

氏名	ぐえん ち み じえん NGUYEN THI MY TRINH
学位(専攻分野)	博士(学術)
学位記番号	博甲第807号
学位授与の日付	平成28年9月26日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
研究科・専攻	工芸科学研究科 生命物質科学専攻
学位論文題目	Study on yeast response to vanillin, a fermentation inhibitor derived from lignocellulosic biomass (リグノセルロース系バイオマス由来発酵阻害物質バニリンに対する酵母のストレス応答の解析)
審査委員	(主査)准教授 井沢真吾 教授 山口政光 教授 亀井加恵子

### 論文内容の要旨

申請論文は、「序論」、第1-4章からなる本編、および「結論」、から構成されている。序論では、本論文の背景と目的が述べられている。最初に、リグノセルロース系バイオマスから製造される第二世代バイオエタノールの利点および技術的な課題について述べ、バイオマスの糖化前処理の際に副産物として生じるバニリンやフルフラール、5-ヒドロキシメチルフルフラール(HMF)などの発酵阻害物質が酵母の生育や発酵を阻害することを概説している。フルフラールは細胞内で活性酸素種(ROS)の蓄積を引き起こし、酸化ストレス応答を誘導することがすでに報告されているが、最も毒性の高いバニリンについてはまったく不明であった。そのため、第1章と第2章の研究を実施した背景として、フルフラールに起因する酸化ストレスについて言及している。さらに、高濃度のバニリンが翻訳抑制を引き起こすデータを示し、第3章および第4章でバニリン存在下でも優先的に翻訳される遺伝子の同定に取り組んだ背景を説明した。また、優先的に翻訳される遺伝子の同定によってもたらされる有用性についても言及している。

第1章では、フルフラールと同様に、バニリンによっても酵母細胞内でROSの蓄積が生じることを確認した。ROSの蓄積の結果、ミトコンドリア形態が小さな断片状に劇的に変化することを明らかにするとともに、バニリンによるミトコンドリアの断片化が可逆的な応答であることも確認している。さらに、バニリン存在下では酸化ストレス応答性の転写活性化因子Yap1の細胞内局在が細胞質から核へと移行し、バニリン濃度依存的にYap1の標的遺伝子の転写活性化が引き起こされることを見出している。また、Yap1欠損株がバニリン高感受性を示すことも確認した。これらの解析結果から、バニリンによって酸化ストレスが細胞内で惹起し酵母の酸化ストレス応答が誘導されること、Yap1が活性化されバニリン耐性の獲得において重要な役割を担うことを明らかにしている。

第2章では、グルタチオンなどの抗酸化物質の再還元にはNADPHが還元力として用いられることや、バニリンをバニリルアルコールへと無毒化するアルコール脱水素酵素Adh6およびAdh7の還元補酵素としてもNADPHが利用されることから、バニリンに対する十分な耐性を獲得する上でNADPHの供給源であるペントースリン酸経路(PPP)が重要な役割を担うと推測し、PPPの律

速酵素であるグルコース-6リン酸脱水素酵素の欠損株(*zwf1Δ*株)を詳細に解析した。第1章で述べたような Yap1 の活性化やミトコンドリアの断片化などが、*zwf1Δ*株では野生株よりも速やか且つ高いレベルで惹起されることを見出した。また、8 mM バニリン存在下での生育速度やバニリンの還元効率が *zwf1Δ*株は野生株よりも遅いことを確認した。さらに、高濃度のバニリンによってプロセッシングボディ(P-body)やストレス顆粒(SG)と呼ばれる翻訳抑制に関与する mRNP granule の形成が誘導されることを蛍光顕微鏡解析によって明らかにした。*zwf1Δ*株は P-body の形成についても野生株より高いバニリン感受性を示したが、SG 形成については有意な差が認められなかった。これらの結果から、翻訳抑制を引き起こす高濃度バニリンよりも、酸化的ストレスを惹起する比較的 low 濃度のバニリンに対する耐性獲得において、Zwf1 および PPP が重要な役割を担っていると結論付けた。

