

論文内容の要旨

申請者氏名 Noreen Suliani binti Mat Nanyan

In the yeast *Saccharomyces cerevisiae*, the transcription factor Msn2 plays an essential role in response to a variety of environmental stresses by activating the transcription of many genes that contain the stress-responsive elements in the promoters. It was previously reported that overexpression of the *MSN2* gene confers tolerance to several stresses on *S. cerevisiae*. Previous studies also indicate that intracellular amino acids, such as proline, could act as key protectants against various stresses. However, it is unknown whether Msn2 is involved in amino acid homeostasis in *S. cerevisiae*. In this study the applicant focused on the role of Msn2 in the incorporation of amino acids as a global stress response mechanism in *S. cerevisiae*.

First, *MSN2*-overexpressing (*MSN2*-OE) cells showed higher sensitivity to a toxic proline analogue, azetidine-2-carboxylic acid (AZC), and the other amino acid toxic analogues than wild-type cells. Overexpression of *MSN2* increased the intracellular content of AZC, suggesting that Msn2 positively regulates the uptake of proline. Among the proline permease genes, *GNP1* was shown to play a predominant role in the AZC toxicity. Based on qRT-PCR and Western blot analyses, the overexpression of *MSN2* did not induce the transcript levels of *GNP1* or the other proline permease genes, while the Gnp1 protein level was markedly increased in *MSN2*-OE cells. Microscopic observation suggested that the endocytic degradation of Gnp1 was impaired in *MSN2*-OE cells. These results sheds light on a novel link between the Msn2-mediated stress response and the amino acid homeostasis in *S. cerevisiae*.

Next, the applicant found that overexpression of *MSN2* increased ubiquitinated protein levels with reduced free ubiquitin. Among deubiquitinating enzymes (DUBs), it was revealed that the loss of Ubp6 depleted the free ubiquitin level and decreased tolerance to the toxic amino acid analogues. The overexpression of *UBP6* in *MSN2*-OE cells partially complemented the impaired tolerance towards the toxic amino acid analogues. Both protein level and plasma-membrane localization of Gnp1 were increased in *ubp6*-deleted cells, as shown in *MSN2*-overexpressing cells. These results raised two possibilities that i) the excess Msn2 impairs endocytic degradation of Gnp1 through dysfunction of DUBs and ii) the excess Ubp6 may function to enhance the degradation of misfolded proteins in the Msn2-independent manner. In conclusion, this study revealed a novel role of Msn2 on the control of intracellular uptake of amino acids, focusing on the stress-protective effects of amino acids, such as proline. Together with the known effects of Msn2, such as upregulation of antioxidant enzyme genes, Msn2-mediated uptake of amino acids contributes to global stress responses, which guarantee a unicellular microorganism *S. cerevisiae* to adapt against various environmental changes.

やむを得ない事由[図書出版, 学術雑誌等への掲載, 特許・実用新案出願, 個人情報等の保護, その他 ()]により本要旨を非公表とする。

【※該当する事由に○印をすること】

論文審査結果の要旨

申請者氏名 Noreen Suliani binti Mat Nanyan

細胞は、環境中のストレスに応答して遺伝子発現をダイナミックに変化させることで環境に適応する。モデル生物として、また、発酵産業においても有用な微生物である酵母 *Saccharomyces cerevisiae* では、ストレスに応答した遺伝子発現の誘導において転写因子 Msn2 が中心的な役割を果たす。一方で、当研究室における先行研究により、細胞内のプロリンをはじめとするアミノ酸が、ストレス耐性の獲得に関与することも明らかになっている。申請者は、Msn2 と細胞内アミノ酸ホメオスタシスの関連に着目した独創的な研究に挑戦し、以下に示す新たな知見や重要な結果を得た。

- 1) *MSN2* 遺伝子の過剰発現が、毒性のプロリンアナログ（アゼチジン-2-カルボン酸；AZC）を含む複数のアミノ酸アナログに対する感受性を高めることを見出した。
- 2) *MSN2* 遺伝子の過剰発現によって、培地に添加した AZC およびプロリンの細胞内への取込みが上昇することが明らかになった。
- 3) プロリンや AZC を細胞内に取込む細胞膜上のパーミアーゼのうち、Gnp1 のみが *MSN2* 遺伝子の過剰発現によって見られる AZC 高感受性に関与することを示した。
- 4) Msn2 は、Gnp1 の転写調節ではなく翻訳後調節に関与していた。*MSN2* 遺伝子の過剰発現によって、Gnp1 のタンパク質レベルおよび細胞膜局在が増加したことから、Msn2 が Gnp1 のエンドサイトーシスを介した分解を抑制する可能性が示された。
- 5) Msn2 がストレス下における細胞内タンパク質の分解に関与する機構を調べるため、ユビキチンに着目した解析を行った結果、*MSN2* 遺伝子の過剰発現によってタンパク質の脱ユビキチン化酵素が機能障害を受けている可能性が示された。
- 6) 遺伝学的解析の結果、*MSN2* 遺伝子の過剰発現によって引き起こされる表現型が、脱ユビキチン化酵素をコードする *UBP6* 遺伝子の欠損株でも観察されるとともに、*UBP6* 遺伝子の過剰発現によって部分的に抑圧されることを示した。

以上の結果から、酵母 *S. cerevisiae* におけるストレス応答の鍵因子である Msn2 が細胞内アミノ酸ホメオスタシスの制御に関与すること、およびアミノ酸ホメオスタシスがストレス応答に重要な役割を担っていることが明らかになった。Msn2 はストレス耐性に関わるタンパク質の発現を転写レベルで調節することが知られているが、*MSN2* 遺伝子の過剰発現によって脱ユビキチン化酵素が機能障害を受ける可能性が示された。また、プロリンの細胞内取込みを増加させ、ストレス耐性に寄与することが示唆された。以上のように、本論文は酵母における Msn2 のストレス応答とアミノ酸ホメオスタシスの新たな関連性を示すだけでなく、ストレス耐性酵母の育種への応用にも資することから、学術上、応用上貢献するところが少なくない。よって審査委員一同は、本論文が博士（バイオサイエンス）の学位論文として価値あるものと認めた。

やむを得ない事由[図書出版、学術雑誌等への掲載、特許・実用新案出願、個人情報等の保護、その他（ ）]により本要旨を非公表とする。

【※該当する事由に○印をすること】