

博士論文（要約）

酵母 *Yarrowia lipolytica* の *n*-アルカン代謝  
とその制御機構に関する研究

岩間 亮

# 目次

略称について .....	8
序章 .....	11
<i>n</i> -アルカン資化性酵母.....	11
<i>Yarrowia lipolytica</i> .....	11
<i>Y. lipolytica</i> における <i>n</i> -アルカン代謝経路.....	12
1) <i>n</i> -アルカンの取り込み .....	12
2) <i>n</i> -アルカンから脂肪酸への変換 .....	12
3) 脂肪酸の代謝.....	13
<i>n</i> -アルカン資化に関わる P450 .....	13
1) シトクロム P450.....	13
2) <i>n</i> -アルカン資化性酵母と P450ALK .....	14
<i>Y. lipolytica</i> における <i>n</i> -アルカンに対する転写応答機構.....	15
<i>Y. lipolytica</i> における脂肪酸に対する転写応答機構.....	17
<i>Y. lipolytica</i> の網羅的転写解析.....	17
本研究の目的と構成 .....	18
図表 .....	19
Figure 0-1. <i>Y. lipolytica</i> における <i>n</i> -アルカン代謝経路のモデル.....	19
Figure 0-2. Yas1p、Yas2p、Yas3p による <i>ALK1</i> の発現制御機構 .....	20
Figure 0-3. <i>Y. lipolytica</i> の網羅的転写解析 .....	21
第1章 Alk タンパク質群の機能解析 .....	24
1-1 緒言 .....	24
1-2 実験方法と材料.....	25
1-2-1 菌株、遺伝子、培地 .....	25
1-2-2 培養条件 .....	29
1-2-3 プラスミド .....	29
1-2-4 プラスミドの構築 .....	34
1-2-5 遺伝子操作 .....	48
1-2-6 Polymerase Chain Reaction (PCR).....	48
1-2-7 塩基配列の決定 .....	48
1-2-8 <i>Y. lipolytica</i> の形質転換 .....	49
1-2-9 <i>Y. lipolytica</i> の全 DNA の調製 .....	49
1-2-10 <i>Y. lipolytica</i> の全 RNA の調製.....	49
1-2-11 Rapid amplification of 5' and 3' cDNA ends (RACE).....	50

1-2-12 CO 還元差スペクトル測定.....	50
1-2-13 細胞内の <i>n</i> -アルカン代謝産物解析.....	51
1-2-14 $\beta$ -ガラクトシダーゼ活性測定.....	52
1-2-15 培養液中の脂肪酸解析.....	53
<b>1-3 結果.....</b>	<b>54</b>
1-3-1 $\Delta alk1-12$ 株の解析.....	54
1-3-2 <i>ALK</i> 遺伝子群の機能解析.....	56
1-3-3 Alk タンパク質の基質認識機構.....	59
<b>1-4 考察.....</b>	<b>61</b>
1-4-1 Alk タンパク質群の <i>n</i> -アルカン資化に対する役割.....	61
1-4-2 Alk タンパク質群の基質特異性.....	62
1-4-3 <i>Y. lipolytica</i> における 12 種の <i>ALK</i> 遺伝子群の生理的意義.....	63
1-4-4 <i>Y. lipolytica</i> における長鎖アルコール、長鎖アルデヒドの酸化酵素の存在.....	65
1-4-5 Alk タンパク質群の基質認識機構.....	65
1-4-6 <i>Y. lipolytica</i> における CYP52 ファミリーの P450 の進化.....	66
<b>図表.....</b>	<b>67</b>
Figure 1-0. <i>Y. lipolytica</i> における <i>ALK</i> 遺伝子群とその全破壊株の作製.....	67
Figure 1-1. 各 <i>ALK</i> 遺伝子破壊株の <i>n</i> -アルカンを含む炭素源とした場合の生育.....	68
Figure 1-2. $\Delta alk1-12$ 株の <i>n</i> -アルカン代謝産物での生育.....	69
Figure 1-3. <i>Y. lipolytica</i> 細胞を用いた CO 還元差スペクトル測定.....	70
Figure 1-4. 野生型株、 $\Delta alk1-12$ 株、 $\Delta alk1-12$ <i>ALK1</i> 株における <i>n</i> -ドデカン代謝産物.....	71
Figure 1-5. Alk9p の N 末端配列の確認.....	72
Figure 1-6. <i>Y. lipolytica</i> 細胞における個々の Alk タンパク質の発現.....	73
Figure 1-7. 4xARR1 プロモーター下で各 <i>ALK</i> 遺伝子を発現する $\Delta alk1-12$ 株の <i>n</i> -アルカンでの生育.....	75
Figure 1-8. ドデカン酸を含む培地における各 <i>ALK</i> 遺伝子単独発現株によるドデカン二酸および 12-ヒドロキシドデカン酸の生産.....	76
Figure 1-9. Alk1p と Alk5p の N 末端領域を置換したキメラタンパク質の解析.....	77
Figure 1-10. Alk1p と Alk5p のアミノ酸置換体の解析 (1).....	78
Figure 1-11. Alk1p と Alk5p のアミノ酸置換体の解析 (2).....	80
Figure 1-12. <i>Y. lipolytica</i> における Alk タンパク質群とその基質特異性.....	82
Figure 1-13. <i>n</i> -アルカン資化性酵母と CYP52 ファミリーの P450 の系統樹.....	83
Table 1-1. 各 <i>ALK</i> 遺伝子破壊株の <i>n</i> -アルカンを単一の炭素源とした場合の生育.....	85
Table 1-2. 各 <i>ALK</i> 遺伝子破壊株のグルコースおよび <i>n</i> -アルカンを炭素源とした場合の生育.....	86

Table 1-3. 4xARR プロモーター下で各 <i>ALK</i> 遺伝子を発現する $\Delta alk1-12$ 株の様々な鎖長の <i>n</i> -アルカンにおける生育.....	87
Table 1-4. 4xARR1 プロモーター下で各 Alk1p 変異体または Alk5p 変異体を発現する $\Delta alk1-12$ 株の様々な鎖長の <i>n</i> -アルカンにおける生育.....	88
<b>第2章 長鎖アルコール酸化に関わる酵素の同定と機能解析 .....</b>	<b>90</b>
<b>2-1 緒言.....</b>	<b>90</b>
<b>2-2 実験方法と材料.....</b>	<b>90</b>
2-2-1 菌体、遺伝子、培地 .....	90
2-2-2 培養条件 .....	95
2-2-3 プラスミド .....	95
2-2-4 プラスミドの構築 .....	97
2-2-5 遺伝子操作 .....	108
2-2-6 PCR.....	108
2-2-7 塩基配列の決定 .....	108
2-2-8 <i>Y. lipolytica</i> の形質転換 .....	108
2-2-9 Pop-in/pop-out 法による破壊株の作製 .....	108
2-2-10 <i>Y. lipolytica</i> の全 DNA の調製 .....	109
2-2-11 サザンハイブリダイゼーション .....	109
2-2-12 スポットアッセイによる酵母の植菌 .....	109
2-2-13 酵母の生菌率測定 .....	109
2-2-14 細胞内の <i>n</i> -アルカン代謝産物解析 .....	110
2-2-15 蛍光顕微鏡観察 .....	110
2-2-16 <i>Y. lipolytica</i> 細胞抽出液の調製 .....	110
2-2-17 細胞抽出液の簡易分画 .....	110
2-2-18 SDS-PAGE .....	111
2-2-19 ウェスタン解析 .....	111
2-2-20 $\beta$ -ガラクトシダーゼ活性測定 .....	112
<b>2-3 結果.....</b>	<b>113</b>
2-3-1 アルコールデヒドロゲナーゼ、長鎖アルコールオキシダーゼ遺伝子の全破壊株の生育 .....	113
2-3-2 ALCY02 株の長鎖アルコールに対する感受性.....	113
2-3-3 ALCY02 株における <i>n</i> -アルカン代謝産物の解析 .....	114
2-3-4 細胞外の長鎖アルコールの資化に関わる遺伝子の特定 .....	114
2-3-5 Adh1p、Adh3p、Fao1p の細胞内局在解析.....	115
2-3-6 <i>ADH1</i> 、 <i>ADH3</i> 、 <i>FAO1</i> のプロモーター活性の解析 .....	116
2-3-7 Alk タンパク質群の長鎖アルコール酸化への関与 .....	116

<b>2-4 考察</b> .....	<b>117</b>
2-4-1 長鎖アルコール酸化におけるアルコールデヒドロゲナーゼの機能 .....	117
2-4-2 長鎖アルコール酸化における長鎖アルコールオキシダーゼの機能 .....	118
2-4-3 長鎖アルコール酸化に関わる遺伝子群の転写制御 .....	118
2-4-4 細胞外から取り込んだ長鎖アルコールの代謝と細胞内で生じる <i>n</i> -アルカン由来の長鎖アルコールの代謝 .....	119
2-4-5 Alk タンパク質群の長鎖アルコール酸化の関与 .....	119
<b>図表</b> .....	<b>121</b>
Figure 2-1. 本章で使う株の作製とサザン解析 .....	121
Figure 2-2. アルコールデヒドロゲナーゼ遺伝子群および長鎖アルコールオキシダーゼ遺伝子の破壊株の様々な炭素源における生育 .....	125
Figure 2-3. ALCY02 株の長鎖アルコールに対する感受性 .....	126
Figure 2-4. ALCY02 株の細胞内 <i>n</i> -ドデカン代謝産物 .....	127
Figure 2-5. 長鎖アルコール酸化に関わる遺伝子の同定 .....	128
Figure 2-6. Adh1p、Adh3p および Fao1p の細胞内局在解析.....	129
Figure 2-7. <i>ADH1</i> 、 <i>ADH3</i> 、 <i>FAO1</i> のプロモーター活性 .....	130
Figure 2-8. Alk タンパク質群の長鎖アルコール酸化に対する機能 .....	131
Figure 2-9. Adh タンパク質群の系統樹 .....	132
<b>第3章 長鎖アルデヒドの酸化に関わる酵素の同定と機能解析</b> .....	<b>134</b>
<b>3-1 緒言</b> .....	<b>134</b>
<b>3-2 実験方法と材料</b> .....	<b>134</b>
3-2-1 菌体、遺伝子、培地 .....	134
3-2-2 培養条件 .....	137
3-2-3 プラスミド .....	137
3-2-4 プラスミドの構築 .....	139
3-2-5 遺伝子操作 .....	148
3-2-6 PCR.....	149
3-2-7 塩基配列の決定 .....	149
3-2-8 <i>Y. lipolytica</i> の形質転換 .....	149
3-2-9 Pop-in/pop-out 法による破壊株の作製 .....	149
3-2-10 <i>Y. lipolytica</i> の全 DNA の調製 .....	149
3-2-11 サザンハイブリダイゼーション .....	149
3-2-12 <i>Y. lipolytica</i> の全 RNA の調製.....	149
3-2-13 ノーザンハイブリダイゼーション .....	149
3-2-14 RACE.....	150
3-2-15 全 RNA からの DNA の除去 .....	150

3-2-16 全 RNA を鋳型とした逆転写反応.....	151
3-2-17 定量的リアルタイム PCR.....	151
3-2-18 <i>Y. lipolytica</i> 細胞破碎液 (FALDH 活性測定用) の調製.....	151
3-2-19 FALDH 活性測定.....	152
3-2-20 <i>E. coli</i> を用いた Hfd タンパク質の発現.....	153
3-2-21 <i>E. coli</i> 細胞破碎液 (FALDH 活性測定用) の調製.....	153
3-2-22 SDS-PAGE.....	154
3-2-23 蛍光顕微鏡観察.....	154
3-2-24 スポットアッセイによる酵母の植菌.....	154
<b>3-3 結果.....</b>	<b>154</b>
3-3-1 長鎖アルデヒドデヒドロゲナーゼ遺伝子の探索と RACE 解析.....	154
3-3-2 <i>HFD</i> 遺伝子群の発現解析.....	156
3-3-3 <i>HFD</i> 遺伝子群破壊株の生育.....	156
3-3-4 長鎖アルデヒドデヒドロゲナーゼ活性測定.....	157
3-3-5 Hfd タンパク質の細胞内局在解析.....	158
3-3-6 <i>HFD2</i> の 2 つのスプライシングバリエントの機能解析.....	159
3-3-7 Alk タンパク質群や Ald タンパク質群の長鎖アルデヒド酸化への関わり ..	159
<b>3-4 考察.....</b>	<b>160</b>
3-4-1 <i>Y. lipolytica</i> における <i>HFD</i> 遺伝子群の役割.....	161
3-4-2 <i>n</i> -アルカン代謝における長鎖アルデヒドの酸化.....	162
3-4-3 <i>HFD2</i> のスプライシングバリエントの役割.....	163
3-4-4 Hfd タンパク質群の鎖長特異性.....	163
<b>図表.....</b>	<b>165</b>
Figure 3-1. <i>Y. lipolytica</i> における長鎖アルデヒドデヒドロゲナーゼ.....	165
Figure 3-2. <i>HFD1</i> – <i>HFD4</i> の転写解析.....	166
Figure 3-3. 本章で使う株の作製とサザン解析.....	167
Figure 3-4. <i>HFD</i> 遺伝子群の破壊株の様々な炭素源における生育とコロニー形態	169
Figure 3-5. Hfd タンパク質群の FALDH 活性.....	170
Figure 3-6. Hfd タンパク質の細胞内局在.....	171
Figure 3-7. Hfd2Ap および Hfd2Bp の機能と細胞内局在.....	172
Figure 3-8. Alk タンパク質群の長鎖アルデヒド資化・解毒に対する機能.....	173
Table 3-1. 3'-RACE 解析により得られた <i>HFD2</i> のバリエント A およびバリエント B の転写産物の数.....	174
Table 3-2. 各破壊株の様々な鎖長の <i>n</i> -アルカンにおける生育.....	175
Table 3-3. 各破壊株のグルコースおよび <i>n</i> -アルカンを炭素源とした生育.....	176
Table 3-4. 各破壊株の長鎖アルコール、長鎖アルデヒド、脂肪酸における生育.....	177

第4章 <i>n</i> -アルカン資化に関わる Osh タンパク質群の機能解析 .....	178
第5章 細胞膜-小胞体コンタクトサイトの <i>n</i> -アルカン資化への関与 .....	180
第6章 <i>n</i> -アルカン代謝に関与する遺伝子の転写制御 .....	182
6-1 緒言 .....	182
6-2 実験方法と材料 .....	183
6-2-1 菌体、遺伝子、培地 .....	183
6-2-2 培養条件 .....	187
6-2-3 プラスミド .....	187
6-2-4 プラスミドの構築 .....	187
6-2-5 遺伝子操作 .....	187
6-2-6 PCR .....	187
6-2-7 塩基配列の決定 .....	187
6-2-8 <i>Y. lipolytica</i> の形質転換 .....	187
6-2-9 <i>Y. lipolytica</i> の全 DNA の調製 .....	187
6-2-10 <i>Y. lipolytica</i> の全 RNA の調製 .....	188
6-2-11 ノーザンハイブリダイゼーション .....	188
6-2-12 $\beta$ -ガラクトシダーゼ活性測定 .....	188
6-2-13 酵母の生菌率測定 .....	188
6-2-14 蛍光顕微鏡観察 .....	188
6-2-15 <i>Y. lipolytica</i> 細胞抽出液の調製 .....	188
6-2-16 SDS-PAGE .....	188
6-2-17 ウェスタン解析 .....	189
6-3 結果 .....	189
6-3-1 <i>Y. lipolytica</i> におけるグリセロール抑制の解析 .....	189
6-3-2 Yas3p の局在制御に関する解析 .....	192
6-4 考察 .....	192
6-4-1 <i>n</i> -アルカンと脂肪酸による転写誘導とグリセロールによる抑制 .....	192
6-4-2 グリセロールによる転写抑制の分子機構 .....	193
6-4-3 DHA による <i>ALK1</i> プロモーターの転写抑制 .....	193
6-4-4 グリセロールの $\Delta gut2$ 株への毒性 .....	194
6-4-5 グリセロール抑制の生理的意義 .....	194
6-4-6 Yas3p のリン酸化 .....	194
図表 .....	195
Figure 6-0. <i>S. cerevisiae</i> におけるグリセロール代謝 .....	195
Figure 6-1. <i>ALK1</i> と <i>PATI</i> のグリセロール抑制 .....	196

Figure 6-2. $\Delta gut1$ 株、 $\Delta gut2$ 株、 $\Delta gut1\Delta gut2$ 株の生育.....	197
Figure 6-3. <i>GUT1</i> 、 <i>GUT2</i> 破壊株における <i>ALK1</i> および <i>PAT1</i> の発現解析.....	198
Figure 6-4. グルコース存在下における <i>ALK1</i> および <i>PAT1</i> の発現解析.....	199
Figure 6-5. <i>GUT2</i> 単独破壊株へのグリセロールの影響.....	200
Figure 6-6. DHA を含む培地における <i>ALK1</i> プロモーター活性.....	201
<b>終章</b> .....	<b>202</b>
<b>図表</b> .....	<b>206</b>
Figure 7-1. 本研究で明らかとなった <i>n</i> -アルカン代謝に関わる酵素群.....	206
<b>参考文献</b> .....	<b>207</b>
<b>謝辞</b> .....	<b>218</b>

## 略称について

本論文にて使用した略称を以下に示す

5-FOA	5-fluoroorotic acid
ACS	acyl-CoA synthetase
ADH	alcohol dehydrogenase
AID	auxin inducible degron
ALDH	aldehyde dehydrogenase
ARE1	alkane responsive element-1
ARE2	alkane responsive element-2
ARR	alkane responsive region
ATCC	American Type Culture Collection
bHLH	basic helix-loop-helix
BLAST	basic local alignment search tool
BSA	bovine serum albumin
CBS	Centraalbureau voor Schimmelcultures
cDNA	complementary DNA
CO	carbon monoxide
CoA	coenzyme A
CYP	cytochrome P450
DHA	dihydroxyacetone
DHAP	dihydroxyacetone phosphate
DNA	deoxyribonucleic acid
DSM (DSMZ)	German Collection of Microorganisms and Cell Cultures
DTT	dithiothreitol
EDTA	ethylenediaminetetraacetic acid
EGFP	enhanced green fluorescence protein
ER	endoplasmic reticulum
EtBr	ethidium bromide
F-1,6-bP	fructose 1,6-bisphosphate
FADH	fatty alcohol dehydrogenase
FALDH	fatty aldehyde dehydrogenase
FAOD	fatty alcohol oxidase
G-3-P	glycerol 3-phosphate
G-6-P	glucose 6-phosphate
GAP	glyceraldehyde 3-phosphate

GC-MS	gas chromatography–mass spectrometry
GOLD	golgi dynamics
GRAS	generally recognized as safe
GSP1	gene specific primer 1
GSP2	gene specific primer 2
IPTG	Isopropyl $\beta$ -D-1-thiogalactopyranoside
LC-MS	liquid chromatography–mass spectrometry
NAA	naphthaleneacetic acid
NAD <sup>+</sup> , NADH	nicotinamide adenine dinucleotide
NGSP1	nested gene specific primer 1
NGSP2	nested gene specific primer 2
NLS	nuclear localization signal
ONP	<i>o</i> -nitrophenol
ONPG	<i>o</i> -nitrophenyl- $\beta$ -galactopyranoside
ORBP	oxysterol-binding protein
ORD	oxysterol-binding protein related proteins domain
ORF	open reading frame
ORP	oxysterol-binding protein related proteins
OSBP	oxysterol-binding protein
P450	cytochrome P450
PA	phosphatidic acid
PBS	phosphate-buffered saline
PC	phosphatidylcholine
PCR	polymerase chain reaction
PDB	protein database
PE	phosphatidylethanolamine
PEP	phosphoenolpyruvic acid
PH	pleckstrin homology
PI	phosphatidylinositol
PIPs	phosphoinositides
PS	phosphatidylserine
PTS1	peroxisomal targeting signal 1
qRT-PCR	quantitative real-time PCR
RACE	rapid amplification of cDNA ends
RNA	ribonucleic acid
S-1-P	sphingosine-1-phosphate

SDS-PAGE	sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis
SLS	Sjögren–Larsson syndrome
TBS	Tris-buffered saline
TCA	tricarboxylic acid
TLC	thin layer chromatography
TMS	trimethylsilyl
Tris	tris(hydroxymethyl) aminomethane
Triton X-100	polyoxyethylene(10) octylphenyl ether
Tween 20	polyoxyethylene(20) sorbitan monolaurate
Tween 80	polyoxyethylene(80) sorbitan monooleate
UAS	upstream activation sequence
X-gal	5-bromo-4-chloro-3-indolyl- $\beta$ -D-galactoside

## 序章

### *n*-アルカン資化性酵母

石油成分の一つである *n*-アルカンは自然界にも広く存在し、植物の表面や昆虫の体表面などに見出される。*n*-アルカンは高エネルギー物質であり、これまでに細菌や酵母、糸状菌など多くの微生物が *n*-アルカンを炭素源およびエネルギー源として資化する能力を有することが見出されている[1-4]。特に酵母においては、“The Yeasts; A Taxonomic Study 5th edition”に記載される 1270 種のうち、子囊菌類で 169 種、担子菌類で 11 種の計 28 属 180 種が *n*-ヘキサデカンを資化出来ることが報告されている[5]。

*n*-アルカン資化能を有する酵母としては、*Candida maltosa* [6]や *Candida tropicalis* [7]、*Candida albicans* [8]、*Debaryomyces hansenii* [9]、*Starmerella bombicola* [10, 11]、*Meyerozyma guilliermondii*、*Lodderomyces elongisporus*、*Scheffersomyces stipitis*、*Yarrowia lipolytica* [12]などが知られている。*n*-アルカンを炭素源として *n*-アルカン資化性酵母を培養することにより、ペルオキシソームなどの発達や、*n*-アルカンの資化に必要な遺伝子群の発現誘導などの応答が見られる。しかし、細胞の *n*-アルカンの感知機構や *n*-アルカンからのシグナル伝達機構、*n*-アルカンを取り込む機構、*n*-アルカンの代謝経路など、*n*-アルカンへの応答とその代謝の分子レベルでの詳細に関しては知見が乏しい。これまでに *C. tropicalis* や *C. maltosa* において、*n*-アルカン応答や *n*-アルカン代謝に関する解析が行われてきた。しかし、これらの酵母は二倍体酵母であったことから、変異株の取得による遺伝学的解析が困難であった。一方で、*n*-アルカン資化性酵母 *Y. lipolytica* は安定な一倍体の生活環を持ち、遺伝学的解析が容易であること[13]、*Y. lipolytica* のゲノム配列も解読、公開されていることから、本酵母は *n*-アルカンに対する応答と代謝を解析する上で優れたモデル生物であると考えられる。

### *Yarrowia lipolytica*

*Y. lipolytica* はチーズやソーセージといった脂質やタンパク質に富む食品から単離される酵母であり[14]、様々なポリアルコールや有機酸、中性脂質や *n*-アルカンなどの疎水性化合物を単一の炭素源として資化する能力を有する[12]。*Y. lipolytica* は 32°C 以上では生育できないことや絶対好気性であることから、アメリカ食品医薬品局から Generally Recognized As Safe (GRAS) に認定されている。これらの性質から、1960 年代に *Y. lipolytica* は *n*-アルカンを炭素源とした石油タンパク質生産の宿主として注目された[15]。また、*Y. lipolytica* を窒素源飢餓状態にすることによりクエン酸やイソクエン酸が細胞外へと分泌されることや、低 pH にてチアミンを枯渇させることにより 2-ケトグルタル酸の分泌が促進されることが知られている[16]。さらに *Y. lipolytica* において、アシル-CoA オキシダーゼをコードする 6 つの *POX1* – *POX6* のうちの複数の遺伝子の多重破壊株で  $\alpha,\omega$ -ジカルボン酸が細胞内に蓄積することも見出されている[17]。これらのことから、

*Y. lipolytica* は *n*-アルカンや植物油などの安価な原料から有機酸を生産するモデルとしても注目を集めており、実際に有機酸の生産菌として利用された実績もある。また、近年では、エイコサペンタエン酸 (eicosapentaenoic acid; EPA)の生産菌としても利用されている[18]。さらに、アルカリプロテアーゼや酸性プロテアーゼ、リパーゼ、ホスファターゼなどの様々な酵素を細胞外へ多く分泌する性質から、異種タンパク質発現系の研究にも用いられている[19]。

基礎科学的には、*Y. lipolytica* は疎水性化合物を効率的に利用できることから、疎水性化合物代謝研究やペルオキシソーム生合成のモデル生物としても利用されている [12, 20-22]。また、*Y. lipolytica* は酵母型と菌糸型の2つの形態を取る二形性酵母でもあり、*C. albicans* などとともに形態変化の研究が行われている[23]。さらに、広く真核生物のモデル生物として用いられている出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* が電子伝達系の複合体 I を持たないのに対して、*Y. lipolytica* は複合体 I を持つことから、ミトコンドリアの呼吸鎖の研究のモデル生物としても利用されている[24]。

このように、*Y. lipolytica* は基礎科学研究および応用的研究の両面で注目される酵母であり、これまで真核生物のモデル生物として研究されてきた出芽酵母 *S. cerevisiae* や分裂酵母 *Shizosaccharomyces pombe* 以外の酵母として定義される non-conventional yeasts の中では近年最も集中的に研究されてきた酵母の一つである[25]。

## ***Y. lipolytica* における *n*-アルカン代謝経路**

現在考えられている *Y. lipolytica* における *n*-アルカン資化経路のモデルを Figure 0-1 に示す。

### **1) *n*-アルカンの取り込み**

*n*-アルカンの細胞内への取り込みに関しては、*Y. lipolytica* において *n*-ヘキサデカンの細胞内への取り込みが KCN によって著しく減少することから、*n*-アルカンの取り込みはエネルギー依存的に行われることが示唆されている [26]。また、Mauersberger と Nicaud らにより、DNA 挿入によるタギングで新たに変異株が取得され、解析された結果、*n*-アルカンの細胞内への取り込みには ABC トランスポーターが関わる可能性が示唆された[27]。しかしながら、具体的な取り込みの機構や、その後の小胞体への輸送機構は明らかとなっていない。

### **2) *n*-アルカンから脂肪酸への変換**

細胞内に取り込まれた *n*-アルカンはまず、小胞体 (endoplasmic reticulum; ER) においてシトクロム P450 (cytochrome P450; CYP or P450)の一種である Alk タンパク質群により末端が水酸化され、長鎖アルコールとなると考えられている。次に、長鎖アルコールは小胞体の長鎖アルコールデヒドロゲナーゼ (fatty alcohol dehydrogenase; FADH) また

はペルオキシソームの長鎖アルコールオキシダーゼ (fatty alcohol oxidase; FAOD)によって末端がさらに酸化されて長鎖アルデヒドへと変換され、さらに長鎖アルデヒドは小胞体もしくはペルオキシソームにて長鎖アルデヒドデヒドロゲナーゼ (fatty aldehyde dehydrogenase; FALDH)により酸化されて脂肪酸となると考えられている[12]。

*n*-アルカンから脂肪酸への変換の過程については、*Y. lipolytica* を含めた *n*-アルカン資化性酵母において、*n*-アルカンの初発酸化に P450 が関わることを示されているのみであり、長鎖アルコールから長鎖アルデヒド、長鎖アルデヒドから脂肪酸への変換に関わる酵素のほとんどが不明である。ただし、*C. maltosa* ではアルコールから脂肪酸までの反応を P450 が触媒する可能性が報告されている[28]。

### 3) 脂肪酸の代謝

脂肪酸はアシル-coenzyme A (CoA)合成酵素 (acyl-CoA synthetase; ACS)によりアシル CoA となった後、一部は膜脂質や貯蔵脂質の合成に用いられ、それ以外はペルオキシソームにおける  $\beta$ 酸化系によって代謝される。哺乳動物の  $\beta$ 酸化系はペルオキシソームとミトコンドリアで見られるのに対し、*Y. lipolytica* や *S. cerevisiae* などの酵母ではペルオキシソームにのみ  $\beta$ 酸化活性が見出されている。*n*-アルカンからアシル CoA に至るまでの代謝経路に関わる因子がほとんど同定されていないのに対して、 $\beta$ 酸化に関わる酵素群は比較的良好に解明されている。*Y. lipolytica* では  $\beta$ 酸化系の最初の反応を触媒する 5 つのアシル CoA オキシダーゼ (Aox1p – Aox5p)をコードする遺伝子 (*POX1 – POX5*)が取得されており、さらにゲノムデータベースにより 6 番目のアシル CoA オキシダーゼである Aox6p をコードする *POX6* の存在が推定されている[12]。Aox2p はアシル鎖の炭素鎖長 10 から 16 の長鎖アシル CoA に、Aox3p はアシル鎖の炭素鎖長 4 から 10 の短鎖アシル CoA に対し活性を持ち、Aox5p はアシル鎖の鎖長にかかわらず活性を持つことが分かっている。また、 $\beta$ 酸化系の次の反応を触媒する 2-エノイル CoA ヒドラターゼおよび、3-ヒドロキシアシル CoA デヒドロゲナーゼ両方の活性を持つ酵素をコードする *MFE2* が単離されている[29]。さらに、 $\beta$ 酸化系の最終反応を触媒する 3-オキソアシル CoA チオラーゼをコードする *POT1* が単離され、脂肪酸の分解に必須であることが示されている[30]。また、*n*-デカン資化能を欠損した変異株の解析から、*n*-デカン誘導性のアセトアセチル-CoA チオラーゼをコードする *PAT1* が見出されている[31]。*PAT1* は *POT1* と共に  $\beta$ 酸化系の最終反応に関わると思われる。  $\beta$ 酸化系によって合成されたアセチル-CoA はペルオキシソームでグリオキシル酸回路に取り込まれ、ミトコンドリア内の TCA 回路へと取り込まれると考えられている。

## *n*-アルカン資化に関わる P450

### 1) シトクロム P450

P450 は還元状態で一酸化炭素と結合して 450 nm に吸収極大をもつ吸収スペクトルを

示すタンパク質の総称であり、ブタ、ラット、ウサギの肝臓細胞中のマイクロソームから同定された[32-34]。現在ではゲノム解析の進展から、ヒト *Homo sapiens* では 57 種[35]、イネ *Oryza sativa* では 302 種[36]、麹菌 *Aspergillus oryzae* では 142 種[37]など非常に多くの P450 遺伝子が見出されており、P450 は細菌から植物、動物に至るまで自然界に広く分布する巨大なスーパーファミリーを形成していることが分かっている[35]。P450 はアミノ酸一次配列の同一性が 40%以上であると同一のファミリー (CYP1, CYP2 など)に、55%以上の同一性があると同一のサブファミリー (CYP1A1, CYP1A2 など)に分類されるが[35]、P450 ファミリーの数は動物で 196 [38]、植物で 127 [39]、真菌類で 399 [40]、細菌類で 153 [35]に及ぶ。P450 は多くの場合、分子状酸素を利用して基質に酸素原子 1 つを付加するモノオキシゲナーゼ (一原子酸素付加酵素) として働き、その生理機能は多様である。動物においてはステロールやステロイドホルモン、胆汁酸の合成、薬剤などの外来性異物の代謝に重要な機能を果たしており[41]、生化学、薬学、医学などの分野で注目されている。医薬品や食品添加物、農薬といった様々な脂溶性物質は、水溶性が低く脂肪組織に蓄積しやすいため体外に排出されにくい。P450 はこのような化合物を水酸化またはエポキシ化して物質の極性を上げ、体外へ排出しやすくする解毒機構を担う[42]。また、ポリ塩化ビニルのように P450 に水酸化されることにより強力な発癌性を示す物質に変換される化合物や、逆に P450 による水酸化を受けて初めて薬効を示す医薬品もある[43]。生理活性物質などの合成に関わる内因性脂溶性物質を基質とする P450 が比較的狭い基質特異性を示すのに対して、外因性物質の代謝に関与する P450 は一般に基質特異性が広く、1 つの P450 が化学構造上類似性の無い多種類の基質の酸化に関与する例が知られている[41]。

出芽酵母 *S. cerevisiae* ではエルゴステロール合成に関わる CYP51 (Erg11p)と CYP61 (Erg5p)および胞子壁を構成するチロシン重合体の合成に必要な CYP56 (Dit2p)が見出されている[44-51]。*n*-アルカン酸化能を有する *Candida* 属や *Yarrowia* 属酵母は、*n*-アルカンの酸化に関わると考えられる P450 を複数有する[6, 7, 52]、それらの中には脂肪酸の  $\omega$  酸化に関わる P450 も見出されている[7, 28, 53]。

## 2) *n*-アルカン酸化性酵母と P450ALK

*n*-アルカン酸化性酵母では、*n*-アルカン酸化に関わる P450 は P450ALK と呼ばれてきた。*C. tropicalis* では 7 種[7]、*C. maltosa* では 8 種[6]、また *D. hansenii* で 4 種[9]の P450ALK をコードすると推定される遺伝子が見出されている。*Y. lipolytica* においては、Iida により P450ALK をコードすると推定される 8 種の遺伝子、*ALK1* – *ALK8* が単離されており[52]、さらにゲノム情報から 4 種の遺伝子、*ALK9* – *ALK12* が見いだされている[12]。P450ALK は CYP52 ファミリーに属する。CYP52 ファミリーの P450 は *n*-アルカン酸化能を持たない酵母である *S. cerevisiae* や *S. pombe* などには見られないが、糸状菌を含む子囊菌類には広く存在する P450 である。一方で、担子菌類のゲノムには CYP52 ファミ

リーの P450 をコードする遺伝子は現在までに見出されていないことから、CYP52 ファミリーの P450 は子囊菌類の祖先で出現し、子囊菌類の中に広がったと考えられている [54, 55]。

*C. maltosa* では、P450ALK をコードする遺伝子として *ALK1* – *ALK8* が単離されているが、*n*-アルカンによって転写が強く誘導される主要な 4 つの P450ALK 遺伝子 (*ALK1*、*ALK2*、*ALK3*、*ALK5*) について多重破壊株が作製され、その 4 重破壊株が *n*-ドデカン、*n*-テトラデカン、*n*-ヘキサデカンを単一の炭素源とした培地で生育できないことが示された [56]。*ALK1* の産物は *n*-ドデカンや *n*-ヘキサデカンに対して最も高い水酸化活性を有したと一致して、*ALK2*、*ALK3*、*ALK5* を欠失しても *ALK1* のみで *n*-ドデカンや *n*-ヘキサデカンを炭素源とした場合の生育が支持された。これに対し、*ALK5* の産物は長鎖 *n*-アルカンに対する活性を持ち、*ALK5* の単独発現は *n*-ドデカンや *n*-テトラデカンを炭素源とした培地における *ALK* 遺伝子 4 重破壊株の生育欠損を回復させることが出来ないが、*n*-ヘキサデカンを炭素源とした培地における生育欠損を回復させることが示されている。さらに *C. maltosa* の CYP52A3 については、*S. cerevisiae* 内で発現させて解析が行われ、CYP52A3 が *n*-ドデカンや *n*-ヘキサデカンを脂肪酸にまで酸化できること、すなわち CYP52A3 が *n*-アルカンから脂肪酸までの全ての中間代謝産物に対する酸化活性を有することが報告されている [28]。一方、*ALK7*、*ALK8* の産物は *n*-アルカンに対する水酸化活性は認められないが、脂肪酸に対しては高い活性が認められている [57]。

### ***Y. lipolytica* における *n*-アルカンに対する転写応答機構**

*C. maltosa* や *C. tropicalis*、*Y. lipolytica* などの *n*-アルカン資化性酵母において一部の P450ALK は基質となる *n*-アルカンによって発現が誘導される [6, 7, 52]。*Y. lipolytica* において *n*-アルカンによる発現制御機構の研究が行われ、*n*-アルカンという疎水性の高い物質が P450ALK の発現を誘導する機構は徐々に明らかになりつつある。

*Y. lipolytica* におけるこれまでの解析により、*ALK1* のプロモーター中に *n*-アルカン応答に重要な配列として Alkane Responsive Element 1 (ARE1) および Alkane Responsive Element 2 (ARE2) が同定されている。このうち ARE1 は basic helix-loop-helix (bHLH) タンパク質の結合配列である E-box モチーフを有する。Yamagami らは ARE1 を介した転写誘導に必須な bHLH タンパク質をコードする遺伝子として *YAS1* を単離した [58]。*YAS1* 破壊株では、*n*-アルカンによる *ALK1* の転写誘導が見られず、*n*-アルカン資化能も失われていた。また Yas1p が *Y. lipolytica* 内で ARE1 を含む DNA 配列と結合することから、Yas1p は ARE1 を介して *ALK1* の転写を正に調節する転写因子であることが示唆された。一般に bHLH タンパク質は HLH 領域を介してホモあるいはヘテロダイマーを形成して DNA に結合することが多く、また大腸菌で生産させて精製した Yas1p も単独では ARE1 に結合できなかったことから、Yas1p と結合する bHLH 型転写因子の存在が予想された。そこで、*Y. lipolytica* のゲノムデータベースより Yas1p の bHLH モチーフと相同性を示

タンパク質をコードする遺伝子が探索され *YAS2* と命名された[59]。Yas2p も bHLH タンパク質であり、*YAS2* 破壊株では *n*-アルカン資化能が失われ、*ALK1* の転写誘導も見られなかった。さらに Yeast two-hybrid 法および免疫沈降実験により、Yas1p と Yas2p が結合することが示された。また、ゲルシフトアッセイにより Yas1p と Yas2p はそれぞれ単独では ARE1 に結合しないが、両者が存在すると ARE1 に結合することが示された。これらの結果から、Yas1p と Yas2p は複合体を形成して ARE1 に結合すると考えられている[59]。また、Yas2p に転写活性化能があることも示されている。

Yas1p と Yas2p の bHLH モチーフは、それぞれ *S. cerevisiae* が持つ Ino4p と Ino2p の bHLH モチーフと高い類似性を示す。*S. cerevisiae* において、リン脂質合成系の遺伝子の発現は *myo*-イノシトールの有無によって調節されるが、その制御にはリン脂質合成系の遺伝子のプロモーター中の配列である UAS<sub>INO</sub> (upstream activation sequence) とそれに複合体を形成して結合する Ino4p および Ino2p と、Ino2p に結合する転写抑制因子 Opi1p が関与する[60]。イノシトールの非存在下では、Opi1p は小胞体膜のホスファチジン酸 (phosphatidic acid; PA) と小胞体膜タンパク質である Scs2p と結合することにより小胞体上に局在し、Ino4p と Ino2p は核内でリン脂質合成系の遺伝子の転写を活性化する。それに対して、培地にイノシトールが添加されると、PA がホスファチジルイノシトール (phosphatidylinositol; PI) の合成に使用されるため小胞体上の PA 量が減少し、Opi1p が小胞体膜から離れ核内に移行して Ino2p と結合することにより、リン脂質合成系の遺伝子の転写が抑制されると考えられている[61]。そこで、*Y. lipolytica* において Opi1p に相当する転写抑制因子が *n*-アルカンによる転写制御に関与することが予想されたことから、*Y. lipolytica* のゲノムデータベースより Opi1p と相同性を示すタンパク質をコードする遺伝子の探索が行われ、*YALI0C14784g* が見出されて *YAS3* と命名された[62]。*YAS3* 破壊株では、*n*-アルカンが存在しない条件でも *ALK1* の転写が大きく増加していた。また、プルダウンアッセイにより、*in vitro* において Yas3p と Yas2p が結合すること、Yas1p は Yas3p と Yas2p を介して結合することが示された。さらに、Yas2p と Yas3p の局在解析が行われ、Yas2p はグルコース培地あるいは *n*-デカン培地のいずれにおいても核に局在するのに対して、Yas3p はグルコース培地では核に局在し、*n*-デカン培地では小胞体に局在することが示された。これらから、*n*-アルカン非存在下では Yas3p が核内に移行し Yas2p と結合することで Yas1p-Yas2p 複合体による転写を抑制するのに対して、*n*-アルカン存在下では Yas3p は小胞体に保持されるため、Yas1p-Yas2p 複合体により標的遺伝子の転写が活性化されると考えられている (Figure 0-2) [62]。

さらに、Yas3p は *in vitro* において *n*-アルカンやその代謝産物には結合せず、PA やホスホイノシチド (phosphoinositide; PIPs) に結合すること、PA ホスファターゼをコードすると考えられる *PAH1* の破壊株では *n*-アルカンや脂肪酸の存在下で ARE1 に依存した転写が増加すること、ホスファチジルイノシトール 4-リン酸 (phosphatidylinositol 4-phosphate; PI4P) の分解に関わる Sac1p の存在量を低下させると、*n*-アルカン存在下で

の ARE1 に依存した転写が増加することから、Yas3p は細胞内でも PA や PIPs に結合する可能性が示唆されている[63]。一方、*S. cerevisiae* の Opi1p は FFAT (two phenylalanines (FF) in an acidic tract)モチーフを介して Scs2p と結合することが示唆されているが、Yas3p には FFAT モチーフが存在せず、Scs2p の *Y. lipolytica* におけるホモログである Scs2p や Scs22p を欠損させても、*ALK1* の転写量に変化が見られなかった。したがって、Yas3p は Scs2p や Scs22p に結合して小胞体に局在する可能性は低いと考えられた[64]。

ARE1 様の配列は *ALK1* 以外にも *ALK2* や *PAT1* などの *n*-アルカンによって発現が誘導される遺伝子のプロモーターにも見出されており、実際に Yas1p が *PAT1* のプロモーターに結合することが示されている[58]。また、*YAS1* や *YAS2* の破壊株では *ALK1*、*ALK2*、*ALK4*、*ALK5*、*ALK6*、*ALK9*、*ALK11* の *n*-アルカンによる発現誘導に欠損が生じたことから、Yas1p と Yas2p は *ALK1* だけでなく *n*-アルカン資化に関わる多くの遺伝子の転写制御に関わると考えられている[62]。さらに、Yas1p は *YAS1* 自身のプロモーターにも結合することから、転写活性化因子である Yas1p の発現制御にはポジティブフィードバック機構が存在し、これにより迅速に *n*-アルカンに応答できると考えられている。

*n*-アルカンがどのように認識され、どのようにシグナルが伝達されるのかについては不明な部分が多い。

### ***Y. lipolytica* における脂肪酸に対する転写応答機構**

酵母や糸状菌において、脂肪酸代謝関連遺伝子の脂肪酸による転写活性化には、2つの異なるファミリーの転写活性化因子に関わることが知られている。1つは *S. cerevisiae* が持つ Zn<sub>2</sub>Cys<sub>6</sub> 型転写因子である Oaf1p と Pip2p によるシステムであり[65]、このシステムは *S. cerevisiae* の近縁の酵母に保存されている。もう1つは糸状菌 *Aspergillus nidulans* で報告されていた Zn<sub>2</sub>Cys<sub>6</sub> 型転写因子である FarA によるシステムであり、このシステムは幅広い真菌類で保存されている[66]。*Y. lipolytica* においても Poopanitpan らにより脂肪酸代謝関連遺伝子の転写制御の解析が行われ、ゲノムデータベースから FarA のオルソログとして *YALI0D12628g* が見出され、*POR1* と命名された[67]。*POR1* 破壊株は脂肪酸を炭素源とした培地では生育に顕著な遅延を示したことから、野生型株ではオレイン酸培地で脂肪酸資化やペルオキシソーム形成に関わる *POT1*、*PAT1*、*POX2*、*PEX5* の転写産物量が増加するのに対して、*POR1* 破壊株ではその量が減少していたことから、Por1p は *Y. lipolytica* において脂肪酸代謝を広く制御する転写因子であることが示唆された[67]。

### ***Y. lipolytica* の網羅的転写解析**

小林と志波らにより、*Y. lipolytica* の高速シーケンサーを用いた網羅的転写解析が行われた。野生型株において、グルコースを炭素源とした場合と比較して、*n*-デカンを炭素源とした場合に cDNA 量が2倍以上増加した遺伝子は548種あった (Figure 0-3A)。そ

の中で Yas2p により活性化され Yas3p により抑制される遺伝子は 79 遺伝子であった。また、Yas2p あるいは Yas3p に依存しない *n*-アルカン応答機構も存在することが示唆された (Figure 0-3B)。さらに、これら Yas2p と Yas3p による転写が制御される遺伝子はすべてグリセロール添加により発現が抑制されること (Figure 0-3C)、Yas2p と Yas3p による転写制御を受けない遺伝子でも、*n*-デカンで誘導される遺伝子の約 70%がグリセロール添加により発現が抑制されることが分かった (Figure 0-3D)。一方、野生型株においてオレイン酸を炭素源とした場合に cDNA 量が 2 倍以上増加した遺伝子は 501 遺伝子であった。また、その中で *POR1* 破壊によりオレイン酸培地でも cDNA 量が 2 分の 1 以下に低下した遺伝子は 118 遺伝子であったことから (Figure 0-3E)、脂肪酸により標的遺伝子の発現を誘導する転写因子が *Por1p* 以外にも存在することが示唆された。*n*-デカンを炭素源とした場合に cDNA 量が 2 倍以上に増加した遺伝子のうちの約 5 分の 3 がオレイン酸を炭素源とした場合にも 2 倍以上 cDNA が増加することが明らかとなり、*n*-デカンにより誘導される遺伝子の中には *n*-デカンの代謝産物である脂肪酸によって発現が誘導される遺伝子があることも示唆された (Figure 0-3F)。

## 本研究の目的と構成

本研究では、酵母 *Y. lipolytica* における *n*-アルカンの代謝経路とその制御機構の解明を目的とした。本論文は 6 章により構成される。

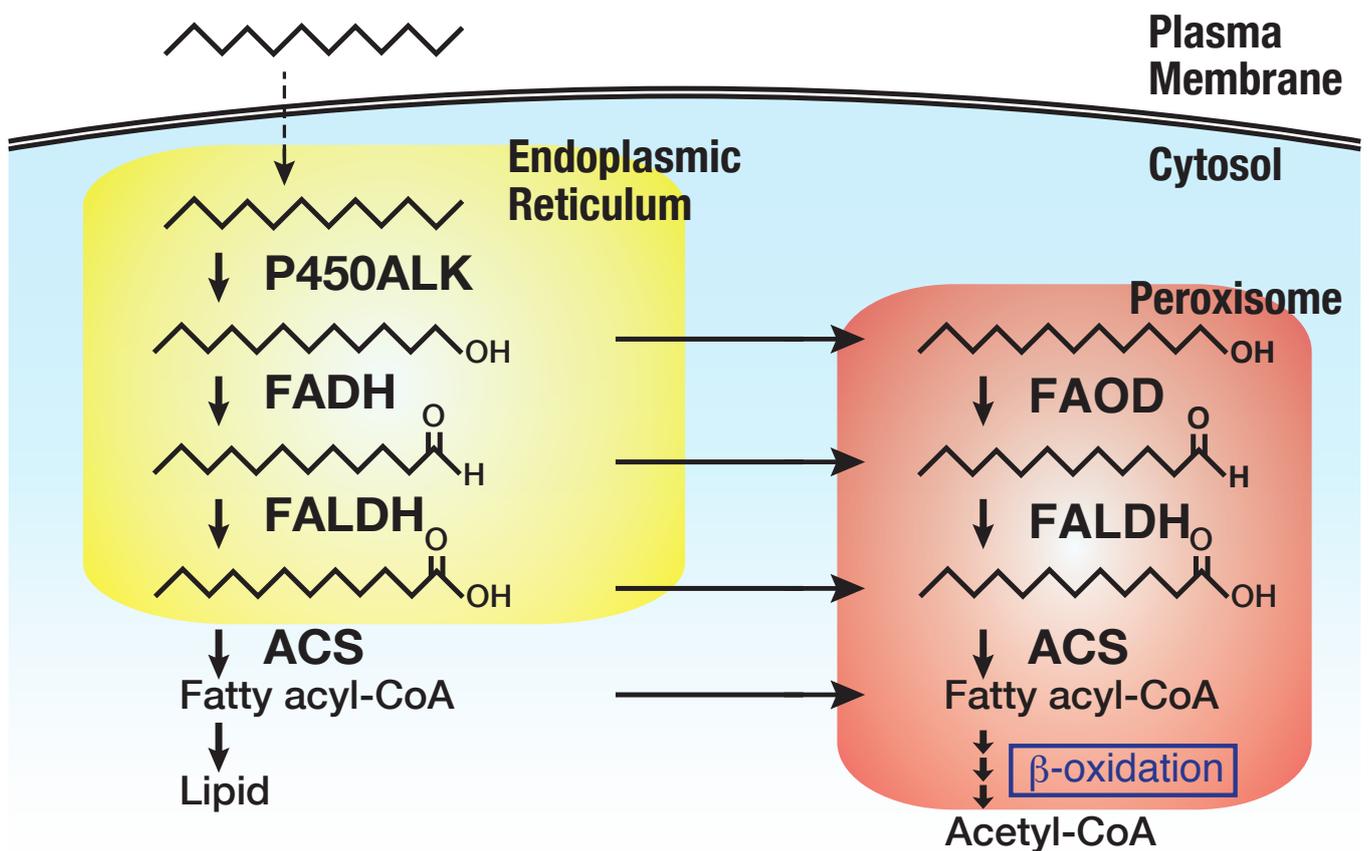
第 1 章では、*Y. lipolytica* における 12 種の P450ALK をコードすると推定される *ALK* 遺伝子群を全て破壊した株の詳細な解析を行うとともに、個々の *Alk* タンパク質を単独で発現する株を作製して、それぞれの *Alk* タンパク質の基質特異性について解析した結果をまとめた。さらに、*Alk* タンパク質群の基質特異性を担う領域の特定を試みた。

第 2 章では、*Y. lipolytica* において、長鎖アルコールの長鎖アルデヒドへの変換に関わる遺伝子の同定を試み、2 つのアルコールデヒドロゲナーゼ遺伝子と 1 つの長鎖アルコールオキシダーゼ遺伝子がこの反応に関与することを明らかにした。

第 3 章では、*Y. lipolytica* 内で長鎖アルデヒドから脂肪酸への変換に関わる酵素をコードする遺伝子を 4 種見出し、それらの機能解析を行った。

第 4 章、第 5 章の内容は、学術雑誌論文として出版する計画があるため公表できない。5 年以内出版予定。

第 6 章では、*ALK* 遺伝子の 1 つである *ALK1* の転写のグリセロールによる抑制機構について解析した結果をまとめた。

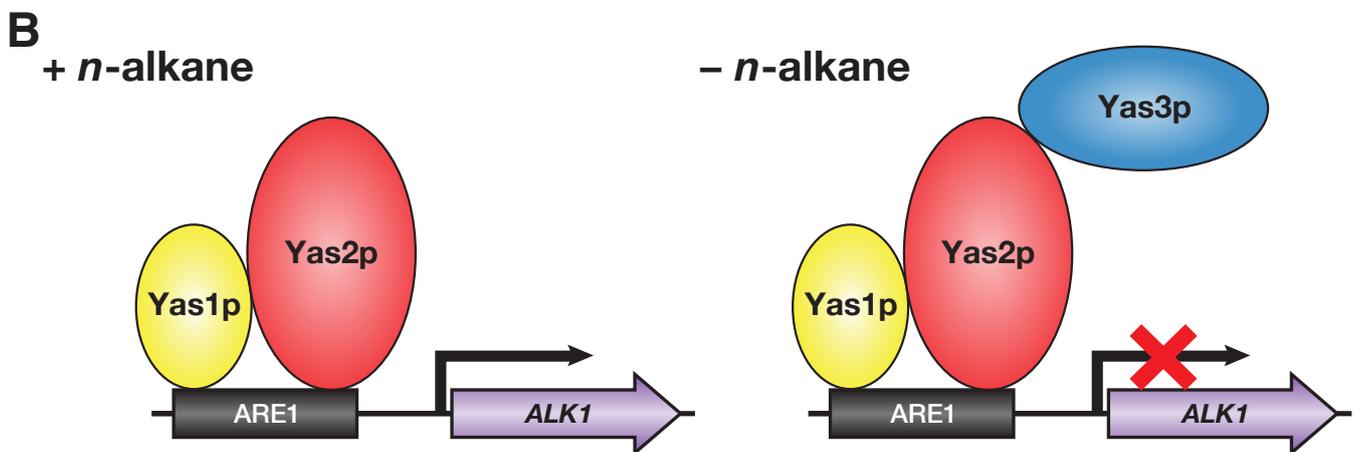


**Figure 0-1. *Y. lipolytica* における *n*-アルカン代謝経路のモデル**

*n*-アルカンは細胞内に取り込まれた後、小胞体上で Alk タンパク質群により末端が水酸化され長鎖アルコールとなる。長鎖アルコールは小胞体で FADH により酸化されるか、ペルオキシソームで FAOD により酸化され長鎖アルデヒドとなり、長鎖アルデヒドは小胞体またはペルオキシソームの FALDH により酸化されて脂肪酸になる。生成した脂肪酸は ACS により小胞体またはペルオキシソームで脂肪酸アシル CoA へと変換され、脂質へと取り込まれるか  $\beta$  酸化によってアセチル CoA まで分解されることにより、細胞内で利用される。

FADH; fatty alcohol dehydrogenase, FALDH; fatty aldehyde dehydrogenase, FAOD; fatty alcohol oxidase, ACS; acyl-CoA synthetase.