第3章では、翻訳抑制を引き起こす高濃度バニリン存在下でも選択的・優先的に翻訳される遺伝子(mRNA)の同定をおこなった。バニリンを無毒なバニリルアルコールへと還元する Adh6 およびそのパラログである Adh7 の発現パターンや生理的役割の違いなどは不明であった。そこで、*ADH6* と *ADH7* の発現パターンを qRT-PCR と Western blot で解析した。その結果、両遺伝子とも高濃度バニリン存在下で mRNA レベルが顕著に上昇することが確認された。しかし、Adh6 タンパク質レベルは一定のままであり、*ADH6* の転写レベルの上昇がタンパク質レベルに反映されなかったことや、翻訳伸長阻害剤シクロヘキシミド処理によってもタンパク質レベルが変化しなかったことなどから、高濃度バニリン存在下で *ADH6* mRNA は翻訳されないことを確認した。一方、Adh7 タンパク質は非ストレス条件下および低濃度のバニリン存在下でも検出されなかったが、高濃度バニリン存在下では *ADH7* mRNA レベルの上昇に対応して Adh7 タンパク質レベルも顕著に増加した。これらの結果から、翻訳が強く抑制される高濃度バニリン存在下でも *ADH7* mRNA は選択的・優先的に翻訳されることが明らかとなった。また、グルコース枯渇による翻訳抑制下での優先的な翻訳には遺伝子のプロモーター領域が重要であると報告されていたことから、*ADH7* のプロモーター領域を用いることで任意の遺伝子を高濃度バニリン存在下で発現させることが可能か検討した。その結果、*GFP*、*GPX2*、*ADH6* いずれの遺伝子もバニリンストレス下で優先的に翻訳・発現させることに成功した。さらに、*ADH7* プロモーター制御下で *ADH6* を発現するプラスミド(*pRS423-ADH7<sub>Pro</sub>-ADH6-ADH7<sub>Ter</sub>*)を導入した酵母細胞がバニリンに対し高い耐性を示すようになったことから、*ADH7* プロモーターによる高濃度バニリン存在下での遺伝子発現の改変が、第二世代バイオエタノールの製造効率や酵母のバニリン耐性などの改善に有効であることを示した。

第4章では、*ADH7* 以外の高濃度バニリン存在下で優先的に翻訳される遺伝子の探索をおこなった。所属研究室では *BDH2* も高濃度バニリン存在下で効率的に翻訳されることを確認していたため、*ADH7* と *BDH2* のプロモーターに共通する転写因子認識配列を持つ遺伝子を選抜し、更にフルフラールや HMF によって転写量が増加する機能未知の遺伝子として *YLL056c* を候補の一つとして絞り込んだ。*YLL056c* は高濃度バニリンにตอบสนองして転写量及び翻訳レベルが著しく上昇し、更に 15 mM や 20 mM のバニリン存在下では *ADH7* 以上に効率よく発現誘導がかかることを確認した。そこで、この遺伝子を新たに *VIE1* (vanillin induced expression 1)と命名した。また、*ADH7* プロモーターと同様に *VIE1* プロモーターを用いることで、高濃度バニリン存在下で任意の遺伝子の発現を誘導することに成功した。さらに、*ADH7* プロモーターの場合と異なり、フルフラール

や HMF によっても *VIE1* プロモーター制御下の遺伝子の発現が誘導されることを見出した。そのため、バイオエタノールの製造効率や酵母のバニリン耐性などの改良において、*ADH7* プロモーター以上に *VIE1* プロモーターは有効なプロモーターだと考えられると結論している。

結論の章では、研究結果のとりまとめと、今後の発展性について述べている。特に、複数の発酵阻害物質に応答する *VIE1* プロモーターのバイオエタノール製造における活用法について言及し、*ZWF1* 遺伝子の発現強化や糖代謝系の強化などに関して今後の計画を記述している。

