

論文内容の要旨

申請者氏名 Watcharawipas Akaraphol

酵母 *Saccharomyces cerevisiae* は発酵産業において広く利用されている有用微生物であるが、木質セルロースからのバイオエタノール生産においては、原料処理によって生じる酢酸ナトリウムが酵母の生育・発酵を阻害することが課題となっている。当研究室で以前に単離された酵母の酢酸ナトリウム耐性変異株は、生育に必須なユビキチンリガーゼである Rsp5 の基質認識を担う WW ドメイン上にアミノ酸置換 (Thr255Ala) を有しているが、この変異が酢酸ナトリウム耐性を上昇させる機構は不明であった。そこで本研究では、酢酸ナトリウム耐性の獲得における Rsp5 の関与を解析するとともに、得られた知見をバイオエタノール生産に応用することを目的とした。

まず、T255A 変異と既存の機能欠失変異 (A401E, L733S) の比較により、Rsp5 の機能が酢酸ナトリウム耐性の付与に必要であり、T255A が機能獲得変異であることを示した。T255A は塩化ナトリウムや酢酸カリウム、酢酸などに対する耐性を付与しないことから、酢酸ナトリウム耐性のみを選択的に高めることも判明した。これまでに、高浸透圧ストレス応答で中心的な役割を示す high-osmolarity-glycerol (HOG) シグナル経路が塩化ナトリウム耐性に関与することは報告されていたが、この経路の MAP キナーゼである Hog1 や MAP キナーゼキナーゼである Pbs2 の欠損が T255A 変異による酢酸ナトリウム耐性の上昇を抑圧することが明らかになった。しかし、T255A 変異は Hog1 のリン酸化レベルには影響を及ぼさなかったことから、T255A 変異が HOG シグナル経路の下流に作用することが示唆された。次に、下流因子として細胞膜上の酢酸またはナトリウムのトランスポーターに着目したところ、ナトリウムの排出ポンプとして知られる Ena1/2/5 の機能が酢酸ナトリウム耐性の獲得に必須であることを見出した。ICP-MS を用いた解析の結果、酢酸ナトリウム処理に伴う細胞内ナトリウムレベルの増大が T255A 変異によって顕著に抑制され、HOG1 遺伝子の破壊によってその効果は打ち消された。以上の結果から、T255A 変異は、HOG シグナル経路の下流に作用し、Ena1/2/5 によるナトリウムの排出を促進することで酢酸ナトリウム耐性を高めるというモデルが考えられた。さらに、Rsp5 による基質認識に重要なアダプタータンパク質に関する解析も行い、Ena1 の細胞膜への輸送に関与することが報告されている Rim8 も酢酸ナトリウム耐性の上昇に寄与することを示した。

T255A 変異によって誘導される酢酸ナトリウム耐性をバイオエタノール生産に応用するため、実用バイオエタノール酵母の二倍体株 (Ethanol Red 株) に同変異を導入した。その結果、この株においても酢酸ナトリウム耐性の上昇が認められ、酢酸ナトリウム存在下でのエタノール発酵速度が有意に向上することが実証された。以上の結果から、Rsp5 を介した酢酸ナトリウム耐性機構への理解を深めるとともに、これを応用したバイオエタノール生産効率の向上に資する有用性の高い知見を得ることができた。

(別紙2)

論文審査結果の要旨

申請者氏名 Watcharawipas Akaraphol

酵母 *Saccharomyces cerevisiae* は、発酵産業において広く利用されている有用微生物であるが、実際の発酵生産環境では、様々なストレスによって酵母の生育と発酵が阻害される。したがって、酵母のストレス応答機構の解明はストレス耐性が向上した酵母の育種技術の開発にも繋がり、基礎研究のみならず産業利用の観点でも重要である。申請者は、酵母の生育に必須なユビキチンリガーゼ Rsp5 の変異株 (T255A 株) が示す新規な表現型を端緒として、未だ詳細な知見の乏しい酢酸ナトリウムストレス応答の解明に挑戦し、以下に示す新たな知見や重要な結果を得た。

- 1) 表現型解析を行った結果、T255A 変異は酢酸ナトリウム耐性を特異的に上昇させる機能獲得変異であることを示した。酵母において、酢酸耐性や塩化ナトリウム耐性に関する研究は進んでいるが、酢酸とナトリウムの組合せによって生じるユニークなストレスに対する細胞応答に Rsp5 が関与することが初めて示唆された。
- 2) 酢酸ナトリウムストレス下での生育、Hog1 のリン酸化、Rim8 のユビキチン化の結果を遺伝学的に解析したところ、T255A 変異を介した酢酸ナトリウム耐性の獲得が、HOG シグナル伝達経路およびアダプタータンパク質 Rim8 の下流因子の機能強化に依存したものであることが示された。
- 3) 酵母が酢酸ナトリウム耐性を獲得するためには、細胞膜上のナトリウムポンプ Ena1/2/5 の機能が必須であることを明らかにした。
- 4) 細胞内のナトリウム含量を測定した結果、T255A 変異は細胞外からのナトリウムの流入に対抗し、ナトリウムの排出を促進することを見出した。
- 5) 酢酸には細胞外からのナトリウムの流入を促進する作用があり、酢酸とナトリウムの組合せにより、細胞に負荷されるストレスの程度が高まることが示唆された。
- 6) T255A 変異をバイオエタノール生産に用いられている酵母二倍体株に導入したところ、酢酸ナトリウム存在下での生育とエタノール発酵速度の向上が認められた。

これらの結果から、Rsp5 による酢酸ナトリウム耐性獲得の分子機構の解明に繋がる重要な知見が得られ、これまで体系的な解析が不十分であった酵母の酢酸ナトリウムストレス応答に関する一つのモデルを提案するに至った。酢酸ナトリウムは、バイオエタノールの原料として期待される木質バイオマスの酸処理などによって容易に生成する発酵阻害物質であり、酵母への酢酸ナトリウム耐性の付与は発酵・エネルギー産業上の課題であった。本研究により、酢酸ナトリウムストレスを回避する具体的な方策を示したことは高く評価されるべき点であると考えられる。以上のように、本論文は Rsp5 の新規機能の解明とその活用の両者を達成した内容となっており、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。