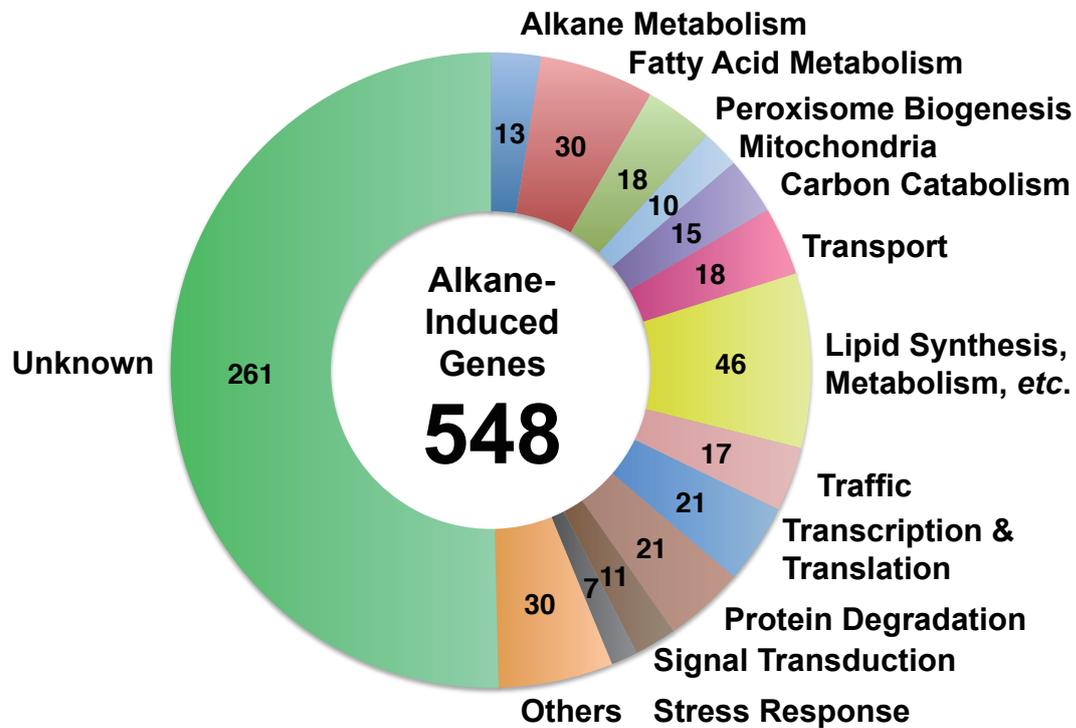
"Hirakawa, K., Kobayashi, S., Inoue, T., Endoh-Yamagami, S., Fukuda, R., and Ohta, A. (2009) Yas3p, an Opi1 family transcription factor, regulates cytochrome P450 expression in response to *n*-alkanes in *Yarrowia lipolytica*. *J Biol Chem* **284**, 7126-7137"から転載した図を掲載していたが、インターネット公表に対する著作権者からの許諾が得られていないため公表できない。



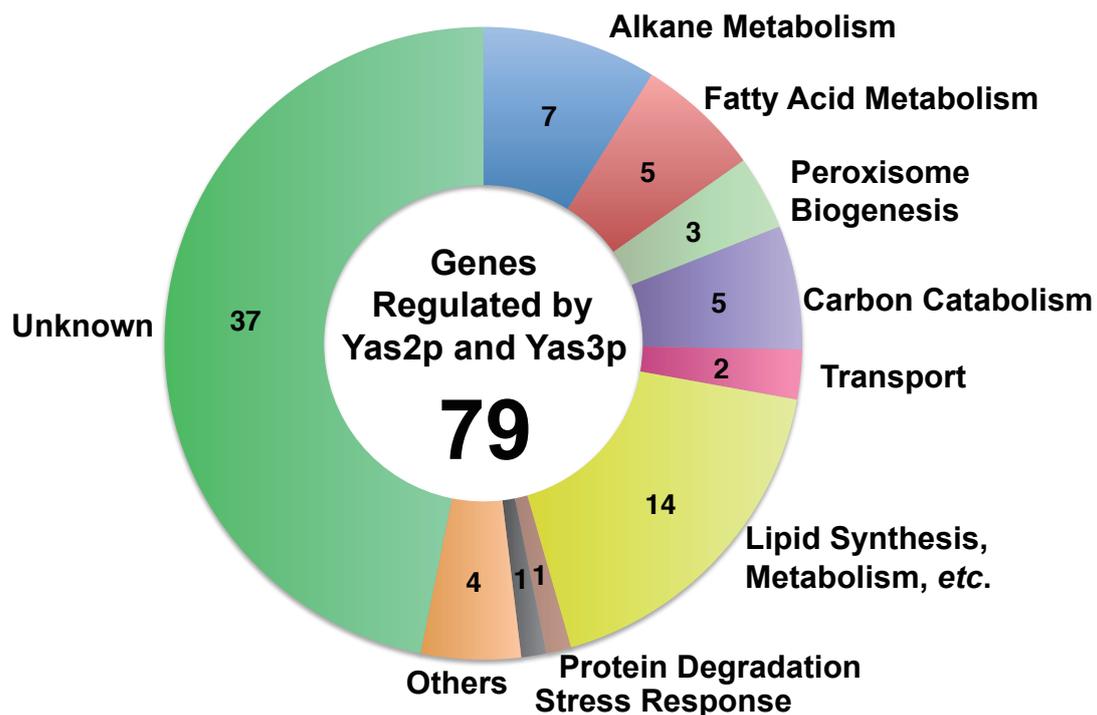
**Figure 0-2. Yas1p、Yas2p、Yas3p による *ALK1* の発現制御機構**

(B) Yas1p、Yas2p、Yas3p による発現制御機構のモデル。*n*-アルカン存在下では、転写活性化因子 Yas1p、Yas2p が複合体を形成し、*ALK1* 上流の ARE1 配列に結合して *ALK1* の転写を活性化する。一方、*n*-アルカン非存在下では、転写抑制因子 Yas3p が Yas2p に結合して転写を抑制する (57,58,61)。

A



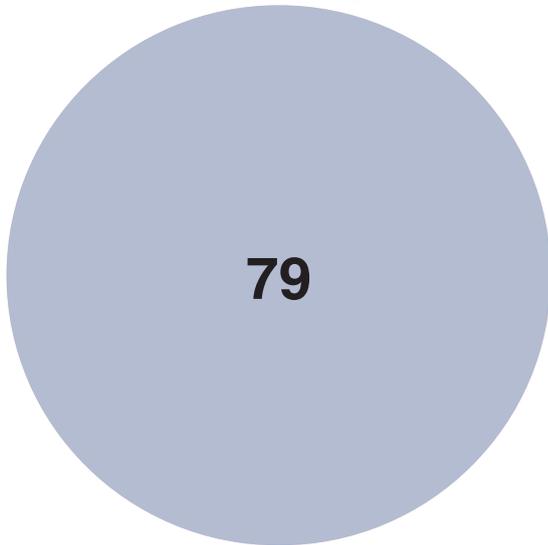
B



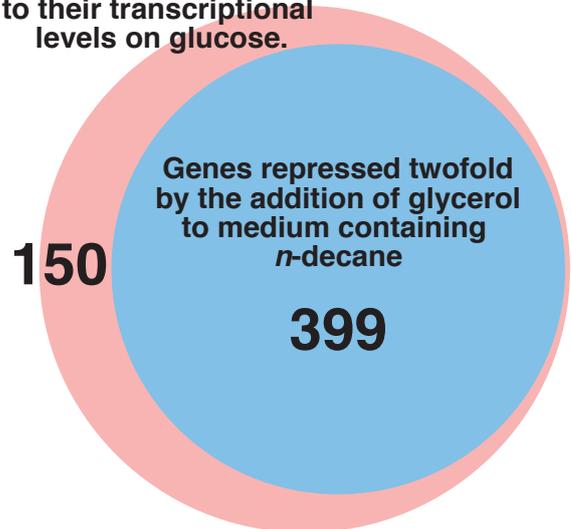
**Figure 0-3. *Y. lipolytica* の網羅的転写解析**

*Y. lipolytica* の野生型株をグルコース、*n*-デカン、グリセロール、*n*-デカンおよびグリセロール、オレイン酸を炭素源として、 $\Delta yas2$  株を *n*-デカンを炭素源として、 $\Delta yas3$  株をグルコースを炭素源として、 $\Delta por1$  株をオレイン酸を炭素源として 1 時間培養した各細胞から抽出した全 RNA から cDNA を調製し、Illumina GAIIX を用いて網羅的転写解析を行った (小林、志波、未発表)。(A) 野生型株において、グルコースを炭素源として培養した場合と比較して、*n*-デカンを炭素源として培養した場合に cDNA 量が 2 倍以上増加する遺伝子。(B) (A) で示す遺伝子の中で、Yas2p により活性化され、Yas3p により抑制される遺伝子 ( $\Delta yas2$  株を *n*-デカンを炭素源として培養した場合に *n*-デカンで培養した野生型株と比較して cDNA 量が 2 分の 1 以下に、 $\Delta yas3$  株をグルコースで培養した場合にグルコースで培養した野生型株と比較して cDNA 量が 2 倍以上になる遺伝子)。

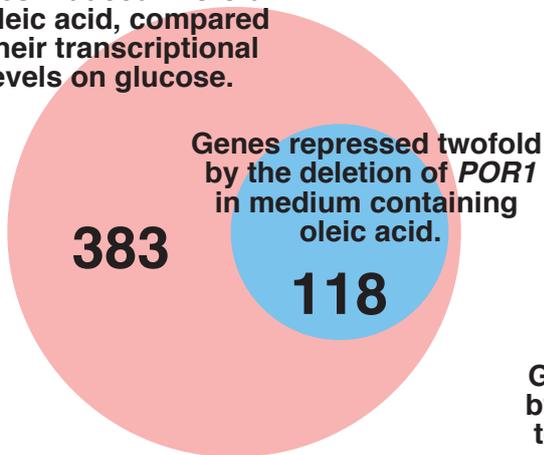
**C**  
Genes regulated by Yas2p and Yas3p  
is repressed by the addition of glycerol  
to medium containing *n*-decane



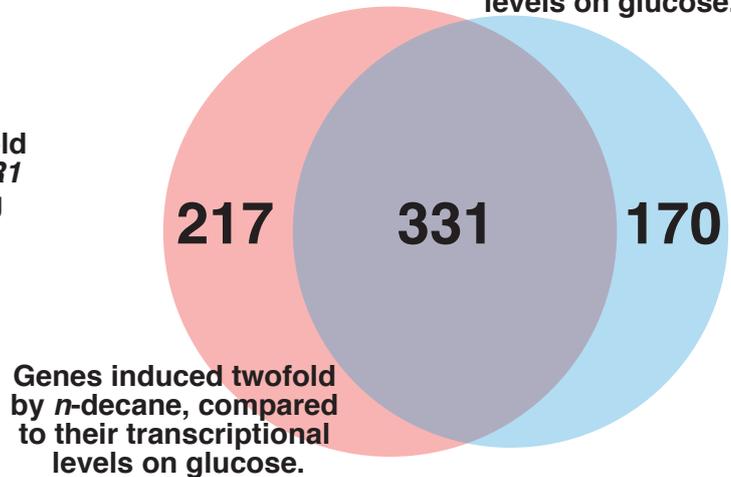
**D**  
Genes induced twofold  
by *n*-decane, compared  
to their transcriptional  
levels on glucose.



**E**  
Genes induced twofold  
by oleic acid, compared  
to their transcriptional  
levels on glucose.



**F**  
Genes induced twofold  
by oleic acid, compared  
to their transcriptional  
levels on glucose.



**Figure 0-3. *Y. lipolytica* の網羅的転写解析 (continued)**

(C) Yas2p、Yas3p により転写制御を受ける遺伝子の中で、野生型株において *n*-デカンによる転写がグリセロールにより 2 分の 1 以下に抑制される遺伝子の数。(D) 野生型株において、グリセロールと比較して *n*-デカンにより cDNA 量が 2 倍以上増加する遺伝子とグリセロールにより *n*-デカンによる転写が 2 分の 1 以下に抑制される遺伝子の数。(E) 野生型株においてグルコースと比較してオレイン酸により cDNA 量が 2 倍以上増加する遺伝子と、 $\Delta por1$  株をオレイン酸で培養した場合にオレイン酸で培養した野生型株と比較して cDNA 量が 2 分の 1 以下になる遺伝子の数。(F) 野生型株において、グルコースと比較して *n*-デカンにより cDNA 量が 2 倍以上増加する遺伝子とグルコースと比較してオレイン酸により cDNA 量が 2 倍以上増加する遺伝子の数。



## 第1章 Alk タンパク質群の機能解析

### 1-1 緒言

序章に述べたとおり、これまで解析された *n*-アルカン資化性酵母の多くは *n*-アルカンの末端水酸化に関わると予想される CYP52 ファミリーの P450 をコードする遺伝子を複数有する。*Y. lipolytica* については、Iida らによりこれら P450 をコードすると予想される 8 種の遺伝子 *ALK1* – *ALK8* が単離された[52]。さらに *Y. lipolytica* のゲノムデータベースから 4 種類のコホモログ (*ALK9* – *ALK12*)が見出された (Figure 1-0A) [62]。このうち、*ALK1*、*ALK2*、*ALK4*、*ALK6* については、Iida らにより破壊株の作製と解析が行われ、*ALK1* の単独破壊株は *n*-デカンを単一の炭素源として生育できないが *n*-ヘキサデカンでは生育できること、*ALK2*、*ALK3*、*ALK4*、*ALK6* の単独破壊株は *n*-デカンおよび *n*-ヘキサデカンの資化に欠損を示さないこと、*ALK1* および *ALK3* の二重破壊株は *n*-ヘキサデカンを用いた場合でも生育できるが、*ALK1* および *ALK2* の二重破壊株では生育が大きく遅延することが示された[52, 68]。これらの結果から、Alk1p が幅広い鎖長の *n*-アルカンの資化に関わること、Alk2p が長鎖の *n*-アルカンの資化に関わることが示唆された。さらに、Hanley らは植物 *Nicotiana benthamiana* の葉で *Y. lipolytica* の *ALK1* – *ALK8* を発現させて解析を行い、Alk3p、Alk5p、Alk7p がドデカン酸の ω 末端の水酸化活性を持つことを示した[53]。一方、平川によりこれら 12 種の *ALK* 遺伝子の発現解析が行われ、*ALK1*、*ALK2*、*ALK3*、*ALK4*、*ALK5*、*ALK6*、*ALK8*、*ALK9*、*ALK11*、*ALK12* の発現が *n*-デカンや *n*-ヘキサデカンにより誘導されることが明らかにされた (Figure 1-0B) [62]。しかしながら、これらの解析にも関わらず、大部分の Alk タンパク質については、それらがどのような化合物を基質とするのかは不明であった。

このような背景のもと、12種の*ALK*遺伝子を全て破壊した株を作製し、*ALK*遺伝子全破壊株の中で個々の*ALK*遺伝子を発現させることができれば、個々のAlkタンパク質の機能を明らかにするのに有効であると考えられた。そこで、高井は*Y. lipolytica*においてこれら12種の*ALK*遺伝子を全て破壊した株 ( $\Delta alk1-12$ 株)を作製した (Figure 1-0C) [69]。 $\Delta alk1-12$ 株は*n*-デカンや*n*-ヘキサデカンを資化できないが、1-ドデカノールやドデカノールを資化できること、また、高速液体クロマトグラフ質量分析装置 (liquid chromatography–mass spectrometry; LC-MS)での解析により、野生型株は*n*-デカンをデカン酸にする代謝経路を持つが、 $\Delta alk1-12$ 株はその経路に欠損があることが示された。そこで本章では、この $\Delta alk1-12$ 株について、さらに詳細に解析を行うとともに $\Delta alk1-12$ 株を用いて、各*ALK*遺伝子を発現させ、その機能を解析した。

## 1-2 実験方法と材料

### 1-2-1 菌株、遺伝子、培地

<菌株>

*Yarrowia lipolytica*

CXAU1 株	<i>MATA ade1 ura3</i> , CX161-1B (ATCC32338)由来[68]
$\Delta alk1$ 株	<i>MATA ade1 ura3 \Delta alk1</i> , CXAU1 株由来[69]
$\Delta alk1\Delta alk2$ 株	<i>MATA ade1 ura3 \Delta alk1 \Delta alk2</i> , $\Delta alk1$ 株由来[69]
$\Delta alk1\Delta alk2\Delta alk4$ 株	<i>MATA ade1 ura3 \Delta alk1 \Delta alk2 \Delta alk4</i> , $\Delta alk1\Delta alk2$ 株由来[69]
$\Delta alk1\Delta alk2\Delta alk4\Delta alk6$ 株	<i>MATA ade1 ura3 \Delta alk1 \Delta alk2 \Delta alk4 \Delta alk6</i> , $\Delta alk1\Delta alk2\Delta alk4$ 株由来[69]
$\Delta alk1\Delta alk2\Delta alk4\Delta alk6$ $\Delta alk11$ 株	<i>MATA ade1 ura3 \Delta alk1 \Delta alk2 \Delta alk4 \Delta alk6 \Delta alk11</i> , $\Delta alk1\Delta alk2\Delta alk4\Delta alk6$ 株由来[69]
$\Delta alk1\Delta alk2\Delta alk4\Delta alk6$ $\Delta alk9\Delta alk11$ 株	<i>MATA ade1 ura3 \Delta alk1 \Delta alk2 \Delta alk4 \Delta alk6 \Delta alk9 \Delta alk11</i> , $\Delta alk1\Delta alk2\Delta alk4\Delta alk6\Delta alk11$ 株由来[69]
$\Delta alk1\Delta alk2\Delta alk3\Delta alk4$ $\Delta alk6\Delta alk9\Delta alk11$ 株	<i>MATA ade1 ura3 \Delta alk1 \Delta alk2 \Delta alk3 \Delta alk4 \Delta alk6 \Delta alk9 \Delta alk11</i> , $\Delta alk1\Delta alk2\Delta alk4\Delta alk6\Delta alk9\Delta alk11$ 株由来[69]
$\Delta alk1\Delta alk2\Delta alk3\Delta alk4$ $\Delta alk6\Delta alk9\Delta alk11$ $\Delta alk12$ 株	<i>MATA ade1 ura3 \Delta alk1 \Delta alk2 \Delta alk3 \Delta alk4 \Delta alk6 \Delta alk9 \Delta alk11</i> , $\Delta alk1\Delta alk2\Delta alk3\Delta alk4\Delta alk6\Delta alk9\Delta alk11$ 株由来[69]
$\Delta alk1\Delta alk2\Delta alk3\Delta alk4$ $\Delta alk5\Delta alk6\Delta alk9$ $\Delta alk11\Delta alk12$ 株	<i>MATA ade1 ura3 \Delta alk1 \Delta alk2 \Delta alk3 \Delta alk4 \Delta alk5 \Delta alk6 \Delta alk9 \Delta alk11 \Delta alk12</i> , $\Delta alk1\Delta alk2\Delta alk3\Delta alk4\Delta alk5\Delta alk6\Delta alk9\Delta alk11$ 株由来[69]
$\Delta alk1\Delta alk2\Delta alk3\Delta alk4$ $\Delta alk5\Delta alk6\Delta alk7$ $\Delta alk9\Delta alk11\Delta alk12$ 株	<i>MATA ade1 ura3 \Delta alk1 \Delta alk2 \Delta alk3 \Delta alk4 \Delta alk5 \Delta alk6 \Delta alk7 \Delta alk9 \Delta alk11 \Delta alk12</i> , $\Delta alk1\Delta alk2\Delta alk3\Delta alk4\Delta alk5\Delta alk6\Delta alk9 \Delta alk11\Delta alk12$ 株由来[69]
$\Delta alk1\Delta alk2\Delta alk3\Delta alk4$ $\Delta alk5\Delta alk6\Delta alk7$ $\Delta alk8\Delta alk9\Delta alk11$ $\Delta alk12$ 株	<i>MATA ade1 ura3 \Delta alk1 \Delta alk2 \Delta alk3 \Delta alk4 \Delta alk5 \Delta alk6 \Delta alk7 \Delta alk8 \Delta alk9 \Delta alk11 \Delta alk12</i> , $\Delta alk1\Delta alk2\Delta alk3\Delta alk4\Delta alk5\Delta alk6 \Delta alk7\Delta alk9\Delta alk11\Delta alk12$ 株由来[69]
$\Delta alk1-12$ 株	<i>MATA ade1 ura3 \Delta alk1 \Delta alk2 \Delta alk3 \Delta alk4 \Delta alk5 \Delta alk6 \Delta alk7 \Delta alk8 \Delta alk9 \Delta alk10 \Delta alk11 \Delta alk12</i> , $\Delta alk1\Delta alk2\Delta alk3\Delta alk4\Delta alk5 \Delta alk6\Delta alk7\Delta alk8\Delta alk9\Delta alk11\Delta alk12$ 株由来[69]
$\Delta alk1-12$ <i>ALK1</i> 株	<i>MATA ade1 ura3 \Delta alk1::ALK1 \Delta alk2 \Delta alk3 \Delta alk4 \Delta alk5 \Delta alk6 \Delta alk7 \Delta alk8 \Delta alk9 \Delta alk10 \Delta alk11 \Delta alk12</i> , $\Delta alk1-12$ 株由来[69]

*Escherichia coli*

JM109 株 *recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17(r<sub>K</sub><sup>-</sup> m<sub>K</sub><sup>+</sup>) supE44 relA1*  
 $\Delta(lac-proAB) / F' traD36 proAB^+ lacI^q lacZ\Delta M15$

DH5 $\alpha$  株 *F<sup>-</sup> endA1 hsdR17(r<sub>K</sub><sup>-</sup> m<sub>K</sub><sup>+</sup>) phoA supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1*  
 $\Delta(lacZYA-argF)U169 deoR \phi 80dlacZ\Delta M15 \lambda^-$

### <遺伝子>

本章で解析した遺伝子の一覧

遺伝子名	Systematic name
<i>ALK1</i>	<i>YALI0E25982g</i>
<i>ALK2</i>	<i>YALI0F01320g</i>
<i>ALK3</i>	<i>YALI0E23474g</i>
<i>ALK4</i>	<i>YALI0B13816g</i>
<i>ALK5</i>	<i>YALI0B13838g</i>
<i>ALK6</i>	<i>YALI0B01848g</i>
<i>ALK7</i>	<i>YALI0A15488g</i>
<i>ALK8</i>	<i>YALI0C12122g</i>
<i>ALK9</i>	<i>YALI0B06248g</i>
<i>ALK10</i>	<i>YALI0B20702g</i>
<i>ALK11</i>	<i>YALI0C10054g</i>
<i>ALK12</i>	<i>YALI0A20130g</i>

### <培地>

#### 酵母用完全培地

##### YPD 培地

Bacto Yeast Extract (Difco)	1.0%
Bacto Peptone (Difco)	2.0%
D(+)-グルコース	2.0%

寒天培地には寒天 (Wako Pure Chemical Industries, Ltd.)を終濃度 2.0%となるように加えた。

#### 酵母用最少培地

##### YNB 培地

Yeast nitrogen base w/o amino acids and ammonium sulfate (Difco)	0.17%
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0.5%

#### SG 培地

グリセロール	2.0%
Yeast nitrogen base w/o amino acids and ammonium sulfate (Difco)	0.17%
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0.5%

#### SD 培地

D(+)-グルコース	2.0%
Yeast nitrogen base w/o amino acids and ammonium sulfate (Difco)	0.17%
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0.5%

#### *n*-デカン培地

<i>n</i> -デカン	2.0%
Yeast nitrogen base w/o amino acids and ammonium sulfate (Difco)	0.17%
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0.5%

#### *n*-ドデカン培地

<i>n</i> -ドデカン	2.0%, 1.0%, or 0.1%
Yeast nitrogen base w/o amino acids and ammonium sulfate (Difco)	0.17%
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0.5%

#### グルコース/*n*-ドデカン培地

D(+)-グルコース	2.0%
<i>n</i> -ドデカン	1.0%
Yeast nitrogen base w/o amino acids and ammonium sulfate (Difco)	0.17%
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0.5%

#### 1-ドデカノール培地

1-ドデカノール	0.1%
Yeast nitrogen base w/o amino acids and ammonium sulfate (Difco)	0.17%
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0.5%

Triton X-100	0.5%
ドデカナール培地	
ドデカナール	0.1%
Yeast nitrogen base w/o amino acids and ammonium sulfate (Difco)	0.17%
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0.5%
Triton X-100	0.5%
ドデカン酸培地	
ドデカン酸	0.1%
Yeast nitrogen base w/o amino acids and ammonium sulfate (Difco)	0.17%
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0.5%
Triton X-100	0.5%

寒天培地には寒天 (Wako Pure Chemical Industries, Ltd.)を終濃度 2%となるように加えた。また、1-ドデカノール、ドデカナール、ドデカン酸を含む培地に関しては、5% TritonX-100、1% 1-ドデカノール (ドデカナールまたはドデカン酸) を小型アナログ超音波ホモジナイザー Sonifier 250A (BRANSON)で乳化処理し、培地に 10 倍希釈で添加して作製した。

#### 酵母用最少培地 (固体培地で *n*-アルカンを与える場合)

##### *n*-アルカン培地

<i>n</i> -アルカン	*
Yeast nitrogen base w/o amino acids and ammonium sulfate (Difco)	0.17%
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0.5%

##### グルコース/*n*-アルカン培地

<i>n</i> -アルカン	*
D(+)-グルコース	2.0%
Yeast nitrogen base w/o amino acids and ammonium sulfate (Difco)	0.17%
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0.5%

寒天培地には寒天 (Wako Pure Chemical Industries, Ltd.)を終濃度 2%となるように加えた。

\*寒天培地で *n*-アルカンを炭素源として培養する場合には、滅菌した濾紙をシャーレの蓋側に置き、*n*-アルカン（直径 85 mm のシャーレに対し 1 ml）を濾紙に染み込ませ、揮発させて与えた。*n*-アルカンとして、*n*-デカン (C10)、*n*-ウンデカン (C11)、*n*-ドデカン (C12)、*n*-トリデカン (C13)、*n*-テトラデカン (C14)、*n*-ペンタデカン (C15)、*n*-ヘキサデカン (C16)、*n*-ヘプタデカン (C17)、*n*-オクタデカン (C18)を使用した。

### 大腸菌用完全培地

#### L-broth 培地

Bacto Tryptone (Difco)	1.0%
Yeast Extract (Difco)	0.5%
NaCl	0.5%

寒天培地には寒天 (Wako Pure Chemical Industries, Ltd.)を終濃度 1.5%となるように加えた。

#### 1-2-2 培養条件

*Y. lipolytica* の培養は 30°Cで行った。完全栄養培地として YPD 培地を、最少培地として YNB 培地に適当な炭素源を添加したものをを用いた。必要に応じて核酸（ウラシル、アデニン）を 24 µg/ml の濃度で添加した。

大腸菌の培養は 37°Cで行った。完全栄養培地として L-broth 培地を用い、必要に応じて ampicillin を 50 µg/ml の濃度で添加した。

#### 1-2-3 プラスミド

以下のプラスミドを使用した。

pSUT5	<i>ORII068/CEN1, URA3, pUC19-ori-ΔlacZa, XPR2 terminator, Amp<sup>r</sup> [31]</i>
pBluescript II SK (+)	(Stratagene)
pSUT-4xARR1	<i>ORII068/CEN1, URA3, pUC19-ori-ΔlacZa, 4xARR1 promoter, XPR2 terminator, Amp<sup>r</sup> [70]</i>
pSUT5lacZ	<i>ORII068/CEN1, URA3, pUC19-ori-ΔlacZa, E. coli lacZ (ATG-less), XPR2 terminator, Amp<sup>r</sup> [70]</i>
pGEM-T Vector	(Promega)

以下のプラスミドを作製し、使用した。

pSUT5-TH	Thrombin-6xHis をコードする配列を pSUT5 の KpnI サイトに挿入したプラスミド。
pS4ARR	pSUT-4xARR1 から 4xARR1 配列をクローニングし、pSUT5-

	TH の XbaI-EcoRI サイトに挿入したプラスミド。 <i>ALK</i> 遺伝子を 4xARR1 プロモーター下で発現させる際のベクター。
pSUTEF1	<i>TEF1</i> の上流 420 bp をクローニングし、pSUT5 の StuI-ApaI サイトに挿入したプラスミド。 <i>ALK</i> 遺伝子を <i>TEF1</i> プロモーター下で発現させる際のベクター。
pS4ARR-lacZ	pS4ARR を ApaI-StuI 処理した 4xARR1 断片を pSUT5-lacZ の ApaI-StuI サイトに挿入したプラスミド。
pSUTEF1-lacZ	pSUT5-lacZ を KpnI-StuI 処理した <i>lacZ</i> 断片を pSUTEF1 の KpnI-StuI サイトに挿入したプラスミド。
pS4RALK1	pS4ARR の BglII-ApaI サイトに <i>ALK1</i> の翻訳領域 (open reading frame; ORF) を挿入したプラスミド。
pS4RALK2	pS4ARR の BglII-ApaI サイトに <i>ALK2</i> の ORF を挿入したプラスミド。
pS4RALK3	pS4ARR の BglII-ApaI サイトに <i>ALK3</i> の ORF を挿入したプラスミド。
pS4RALK4	pS4ARR の EcoRI-ApaI サイトに <i>ALK4</i> の ORF を挿入したプラスミド。
pS4RALK5	pS4ARR の EcoRI-ApaI サイトに <i>ALK5</i> の ORF を挿入したプラスミド。
pS4RALK6	pS4ARR の EcoRI-ApaI サイトに <i>ALK6</i> の ORF を挿入したプラスミド。
pS4RALK7	pS4ARR の BglII-SalI サイトに <i>ALK7</i> の ORF を挿入したプラスミド。
pS4RALK8	pS4ARR の BglII-ApaI サイトに <i>ALK8</i> の ORF を挿入したプラスミド。
pS4RALK9	pSUTEF1- <i>ALK9</i> を EcoRI-KpnI 処理した <i>ALK9</i> の ORF 断片を pS4ARR の EcoRI-KpnI サイトに挿入したプラスミド。
pS4RALK10	pSUTEF1- <i>ALK10</i> を EcoRI-KpnI 処理した <i>ALK10</i> の ORF 断片を pS4ARR の EcoRI-KpnI サイトに挿入したプラスミド。
pS4RALK11	pSUTEF1- <i>ALK11</i> を EcoRI-KpnI 処理した <i>ALK11</i> の ORF 断片を pS4ARR の EcoRI-KpnI サイトに挿入したプラスミド。
pS4RALK12	pS4ARR の EcoRI-ApaI サイトに <i>ALK12</i> の ORF を挿入したプラスミド。
pSUTEF1- <i>ALK1</i>	pS4ARALK1 を StuI-KpnI 処理した <i>ALK1</i> の ORF を pSUTEF1 の StuI-KpnI サイトに挿入したプラスミド。
pSUTEF1- <i>ALK2</i>	pS4ARALK2 を StuI-KpnI 処理した <i>ALK2</i> の ORF を pSUTEF1

	の StuI-KpnI サイトに挿入したプラスミド。
pSUTEF1-ALK3	pS4ARALK3 を StuI-KpnI 処理した <i>ALK3</i> の ORF を pSUTEF1 の StuI-KpnI サイトに挿入したプラスミド。
pSUTEF1-ALK4	pS4ARALK4 を EcoRI-KpnI 処理した <i>ALK4</i> の ORF を pSUTEF1 の EcoRI-KpnI サイトに挿入したプラスミド。
pSUTEF1-ALK5	pS4ARALK5 を EcoRI-KpnI 処理した <i>ALK5</i> の ORF を pSUTEF1 の EcoRI-KpnI サイトに挿入したプラスミド。
pSUTEF1-ALK6	pS4ARALK6 を StuI-KpnI 処理した <i>ALK6</i> の ORF を pSUTEF1 の StuI-KpnI サイトに挿入したプラスミド。
pSUTEF1-ALK7	pSUTEF1 の HindIII-SalI サイトに <i>ALK7</i> の ORF を挿入したプラスミド。
pSUTEF1-ALK8	pSUTEF1 の EcoRI-KpnI サイトに <i>ALK8</i> の ORF を挿入したプラスミド。
pSUTEF1-ALK9	pSUTEF1 の EcoRI-KpnI サイトに <i>ALK9</i> の ORF を挿入したプラスミド。
pSUTEF1-ALK10	pSUTEF1 の EcoRI-KpnI サイトに <i>ALK10</i> の ORF を挿入したプラスミド。
pSUTEF1-ALK11	pSUTEF1 の EcoRI-KpnI サイトに <i>ALK11</i> の ORF を挿入したプラスミド。
pSUTEF1-ALK12	pS4ARALK12 を EcoRI-KpnI 処理した <i>ALK12</i> の ORF 断片を pSUTEF1 の EcoRI-KpnI サイトに挿入したプラスミド。
pS4RALK1-5A	pS4ARR の EcoRI-ApaI サイトに <i>ALK1</i> の 1 番目から 100 番目のアミノ酸に該当する ORF と <i>ALK5</i> の 95 番目から 531 番目のアミノ酸に該当する ORF (終止コドンを含む) を繋げた ORF 断片を挿入したプラスミド。
pS4RALK1-5B	pS4ARR の EcoRI-ApaI サイトに <i>ALK1</i> の 1 番目から 108 番目のアミノ酸に該当する ORF と <i>ALK5</i> の 103 番目から 531 番目のアミノ酸に該当する ORF (終止コドンを含む) を繋げた ORF 断片を挿入したプラスミド。
pS4RALK5-1A	pS4ARR の EcoRI-ApaI サイトに <i>ALK5</i> の 1 番目から 94 番目のアミノ酸に該当する ORF と <i>ALK1</i> の 101 番目から 523 番目のアミノ酸に該当する ORF (終止コドンを含む) を繋げた ORF 断片を挿入したプラスミド。
pS4RALK5-1B	pS4ARR の EcoRI-ApaI サイトに <i>ALK5</i> の 1 番目から 102 番目のアミノ酸に該当する ORF と <i>ALK1</i> の 109 番目から 523 番目のアミノ酸に該当する ORF (終止コドンを含む) を繋げた ORF

	断片を挿入したプラスミド。
pSUTEF1-ALK1-5A	pSUTEF1 の EcoRI-ApaI サイトに <i>ALK1</i> の 1 番目から 100 番目のアミノ酸に該当する ORF と <i>ALK5</i> の 95 番目から 531 番目のアミノ酸に該当する ORF (終止コドンを含む) を繋げた ORF 断片を挿入したプラスミド。
pSUTEF1-ALK1-5B	pSUTEF1 の EcoRI-ApaI サイトに <i>ALK1</i> の 1 番目から 108 番目のアミノ酸に該当する ORF と <i>ALK5</i> の 103 番目から 531 番目のアミノ酸に該当する ORF (終止コドンを含む) を繋げた ORF 断片を挿入したプラスミド。
pSUTEF1-ALK5-1A	pSUTEF1 の EcoRI-ApaI サイトに <i>ALK5</i> の 1 番目から 94 番目のアミノ酸に該当する ORF と <i>ALK1</i> の 101 番目から 523 番目のアミノ酸に該当する ORF (終止コドンを含む) を繋げた ORF 断片を挿入したプラスミド。
pSUTEF1-ALK5-1B	pSUTEF1 の EcoRI-ApaI サイトに <i>ALK5</i> の 1 番目から 102 番目のアミノ酸に該当する ORF と <i>ALK1</i> の 109 番目から 523 番目のアミノ酸に該当する ORF (終止コドンを含む) を繋げた ORF 断片を挿入したプラスミド。
pS4RALK1 <sup>S53K</sup>	pS4ARR の EcoRI-ApaI サイトに <i>ALK1</i> の 53 番目のセリン残基に該当する TCC を AAG に置換した ORF 断片を挿入したプラスミド。
pS4RALK1 <sup>I56R</sup>	pS4ARR の EcoRI-ApaI サイトに <i>ALK1</i> の 56 番目のイソロイシン残基に該当する ATC を CGA に置換した ORF 断片を挿入したプラスミド。
pS4RALK1 <sup>S53K/I56R</sup>	pS4ARR の EcoRI-ApaI サイトに <i>ALK1</i> の 53 番目のセリン残基に該当する TCC を AAG に、56 番目のイソロイシン残基に該当する ATC を CGA に置換した ORF 断片を挿入したプラスミド。
pS4RALK1 <sup>Y83R</sup>	pS4ARR の EcoRI-ApaI サイトに <i>ALK1</i> の 83 番目のチロシン残基に該当する TAC を CGA に置換した ORF 断片を挿入したプラスミド。
pS4RALK1 <sup>C85Y</sup>	pS4ARR の EcoRI-ApaI サイトに <i>ALK1</i> の 85 番目のシステイン残基に該当する TGC を TAT に置換した ORF 断片を挿入したプラスミド。
pS4RALK1 <sup>T88H</sup>	pS4ARR の EcoRI-ApaI サイトに <i>ALK1</i> の 88 番目のスレオニン残基に該当する ACC を CAC に置換した ORF 断片を挿入したプラスミド。

pSUTEF1-ALK1 <sup>S53K</sup>	pSUTEF1 の EcoRI-ApaI サイトに <i>ALK1</i> の 53 番目のセリン残基に該当する TCC を AAG に置換した ORF 断片を挿入したプラスミド。
pSUTEF1-ALK1 <sup>I56R</sup>	pSUTEF1 の EcoRI-ApaI サイトに <i>ALK1</i> の 56 番目のイソロイシン残基に該当する ATC を CGA に置換した ORF 断片を挿入したプラスミド。
pSUTEF1-ALK1 <sup>S53K/I56R</sup>	pSUTEF1 の EcoRI-ApaI サイトに <i>ALK1</i> の 53 番目のセリン残基に該当する TCC を AAG に、56 番目のイソロイシン残基に該当する ATC を CGA に置換した ORF 断片を挿入したプラスミド。
pSUTEF1-ALK1 <sup>Y83R</sup>	pSUTEF1 の EcoRI-ApaI サイトに <i>ALK1</i> の 83 番目のチロシン残基に該当する TAC を CGA に置換した ORF 断片を挿入したプラスミド。
pSUTEF1-ALK1 <sup>C85Y</sup>	pSUTEF1 の EcoRI-ApaI サイトに <i>ALK1</i> の 85 番目のシステイン残基に該当する TGC を TAT に置換した ORF 断片を挿入したプラスミド。
pSUTEF1-ALK1 <sup>T88H</sup>	pSUTEF1 の EcoRI-ApaI サイトに <i>ALK1</i> の 88 番目のスレオニン残基に該当する ACC を CAC に置換した ORF 断片を挿入したプラスミド。
pS4RALK5 <sup>K50S</sup>	pS4ARR の EcoRI-ApaI サイトに <i>ALK5</i> の 50 番目のリジン残基に該当する AAG を TCC に置換した ORF 断片を挿入したプラスミド。
pS4RALK5 <sup>R53I</sup>	pS4ARR の EcoRI-ApaI サイトに <i>ALK5</i> の 53 番目のアルギニン残基に該当する CGA を ATC に置換した ORF 断片を挿入したプラスミド。
pS4RALK5 <sup>K50S/R53I</sup>	pS4ARR の EcoRI-ApaI サイトに <i>ALK5</i> の 50 番目のリジン残基に該当する AAG を TCC に、53 番目のアルギニン残基に該当する CGA を ATC に置換した ORF 断片を挿入したプラスミド。
pS4RALK5 <sup>R77Y</sup>	pS4ARR の EcoRI-ApaI サイトに <i>ALK5</i> の 77 番目のアルギニン残基に該当する CGA を TAC に置換した ORF 断片を挿入したプラスミド。
pS4RALK5 <sup>Y79C</sup>	pS4ARR の EcoRI-ApaI サイトに <i>ALK5</i> の 79 番目のチロシン残基に該当する TAT を TGC に置換した ORF 断片を挿入したプラスミド。
pS4RALK5 <sup>H82T</sup>	pS4ARR の EcoRI-ApaI サイトに <i>ALK5</i> の 82 番目のヒスチジン残基に該当する CAC を ACC に置換した ORF 断片を挿入した

pSUTEF1-ALK5 <sup>K50S</sup>	プラスミド。 pSUTEF1 の EcoRI-ApaI サイトに <i>ALK5</i> の 50 番目のリジン残基に該当する AAG を TCC に置換した ORF 断片を挿入したプラスミド。
pSUTEF1-ALK5 <sup>R53I</sup>	pSUTEF1 の EcoRI-ApaI サイトに <i>ALK5</i> の 53 番目のアルギニン残基に該当する CGA を ATC に置換した ORF 断片を挿入したプラスミド。
pSUTEF1-ALK5 <sup>K50S/R53I</sup>	pSUTEF1 の EcoRI-ApaI サイトに <i>ALK5</i> の 50 番目のリジン残基に該当する AAG を TCC に、53 番目のアルギニン残基に該当する CGA を ATC に置換した ORF 断片を挿入したプラスミド。
pSUTEF1-ALK5 <sup>R77Y</sup>	pSUTEF1 の EcoRI-ApaI サイトに <i>ALK5</i> の 77 番目のアルギニン残基に該当する CGA を TAC に置換した ORF 断片を挿入したプラスミド。
pSUTEF1-ALK5 <sup>Y79C</sup>	pSUTEF1 の EcoRI-ApaI サイトに <i>ALK5</i> の 79 番目のチロシン残基に該当する TAT を TGC に置換した ORF 断片を挿入したプラスミド。
pSUTEF1-ALK5 <sup>H82T</sup>	pSUTEF1 の EcoRI-ApaI サイトに <i>ALK5</i> の 82 番目のヒスチジン残基に該当する CAC を ACC に置換した ORF 断片を挿入したプラスミド。

#### 1-2-4 プラスミドの構築

##### 1-2-4-1 pSUT5-TH

プライマー Throm-6xHis-F と Throm-6xHis-R をアニーリングさせてできた断片を pSUT5 の KpnI サイトに挿入し、pSUT5-TH を得た。塩基配列を読み、挿入した DNA 断片の向きと配列に誤りがないことを確認した。

本項で使用したプライマーの配列

---

Throm-6xHis-F	5'-CGGCCTGGTGCCTCGCGGCAGCCATCATCATCATCATC ACTAAGTAC-3'
Throm-6xHis-R	5'-TTAGTGATGATGATGATGATGGCTGCCGCGAGGCACC AGGCCGGTAC-3'

---

##### 1-2-4-2 pS4ARR

pSUT-4xARR1 を鋳型として、プライマー XbaI-4xARR-His-F と EcoRI-StuI-4xARR-R を用いて、4xARR1 プロモーター領域を iProof による PCR 法で増幅した後、XbaI と EcoRI

で切断した。この DNA 断片を pSUT5-TH の XbaI-EcoRI サイトに挿入し、pS4ARR を得た。塩基配列を読み、挿入した DNA 断片の配列に誤りがないことを確認した。

本項で使用したプライマーの配列 (下線部は制限酵素サイトを示す)

---

XbaI-4xARR-His-F	5'-AAT <u>CTAGA</u> ATCAAGCTTCGAACCT-3'
EcoRI-StuI-4xARR-R	5'-AAGAATTCAGATCTAGGCCTCATAGTGCAGGAGTATTC TGGGGAG-3'

---

#### 1-2-4-3 pSUTEF1

CXAU1 株の全 DNA を鋳型として、プライマー XbaI-TEF1p-F と TEF1p-R-StuIEcoRI を用いて、*TEF1* のプロモーター領域を iProof による PCR 法で増幅した後、XbaI と EcoRI で切断した。この DNA 断片を pSUT5 の XbaI-EcoRI サイトに挿入し、pSUTEF1 を得た。塩基配列を読み、挿入した DNA 断片の配列に誤りがないことを確認した。

本項で使用したプライマーの配列 (下線部は制限酵素サイトを示す)

---

XbaI-TEF1p-F	5'-AAT <u>CTAGAG</u> ACCAGAGACCGGGTTGGCGGCGCATT-3'
TEF1p-R-StuIEcoRI	5'-TTGAATTCAGGCCTCATTTTGAATGATTCTTATAC-3'

---

#### 1-2-4-4 pS4ARR-lacZ

pS4ARR を ApaI と StuI で切断して得られた 4xARR1 プロモーター断片を pSUT5lacZ の ApaI-StuI サイトに挿入し、pS4ARR-lacZ を得た。

#### 1-2-4-5 pSUTEF1-lacZ

pSUT5lacZ を KpnI と StuI で切断して得られた *lacZ* 断片を pSUTEF1 の KpnI-StuI サイトに挿入し、pSUTEF1-lacZ を得た。

#### 1-2-4-6 pS4RALK1

CXAU1 株の全 DNA を鋳型として、プライマー ALK1-F と ALK1-R を用いて、*ALK1* の ORF 領域を iProof による PCR 法で増幅した後、BglII と ApaI で切断した。この DNA 断片を pS4ARR の BglII-ApaI サイトに挿入し、pS4RALK1 を得た。塩基配列を読み、挿入した DNA 断片の配列に誤りがないことを確認した。

本項で使用したプライマーの配列 (下線部は制限酵素サイトを示す)

---

ALK1-F	5'-CCCAGATCT <u>AT</u> GTCCAACGCCCTCAACCTGTCGC-3'
ALK1-R	5'-TTTGGG <u>CCCT</u> TACTGAGCCTTGGTGGTCTTGGAG-3'

---

#### 1-2-4-7 pS4RALK2

CXAU1 株の全 DNA を鋳型として、プライマー-ALK2-F と ALK2-R を用いて、*ALK2* の ORF 領域を iProof による PCR 法で増幅した後、BglII と ApaI で切断した。この DNA 断片を pS4ARR の BglII-ApaI サイトに挿入し、pS4RALK2 を得た。塩基配列を読み、挿入した DNA 断片の配列に誤りがないことを確認した。

本項で使用したプライマーの配列 (下線部は制限酵素サイトを示す)

---

ALK2-F	5'-CCCAGATCTATGATCATCTTATACGTTTTGGCCGT-3'
ALK2-R	5'-TTTGGGCCCTTATGCGTTAATGAGCTTCTCGGTCT-3'

---

#### 1-2-4-8 pS4RALK3

CXAU1 株の全 DNA を鋳型として、プライマー-ALK3-F と ALK3-R を用いて、*ALK3* の ORF 領域を iProof による PCR 法で増幅した後、BglII と ApaI で切断した。この DNA 断片を pS4ARR の BglII-ApaI サイトに挿入し、pS4RALK3 を得た。塩基配列を読み、挿入した DNA 断片の配列に誤りがないことを確認した。

本項で使用したプライマーの配列 (下線部は制限酵素サイトを示す)

---

ALK3-F	5'-CCCAGATCTATGATTATCATCGAAACGCTCATTGG-3'
ALK3-R	5'-TTTGGGCCCTCACTCTTCCTTGGCTCTGGTCAGC-3'

---

#### 1-2-4-9 pS4RALK4

CXAU1 株の全 DNA を鋳型として、プライマー-ALK4-F と ALK4-R を用いて、*ALK4* の ORF 領域を iProof による PCR 法で増幅した後、EcoRI と ApaI で切断した。この DNA 断片を pS4ARR の EcoRI-ApaI サイトに挿入し、pS4RALK4 を得た。塩基配列を読み、挿入した DNA 断片の配列に誤りがないことを確認した。

本項で使用したプライマーの配列 (下線部は制限酵素サイトを示す)

---

ALK4-F	5'-CCGAATTCATGTTGACCAATCTTACGATCGTGCTGAT-3'
ALK4-R	5'-ATAGGGCCCCTACTTCATCGACACCCAAACACCCTCAC-3'

---

#### 1-2-4-10 pS4RALK5

CXAU1 株の全 DNA を鋳型として、プライマー-ALK5-F と ALK5-R を用いて、*ALK5* の ORF 領域を iProof による PCR 法で増幅した後、EcoRI と ApaI で切断した。この DNA 断片を pS4ARR の EcoRI-ApaI サイトに挿入し、pS4RALK5 を得た。塩基配列を読み、

挿入した DNA 断片の配列に誤りがないことを確認した。

本項で使用したプライマーの配列 (下線部は制限酵素サイトを示す)

---

ALK5-F	5'-CCGAATTCATGCTACAACCTCTTTGGCGTCCTTGTG-3'
ALK5-R	5'-ATAGGGCCCCTACGCCTTCTCACCTTATACATCTTGA C-3'

---

#### 1-2-4-11 pS4RALK6

CXAU1 株の全 DNA を鋳型として、プライマー-ALK6-F と ALK6-R を用いて、*ALK6* の ORF 領域を iProof による PCR 法で増幅した後、EcoRI と ApaI で切断した。この DNA 断片を pS4ARR の EcoRI-ApaI サイトに挿入し、pS4RALK6 を得た。塩基配列を読み、挿入した DNA 断片の配列に誤りがないことを確認した。

本項で使用したプライマーの配列 (下線部は制限酵素サイトを示す)

---

ALK6-F	5'-CCGAATTCATGATCCAGTCGGTTTTCTTGGCCTTGG-3'
ALK6-R	5'-ATAGGGCCCCTACTCCATCTTCAACCAAACACCATCAT C-3'

---

#### 1-2-4-12 pS4RALK7

CXAU1 株の全 DNA を鋳型として、プライマー-ALK7-F と ALK7-R を用いて、*ALK7* の ORF 領域を iProof による PCR 法で増幅した後、BglII と SalI で切断した。この DNA 断片を pS4ARR の BglII-SalI サイトに挿入し、pS4RALK7 を得た。塩基配列を読み、挿入した DNA 断片の配列に誤りがないことを確認した。

本項で使用したプライマーの配列 (下線部は制限酵素サイトを示す)

---

ALK7-F	5'-TTTAGATCTATGTTCCAGCTATTCTCGATACTGG-3'
ALK7-R	5'-TTTGTCGACTCACTCCGTCTTAATCCAAACGCC-3'

---

#### 1-2-4-13 pS4RALK8

CXAU1 株の全 DNA を鋳型として、プライマー-ALK8-F と ALK8-R を用いて、*ALK8* の ORF 領域を iProof による PCR 法で増幅した後、BglII と ApaI で切断した。この DNA 断片を pS4ARR の BglII-ApaI サイトに挿入し、pS4RALK8 を得た。塩基配列を読み、挿入した DNA 断片の配列に誤りがないことを確認した。

本項で使用したプライマーの配列 (下線部は制限酵素サイトを示す)

---

ALK8-F	5'-TTTAGATCTATGATACCATTTACCAAGATCAATC-3'
--------	--

---

## 1-2-4-14 pS4RALK9

pSUTEF1-ALK9 (後述) を EcoRI-KpnI 処理した *ALK9* の ORF を含む DNA 断片を pS4ARR の EcoRI-KpnI サイトに挿入し、pS4RALK9 を得た。

## 1-2-4-15 pS4RALK10

pSUTEF1-ALK10 (後述) を EcoRI-KpnI 処理した *ALK10* の ORF を含む DNA 断片を pS4ARR の EcoRI-KpnI サイトに挿入し、pS4RALK10 を得た。

## 1-2-4-16 pS4RALK11

pSUTEF1-ALK11 (後述) を EcoRI-KpnI 処理した *ALK11* の ORF を含む DNA 断片を pS4ARR の EcoRI-KpnI サイトに挿入し、pS4RALK11 を得た。

