

論文内容の要旨

申請者氏名 Nguyen Thi Mai Phuong

小胞体は分泌タンパク質などの折り畳みの他、脂質の生合成などを行うオルガネラである。出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* 細胞では、小胞体の機能不全、すなわち小胞体ストレスにより、*HAC1* mRNA はスプライシングされ、転写因子タンパク質へと翻訳される。この細胞応答は Unfolded Protein Response (UPR) と呼ばれ、小胞体内在性分子シャペロンや脂質合成酵素など、小胞体の機能に関わる遺伝子が広範囲に転写レベルで誘導され、小胞体の機能全般が賦活化される。よって、UPR の人為的惹起は、小胞体上でのさまざまな有用物質の生産性を高める可能性がある。そこで申請者は、スプライシング型 *HAC1* mRNA を恒常的に発現する細胞(スプライシング型 *HAC1* 株)を作出した。その株は非ストレス条件下でも強い UPR を示したが、しかし、増殖速度が著しく低下していた。そして、増殖速度は回復したものの UPR 能を失った変異株が高頻度で出現した。

そこで申請者は、この問題を解決すべく研究を続けた。まず、小胞体ストレスを惹起する抗生物質であるツニカマイシンを低濃度で培地に加えた場合、あるいは、小胞体局在型の緑色蛍光タンパク質(GFP)を発現させた場合、スプライシング型 *HAC1* 株の増殖が加速することが見出された。非ストレス条件下で UPR が過度に惹起された場合、小胞体内在性分子シャペロンなどが不必要に過剰産生され、それが正常なタンパク質を攻撃し、細胞に障害を与えるのであろう。一方、小胞体内腔に分子シャペロンの基質となるタンパク質が大量に存在する場合は、過剰な小胞体内在性分子シャペロンがそれらに会合し、細胞にダメージを与えないと考えられる。小胞体局在型 GFP を発現するスプライシング型 *HAC1* 株は、安定的に強い UPR を示し、また、小胞体が高度に拡張していた。そして、その株での小胞体の機能亢進は、脂質の生合成を促進し、油脂や異種性カロテノイドの大量蓄積へと繋がった。

さらに、ゲノム上の遺伝子の変異により、強い UPR 能を保持したまま増殖速度が回復した変異株を、スプライシング型 *HAC1* 株から分離することにも成功した。得られた変異株は、ヒストン脱アセチル化酵素複合体(HDA)の構成因子をコードする *HDA3* 遺伝子のミスセンス変異を有していた。そして、*HDA3* や他の HDA 構成遺伝子の欠損によっても、スプライシング型 *HAC1* 株の増殖は加速し、しかし、UPR 能は失われなかった。これらの知見は将来的に、小胞体機能が増強された酵母株の産業利用への基盤になると期待される。

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 Nguyen Thi Mai Phuong

*Saccharomyces cerevisiae*を代表とする酵母は、単細胞真核生物であり、動植物など真核生物由来の有用物質生産のプラットフォームとしての実用的価値が高い。そして、酵母に分子育種を施し、産生する有用物質の品質や収量を向上させることは、代謝工学における重要なテーマとなっている。真核生物細胞は細胞内に多様なオルガネラを有しており、例えば小胞体など、物質生産に関わるオルガネラも知られている。小胞体は一層の生体膜で覆われた袋状のオルガネラであり、小胞体内腔では分泌タンパク質の折り畳みが進められ、小胞体表層では脂質の生合成が行われる。申請者の研究は、*S. cerevisiae*において小胞体の体積・表面積や機能を人為的に向上させることにより、物質生産能を高めることを目指すものである。

小胞体の機能不全は小胞体ストレスと呼ばれ、折り畳み不全蛋白質の蓄積などを通じ、細胞にダメージを与える。そして、小胞体ストレスに応じ、小胞体の機能に関わる遺伝子の発現が誘導される防衛応答が、Unfolded protein response (UPR)である。そこで申請者は、UPR 惹起を司る転写因子である Hac1 を人為的かつ恒常的に発現させることにより、小胞体の機能が亢進した *S. cerevisiae* 株を作出した。なお、同様の試みは他の複数の研究グループによってなされてきたが、その効果は低く、Hac1 の発現量が低かった可能性が考えられる。一方、申請者が作製した菌株は、Hac1 が十分に発現しており、UPR が恒常的に強く活性化していたが、しかし、その副作用として、増殖速度が著しく低かった。そして、Hac1 遺伝子にミスセンス変異やナンセンス変異が入ることにより、UPR 能が消失して増殖速度が回復した変異体が出現し、元の Hac1 遺伝子発現細胞と容易に置き換わるという事態が頻発した。

そこで本研究で申請者は、Hac1 遺伝子発現株にさらに遺伝子改変を加え、強い UPR を示しつつも増殖が速い株の作出を試みた。その結果、Hac1 遺伝子発現株に弱い小胞体ストレスを与え続けると、ある程度は増殖遅延が回復することが明らかとなった。また、ヒストン脱アセチル化酵素遺伝子の欠損によっても、Hac1 遺伝子発現細胞の増殖は加速した。さらに申請者は、強い UPR を示しつつも増殖速度が回復した Hac1 遺伝子発現株において、小胞体が極度に伸展し、また、油脂や異種性カルテノイドの産生量が向上していることを実証した。なお、*S. cerevisiae* を用いて開発された本技術は、有用分泌タンパク質の実用生産に幅広く用いられている *Pichia pastoris* や、食用油脂や脂質関連分子の生産に関わる研究が進んでいる油脂酵母についても、将来的には適用されると期待される。

以上のように、本論文はオルガネラの機能向上による有用細胞の作出に関して興味深い事例を提示するものであり、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】