### 論文審査の結果の要旨

廃材や稲藁などのリグノセルロース系バイオマスを原料とする第二世代バイオエタノールは、食料と競合しないため、その普及拡大が強く期待されている。加圧熱水や酸などで破碎・加水分解を行うことでリグノセルロース系バイオマスからグルコースやキシロースなどの単糖類を抽出するが、このような糖化前処理によってバニリンやフルフラール、5-ヒドロキシメチルフルフラール(HMF)などのバイオマス由来発酵阻害物質が副産物として必ず生じる。これらの発酵阻害物質は酵母の生育や発酵能を抑制するため、アルコール発酵効率の低下を招き、バイオエタノールの低価格化を妨げる主な要因となっている。なかでもバニリンは最も毒性が高く、バイオエタノールの普及を目指す上で、バニリンに対する酵母のストレス応答機構の解明や、バニリン耐性の改良法の確立が急務である。しかし、フルフラールなどと比べてバニリンに対する酵母の応答機構はほとんど未解明であり、申請者はその解明に取り組むと共に、バニリン耐性を改善するために有用な情報の探索をおこなった。

申請者は、バニリンが酸化的ストレスを惹起し、酵母細胞内で酸化的ストレス応答を誘導されるか検討した。酸化的ストレス応答性の転写因子 *Yap1* の局在変化や *Yap1* 標的遺伝子の転写活性化、細胞内酸化度、ミトコンドリア形態の解析を通じて、バニリン存在下では酸化的ストレスが惹起して酵母は酸化的ストレスに対する応答を誘導することを明らかにした。これらの結果は、酸化的ストレスがバニリンによる細胞毒性の一因であることを強く示唆している。加えて、細胞内還元力の維持に不可欠な NADPH の主たる供給源であるペントースリン酸系路(PPP)の律速酵素であるグルコース-6-リン酸脱水素酵素(G6PDH)の欠損株を用いた解析を行い、NADPH の供給がバニリンに対する耐性獲得において不可欠であることを確認している。これらの研究成果は、酵母のバニリン耐性の向上を図る上で、抗酸化酵素だけでなく PPP 活性の適切な補強にも配慮する必要性を示しており、第二世代バイオエタノール製造効率を改良する上で有用な知見である。さらに申請者は、高濃度バニリンによる翻訳抑制下でも優先的に発現する遺伝子の同定を行った。*ADH7* と *VIE1* 遺伝子は通常ほとんど発現していないが、他の遺伝子の翻訳が抑制される高濃度バニリン存在下では転写の活性化と翻訳が効率的に行われることを明らかにした。高濃度バニリンによる翻訳抑制を乗り越え優先的に翻訳される遺伝子の同定はこれまで報告例がなく、世界に先駆けた重要な発見である。また、両遺伝子のプロモーターを利用することで任意の遺伝子の発現を高濃度バニリン存在下で誘導することにも成功している。これらのオリジナルな知見は、バニリンに対する酵母の応答機構に関する理解を深めるという学問的意義を持つだけでなく、バイオエタノール製造効率の改良においてこれまでにない実践的なアプローチを提唱している。本論文の内容は、査読制のある国際的学会誌に申請者が筆頭著者として発表した下記 3 編の論文を基礎としている。

T. T. M. Nguyen, A. Iwaki, and S. Izawa (2015) The *ADH7* promoter of *Saccharomyces cerevisiae* is

vanillin-inducible and enables mRNA translation under severe vanillin stress. *Frontiers Microbiol.* **6**, 1390.

T. T. M. Nguyen, S. Kitajima, and S. Izawa (2014) Importance of glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PDH) for vanillin tolerance in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biosci. Bioeng.*, **118**, 263-269.

T. T. M. Nguyen, A. Iwaki, Y. Ohya, and S. Izawa (2014) Vanillin causes the activation of Yap1 and mitochondrial fragmentation in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biosci. Bioeng.*, **117**, 33-38.