## 1-2-4-17 pS4RALK12

CXAU1 株の全 DNA を鋳型として、プライマー-ALK12-F と ALK12-R を用いて、*ALK12* の ORF 領域を iProof による PCR 法で増幅した後、EcoRI と ApaI で切断した。この DNA 断片を pS4ARR の EcoRI-ApaI サイトに挿入し、pS4RALK12 を得た。塩基配列を読み、挿入した DNA 断片の配列に誤りがないことを確認した。

本項で使用したプライマーの配列 (下線部は制限酵素サイトを示す)

ALK12-F                    5'-CCCGAATTCATGCTCGAAATACTGATTGGAGTCA-3'

ALK12-R                    5'-TTTGGGCCCTCAACTAACTACTGTACCCTCCCTCG-3'

## 1-2-4-18 pSUTEF1-ALK1

pS4RALK1 を StuI-KpnI 処理した *ALK1* の ORF を含む DNA 断片を pSUTEF1 の StuI-KpnI サイトに挿入し、pSUTEF1-ALK1 を得た。

## 1-2-4-19 pSUTEF1-ALK2

pS4RALK2 を StuI-KpnI 処理した *ALK2* の ORF を含む DNA 断片を pSUTEF1 の StuI-KpnI サイトに挿入し、pSUTEF1-ALK2 を得た。

## 1-2-4-20 pSUTEF1-ALK3

pS4RALK3 を StuI-KpnI 処理した *ALK3* の ORF を含む DNA 断片を pSUTEF1 の StuI-KpnI サイトに挿入し、pSUTEF1-ALK3 を得た。

#### 1-2-4-21 pSUTEF1-ALK4

pS4RALK4 を EcoRI-KpnI 処理した *ALK4* の ORF を含む DNA 断片を pSUTEF1 の EcoRI-KpnI サイトに挿入し、pSUTEF1-ALK4 を得た。

#### 1-2-4-22 pSUTEF1-ALK5

pS4RALK5 を EcoRI-KpnI 処理した *ALK5* の ORF を含む DNA 断片を pSUTEF1 の EcoRI-KpnI サイトに挿入し、pSUTEF1-ALK5 を得た。

#### 1-2-4-23 pSUTEF1-ALK6

pS4RALK6 を StuI-KpnI 処理した *ALK6* の ORF を含む DNA 断片を pSUTEF1 の StuI-KpnI サイトに挿入し、pSUTEF1-ALK6 を得た。

#### 1-2-4-24 pSUTEF1-ALK7

CXAU1 株の全 DNA を鋳型として、プライマー-ALK7-F2 と ALK7-R を用いて、*ALK7* の ORF 領域を iProof による PCR 法で増幅した後、HindIII と SalI で切断した。この DNA 断片を pSUTEF1 の HindIII-SalI サイトに挿入し、pSUTEF1-ALK7 を得た。塩基配列を読み、挿入した DNA 断片の配列に誤りがないことを確認した。

本項で使用したプライマーの配列 (下線部は制限酵素サイトを示す)

---

ALK7-F2	5'-TTA <u>AGCTT</u> ATGTTCCAGCTATTCTCGATACTGG-3'
ALK7-R	5'-TTT <u>GTCGAC</u> TCACTCCGTCTTAATCCAAACGCCC-3'

---

#### 1-2-4-25 pSUTEF1-ALK8

CXAU1 株の全 DNA を鋳型として、プライマー-ALK8-F2 と ALK8-R2 を用いて、*ALK8* の ORF 領域を iProof による PCR 法で増幅した後、EcoRI と KpnI で切断した。この DNA 断片を pSUTEF1 の EcoRI-KpnI サイトに挿入し、pSUTEF1-ALK8 を得た。塩基配列を読み、挿入した DNA 断片の配列に誤りがないことを確認した。

本項で使用したプライマーの配列 (下線部は制限酵素サイトを示す)

---

ALK8-F2	5'-TTGA <u>AATTC</u> ATGATACCATTTACCAAGATCAATC-3'
ALK8-R2	5'-TTGGT <u>ACC</u> CTATTTTCATATGAACCCTCAGACCT-3'

---

#### 1-2-4-26 pSUTEF1-ALK9

CXAU1 株の全 DNA を鋳型として、プライマー-ALK9-F と ALK9-R を用いて、*ALK9* の ORF 領域を iProof による PCR 法で増幅した後、EcoRI と KpnI で切断した。この DNA 断片を pSUTEF1 の EcoRI-KpnI サイトに挿入し、pSUTEF1-ALK9 を得た。塩基配列を

読み、挿入した DNA 断片の配列に誤りがないことを確認した。

本項で使用したプライマーの配列 (下線部は制限酵素サイトを示す)

---

ALK9-F	5'-TTGA <u>AATTC</u> ATGAACACCTTCCATCTGTTAA-3'
ALK9-R	5'-TTGGT <u>ACC</u> CCTAGTTCTTCTTGTACAACCTCAC-3'

---

#### 1-2-4-27 pSUTEF1-ALK10

CXAU1 株の全 DNA を鋳型として、プライマー-ALK10-F と ALK10-R を用いて、*ALK10* の ORF 領域を iProof による PCR 法で増幅した後、EcoRI と KpnI で切断した。この DNA 断片を pSUTEF1 の EcoRI-KpnI サイトに挿入し、pSUTEF1-ALK10 を得た。塩基配列を読み、挿入した DNA 断片の配列に誤りがないことを確認した。

本項で使用したプライマーの配列 (下線部は制限酵素サイトを示す)

---

ALK10-F	5'-TTGA <u>AATTC</u> ATGATTCTACTCTACGTCCTG-3'
ALK10-R	5'-TTGGT <u>ACCT</u> CACGGTAAGTTATTTGTGCTC-3'

---

#### 1-2-4-28 pSUTEF1-ALK11

CXAU1 株の全 DNA を鋳型として、プライマー-ALK11-F と ALK11-R を用いて、*ALK11* の ORF 領域を iProof による PCR 法で増幅した後、EcoRI と KpnI で切断した。この DNA 断片を pSUTEF1 の EcoRI-KpnI サイトに挿入し、pSUTEF1-ALK11 を得た。塩基配列を読み、挿入した DNA 断片の配列に誤りがないことを確認した。

本項で使用したプライマーの配列 (下線部は制限酵素サイトを示す)

---

ALK11-F	5'-TTGA <u>AATTC</u> ATGCTCTTACCACTGCTTTTCGCC-3'
ALK11-R	5'-TTGGT <u>ACCT</u> CACTTGACCCGAATCCTCACACCATCG-3'

---

#### 1-2-4-29 pSUTEF1-ALK12

pS4RALK12 を EcoRI-KpnI 処理した *ALK12* の ORF を含む DNA 断片を pSUTEF1 の EcoRI-KpnI サイトに挿入し、pSUTEF1-ALK12 を得た。

#### 1-2-4-30 pS4RALK1-5A, pSUTEF1-ALK1-5A

CXAU1 株の全 DNA を鋳型として、プライマー-ALK1-F2 と R-ALK1(300)を用いて、*ALK1* の ORF 領域の一部を KOD -Plus- Neo による PCR 法で増幅した後、EcoRI で切断した。また、CXAU1 株の全 DNA を鋳型として、プライマー-ALK5(283)-F と ALK5-R を用いて、*ALK5* の ORF 領域の一部を KOD -Plus- Neo による PCR 法で増幅した後、ApaI で切断した。これら 2 つの断片の平滑末端をリン酸化した後、pS4ARR または

pSUTEF1 の EcoRI-ApaI サイトに挿入し、それぞれ S4RALK1-5A、pSUTEF1-ALK1-5A を得た。塩基配列を読み、挿入した DNA 断片の配列に誤りがないことを確認した。

本項で使用したプライマーの配列 (下線部は制限酵素サイトを示す)

---

ALK1-F2	5'-CCGAATTCATGTCCAACGCCCTCAACCTGTTCGC-3'
R-ALK1(300)	5'-AGGGTCGACAGTGTGGTACATGTCA-3'
ALK5(283)-F	5'-GAGAACATCAAGGCAATGTTGGCGA-3'
ALK5-R	5'-ATAGGGCCCCTACGCCTTCTCACCCCTTATACATCTTGA C-3'

---

#### 1-2-4-31 pS4RALK1-5B, pSUTEF1-ALK1-5B

CXAU1 株の全 DNA を鋳型として、プライマー-ALK1-F2 と R-ALK1(324)を用いて、*ALK1* の ORF 領域の一部を KOD -Plus- Neo による PCR 法で増幅した後、EcoRI で切断した。また、CXAU1 株の全 DNA を鋳型として、プライマー-ALK5(307)-F と ALK5-R を用いて、*ALK5* の ORF 領域の一部を KOD -Plus- Neo による PCR 法で増幅した後、ApaI で切断した。これら 2 つの断片の平滑末端をリン酸化した後、pS4ARR または pSUTEF1 の EcoRI-ApaI サイトに挿入し、それぞれ S4RALK1-5B、pSUTEF1-ALK1-5B を得た。塩基配列を読み、挿入した DNA 断片の配列に誤りがないことを確認した。

本項で使用したプライマーの配列 (下線部は制限酵素サイトを示す)

---

ALK1-F2	5'-CCGAATTCATGTCCAACGCCCTCAACCTGTTCGC-3'
R-ALK1(324)	5'-GGCTAGAACAGCCTTGAGGT-3'
ALK5(307)-F	5'-ACTCAATTTAAGGACTTTTCTCTGG-3'
ALK5-R	5'-ATAGGGCCCCTACGCCTTCTCACCCCTTATACATCTTGA C-3'

---

#### 1-2-4-32 pS4RALK5-1A, pSUTEF1-ALK5-1A

CXAU1 株の全 DNA を鋳型として、プライマー-ALK5-F と R-ALK5(282)を用いて、*ALK5* の ORF 領域の一部を KOD -Plus- Neo による PCR 法で増幅した後、EcoRI で切断した。また、CXAU1 株の全 DNA を鋳型として、プライマー-ALK1(301)-F と ALK1-R を用いて、*ALK1* の ORF 領域の一部を KOD -Plus- Neo による PCR 法で増幅した後、ApaI で切断した。これら 2 つの断片の平滑末端をリン酸化した後、pS4ARR または pSUTEF1 の EcoRI-ApaI サイトに挿入し、それぞれ S4RALK5-1A、pSUTEF1-ALK5-1A を得た。塩基配列を読み、挿入した DNA 断片の配列に誤りがないことを確認した。

本項で使用したプライマーの配列 (下線部は制限酵素サイトを示す)

ALK5-F	5'-CCGAATTCATGCTACAACCTCTTTGGCGTCCTTGTG-3'
R-ALK5(282)	5'-AGGCTCCATGGTGGAAATCACAGGG-3'
ALK1(301)-F	5'-GAGAACCTCAAGGCTGTTCTAGCCA-3'
ALK1-R	5'-TTTGGGCCCTTACTGAGCCTTGGTGGTCTTGGAG-3'

#### 1-2-4-33 pS4RALK5-1B, pSUTEF1-ALK5-1B

CXAU1 株の全 DNA を鋳型として、プライマー ALK5-F と R-ALK5(306) を用いて、*ALK5* の ORF 領域の一部を KOD -Plus- Neo による PCR 法で増幅した後、EcoRI で切断した。また、CXAU1 株の全 DNA を鋳型として、プライマー ALK1(325)-F と ALK1-R を用いて、*ALK1* の ORF 領域の一部を KOD -Plus- Neo による PCR 法で増幅した後、ApaI で切断した。これら 2 つの断片の平滑末端をリン酸化した後、pS4ARR または pSUTEF1 の EcoRI-ApaI サイトに挿入し、それぞれ S4RALK5-1B、pSUTEF1-ALK5-1B を得た。塩基配列を読み、挿入した DNA 断片の配列に誤りがないことを確認した。

本項で使用したプライマーの配列 (下線部は制限酵素サイトを示す)

ALK5-F	5'-CCGAATTCATGCTACAACCTCTTTGGCGTCCTTGTG-3'
R-ALK5(306)	5'-CGCCAACATTGCCTTGATGTTCTCA-3'
ALK1(325)-F	5'-ACCCAGTTCAAGGACTTTTGTCTCG-3'
ALK1-R	5'-TTTGGGCCCTTACTGAGCCTTGGTGGTCTTGGAG-3'

#### 1-2-4-34 pS4RALK1<sup>S53K</sup>, pSUTEF1-ALK1<sup>S53K</sup>

CXAU1 株の全 DNA を鋳型として、プライマー ALK1-F2 と ALK1(S53K)-R およびプライマー ALK1(S53K)-F と ALK1-R を用いて、*ALK1* の ORF 領域の一部をそれぞれ KOD -Plus- Neo による PCR 法で増幅した。これら 2 つの断片を鋳型として、プライマー ALK1-F2 と ALK1-R を用いて、*ALK1* の ORF 領域を KOD -Plus- Neo による fusionPCR 法により増幅した後、EcoRI と ApaI で切断した。この DNA 断片を pBluescript II SK (+) の EcoRI-ApaI サイトに挿入し、pBALK1<sup>S53K</sup> を得た。塩基配列を読み、挿入した DNA 断片の配列を誤りがないことを確認した。pBALK1<sup>S53K</sup> を EcoRI と KpnI で切断し、*ALK1* ORF を含む断片を pS4ARR、pSUTEF1 の EcoRI-KpnI サイトに挿入し、pS4RALK1<sup>S53K</sup>、pSUTEF1-ALK1<sup>S53K</sup> を得た。

本項で使用したプライマーの配列 (下線部は制限酵素サイトを示す)

ALK1-F2	5'-CCGAATTCATGTCCAACGCCCTCAACCTGTGCG-3'
ALK1(S53K)-R	5'-GAAGGGGATGAAGAACTTGGCTGAA-3'
ALK1(S53K)-F	5'-TTCAGCCAAGTTCTTCATCCCCTTC-3'
ALK1-R	5'-TTTGGGCCCTTACTGAGCCTTGGTGGTCTTGGAG-3'

1-2-4-35 pS4RALK1<sup>I56R</sup>, pSUTEF1-ALK1<sup>I56R</sup>

CXAU1 株の全 DNA を鋳型として、プライマー-ALK1-F2 と ALK1(I56R)-R およびプライマー-ALK1(I56R)-F と ALK1-R を用いて、*ALK1* の ORF 領域の一部をそれぞれ KOD-Plus-Neo による PCR 法で増幅した。これら 2 つの断片を鋳型として、プライマー-ALK1-F2 と ALK1-R を用いて、*ALK1* の ORF 領域を KOD-Plus-Neo による fusionPCR 法により増幅した後、EcoRI と ApaI で切断した。この DNA 断片を pBluescript II SK (+) の EcoRI-ApaI サイトに挿入し、pBALK1<sup>I56R</sup> を得た。塩基配列を読み、挿入した DNA 断片の配列を誤りがないことを確認した。pBALK1<sup>I56R</sup> を EcoRI と KpnI で切断し、*ALK1* ORF を含む断片を pS4ARR、pSUTEF1 の EcoRI-KpnI サイトに挿入し、pS4RALK1<sup>I56R</sup>、pSUTEF1-ALK1<sup>I56R</sup> を得た。

本項で使用したプライマーの配列 (下線部は制限酵素サイトを示す)

ALK1-F2	5'-CCGAATTCATGTCCAACGCCCTCAACCTGTTCGC-3'
ALK1(I56R)-R	5'-GAAGGGTTCGGAAGAAGGAGGCTGAA-3'
ALK1(I56R)-F	5'-TTCAGCCTCCTTCTCCGACCCTTC-3'
ALK1-R	5'-TTTGGGCCCTTACTGAGCCTTGGTGGTCTTGGAG-3'

1-2-4-36 pS4RALK1<sup>S53K/I56R</sup>, pSUTEF1-ALK1<sup>S53K/I56R</sup>

CXAU1 株の全 DNA を鋳型として、プライマー-ALK1-F2 と ALK1(S53K/I56R)-R およびプライマー-ALK1(S53K/I56R)-F と ALK1-R を用いて、*ALK1* の ORF 領域の一部をそれぞれ KOD-Plus-Neo による PCR 法で増幅した。これら 2 つの断片を鋳型として、プライマー-ALK1-F2 と ALK1-R を用いて、*ALK1* の ORF 領域を KOD-Plus-Neo による fusionPCR 法により増幅した後、EcoRI と ApaI で切断した。この DNA 断片を pBluescript II SK (+) の EcoRI-ApaI サイトに挿入し、pBALK1<sup>S53K/I56R</sup> を得た。塩基配列を読み、挿入した DNA 断片の配列を誤りがないことを確認した。pBALK1<sup>S53K/I56R</sup> を EcoRI と KpnI で切断し、*ALK1* ORF を含む断片を pS4ARR、pSUTEF1 の EcoRI-KpnI サイトに挿入し、pS4RALK1<sup>S53K/I56R</sup>、pSUTEF1-ALK1<sup>S53K/I56R</sup> を得た。

本項で使用したプライマーの配列 (下線部は制限酵素サイトを示す)

ALK1-F2	5'-CCGAATTCATGTCCAACGCCCTCAACCTGTTCGC-3'
ALK1(S53K/I56R)-R	5'-GAAGGGTTCGGAAGAACTTGGCTGAA-3'
ALK1(S53K/I56R)-F	5'-TTCAGCCAAGTTCTTCCGACCCTTC-3'
ALK1-R	5'-TTTGGGCCCTTACTGAGCCTTGGTGGTCTTGGAG-3'

1-2-4-37 pS4RALK1<sup>Y83R</sup>, pSUTEF1-ALK1<sup>Y83R</sup>

CXAU1 株の全 DNA を鋳型として、プライマー-ALK1-F2 と ALK1(Y83R)-R およびプライマー-ALK1(Y83R)-F と ALK1-R を用いて、*ALK1* の ORF 領域の一部をそれぞれ KOD-Plus- Neo による PCR 法で増幅した。これら 2 つの断片を鋳型として、プライマー-ALK1-F2 と ALK1-R を用いて、*ALK1* の ORF 領域を KOD-Plus- Neo による fusionPCR 法により増幅した後、EcoRI と ApaI で切断した。この DNA 断片を pBluescript II SK (+) の EcoRI-ApaI サイトに挿入し、pBALK1<sup>Y83R</sup> を得た。塩基配列を読み、挿入した DNA 断片の配列を誤りがないことを確認した。pBALK1<sup>Y83R</sup> を EcoRI と KpnI で切断し、*ALK1* ORF を含む断片を pS4ARR、pSUTEF1 の EcoRI-KpnI サイトに挿入し、pS4RALK1<sup>Y83R</sup>、pSUTEF1-ALK1<sup>Y83R</sup> を得た。

本項で使用したプライマーの配列 (下線部は制限酵素サイトを示す)

ALK1-F2	5'-CCGAATTCATGTCCAACGCCCTCAACCTGTCGC-3'
ALK1(Y83R)-F	5'-GGTCGAACCTGCAAGACCACCGTG-3'
ALK1(Y83R)-R	5'-CACGGTGGTCTTGCAGGTTTCGACC-3'
ALK1-R	5'-TTTGGGCCCTTACTGAGCCTTGGTGGTCTTGGAG-3'

1-2-4-38 pS4RALK1<sup>C85Y</sup>, pSUTEF1-ALK1<sup>C85Y</sup>

CXAU1 株の全 DNA を鋳型として、プライマー-ALK1-F2 と ALK1(C85Y)-R およびプライマー-ALK1(C85Y)-F と ALK1-R を用いて、*ALK1* の ORF 領域の一部をそれぞれ KOD-Plus- Neo による PCR 法で増幅した。これら 2 つの断片を鋳型として、プライマー-ALK1-F2 と ALK1-R を用いて、*ALK1* の ORF 領域を KOD-Plus- Neo による fusionPCR 法により増幅した後、EcoRI と ApaI で切断した。この DNA 断片を pBluescript II SK (+) の EcoRI-ApaI サイトに挿入し、pBALK1<sup>C85Y</sup> を得た。塩基配列を読み、挿入した DNA 断片の配列を誤りがないことを確認した。pBALK1<sup>C85Y</sup> を EcoRI と KpnI で切断し、*ALK1* ORF を含む断片を pS4ARR、pSUTEF1 の EcoRI-KpnI サイトに挿入し、pS4RALK1<sup>C85Y</sup>、pSUTEF1-ALK1<sup>C85Y</sup> を得た。

本項で使用したプライマーの配列 (下線部は制限酵素サイトを示す)

ALK1-F2	5'-CCGAATTCATGTCCAACGCCCTCAACCTGTCGC-3'
ALK1(C85Y)-F	5'-GGTTACACCTATAAGACCACCGTG-3'
ALK1(C85Y)-R	5'-CACGGTGGTCTTATAGGTGTAACC-3'
ALK1-R	5'-TTTGGGCCCTTACTGAGCCTTGGTGGTCTTGGAG-3'

1-2-4-39 pS4RALK1<sup>T88H</sup>, pSUTEF1-ALK1<sup>T88H</sup>

CXAU1 株の全 DNA を鋳型として、プライマー-ALK1-F2 と ALK1(T88H)-R およびプライマー-ALK1(T88H)-F と ALK1-R を用いて、*ALK1* の ORF 領域の一部をそれぞれ KOD

-Plus- Neo による PCR 法で増幅した。これら 2 つの断片を鋳型として、プライマー ALK1-F2 と ALK1-R を用いて、*ALK1* の ORF 領域を KOD -Plus- Neo による fusionPCR 法により増幅した後、EcoRI と ApaI で切断した。この DNA 断片を pBluescript II SK (+) の EcoRI-ApaI サイトに挿入し、pBALK1<sup>T88H</sup> を得た。塩基配列を読み、挿入した DNA 断片の配列を誤りがないことを確認した。pBALK1<sup>T88H</sup> を EcoRI と KpnI で切断し、*ALK1* ORF を含む断片を pS4ARR、pSUTEF1 の EcoRI-KpnI サイトに挿入し、pS4RALK1<sup>T88H</sup>、pSUTEF1-ALK5<sup>T88H</sup> を得た。

本項で使用したプライマーの配列 (下線部は制限酵素サイトを示す)

---

ALK1-F2	5'-CCGAATTCATGTCCAACGCCCTCAACCTGTCGC-3'
ALK1(T88H)-F	5'-GGTTACACCTGCAAGACCCACGTG-3'
ALK1(T88H)-R	5'-CACGTGGGTCTTGCAGGTGTAACC-3'
ALK1-R	5'-TTTGGGCCCTTACTGAGCCTTGGTGGTCTTGGAG-3'

---

1-2-4-40 pS4RALK5<sup>K50S</sup>, pSUTEF1-ALK5<sup>K50S</sup>

CXAU1 株の全 DNA を鋳型として、プライマー ALK5-F と ALK5(K50S)-R およびプライマー ALK5(K50S)-F と ALK5-R を用いて、*ALK5* の ORF 領域の一部をそれぞれ KOD -Plus- Neo による PCR 法で増幅した。これら 2 つの断片を鋳型として、プライマー ALK5-F と ALK5-R を用いて、*ALK5* の ORF 領域を KOD -Plus- Neo による fusionPCR 法により増幅した後、EcoRI と ApaI で切断した。この DNA 断片を pBluescript II SK (+) の EcoRI-ApaI サイトに挿入し、pBALK5<sup>K50S</sup> を得た。塩基配列を読み、挿入した DNA 断片の配列を誤りがないことを確認した。pBALK5<sup>K50S</sup> を EcoRI と KpnI で切断し、*ALK5* ORF を含む断片を pS4ARR、pSUTEF1 の EcoRI-KpnI サイトに挿入し、pS4RALK5<sup>K50S</sup>、pSUTEF1-ALK5<sup>K50S</sup> を得た。

本項で使用したプライマーの配列 (下線部は制限酵素サイトを示す)

---

ALK5-F	5'-CCGAATTCATGCTACAACCTCTTTGGCGTCCTTGTG-3'
ALK5(K50S)-R	5'-CACTGCTCGGATTCCGGACCAGCC-3'
ALK5(K50S)-F	5'-GGCTGGTCCGGAATCCGAGCAGTG-3'
ALK5-R	5'-ATAGGGCCCCTACGCCTTCTCACCCCTTATACATCTTGA C-3'

---

1-2-4-41 pS4RALK5<sup>R53I</sup>, pSUTEF1-ALK5<sup>R53I</sup>

CXAU1 株の全 DNA を鋳型として、プライマー ALK5-F と ALK5(R53I)-R およびプライマー ALK5(R53I)-F と ALK5-R を用いて、*ALK5* の ORF 領域の一部をそれぞれ KOD -Plus- Neo による PCR 法で増幅した。これら 2 つの断片を鋳型として、プライマー

ALK5-F と ALK5-R を用いて、*ALK5* の ORF 領域を KOD -Plus- Neo による fusionPCR 法により増幅した後、EcoRI と ApaI で切断した。この DNA 断片を pBluescript II SK (+) の EcoRI-ApaI サイトに挿入し、pBALK5<sup>R531</sup> を得た。塩基配列を読み、挿入した DNA 断片の配列を誤りがないことを確認した。pBALK5<sup>R531</sup> を EcoRI と KpnI で切断し、*ALK5* ORF を含む断片を pS4ARR、pSUTEF1 の EcoRI-KpnI サイトに挿入し、pS4RALK5<sup>R531</sup>、pSUTEF1-ALK5<sup>R531</sup> を得た。

本項で使用したプライマーの配列 (下線部は制限酵素サイトを示す)

---

ALK5-F	5'-CCGAATTCATGCTACAACCTCTTTGGCGTCCTTGTG-3'
ALK5(R53I)-R	5'-CACTGCGATGATTCCCTTCCAGCC-3'
ALK5(R53I)-F	5'-GGCTGGAAGGGAATCATCGCAGTG-3'
ALK5-R	5'-ATAGGGCCCCTACGCCTTCTCACCCCTTATACATCTTGA C-3'

---

1-2-4-42 pS4RALK5<sup>K50S/R53I</sup>, pSUTEF1-ALK5<sup>K50S/R53I</sup>

CXAU1 株の全 DNA を鋳型として、プライマー ALK5-F と ALK5(K50S/R53I)-R およびプライマー ALK5(K50S/R53I)-F と ALK5-R を用いて、*ALK5* の ORF 領域の一部をそれぞれ KOD -Plus- Neo による PCR 法で増幅した。これら 2 つの断片を鋳型として、プライマー ALK5-F と ALK5-R を用いて、*ALK5* の ORF 領域を KOD -Plus- Neo による fusionPCR 法により増幅した後、EcoRI と ApaI で切断した。この DNA 断片を pBluescript II SK (+) の EcoRI-ApaI サイトに挿入し、pBALK5<sup>K50S/R53I</sup> を得た。塩基配列を読み、挿入した DNA 断片の配列を誤りがないことを確認した。pBALK5<sup>K50S/R53I</sup> を EcoRI と KpnI で切断し、*ALK5* ORF を含む断片を pS4ARR、pSUTEF1 の EcoRI-KpnI サイトに挿入し、pS4RALK5<sup>K50S/R53I</sup>、pSUTEF1-ALK5<sup>K50S/R53I</sup> を得た。

本項で使用したプライマーの配列 (下線部は制限酵素サイトを示す)

---

ALK5-F	5'-CCGAATTCATGCTACAACCTCTTTGGCGTCCTTGTG-3'
ALK5(K50S/R53I)-R	5'-CACTGCGATGATTCCGGACCAGCC-3'
ALK5(K50S/R53I)-F	5'-GGCTGGTCCGGAATCATCGCAGTG-3'
ALK5-R	5'-ATAGGGCCCCTACGCCTTCTCACCCCTTATACATCTTGA C-3'

---

1-2-4-43 pS4RALK5<sup>R77Y</sup>, pSUTEF1-ALK5<sup>R77Y</sup>

CXAU1 株の全 DNA を鋳型として、プライマー ALK5-F と ALK5(R77Y)-R およびプライマー ALK5(R77Y)-F と ALK5-R を用いて、*ALK5* の ORF 領域の一部をそれぞれ KOD -Plus- Neo による PCR 法で増幅した。これら 2 つの断片を鋳型として、プライマー

ALK5-F と ALK5-R を用いて、*ALK5* の ORF 領域を KOD -Plus- Neo による fusionPCR 法により増幅した後、EcoRI と ApaI で切断した。この DNA 断片を pBluescript II SK (+) の EcoRI-ApaI サイトに挿入し、pBALK5<sup>R77Y</sup> を得た。塩基配列を読み、挿入した DNA 断片の配列を誤りがないことを確認した。pBALK5<sup>R77Y</sup> を EcoRI と KpnI で切断し、*ALK5* ORF を含む断片を pS4ARR、pSUTEF1 の EcoRI-KpnI サイトに挿入し、pS4RALK5<sup>R77Y</sup>、pSUTEF1-ALK5<sup>R77Y</sup> を得た。

本項で使用したプライマーの配列 (下線部は制限酵素サイトを示す)

---

ALK5-F	5'-CCGAATTCATGCTACAACCTCTTTGGCGTCCTTGTG-3'
ALK5(R77Y)-F	5'-GGATACACCTATGTCTTTTCACATT-3'
ALK5(R77Y)-R	5'-AATGTGAAAGACATAGGTGTATCC-3'
ALK5-R	5'-ATAGGGCCCCTACGCCTTCTCACCCCTTATACATCTTGA C-3'

---

1-2-4-44 pS4RALK5<sup>Y79C</sup>, pSUTEF1-ALK5<sup>Y79C</sup>

CXAU1 株の全 DNA を鋳型として、プライマー-ALK5-F と ALK5(Y79C)-R およびプライマー-ALK5(Y79C)-F と ALK5-R を用いて、*ALK5* の ORF 領域の一部をそれぞれ KOD -Plus- Neo による PCR 法で増幅した。これら 2 つの断片を鋳型として、プライマー-ALK5-F と ALK5-R を用いて、*ALK5* の ORF 領域を KOD -Plus- Neo による fusionPCR 法により増幅した後、EcoRI と ApaI で切断した。この DNA 断片を pBluescript II SK (+) の EcoRI-ApaI サイトに挿入し、pBALK5<sup>Y79C</sup> を得た。塩基配列を読み、挿入した DNA 断片の配列を誤りがないことを確認した。pBALK5<sup>Y79C</sup> を EcoRI と KpnI で切断し、*ALK5* ORF を含む断片を pS4ARR、pSUTEF1 の EcoRI-KpnI サイトに挿入し、pS4RALK5<sup>Y79C</sup>、pSUTEF1-ALK5<sup>Y79C</sup> を得た。

本項で使用したプライマーの配列 (下線部は制限酵素サイトを示す)

---

ALK5-F	5'-CCGAATTCATGCTACAACCTCTTTGGCGTCCTTGTG-3'
ALK5(Y79C)-F	5'-GGACGAACCTGCGTCTTTTCACATT-3'
ALK5(Y79C)-R	5'-AATGTGAAAGACGCAGGTTTCGTCC-3'
ALK5-R	5'-ATAGGGCCCCTACGCCTTCTCACCCCTTATACATCTTGA C-3'

---

1-2-4-45 pS4RALK5<sup>H82T</sup>, pSUTEF1-ALK5<sup>H82T</sup>

CXAU1 株の全 DNA を鋳型として、プライマー-ALK5-F と ALK5(H82T)-R およびプライマー-ALK5(H82T)-F と ALK5-R を用いて、*ALK5* の ORF 領域の一部をそれぞれ KOD -Plus- Neo による PCR 法で増幅した。これら 2 つの断片を鋳型として、プライマー-

ALK5-F と ALK5-R を用いて、*ALK5* の ORF 領域を KOD -Plus- Neo による fusionPCR 法により増幅した後、EcoRI と ApaI で切断した。この DNA 断片を pBluescript II SK (+) の EcoRI-ApaI サイトに挿入し、pBALK5<sup>H82T</sup> を得た。塩基配列を読み、挿入した DNA 断片の配列を誤りがないことを確認した。pBALK5<sup>H82T</sup> を EcoRI と KpnI で切断し、*ALK5* ORF を含む断片を pS4ARR、pSUTEF1 の EcoRI-KpnI サイトに挿入し、pS4RALK5<sup>H82T</sup>、pSUTEF1-ALK5<sup>H82T</sup> を得た。

本項で使用したプライマーの配列 (下線部は制限酵素サイトを示す)

ALK5-F	5'-CCGAATTCATGCTACAACCTCTTTGGCGTCCTTG-3'
ALK5(H82T)-F	5'-GGACGAACCTATGTCTTTACCATT-3'
ALK5(H82T)-R	5'-AATGGTAAAGACATAGGTTTCGTCC-3'
ALK5-R	5'-ATAGGGCCCCTACGCCTTCTCACCCCTTATACATCTTGA C-3'

### 1-2-5 遺伝子操作

一般的な遺伝子組み換え操作に必要な酵素、試薬類は Takara Bio Inc.、TOYOBO Co., LTD.、New England BioLabs、NIPPON GENE CO., LTD.、Bio-Rad Laboratories、Invitrogen、QIAGEN N.V.のいずれかより購入し、使用法は添付の説明書に従った。DNA の連結反応には DNA Ligation Kit <Mighty Mix> (Takara Bio Inc.)を用いた。DNA 末端の脱リン酸化には Alkaline phosphatase *E. coli* C75 (Takara Bio Inc.)を用いた。電気泳動による DNA 解析は TAE-buffer [40 mM Tris-acetate (pH 8.0), 1 mM エチレンジアミン四酢酸 (ethylenediaminetetraacetic acid; EDTA)]、及び 0.6~2.0%のアガロースゲルによって行った。アガロースからの DNA 回収には Freeze'N Squeeze DNA Gel Extraction Spin Columns (Bio-Rad Laboratories)または QIAquick<sup>®</sup> Gel Extraction Kit (QIAGEN N.V.)を用いた。大腸菌からのプラスミドの単離、形質転換などの操作は成書に従った。

### 1-2-6 Polymerase Chain Reaction (PCR)

PCR には iProof (Bio-Rad Laboratories)、Takara Ex Taq (Takara Bio Inc.)、KOD -Plus- Neo (TOYOBO CO., LTD.) KOD-FX Neo (TOYOBO CO., LTD.)および Platinum<sup>®</sup> Taq DNA Polymerase High Fidelity (Invitrogen)を用いた。PCR 反応には PCR Thermal Cycler MP (Takara Bio Inc.)を用い、反応条件はプライマーの T<sub>m</sub> 値、増幅断片長、酵素の至適条件などを考慮して行った。

### 1-2-7 塩基配列の決定

塩基配列の決定の際には、BigDye<sup>®</sup> Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied

Biosystems, Inc.)で PCR 反応を行った後、ABI PRISM 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Inc.)を用いるか、Fasmac Co., Ltd.の DNA シーケンス解析に委託して、配列を決定した。

#### 1-2-8 *Y. lipolytica* の形質転換

*Y. lipolytica* の形質転換は Iida らの方法に従い、Gene Pulser (Bio-Rad Laboratories)を用いた電気穿孔法で行った[68]。

##### 試薬

ソルビトール溶液

D(-)-ソルビトール 1 M

##### 操作

- 1) 形質転換を行う宿主菌体を YPD 培地で定常期まで一晩培養した。
- 2) 10 ml の YPD 培地に 1)の培養液を 2%植菌して 5~6 時間培養後、10 ml の氷冷した滅菌水、ソルビトール溶液でそれぞれ 2 回ずつ洗浄した。
- 3) できるだけ少量のソルビトール溶液に菌体を懸濁した後、50  $\mu$ l ずつを 1.5 ml チューブに分取し、DNA 溶液 (0.5  $\mu$ l~5  $\mu$ l) を添加した。
- 4) ピペッティングにより混和した後、あらかじめ氷冷しておいたキュベット (電極間 0.2 cm、Bio-Rad Laboratories) に移しパルスをかけた。パルス条件は、Capacitator: 25  $\mu$ F、Parallel resister: 400  $\Omega$ 、Initial voltage: 1.8 kV。
- 5) パルス後、速やかに菌体に 100  $\mu$ l のソルビトール溶液を加え、ピペッティングにより懸濁した後、選択培地上にプレーティングした。

プラスミドの導入など高い形質転換効率を必要としない場合は、YPD 固体培地より回収した菌体を 1 ml の氷冷した滅菌水、ソルビトール溶液でそれぞれ 2 回ずつ洗浄した後、上記の 3) 以降の操作を行った。

#### 1-2-9 *Y. lipolytica* の全 DNA の調製

*Y. lipolytica* の全 DNA の調製には、Dr. GenTLE™ for yeast High Recovery (Takara Bio Inc.)を用い、添付の説明書に従った。

#### 1-2-10 *Y. lipolytica* の全 RNA の調製

*Y. lipolytica* の全 RNA の調製には、ISOGEN (NIPPON GENE CO., LTD.)を用い、添付の説明書に従った。菌体の破碎にはマルチビーズショッカー (YASUI KIKAI)と直径 0.50 mm の専用グラスビーズ (低アルカリ) を用い、2,700 rpm で 1 分間の運転の後、1 分間の停止を 3 サイクル行った。運転中は氷水でマルチビーズショッカーを冷却した。

### 1-2-11 Rapid amplification of 5' and 3' cDNA ends (RACE)

*ALK9* の RACE には SMARTer™ RACE cDNA Amplification Kit (Clontech) を用い、方法は添付の説明書に従った。5'-RACE においては、まず Gene Specific Primer 1 (GSP1) を用いて PCR を行い、さらにその PCR 産物を鋳型として Nested Gene Specific Primer 1 (NGSP1) を用いた Nested PCR を行った。3'-RACE においては、まず GSP2 を用いて PCR を行い、さらにその PCR 産物を鋳型として NGSP2 を用いた Nested PCR を行った。遺伝子特異的プライマーとして以下のプライマーを用いた。

#### Primers for *ALK9* RACE

ALK9_GSP1	5'-GGAACACGTACTTGTCGTCGTCCACC-3'
ALK9_NGSP1	5'-CAGCCTCCACCAAAGCCTTAGACACG-3'
ALK9_GSP2	5'-GGCCCAGGAGCACCTTGGTGAGCGT-3'
ALK9_NGSP2	5'-GGAACCCCAAGGAACTACAGACTGCT-3'

### 1-2-12 CO 還元差スペクトル測定

#### 試薬

##### A-buffer

リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.25)	0.2 M
Tween 20	0.5%(v/v)
グリセロール	35%(w/v)
EDTA	1 mM
ジチオトレイトール (dithiothreitol; DTT)	0.5 mM

##### B-buffer

D(-)-ソルビトール	400 mM
トリス塩酸緩衝液 (pH 7.5)	50 mM
EDTA	1 mM
DTT	0.5 mM

##### シアン化カリウム溶液

KCN	100 mM
トリス塩酸緩衝液 (pH 7.0)	50 mM
EDTA	1 mM

NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> と Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> を用いて、リン酸ナトリウム緩衝液を調製した。トリスヒドロキシメチルアミノメタン (tris(hydroxymethyl)aminomethane; Tris)と塩酸溶液を利用して、トリス塩酸緩衝液を調製した。

#### 操作

- 1) 適当な培養液 (OD<sub>600</sub> = 1.0 以上の培養液 200 ml 程度)から回収した菌体を氷冷しておいた B-buffer 20 ml で 2 回洗浄した。
- 2) 氷冷した A-buffer 7 ml に懸濁し、シアン化カリウム溶液 200 μl を加えて、よく混合した。
- 3) 2 つの石英セルに 3 ml ずつ分注した。
- 4) UV-2200A (Shimadzu Corp.)にセットしオートゼロ補正を行った。
- 5) 片方のセルに 5 分間一酸化炭素 (carbon monoxide; CO)を吹き込み、測定条件を測定波長範囲 400 ~ 500 nm、高速測定、スリット幅 5.0 nm、T = 30 sec、N = 1 と設定して、UV-2200A で CO 還元差スペクトルを測定した。

### 1-2-13 細胞内の *n*-アルカン代謝産物解析

#### 試薬

Tris-buffered saline (TBS)

トリス塩酸緩衝液 (pH 7.6)	20 mM
NaCl	137 mM

水酸化カリウム-メタノール溶液

KOH	10% in methanol
-----	-----------------

塩化カリウム溶液

KCl	0.1 mM
-----	--------

クロロホルム

*n*-ヘキサン

トリメチルシリル (trimethylsilyl; TMS)化試薬

HMDS + TMCS + Pyridine, 3:1:9 (Sylon HTP) Kit	(SUPELCO)
---	-----------

#### 操作

- 1) 適当な培養液から回収した菌体を集菌し、TBS 1 ml で洗浄して、1.5 ml エッペンチューブに集めた。
- 2) 水酸化カリウム-メタノール溶液 1 ml で菌体を懸濁し、スクリューキャップ付試験管

に移した。

- 3) 菌体湿重量 1 mg に対して、0.4  $\mu\text{g}$  のウンデカン酸を内標準物質として添加した。
- 4) 菌体懸濁液を 80°C で 15 分毎によく懸濁しながら、2 時間処理した。
- 5) 菌体懸濁液を室温に戻し、塩化カリウム溶液 0.5 ml を加えた。
- 6) クロロホルム 1 ml 加えて 15 分間振盪した後、クロロホルム層を回収する操作を 3 回繰り返した。
- 7) 得られたクロロホルム層 3 ml を窒素ガス下で蒸発乾固させた。
- 8) *n*-ヘキサン 200  $\mu\text{l}$  を加えて抽出物を溶かし、TMS 化試薬 200  $\mu\text{l}$  を加えて室温で 5 分間反応させた後、2000 rpm、室温、5 min の条件で遠心して上清を取得した。
- 9) 得られた反応物 1  $\mu\text{l}$  をガスクロマトグラフ質量分析装置 (gas chromatography–mass spectrometry; GC-MS) QP5050A (Shimadzu Corp.) または QP2010 SE で測定した。使用したカラムは DB-5 (30 m x 0.25 nm, J & W Scientific) で、測定に際して、気化室温度およびインターフェース温度は 270°C、オープン温度は 100°C で 2 分保持した後、300°C まで毎分 10°C で昇温し、300°C で 20 分間保持した。

ガスクロマトグラフの面積値算出のための標的イオンとして、ウンデカン酸のトリメチルシリル誘導体では  $m/z$  243、1-ドデカノールのトリメチルシリル誘導体では  $m/z$  243、ドデカン酸のトリメチルシリル誘導体では  $m/z$  257 を利用した。各株における 1-ドデカノール、ドデカン酸の量を内標準であるウンデカン酸に対する比として算出した。

#### 1-2-14 $\beta$ -ガラクトシダーゼ活性測定

##### 試薬

##### Phosphorus-buffered saline (PBS)

$\text{Na}_2\text{HPO}_4$	53 mM
$\text{NaH}_2\text{PO}_4$	13 mM
NaCl	137 mM
KCl	27 mM

##### Z-buffer

$\text{Na}_2\text{HPO}_4$	60 mM
$\text{NaH}_2\text{PO}_4$	40 mM
KCl	10 mM
$\text{MgSO}_4$	1 mM
2-メルカプトエタノール	50 mM

##### ONPG 溶液

*o*-Nitrophenyl- $\beta$ -galactopyranoside (nacalai tesque)

4 mg/ml in Z-buffer

炭酸ナトリウム溶液

Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>

1 M

### 操作

- 1) 適当な培養液から回収し、PBS で洗浄した菌体を破砕チューブに集菌した。
- 2) 150  $\mu$ l の菌体破砕バッファーおよび菌体と同体積のガラスビーズ（直径 0.5 mm、低アルカリ）を加えたのち、マルチビーズショッカー（YASUI KIKAI）を用いて 2,700 rpm で1分間の運転の後、1分間の停止を3サイクル行い菌体破砕した。
- 3) 4,000 rpm、5 min、4 °Cの遠心分離によりガラスビーズと未破砕の菌体を分離し、その上清を 1.5 ml チューブに移した。
- 4) 15,000 rpm、10 min、4 °Cで遠心分離し、その上清を粗酵素溶液とした。
- 5) 粗酵素溶液のタンパク質濃度を定量後、Z-buffer で適当な濃度に希釈した。
- 6) 5) で希釈した粗酵素溶液 500  $\mu$ l に ONPG 溶液を 100  $\mu$ l 加え、30°Cで保温した。適当な時間で炭酸ナトリウム溶液を 250  $\mu$ l 加え反応を止めた後、420 nm の吸光度を測定した。

*o*-ニトロフェノール (*o*-nitrophenol; ONP)のモル吸光係数は  $0.0213 \mu\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$  である。1 unit を1分間で  $1 \times 10^{-3} \mu\text{mol}$  の ONP を生じる酵素量として定義し、粗酵素溶液中のタンパク質 1 mg あたりの unit 数を以下の式を用いて算出した。

$\beta$ -ガラクトシダーゼ活性 (unit/mg protein)

=  $\text{OD}_{420} \times 79.8 \times \text{希釈率} / \text{タンパク質濃度 (mg/ml)} / \text{反応時間 (min)}$

### 1-2-15 培養液中の脂肪酸解析

#### 試薬

水酸化カリウム水溶液

KOH

1 M

塩酸水溶液

HCl

1 M

酢酸エチル

*n*-ヘキサン

TMS 化試薬

## 操作

- 1) 適当な培養液 5 ml を回収し、水酸化カリウム溶液 500  $\mu$ l を加えて、ボルテックスで 20 秒間攪拌した。
- 2) 塩酸溶液 1.0 ml と酢酸エチル 2 ml を加えて、ボルテックスで 30 秒間攪拌した。
- 3) 上層 3 ml を 1.5 ml エッペンチューブ 2 本に分注し、15,000 rpm、5 min、室温で遠心した。
- 4) 上層（酢酸エチル層）を 1 ml 回収し、窒素ガス下で蒸発乾固させた。
- 5) *n*-ヘキサン 600  $\mu$ l を加えて抽出物を溶かし、TMS 化試薬 200  $\mu$ l を加えて室温で 5 分間反応させた後、2000 rpm、室温、5 min の条件で遠心して上清を取得した。
- 6) 得られた反応物 1  $\mu$ l を GC-MS QP2010SE で測定した。使用したカラムは DB-5 (30 m x 0.25 mm, J & W Scientific) で、測定に際して、気化室温度およびインターフェース温度は 270°C、オーブン温度は 100°C で 2 分保持した後、300°C まで毎分 10°C で昇温し、300°C で 20 分間保持した。培養液に基質として与えた物質の流出時間ではフィラメントをオフにした。

## 1-3 結果

### 1-3-1 $\Delta alk1-12$ 株の解析

#### 1-3-1-1 *ALK* 破壊株の各種炭素源での生育

緒言で述べたように、高井は  $\Delta alk1-12$  株が炭素鎖長 10 の *n*-デカンおよび炭素鎖長 16 の *n*-ヘキサデカンを炭素源とした培地で生育しないことを示した[69]。そこで、*n*-デカン、*n*-ヘキサデカンに加えて他の鎖長の *n*-アルカンを単一の炭素源とした場合の  $\Delta alk1-12$  株の生育についての解析を行った。また、 $\Delta alk1-12$  株を作製する過程で得られた 11 種の *ALK* 遺伝子破壊株、さらに  $\Delta alk1-12$  株のゲノムに *ALK1* を戻した  $\Delta alk1-12$  *ALK1* 株についてもあわせて解析を行った (Figure 1-1A, Table 1-1)。その結果、 $\Delta alk1\Delta alk2\Delta alk4\Delta alk6$  株から  $\Delta alk1-12$  株までの 9 種類の *ALK* 破壊株は YNB 固体培地上で *n*-デカンから *n*-ヘキサデカンのいずれの鎖長の *n*-アルカンを与えても生育を示さなかった。 $\Delta alk1\Delta alk2$  株および  $\Delta alk1\Delta alk2\Delta alk4$  株は *n*-デカンから *n*-テトラデカンまでは資化できなかったが、*n*-ペンタデカンと *n*-ヘキサデカンを炭素源とした培地では僅かな生育を示した。一方、 $\Delta alk1$  株は *n*-デカンを炭素源とした場合は生育せず、*n*-ウンデカンから *n*-ペンタデカンを炭素源とした培地では生育の遅延を示し、*n*-ヘキサデカンを炭素源とすると野生型株と同程度の生育を示した。一方、 $\Delta alk1-12$  *ALK1* 株はいずれの鎖長の *n*-アルカンを与えても野生型株と同程度の生育を示した。これらの結果から、Iidaらの解析結果[52, 68]と同様に、*Alk1p* が *n*-デカンから *n*-ヘキサデカンまでの代謝に重要

な役割を果たすこと、Alk2p が *n*-ヘキサデカンなどの長鎖の *n*-アルカンの代謝に関わることが再度示唆された。次に SD 固体培地に *n*-アルカンを与えた条件で生育を観察した。*n*-デカンを与えた場合には、 $\Delta alk1$  株は生育の遅延を示し、 $\Delta alk1\Delta alk2$  株から  $\Delta alk1-12$  株までの 11 種類の ALK 遺伝子破壊株は生育しなかったが、 $\Delta alk1-12$  ALK1 株は野生型株と同程度の生育を示した (Figure 1-1B, Table 1-2)。また、炭素鎖長 11 以上の *n*-アルカンではいずれの株も野生型株と同様の生育を示した。これらの結果から、*n*-デカンは *Y. lipolytica* に対し毒性があること、Alk1p は *n*-デカンの解毒に関与することが示唆された。

*C. maltosa* では一部の P450ALK が *n*-アルカンの末端水酸化だけでなく、長鎖アルコールや長鎖アルデヒドの酸化に関与することが示唆されており[28]、*Y. lipolytica* においても Alk タンパク質群が長鎖アルコールや長鎖アルデヒドの代謝に関わる可能性が予想された。高井は  $\Delta alk1-12$  株が炭素鎖長 12 のアルコールである 1-ドデカノールや炭素鎖長 12 のアルデヒドであるドデカノールを単一の炭素源として生育できることを示した[69]。本研究では、これらの結果を再確認するとともに、さらに同じ鎖長の脂肪酸であるドデカン酸の資化能を調べた。その結果、 $\Delta alk1-12$  株はドデカン酸を単一の炭素源とした培地で生育を示した (Figure 1-2)。

これらの結果から、 $\Delta alk1-12$  株は *n*-アルカンから長鎖アルコールへの変換に欠損があること、Alk タンパク質群は *Y. lipolytica* 内では培地に添加した長鎖アルコール、長鎖アルデヒドの酸化に関わらないか必須ではないことが示唆された。

#### 1-3-1-2 *Y. lipolytica* 細胞を用いた CO 還元差スペクトル測定

*Y. lipolytica* において、*n*-アルカン存在下で培養した野生型株が懸濁された溶液を還元状態にした後、一酸化炭素を通気する前後の吸収スペクトルの差 (CO 還元差スペクトル) を測定すると、P450 由来と考えられる 450 nm に極大を持つ特徴的な吸収が見られる[68]。野生型株、 $\Delta alk1-12$  株、 $\Delta alk1-12$  ALK1 株について SD 液体培地で対数増殖期まで培養した後、*n*-ドデカンを培地に添加して 12 時間培養した菌体を用いて CO 還元差スペクトルを測定した (Figure 1-3)。野生型株では以前の報告と同様に CO 還元差スペクトルで 450 nm に極大を持つ吸収が見られたのに対して、 $\Delta alk1-12$  株は 450 nm に極大を持つ吸収は見られなかった。この結果から、 $\Delta alk1-12$  株では *n*-アルカン誘導性の P450 を持たないことが示唆された (Figure 1-3)。一方、 $\Delta alk1-12$  ALK1 株では同様の条件で測定した結果、450 nm に極大を持つ吸収が見られ (Figure 1-3)、Alk1p が実際に生産されていることが確認された。

#### 1-3-1-3 *n*-ドデカン代謝産物の測定

これまでに高井による LC-MS を用いた解析により、 $\Delta alk1-12$  株は *n*-デカンをデカン酸にする代謝経路に欠損があることが示されたが、LC-MS を用いた脂肪酸の解析では感度が非常に低いことが問題であった [69]。そこで、高感度な検出が可能である GC-MS

