

論文内容の要旨

申請者氏名 YASMIN NABILAH BINTI MOHD FAUZEE

真核生物が共有するオルガネラである小胞体は、細胞外に分泌されるタンパク質の折り畳みなどを担うオルガネラである。小胞体の機能不全は小胞体ストレスと総称され、細胞はその状態への防衛応答として、Unfolded protein response (UPR)を引き起こし、小胞体内在性分子シャペロン BiP などの転写レベルでの発現誘導を通じ、小胞体の機能が亢進される。真菌類の多くでは、小胞体ストレス応答を担うのは Ire1 と Hac1 である。Ire1 は小胞体に局在する I 型膜貫通タンパク質であり、小胞体ストレスに応じて RNase 活性を発揮する。そして、Hac1 をコードする mRNA (*HAC1* mRNA) が Ire1 依存的なスプライシングにより成熟し、転写因子である Hac1 が生成される。*Pichia pastoris* は有用分泌タンパク質の生産に頻用されている酵母種であり、申請者は、*P. pastoris* の小胞体の働きがどのように制御されているのかに着目し、Ire1 や Hac1 の機能解析を中心に研究を進めた。そして、最も解析が進んでいる酵母種である *Saccharomyces cerevisiae* と比した明確な相違点をいくつか見い出すに至った。

第一の知見は、*S. cerevisiae* の場合とは異なり、*P. pastoris* では非ストレス状態においても Ire1 が活性化し、*HAC1* mRNA スプライシングを通じて UPR を引き起こすことである (ただし、小胞体ストレスを与えることにより、さらに強く UPR が惹起される)。この事象はおそらく、*S. cerevisiae* に比して *P. pastoris* ではタンパク質分泌が盛んであり、非ストレス状態でも小胞体に負荷がかかっているためであると考えられる。

第二の知見は、UPR によって発現誘導される遺伝子の違いである。BiP など小胞体における分泌タンパク質の折り畳みや修飾に関わる因子は、*S. cerevisiae* でも *P. pastoris* でも共通して UPR により発現誘導される。一方、*S. cerevisiae* にて認められた膜脂質合成系酵素群の発現誘導は、*P. pastoris* では引き起こされなかった。

さらに第三の知見として、*P. pastoris* においては、Ire1 は *HAC1* 非依存的な機能も有することを申請者は見出した。申請者はゲノム編集法などを用い、*IRE1* 遺伝子破壊株、*HAC1* 遺伝子破壊株、そして *IRE1* 遺伝子 *HAC1* 遺伝子 2 重破壊株を作製し、それらを RNAseq 解析に供することにより、遺伝子発現プロファイルを比較した。その結果、小胞体で働く蛋白質群の転写レベルでの誘導、すなわち UPR には、Ire1 と *HAC1* の双方が必要であるが、Ire1 のみに依存する (*IRE1* 遺伝子破壊では変動するが、*HAC1* 遺伝子破壊では変動しない) 遺伝子も数多く存在することが分かった。そして、Ire1 は *HAC1* 非依存的に、サイトゾルにおけるタンパク質の凝集を防ぎ、熱ショック応答 (一般的に、サイトゾルや核のタンパク質の折り畳みが不全となることで惹起すると考えられている) を抑制していることも分かった。また、*S. cerevisiae* とは異なり、*P. pastoris* においては高温ストレスでも Ire1 は強く活性化し、熱耐性にも Ire1 が関与することが見い出された。

すなわち、本研究において、UPR や UPR 関連因子が織りなす生理学的な事象として、*P. pastoris* のおいては *S. cerevisiae* では見られなかったユニークなものが見い出され、その多様性が示されたと考えている。

論文審査結果の要旨

申請者氏名 YASMIN NABILAH BINTI MOHD FAUZEE

Pichia pastoris は、誘導性かつ強力な遺伝子発現プロモーターが見い出されており、また、酵母類の中では発達したタンパク質分泌経路を有し、バイオ医薬品（ヒト由来分泌タンパク質）など、*Pichia pastoris* を用いた様々なタンパク質の分泌生産の実用化が進められている。分泌タンパク質の折り畳みや修飾は小胞体にて行われることから、小胞体のサイズや機能の増大を通して、産物となる分泌タンパク質の質や量を向上させようとする試みが、国内外の多くの研究者によって進められている。そのためのアプローチの一つが、Unfolded protein response (UPR) を利用したものである。UPR とは元来、小胞体ストレスに応じて惹起され、小胞体局在分子シャペロンなど小胞体機能に関わるタンパク質群が転写レベルで誘導される現象である。そして、UPR に関わる転写因子である Hac1 を恒常的に発現させることにより、非ストレス時においても人為的に小胞体の機能を亢進し、タンパク質分泌能を向上させることができたという報告もなされている。

P. pastoris と同じく *Saccharomycetaceae* 科の酵母である *Saccharomyces cerevisiae* は、基礎分子細胞生物学における重要なモデル生物である。UPR おける細胞内情報伝達も *S. cerevisiae* を用いた研究によって解明され、小胞体ストレスセンサー Ire1 や、その下流で機能する転写因子である Hac1 も、まず、*S. cerevisiae* にて発見された。そして、*P. pastoris* にも *IRE1* 遺伝子や *HAC1* 遺伝子が存在し、上述のように、Hac1 を人為的かつ恒常的に発現させるという応用展開が進められている。しかし、Ire1 や Hac1 の機能が *P. pastoris* と *S. cerevisiae* において同一か否か、また、*P. pastoris* 細胞ではいかなる局面において UPR が引き起こされるのか等、基礎的あるいは生理学的な視点に立った研究は、従来はほとんどなされてこなかった。

そこで申請者は、*P. pastoris* を材料として UPR に関わる基礎的な研究を進め、*S. cerevisiae* との相違点として以下の知見を得た。(1)*P. pastoris* 細胞では非ストレス状態でも UPR が惹起されており、また、それは旧来から知られている小胞体ストレスだけではなく、熱ストレスによっても増強される。(2)Ire1 は、*HAC1* mRNA スプライシングを通じて UPR を引き起こすとともに、*HAC1* 非依存的な機能も有し、サイトゾルにおけるタンパク質の凝集を防ぎ、熱ショック応答を抑える。

本研究で得られた知見は、種間での UPR の多様性を示し、また、小胞体におけるタンパク質品質管理システム (UPR) とサイトゾルにおけるタンパク質品質管理システム (熱ショック応答) の間に未だ明らかになっていない関係性が存在することを示唆するものである。さらに、本研究で明らかとなった *P. pastoris* における Ire1 や Hac1 の機能に関する知見は、小胞体の機能強化に向けた *P. pastoris* のさらなる分子育種のための礎になると期待される。以上のように、本論文は真菌類の UPR についての重要な新局面にアプローチするものであり、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。