を用いて、*n*-ドデカンを与えた場合の  $\Delta alk1-12$  株の代謝産物の分析を試みた。*n*-ドデカンは細胞内に取り込まれドデカン酸に変換された後、その一部は脂質に取り込まれる可能性が考えられた。そこで、菌体を強アルカリで処理することで、菌体を溶解するとともに脂質に取り込まれた脂肪酸も遊離させた後、細胞内の全脂肪酸を抽出し解析を行うことにした。野生型株を YNB 液体培地にシフトし、*n*-ドデカンを添加してから 1、6、10 時間後の菌体内のドデカン酸を解析したところ、6 時間後に最も高いドデカン酸由来のピークが検出された。一方、グルコースを炭素源とした培地で培養した際にはドデカン酸由来のピークは検出されなかった (Figure 1-4A)。この結果から、*n*-ドデカン添加後 6 時間培養し脂肪酸分析を行うことにした。 $\Delta alk1-12$  株は *n*-ドデカンでは生育できないため、*n*-ドデカンを単一の炭素源として 6 時間培養を行うと細胞が死滅する可能性が考えられたこと、*ALK1*、*ALK2*、*ALK3*、*ALK4*、*ALK5*、*ALK6* の発現はグリセロール共存下では強く抑制されるのに対して、グルコース共存下ではほとんど抑制されないことから[52]、SD 液体培地に *n*-ドデカンを添加して培養することにした。その結果、この条件では、野生型株および  $\Delta alk1-12$  *ALK1* 株の抽出液ではドデカン酸が検出されたが、 $\Delta alk1-12$  株では検出されなかった (Figure 1-4B)。*n*-ドデカンの水酸化産物である 1-ドデカノールについても定量したところ、野生型株では非常に量は少ないものの検出された一方、 $\Delta alk1-12$  株では 1-ドデカノール由来のピークはほとんど検出されず、得られた定量値もノイズレベルであった (Figure 1-4D)。また、グルコースを加えず *n*-ドデカンのみで培養した場合についても *n*-ドデカン添加後の培養時間を 3 時間として確認したが、SD 液体培地に *n*-ドデカンを与えた場合と同様に、野生型株および  $\Delta alk1-12$  *ALK1* 株ではドデカン酸由来のピークが検出されたのに対して、 $\Delta alk1-12$  株ではドデカン酸由来のピークが検出されなかった (Figure 1-4C)。これらの結果から、 $\Delta alk1-12$  株は *n*-ドデカンの 1-ドデカノールへの変換に欠損を持つことが示された。

### 1-3-2 *ALK* 遺伝子群の機能解析

#### 1-3-2-1 *ALK9* mRNA 配列の確定

ここまでの結果から、 $\Delta alk1-12$  株は 12 種の *ALK* 遺伝子が破壊されたことにより、*n*-アルカン誘導性の P450 を持たないこと、また、*n*-アルカン資化能を失ったことが示された。そこで、 $\Delta alk1-12$  株において各 Alk タンパク質を単独で生産させることにより、それらの機能や基質特異性などを解析できると考えられた。まず各 *ALK* 遺伝子の発現系の構築を行った。ゲノムデータベース Génolevures (<http://www.genolevures.org>)で予想された *ALK* 遺伝子群の ORF 領域を用いて Kyte-Doolittle hydrophathy plot を作製した (Figure 1-5A)。真核生物の膜結合型 P450 は N 末端に膜貫通領域を持つことが知られているが、Alk9p は推定膜貫通領域のさらに N 末端側に約 40 アミノ酸の付加配列があり、これは他の Alk タンパク質には見られなかったことから、ゲノムデータベースで推定された *ALK9* の ORF が正しくない可能性が考えられた。そこで、*n*-ドデカンを炭素源として

1時間誘導した野生型株から抽出したRNAを用いたRACE解析を行い、*ALK9*のmRNAの配列を決定した。その結果、*ALK9*はゲノムデータベースで予想された開始コドンより99 bp下流にあるATGが開始コドンであると推定された (Figure 1-5B)。RACE解析の結果から推定されるAlk9pのアミノ酸配列を用いてKyte-Doolittle hydropathy plotを作製したところ、Alk9pは他のAlkタンパク質群と同様にN末端に膜貫通領域を持つと予想された。以降の解析では、*ALK9*のORFとしてはRACE解析で決定されたORFを用いた。

#### 1-3-2-2 *n*-アルカン誘導性プロモーター、構成的プロモーターを持つベクターの構築

Sumitaは*ALK1*上流にあるARR1配列をタンデムに4つもつ4xARR1プロモーターを構築した[70]。この4xARR1プロモーターは、*n*-アルカンで発現が誘導できること、*n*-アルカンで誘導した場合の発現量は*ALK*遺伝子の中で発現量をもっとも大きい*ALK1*プロモーターの約4倍あること、さらにグリセロールにより発現を抑制できることなどを特徴として持つ。そこで、この4xARR1プロモーターをpSUT5にクローニングすることにより、*n*-アルカンに依存して発現を誘導できる発現ベクターpS4ARRを作製した。また、*Y. lipolytica*の転写伸長因子をコードする遺伝子*TEF1*の上流420 bpをpSUT5にクローニングし、構成的発現ベクターpSUTEF1を構築した。これらのプロモーターの下流に*lacZ*配列をつないだプラスミドを野生型株に導入し、グルコース、*n*-ドデカン、ドデカン酸、グルコースと*n*-ドデカン、グルコースとドデカン酸、グルコースと*n*-ドデカンとドデカン酸を炭素源として3時間培養した菌体から粗酵素液を調製し、β-ガラクトシダーゼ活性を測定した (Figure 1-6A)。4xARR1プロモーターでは、*n*-ドデカン単独またはグルコースと*n*-ドデカンを含む培地で培養すると、β-ガラクトシダーゼ活性が大きく上昇したのに対し、グルコースのみの場合やドデカン酸が培地に含まれる場合にはβ-ガラクトシダーゼ活性の上昇はほとんど見られなかった。一方で、*TEF1*プロモーターでは、いずれの誘導条件でも同程度のβ-ガラクトシダーゼ活性が見られ、その活性は4xARR1プロモーターを用いて*n*-アルカンで誘導した場合の半分程度であった。以上の結果から、4xARR1プロモーター活性は*n*-アルカンにより大きく増加し、ドデカン酸により大きく抑制されること、*TEF1*プロモーターは構成的に高発現することが確認された。

4xARR1プロモーターの下流に各*ALK*遺伝子のORFをつないだプラスミドを作製し、 $\Delta alk1-12$ 株に導入した。それぞれの株において、SD液体培地で対数増殖期まで培養した後、*n*-ドデカンを添加して12時間培養した後のCO還元差スペクトルを測定したところ、*ALK8*、*ALK10*、*ALK11*を導入した場合は450 nmの吸収が小さく、*ALK5*、*ALK6*を導入した場合は450 nmの吸収が顕著に大きい、などの違いが見られたが、450 nmの吸収が観察された。この結果から、それぞれの*ALK*遺伝子が*n*-アルカン存在下で発現することが示された (Figure 1-6B)。また、*TEF1*プロモーターの下流に各*ALK*遺伝子の

ORF をつないだプラスミドも作製し、 $\Delta alk1-12$  株に導入した。pSUTEF1-ALK1 を導入した  $\Delta alk1-12$  株を SD 液体培地中で、 $OD_{600} = 2$ 、 $OD_{600} = 5$ 、 $OD_{600} = 10$  まで培養し CO 還元差スペクトルを測定したところ、 $OD_{600} = 2$  の場合に P450 由来の最も大きなピークが見られたため (Figure 1-6C)、他の ALK 遺伝子を *TEF1* プロモーター下で導入した株についても、SD 液体培地で  $OD_{600} = 2$  程度まで培養し CO 還元差スペクトルを測定した (Figure 1-6D)。その結果、*ALK2*、*ALK8*、*ALK11* を導入した場合は 450 nm の吸収が小さく、*ALK6* を導入した場合は 450 nm の吸収が顕著に大きくなり、ALK 遺伝子によってピークの大きさは異なったが、それぞれの ALK 遺伝子が *TEF1* プロモーター下で発現することが示された。

### 1-3-2-3 各 ALK 発現株の *n*-アルカンでの生育

各 ALK 遺伝子を 4xARR1 プロモーター下で発現する株の *n*-デカンから *n*-オクタデカンまでの *n*-アルカンを単一の炭素源とした場合の生育を調べた (Figure 1-7, Table 1-3)。 $\Delta alk1-12$  pS4RALK1 株はいずれの *n*-アルカンを含む培地においても野生型株と同様の生育を示した。 $\Delta alk1-12$  pS4RALK2 株は *n*-デカンから *n*-テトラデカンまではほとんど生育しなかったが、*n*-ペンタデカンではわずかに生育が認められ、*n*-ヘキサデカンから *n*-オクタデカンまでは野生型株とほぼ同様の生育を示した。 $\Delta alk1-12$  pS4RALK3 株はいずれの *n*-アルカンにおいても生育したが野生型株よりもわずかに生育の程度が悪かった。 $\Delta alk1-12$  pS4RALK6 株は *n*-デカンから *n*-トリデカンまででは野生型株と比較して生育の遅延が認められたが、*n*-テトラデカンから *n*-オクタデカンまでは野生型株と同様の生育であった。 $\Delta alk1-12$  pS4RALK9 株は *n*-ペンタデカンから *n*-オクタデカンで僅かな生育が観察された。 $\Delta alk1-12$  pS4RALK10 株は *n*-デカンから *n*-ペンタデカンまでにおいて野生型株よりも若干の生育の遅れが認められ、*n*-ヘキサデカンから *n*-オクタデカンでは著しい生育の遅延が認められた。 $\Delta alk1-12$  pS4RALK4 株、 $\Delta alk1-12$  pS4RALK5 株、 $\Delta alk1-12$  pS4RALK7 株、 $\Delta alk1-12$  pS4RALK8 株、 $\Delta alk1-12$  pS4RALK11 株、 $\Delta alk1-12$  pS4RALK12 株についてはいずれの *n*-アルカンにおいても生育しなかった。

### 1-3-2-4 各 Alk タンパク質群の脂肪酸への活性

*C. maltosa* の P450ALK である CYP52A3 は脂肪酸の  $\omega$  末端水酸化を行うことが示唆されている[28]。また、Hanley らは植物 *N. benthamiana* で *Y. lipolytica* の *ALK1* ~ *ALK8* を異種発現させることにより、Alk3p、Alk5p、Alk7p がドデカン酸の  $\omega$  末端を水酸化することを示した[53]。本節では Alk タンパク質が *Y. lipolytica* 内でドデカン酸の  $\omega$  末端水酸化活性を持つかを調べた。

まず、*Y. lipolytica* の細胞内においても Alk3p、Alk5p、Alk7p がドデカン酸の  $\omega$  末端を水酸化できるかどうかを確認するため、*TEF1* プロモーターの下流で Alk3p、Alk5p、Alk7p のいずれかを発現させた株を 0.5%(w/v) ドデカン酸を含む SD 液体培地に  $OD_{600} =$

0.1 で植菌し、1~5 日後の培養液から脂肪酸を抽出し、GC-MS で分析した (Figure 1-8A)。その結果、いずれの場合においても培養液から、ドデカン二酸や 12-ヒドロキシドデカン酸が検出され、その濃度は 3 日目から 4 日目にかけて最大になっていた。この結果から、*N. benthamiana* での報告例と同様に、Alk3p、Alk5p、Alk7p が *Y. lipolytica* でドデカン酸の  $\omega$  末端水酸化を行うことが示唆された。

次に、同様の実験を各 Alk タンパク質を *TEF1* プロモーターの下流で発現する株に対しても行った (Figure 1-8B, C)。培養日数は Figure 1-8A の結果を踏まえ、3 日間とした。まず、 $\Delta alk1-12$  pSUT5 株 (vector 導入株) ではドデカン二酸が検出されなかったのに対して (Figure 1-8B)、 $\Delta alk1-12$  pSUTEF1-ALK3 株、 $\Delta alk1-12$  pSUTEF1-ALK4 株、 $\Delta alk1-12$  pSUTEF1-ALK5 株、 $\Delta alk1-12$  pSUTEF1-ALK6 株、 $\Delta alk1-12$  pSUTEF1-ALK7 株では培養液からドデカン二酸と 12-ヒドロキシドデカン酸が検出され、基質として与えたドデカン酸が細胞内でこれらの Alk タンパク質により水酸化されたものと考えられた。Alk4p、Alk6p に関しては、ドデカン酸への  $\omega$  末端水酸化活性は *N. benthamiana* での異種発現系では確認されていなかったが、*Y. lipolytica* 内では Alk4p と Alk6p がドデカン酸の  $\omega$  末端水酸化活性を持つことが示唆された。Alk1p、Alk2p、Alk8p、Alk9p、Alk11p をそれぞれ単独で発現する株については、ドデカン二酸または 12-ヒドロキシドデカン酸が培養液からわずかに検出され、これらのタンパク質が非常に弱いドデカン酸の  $\omega$  末端水酸化活性を持つことが示唆された。さらに、 $\Delta alk1-12$  pSUTEF1-ALK3 株、 $\Delta alk1-12$  pSUTEF1-ALK5 株、 $\Delta alk1-12$  pSUTEF1-ALK7 株では、培養液から 11-ヒドロキシドデカン酸も検出され、Alk3p、Alk5p、Alk7p がドデカン酸の  $\omega$  末端だけではなく、 $\omega-1$  末端も水酸化することが示唆された。

### 1-3-3 Alk タンパク質の基質認識機構

12 種の Alk タンパク質のうち、Alk11p を除く 11 種が CYP52F サブファミリーに属し [35]、互いに一次配列が類似しているにも関わらず、これまでの解析から示唆されたように、*n*-アルカンのみに活性があるものや脂肪酸のみに活性があるものなど、基質特性に違いがあることが明らかになった。そこで、Alk タンパク質の基質認識に関与する領域を同定することを試みた。

#### 1-3-3-1 Alk タンパク質群のホモロジーモデリング

*Bacillus megaterium* が持つ P450 の 1 つである P450<sub>BM-3</sub> はパルミチン酸の  $\omega-1$  末端から  $\omega-3$  末端までのいずれか、もしくは全てを水酸化する酵素である [71]。P450<sub>BM-3</sub> を鋳型として、各 Alk タンパク質群の構造を推定した。その結果、脂肪酸を認識する Alk タンパク質群の N 末端ドメインに、カルボキシル基を認識する可能性のある塩基性残基が見出された。

### 1-3-3-2 Alk1p と Alk5p のキメラタンパク質の機能解析

*n*-アルカンに対して活性を示すのに対して脂肪酸に対してはほとんど活性を示さない Alk1p と、逆に脂肪酸に対しては活性を示すが *n*-アルカンに対しては活性を示さない Alk5p を選択し、これらの N 末端領域を置換したキメラタンパク質を生産するプラスミドを作製し、 $\Delta alk1-12$  株に導入した (Figure 1-9A)。これらの株を用いて CO 還元差スペクトルを測定したが、キメラタンパク質を発現させた株では 450 nm のピークが非常に小さかった (Figure 1-9B)。キメラタンパク質を発現する株は、*n*-ドデカン、*n*-ヘキサデカンのいずれの *n*-アルカンも単一の炭素源としても生育を示さず、ドデカン酸の  $\omega$  末端水酸化活性も示さなかった (Figure 1-9C, D)。これらのことから、作製した Alk1p と Alk5p のキメラタンパク質では機能的な P450 にならない可能性が考えられた。

### 1-3-3-3 Alk1p と Alk5p のアミノ酸置換体の機能解析

次に、Alk5p においてカルボキシル基を認識する可能性のある残基を Alk1p の該当する残基へと置換したタンパク質と、また逆に Alk1p の該当する残基を Alk5p の残基へと置換したタンパク質を発現する株を作製し、その解析を行うことにした。

Alk タンパク質のアミノ酸配列のアライメントにおいて、基質認識に関わると考えられる N 末端領域に着目し、脂肪酸に対する活性が強い Alk3p、Alk5p、Alk7p では塩基性アミノ酸であるが、Alk1p や Alk2p において該当する残基は塩基性アミノ酸ではない残基を抽出した (Figure 1-10A)。Alk1p においてそれらの残基を Alk5p の塩基性残基に置換した変異体 Alk1<sup>S53K</sup>p、Alk1<sup>I56R</sup>p、Alk1<sup>S53K/I56R</sup>p、と Alk5p においてそれらの塩基性残基を Alk1p の残基に置換した変異体 Alk5<sup>K50S</sup>p、Alk5<sup>R531</sup>p、Alk5<sup>K50S/R531</sup>p を発現させるプラスミドを作製し、 $\Delta alk1-12$  株に導入した。これらの株を用いた CO 還元差スペクトル測定の結果、Alk1<sup>S53K</sup>p、Alk1<sup>I56R</sup>p、Alk1<sup>S53K/I56R</sup>p、Alk5<sup>R531</sup>p を発現する株では 450 nm のピークが見られ、これらのタンパク質が細胞内で正常なフォールディングをとることが示唆された (Figure 1-10B)。*n*-アルカンも単一の炭素源とした場合の生育を調べたところ、Alk5p のアミノ酸置換体は Alk5p と同様に *n*-アルカンでの生育を支持することが出来なかった。一方、Alk1p については、Alk1<sup>S53K</sup>p が炭素鎖長 10-18 の *n*-アルカンでの生育を支持できるのに対して、Alk1<sup>I56R</sup>p が炭素鎖長 10-15、Alk1<sup>S53K/I56R</sup>p が炭素鎖長 10-17 の *n*-アルカンでの生育を支持しなかった (Figure 1-10C, Table 1-4)。脂肪酸の  $\omega$  末端水酸化活性に関しては、Alk5<sup>K50S</sup>p、Alk5<sup>R531</sup>p では活性が検出されたが、Alk1p の置換体では活性を示すタンパク質は見られなかった (Figure 1-10D)。

上記で標的とした残基の P450<sub>BM-3</sub> に相当すると考えられる残基はパルミチン酸のカルボキシル基からは離れていた。次に、P450<sub>BM-3</sub> において、カルボキシル基と相互作用している残基に該当する Alk1p と Alk5p の残基を相互に置換したタンパク質 Alk1<sup>Y83R</sup>p、Alk1<sup>C85Y</sup>p、Alk1<sup>T88H</sup>p、Alk5<sup>R77Y</sup>p、Alk5<sup>Y79C</sup>p および Alk5<sup>H82T</sup>p を  $\Delta alk1-12$  株で発現させた (Figure 1-11A)。これらのタンパク質を発現する株を用いた CO 還元差スペクトル測定

において、450 nmのピークが観察され、これらのタンパク質は細胞内で機能していることが示唆された (Figure 1-11B)。また、これらのタンパク質を発現する株の*n*-アルカン酸化能を調べたところ、Alk1<sup>C85Y</sup>pは短鎖の*n*-アルカンの酸化能に欠損があり、長鎖の*n*-アルカンの酸化能も低下していることが示唆された (Figure 1-11C, Table 1-4)。また、Alk1<sup>T88H</sup>pは短鎖の*n*-アルカンの酸化能に欠損があることが示唆された (Figure 1-11C, Table 1-4)。一方で、*n*-アルカン酸化能を獲得したAlk5pのアミノ酸置換体は見られなかった。また、Alk1pのアミノ酸置換体において、脂肪酸の $\omega$ 末端水酸化活性を獲得したものはなかった。Alk5<sup>R77Y</sup>p、Alk5<sup>Y79C</sup>pおよびAlk5<sup>H82T</sup>pの脂肪酸 $\omega$ 末端水酸化活性は野生型のAlk5pとほぼ同様であり、アミノ酸置換の効果は見られなかった (Figure 1-11D)。

## 1-4 考察

### 1-4-1 Alk タンパク質群の *n*-アルカン酸化に対する役割

$\Delta alk1-12$  株は *n*-アルカンを単一の炭素源として生育することができないこと (Figure 1-1, Table 1-1)、 $\Delta alk1-12$  株に *n*-ドデカンを与えても細胞抽出液中に 1-ドデカノールやドデカン酸が検出されないことから (Figure 1-4B-D)、*Y. lipolytica* において *ALK* 遺伝子群は *n*-アルカン代謝に必須であることが示された。さらに、 $\Delta alk1-12$  株が 1-ドデカノール、ドデカノール、ドデカン酸を単一の炭素源として生育できることから、Alk タンパク質は *n*-アルカンから長鎖アルコールへの変換には関わるが、それ以降の過程には関わらないか必須ではないことが示唆された (Figure 1-2)。

緒言に述べたとおり、これまで Iida らにより、 $\Delta alk1$  株が *n*-デカンで単一の炭素源とした培地で生育に欠損を示すのに対して、 $\Delta alk1\Delta alk2$  株は *n*-ヘキサデカンで炭素源とした場合にも著しい生育の遅れを示すことが明らかにされていた[52, 68]。本研究の結果により、 $\Delta alk1$  株は *n*-デカンだけでなく、*n*-ウンデカンから *n*-ペンタデカンを含む培地で著しい生育の遅延を示し、 $\Delta alk1\Delta alk2$  株は *n*-デカンから *n*-ヘキサデカンまでの全てで著しい生育の遅れを示すことが明らかとなった (Figure 1-1, Table 1-1)。これらの結果は、*Y. lipolytica* の *n*-アルカン代謝において、Alk1p が主要な役割を担っていること、Alk2p が長鎖 *n*-アルカン酸化に関与することを示唆するものである。Hirakawa らが行った各 *ALK* 遺伝子の定量的リアルタイム PCR による発現解析により、*n*-デカン、*n*-ヘキサデカンを炭素源とした場合に *ALK1* および *ALK2* の mRNA 量が他の *ALK* 遺伝子より多いことが示されており (Figure 1-0B) [62]、このことも Alk1p と Alk2p の *Y. lipolytica* での重要性を支持している。

$\Delta alk1\Delta alk2$  株、 $\Delta alk1\Delta alk2\Delta alk4$  株は *n*-ペンタデカン、*n*-ヘキサデカンを炭素源とした場合、長期間の培養で僅かに生育が確認されたが、 $\Delta alk1\Delta alk2\Delta alk4\Delta alk6$  株では生育は全く確認されず (Figure 1-1, Table 1-1)、*Y. lipolytica* において Alk6p が長鎖の *n*-アルカン酸化に関わる可能性が示唆された。

#### 1-4-2 Alk タンパク質群の基質特異性

$\Delta alk1-12$  株において各 *ALK* 遺伝子を個々に発現させた株の生育の解析結果 (Figure 1-7, Table 1-3)やドデカン酸を与えた際の培養液脂肪酸解析 (Figure 1-8)から、各 Alk タンパク質群の *n*-アルカンや脂肪酸に対する基質特異性についての知見が得られた (Figure 1-12)。

Alk1p は *n*-デカンから *n*-オクタデカンまでの幅広い *n*-アルカンを基質とすること、Alk2p は *n*-ペンタデカンから *n*-オクタデカンの長鎖の *n*-アルカンを基質とすることが示された。この結果は、 $\Delta alk1$  株および  $\Delta alk1\Delta alk2$  株の生育解析の結果と一致する。Alk3p は Alk1p と同様に幅広い鎖長の *n*-アルカンを基質とすることができるが、Alk1p よりも *n*-アルカンに対して活性が低いことが示唆された。Alk6p は *n*-デカンから *n*-オクタデカン を基質とするが、特に長鎖の *n*-テトラデカンから *n*-オクタデカンをより利用しやすいことが示唆された。Alk9p は *n*-ヘキサデカンから *n*-オクタデカンまでの長鎖の *n*-アルカン を基質とし得ること、Alk10p は *n*-デカンから *n*-ペンタデカンまでのより短鎖の *n*-アルカン を基質にすることが示唆された。その他の Alk4p、Alk5p、Alk7p、Alk8p、Alk11p、Alk12p は  $\Delta alk1-12$  株で個々に発現させても *n*-アルカン を単一の炭素源として生育できないため、*n*-アルカン を基質としないか、基質にしても *Y. lipolytica* の生育を支持する程の活性はないことが示された。

*ALK3*、*ALK4*、*ALK5*、*ALK6*、*ALK7* を個々に発現する株では、ドデカン酸を含む SD 液体培地で培養すると培養液からドデカン二酸が検出された。ドデカン二酸はベクターである pSUT5 を導入した  $\Delta alk1-12$  株では見られないため、これら Alk タンパク質によりドデカン酸の  $\omega$  末端が水酸化され、12-ヒドロキシドデカン酸が生成し、細胞内でさらに代謝されてドデカン二酸になったものと考えられる。*N. benthamiana* で異種発現させて得られた結果では Alk4p、Alk6p のドデカン酸  $\omega$  末端水酸化活性は検出されなかったが[53]、本研究の結果で見られたように Alk4p と Alk6p の活性が極めて低いか、Alk4p と Alk6p が *N. benthamiana* 内では正常に機能しなかった可能性が考えられる。また、*ALK1*、*ALK2*、*ALK8*、*ALK9*、*ALK11* を個々に発現する株においても、ドデカン二酸や 12-ヒドロキシドデカン酸が僅かに検出されたため、Alk1p、Alk2p、Alk8p、Alk9p、Alk11p もドデカン酸の  $\omega$  末端水酸化活性があると予想されるが、その活性は非常に弱いものであることが示唆された。

Alk3p、Alk5p、Alk7p を発現させた場合、ドデカン酸を与えるとドデカン二酸や 12-ヒドロキシドデカン酸の他に 11-ヒドロキシドデカン酸が見られた。*C. albicans* の CYP52A21 はドデカン酸の  $\omega$  位を主に水酸化するが、 $\omega-1$  位も水酸化されることが知られており[8]、*Y. lipolytica* の Alk3p、Alk5p、Alk7p が同様に  $\omega-1$  位の水酸化していることが示された。

本章の実験では、*n*-アルカンを含む培地での生育やジカルボン酸の生産により Alk タ

ンパク質の活性を評価したが、より正確に活性を評価するためには、長鎖アルコールや長鎖アルデヒドの酸化等 *n*-アルカン酸化以降の各過程に関わる酵素群を明らかにし、*ALK* 遺伝子群に加えてそれらをコードする遺伝子を破壊した株を作製した上で、各 *ALK* 遺伝子を発現させ、解析する必要がある。また、機能不明の Alk タンパク質の基質を明らかにするためには、各 Alk タンパク質を単独で発現している株から細胞内膜画分を調製し、*in vitro* で活性を解析する系を構築する必要があると考えられる。

### 1-4-3 *Y. lipolytica* における 12 種の *ALK* 遺伝子群の生理的意義

#### 1-4-3-1 *ALK1*、*ALK2*、*ALK6*

$\Delta alk1$  株、 $\Delta alk1\Delta alk2$  株の生育解析から、*n*-アルカン資化に大きく関与するのは *ALK1*、*ALK2* であることが示唆された (Figure 1-1, Table 1-1)。また、 $\Delta alk1\Delta alk2\Delta alk4$  株、 $\Delta alk1\Delta alk2\Delta alk4\Delta alk6$  株の解析から、*ALK6* も *n*-アルカン資化に関与することが示唆されたが、実際に *ALK6* を 4xARR1 プロモーター、*TEF1* プロモーター下で発現させた株は *n*-テトラデカンから *n*-オクタデカンまでの *n*-アルカンを単一の炭素源として生育し、Alk6p が *n*-アルカン資化に関与することが示された (Figure 1-7, Table 1-3)。*n*-ヘキサデカンによる誘導時の *ALK6* の mRNA 量は *ALK1* の 10 分の 1 程度であるが (Figure 1-0B) [62]、この mRNA 量では、*Y. lipolytica* の長鎖 *n*-アルカン炭素源とした場合の生育を十分に支持することができない可能性が考えられる。

#### 1-4-3-2 *ALK3*、*ALK9*、*ALK10*

*ALK3*、*ALK9*、*ALK10* は単独で高発現させると、鎖長に対する活性の違いはあるが、*n*-アルカン炭素源資化することが可能であった (Figure 1-7, Table 1-3)。一方で、これらの遺伝子は通常発現量では *Y. lipolytica* の *n*-アルカン炭素源とした培地での生育を支持できなかった (Figure 1-1, Table 1-1)。*n*-ヘキサデカンにより誘導させた場合の *ALK3* の mRNA 量は *ALK1* の 25 分の 1 程度、*ALK9* の mRNA 量は *ALK1* の 10 分の 1 程度、*ALK10* の mRNA 量は *ALK1* の 2000 分の 1 程度であった (Figure 1-0B) [62]。*ALK9* の mRNA 量は比較的多いが、 $\Delta alk1-12$  pS4RALK9 株の *n*-アルカンにおける生育が悪いことから、*n*-アルカンに対する Alk9p の活性が低いことが示唆され、この発現量では *Y. lipolytica* の生育を支持できないものと考えられる。一方で、*ALK10* は *n*-ヘキサデカンにより誘導させた場合の mRNA 量から機能的な P450 をコードしていない可能性も予想されたが、4xARR1 プロモーター、*TEF1* プロモーター下で発現させると、野生型株と同程度の生育を示した。*Y. lipolytica* のゲノムにコードされる Alk タンパク質の系統解析から、Alk9p は Alk1p と、Alk10p は Alk2p とそれぞれ近縁であると考えられる (Figure 1-12)。*ALK9*、*ALK10* はそれぞれ *ALK1*、*ALK2* から遺伝子重複によって生じた後、*n*-アルカン炭素源の認識や活性、*n*-アルカン炭素源による誘導に関わるプロモーター領域などに変異が生じた可能性も考えられる。

#### 1-4-3-3 ALK3、ALK5、ALK7

Alk3p、Alk5p、Alk7p はドデカン酸の  $\omega$  末端を水酸化することが示唆された (Figure 1-8)。本研究では、ドデカン酸を与えた場合に培地に排出されるドデカン二酸をドデカン酸の  $\omega$  末端水酸化の指標としたが、同じ条件で野生型株について解析を行った場合にはドデカン酸の  $\omega$  末端水酸化を確認することができなかった (data not shown)。これらの遺伝子が *Y. lipolytica* 内でどのような機能を果たしているのか、*Y. lipolytica* において脂肪酸の  $\omega$  酸化にはどのような意義があるのかは不明である。*S. bombicola* をオレイン酸、パルミチン酸、植物油のいずれかとグルコースの共存下で培養すると、ソホロリピッドが生産されることが知られている[72-74]。ソホロリピッドは界面活性剤としての性質を持ち、*S. bombicola* ではアルカンの取り込みに関与していると考えられている[72]。ソホロリピッドの構成成分はソホロースとヒドロキシ脂肪酸であり、ヒドロキシ脂肪酸の生成に P450 である CYP52M1 が関与することが示唆されている[11]。*Y. lipolytica* がソホロリピッドを合成するかは不明であるが、*ALK3*、*ALK5*、*ALK7* の産物が脂肪酸の  $\omega$  位や  $\omega-1$  位を水酸化してヒドロキシ脂肪酸を作り、ソホロリピッドのようなヒドロキシ脂肪酸を持つ化合物の合成に関わっているのかもしれない。また、*Y. lipolytica* では Liposan と呼ばれる 27 kDa の生物乳化剤 (88%の炭水化物と 12%のタンパク質を含む混合物)の分泌が誘導されることが知られている[75, 76]。Liposan を構成する具体的な化合物は分かっていないが、*ALK3*、*ALK5*、*ALK7* の産物がこれらの物質を生産する役割を担っているかもしれない。今後、*Y. lipolytica* の細胞内や培養液のメタボローム解析を行うことにより、この様な二次代謝産物の存在を同定できる可能性がある。

#### 1-4-3-4 ALK4

Alk4p、Alk6p も僅かではあるが、ドデカン酸の  $\omega$  末端を水酸化することが示唆された (Figure 1-8)。*ALK6* は *n*-アルカン資化に僅かに関わることを示されたが、*ALK4* は *n*-アルカン資化には関与しないことが示された。また、Alk4p の脂肪酸への活性も低いことから、*Y. lipolytica* 内で何を基質にしているのかは不明である。

#### 1-4-3-5 Alk タンパク質の生理的役割

本研究では、*ALK8*、*ALK11*、*ALK12* の産物が基質にする物質を明らかにすることはできなかった。また、上述のように Alk3p、Alk6p、Alk9p、Alk10p は高発現した場合には *n*-アルカン、Alk3p、Alk4p、Alk5p、Alk6p、Alk7p はドデカン酸を基質にできることは示されたが、これらが細胞内で本来何を基質にするのかは不明である。Alk8p と Alk11p は細胞内で高発現させると、僅かにドデカン酸の  $\omega$  酸化活性が検出された (Figure 1-8)が、その程度は非常に小さく、これらは *n*-アルカンや脂肪酸と異なる物質を基質にする可能性も考えられる。本章の研究では、数少ない条件で実験を行ったが、様々

なストレスを与えた場合や、異なる温度、様々培地で同様の実験を行うことにより、Alk タンパク質の新たな生理機能が明らかになるかもしれない。

#### 1-4-4 *Y. lipolytica* における長鎖アルコール、長鎖アルデヒドの酸化酵素の存在

$\Delta alk1-12$  株は 1-ドデカノールやドデカナールを単一の炭素源として、野生型株と同程度に生育したことから、Alk タンパク質群は、培地中の長鎖アルコールや長鎖アルデヒドの酸化に必要ではないか、必須ではないことが示された (Figure 1-2)。このことから、*Y. lipolytica* 内にはこれらの反応を触媒する酵素が別に存在すると考えられる。本論文の 2 章、3 章でこれらの因子の探索を行う。

#### 1-4-5 Alk タンパク質群の基質認識機構

本章で得られた結果と Alk タンパク質群の系統解析から、基質特異性が類似している Alk タンパク質群は比較的近縁の関係にあることが示された (Figure 12)。しかしながら、*n*-アルカンの鎖長特異性に関しては、Alk1p が幅広い長さの *n*-アルカンに、Alk2p、Alk9p が長鎖の *n*-アルカンに、Alk10p が短鎖の *n*-アルカンに特性があるなど、関連性は見いだせなかった。

本章の後半では、Alk タンパク質群の基質認識機構を明らかにするために、*n*-アルカンに対し強い活性を示す Alk1p と脂肪酸に対し強い活性を示す Alk5p をモデルに、キメラタンパク質やアミノ酸置換体を用いて解析した。キメラタンパク質では *n*-アルカン酸化能、ドデカン酸酸化能のいずれも大きく失われていた。また、アミノ酸置換体に関しても、Alk1p にドデカン酸酸化能を、Alk5p に *n*-アルカン酸化能を付与することはできなかった。一方で、Alk1p のアミノ酸置換体において、*n*-アルカンに対する鎖長特異性が変化したものが複数得られた。この鎖長特異性の変化と構造の違いにおける関連性を見出すことはできなかった。これらの結果から、Alk タンパク質群は基質を認識するために複数のサイトを利用していると考えられる。実際に、CYP2 を用いた研究から、基質認識に関わる 6 個の領域 SRS1-6 (substrate recognition site 1-6) が特定されている [77]。しかし、この SRS を他の P450 に広く拡張することは難しく、P450 の基質認識機構の解明は今後の大きな課題である。

本章の研究においては、脂肪酸の  $\omega$  酸化を行うことができる P450<sub>BM-3</sub> とのホモロジーモデリングにより Alk タンパク質群の立体構造を推定したが、P450<sub>BM-3</sub> は可溶性タンパク質であり、精度良い構造推定が難しかったものと予想される。今後、Alk タンパク質の結晶構造解析が必要になるものと考えられる。

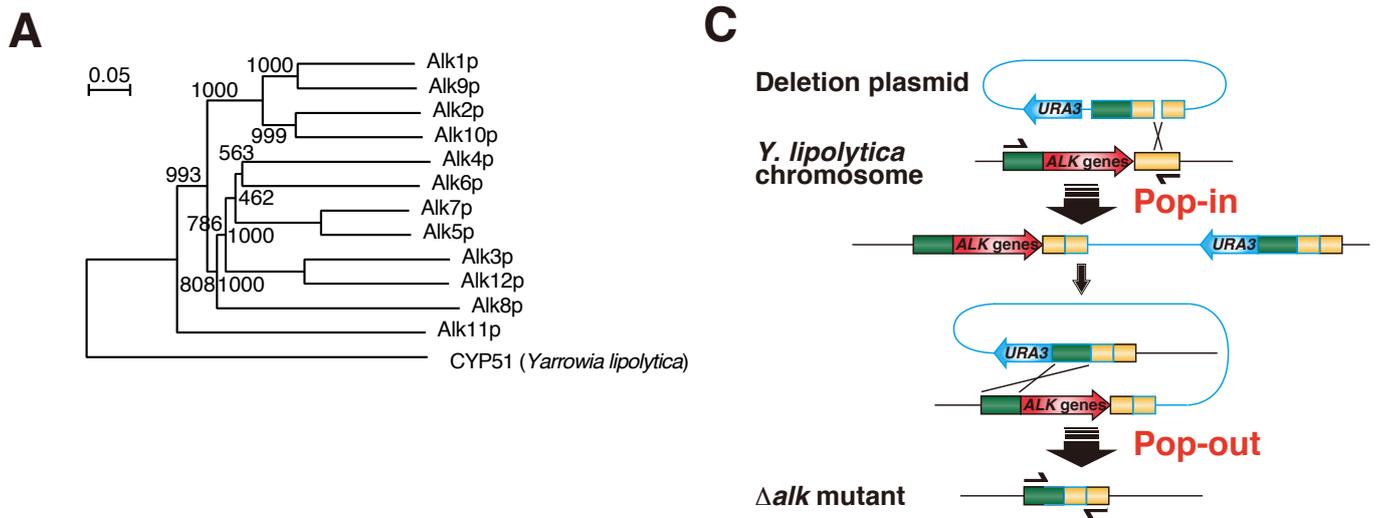
近年、膜結合性 P450 において、膜貫通領域を含む全長の結晶構造としては初めての例となる *S. cerevisiae* の CYP51 (Erg11p) の結晶構造が明らかとなった [78]。Erg11p では、貫通型膜ヘリックスの一部と触媒ドメインが相互作用すること、活性ドメインの一部が生体膜に接していること、基質のチャンネルが膜側に接していることなどが示唆された。

また、CYP2C9 や CYP46A1 といった膜結合型 P450 においても、膜貫通領域以外に膜表面と相互作用する領域の存在が示唆されている[79-81]。これらのことから、膜結合型の P450 において、生体膜との相互作用様式を明らかにすることは重要であると考えられる。このような観点からも、Alk タンパク質群の基質認識を明らかにするためには、Alk タンパク質群の結晶構造を明らかにする必要があると考えられる。

#### 1-4-6 *Y. lipolytica* における CYP52 ファミリーの P450 の進化

真菌類において、P450 遺伝子の数は 1 から 100 以上の多岐にわたる[54]。多様な環境の中で生存に必要な代謝を行うために、P450 遺伝子は真菌類の中で多重化、多様化してきたと考えられている[40, 82]。P450 遺伝子群の大きな特徴の 1 つに CYP “bloom” と呼ばれる現象があるが、これはある生物種で P450 の特定のサブファミリーが顕著に増加する現象である[83]。*Y. lipolytica* についても、全 17 種ある P450 遺伝子群のうち、*ALK11* を除く Alk タンパク質群をコードする 11 種が CYP52F ファミリーに属し、CYP bloom 様の現象が起きていると考えられる[35]。CYP52 ファミリーの P450 は *n*-アルカン酸化性酵母に広く存在しているが、*Y. lipolytica* の持つ CYP52F サブファミリーは単系統群を構成していると考えられる (Figure 13B)。*Y. lipolytica* は *C. maltosa*、*C. tropicalis*、*D. hansenii*、*S. stipitis* などの *n*-アルカン酸化性酵母とは系統的に離れた位置におり (Figure 13A)、CYP52F サブファミリーは *Y. lipolytica* がこれら *n*-アルカン酸化性酵母の共通祖先から分岐した後、多重化等を経たと予想される。独立に進化した P450 が *n*-アルカンや脂肪酸の酸化という他の *n*-アルカン酸化性酵母が持つ機能を有することは興味深い。疎水性化合物の効率的な酸化が必要な環境では、CYP52 ファミリーの機能が収斂進化したのかもしれない。

また、*Y. lipolytica* が多数の P450 遺伝子を持つ理由は明らかになっていない。*Y. lipolytica* の現在の P450 遺伝子多様性が一過性であり、今後、*Y. lipolytica* が進化を経る中で CYP52F サブファミリー遺伝子が減少する可能性もある。*Y. lipolytica* の近縁種の発見と解析により、CYP52F サブファミリーの進化が明らかになるかもしれない。

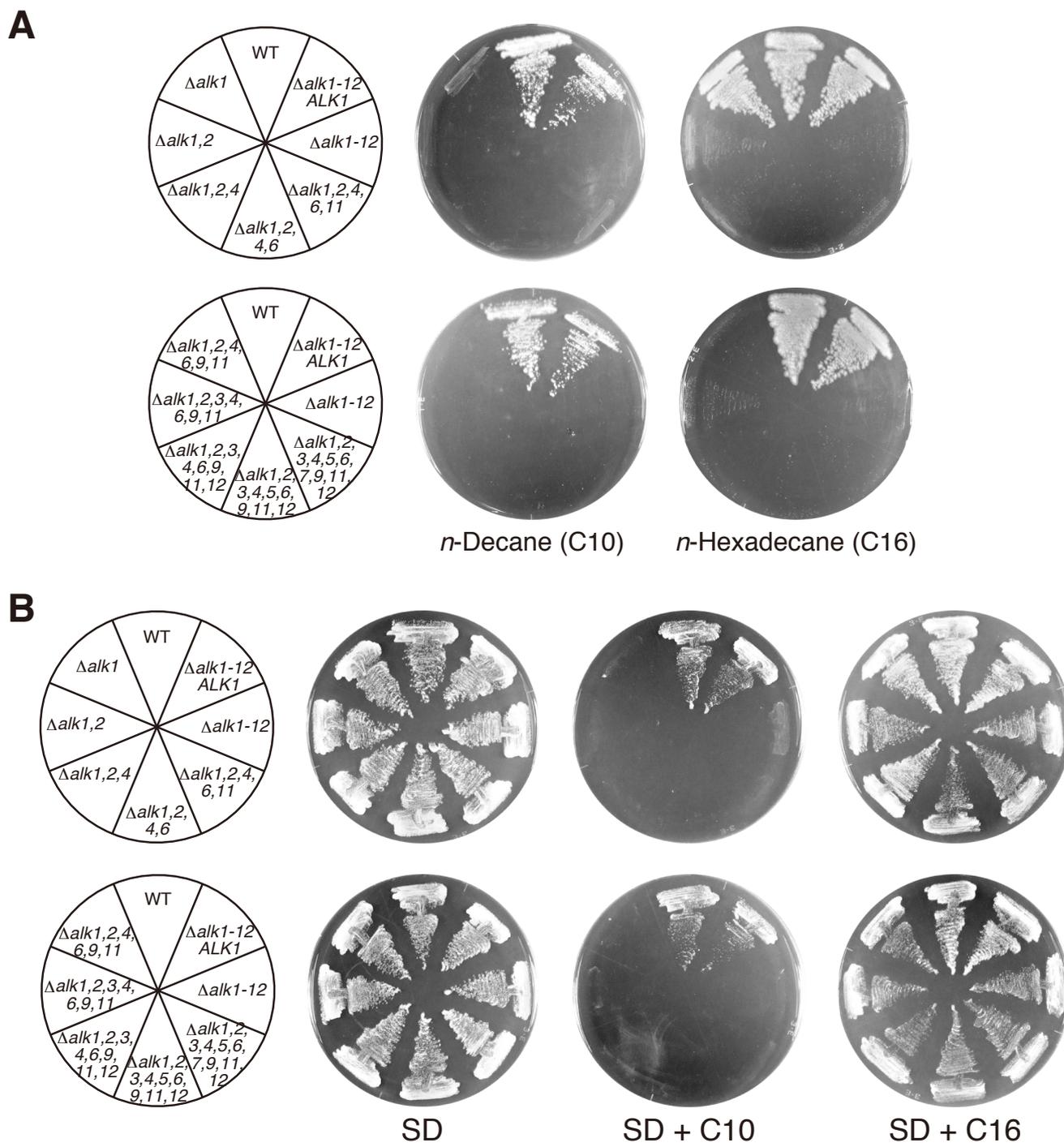


"Hirakawa, K., Kobayashi, S., Inoue, T., Endoh-Yamagami, S., Fukuda, R., and Ohta, A. (2009) Yas3p, an Opi1 family transcription factor, regulates cytochrome P450 expression in response to *n*-alkanes in *Yarrowia lipolytica*. *J Biol Chem* **284**, 7126-7137"から転載した図を掲載していたが、インターネット公表に対する著作権者からの許諾が得られていないため公表できない。

「高井寛 (2010)、東京大学大学院農学生命科学研究科修士論文」から転載した図を掲載していたが、インターネット公表に対する著作権者からの許諾が得られていないため公表できない。

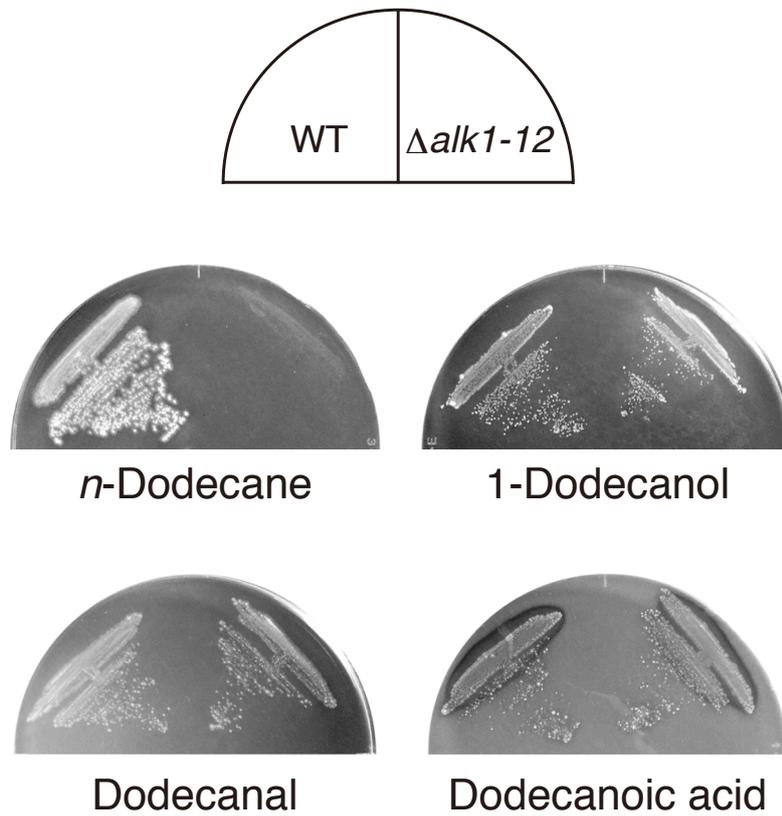
### Figure 1-0. *Y. lipolytica* における *ALK* 遺伝子群とその全破壊株の作製

(A) *Y. lipolytica* の 12 種の Alk タンパク質群のアミノ酸配列を ClustalW (DDBJ, v2.1) で解析し、Njplot で分子系統樹を描画した。*Y. lipolytica* の CYP51 を外群として利用した。スケールバーは 0.1 substitutions per site、ブートストラップ値は 1000 回の試行により得られた値を示す。使用した各配列の UniprotKB における Accession number を次に示す。Alk1p (O74127)、Alk2p (O74128)、Alk3p (O74129)、Alk4p (O74130)、Alk5p (O74131)、Alk6p (O74132)、Alk7p (O74133)、Alk8p (O74134)、Alk9p (A0A0K2S2A7)、Alk10p (Q6CDW4)、Alk11p (Q6CCE5)、Alk12p (Q6CGD9)、CYP51 (Q6CFP4)。(C) Pop-in/pop-out 法による遺伝子破壊。破壊する遺伝子上流と下流のそれぞれ 1.0 kb 程度を pBURA3 にクローニングする。上流または下流配列の内部のみでプラスミドを切断する酵素を用いてプラスミドを直鎖状にして、*Y. lipolytica* のゲノムに挿入する (Pop-in; 図では下流配列中で切断した場合を示す)。次に上流配列で相同組換えが起こることにより *URA3* とともに標的遺伝子がゲノムから除去され、遺伝子が破壊される (Pop-out)。



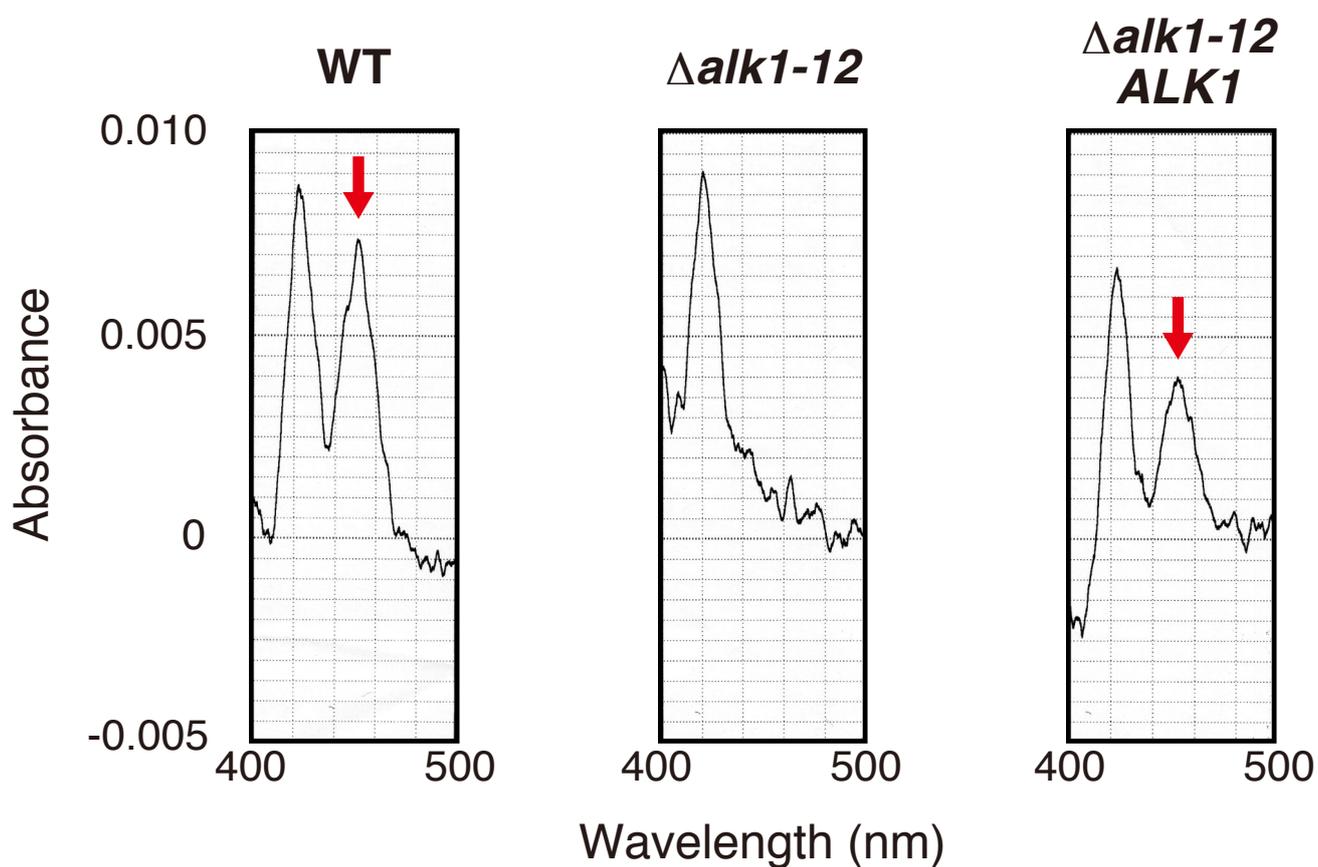
**Figure 1-1. 各 *ALK* 遺伝子破壊株の *n*-アルカンを含む炭素源とした場合の生育**

(A) CXAU1 株 (WT)、 $\Delta alk1$  株、 $\Delta alk1\Delta alk2$  ( $\Delta alk1,2$ ) 株、 $\Delta alk1\Delta alk2\Delta alk4$  ( $\Delta alk1,2,4$ ) 株、 $\Delta alk1\Delta alk2\Delta alk4\Delta alk6$  ( $\Delta alk1,2,4,6$ ) 株、 $\Delta alk1\Delta alk2\Delta alk4\Delta alk6\Delta alk11$  ( $\Delta alk1,2,4,6,11$ ) 株、 $\Delta alk1\Delta alk2\Delta alk4\Delta alk6\Delta alk9\Delta alk11$  ( $\Delta alk1,2,4,6,9,11$ ) 株、 $\Delta alk1\Delta alk2\Delta alk3\Delta alk4\Delta alk6\Delta alk9\Delta alk11$  ( $\Delta alk1,2,3,4,6,9,11$ ) 株、 $\Delta alk1\Delta alk2\Delta alk3\Delta alk4\Delta alk5\Delta alk6\Delta alk9$  ( $\Delta alk1,2,3,4,5,6,9,11$ ) 株、 $\Delta alk1\Delta alk2\Delta alk3\Delta alk4\Delta alk5\Delta alk6\Delta alk9\Delta alk11\Delta alk12$  ( $\Delta alk1,2,3,4,5,6,9,11,12$ ) 株、 $\Delta alk1\Delta alk2\Delta alk3\Delta alk4\Delta alk5\Delta alk6\Delta alk7\Delta alk9\Delta alk11\Delta alk12$  ( $\Delta alk1,2,3,4,5,6,7,9,11,12$ ) 株、 $\Delta alk1\Delta alk2\Delta alk3\Delta alk4\Delta alk5\Delta alk6\Delta alk7\Delta alk8\Delta alk9\Delta alk11\Delta alk12$  ( $\Delta alk1,2,3,4,5,6,7,8,9,11,12$ ) 株、 $\Delta alk1-12$  株、 $\Delta alk1-12 ALK1$  株を *n*-デカン (C10) または *n*-ヘキサデカン (C16) を単一の炭素源として 7 日間培養した。(B) (A) と同様の株を SD 培地、グルコース/*n*-デカン培地 (SD+C10)、またはグルコース/*n*-ヘキサデカン培地 (SD+C16) で 3 日間培養した。



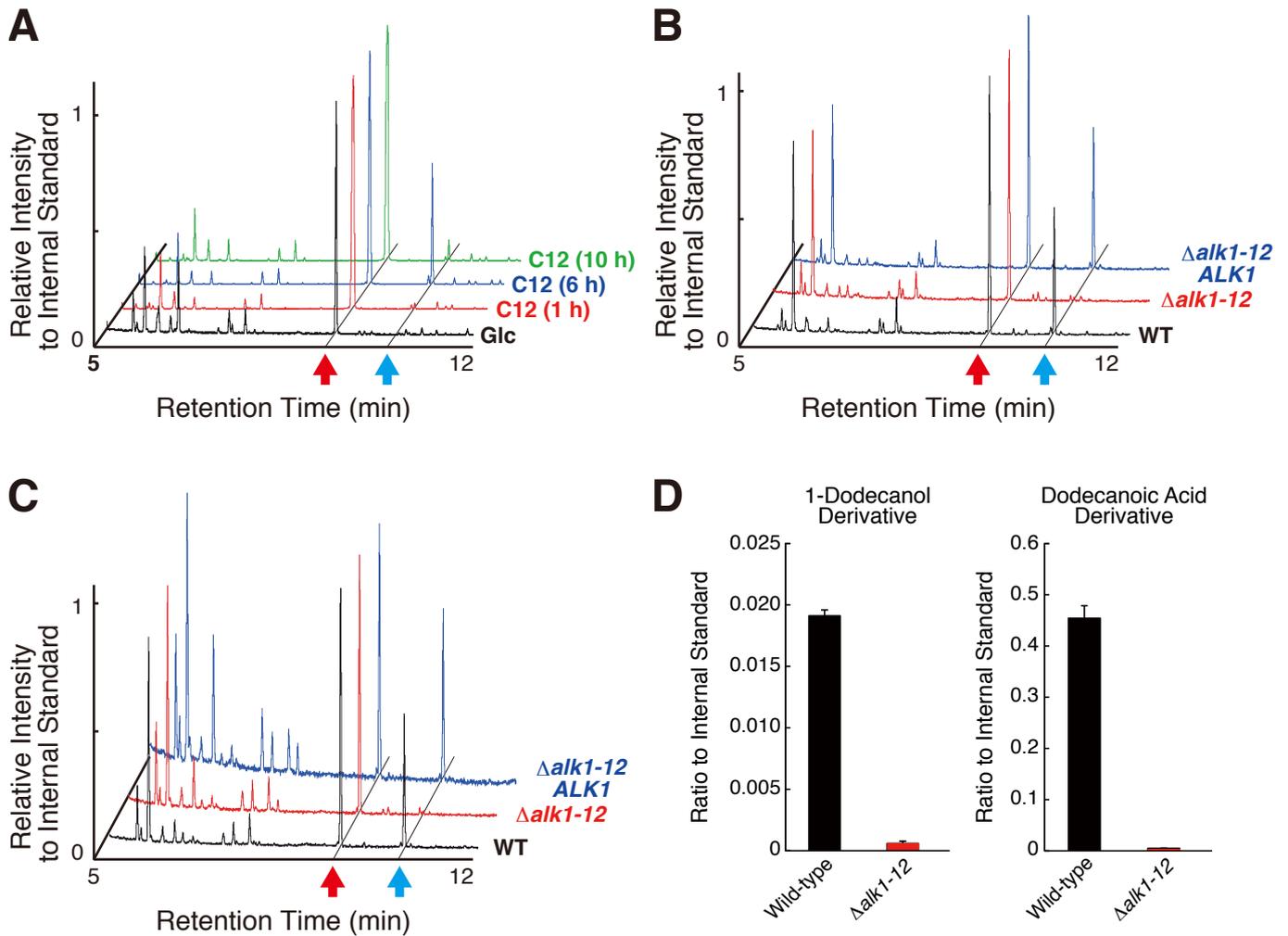
**Figure 1-2.  $\Delta alk1-12$  株の *n*-アルカン代謝産物での生育**

CXAU1 株 (WT)、 $\Delta alk1-12$  株を *n*-ドデカン、1-ドデカノール、ドデカナール、ドデカン酸のそれぞれを単一の炭素源として7日間培養した。



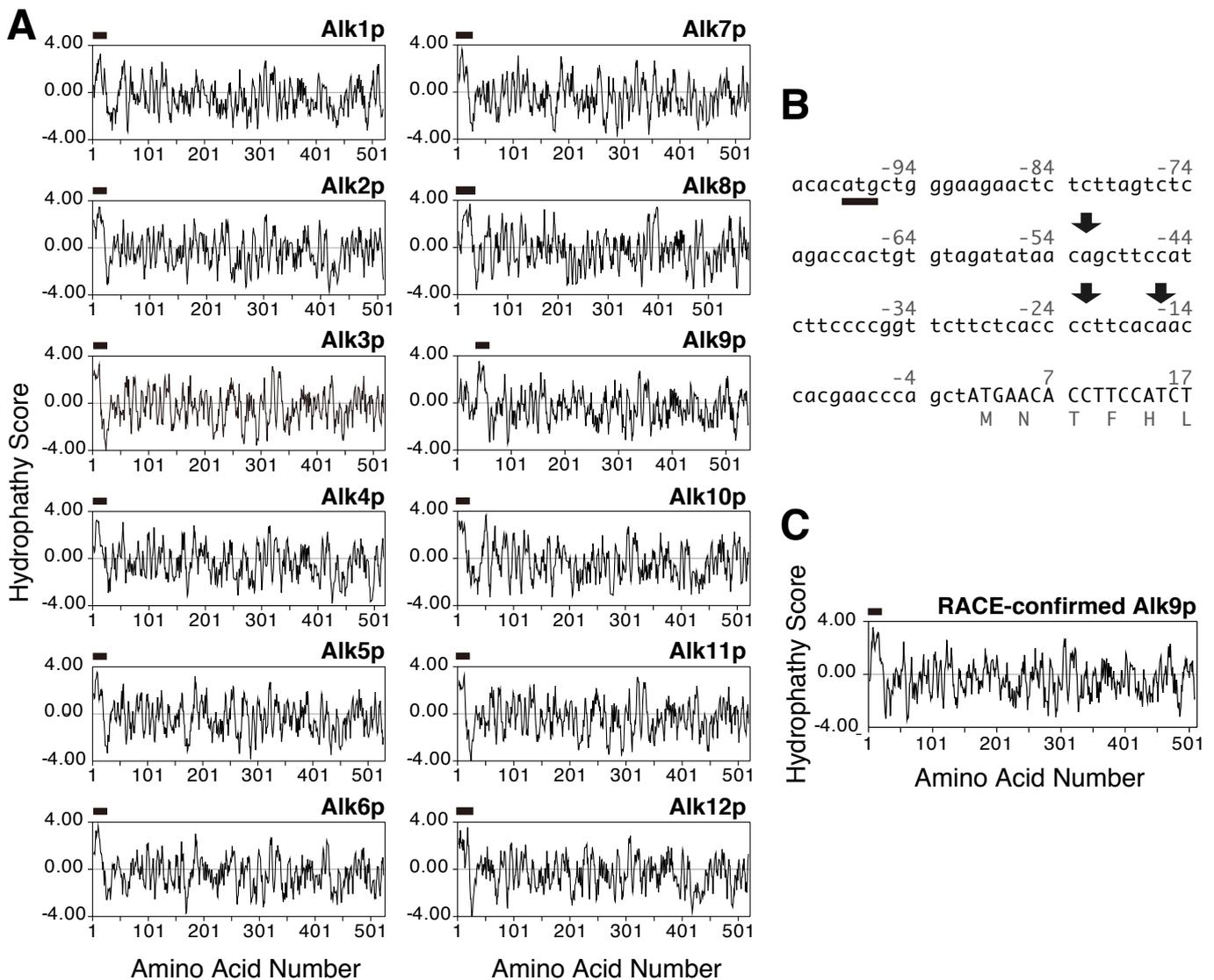
**Figure 1-3. *Y. lipolytica* 細胞を用いた CO 還元差スペクトル測定**

CXAU1 株 (WT)、 $\Delta alk1-12$  株、 $\Delta alk1-12$  ALK1 株を SD 液体培地で対数増殖期まで培養した後、*n*-ドデカンを終濃度 2% となるように培地に添加してさらに 12 時間培養した。菌体を回収し、CO 還元差スペクトル測定に供した。CXAU1 株と  $\Delta alk1-12$  ALK1 株の矢印は P450 由来と考えられる 450 nm の吸収極大を示す。



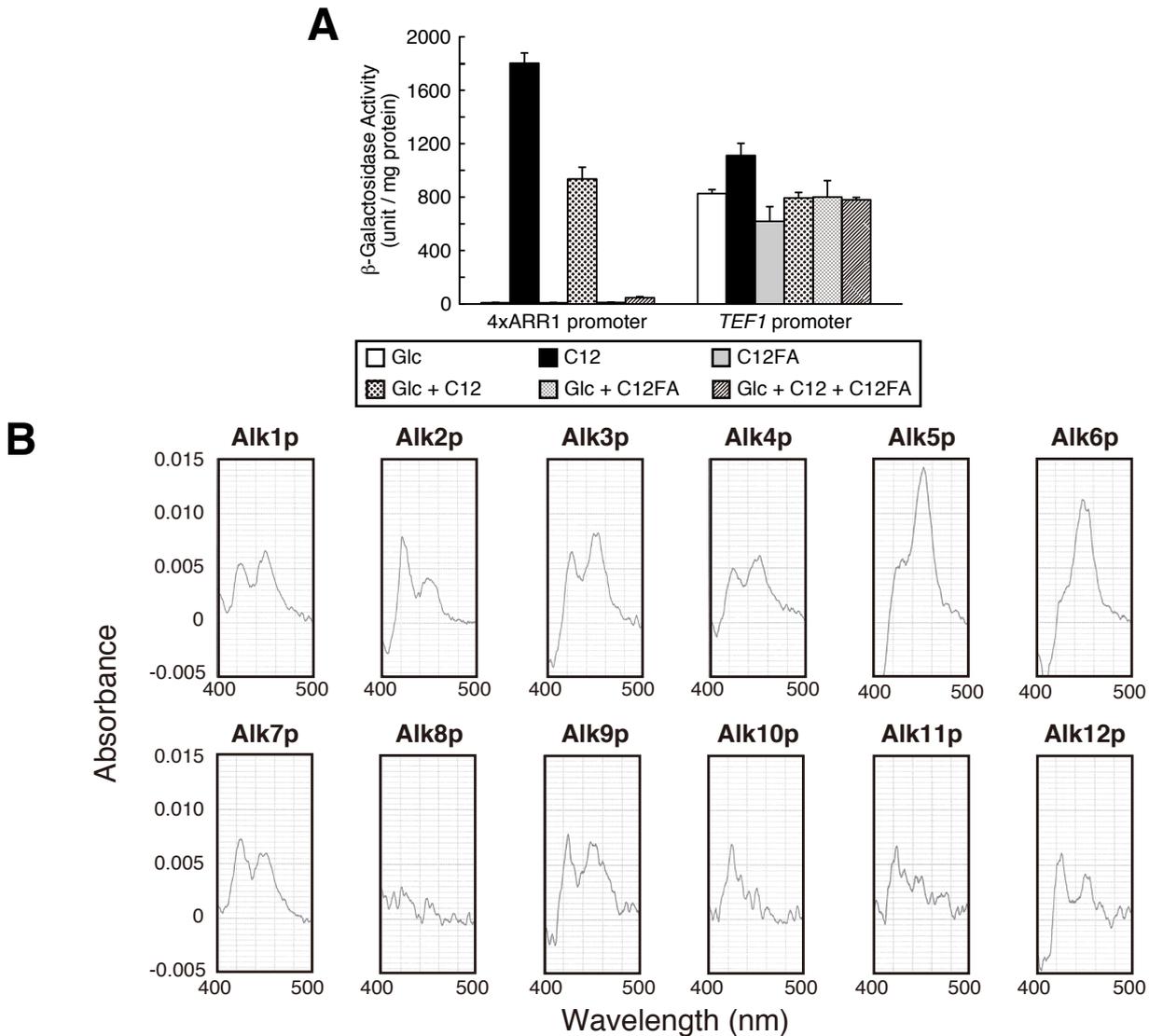
**Figure 1-4. 野生型株、 $\Delta alk1-12$  株、 $\Delta alk1-12 ALK1$  株における  $n$ -ドデカン代謝産物**

(A) CXAU1 株 (WT) を SD 液体培地で対数増殖期まで培養した菌体 (黒線; Glc) を回収した。また、CXAU1 株を SD 液体培地で対数増殖期まで培養した後、0.1%(v/v)  $n$ -ドデカンを含む YNB 培地にシフトして 1、6、10 時間培養した菌体 (それぞれ赤線; C12 (1 h)、青線; C12 (6 h)、緑線; C12 (10 h)) を回収した。回収した菌体を  $n$ -アルカン代謝産物解析に供した。(B) CXAU1 株 (黒線; WT)、 $\Delta alk1-12$  株 (赤線;  $\Delta alk1-12$ )、 $\Delta alk1-12 ALK1$  株 (青線;  $\Delta alk1-12 ALK1$ ) を SD 液体培地で対数増殖期まで培養した後、0.1%(v/v)  $n$ -ドデカンを添加して 6 時間培養した。菌体を回収し、 $n$ -アルカン代謝産物解析に供した。(C) CXAU1 株 (黒線; WT)、 $\Delta alk1-12$  株 (赤線;  $\Delta alk1-12$ )、 $\Delta alk1-12 ALK1$  株 (青線;  $\Delta alk1-12 ALK1$ ) を SD 液体培地で対数増殖期まで培養した後、0.1%(v/v)  $n$ -ドデカンを含む YNB 培地にシフトして 3 時間培養した。菌体を回収し、 $n$ -アルカン代謝産物解析に供した。矢印 (赤); トリメチルシリルウンデカン酸 (ウンデカン酸 TMS 化誘導体、内標準物質) のピーク、矢印 (青); トリメチルシリルドデカン酸 (ドデカン酸 TMS 化誘導体) のピーク。(D) CXAU1 株 (Wild-type)、 $\Delta alk1-12$  株を SD 液体培地で対数増殖期まで培養した後、2%(v/v)  $n$ -ドデカンを添加して 6 時間培養した菌体を  $n$ -アルカン代謝産物解析に供した。検出された 1-ドデカノールおよびドデカン酸の誘導体の量を定量した。独立した 3 回の実験の平均値を棒グラフ、標準誤差をエラーバーで示した。



### Figure 1-5. Alk9p の N 末端配列の確認

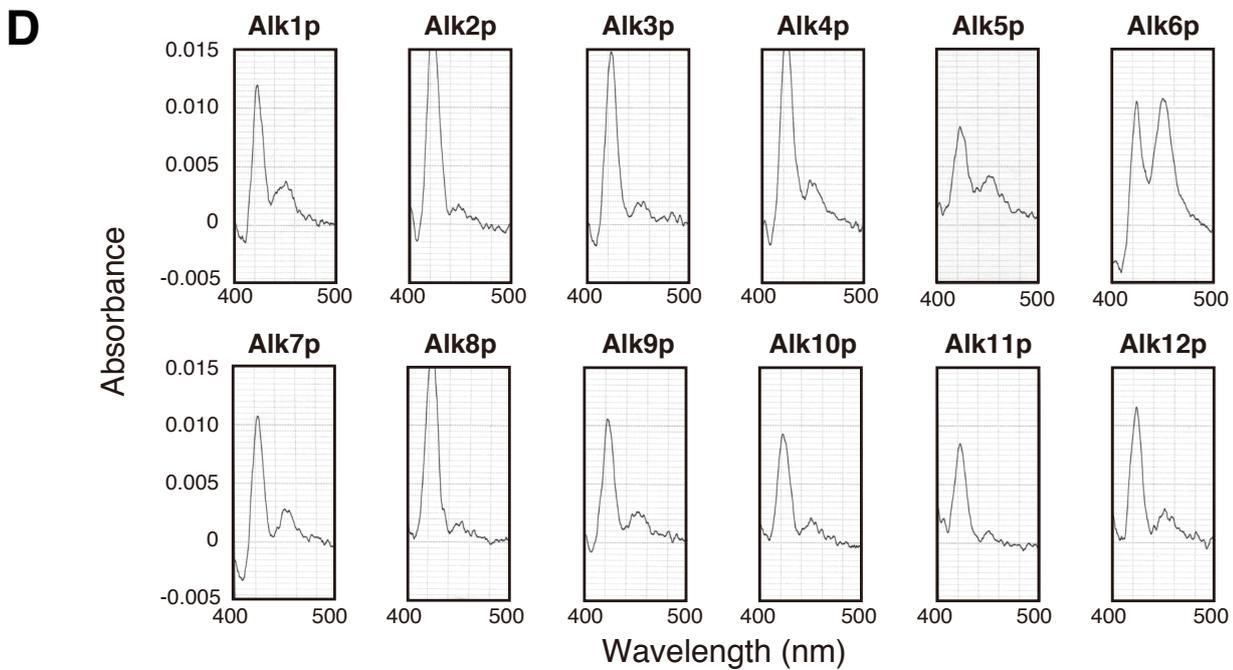
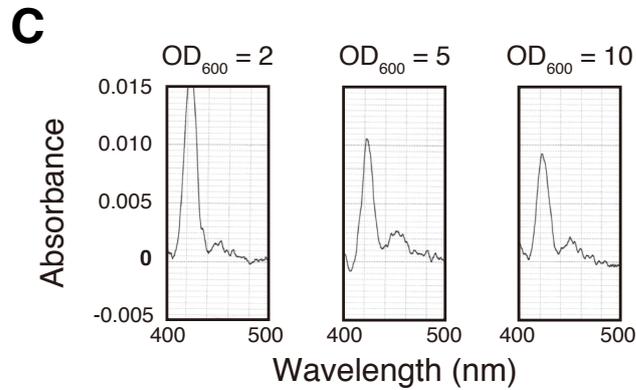
(A) 各 Alk タンパク質群の Kyte-Doolittle hydropathy plot. 使用した各配列の UniprotKB における Accession number は、Alk1p (O74127), Alk2p (O74128), Alk3p (O74129), Alk4p (O74130), Alk5p (O74131), Alk6p (O74132), Alk7p (O74133), Alk8p (O74134), Alk9p (Q6CFK2), Alk10p (Q6CDW4), Alk11p (Q6CCE5), Alk12p (Q6CGD9) である。太線は推定膜貫通領域を示す。(B) *ALK9* の 5' 側のタンパク質コード領域と非コード領域の核酸配列。矢印は RACE 解析により予測される転写開始点を示す。Génolevures プロジェクトにより予想されていた開始コドンを下線で示す。(C) RACE 解析により予測された Alk9p の Kyte-Doolittle hydropathy plot. 太線は推定膜貫通領域を示す。



### Figure 1-6. *Y. lipolytica* 細胞における個々の Alk タンパク質の発現

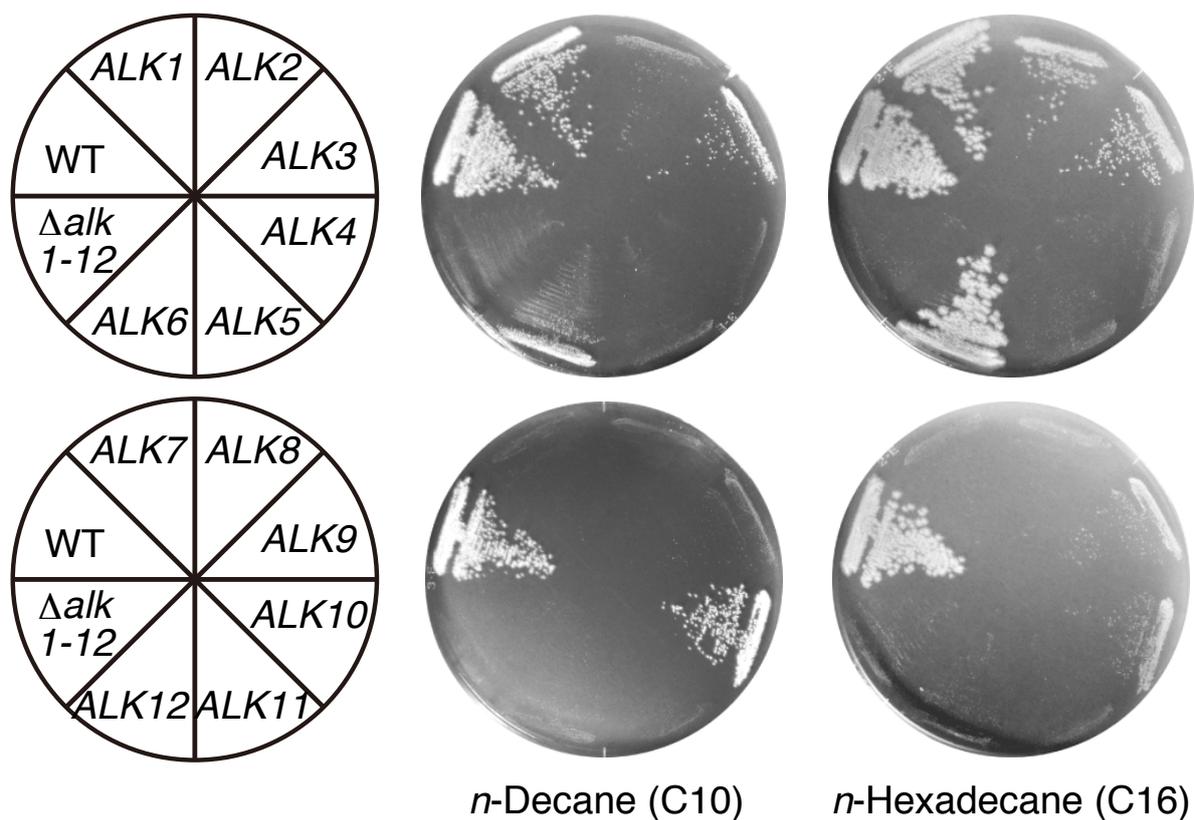
(A) 4xARR1 プロモーターおよび *TEF1* プロモーターの活性。pS4ARR-lacZ、pSUTEF1-lacZ を導入した CXAU/A1 株 (野生型株) を SD 液体培地で対数増殖期まで培養した後、2% グルコース (Glc)、2% *n*-ドデカン (C12)、2% ドデカン酸 (C12FA)、2% グルコースおよび 2% *n*-ドデカン (Glc + C12)、2% グルコースおよび 2% ドデカン酸 (Glc + C12FA)、または 2% グルコース、2% *n*-ドデカンおよび 2% ドデカン酸 (Glc + C12 + C12FA) を含む YNB 液体培地にシフトして 3 時間培養した。得られた菌体から粗酵素液を抽出し、 $\beta$ -ガラクトシダーゼ活性測定を行った。独立した 3 回の実験の平均値を棒グラフ、標準誤差をエラーバーで示した。

(B)  $\Delta alk1-12$  株における 4xARR1 プロモーター制御下での各 Alk タンパク質の生産。4xARR1 プロモーター下流に個々の *ALK* 遺伝子の ORF を繋いだプラスミド (Alk1p ~ Alk12p) を  $\Delta alk1-12$  株に導入した。それぞれの株を SD 液体培地で対数増殖期まで培養した後、終濃度 1% となるように *n*-ドデカンを添加して 12 時間培養した。回収した菌体を CO 還元差スペクトル測定に供した。同様の結果が独立した 3 回の実験で得られた。

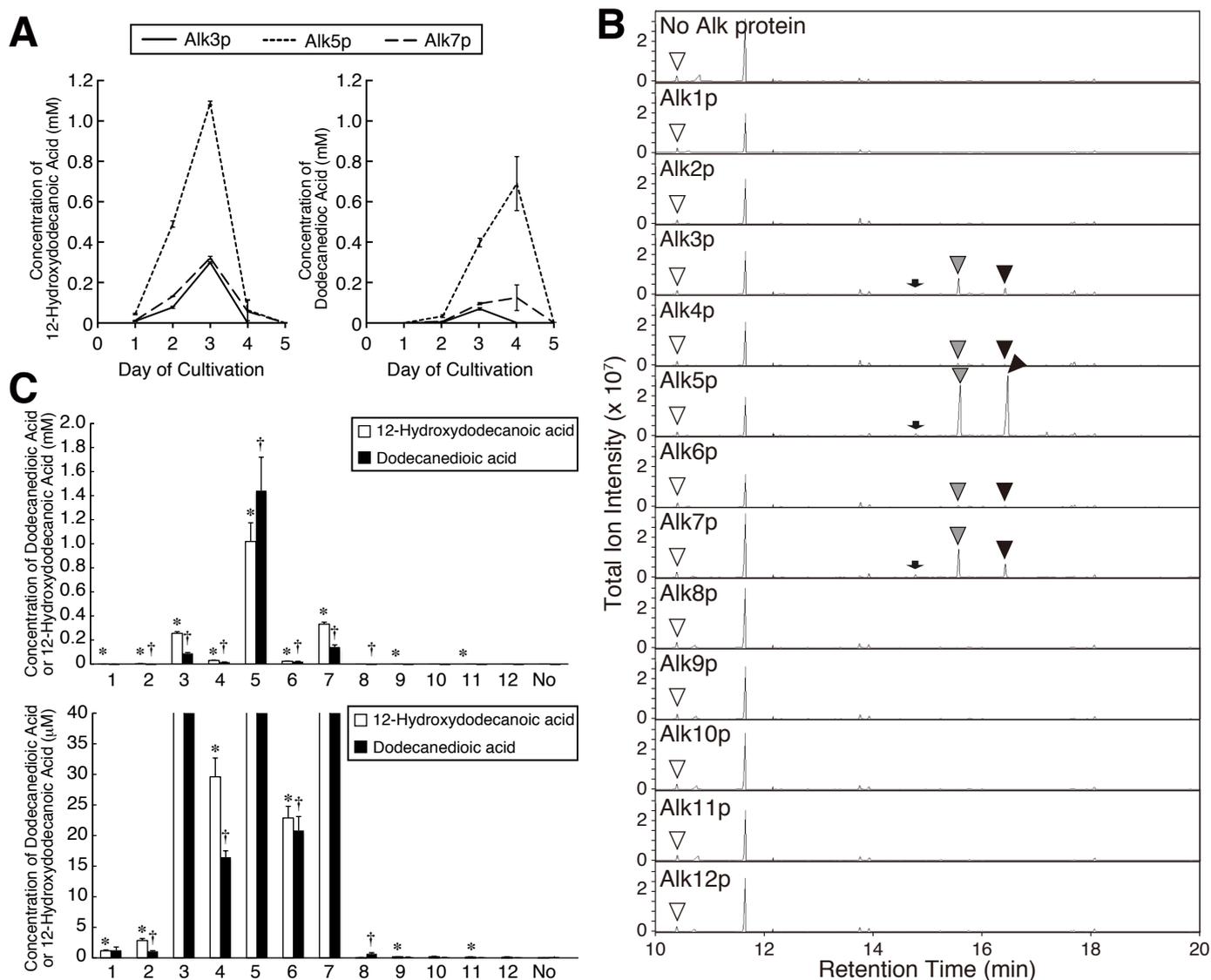


**Figure 1-6. *Y. lipolytica* 細胞における個々の Alk タンパク質の発現 (continued)**

(C) pSUTEF1-ALK1 を導入した  $\Delta alk1-12$  株を SD 液体培地で OD<sub>600</sub> = 2、OD<sub>600</sub> = 5、OD<sub>600</sub> = 10 まで培養した。それぞれの菌体を回収し、CO 還元差スペクトル測定に供した。(D)  $\Delta alk1-12$  株における *TEF1* プロモーター制御下での各 Alk タンパク質の生産。*TEF1* プロモーター下流に個々の *ALK* 遺伝子の ORF を繋いだプラスミド (Alk1p~Alk12p) を *alk1-12* 株に導入した。それぞれの株を SD 液体培地で 30 時間培養した後、CO 還元差スペクトル測定に供した。同様の結果が独立した 3 回の実験で得られた。

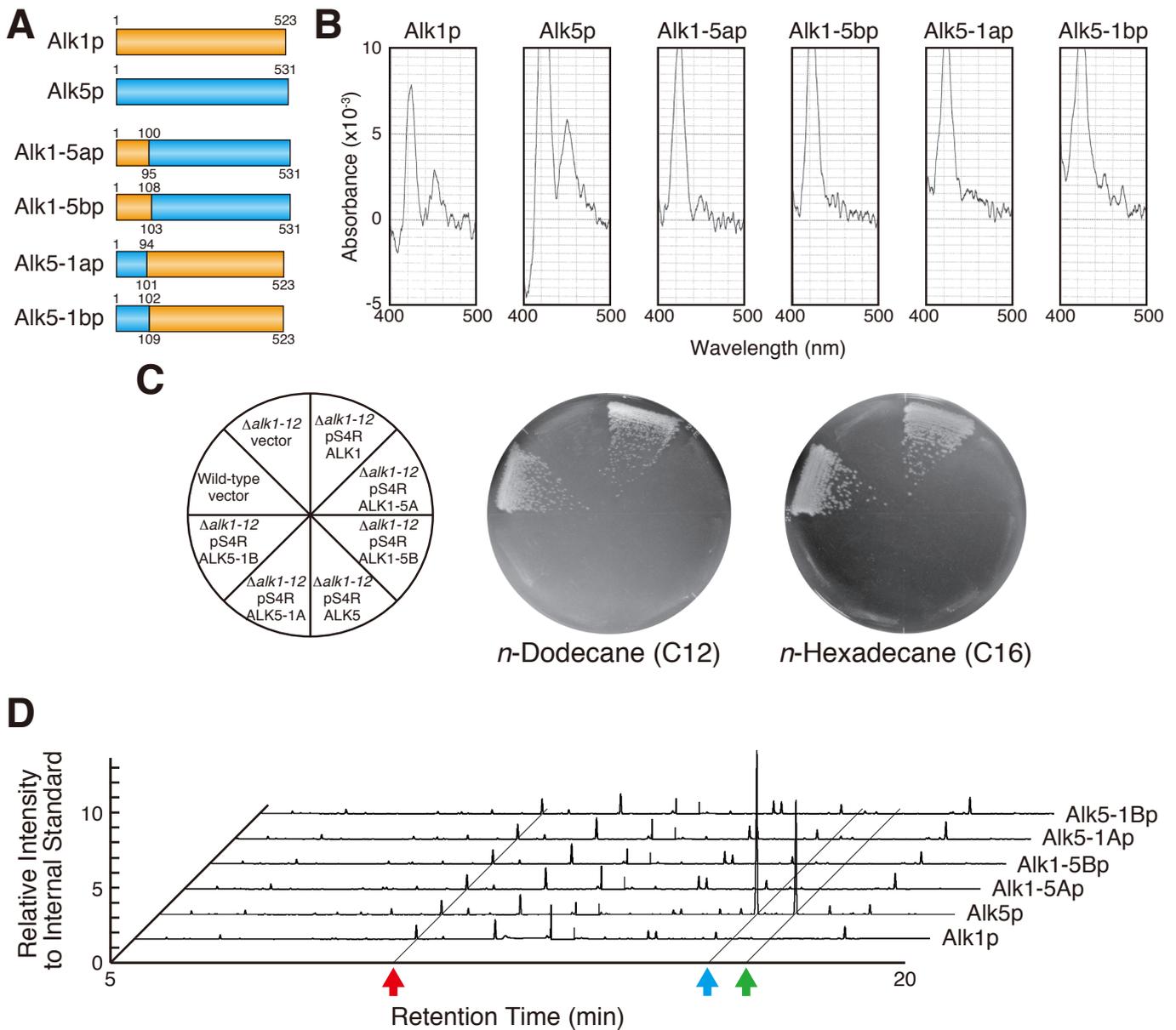


**Figure 1-7.** 4xARR1 プロモーター下で各 *ALK* 遺伝子を発現する  $\Delta alk1-12$  株の *n*-アルカンでの生育  
 pSUT5 を導入した CXAU1 株 (WT) と pSUT5 ( $\Delta alk1-12$ ), pS4RALK1 (*ALK1*), pS4RALK2 (*ALK2*), pS4RALK3 (*ALK3*), pS4RALK4 (*ALK4*), pS4RALK5 (*ALK5*), pS4RALK6 (*ALK6*), pS4RALK7 (*ALK7*), pS4RALK8 (*ALK8*), pS4RALK9 (*ALK9*), pS4RALK10 (*ALK10*), pS4RALK11 (*ALK11*), pS4RALK12 (*ALK12*) を導入した  $\Delta alk1-12$  株を *n*-デカン (C10) または *n*-ヘキサデカン (C16) を単一の炭素源として 7 日間培養した。



**Figure 1-8. ドデカン酸を含む培地における各 *ALK* 遺伝子単独発現株によるドデカン二酸および 12-ヒドロキシドデカン酸の生産**

(A) *TEF1* プロモーター下で *ALK3*、*ALK5* または *ALK7* を発現する  $\Delta alk1-12$  株を 0.5% ドデカン酸を含む SD 液体培地で 1、2、3、4、5 日間培養した。ドデカン二酸や 12-ヒドロキシドデカン酸をこれらの培養液から抽出し、GC-MS を用いて定量した。独立した 3 回の実験の平均値をプロットし、標準誤差をエラーバーで示した。(B) pSUT5 (no Alk protein)、pSUTEF1-*ALK1* (Alk1p)、pSUTEF1-*ALK2* (Alk2p)、pSUTEF1-*ALK3* (Alk3p)、pSUTEF1-*ALK4* (Alk4p)、pSUTEF1-*ALK5* (Alk5p)、pSUTEF1-*ALK6* (Alk6p)、pSUTEF1-*ALK7* (Alk7p)、pSUTEF1-*ALK8* (Alk8p)、pSUTEF1-*ALK9* (Alk9p)、pSUTEF1-*ALK10* (Alk10p)、pSUTEF1-*ALK11* (Alk11p)、pSUTEF1-*ALK12* (Alk12p) を導入した  $\Delta alk1-12$  株を 0.5% ドデカン酸を含む SD 液体培地で 3 日間培養した。ドデカン二酸、12-ヒドロキシドデカン酸、11-ヒドロキシドデカン酸を培養液から抽出し、GC-MS で解析した。TMS 化されたドデカン二酸、12-ヒドロキシドデカン酸、ウンデカン酸 (内標準物質) のピークをそれぞれ黒、灰色、白の矢頭で示す。黒の矢印は 11-ヒドロキシドデカン酸の TMS 誘導体を示す。(C) (upper)(B) におけるドデカン二酸、12-ヒドロキシドデカン酸の定量。1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12 はそれぞれ Alk1p、Alk2p、Alk3p、Alk4p、Alk5p、Alk6p、Alk7p、Alk8p、Alk9p、Alk10p、Alk11p、Alk12p を発現する  $\Delta alk1-12$  株を No は Alk タンパク質を発現していない  $\Delta alk1-12$  株を示す。独立した 3 回の実験の平均値を棒グラフ、標準誤差をエラーバーで示した。\*、† Alk タンパク質を発現していない  $\Delta alk1-12$  株の結果と比較して統計的有意差がある ( $P < 0.05$ 、独立 2 標本 *t* 検定、両側検定、\* ドデカン二酸、† 12-ヒドロキシドデカン酸)。(lower) 上の図の 40  $\mu$ M までの拡大図を示す。

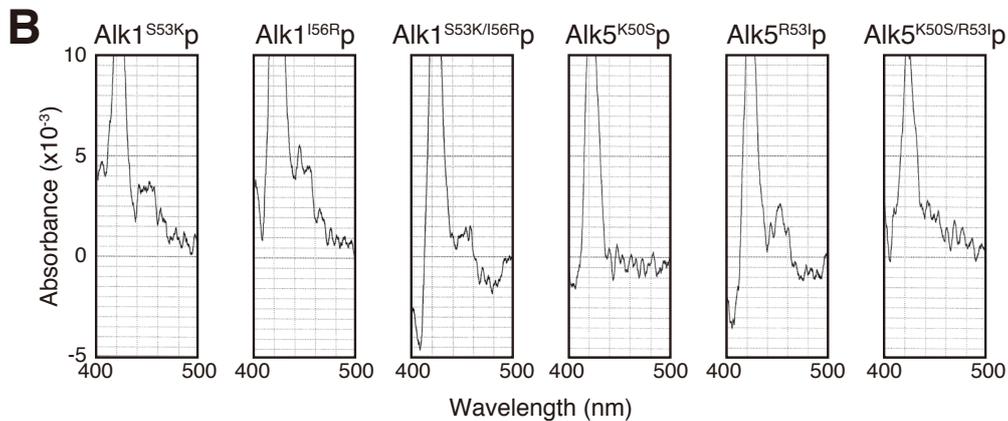


**Figure 1-9. Alk1p と Alk5p の N 末端領域を置換したキメラタンパク質の解析**

(A) Alk1p と Alk5p のキメラタンパク質の模式図。Alk1p の領域を橙色、Alk5p の領域を青色で示す。(B) *TEF1* プロモーター下に Alk1p、Alk5p、Alk1-5Ap、Alk1-5Bp、Alk5-1Ap、Alk5-1Bp の ORF を繋いだプラスミドを  $\Delta alk1-12$  株に導入した。それぞれの株を SD 液体培地で 30 時間培養した後、CO 還元差スペクトル測定に供した。(C) pSUT5 を導入した CXAU1 株 (Wild-type vector)、pSUT5 を導入した  $\Delta alk1-12$  株 ( $\Delta alk1-12$  vector)、4xARR1 プロモーター下に Alk1p ( $\Delta alk1-12$  pS4RALK1)、Alk5p ( $\Delta alk1-12$  pS4RALK5)、Alk1-5Ap ( $\Delta alk1-12$  pS4RALK1-5A)、Alk1-5Bp ( $\Delta alk1-12$  pS4RALK1-5B)、Alk5-1Ap ( $\Delta alk1-12$  pS4RALK5-1A)、Alk5-1Bp ( $\Delta alk1-12$  pS4RALK5-1B) の ORF を繋いだプラスミドを  $\Delta alk1-12$  株に導入し、それぞれの株の *n*-ドデカン、*n*-ヘキサデカンを単一の炭素源とした培地で 5 日間培養した。(D) *TEF1* プロモーター下に Alk1p、Alk5p、Alk1-5Ap、Alk1-5Bp、Alk5-1Ap、Alk5-1Bp の ORF を繋いだプラスミドを  $\Delta alk1-12$  株に導入し、それぞれの株を 0.5% ドデカン酸を含む SD 液体培地で 3 日間培養した。脂肪酸類を培地から抽出し、GC-MS で解析した。赤矢印はウンデカン酸 (内標準物質) 由来、青矢印はドデカン二酸由来、緑矢印は 12-ヒドロキシドデカン酸由来のピークを示す。

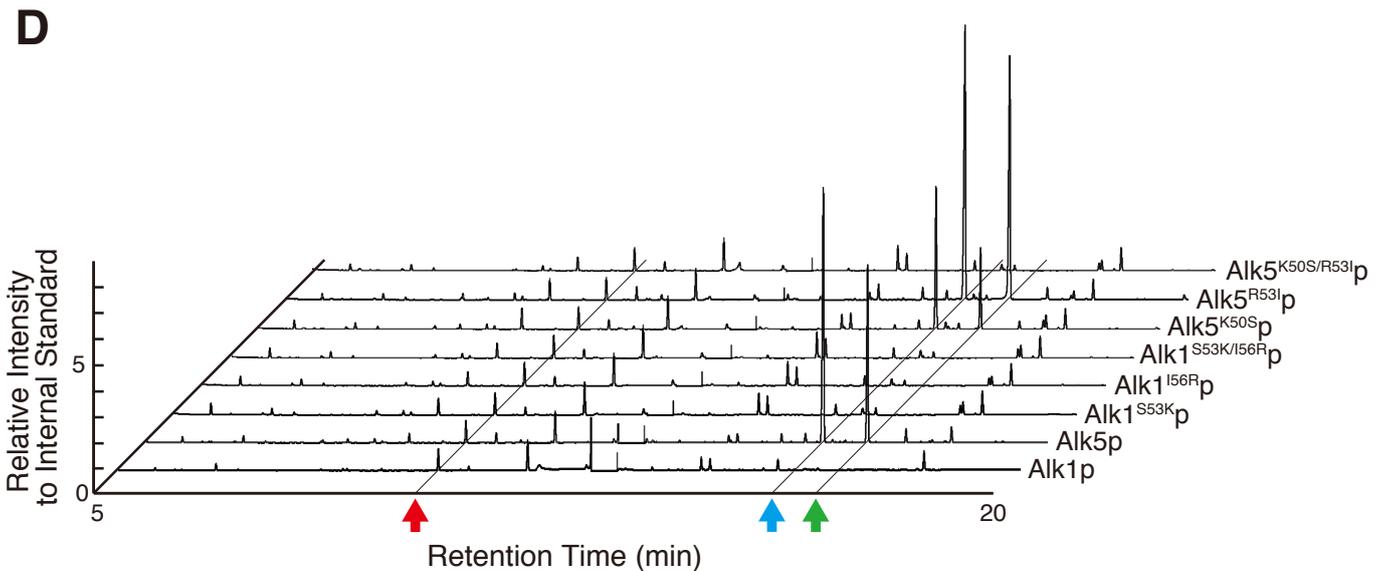
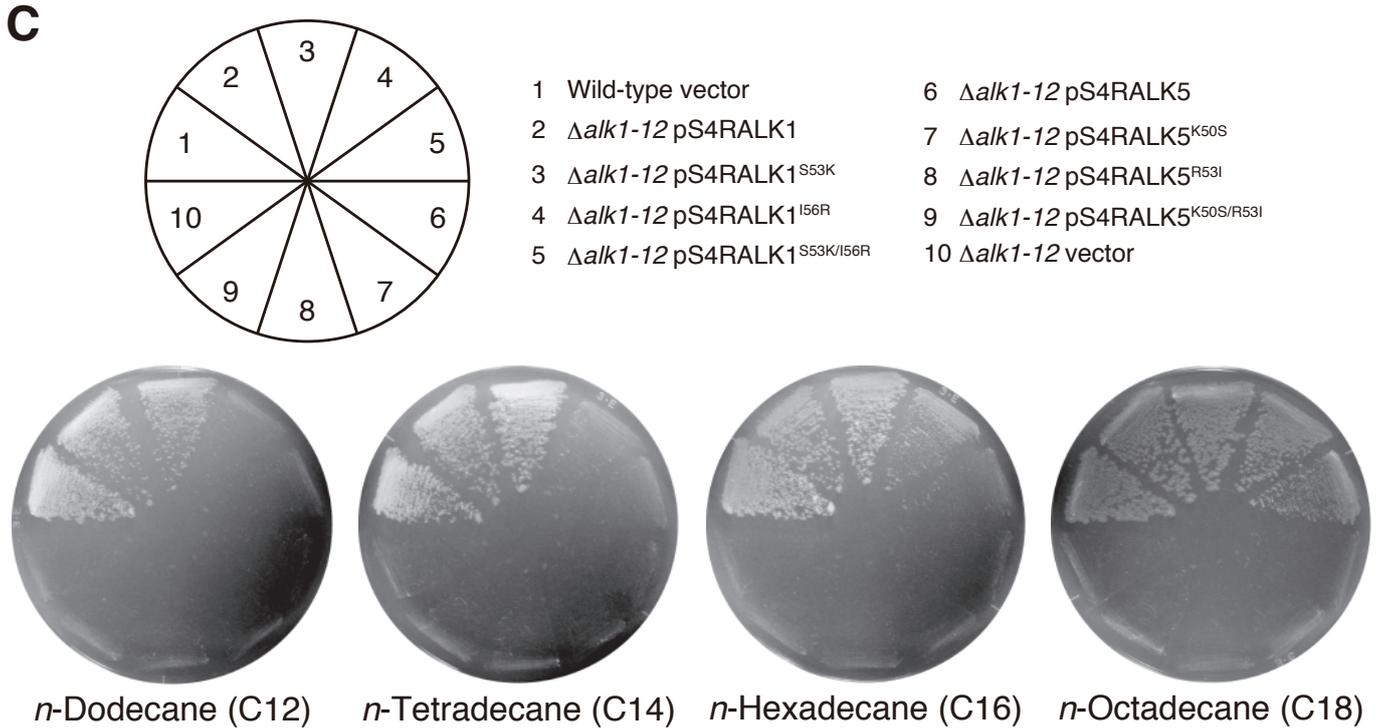
**A**

Protein	Sequences of Amino Acids																																										
Alk11p	42	Q	K	V	A	D	I	Q	-	V	Q	N	N	F	L	R	N	P	-	F	G	-	-	-	-	L	V	Q	F	V	E	F	L	N	R	T	K	G	A	F	F	V	76
Alk1p	41	K	P	K	D	-	-	-	-	-	-	-	I	S	R	F	P	-	F	S	-	-	-	-	A	(S)	F	F	(I)	P	F	L	V	E	S	K	K	N	R	L	L	68	
Alk10p	36	P	V	R	D	-	-	-	-	-	-	V	S	S	F	P	-	M	A	-	-	-	-	F	P	E	F	L	F	F	F	K	S	G	K	N	N	V	L	L	63		
Alk2p	36	E	P	H	N	-	-	-	-	-	-	L	N	E	F	P	-	L	N	-	-	-	-	L	P	L	F	F	L	I	I	N	A	S	R	R	H	E	L	L	63		
Alk9p	40	K	P	L	Y	-	-	-	-	-	-	-	Y	A	S	F	P	-	R	S	-	-	-	-	L	W	H	F	Y	V	F	L	R	E	S	R	K	H	K	L	L	67	
Alk6p	38	M	P	P	M	-	-	-	-	-	-	A	N	G	G	F	-	L	G	-	-	-	-	W	Y	G	L	Y	K	T	Y	Q	I	T	S	E	R	T	Y	P	65		
Alk4p	39	L	P	P	R	-	-	-	-	-	-	V	N	N	G	I	-	L	G	-	-	-	-	W	Y	G	L	W	L	V	I	Q	N	A	R	S	M	K	L	P	66		
Alk3p	38	-	-	P	V	-	-	-	-	-	-	-	A	Y	N	G	L	-	L	G	-	-	-	-	W	K	G	L	R	H	M	L	T	V	F	N	N	D	I	G	P	63	
Alk7p	38	Q	L	R	V	-	-	-	-	-	-	-	A	E	N	G	L	-	F	G	-	-	-	-	W	(K)	G	L	(R)	E	V	L	R	I	N	K	Y	K	L	G	P	65	
Alk5p	38	E	L	T	V	-	-	-	-	-	-	-	A	K	N	G	F	-	L	G	-	-	-	-	W	K	G	I	R	A	V	L	H	V	L	K	T	K	K	G	P	65	
Alk12p	34	Y	P	P	I	-	-	-	-	-	-	-	A	S	N	G	L	-	L	G	-	-	-	-	W	R	G	L	V	H	Q	L	S	G	F	V	K	D	I	G	P	61	
Alk8p	48	R	C	P	Q	-	-	-	-	-	-	-	Q	S	T	G	L	-	F	G	-	-	-	-	W	W	L	I	Y	A	V	V	R	C	N	R	D	R	F	Y	S	75	
BM3 (2UWH)	10	T	-	-	F	-	-	G	E	-	-	-	L	K	N	-	L	P	L	L	N	T	D	K	P	-	V	Q	A	L	-	M	K	I	-	-	A	D	E	-	L	36	



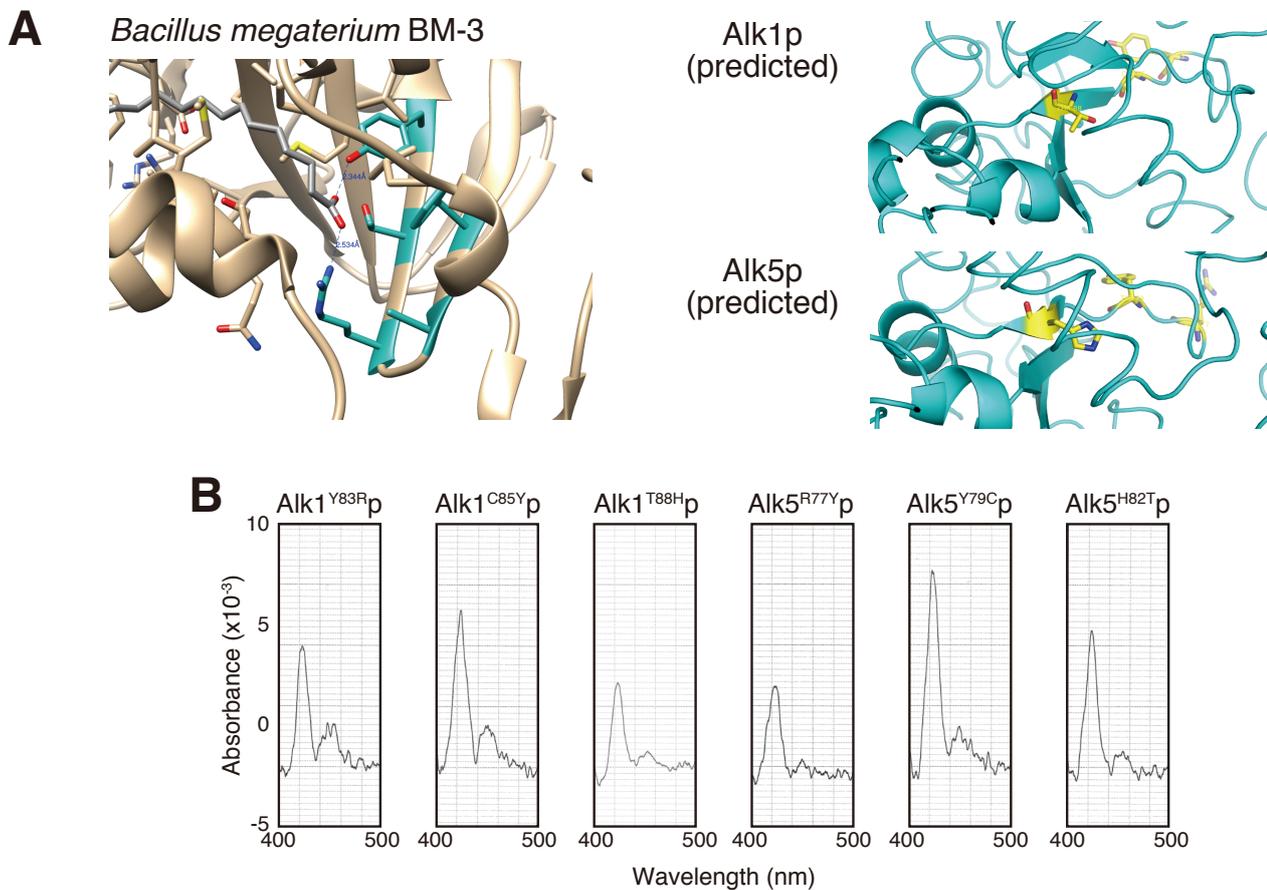
**Figure 1-10. Alk1p と Alk5p のアミノ酸置換体の解析 (1)**

(A) 立体構造予測に基づいたマルチプルアラインメント。モデル構造において基質から 6Å 以内に近接する残基を赤で示す。P450<sub>BM-3</sub> の構造として、Protein Data Bank (PDB) に登録されている 2UWH を利用した (東京大学アグリバイオインフォマティクス教育研究ユニット、寺田透先生より)。アミノ酸置換の標的にした残基を丸印で示した。(B) *TEF1* プロモーター下に Alk1<sup>S53K</sup>p、Alk1<sup>I56R</sup>p、Alk1<sup>S53K/I56R</sup>p、Alk5<sup>K50S</sup>p、Alk5<sup>R53I</sup>p または Alk5<sup>K50S/R53I</sup>p の ORF を繋いだプラスミドを  $\Delta alk1-12$  株に導入した。それぞれの株を SD 液体培地で 30 時間培養した後、CO 還元差スペクトル測定に供した。



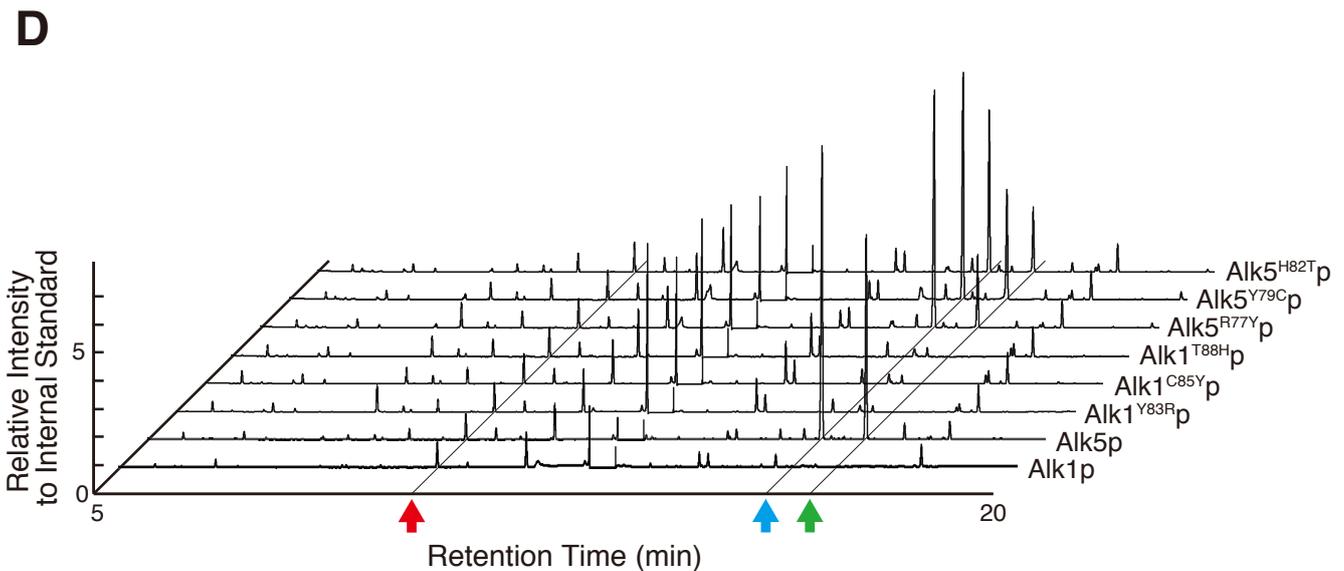
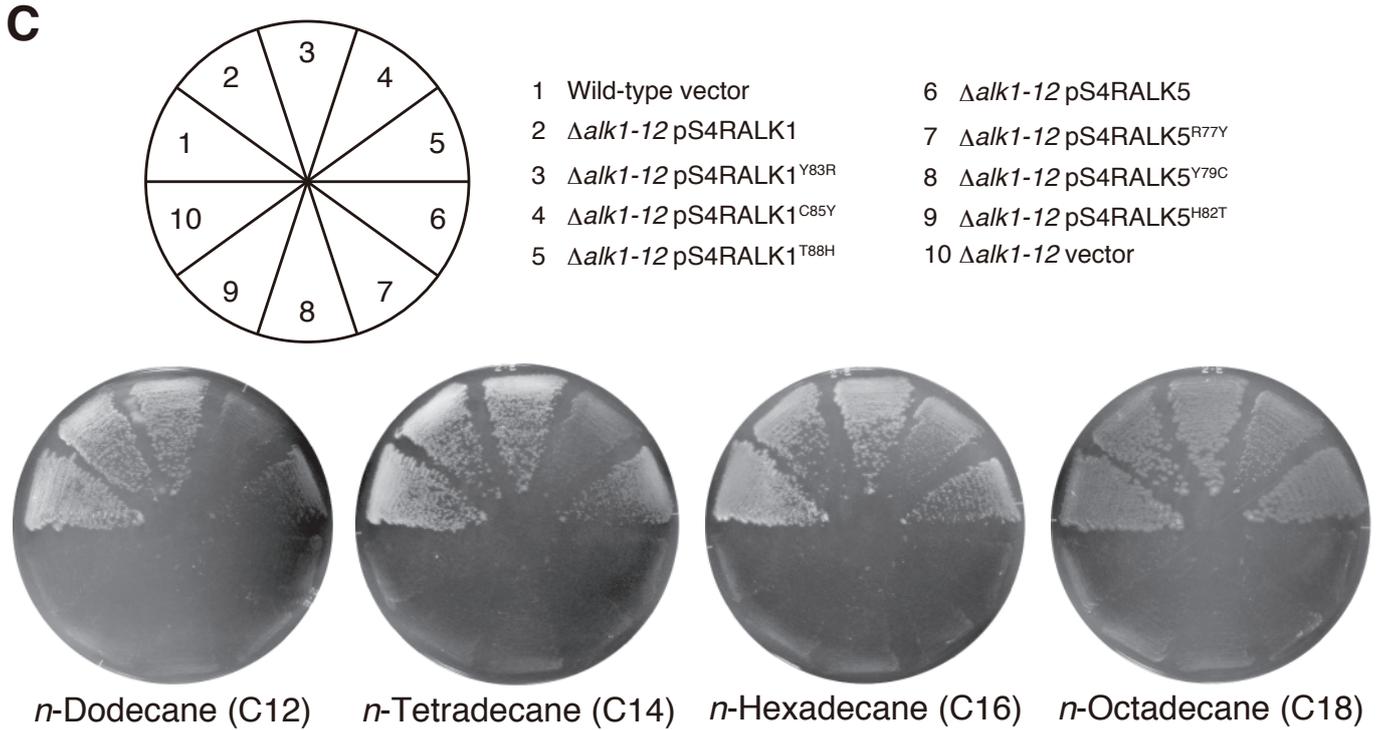
**Figure 1-10. Alk1p と Alk5p のアミノ酸置換体の解析 (1) (continued)**

(C) pSUT5 を導入した CXAU1 株 (Wild-type vector)、pSUT5 を導入した  $\Delta alk1-12$  株 ( $\Delta alk1-12$  vector)、4xARR1 プロモーター下に Alk1p ( $\Delta alk1-12$  pS4RALK1)、Alk5p ( $\Delta alk1-12$  pS4RALK5)、Alk1<sup>S53K</sup>p ( $\Delta alk1-12$  pS4RALK1<sup>S53K</sup>)、Alk1<sup>I56R</sup>p ( $\Delta alk1-12$  pS4RALK1<sup>I56R</sup>)、Alk1<sup>S53K/I56R</sup>p ( $\Delta alk1-12$  pS4RALK1<sup>S53K/I56R</sup>)、Alk5<sup>K50S</sup>p ( $\Delta alk1-12$  pS4RALK5<sup>K50S</sup>)、Alk5<sup>R53I</sup>p ( $\Delta alk1-12$  pS4RALK5<sup>R53I</sup>)または Alk5<sup>K50S/R53I</sup>p ( $\Delta alk1-12$  pS4RALK5<sup>K50S/R53I</sup>) の ORF を繋いだプラスミドを  $\Delta alk1-12$  株に導入し、それぞれの株の *n*-ドデカン、*n*-テトラデカン、*n*-ヘキサデカン、*n*-オクタデカンを用いた培地で 5 日間培養した。(D) *TEF1* プロモーター下に Alk1<sup>S53K</sup>p、Alk1<sup>I56R</sup>p、Alk1<sup>S53K/I56R</sup>p、Alk5<sup>K50S</sup>p、Alk5<sup>R53I</sup>p または Alk5<sup>K50S/R53I</sup>p の ORF を繋いだプラスミドを  $\Delta alk1-12$  株に導入し、それぞれの株を 0.5%ドデカン酸を含む SD 液体培地で 3 日間培養した。脂肪酸類を培地から抽出し、GC-MS で解析した。赤矢印はウンデカン酸 (内標準物質) 由来、青矢印はドデカン二酸由来、緑矢印は 12-ヒドロキシドデカン酸由来のピークを示す。



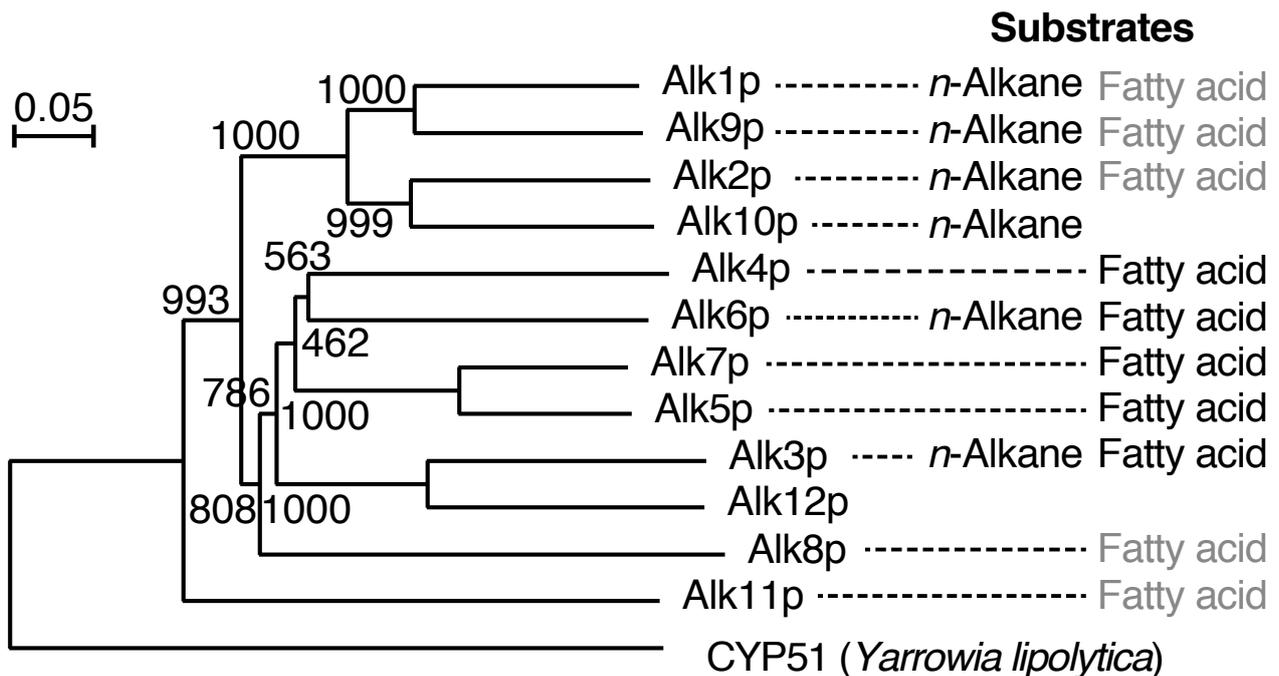
### Figure 1-11. Alk1p と Alk5p のアミノ酸置換体の解析 (2)

(A) パルミチン酸と結合した *B. megaterium* P450<sub>BM-3</sub> の立体構造および Alk1p と Alk5p の予測された立体構造におけるパルミチン酸のカルボキシル基周辺のタンパク質構造 (東京大学アグリバイオインフォマティクス教育研究ユニット、寺田透先生より)。Alk1p と Alk5p の立体構造における黄色で示した残基をアミノ酸置換の標的にした。(B) *TEF1* プロモーター下に Alk1<sup>Y83R</sup>p、Alk1<sup>C85Y</sup>p、Alk1<sup>T88H</sup>p、Alk5<sup>R77Y</sup>p、Alk5<sup>Y79C</sup>p および Alk5<sup>H82T</sup>p の ORF を繋いだプラスミドを  $\Delta alk1-12$  株に導入した。それぞれの株を SD 液体培地で 30 時間培養した後、CO 還元差スペクトル測定に供した。



**Figure 1-11. Alk1p と Alk5p のアミノ酸置換体の解析 (2) (continued)**

(C) pSUT5 を導入した CXAU1 株 (Wild-type vector)、pSUT5 を導入した  $\Delta alk1-12$  株 ( $\Delta alk1-12$  vector)、4xARR1 プロモーター下に Alk1p ( $\Delta alk1-12$  pS4RALK1)、Alk5p ( $\Delta alk1-12$  pS4RALK5)、Alk1<sup>Y83R</sup>p ( $\Delta alk1-12$  pS4RALK1<sup>Y83R</sup>)、Alk1<sup>C85Y</sup>p ( $\Delta alk1-12$  pS4RALK1<sup>C85Y</sup>)、Alk1<sup>T88H</sup>p ( $\Delta alk1-12$  pS4RALK1<sup>T88H</sup>)、Alk5<sup>R77Y</sup>p ( $\Delta alk1-12$  pS4RALK5<sup>R77Y</sup>)、Alk5<sup>Y79C</sup>p ( $\Delta alk1-12$  pS4RALK5<sup>Y79C</sup>)、および Alk5<sup>H82T</sup>p ( $\Delta alk1-12$  pS4RALK5<sup>H82T</sup>) の ORF を繋いだプラスミドを  $\Delta alk1-12$  株に導入し、それぞれの株の *n*-ドデカン、*n*-テトラデカン、*n*-ヘキサデカン、*n*-オクタデカンを単一の炭素源とした培地で 5 日間培養した。(D) *TEF1* プロモーター下に Alk1<sup>Y83R</sup>p、Alk1<sup>C85Y</sup>p、Alk1<sup>T88H</sup>p、Alk5<sup>R77Y</sup>p、Alk5<sup>Y79C</sup>p および Alk5<sup>H82T</sup>p の ORF を繋いだプラスミドを  $\Delta alk1-12$  株に導入し、それぞれの株を 0.5% ドデカン酸を含む SD 液体培地で 3 日間培養した。脂肪酸類を培地から抽出し、GC-MS で解析した。赤矢印はウンデカン酸 (内標準物質) 由来、青矢印はドデカン二酸由来、緑矢印は 12-ヒドロキシドデカン酸由来のピークを示す。



**Figure 1-12. *Y. lipolytica* における Alk タンパク質群とその基質特異性**

*Y. lipolytica* の 12 種の Alk タンパク質群のアミノ酸配列を ClustalW (DDBJ, v2.1) で解析し、Njplot で分子系統樹を描画した。*Y. lipolytica* の CYP51 を外群として利用した。スケールバーは 0.1 substitutions per site、ブーストストラップ値は 1000 回の試行により得られた値を示す。使用した各配列の UniprotKB における Accession number は Figure 1-0 に示した。本研究において明らかとなった基質を示す。Alk1p、Alk2p、Alk8p、Alk9p および Alk11p の脂肪酸に対する弱い活性を灰色で示した。

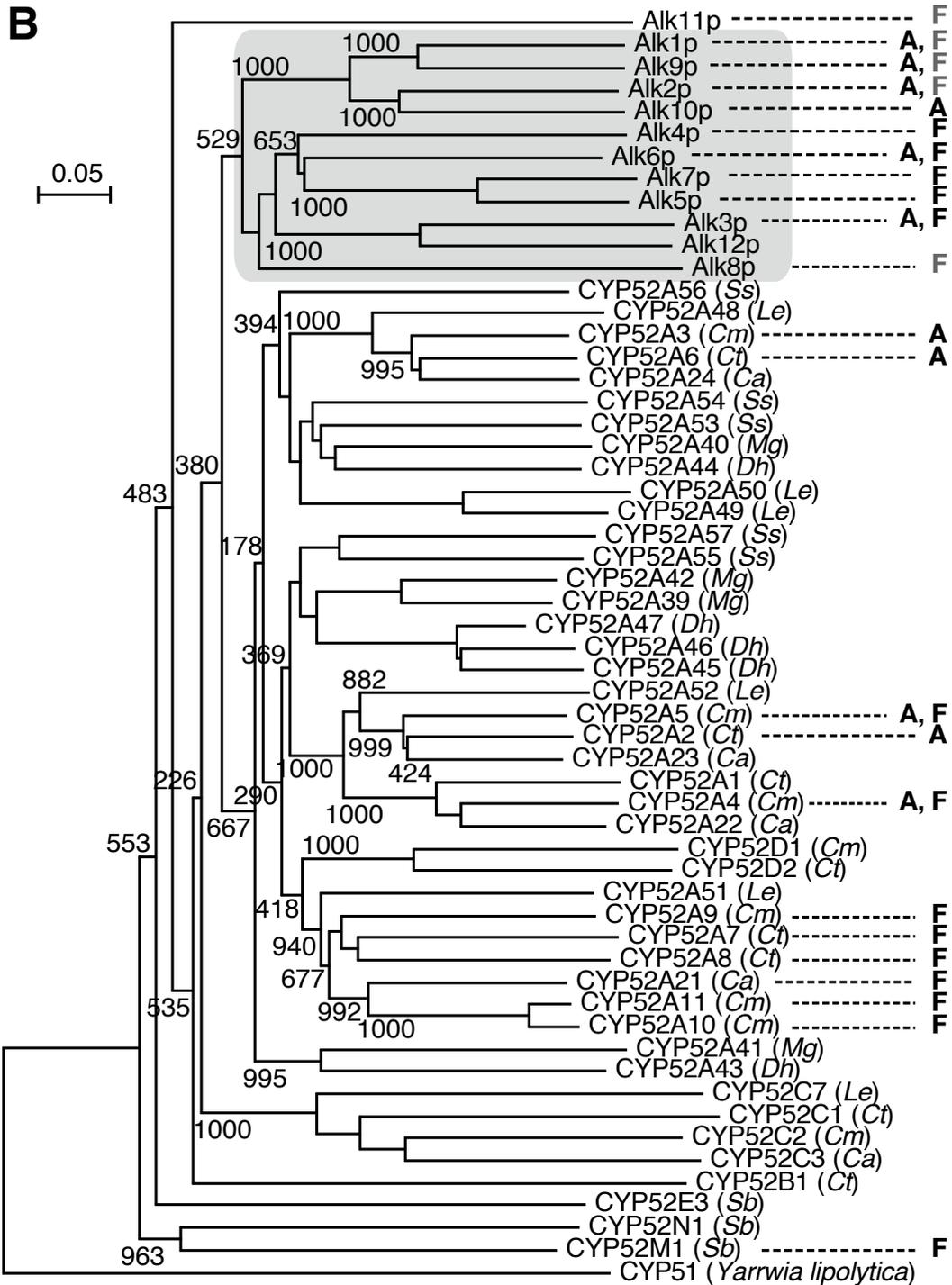
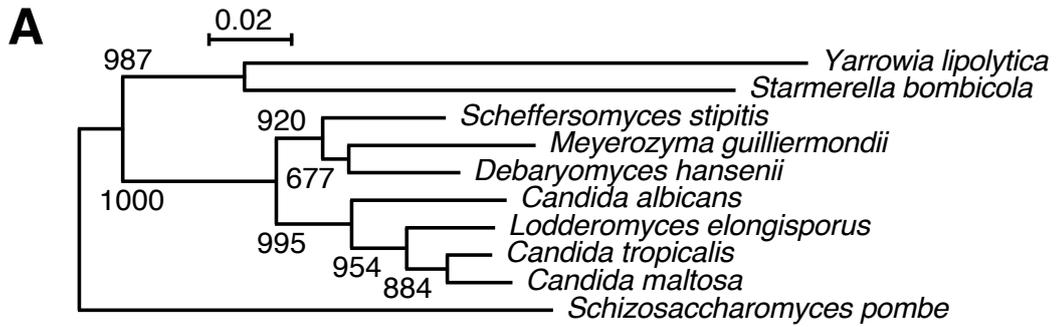


Figure 1-13. *n*-アルカン資化性酵母と CYP52 ファミリーの P450 の系統樹

(説明は次頁)

**Figure 1-13. *n*-アルカン資化性酵母と CYP52 ファミリーの P450 の系統樹 (continued)**

(A) *n*-アルカン資化性酵母の 26S リボソーム DNA の D1/D2 領域を ClustalW (DDBJ, v2.1)で解析し、Njplot で分子系統樹を描画した。*S. pombe* の D1/D2 領域を外群として利用した。スケールバーは 0.02 substitutions per site、ブートストラップ値は 1000 試行により得られた値を示す。D1/D2 領域は基準株から得られた配列を使用した。GenBank におけるそれぞれの配列の Accession number を次に示す。*C. albicans* (U45776)、*C. maltosa* (U45745)、*C. tropicalis* (U45749)、*D. hansenii* (U45808)、*L. elongisporus* (U45763)、*Meyerozyma guilliermondii* (U45709)、*Scheffersomyces stipitis* (U45741)、*S. pombe* (U40085)、*S. bombicola* (U45705)、*Y. lipolytica* (U40080)。(B) *n*-アルカン資化性酵母における CYP52 ファミリーの P450 のアミノ酸配列を ClustalW (DDBJ, v2.1)で解析し、Njplot で分子系統樹を描画した。*Y. lipolytica* の CYP51 を外群として利用した。スケールバーは 0.05 substitutions per site、ブートストラップ値は 1000 試行により得られた値を示す。使用した各配列の UniprotKB における Accession number を次に示す。CYP52A21 (Q59K96)、CYP52A22 (Q5AAH7)、CYP52A23 (Q5AAH6)、CYP52A24 (Q5A8M1)、CYP52C3 (Q5AGW4)、CYP52A3 (P1649)、CYP52A5 (Q12581)、CYP52A4 (P16141)、CYP52A9 (Q12586)、CYP52A10 (Q12588)、CYP52A11 (Q12589)、CYP52C2 (Q12587)、CYP52D1 (Q12585)、CYP52A1 (P10615)、CYP52A2 (P30607)、CYP52A6 (P30608)、CYP52A7 (P30609)、CYP52A8 (P30610)、CYP52B1 (P30611)、CYP52C1 (P30612)、CYP52D2 (Q874J0)、CYP52A43 (Q6BVP2)、CYP52A44 (Q6BVH7)、CYP52A45 (Q6BNW0)、CYP52A46 (Q6BNV9)、CYP52A47 (Q6BNV8)、CYP52A48 (A5E5R8)、CYP52A49 (A5E1L9)、CYP52A50 (A5E1L8)、CYP52A51 (A5E122)、CYP52A52 (A5DRQ8)、CYP52C7 (A5H2Q3)、CYP52A39 (A5DD87)、CYP52A40 (A5DRF4)、CYP52A41 (A5DL54)、CYP52A42 (A5DQW9)、CYP52A53 (A3LRT5)、CYP52A54 (A3LR60)、CYP52A55 (A3LS01)、CYP52A56 (A3LZV9)、CYP52A57 (A3LSP0)、CYP52E3 (B8QHP3)、CYP52M1 (B8QHP1)、CYP52N1 (B8QHP5)。*Y. lipolytica* の Alk タンパク質群の Accession number は Figure 1-0 に示した。括弧内にそれぞれの酵母種を示しており、使用した略称を次に示す。*C. albicans* (Ca)、*C. maltosa* (Cm)、*C. tropicalis* (Ct)、*D. hansenii* (Dh)、*L. elongisporus* (Le)、*M. guilliermondii* (Mg)、*S. stipitis* (Ss)、*S. bombicola* (Sb)。灰色の領域は CYP52F ファミリーを示し、**A** と **F** はそれぞれ *n*-アルカンを酸化する P450、脂肪酸の  $\omega$  末端を酸化する P450 を示す。

Table 1-1

各 *ALK* 遺伝子破壊株の *n*-アールカンを単一の炭素源とした場合の生育

Strain	Glc	C10	C11	C12	C13	C14	C15	C16
WT	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
<i>Δalk1</i>	+++	-(±)	+	+	+	+	+	+++
<i>Δalk1Δalk2</i>	+++	-	-	-	-	-	-(±)	-(±)
<i>Δalk1Δalk2Δalk4</i>	+++	-	-	-	-	-	-(±)	-(±)
<i>Δalk1Δalk2Δalk4Δalk6</i>	+++	-	-	-	-	-	-	-
<i>Δalk1Δalk2Δalk4Δalk6Δalk11</i>	+++	-	-	-	-	-	-	-
<i>Δalk1Δalk2Δalk4Δalk6Δalk9Δalk11</i>	+++	-	-	-	-	-	-	-
<i>Δalk1Δalk2Δalk3Δalk4Δalk6Δalk9Δalk11</i>	+++	-	-	-	-	-	-	-
<i>Δalk1Δalk2Δalk3Δalk4Δalk6Δalk9Δalk11Δalk12</i>	+++	-	-	-	-	-	-	-
<i>Δalk1Δalk2Δalk3Δalk4Δalk5Δalk6Δalk9Δalk11Δalk12</i>	+++	-	-	-	-	-	-	-
<i>Δalk1Δalk2Δalk3Δalk4Δalk5Δalk6Δalk7Δalk9Δalk11Δalk12</i>	+++	-	-	-	-	-	-	-
<i>Δalk1Δalk2Δalk3Δalk4Δalk5Δalk6Δalk7Δalk8Δalk9Δalk11Δalk12</i>	+++	-	-	-	-	-	-	-
<i>Δalk1-12</i>	+++	-	-	-	-	-	-	-
<i>Δalk1-12 ALK1</i>	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++

各破壊株を *n*-アールカンを単一の炭素源として 7 日間培養した場合の生育を示す。野生型株 (WT) と同程度の生育を ‘+++’ で表す。括弧内の結果は *n*-アールカンを単一の炭素源として 21 日間培養した結果である。

Table 1-2

各 *ALK* 遺伝子破壊株のグルコースおよび *n*-アールカンを炭素源とした場合の生育

Strain	Glc	Glc+C10	Glc+C12	Glc+C14	Glc+C16
WT	+++	+++	+++	+++	+++
<i>Alk1</i>	+++	-(+)	+++	+++	+++
<i>Δalk1Δalk2</i>	+++	-	+++	+++	+++
<i>Δalk1Δalk2Δalk4</i>	+++	-	+++	+++	+++
<i>Δalk1Δalk2Δalk4Δalk6</i>	+++	-	+++	+++	+++
<i>Δalk1Δalk2Δalk4Δalk6Δalk11</i>	+++	-	+++	+++	+++
<i>Δalk1Δalk2Δalk4Δalk6Δalk9Δalk11</i>	+++	-	+++	+++	+++
<i>Δalk1Δalk2Δalk3Δalk4Δalk6Δalk9Δalk11</i>	+++	-	+++	+++	+++
<i>Δalk1Δalk2Δalk3Δalk4Δalk6Δalk9Δalk11Δalk12</i>	+++	-	+++	+++	+++
<i>Δalk1Δalk2Δalk3Δalk4Δalk5Δalk6Δalk9Δalk11Δalk12</i>	+++	-	+++	+++	+++
<i>Δalk1Δalk2Δalk3Δalk4Δalk5Δalk6Δalk7Δalk9Δalk11Δalk12</i>	+++	-	+++	+++	+++
<i>Δalk1Δalk2Δalk3Δalk4Δalk5Δalk6Δalk7Δalk8Δalk9Δalk11Δalk12</i>	+++	-	+++	+++	+++
<i>Δalk1-12</i>	+++	-	+++	+++	+++
<i>Δalk1-12 ALK1</i>	+++	+++	+++	+++	+++

各破壊株をグルコースおよび *n*-アールカンを炭素源として3日間培養した場合の生育を示す。野生型株 (WT) と同程度の生育を‘+++’で表す。括弧内の結果はグルコースおよび *n*-アールカンを炭素源として9日間培養した結果である。

**Table 1-3**

4xARR1 プロモーター下で各 *ALK* 遺伝子を発現する  $\Delta alk1-12$  株の様々な鎖長の *n*-アルカンにおける生育

Strain	Glc	C10	C11	C12	C13	C14	C15	C16	C17	C18
WT	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
$\Delta alk1-12$	+++	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>ALK1</i>	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
<i>ALK2</i>	+++	±	±	±	+	±	++	+++	+++	+++
<i>ALK3</i>	+++	+++	+++	++	++	+++	+++	+++	+++	+++
<i>ALK4</i>	+++	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>ALK5</i>	+++	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>ALK6</i>	+++	+	+	++	++	+++	+++	+++	+++	+++
<i>ALK7</i>	+++	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>ALK8</i>	+++	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>ALK9</i>	+++	±	+	±	±	+	+	++	++	++
<i>ALK10</i>	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	++	++
<i>ALK11</i>	+++	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>ALK12</i>	+++	-	-	-	-	-	-	-	-	-

pSUT5 (vector)を導入した CXAU1 株 (WT)、vector を導入した $\Delta alk1-12$  株 ( $\Delta alk1-12$ )、または 4xARR1 プロモーターの下流に各 *ALK* 遺伝子を持つプラスミドを導入した $\Delta alk1-12$  株 (*ALK1*–*ALK12*)を *n*-アルカンを単一の炭素源として 15 日間培養した。野生型株と同程度の生育を‘+++’で表す。

**Table 1-4**

**4xARR1 プロモーター下で各 Alk1p 変異体または Alk5p 変異体を発現する  $\Delta alk1-12$  株の様々な鎖長の  $n$ -アルカンにおける生育**

Strain	C10	C11	C12	C13	C14	C15	C16	C17	C18
WT vector	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
$\Delta alk1-12$ vector	-	-	-	-	-	-	-	-	-
$\Delta alk1-12$ pS4RALK1	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
$\Delta alk1-12$ pS4RALK1 <sup>S53K</sup>	-	-	-	-	-	-	+	++	+++
$\Delta alk1-12$ pS4RALK1 <sup>I56R</sup>	-	-	-	-	-	-	-	-	-
$\Delta alk1-12$ pS4RALK1 <sup>S53K/I56R</sup>	-	-	-	-	-	-	-	-	++
$\Delta alk1-12$ pS4RALK1 <sup>Y83R</sup>	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
$\Delta alk1-12$ pS4RALK1 <sup>C85Y</sup>	-	-	-	-	+	+	++	+	++
$\Delta alk1-12$ pS4RALK1 <sup>T88H</sup>	+	+	+	++	++	++	++	+++	+++
$\Delta alk1-12$ pS4RALK5	-	-	-	-	-	-	-	-	-
$\Delta alk1-12$ pS4RALK5 <sup>K50S</sup>	-	-	-	-	-	-	-	-	-
$\Delta alk1-12$ pS4RALK5 <sup>R53I</sup>	-	-	-	-	-	-	-	-	-
$\Delta alk1-12$ pS4RALK5 <sup>K50S/R53I</sup>	-	-	-	-	-	-	-	-	-
$\Delta alk1-12$ pS4RALK5 <sup>R77Y</sup>	-	-	-	-	-	-	-	-	-
$\Delta alk1-12$ pS4RALK5 <sup>Y79C</sup>	-	-	-	-	-	-	-	-	-
$\Delta alk1-12$ pS4RALK5 <sup>H82T</sup>	-	-	-	-	-	-	-	-	-

pSUT5 (vector)を導入した CXAU1 株 (WT vector)、vector を導入した  $\Delta alk1-12$  株 ( $\Delta alk1-12$  vector)、または 4xARR1 プロモーターの下流で Alk1<sup>S53K</sup>p、Alk1<sup>I56R</sup>p、Alk1<sup>S53K/I56R</sup>p、Alk5<sup>K50S</sup>p、Alk5<sup>R53I</sup>p、Alk5<sup>K50S/R53I</sup>p、Alk1<sup>Y83R</sup>p、Alk1<sup>C85Y</sup>p、Alk1<sup>T88H</sup>p、Alk5<sup>R77Y</sup>p、Alk5<sup>Y79C</sup>p または Alk5<sup>H82T</sup>p を発現するプラスミドを導入した  $\Delta alk1-12$  株 (それぞれ  $\Delta alk1-12$  pS4RALK1<sup>S53K</sup>、 $\Delta alk1-12$  pS4RALK1<sup>I56R</sup>、 $\Delta alk1-12$  pS4RALK1<sup>S53K/I56R</sup>、 $\Delta alk1-12$  pS4RALK5<sup>K50S</sup>、 $\Delta alk1-12$  pS4RALK5<sup>R53I</sup>、 $\Delta alk1-12$  pS4RALK5<sup>K50S/R53I</sup>、 $\Delta alk1-12$  pS4RALK1<sup>Y83R</sup>、 $\Delta alk1-12$  pS4RALK1<sup>C85Y</sup>、 $\Delta alk1-12$  pS4RALK1<sup>T88H</sup>、 $\Delta alk1-12$  pS4RALK5<sup>R77Y</sup>、 $\Delta alk1-12$  pS4RALK5<sup>Y79C</sup>、 $\Delta alk1-12$  pS4RALK5<sup>H82T</sup>) を  $n$ -アルカンを単一の炭素源として 5 日間培養した。野生型株と同程度の生育を‘+++’で表す。



## 第2章 長鎖アルコール酸化に関わる酵素の同定と機能解析

### 2-1 緒言

これまで、*C. maltosa*、*S. bombicola*、*C. parapsilosis*、*C. rugosa*、*C. tropicalis*、*D. hansenii*、*D. polymorphus* などの多くの *n*-アルカン資化性酵母において、膜画分から長鎖アルコール酸化酵素 (fatty alcohol oxidase; FAOD) 活性が見出されてきた[84]。このうち、*C. tropicalis* では、ATCC20336 株から *FAO1* と *FAO2* が、NCYC470 株から *FAOT* が長鎖アルコール酸化酵素をコードする遺伝子として単離されている[85, 86]。また、序章で述べたとおり、*n*-アルカン資化性酵母 *C. maltosa* の P450 である CYP52A3 については *S. cerevisiae* 内で発現させて解析が行われ、長鎖アルコールを酸化する活性を持つことが示唆されていた[28]。

*Y. lipolytica* においては、長鎖アルコールの酸化に関わる因子が明らかにされていなかった。*C. maltosa* と同様に Alk タンパク質群がアルコールの酸化を担う可能性が考えられたが、第1章において、 $\Delta alk1-12$  株は 1-ドデカノールを単一の炭素源として生育できた。そのため、*Y. lipolytica* において長鎖アルコールの酸化には Alk タンパク質群は必須ではなく、長鎖アルコールを酸化する酵素が別に存在すると考えられた。本章では、これらの遺伝子のうち長鎖アルコールの資化に実際に関与する遺伝子を特定した。

### 2-2 実験方法と材料

#### 2-2-1 菌体、遺伝子、培地

<菌株>

*Yarrowia lipolytica*

CXAU1 株	第1章に記載
CXAU/A1 株	<i>MATA ade1::ADE1 ura3</i> , CXAU1 株由来[58]
$\Delta alk1-12$ 株	第1章に記載
$\Delta adh1$ 株	<i>MATA ade1 ura3 \Delta adh1</i> , CXAU1 株由来 (本論文)
$\Delta adh1-2$ 株	<i>MATA ade1 ura3 \Delta adh1 \Delta adh2</i> , $\Delta adh1$ 株由来 (本論文)
$\Delta adh1,3$ 株	<i>MATA ade1 ura3 \Delta adh1 \Delta adh3</i> , $\Delta adh1$ 株由来 (本論文)
$\Delta adh1-3$ 株	<i>MATA ade1 ura3 \Delta adh1 \Delta adh2 \Delta adh3</i> , $\Delta adh1-2$ 株由来 (本論文)
$\Delta adh1-4$ 株	<i>MATA ade1 ura3 \Delta adh1 \Delta adh2 \Delta adh3 \Delta adh4</i> , $\Delta adh1-3$ 株由来 (本論文)
$\Delta adh1-4\Delta fadh$ 株	<i>MATA ade1 ura3 \Delta adh1 \Delta adh2 \Delta adh3 \Delta adh4 \Delta fadh</i> , $\Delta adh1-4$ 株由来 (本論文)
$\Delta adh1-4,6\Delta fadh$ 株	<i>MATA ade1 ura3 \Delta adh1 \Delta adh2 \Delta adh3 \Delta adh4 \Delta adh6 \Delta fadh</i> ,

	<i>Δadh1-4Δfadh</i> 株由来 (本論文)
<i>Δadh1-6Δfadh</i> 株	MATA <i>ade1 ura3 Δadh1 Δadh2 Δadh3 Δadh4 Δadh5::ADE1 Δadh6 Δfadh</i> , <i>Δadh1-4,6Δfadh</i> 株由来 (本論文)
ALCY01 株	MATA <i>ade1 ura3 Δadh1 Δadh2 Δadh3 Δadh4 Δadh5::ADE1 Δadh6 Δadh7 Δfadh</i> , <i>Δadh1-6Δfadh</i> 株由来 (本論文)
ALCY02 株	MATA <i>ade1 ura3 Δadh1 Δadh2 Δadh3 Δadh4 Δadh5::ADE1 Δadh6 Δadh7 Δfadh Δfao1</i> , ALCY01 株由来 (本論文)
ALCY03 株	MATA <i>ade1 ura3 Δadh1 Δadh3 Δfao1::ADE1</i> , <i>Δadh1,3</i> 株由来 (本論文)
<i>Δalk1-12Δadh1</i> 株	MATA <i>ade1 ura3 Δalk1 Δalk2 Δalk3 Δalk4 Δalk5 Δalk6 Δalk7 Δalk8 Δalk9 Δalk10 Δalk11 Δalk12 Δadh1 Δadh2</i> , <i>Δalk1-12</i> 株由来 (本論文)
<i>Δalk1-12Δadh1-2</i> 株	MATA <i>ade1 ura3 Δalk1 Δalk2 Δalk3 Δalk4 Δalk5 Δalk6 Δalk7 Δalk8 Δalk9 Δalk10 Δalk11 Δalk12 Δadh1 Δadh2</i> , <i>Δalk1-12Δadh1</i> 株由来 (本論文)
<i>Δalk1-12Δadh1-3</i> 株	MATA <i>ade1 ura3 Δalk1 Δalk2 Δalk3 Δalk4 Δalk5 Δalk6 Δalk7 Δalk8 Δalk9 Δalk10 Δalk11 Δalk12 Δadh1 Δadh2 Δadh3</i> , <i>Δalk1-12Δadh1-2</i> 株由来 (本論文)
<i>Δalk1-12Δadh1-4</i> 株	MATA <i>ade1 ura3 Δalk1 Δalk2 Δalk3 Δalk4 Δalk5 Δalk6 Δalk7 Δalk8 Δalk9 Δalk10 Δalk11 Δalk12 Δadh1 Δadh2 Δadh3 Δadh4</i> , <i>Δalk1-12Δadh1-3</i> 株由来 (本論文)
<i>Δalk1-12Δadh1-4Δfadh</i> 株	MATA <i>ade1 ura3 Δalk1 Δalk2 Δalk3 Δalk4 Δalk5 Δalk6 Δalk7 Δalk8 Δalk9 Δalk10 Δalk11 Δalk12 Δadh1 Δadh2 Δadh3 Δadh4 Δfadh</i> , <i>Δalk1-12Δadh1-4</i> 株由来 (本論文)
<i>Δalk1-12Δadh1-4,6Δfadh</i> 株	MATA <i>ade1 ura3 Δalk1 Δalk2 Δalk3 Δalk4 Δalk5 Δalk6 Δalk7 Δalk8 Δalk9 Δalk10 Δalk11 Δalk12 Δadh1 Δadh2 Δadh3 Δadh4 Δadh6 Δfadh</i> , <i>Δalk1-12Δadh1-4Δfadh</i> 株由来 (本論文)
<i>Δalk1-12Δadh1-6Δfadh</i> 株	MATA <i>ade1 ura3 Δalk1 Δalk2 Δalk3 Δalk4 Δalk5 Δalk6 Δalk7 Δalk8 Δalk9 Δalk10 Δalk11 Δalk12 Δadh1 Δadh2 Δadh3 Δadh4 Δadh5::ADE1 Δadh6 Δfadh</i> , <i>Δalk1-12Δadh1-4,6Δfadh</i> 株由来 (本論文)
ALCY12 株	MATA <i>ade1 ura3 Δalk1 Δalk2 Δalk3 Δalk4 Δalk5 Δalk6 Δalk7 Δalk8 Δalk9 Δalk10 Δalk11 Δalk12 Δadh1 Δadh2 Δadh3 Δadh4 Δadh5::ADE1 Δadh6 Δadh7 Δfadh</i> , <i>Δalk1-12Δadh1-6Δfadh</i> 株由来 (本論文)
REA1 株	MATA <i>ade1::ADE1 ura3 sec61::SEC61-DsRed</i> , CXAU1 株由来

[63]

POC 株 *MATA ade1 ura3 pot1::POT1-mCherry-ADE1*, CXAU1 株由来  
(本論文)

SEMC 株 *MATA ade1 ura3 sec63::SEC63-mCherry-ADE1*, CXAU1 株由来  
(本論文)

*Escherichia coli*

JM109 株 第 1 章に記載

<遺伝子>

本章で解析した遺伝子の一覧

遺伝子名	Systematic name
<i>ADH1</i>	<i>YALI0D25630g</i>
<i>ADH2</i>	<i>YALI0E17787g</i>
<i>ADH3</i>	<i>YALI0A16379g</i>
<i>ADH4</i>	<i>YALI0E15818g</i>
<i>ADH5</i>	<i>YALI0D02167g</i>
<i>ADH6</i>	<i>YALI0A15147g</i>
<i>ADH7</i>	<i>YALI0E07766g</i>
<i>FADH</i>	<i>YALI0F09603g</i>
<i>FAO1</i>	<i>YALI0B14014g</i>

*ALK1 – ALK12* は第 1 章に記載

<培地>

酵母用完全培地

YPD 培地 第 1 章に記載

酵母用最少培地

YNB 培地 第 1 章に記載

SG 培地 第 1 章に記載

SD 培地 第 1 章に記載

1-ドデカノール培地 第 1 章に記載

ドデカノール培地 第 1 章に記載

ドデカン酸培地 第 1 章に記載

1-テトラデカノール培地

1-テトラデカノール	0.1%
Yeast nitrogen base w/o amino acids and ammonium sulfate (Difco)	0.17%
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0.5%
Triton X-100	0.5%
1-ヘキサデカノール培地	
1-ヘキサデカノール	0.1%
Yeast nitrogen base w/o amino acids and ammonium sulfate (Difco)	0.17%
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0.5%
Triton X-100	0.5%
テトラデカノール培地	
テトラデカノール	0.1%
Yeast nitrogen base w/o amino acids and ammonium sulfate (Difco)	0.17%
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0.5%
Triton X-100	0.5%
テトラデカン酸培地	
テトラデカン酸	0.1%
Yeast nitrogen base w/o amino acids and ammonium sulfate (Difco)	0.17%
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0.5%
Triton X-100	0.5%
グルコース/1-ドデカノール培地	
D(+)-グルコース	2.0%
1-ドデカノール	0.1%
Yeast nitrogen base w/o amino acids and ammonium sulfate (Difco)	0.17%
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0.5%
Triton X-100	0.5%
グルコース/1-テトラデカノール培地	

D(+)-グルコース	2.0%
1-テトラデカノール	0.1%
Yeast nitrogen base w/o amino acids and ammonium sulfate (Difco)	0.17%
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0.5%
Triton X-100	0.5%

寒天培地には寒天 (Wako Pure Chemical Industries, Ltd.)を終濃度 2%となるように加えた。また、1-ドデカノール、1-テトラデカノール、1-ヘキサデカノール、テトラデカノール、テトラデカン酸を含む培地に関しては、5% TritonX-100、1% 1-ドデカノール（または1-テトラデカノール、1-ヘキサデカノール、テトラデカノール、テトラデカン酸）を小型アナログ超音波ホモジナイザー Sonifier 250A (BRANSON)で乳化処理し、培地に10倍希釈で添加して作製した。

#### 酵母用最少培地（固体培地で *n*-アルカンを与える場合）

*n*-アルカン培地                      第1章に記載

#### 酵母用ウラシル要求性選抜培地

##### YPD+5-FOA 培地

Bacto Yeast Extract (Difco)	1.0%
Bacto Peptone (Difco)	2.0%
D(+)-グルコース	2.0%
5-フルオロオロチン (5-fluoroorotic acid; 5-FOA)	1 mg/ml

##### SG+5-FOA 培地

グリセロール	2.0%
Yeast nitrogen base w/o amino acids and ammonium sulfate (Difco)	0.17%
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0.5%
5-FOA	0.5 mg/ml

寒天培地には寒天 (Wako Pure Chemical Industries, Ltd.)を終濃度 2.0%となるように加えた。

#### 大腸菌用完全培地

L-broth 培地                              第1章に記載

## 2-2-2 培養条件

1-2-2 に従った。

## 2-2-3 プラスミド

以下のプラスミドを使用した。

pSAT4	<i>ORI1068/CEN1, ADE1, pUC19-ori-ΔlacZa, XPR2 terminator, Amp<sup>r</sup></i> [68]
pSUT5	第 1 章に記載
pSUT5lacZ	第 1 章に記載
pBluescript II SK (+)	第 1 章に記載
pBURA3	NcoI により pSUT5 から URA3 を含む断片を切り出し、末端を平滑化した後、pBluescript II SK (+)の EcoRV サイトに挿入したプラスミド[69]。
pBS-EGFP	5'側に StuI サイトを付加した <i>EGFP</i> ORF 断片を pBluescript II SK (+)の EcoRV-EcoRI サイトに挿入したプラスミド (小林哲, 未発表)。
pmCherry-N1	(Clontech)

以下のプラスミドを作製し、使用した。

pBUADH1PT	<i>ADH1</i> の上流約 1.0 kbp および下流約 0.8 kbp の領域を pBURA3 の BamHI-XbaI サイトに挿入したプラスミド。pop-in/pop-out 法による <i>ADH1</i> の破壊に使用した。
pBUADH2PT	<i>ADH2</i> の上流約 1.1 kbp および下流約 1.0 kbp の領域を pBURA3 の BamHI-XbaI サイトに挿入したプラスミド。pop-in/pop-out 法による <i>ADH2</i> の破壊に使用した。
pBUADH3PT	<i>ADH3</i> の上流約 1.1 kbp および下流約 1.1 kbp の領域を pBURA3 の BamHI-XbaI サイトに挿入したプラスミド。pop-in/pop-out 法による <i>ADH3</i> の破壊に使用した。
pBUADH4PT	<i>ADH4</i> の上流約 1.3 kbp および下流約 0.9 kbp の領域を pBURA3 の BamHI-XbaI サイトに挿入したプラスミド。pop-in/pop-out 法による <i>ADH4</i> の破壊に使用した。
pBUADH6PT	<i>ADH6</i> の上流約 1.0 kbp および下流約 1.0 kbp の領域を pBURA3 の EcoRI-XbaI サイトに挿入したプラスミド。pop-in/pop-out 法による <i>ADH6</i> の破壊に使用した。
pBUADH7PT	<i>ADH7</i> の上流約 1.1 kbp および下流約 1.0 kbp の領域を pBURA3 の EcoRI-BamHI サイトに挿入したプラスミド。pop-in/pop-out

	法による <i>ADH7</i> の破壊に使用した。
pBUFADHPT	<i>FADH</i> の上流約 1.1 kbp および下流約 1.0 kbp の領域を pBURA3 の EcoRI-BamHI サイトに挿入したプラスミド。pop-in/pop-out 法による <i>FADH</i> の破壊に使用した。
pBUFAO1PT	<i>FAO1</i> の上流約 1.0 kbp および下流約 0.8 kbp の領域を pBURA3 の EcoRI-NotI サイトに挿入したプラスミド。pop-in/pop-out 法による <i>FAO1</i> の破壊に使用した。
pBADH5PT-ADE1	<i>ADH5</i> の上流約 1.0 kbp および <i>ADH5</i> ORF の 3'側と下流を含む約 0.8 kbp の領域の間に pSAT4 から切り出した <i>ADE1</i> 配列を挿入した断片を pBlueScript II SK (+)の KpnI-XbaI サイトに挿入したプラスミド。 <i>ADH5</i> の破壊に使用した。
pBFAO1PT-ADE1	<i>FAO1</i> の上流約 0.7 kbp および下流約 0.7 kbp の領域の間に pSAT4 から切り出した <i>ADE1</i> 配列を挿入した断片を pBlueScript II SK (+)の KpnI-XbaI サイトに挿入したプラスミド。 <i>FAO1</i> の破壊に使用した。
pBPOT1-mCherry-ADE1	3'末端に mCherry の ORF を付加した <i>POT1</i> を染色体上に組み込むカセットとして使用したプラスミド。POC 株の作製に使用した。
pBSEC63-mCherry-ADE1	3'末端に mCherry の ORF を付加した <i>SEC63</i> を染色体上に組み込むカセットとして使用したプラスミド。SEMC 株の作製に使用した。
pSADH1	<i>ADH1</i> の上流約 0.9 kbp および下流約 0.5 kbp を含む ORF 断片を pSUT5 の BamHI-ApaI サイトに挿入したプラスミド。
pSADH2	<i>ADH2</i> の上流約 1.1 kbp および下流約 0.5 kbp を含む ORF 断片を pSUT5 の BamHI-ApaI サイトに挿入したプラスミド。
pSADH3	<i>ADH3</i> の上流約 1.0 kbp および下流約 0.5 kbp を含む ORF 断片を pSUT5 の BamHI-ApaI サイトに挿入したプラスミド。
pSADH4	<i>ADH4</i> の上流約 1.0 kbp および下流約 0.5 kbp を含む ORF 断片を pSUT5 の EcoRI-ApaI サイトに挿入したプラスミド。
pSADH5	<i>ADH5</i> の上流約 1.1 kbp および下流約 0.5 kbp を含む ORF 断片を pSUT5 の BamHI-ApaI サイトに挿入したプラスミド。
pSADH6	<i>ADH6</i> の上流約 1.1 kbp および下流約 0.5 kbp を含む ORF 断片を pSUT5 の EcoRI-ApaI サイトに挿入したプラスミド。
pSADH7	<i>ADH7</i> の上流約 1.0 kbp および下流約 0.5 kbp を含む ORF 断片を pSUT5 の HindIII-ApaI サイトに挿入したプラスミド。
pSFADH	<i>FADH</i> の上流約 1.1 kbp および下流約 0.5 kbp を含む ORF 断片

pSFAO1	を pSUT5 の EcoRI-KpnI サイトに挿入したプラスミド。 FAO1 の上流約 1.0 kbp および下流約 0.5 kbp を含む ORF 断片を pSUT5 の BamHI-ApaI サイトに挿入したプラスミド。
pSEGFP-ADH1	Adh1p の N 末端に EGFP を付加した EGFP-Adh1p を発現させるプラスミド。
pSEGFP-ADH3	Adh3p の N 末端に EGFP を付加した EGFP-Adh3p を発現させるプラスミド。
pSEGFP-FAO1	Fao1p の N 末端に EGFP を付加した EGFP-Fao1p を発現させるプラスミド。
pADH1p-lacZ	ADH1 の上流 720 bp の配列をクローニングし、pSUT5lacZ の XbaI-StuI サイトに挿入したプラスミド。
pADH2p-lacZ	ADH2 の上流 720 bp の配列をクローニングし、pSUT5lacZ の XbaI-StuI サイトに挿入したプラスミド。
pADH3p-lacZ	ADH3 の上流 720 bp の配列をクローニングし、pSUT5lacZ の XbaI-StuI サイトに挿入したプラスミド。
pADH6p-lacZ	ADH6 の上流 720 bp の配列をクローニングし、pSUT5lacZ の XbaI-StuI サイトに挿入したプラスミド。
pFAO1p-lacZ	FAO1 の上流 722 bp の配列をクローニングし、pSUT5lacZ の XbaI-StuI サイトに挿入したプラスミド。

## 2-2-4 プラスミドの構築

### 2-2-4-1 pBUADH1PT

CXAU1 株の全 DNA を鋳型として、プライマー ADH1P-F と ADH1P-R を用いて *ADH1* の上流約 1.0 kbp の領域を KOD -Plus- Neo による PCR 法で増幅した後、BamHI と StuI で切断した。同様にプライマー ADH1T-F と ADH1T-R を用いて *ADH1* の下流約 0.8 kbp の領域を増幅した後、StuI と XbaI で切断した。これらの DNA 断片を pBURA3 の BamHI-XbaI サイトに挿入し、pBUADH1PT を得た。このプラスミドを BspT104I で直鎖状にした後、形質転換に用いた。

本項で使用したプライマーの配列 (下線部は制限酵素サイトを示す)

ADH1P-F	5'-AAGGAT <u>CCG</u> GACACCGACATTCTTCGTGCTTTCAC-3'
ADH1P-R	5'-CCAGG <u>CC</u> TGAGATGGTAGTTGGTAGTAGTTTGG-3'
ADH1T-F	5'-GGAGG <u>CC</u> TAGTACCAGGATTGAAGGCCATGAGG-3'
ADH1T-R	5'-CCTCTAGAGCCTGGTTGTTTACTATGGCAAGGA-3'

### 2-2-4-2 pBUADH2PT

CXAUI 株の全 DNA を鋳型として、プライマー-ADH2P-F と ADH2P-R を用いて *ADH2* の上流約 1.1 kbp の領域を KOD -Plus- Neo による PCR 法で増幅した後、BamHI と StuI で切断した。同様にプライマー-ADH2T-F と ADH2T-R を用いて *ADH2* の下流約 1.0 kbp の領域を増幅した後、StuI と XbaI で切断した。これらの DNA 断片を pBURA3 の BamHI-XbaI サイトに挿入し、pBUADH2PT を得た。このプラスミドを BspT104I で直鎖状にした後、形質転換に用いた。

本項で使用するプライマーの配列 (下線部は制限酵素サイトを示す)

ADH2P-F	5'-AAG <u>GATCCC</u> AGGTACCGGAAAATCTCAAACCTA-3'
ADH2P-R	5'-GGAGGCCTGGTGGTGGTGGTGGTGGTAGTAGTTG-3'
ADH2T-F	5'-CCAGGCCTGGCGACAAGTATTTATAATGAGATA-3'
ADH2T-R	5'-GGTCTAGAAATGGGCCTGTCTTGAGTTCTTTGGA-3'

#### 2-2-4-3 pBUADH3PT

CXAUI 株の全 DNA を鋳型として、プライマー-ADH3P-F と ADH3P-R を用いて *ADH3* の上流約 1.1 kbp の領域を KOD -Plus- Neo による PCR 法で増幅した後、BamHI と StuI で切断した。同様にプライマー-ADH3T-F と ADH3T-R を用いて *ADH3* の下流約 1.1 kbp の領域を増幅した後、StuI と XbaI で切断した。これらの DNA 断片を pBURA3 の BamHI-XbaI サイトに挿入し、pBUADH3PT を得た。このプラスミドを NheI で直鎖状にした後、形質転換に用いた。

本項で使用するプライマーの配列 (下線部は制限酵素サイトを示す)

ADH3P-F	5'-AAG <u>GATCC</u> ACACCATCATCATAAATATGCACCA-3'
ADH3P-R	5'-TTAGGCCTGTGGTTGTGGTGGTGGTGAAGAGAT-3'
ADH3T-F	5'-TTAGGCCTACGACTTTTTGGCCGTCTAGTTTAT-3'
ADH3T-R	5'-GGTCTAGAACTCCTTCATGTCTGCTACTTCAGG-3'

#### 2-2-4-4 pBUADH4PT

CXAUI 株の全 DNA を鋳型として、プライマー-ADH4P-F と ADH4P-R を用いて *ADH4* の上流約 1.3 kbp の領域を KOD -Plus- Neo による PCR 法で増幅した後、BamHI と StuI で切断した。同様にプライマー-ADH4T-F と ADH4T-R を用いて *ADH4* の下流約 0.9 kbp の領域を増幅した後、StuI と XbaI で切断した。これらの DNA 断片を pBURA3 の BamHI-XbaI サイトに挿入し、pBUADH4PT を得た。このプラスミドを HpaI で直鎖状にした後、形質転換に用いた。

本項で使用するプライマーの配列 (下線部は制限酵素サイトを示す)

ADH4P-F	5'-AAGGATCCGTCATACCTGTATCTGCCAAAAGA-3'
ADH4P-R	5'-CCAGGCCTTGTGATGTTGTCGTGGTCTCTTTTG-3'
ADH4T-F	5'-GGAGGCCTCGCGACTCAGGCATGCATTTATTGA-3'
ADH4T-R	5'-CCTCTAGACTCCCAACCCAGAGAACATCAGATAA-3'

#### 2-2-4-5 pBUADH6PT

CXAU1 株の全 DNA を鋳型として、プライマー ADH6P-F と ADH6P-R を用いて *ADH6* の上流約 1.0 kbp の領域を KOD -Plus- Neo による PCR 法で増幅した後、EcoRI と BamHI で切断した。同様にプライマー ADH6T-F と ADH6T-R を用いて *ADH6* の下流約 1.0 kbp の領域を増幅した後、BamHI と XbaI で切断した。これらの DNA 断片を pBURA3 の EcoRI-XbaI サイトに挿入し、pBUADH6PT を得た。このプラスミドを EcoT22I で直鎖状にした後、形質転換に用いた。

本項で使用したプライマーの配列 (下線部は制限酵素サイトを示す)

ADH6P-F	5'-TTGAATTCCTCTCGTATCTTCTGAGCACCCT-3'
ADH6P-R	5'-TTGGATCCGGTGTAGAAGTAGGGATTGGAAGTG-3'
ADH6T-F	5'-TTGGATCCGACATCGAGTTTGGTACAATGTGAA-3'
ADH6T-R	5'-GGTCTAGACAGAGAGACAAGGGCTGAAAAGAAG-3'

#### 2-2-4-6 pBUADH7PT

CXAU1 株の全 DNA を鋳型として、プライマー ADH7P-F と ADH7P-R を用いて *ADH7* の上流約 1.1 kbp の領域を KOD -Plus- Neo による PCR 法で増幅した後、EcoRI と BamHI で切断した。同様にプライマー ADH7T-F と ADH7T-R を用いて *ADH7* の下流約 1.0 kbp の領域を増幅した後、BamHI と XbaI で切断した。これらの DNA 断片を pBURA3 の EcoRI-XbaI サイトに挿入し、pBUADH7PT を得た。このプラスミドを BspT104I で直鎖状にした後、形質転換に用いた。

本項で使用したプライマーの配列 (下線部は制限酵素サイトを示す)

ADH7P-F	5'-CCGAATTCCTCGGATATTAAGGAGAGGGGTAAG-3'
ADH7P-R	5'-TTGGATCCCTGTGATGTTATTGATGTGAATGTGT-3'
ADH7T-F	5'-TTGGATCCCACGTCGAGGTCATGCATTGGTAAC-3'
ADH7T-R	5'-GGTCTAGATTGTCGTCCGATTGATTTGTTTGGG-3'

#### 2-2-4-7 pBUFADHPT

CXAU1 株の全 DNA を鋳型として、プライマー FADHP-F と FADHP-R を用いて *FADH* の上流約 1.1 kbp の領域を KOD -Plus- Neo による PCR 法で増幅した後、EcoRI と EcoT22I

で切断した。同様にプライマーFADHT-F と FADHT-R を用いて *FADH* の下流約 1.0 kbp の領域を増幅した後、EcoT22I と BamHI で切断した。これらの DNA 断片を pBURA3 の EcoRI-BamHI サイトに挿入し、pBUFADHPT を得た。このプラスミドを SnaBI で直鎖状にした後、形質転換に用いた。

本項で使用したプライマーの配列 (下線部は制限酵素サイトを示す)

FADHP-F	5'-CCGAATTC <u>ACTCTCGTC</u> ATTACGAACAAGCAC-3'
FADHP-R	5'-CCATGCATGTATGATATACCCAGAGAATCGTGC-3'
FADHT-F	5'-GGATGCATACATGGCACCATAGTTCCTGTTCG-3'
FADHT-R	5'-AAGGATCCGGCAATGTCAGCGAGGAGACCATT-3'

#### 2-2-4-8 pBUFAO1PT

CXAU1 株の全 DNA を鋳型として、プライマーFAO1P-F と FAO1P-R を用いて *FAO1* の上流約 1.0 kbp の領域を KOD -Plus- Neo による PCR 法で増幅した後、BamHI と XbaI で切断した。同様にプライマーFAO1T-F と FAO1T-R を用いて *FAO1* の下流約 0.8 kbp の領域を増幅した後、XbaI と NotI で切断した。これらの DNA 断片を pBURA3 の BamHI-NotI サイトに挿入し、pBUFAO1PT を得た。このプラスミドを StuI で直鎖状にした後、形質転換に用いた。

本項で使用したプライマーの配列 (下線部は制限酵素サイトを示す)

FAO1P-F	5'-TTGGATCCGACTTATCCTCCCGACGATCTTAG-3'
FAO1P-R	5'-AATCTAGATCAAGCTAATGCAAAGCGTGTACAG-3'
FAO1T-F	5'-AATCTAGAAAGTTTAGAAATAGAAGTAATGCTAA-3'
FAO1T-R	5'-TTGCGGCCGCAACTAAGGAGATTGACCAAGGAGGA-3'

#### 2-2-4-9 pBADH5PT-ADE1

CXAU1 株の全 DNA を鋳型として、プライマーADH5P-F と ADH5P-R を用いて *ADH5* の上流約 1.0 kbp の領域を KOD -Plus- Neo による PCR 法で増幅した後、KpnI と BamHI で切断した。同様にプライマーADH5T-F と ADH5T-R を用いて *ADH5* の下流約 0.8 kbp の領域を増幅した後、BamHI と XbaI で切断した。これらの DNA 断片を pBluescript II SK (+) の KpnI-XbaI サイトに挿入し、pBADH5PT を得た。pSAT4 を BamHI で切断し、得られた *ADE1* 配列を pBADH5PT の BamHI サイトに挿入し、pBADH5PT-ADE1 を得た。このプラスミドを ScaI と XbaI で切断し、*ADE1* を含む DNA 断片を回収して、*ADH5* の破壊カセットとして用いた。

本項で使用したプライマーの配列 (下線部は制限酵素サイトを示す)

---

ADH5P-F	5'-TTGGT <u>ACCGTGGAAACAGCGTCAAAAGTGGTCA</u> -3'
ADH5P-R	5'-TTGGATCCTGTAGTCATTTTGAATGGGGTGTGT-3'
ADH5T-F	5'-TTGGAT <u>CCCCAATGGTCCTAGAGGACAAAAAT</u> -3'
ADH5T-R	5'-GAAAGCCGACGGT <u>CTAGACCTCGGAGACGC</u> -3'

---

#### 2-2-4-10 pBFAO1PT-ADE1

CXAU1 株の全 DNA を鋳型として、プライマー dcFAO1P-F と dcFAO1P-R を用いて *FAO1* の上流約 0.7 kbp の領域を KOD -Plus- Neo による PCR 法で増幅した後、ApaI と BamHI で切断した。同様にプライマー dcFAO1T-F と dcFAO1T-R を用いて *FAO1* の下流約 0.7 kbp の領域を増幅した後、BamHI と XbaI で切断した。これらの DNA 断片を pBluescript II SK (+) の ApaI-XbaI サイトに挿入し、pBFAO1PT を得た。pSAT4 を BamHI で切断し、得られた *ADE1* 配列を pBFAO1PT の BamHI サイトに挿入し、pBAFAO1PT-ADE1 を得た。このプラスミドを ApaI と XbaI で切断し、*ADE1* を含む DNA 断片を回収して、*FAO1* の破壊カセットとして用いた。

本項で使用したプライマーの配列 (下線部は制限酵素サイトを示す)

---

dcFAO1P-F	5'-TTGGG <u>CCCTAACCACATGCTACATATTGGTC</u> -3'
dcFAO1P-R	5'-TTGGATCCTCAAGCTAATGCAAAGCGTGTA-3'
dcFAO1T-F	5'-TTGGATCCAGTTT <u>AGAAATAGAAGTAATGCT</u> -3'
dcFAO1T-R	5'-AATCTAGACGTTTCTCGTTGGGTGTATAGG-3'

---

#### 2-2-4-11 pBPOT1-mCherry-ADE1

CXAU1 株の全 DNA を鋳型として、プライマー EcoRI-POT1-F と POT1-R-EcoT22I を用いて *POT1* ORF の 3' 側の一部約 0.7 kbp の領域を KOD -Plus- Neo による PCR 法で増幅した後、EcoRI と EcoT22I で切断した。pmCherry-N1 を鋳型として、プライマー EcoT22I-mCherry-F と mCherry-R-NotI を用いて *mCherry* ORF 領域約 0.7 kbp を増幅した後、EcoT22I と NotI で切断した。pSUT5 を鋳型として、プライマー NotI-XPR2T-F と XPR2T-R-BamHI を用いて *XPR2* のターミネーター領域約 0.2 kbp を増幅した後、NotI と BamHI で切断した。CXAU1 株の全 DNA を鋳型として、プライマー BamHI-POT1T-F と POT1T-R-XbaI を用いて *POT1* ターミネーター領域約 0.6 kbp を増幅した後、BamHI と XbaI で切断した。これらの 4 つの DNA 断片を pBluescript II SK (+) の EcoRI-XbaI サイトに挿入し、pBPOT1-mCherry を得た。塩基配列を読み、挿入した DNA 断片に誤りがないことを確認した。pSAT4 を BamHI で切断し、得られた *ADE1* 配列を pBPOT1-mCherry の BamHI サイトに挿入し、pBPOT1-mCherry-ADE1 を得た。このプラスミドを EcoRV と XbaI で切断し、*ADE1* を含む DNA 断片を回収して、POC 株作製の

ためのカセットとして用いた。

本項で使用したプライマーの配列 (下線部は制限酵素サイトを示す)

---

EcoRI-POT1-F	5'-TTGAATTCGTTGCCGCAAGTACAACGTGTC-3'
POT1-R-EcoT22I	5'-TTATGCATCTCGGCAACAACCAGAGAA-3'
BamHI-POT1T-F	5'-TTGGATCCCCGCTGATATGCCTAAG-3'
POT1T-R-XbaI	5'-TTTCTAGACCCCAGCTCTTCTTCAACTCCTC-3'
EcoT22I-mCherry-F	5'-TTATGCATATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGGAT-3'
mCherry-R-NotI	5'-TTGCGGCCGCTACTTGTACAGCTCGTCCATGC-3'
NotI-XPR2T-F	5'-TTGCGGCCGCCAATTAACAGATAGTTTGCCGGT-3'
XPR2T-R-BamHI	5'-TTGGATCCTATGGAAAATAAGAAATACGACA-3'

---

#### 2-2-4-12 pBSEC63-mCherry-ADE1

CXAU1 株の全 DNA を鋳型として、プライマー EcoRI-SEC63-F と SEC63-R-EcoT22I を用いて *SEC63* の ORF の 3' 側の一部約 0.7 kbp の領域を KOD -Plus- Neo による PCR 法で増幅した後、EcoRI と EcoT22I で切断した。制限酵素 BamHI による切断を防ぐために、SEC63-R-EcoT22I は *SEC63* の 1932 番目から 1938 番目の核酸配列に該当する GGATCC を GGACCC に変更している。pBPOT1-mCherry-ADE1 を EcoT22I と BamHI で切断し、mCherry の ORF と *XPR2* ターミネーターを含む領域を得た。CXAU1 株の全 DNA を鋳型として、プライマー BamHI-SEC63T-F と SEC63T-R-XbaI を用いて *SEC63* ターミネーター領域約 0.7 kbp を増幅した後、BamHI と XbaI で切断した。これらの 3 つの DNA 断片を pBluescript II SK (+) の EcoRI-XbaI サイトに挿入し、pBSEC63-mCherry を得た。塩基配列を読み、挿入した DNA 断片に誤りが無いことを確認した。pSAT4 を BamHI で切断し、得られた *ADE1* 配列を pBSEC63-mCherry の BamHI サイトに挿入し、pBPOT1-mCherry-ADE1 を得た。このプラスミドを EcoRV と XbaI で切断し、*ADE1* を含む DNA 断片を回収して、SEMC 株作製のためのカセットとして用いた。

本項で使用したプライマーの配列 (下線部は制限酵素サイトを示す)

---

EcoRI-SEC63-F	5'-TTGAATTCCTGTGCCCAAGATTGATATTGTG-3'
SEC63-R-EcoT22I	5'-TTATGCATCTTCTTCTTGGGGTCCTCAGCCTCG-3'
BamHI-SEC63T-F	5'-TTGGATCCTTAGAGGAGGAGAAGATGGTAAAA-3'
SEC63T-R-XbaI	5'-TTTCTAGAATCATTAACCTGGAGTTGTACACAC-3'

---

#### 2-2-4-13 pSADH1

CXAU1 株の全 DNA を鋳型として、プライマー ADH1P-F と ADH1T-R2 を用いて *ADH1* の ORF とその上流約 0.9 kbp と下流約 0.5 kbp を含む領域を KOD -Plus- Neo による PCR

法で増幅した後、BamHI と ApaI で切断した。この DNA 断片を pSUT5 の BamHI-ApaI サイトに挿入し、pSADH1 を得た。塩基配列を読み、挿入した DNA 断片に誤りがないことを確認した。

本項で使用したプライマーの配列 (下線部は制限酵素サイトを示す)

---

ADH1P-F	5'-AAGGAT <u>CCGACACCGAC</u> ATTCTTCGTGCTTTCAC-3'
ADH1T-R2	5'-TTGGG <u>CCCCGAGTAGTGAG</u> TTGTTTCCAGCAT-3'

---

#### 2-2-4-14 pSADH2

CXAU1 株の全 DNA を鋳型として、プライマー ADH2P-F と ADH2T-R2 を用いて *ADH2* の ORF とその上流約 1.1 kbp と下流約 0.5 kbp を含む領域を KOD-Plus-Neo による PCR 法で増幅した後、BamHI と ApaI で切断した。この DNA 断片を pSUT5 の BamHI-ApaI サイトに挿入し、pSADH2 を得た。塩基配列を読み、挿入した DNA 断片に誤りがないことを確認した。

本項で使用したプライマーの配列 (下線部は制限酵素サイトを示す)

---

ADH2P-F	5'-AAGGAT <u>CCCAGGTACCGGAAAATCTCAAACCTA</u> -3'
ADH2T-R2	5'-TTGGG <u>CCCCTCTTCCTCAGGTCTCTGATACCG</u> -3'

---

#### 2-2-4-15 pSADH3

CXAU1 株の全 DNA を鋳型として、プライマー ADH3P-F と ADH3T-R2 を用いて *ADH3* の ORF とその上流約 1.0 kbp と下流約 0.5 kbp を含む領域を KOD-Plus-Neo による PCR 法で増幅した後、BamHI と ApaI で切断した。この DNA 断片を pSUT5 の BamHI-ApaI サイトに挿入し、pSADH3 を得た。塩基配列を読み、挿入した DNA 断片に誤りがないことを確認した。

本項で使用したプライマーの配列 (下線部は制限酵素サイトを示す)

---

ADH3P-F	5'-AAGGAT <u>CCACACCATCATCATAAATATGCACCA</u> -3'
ADH3T-R2	5'-TTGGG <u>CCCAGCTCCTTTGGAGTGAAGAAACATT</u> -3'

---

#### 2-2-4-16 pSADH4

CXAU1 株の全 DNA を鋳型として、プライマー ADH4P-F2 と ADH4T-R2 を用いて *ADH4* の ORF とその上流約 1.0 kbp と下流約 0.5 kbp を含む領域を KOD-Plus-Neo による PCR 法で増幅した後、EcoRI と ApaI で切断した。この DNA 断片を pSUT5 の EcoRI-ApaI サイトに挿入し、pSADH4 を得た。塩基配列を読み、挿入した DNA 断片に誤りがないことを確認した。

本項で使用したプライマーの配列 (下線部は制限酵素サイトを示す)

---

ADH4P-F2	5'-TTGA <u>ATTCT</u> TCACTCCGAATTTGCTGTTTG-3'
ADH4T-R2	5'-TTGGG <u>CCC</u> CAGACTGTGATCTGGAACCGATTATT-3'

---

#### 2-2-4-17 pSADH5

CXAU1 株の全 DNA を鋳型として、プライマー ADH5P-F2 と ADH5T-R2 を用いて *ADH5* の ORF とその上流約 1.1 kbp と下流約 0.5 kbp を含む領域を KOD-Plus-Neo による PCR 法で増幅した後、BamHI と ApaI で切断した。この DNA 断片を pSUT5 の BamHI-ApaI サイトに挿入し、pSADH5 を得た。塩基配列を読み、挿入した DNA 断片に誤りがないことを確認した。

本項で使用したプライマーの配列 (下線部は制限酵素サイトを示す)

---

ADH5P-F2	5'-TTGGAT <u>CCC</u> CGGTCCATCTGGAGGCTTACATAAT-3'
ADH5T-R2	5'-TTGGG <u>CCCT</u> AGTCGTATCAGTAGATGACAATTT-3'

---

#### 2-2-4-18 pSADH6

CXAU1 株の全 DNA を鋳型として、プライマー ADH6P-F と ADH6T-R2 を用いて *ADH6* の ORF とその上流約 1.1 kbp と下流約 0.5 kbp を含む領域を KOD-Plus-Neo による PCR 法で増幅した後、EcoRI と ApaI で切断した。この DNA 断片を pSUT5 の EcoRI-ApaI サイトに挿入し、pSADH6 を得た。塩基配列を読み、挿入した DNA 断片に誤りがないことを確認した。

本項で使用したプライマーの配列 (下線部は制限酵素サイトを示す)

---

ADH6P-F	5'-TTGA <u>ATTC</u> CCTCTCGTATCTTCTGAGCACCCT-3'
ADH6T-R2	5'-TTGGG <u>CCCA</u> ACAAAATCTGCTGAAAACCATGAG-3'

---

#### 2-2-4-19 pSADH7

CXAU1 株の全 DNA を鋳型として、プライマー ADH7P-F2 と ADH7T-R2 を用いて *ADH7* の ORF とその上流約 1.0 kbp と下流約 0.5 kbp を含む領域を KOD-Plus-Neo による PCR 法で増幅した後、HindIII と ApaI で切断した。この DNA 断片を pSUT5 の HindIII-ApaI サイトに挿入し、pSADH7 を得た。塩基配列を読み、挿入した DNA 断片に誤りがないことを確認した。

本項で使用したプライマーの配列 (下線部は制限酵素サイトを示す)

---

ADH7P-F2	5'-TTA <u>AGCT</u> TTTTTCGGATATTAAAGGAGAGGGGT-3'
----------	--

---

ADH7T-R2

5'-TTGGGCCCCCTAGAGCGAAGATCTGCCTCAGATG-3'

---

#### 2-2-4-20 pSFADH

CXAU1 株の全 DNA を鋳型として、プライマー-FADHP-F2 と FADHT-R2 を用い *FADH* の ORF とその上流約 1.1 kbp と下流約 0.5 kbp を含む領域を KOD-Plus-Neo による PCR 法で増幅した後、HindIII と ApaI で切断した。この DNA 断片を pSUT5 の HindIII-ApaI サイトに挿入し、pSFADH を得た。塩基配列を読み、挿入した DNA 断片に誤りがないことを確認した。

本項で使用したプライマーの配列 (下線部は制限酵素サイトを示す)

---

FADHP-F                    5'-CCGAATTCACTCTCGTCATTACGAACAAGCAC-3'

FADHT-R2                  5'-TTGGTACCTGTAAACACTCATAAATA-3'

---

#### 2-2-4-21 pSFAO1

CXAU1 株の全 DNA を鋳型として、プライマー-FAO1P-F2 と FAO1T-R2 を用いて *FAO1* の ORF とその上流約 1.0 kbp と下流約 0.5 kbp を含む領域を KOD-Plus-Neo による PCR 法で増幅した後、BamHI と ApaI で切断した。この DNA 断片を pSUT5 の BamHI-ApaI サイトに挿入し、pSFAO1 を得た。塩基配列を読み、挿入した DNA 断片に誤りがないことを確認した。

本項で使用したプライマーの配列 (下線部は制限酵素サイトを示す)

---

FAO1P-F2                   5'-AATCTAGAGACTTATCCTCCCGACGATCTTA-3'

FAO1T-R2                  5'-TTGGGCCCCTAACAATCTTGTGTTAGTTCCTT-3'

---

#### 2-2-4-22 pSEGFP-ADH1

CXAU1 株の全 DNA を鋳型として、プライマー-ADH1P-F2 と ADH1P-R2 を用いて *ADH1* の上流約 1.0 kbp の領域を KOD-Plus-Neo による PCR 法で増幅した後、XbaI と BamHI で切断した。同様にプライマー-ADH1-F と ADH1T-R2 を用いて *ADH1* の ORF と下流約 0.5 kbp の領域を増幅した後、BamHI と ApaI で切断した。これらの DNA 断片を pSUT5 の XbaI-ApaI サイトに挿入し、pSADH1pROt を得た。塩基配列を読み、挿入した DNA 断片に誤りがないことを確認した。pBS-EGFP を StuI と BamHI で切断し、得られた *EGFP* の ORF を含む断片を pSADH1pROt の NruI-BamHI サイトに挿入し、pSEGFP-ADH1 を得た。

本項で使用したプライマーの配列 (下線部は制限酵素サイトを示す)

---

ADH1P-F2                   5'-AATCTAGACGACAAGCATAATCAAATACGAGCG-3'

---

ADH1P-R2	5'-AAGGATCCTCGCGACATGGTGAAGAGATGGTAGTTGG TA-3'
ADH1-F	5'-AAGGATCCATGACCACCATCCCCAAGACCCAGA-3'
ADH1T-R2	5'-TTGGGCCCGAGTAGTGAGTTGTTTCCAGCAT-3'

---

#### 2-2-4-23 pSEGFP-ADH3

CXAU1 株の全 DNA を鋳型として、プライマーADH3P-F2 と ADH3P-R2 を用いて *ADH3* の上流約 1.0 kbp の領域を KOD -Plus- Neo による PCR 法で増幅した後、XbaI と BamHI で切断した。同様にプライマーADH3-F と ADH3T-R2 を用いて *ADH3* の ORF と下流約 0.5 kbp の領域を増幅した後、BamHI と ApaI で切断した。これらの DNA 断片を pSUT5 の XbaI-ApaI サイトに挿入し、pSADH3pROt を得た。塩基配列を読み、挿入した DNA 断片に誤りがないことを確認した。pBS-EGFP を StuI と BamHI で切断し、得られた *EGFP* の ORF を含む断片を pSADH3pROt の NruI-BamHI サイトに挿入し、pSEGFP-ADH3 を得た。

本項で使用したプライマーの配列 (下線部は制限酵素サイトを示す)

ADH3P-F2	5'-AAT <u>C</u> TAGAGTACTGGTACAGTAACAAAAAACTT-3'
ADH3P-R2	5'-AAGGATCCTCGCGACATTGTTGTGGTGGTGGTTGTGG TG-3'
ADH3-F	5'-TTGGATCCATGACCACCATCCCCAAGACCCAGA-3'
ADH3T-R2	5'-TTGGGCCCGAGCTCCTTTGGAGTGAAGAAACATT-3'

---

#### 2-2-4-24 pSEGFP-FAO1

CXAU1 株の全 DNA を鋳型として、プライマーFAO1P-F3 と FAO1P-R2 を用いて *FAO1* の上流約 0.8 kbp の領域を KOD -Plus- Neo による PCR 法で増幅した後、SacII と XbaI で切断した。同様にプライマーFAO1-F と FAO1T-R2 を用いて *FAO1* の ORF と下流約 0.5 kbp の領域を増幅した後、XbaI と ApaI で切断した。これらの DNA 断片を pSUT5 の SacII-ApaI サイトに挿入し、pSFAO1pROt を得た。塩基配列を読み、挿入した DNA 断片に誤りがないことを確認した。pBS-EGFP を StuI と XbaI で切断し、得られた *EGFP* の ORF を含む断片を pSFAO1pROt の NruI-XbaI サイトに挿入し、pSEGFP-FAO1 を得た。

本項で使用したプライマーの配列 (下線部は制限酵素サイトを示す)

FAO1P-F3	5'-TT <u>C</u> CGCGGCTGCAGGTACAACATTAGCGTCT-3'
FAO1P-R2	5'-AAT <u>C</u> TAGAAAAT <u>C</u> CGCGACATTGTCAAGTAATCAAGCT AATGC-3'
FAO1-F	5'-AAT <u>C</u> TAGAAATGTCTGACGACAAGCACACTTT-3'

## 2-2-4-25 pADH1p-lacZ

CXAU1 株の全 DNA を鋳型として、プライマーADH1P-F3 と ADH1P-R3 を用いて、*ADH1* のプロモーター領域 720 bp を KOD -Plus- Neo による PCR 法で増幅した後、XbaI と StuI で切断した。この DNA 断片を pSUT5lacZ の XbaI-StuI サイトに挿入し、pADH1p-lacZ を得た。塩基配列を読み、挿入した DNA 断片の配列に誤りがないことを確認した。

本項で使用したプライマーの配列 (下線部は制限酵素サイトを示す)

ADH1P-F3                    5'-AATCTAGATGTAGCCTGTATATTTATCAATG-3'

ADH1P-R3                    5'-TTAGGCCTCATGGTGAAGAGATGGTAGTTGGTA-3'

## 2-2-4-26 pADH2p-lacZ

CXAU1 株の全 DNA を鋳型として、プライマーADH2P-F2 と ADH2P-R2 を用いて、*ADH2* のプロモーター領域 720 bp を KOD -Plus- Neo による PCR 法で増幅した後、XbaI と StuI で切断した。この DNA 断片を pSUT5lacZ の XbaI-StuI サイトに挿入し、pADH2p-lacZ を得た。塩基配列を読み、挿入した DNA 断片の配列に誤りがないことを確認した。

本項で使用したプライマーの配列 (下線部は制限酵素サイトを示す)

ADH2P-F2                    5'-AATCTAGAAAAGGCAAGGTTGGCGCTAACAAGTCG-3'

ADH2P-R2                    5'-TTAGGCCTCATTGTGATGAGTGGTGG-3'

## 2-2-4-27 pADH3p-lacZ

CXAU1 株の全 DNA を鋳型として、プライマーADH3P-F3 と ADH3P-R3 を用いて、*ADH3* のプロモーター領域 720 bp を KOD -Plus- Neo による PCR 法で増幅した後、XbaI と StuI で切断した。この DNA 断片を pSUT5lacZ の XbaI-StuI サイトに挿入し、pADH3p-lacZ を得た。塩基配列を読み、挿入した DNA 断片の配列に誤りがないことを確認した。

本項で使用したプライマーの配列 (下線部は制限酵素サイトを示す)

ADH3P-F3                    5'-AATCTAGATTTTTCACTGCATCCCTCCTGTAG-3'

ADH3P-R3                    5'-TTAGGCCTCATTGTTGTGGTGGTGGTTG-3'

## 2-2-4-28 pADH6p-lacZ

CXAU1 株の全 DNA を鋳型として、プライマー-ADH6P-F2 と ADH6P-R2 を用いて、*ADH6* のプロモーター領域 720 bp を KOD -Plus- Neo による PCR 法で増幅した後、*Xba*I と *Stu*I で切断した。この DNA 断片を pSUT5lacZ の *Xba*I-*Stu*I サイトに挿入し、pADH6p-lacZ を得た。塩基配列を読み、挿入した DNA 断片の配列に誤りがないことを確認した。

本項で使用したプライマーの配列 (下線部は制限酵素サイトを示す)

---

ADH6P-F2	5'-AAT <u>CTAGAGTAA</u> AGAATCGATAATCCGCAGCCT-3'
ADH6P-R2	5'-TTAG <u>GCCCTC</u> ATGTTTGATGCTGGTGTAGAAGTA-3'

---

#### 2-2-4-29 pFAO1p-lacZ

CXAU1 株の全 DNA を鋳型として、プライマー-FAO1P-F4 と FAO1P-R3 を用いて、*FAO1* のプロモーター領域 722 bp を KOD -Plus- Neo による PCR 法で増幅した後、*Xba*I と *Stu*I で切断した。この DNA 断片を pSUT5lacZ の *Xba*I-*Stu*I サイトに挿入し、pFAO1p-lacZ を得た。塩基配列を読み、挿入した DNA 断片の配列に誤りがないことを確認した。

本項で使用したプライマーの配列 (下線部は制限酵素サイトを示す)

---

FAO1P-F4	5'-AAT <u>CTAGACTAC</u> ATATTGGTCTATTA-3'
FAO1P-R3	5'-TTGATAT <u>CCATTG</u> TCAAGTAATCAAGCTAA-3'

---

#### 2-2-5 遺伝子操作

1-2-5 に従った。

#### 2-2-6 PCR

1-2-6 に従った。

#### 2-2-7 塩基配列の決定

1-2-7 に従った。

#### 2-2-8 *Y. lipolytica* の形質転換

1-2-8 に従った。

#### 2-2-9 Pop-in/pop-out 法による破壊株の作製

Pop-in/pop-out 法による遺伝子の破壊および挿入は Boeke らの方法に従った[87]。

## 操作

- 1) 制限酵素で直鎖状にした遺伝子の破壊あるいは挿入用のプラスミドを電気穿孔法により導入した。
- 2) 得られた Ura<sup>+</sup>の形質転換体を SG 培地にて 1 度純化した後、YPD 培地に塗布し、1 日培養した。
- 3) YPD+5-FOA 培地に塗布し、1 日後に生えてきた Ura<sup>-</sup>の形質転換体を SG+5-FOA 培地にて 2 度純化した。

得られた形質転換体について KOD-FX を用いたコロニーPCR およびサザン解析を行い、導入した配列が染色体上の正しい位置に組み込まれていることを確認した。

### 2-2-10 *Y. lipolytica* の全 DNA の調製

1-2-9 に従った。

### 2-2-11 サザンハイブリダイゼーション

メンブレンには Hybond-N<sup>+</sup> (GE Healthcare)を用い、使用法は添付の説明書に従った。プローブ DNA の標識、シグナルの検出には Gene Images AlkPhos Direct Labelling and Detection Sytems (GE Healthcare)を用い、使用法は添付の説明書に従った。

### 2-2-12 スポットアッセイによる酵母の植菌

SD 液体培地で対数増殖期まで培養した菌体を滅菌水で 2 回洗浄し、OD<sub>600</sub> = 0.5 または OD<sub>600</sub> = 1.25 に希釈した後、さらに 10 倍ずつ 3 段階に希釈した。計 4 段階の菌体懸濁液 5 μl (OD<sub>600</sub> = 0.5 の希釈系列の場合)または 2 μl (OD<sub>600</sub> = 1.25 の希釈系列の場合)をプレートに滴下した。

### 2-2-13 酵母の生菌率測定

酵母の生菌率の測定はフロキシシン B 染色法を用いた。

## 試薬

PBS	1-2-14 に記載
フロキシシン B 溶液	1 mM に調製し、PBS に 100 倍希釈で添加した。

## 操作

- 1) 適当な菌体培養液 1 ml を 1.5 ml エッペンチューブに移して 12,000 rpm、1 分で集菌し、PBS 1 ml で 1 回洗浄した。
- 2) 10 μM フロキシシン B を含む PBS 1 ml で菌体を懸濁した。
- 3) 30°C で 5 分間インキュベートした。

- 4) 12,000 rpm、1分で集菌し、PBS 1 ml で3回洗浄した。
- 5) 蛍光顕微鏡 (WIG)で観察し、明視野での細胞数とフロキシン B で染色された細胞 (死細胞) の数を計数した。

#### 2-2-14 細胞内の *n*-アルカン代謝産物解析

1-2-13 に従った。

#### 2-2-15 蛍光顕微鏡観察

蛍光顕微鏡は BX52 (Olympus)を使用し、画像解析には AQUACOSMOS (HAMAMA-TSU)を用いた。

#### 2-2-16 *Y. lipolytica* 細胞抽出液の調製

##### 試薬

##### 菌体破碎用緩衝液

トリス塩酸緩衝液 (pH 7.5)	50 mM
KCl	100 mM
グリセロール	10%(w/v)
DTT	1 mM
Protease inhibitor cocktail for use with fungal and yeast extracts, DMSO solution (Sigma-Aldrich Corporation)	1%(v/v)

##### 操作

- 1) 適当な培養液から回収した菌体を破碎チューブに集菌した。
- 2) 適量の菌体破碎用緩衝液および菌体と同体積のグラスビーズ (直径 0.5 mm、低アリアリ) を加えた後、マルチビーズショッカー (YASUI KIKAI)を用いて 2,700 rpm で1分間の運転の後、1分間の停止を3サイクル行い菌体破碎した。
- 3) 1000 xg、2 min、4°C の遠心分離によりグラスビーズと未破碎の菌体を分離した後、その上清をさらに 1,000 xg、10 min、4°C の遠心分離を2回行い、未破碎菌体を分離し、上清を細胞抽出液とした。

細胞抽出液のタンパク質濃度の定量には Protein Assay (Bio-Rad Laboratories)を用い、BSA をスタンダードとした。

#### 2-2-17 細胞抽出液の簡易分画

##### 試薬

菌体破碎用緩衝液 2-2-16 に記載

#### 操作

- 1) 2-2-15 で得た細胞抽出液を 10,000 xg、10 min、4°C の条件で遠心分離し、上清画分 (S10 画分) と沈殿画分を得た。
- 2) 沈殿画分を細胞抽出液と同体積の菌体破碎用緩衝液で懸濁した後、10,000 xg、10 min、4°C の条件で遠心分離し、沈殿画分を同体積の菌体破碎用緩衝液で懸濁して P10 画分とした。
- 3) S10 画分を 100,000 xg、1 h、4°C の条件で遠心分離し、上清画分 (S100 画分) と沈殿画分を得た。
- 4) 沈殿画分を細胞抽出液と同体積の菌体破碎用緩衝液で懸濁した後、100,000 xg、1 h、4°C の条件で遠心分離し、沈殿画分を同体積の菌体破碎用緩衝液で懸濁して P100 画分とした。

#### 2-2-18 SDS-PAGE

SDS-変性ポリアクリルアミドゲル (sodium dodecyl sulfate poly-acrylamide gel electrophoresis; SDS-PAGE) に関しては、Current Protocols in Molecular Biology に従った。

#### 2-2-19 ウェスタン解析

##### 試薬

##### TBS-T

トリス塩酸緩衝液 (pH 7.6)	20 mM
NaCl	137 mM
Tween-20	0.1%(v/v)

##### ブロッキングバッファー

Tris (pH8.3)	25 mM
グリシン	192 mM
メタノール	20%(v/v)
ドデシル硫酸ナトリウム (sodium dodecyl sulfate; SDS)	0.1%(w/v)

##### ブロッキングバッファー

Difco <sup>TM</sup> Skim Milk (Becton, Dickinson and Company)	0.5%(w/v) in TBS-T
--	--------------------

## 抗体

### 一次抗体

α-EGFP 抗体	Living Colors <sup>®</sup> A.v. Peptide Antibody (Clontech Laboratories, Inc.)
α-DsRed 抗体	Living Colors <sup>®</sup> DsRed Polyclonal Antibody (Clontech Laboratories, Inc.)

### 二次抗体

α-Mouse IgG 抗体	Anti-mouse IgG, HRP-linked Antibody (Cell Signaling Technology, Inc.)
α-Rabbit IgG 抗体	goat anti-rabbit IgG-HRP (Santa Cruz Biotechnology, Inc.)

抗体は 5000 倍希釈で使用した。

## 操作

- 1) ブロットニング装置 WSE-4020 HorizeBLOT 2M-R (ATTO CORPORATION)の陽極面から順にブロットニングバッファーに浸した濾紙 3 枚、ブロットニングバッファーに浸した BioTrace<sup>™</sup> NT Nitrocellulose Transfer Membrane (Pall Corporation) 1 枚、SDS-PAGE 後のポリアクリルアミドゲル、ブロットニングバッファーに浸した濾紙 3 枚を重ね、陰極面を重ねた。
- 2) ミnusラブゲル 1 枚あたり 225 mA 定電流、30 分間通電した。
- 3) 通電後、BioTrace<sup>™</sup> NT Nitrocellulose Transfer Membrane をブロッキングバッファーで 1 時間以上振盪した。
- 4) BioTrace<sup>™</sup> NT Nitrocellulose Transfer Membrane を TBS-T により 5 分間洗浄することを 4 回繰り返した。
- 5) BioTrace<sup>™</sup> NT Nitrocellulose Transfer Membrane を一次抗体を含む TBS-T で 1 時間以上浸した。
- 6) BioTrace<sup>™</sup> NT Nitrocellulose Transfer Membrane を TBS-T により 5 分間洗浄することを 4 回繰り返した。
- 7) BioTrace<sup>™</sup> NT Nitrocellulose Transfer Membrane を二次抗体を含む TBS-T で 1 時間浸した。
- 8) BioTrace<sup>™</sup> NT Nitrocellulose Transfer Membrane を TBS-T により 5 分間洗浄することを 4 回繰り返した。
- 9) Amersham<sup>™</sup> ECL<sup>™</sup> Prime Western Blotting Detection Reagent (GE Healthcare)を用い、添付の説明書に従ってシグナルの検出をした。

### 2-2-20 β-ガラクトシダーゼ活性測定

1-2-14 に従った。

## 2-3 結果

### 2-3-1 アルコールデヒドロゲナーゼ、長鎖アルコールオキシダーゼ遺伝子の全破壊株の生育

*Y. lipolytica* のゲノムから、アルコールの酸化に関わるアルコールデヒドロゲナーゼをコードする遺伝子として、*YALI0D25630g*、*YALI0E17787g*、*YALI0A16379g*、*YALI0E15818g*、*YALI0D02167g*、*YALI0A15147g*、*YALI0E07766g*、*YALI0F09603g* を見出した。それぞれ *S. cerevisiae* との類似性から、*ADH1*、*ADH2*、*ADH3*、*ADH4*、*ADH5*、*ADH6*、*ADH7*、*SFA1* と命名した。これらの遺伝子を全て破壊した ALCY01 株を作製し (Figure 2-1)、長鎖アルコールを単一の炭素源とした培地での生育を解析した。ALCY01 株は 1-ドデカノールまたは 1-ヘキサデカノールを単一の炭素源とした培地で顕著な生育遅延を示したが、1-テトラデカノールを単一の炭素源とした培地では僅かな生育遅延を示すのみであった (Figure 2-2)。一方、*Y. lipolytica* の網羅的転写解析で得られたデータを用いたクラスタリング解析 (第 4 章後述) を行ったところ、*n*-アルカン代謝で重要な役割を果たす *ALK1* と同様の発現パターンを示す遺伝子の中に、グルコース-メタノール-コリン酸化還元酵素ファミリータンパク質と類似性の高いタンパク質をコードする *YALI0B14014g* が見出された。この破壊株は 1-ドデカノール、1-テトラデカノール、または 1-ヘキサデカノールを単一の炭素源とした培地での生育遅延はほとんど示さなかった (Figure 2-2、 $\Delta fao1$  株)。本研究を遂行する中、*Y. lipolytica* において、アルコールデヒドロゲナーゼ遺伝子 *ADH1*、*ADH2*、*ADH3*、*ADH4*、*ADH5*、*ADH6*、*ADH7*、*FADH* (本研究で *SFA1* と命名した遺伝子)、および長鎖アルコール酸化酵素遺伝子 *FAO1* (*YALI0B14014g*) が  $\omega$ -ヒドロキシ脂肪酸の水酸基の酸化に関わることが示唆された[88]。そこで、これら計 9 つの遺伝子を全て破壊した ALCY02 株を作製した (Figure 2-1)。ALCY02 株は 1-ドデカノール、1-テトラデカノール、1-ヘキサデカノールを単一の炭素源とした培地全てで顕著な生育遅延を示した (Figure 2-2)。 $\Delta fao1$  株、ALCY01 株、ALCY02 株の *n*-アルカン、長鎖アルデヒド、脂肪酸における生育も調べた (Figure 2-2)。いずれの株もグルコースを単一の炭素源とした場合には野生型株と同様の生育を示した。ALCY01 株および ALCY02 株はともに、炭素鎖長 14-18 の *n*-アルカンで野生型株と同程度の生育を示したが、*n*-デカンや *n*-ドデカンにおいては生育の遅延を示した。これら 2 つの株はドデカノールやドデカン酸においても生育遅延を示した。これらの結果から、アルコールデヒドロゲナーゼや長鎖アルコールオキシダーゼが細胞外から取り込んだ長鎖アルコールの資化に関与すること、*n*-アルカン代謝で生じる長鎖アルコールの資化には主に他の酵素が関与していることが示された。なお、以降では、*YALI0F09603g* を *FADH* と呼ぶことにする。

### 2-3-2 ALCY02 株の長鎖アルコールに対する感受性

グルコースを炭素源とした場合と比較して、長鎖アルコールを炭素源とした場合に野

生型株の生育が悪化していたことから (Figure 2-2)、長鎖アルコールは細胞に対する毒性を持つことが予想された。そこで、アルコールデヒドロゲナーゼと長鎖アルコールオキシダーゼを全て破壊すると、長鎖アルコールに対する感受性が増加するかどうかを検討した。対数増殖期まで培養した野生型株と ALCY02 株を SD 液体培地または 2% *n*-ドデカン、1% 1-ドデカノール、0.1% 1-ドデカノールのいずれかを含む SD 液体培地にシフトした後、1時間または6時間培養し、フロキシシン B の排出を指標に培養後の細胞の生菌率を測定した (Figure 2-3A)。SD 液体培地または *n*-ドデカンを終濃度 2% で含む SD 液体培地では、野生型株と ALCY02 株の生菌率には有意差は見られなかった。それに対して、1-ドデカノールを含む SD 液体培地で1時間培養した場合、野生型株の生菌率は1-ドデカノールを終濃度 2% で添加した培地では 6%、1-ドデカノールを終濃度 0.1% で添加した培地では 72% であったのに対して、ALCY02 株の生菌率は1-ドデカノールを終濃度 2% で添加した培地では 3%、1-ドデカノールを終濃度 0.1% で添加した培地では 17% であり、ALCY02 株は野生型株よりも1-ドデカノールに対して高い感受性を示した。また、6時間培養した場合にも同様の傾向が見られた。さらに、0.1% 1-ドデカノールまたは 0.1% 1-テトラデカノールを含む SD 固体培地における生育を調べたところ、野生型株と比較して、ALCY02 株は顕著に生育の遅延を示した (Figure 2-3B)。これらの結果から、ALCY02 株は細胞外の長鎖アルコールに対する感受性が増加していることが示された。

### 2-3-3 ALCY02 株における *n*-アルカン代謝産物の解析

ALCY02 株が長鎖アルコール酸化に欠損を示すかどうかを調べることにした。しかしながら、ALCY02 株に対する長鎖アルコールの強力な毒性から、ALCY02 株に細胞外から長鎖アルコールを与えて細胞内代謝産物を解析することは困難であると考えられた (Figure 2-3)。そこで、大きな毒性を示さない *n*-ドデカンを含む培地で ALCY02 株を培養し、細胞内 *n*-アルカン代謝産物を解析することにした。野生型株と ALCY02 株を対数増殖期まで培養した後、*n*-ドデカンを終濃度 2% となるように加えてさらに 6 時間培養した。培養後の菌体を回収し、*n*-ドデカン代謝産物を抽出して、GC-MS で解析した (Figure 2-4)。野生型株においては、ドデカン酸と微量な 1-ドデカノールが検出された。それに対して、ALCY02 株においては、野生型株と比較して 1-ドデカノールの検出量が顕著に増加しており、ドデカン酸の検出量は低下した。1-ドデカノールおよびドデカン酸はこれらの株を SD 培地で培養した場合にはほとんど検出されなかった (Figure 2-4A)。これらの結果から、ALCY02 株は長鎖アルコールの酸化に欠損を示すことが示唆された。

### 2-3-4 細胞外の長鎖アルコールの資化に関わる遺伝子の特定

*ADH1*、*ADH2*、*ADH3*、*ADH4*、*ADH5*、*ADH6*、*ADH7*、*FADH* および *FAO1* の中で、どの遺伝子が細胞外長鎖アルコールの資化に関与するかを明らかにするために、

ALCY02 株に各遺伝子を 1 つずつプラスミドで戻した株を作製し、1-ドデカノール、1-テトラデカノール、1-ヘキサデカノールを単一の炭素源とした培地における生育を調べた (Figure 2-5A)。その結果、*ADH1*、*ADH3*、*FAO1* のいずれかを戻した場合に、これらの炭素源での生育が回復した。そこで、これら 3 つの遺伝子が *Y. lipolytica* において細胞外長鎖アルコールの資化に必須であることを確かめるために、*ADH1*、*ADH3*、*FAO1* の 3 つを破壊した ALCY03 株を作製した。ALCY03 株は *n*-デカン、1-ドデカノール、1-テトラデカノール、1-ヘキサデカノールを単一の炭素源とした培地で顕著な生育不全を示し、*n*-ドデカン、*n*-テトラデカン、ドデカノール単一の炭素源とした培地で僅かな生育遅延を示した (Figure 2-5B)。また、ALCY03 株は 1-ドデカノールまたは 1-テトラデカノールを含む SD 固体培地における生育が野生型株と比較して顕著に悪化していた (Figure 2-5B)。これらの表現型は ALCY02 株と同様であった (Figure 2-2, 2-3B)。これらの結果から、アルコールデヒドロゲナーゼ Adh1p および Adh3p と長鎖アルコールオキシダーゼ Fao1p が細胞外から取り込んだ長鎖アルコールの代謝に必須の役割をはたすことが示された。

### 2-3-5 Adh1p、Adh3p、Fao1p の細胞内局在解析

Adh1p、Adh3p および Fao1p の局在を解析するため、N 末端に EGFP を融合した Adh1p、Adh3p、Fao1p (EGFP-Adh1p、EGFP-Adh3p、EGFP-Fao1p) を発現するプラスミドを構築した。これらのプラスミドを ALCY03 株に導入したところ、1-テトラデカノールで no 生育欠損が回復したことから、これら融合タンパク質が機能することが確認された (data not shown)。EGFP-Adh1p、EGFP-Adh3p を発現するプラスミドは野生型株に、EGFP-Fao1p を発現するプラスミドを Sec61p-DsRed を ER マーカーとして発現する REA1 株、または Pot1p-mCherry をペルオキシソームマーカーとして発現する POC 株 (Figure 2-1K) に導入した。これらの株を SD 液体培地で対数増殖期まで培養し、蛍光顕微鏡観察した (Figure 2-6A-C)。その結果、EGFP-Adh1p と EGFP-Adh3p の蛍光シグナルは細胞質全体に拡散しており、Adh1p と Adh3p が細胞質に局在することが示唆された (Figure 2-6A, B)。一方、EGFP-Fao1p の蛍光シグナルはペルオキシソームマーカーである Pot1p-mCherry のシグナルと共局在し、Sec61p-DsRed のシグナルとは共局在しなかったことから、Fao1p はペルオキシソームに局在するタンパク質であることが示唆された (Figure 2-6C)。*n*-ドデカン存在下で培養した場合にも同様の結果が得られた (Figure 2-6)。

*n*-アルカン代謝経路において、*n*-アルカンは小胞体上で Alk タンパク質群により長鎖アルコールに変換されると考えられている。また、第 3 章で後述するように、長鎖アルデヒドは小胞体またはペルオキシソームにおいて脂肪酸に酸化される。Adh1p および Adh3p は細胞質に局在することが示唆されたが、これらが一過的に小胞体やペルオキシソームに局在して反応を行う可能性も考えられる。そこで、これらのタンパク質の局在について生化学的な解析を行った。EGFP-Adh1p または EGFP-Adh3p を発現するプラス

ミドを Sec63p-mCherry を ER マーカーとして発現する SEMC 株 (Figure 2-1J) に導入した。これらの株を SD 液体培地で対数増殖期まで培養し、回収した菌体から細胞抽出液 (WCE 画分) を調製し、簡易分画法により 10,000 xg 沈殿画分 (P10 画分)、100,000 xg 沈殿画分 (P100 画分)、100,000 xg 上清画分 (S100 画分) に分画した。それぞれの画分を抗 EGFP 抗体、抗 DsRed 抗体 (mCherry 検出用) を用いたウェスタン解析に供したところ、小胞体膜タンパク質である Sec63p-mCherry が主に P10 画分と P100 画分から検出されたのに対して、EGFP-Adh1p および EGFP-Adh3p は全ての画分から検出された (Figure 2-6D)。EGFP-Adh3p について、WCE 画分および S100 画分では分解産物と思われるバンドが多数見られたが、P10 画分および P100 画分では完全長と予想されるバンドが主に検出された。これらの結果から、Adh1p および Adh3p は細胞質だけでなく、膜にも局在することが示唆された。

### 2-3-6 *ADH1*、*ADH3*、*FAO1* のプロモーター活性の解析

細胞外の長鎖アルコール酸化に関与する *ADH1*、*ADH3*、*FAO1* の発現レベルを調べるために、それぞれのプロモーター配列の下流に *lacZ* を連結したプラスミドを作製した。これらのプラスミドを野生型株または ALCY02 株に導入した。それぞれの株を SD 液体培地で対数増殖期まで培養した後、グルコース、*n*-ドデカンまたは *n*-ヘキサデカンを含む YNB 液体培地にシフトしてさらに 3 時間培養した。回収した菌体から細胞抽出液を調製し、 $\beta$ -ガラクトシダーゼ活性を測定した (Figure 2-7A)。野生型株においては、グルコース存在下と比較して *n*-アルカン存在下で、*ADH1*、*ADH3*、*FAO1* のプロモーター活性が増加することが示され、これらの遺伝子の転写が *n*-アルカンに応答して活性化することが示唆された。ALCY02 株においては、*n*-アルカンにより *ADH1* プロモーター活性が野生型株ほど上昇しなかった。

*Y. lipolytica* において、Adh1p、Adh2p、Adh3p、Adh6p はアミノ酸の類似性が極めて高いが (Figure 2-9)、ALCY02 株において *ADH2* や *ADH6* を発現させても、長鎖アルコールを単一の炭素源とした培地での生育欠損は回復しない (Figure 2-5A)。*ADH2* や *ADH6* の発現レベルを調べるため、 $\beta$ -ガラクトシダーゼ活性測定を用いてそれぞれのプロモーター活性を測定した。その結果、*n*-ドデカンに応答した *ADH2* や *ADH6* のプロモーター活性はそれぞれ *ADH3* や *ADH1* のプロモーター活性と同様に上昇していた (Figure 2-7B)。これらの結果から、Adh2p と Adh6p が細胞内でそれぞれ Adh3p と Adh1p と同様のレベルで生産されていることが示唆された。

### 2-3-7 Alk タンパク質群の長鎖アルコール酸化への関与

第 1 章で述べたように、*C. maltosa* では CYP52A3 が長鎖アルコールの酸化に関与することが示唆されている [28]。*Y. lipolytica* においても、Alk タンパク質群が長鎖アルコールの酸化に関与するかどうかを調べるために、12 種の *ALK* 遺伝子群と *ADH1* - *ADH7* と

*FADH* および *FAOI* の全てを破壊した ALCY12 株を作製した。長鎖アルコールの強力な毒性のため (Figure 2-3)、ALCY02 株、ALCY12 株および  $\Delta alk1-12$  株に細胞外から長鎖アルコールを与えて細胞内の代謝産物を解析することは難しいと考えられたことから、これらの株の長鎖アルコールに対する感受性を調べた (Figure 2-8)。ALCY02 株は 0.1% 1-ドデカノールを用いた場合にも非常に低い生存率を示したため、さらに低濃度の 1-ドデカノールで検討する必要があるがあった。1-ドデカノールを可溶化するため、Triton X-100 を終濃度 0.1% で培地に添加した。おそらくは Triton X-100 自体にも毒性があるためか、1-ドデカノールを含まない条件においても野生型株、 $\Delta alk1-12$  株、ALCY02 株、ALCY12 株の生菌率は低下した。また、5 mM 1-ドデカノールの存在下では、これらの株の生菌率は大きく低下した。一方、0.05 mM 1-ドデカノール存在下では、野生型株と比較して  $\Delta alk1-12$  株は有意 (有意水準 5%) に低い生菌率を示した。0.05 mM 1-ドデカノールの存在下では、ALCY12 株は ALCY02 株と比較して、有意水準 5% の有意差は見られなかったものの低い生菌率を示した ( $P=0.051$ )。これらの結果から、Alk タンパク質群が長鎖アルコールの解毒、酸化に関与する可能性が示唆された。

## 2-4 考察

本章の研究から、アルコールデヒドロゲナーゼ *Adh1p* および *Adh3p* と長鎖アルコールオキシダーゼ *Fao1p* が細胞外の長鎖アルコールの資化に必須であることが明らかとなった。

### 2-4-1 長鎖アルコール資化におけるアルコールデヒドロゲナーゼの機能

本研究により、8つのアルコールデヒドロゲナーゼのうち、*Adh1p* と *Adh3p* が細胞外の長鎖アルコール資化に関与することが明らかになった。*Adh2p* と *Adh6p* はそれぞれ *Adh1p* と *Adh3p* との配列類似性が非常に高く (Figure 2-9)、また *ADH2* と *ADH6* はそれぞれ *ADH3* と *ADH1* と同程度に発現していることが示唆されたが (Figure 2-7B)、ALCY02 株で *Adh2p* や *Adh6p* を生産させても長鎖アルコールを単一の炭素源とした培地での生育は支持されなかった (Figure 2-5A)。このことは、*Adh2p* と *Adh6p* の基質特異性が *Adh1p* と *Adh3p* とは異なっていることを示唆している。実際に、*Y. lipolytica* の *Adh2p* は第1級アルコールよりも第2級アルコールに対して特異性を持つことが報告されている [89]。*S. cerevisiae* において、*Adh1p* と *Adh2p* はともに 348 アミノ酸からなり、そのうち 24 残基しか違いがないが、エタノールに対するミカエリス定数  $K_M$  値は *Adh1p* では 17,000 - 20,000  $\mu\text{M}$  であるのに対して、*Adh2p* では 600 - 800  $\mu\text{M}$  であり、大きな違いが見られる [90, 91]。*S. cerevisiae* では、*Adh1p* は炭素鎖 2~10 の第1級アルコールに対する酸化活性を示すが、主な役割はアセトアルデヒドのエタノールへの変換であると考えられている一方で [91]、*Adh2p* はエタノールからアセトアルデヒドへの変換を触媒す

ると考えられている[92]。 *Y. lipolytica* においては、Adh2p や Adh6p は長鎖アルデヒドから長鎖アルコールへの変換を担っている可能性も考えられる。

EGFP-Adh1p および EGFP-Adh3p の蛍光顕微鏡観察による局在解析から、Adh1p と Adh3p は細胞質に存在することが示唆された (Figure 2-6A, B)。また、簡易分画法とウェスタン解析からは、これら 2 つのタンパク質が膜にも局在することが示唆された (Figure 2-6D)。Alk タンパク質群による *n*-アルカンの水酸化は小胞体上で行われるとともに、第 3 章で後述するように長鎖アルデヒドの酸化も小胞体またはペルオキシソーム上でも行われることから、長鎖アルコールの酸化も小胞体またはペルオキシソーム上で行われる可能性が考えられ、ウェスタン解析の結果はこれを支持するものである。また、各細胞小器官を分離できる分画法を用いることにより、Adh1p と Adh3p が実際にどこに細胞小器官に局在するかどうかを確かめることができると期待される。

#### 2-4-2 長鎖アルコール酸化における長鎖アルコールオキシダーゼの機能

長鎖アルコールオキシダーゼをコードする遺伝子はいくつかの生物種で同定されており、*C. cloacae* では *FAO1* [86]、*C. tropicalis* では *FAOT*、*FAO1* および *FAO2* [85]、*Arabidopsis thaliana* では *AtFAO3* [93]、*Lotus japonicus* では *LjFAO1* [94]、*Simmondsia chinensis* では *ScFAO* [95]が単離されている。これらのタンパク質の酵素学的特徴は明らかにされているが、*in vivo* において長鎖アルコールオキシダーゼの生理的機能を明らかにした報告は少ない。*C. tropicalis* において *FAOT* を破壊すると、膜画分から長鎖アルコールオキシダーゼ活性が検出されなくなるとともに、*n*-オクタデカンで生育できなくなるが、他の鎖長の *n*-アルカンや脂肪酸では生育できることが報告されている[96]。近年、*Y. lipolytica* において、*Fao1p* が  $\omega$ -ヒドロキシドデカン酸の水酸基の酸化に関与し、ジカルボン酸生成に寄与していることが明らかにされた[88]。本章の結果から、*Y. lipolytica* において、*Fao1p* が長鎖アルコールの酸化に関わるという長鎖アルコールオキシダーゼの新たな機能が明らかとなった。

*C. maltosa* では長鎖アルコールオキシダーゼ活性がペルオキシソーム、ミトコンドリア混合画分から検出されることが報告されていたが[97]、*Y. lipolytica* においても、それと一致するように、*Fao1p* がペルオキシソームに局在することが示唆された (Figure 2-6C)。

#### 2-4-3 長鎖アルコール酸化に関わる遺伝子群の転写制御

*Y. lipolytica* の *ADH1*、*ADH3*、*FAO1* のプロモーターを用いたレポーター解析から、これらの遺伝子群が *n*-アルカンの存在により大きく発現誘導されることが示唆された (Figure 2-7)。序章にも述べたように、*Y. lipolytica* において、*ALK1* などの *n*-アルカン代謝に関与する遺伝子群の転写は *n*-アルカンの存在により活性化すること、その制御には

Yas1p、Yas2p、Yas3p が関与することが明らかになっている[58, 59, 62, 63, 70]。 *Y. lipolytica* の網羅的転写解析のデータを用いたクラスタリング解析により *ALK1* 様の発現パターンを示す遺伝子として見出されたように、*FAO1* は Yas2p、Yas3p の制御下にあることが示唆されており、Yas1p/Yas2p/Yas3p による転写制御機構が *n*-アルカンの水酸化酵素である Alk タンパク質群のみならず、長鎖アルコール代謝に関与する酵素の発現にも寄与していることが示唆された。

ALCY02 株において、*n*-アルカン添加による *ADHI* プロモーター活性の増加量は野生型株と比較して低下した

(Figure 2-7A)。*n*-ドデカン存在下で培養すると、ALCY02 株では野生型株よりも 1-ドデカノールをより蓄積することから (Figure 2-4)、1-ドデカノールの代謝産物であるドデカノールやドデカン酸が *ADHI* の転写を活性化させるか、長鎖アルコールが *ADHI* の転写を抑制している可能性が考えられた。

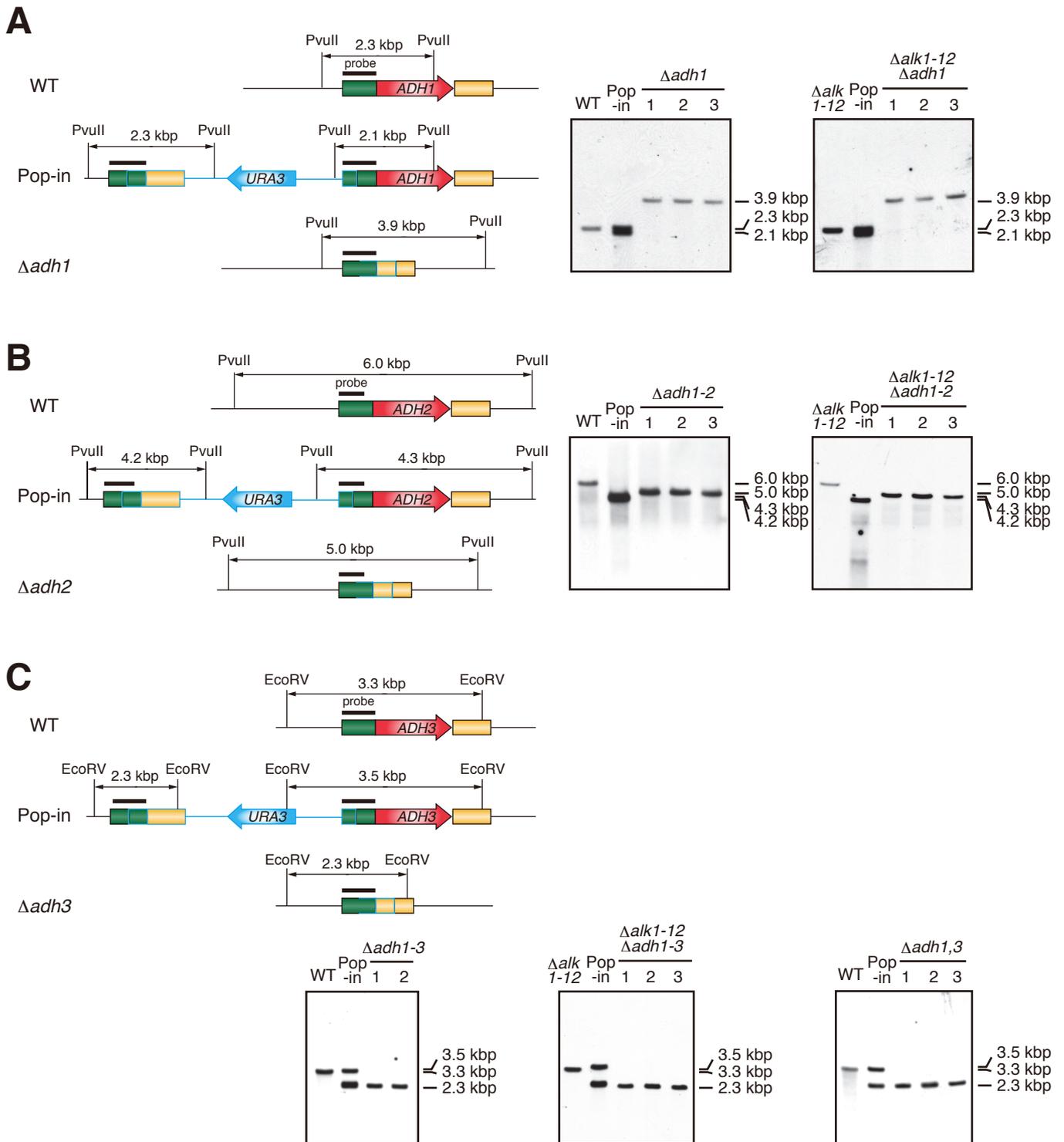
#### 2-4-4 細胞外から取り込んだ長鎖アルコールの代謝と細胞内で生じる *n*-アルカン由来の長鎖アルコールの代謝

ALCY02 株と ALCY03 株は長鎖アルコールを単一の炭素源とした培地では顕著に生育の悪化を示したが、炭素鎖長 14-18 の *n*-アルカンを炭素源とした培地では野生型株とほぼ同等の生育を示し、炭素鎖長 10-12 の *n*-アルカンを炭素源とした培地でも野生型株と比較して僅かに生育遅延を示したのみであった (Figure 2-2)。Gatter らは *POX1-POX6*、*FADH*、*ADHI-ADH7*、*FAO1* の全てを破壊した株においても、*n*-ドデカンの変換効率が低下していないことを示している[88]。本章の結果では、ALCY02 株を *n*-ドデカンで培養した場合、ALCY02 株は野生型株よりも 1-ドデカノールを多く蓄積しており、*ADHI-ADH7*、*FADH*、*FAO1* が *n*-ドデカン由来の 1-ドデカノールの酸化に関与することが示されたが、ALCY02 株は依然として一定量のドデカン酸を産生していた (Figure 2-4)。これらの結果は、細胞内の代謝により *n*-アルカンから生じた長鎖アルコールの酸化に関与する酵素は、*Adh1p-Adh7p*、*Fadh1p*、*Fao1p* の他にもあることを示唆している。細胞外から取り込んだ長鎖アルコールの代謝と *n*-アルカン代謝の結果で生じる長鎖アルコールの代謝はその経路が異なる可能性が考えられる。また、ALCY03 株は *n*-ドデカンを炭素源として生育しておらず、ALCY02 株との生育の差が観察されたが (Figure 2-5B)、この理由は不明である。

#### 2-4-5 Alk タンパク質群の長鎖アルコール酸化の関与

長鎖アルコール酸化に関与する酵素の候補の 1 つは Alk タンパク質群である。緒言でも述べたとおり、*C. maltosa* の *CYP52A2* は長鎖アルコールの酸化に関与することが示唆されている[28]。本章においても、12 種の *ALK* 遺伝子群を全て破壊すると、長鎖アルコールに対して僅かに感受性が増加した (Figure 2-8)。この結果から、Alk タンパク質群

が長鎖アルコールの酸化に関わる可能性が示唆された。今後、Alk タンパク質群の活性を *in vitro* で解析する系を構築し、Alk タンパク質による長鎖アルコールの酸化を生化学的に解析する必要がある。



**Figure 2-1. 本章で使う株の作製とサザン解析**

本章で作製した株の確認のためのサザン解析のストラテジーとサザン解析の結果。各パネルの左側のサザンストラテジーを、右側にサザン解析の結果を示す。WTはCXAU1株、Pop-inはその右側に示す株を作製するために破壊カセットを導入した株を示す。それぞれのパネルは、(A) *ADH1* 破壊株、(B) *ADH2* 破壊株、(C) *ADH3* 破壊株、(D) *ADH4* 破壊株、(E) *FADH* 破壊株、(F) *ADH6* 破壊株、(G) *ADH5* 破壊株、(H) *ADH7* 破壊株、(I) *FAO1* 破壊株、(J) POC株、(K) SEMC株について示す。*FAO1* 破壊の確認については、*ADE1* 置換による破壊の確認には上側、pop-in/pop-out法による破壊の確認には下側のストラテジーを用いた。\*は非特異的なバンドを示す。いずれも1の株を解析に用いた。

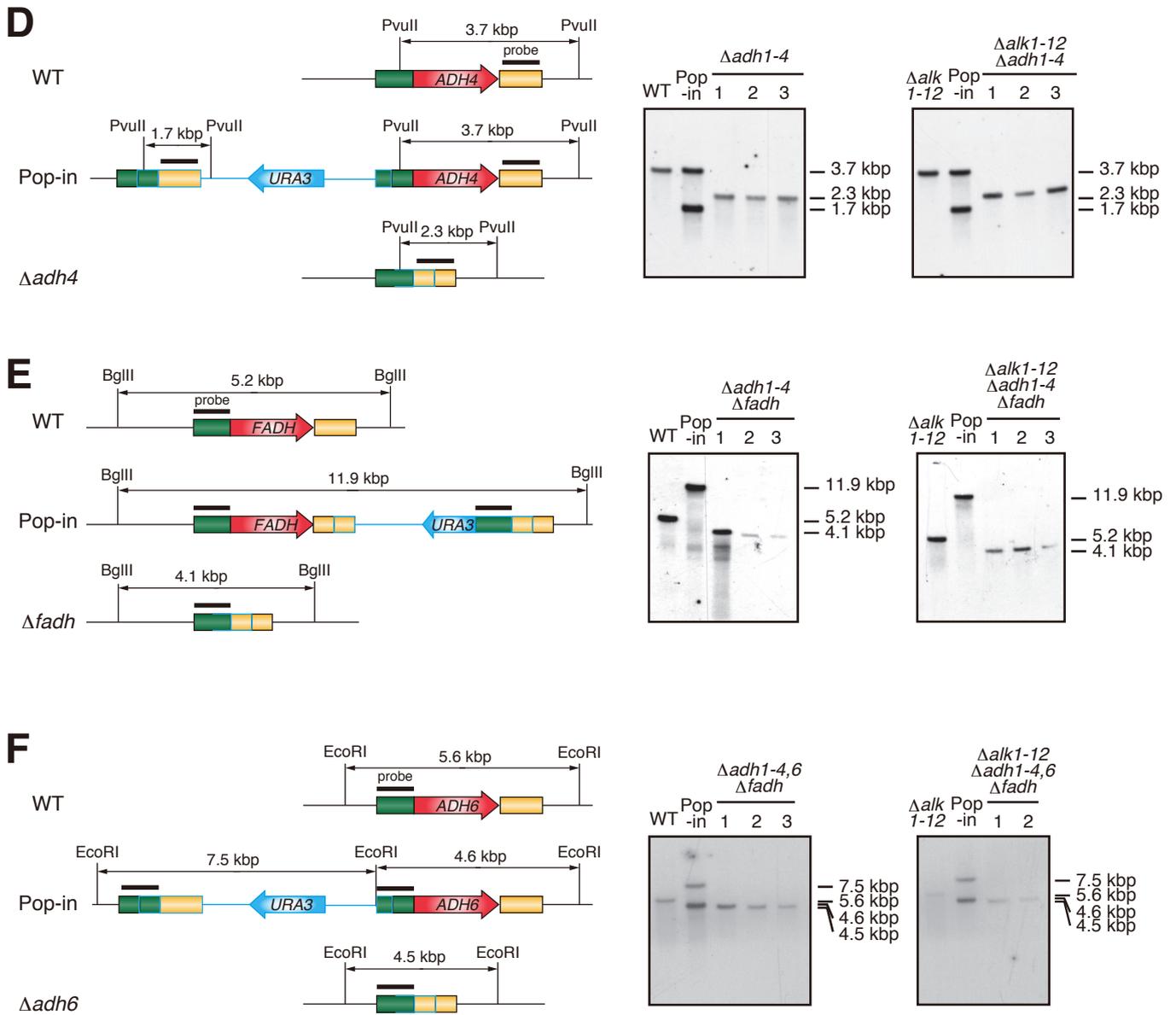


Figure 2-1. 本章で使う株の作製とサザン解析 (continued)

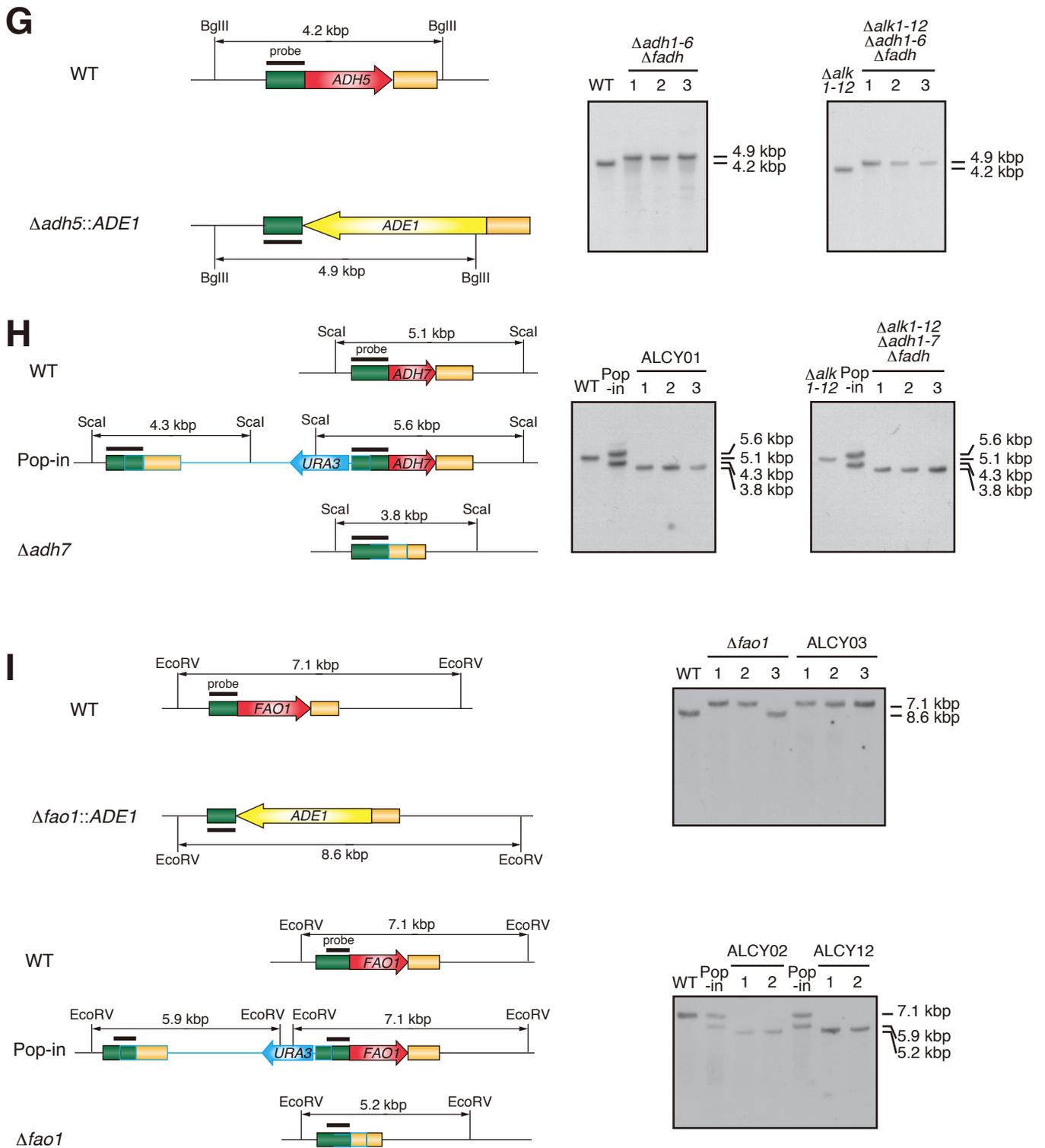


Figure 2-1. 本章で使う株の作製とサザン解析 (continued)

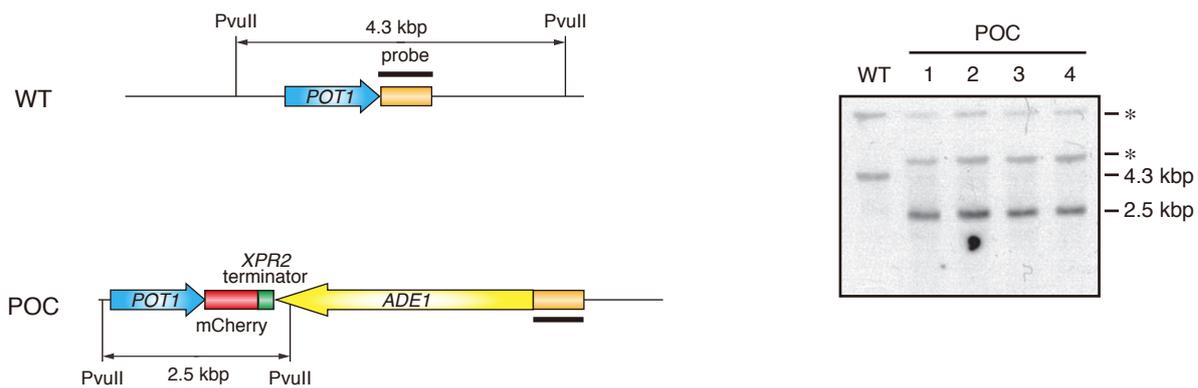
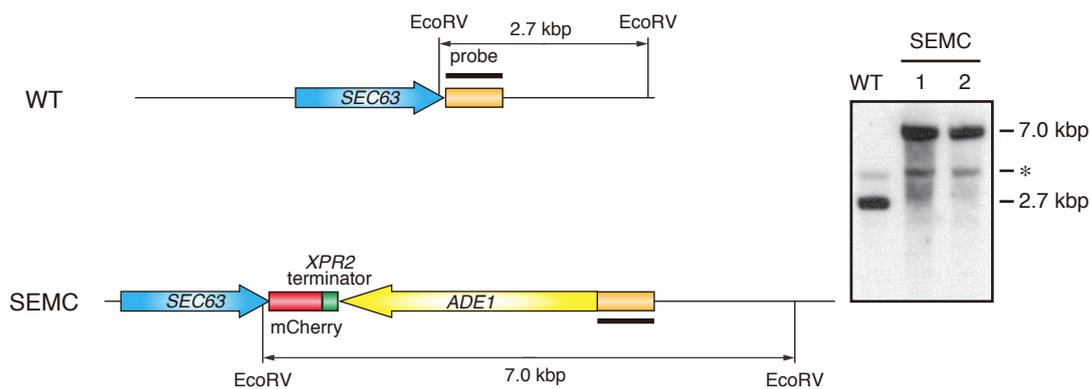
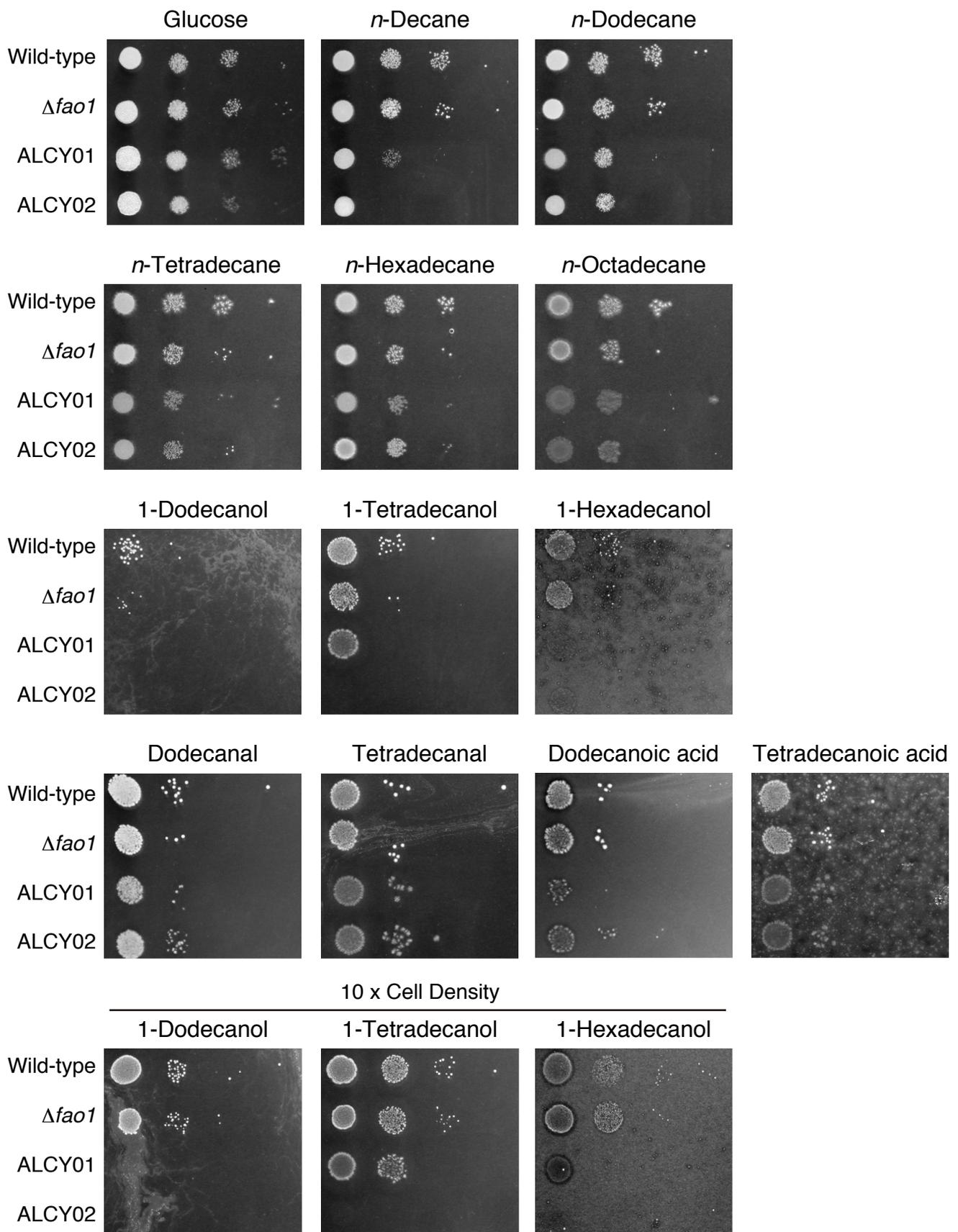
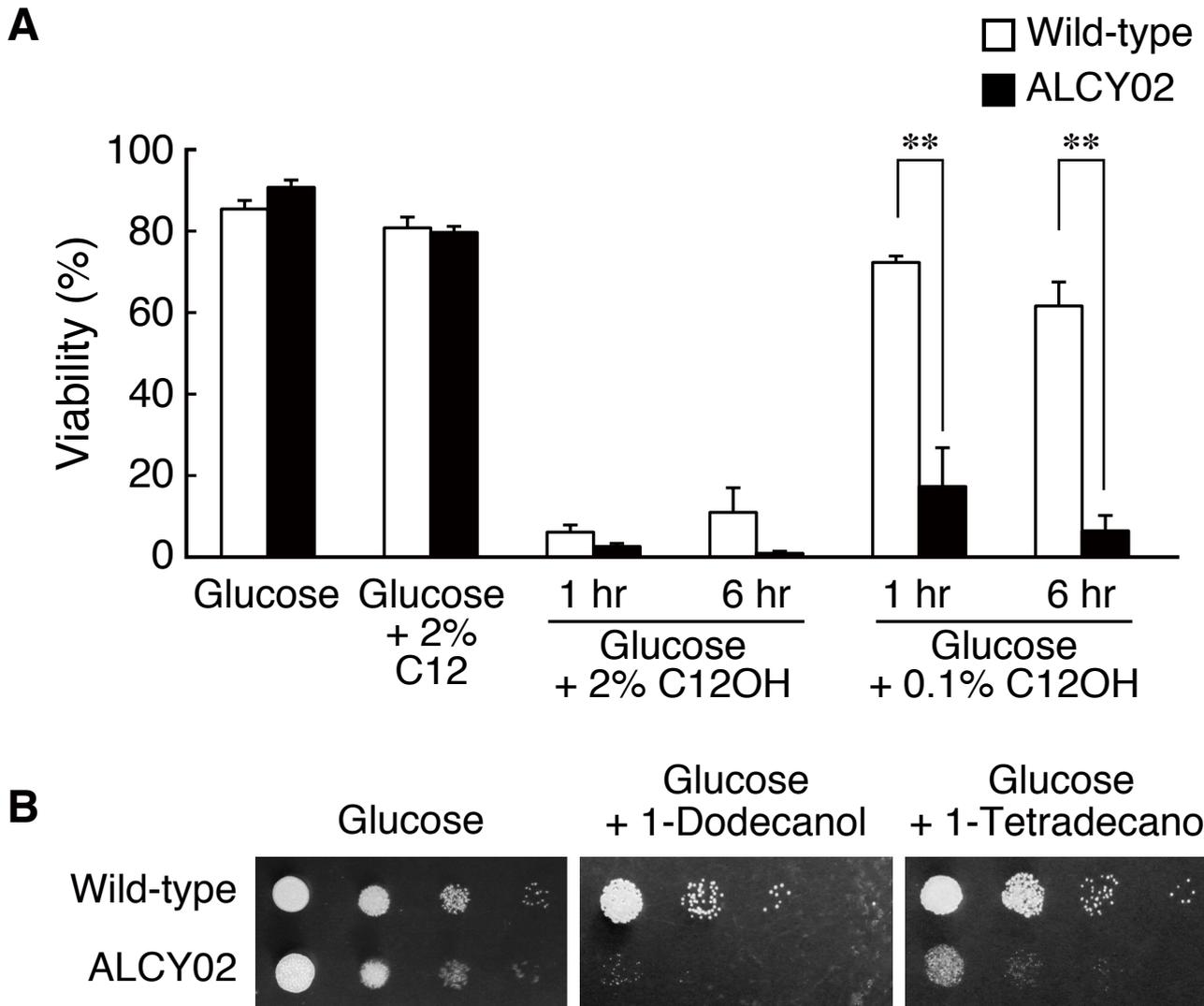
**J****K**

Figure 2-1. 本章で使う株の作製とサザン解析 (continued)



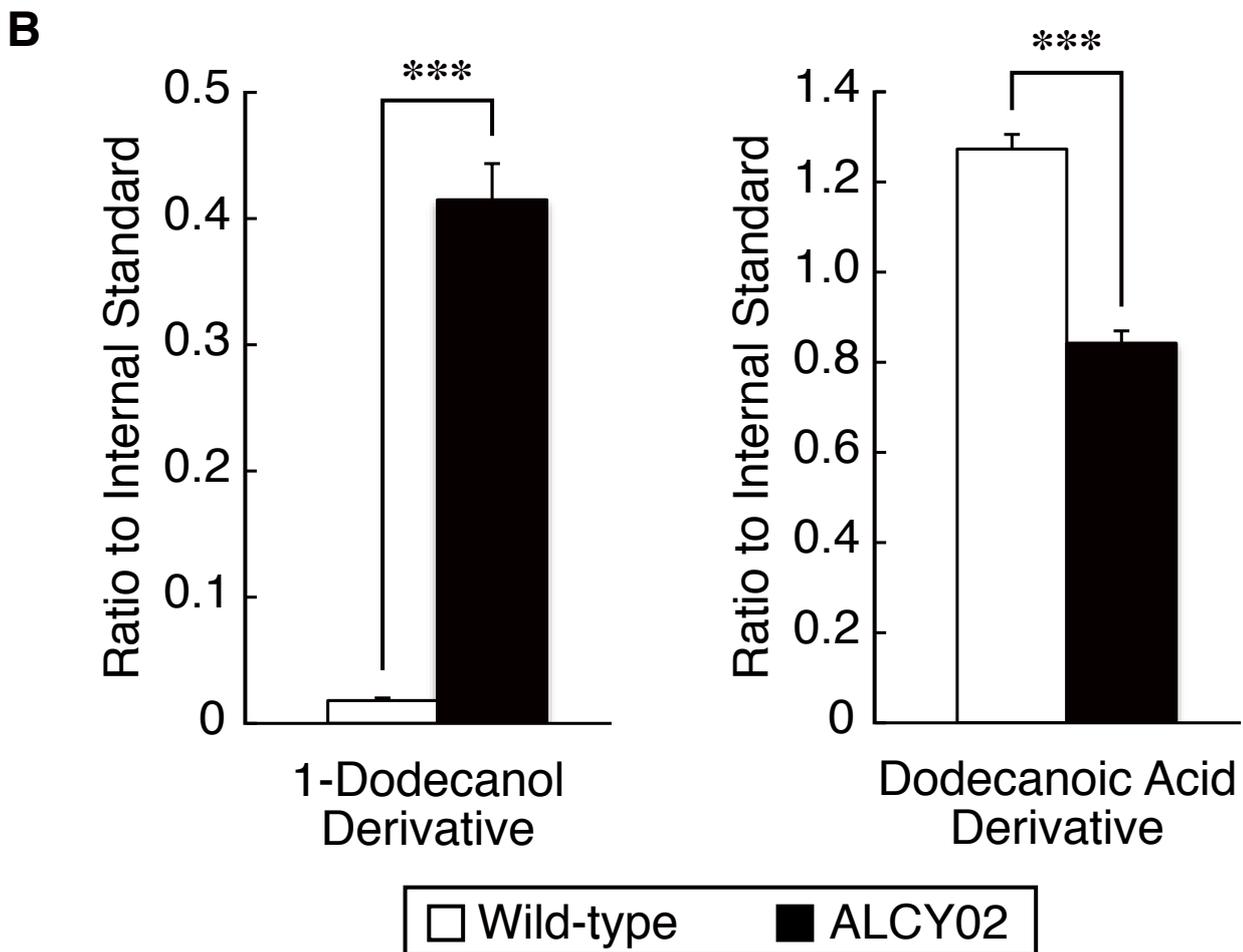
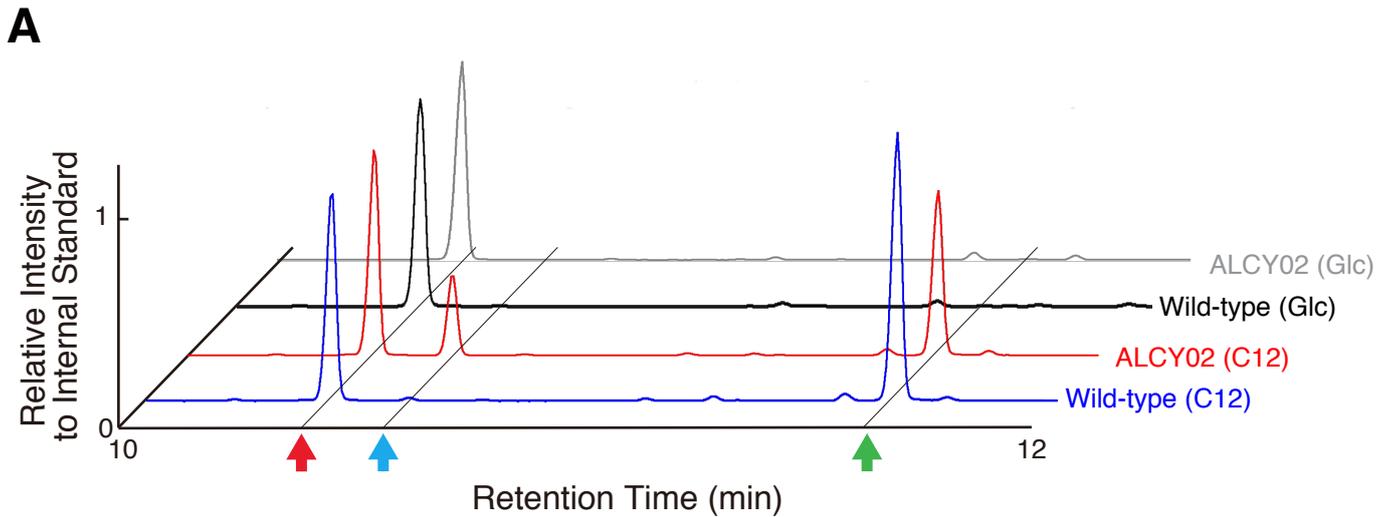
**Figure 2-2.** アルコールデヒドロゲナーゼ遺伝子群および長鎖アルコールオキシダーゼ遺伝子の破壊株の様々な炭素源における生育

CXAU/A1 株 (Wild-type)、 $\Delta fao1$  株、ALCY01 株、ALCY02 株を SD 液体培地で対数増殖期まで培養した後、各炭素源のプレートにスポット法により植菌した。グルコース培地では 2 日間、*n*-デカン、*n*-ドデカン、*n*-テトラデカン、*n*-ヘキサデカン、*n*-オクタデカン、1-ドデカノール、1-テトラデカノール、1-ヘキサデカノール、ドデカナール、テトラデカナール、ドデカン酸、テトラデカン酸を炭素源とした各培地では 4 日間培養した。10 x Cell Density はそれぞれを 10 倍濃度でスポットしたことを示す。



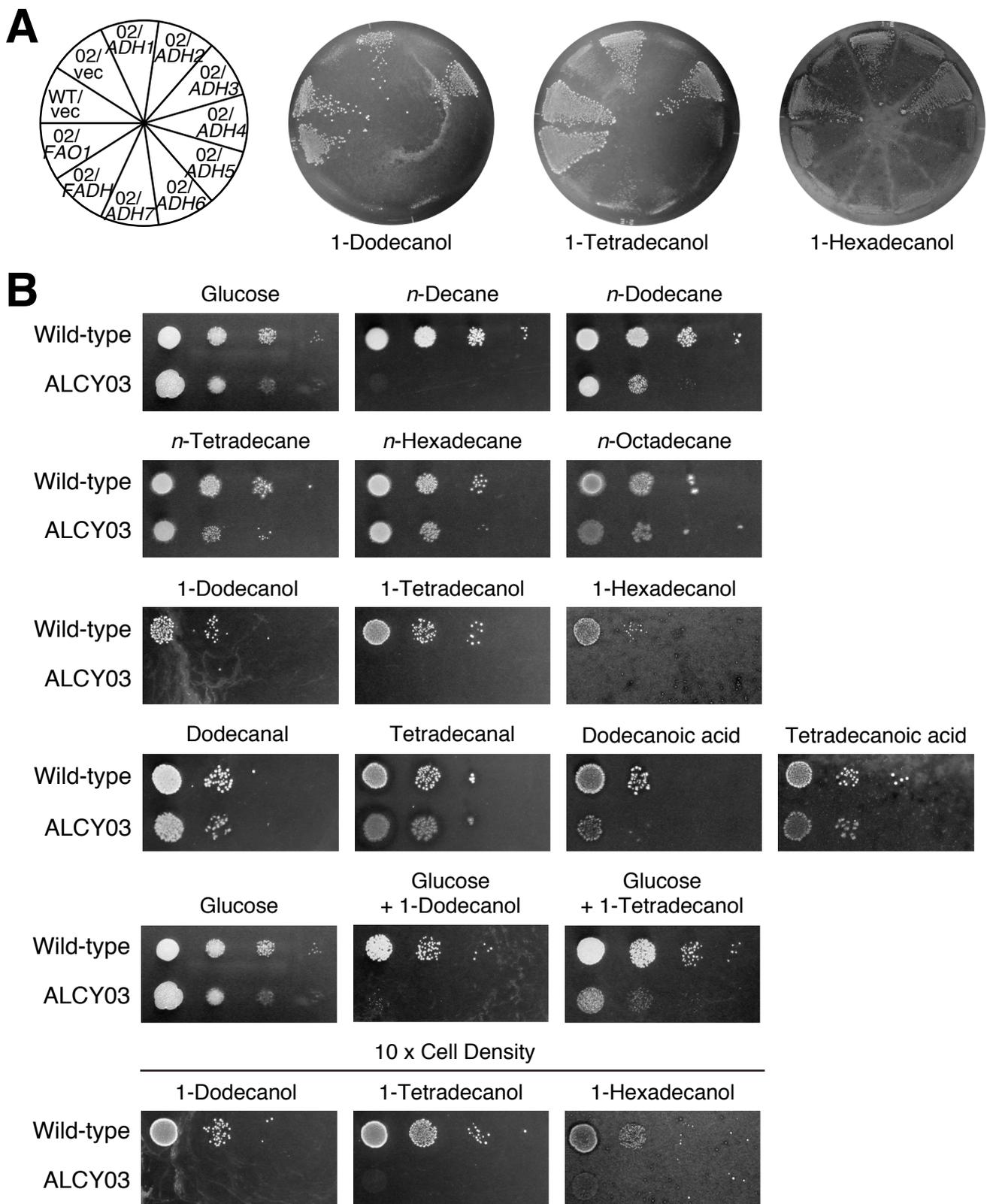
**Figure 2-3. ALCY02 株の長鎖アルコールに対する感受性**

(A) 1-ドデカノール存在下における ALCY02 株の生菌率。CXAU/A1 株 (Wild-type) および ALCY02 株を SD 液体培地 (Glucose) または 2% *n*-ドデカンを含む SD 液体培地 (Glucose + 2% C12) で 6 時間培養した。また、これら 2 つの株を 0.1% または 2% 1-ドデカノールを含む SD 液体培地 (Glucose + 0.1% C12OH または Glucose + 2% C12OH) で 1 時間または 6 時間培養した。培養後の生菌率をフロキシニン B 染色により測定した。独立した 3 回の実験の平均値を棒グラフ、標準誤差をエラーバーで示した。\*\*  $P < 0.005$  (独立 2 標本 *t* 検定、両側検定) (B) 長鎖アルコール存在下における ALCY02 株の固体培地上での生育。CXAU/A1 株 (Wild-type) と ALCY02 株を対数増殖期まで培養した後、各炭素源のプレートにスポット法により植菌した。グルコース培地、グルコース/1-テトラデカノール培地では 2 日間、グルコース/1-ドデカノール培地では 3 日間培養した。



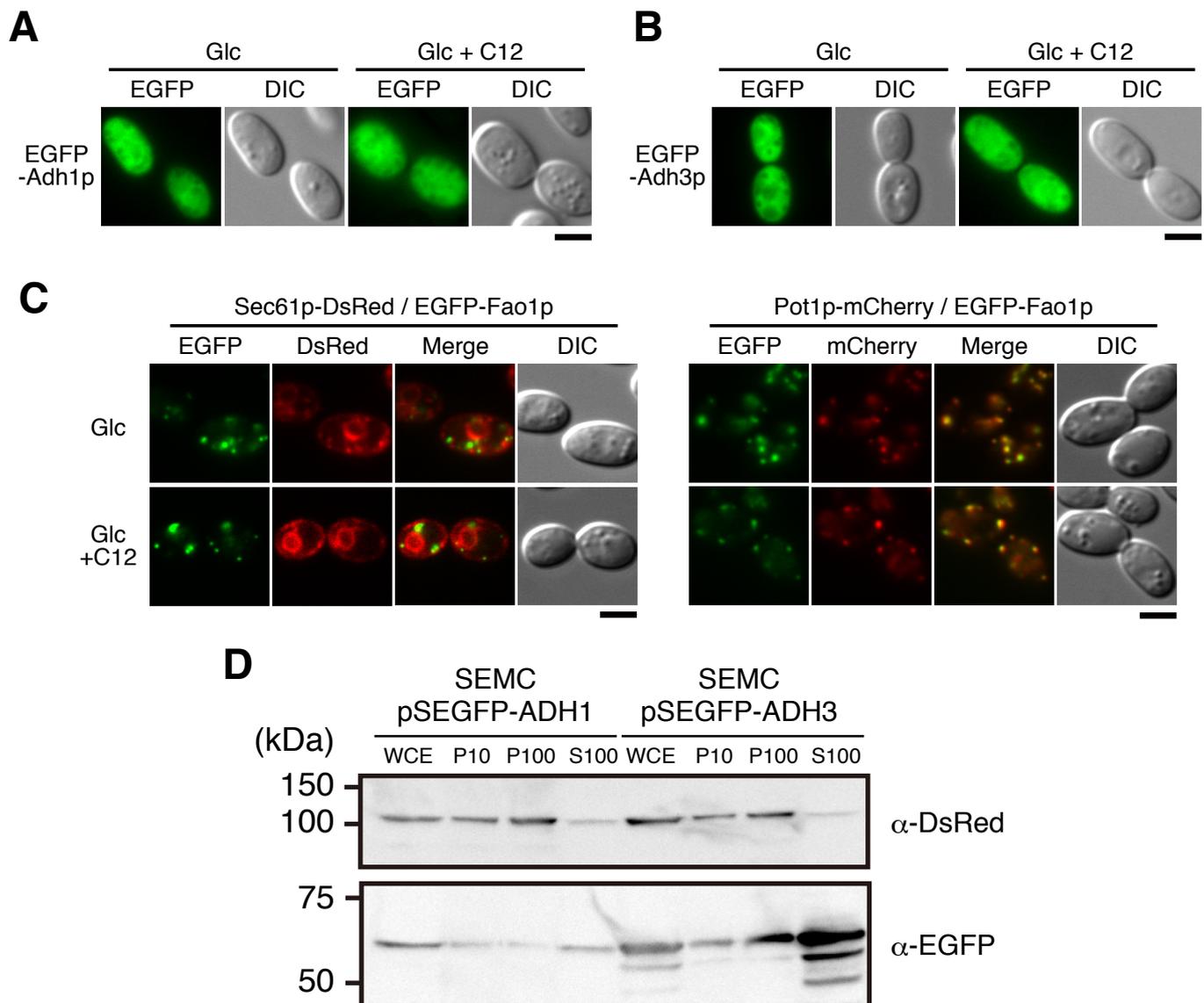
**Figure 2-4. ALCY02 株の細胞内 *n*-ドデカン代謝産物**

(A) CXAU/A1 株 (Wild-type) および ALCY02 株を SD 液体培地で対数増殖期まで培養した菌体 (Glc)、または SD 液体培地で対数増殖期まで培養した後、*n*-ドデカンを終濃度 2% で添加してさらに 6 時間培養した菌体 (C12) から、1-ドデカノール、ドデカン酸を抽出して GC-MS で解析した。ウンデカン酸 (内標準物質)、1-ドデカノール、ドデカン酸の TMS 誘導体に相当するピークをそれぞれ赤、青、緑の矢印で示した。(B) (A) と同様に培養した CXAU/A1 株および ALCY02 株における 1-ドデカノールおよびドデカン酸を定量した。独立した 3 回の実験の平均値を棒グラフ、標準誤差をエラーバーで示した。\*\*\*  $P < 0.0005$  (独立 2 標本 *t* 検定、両側検定)



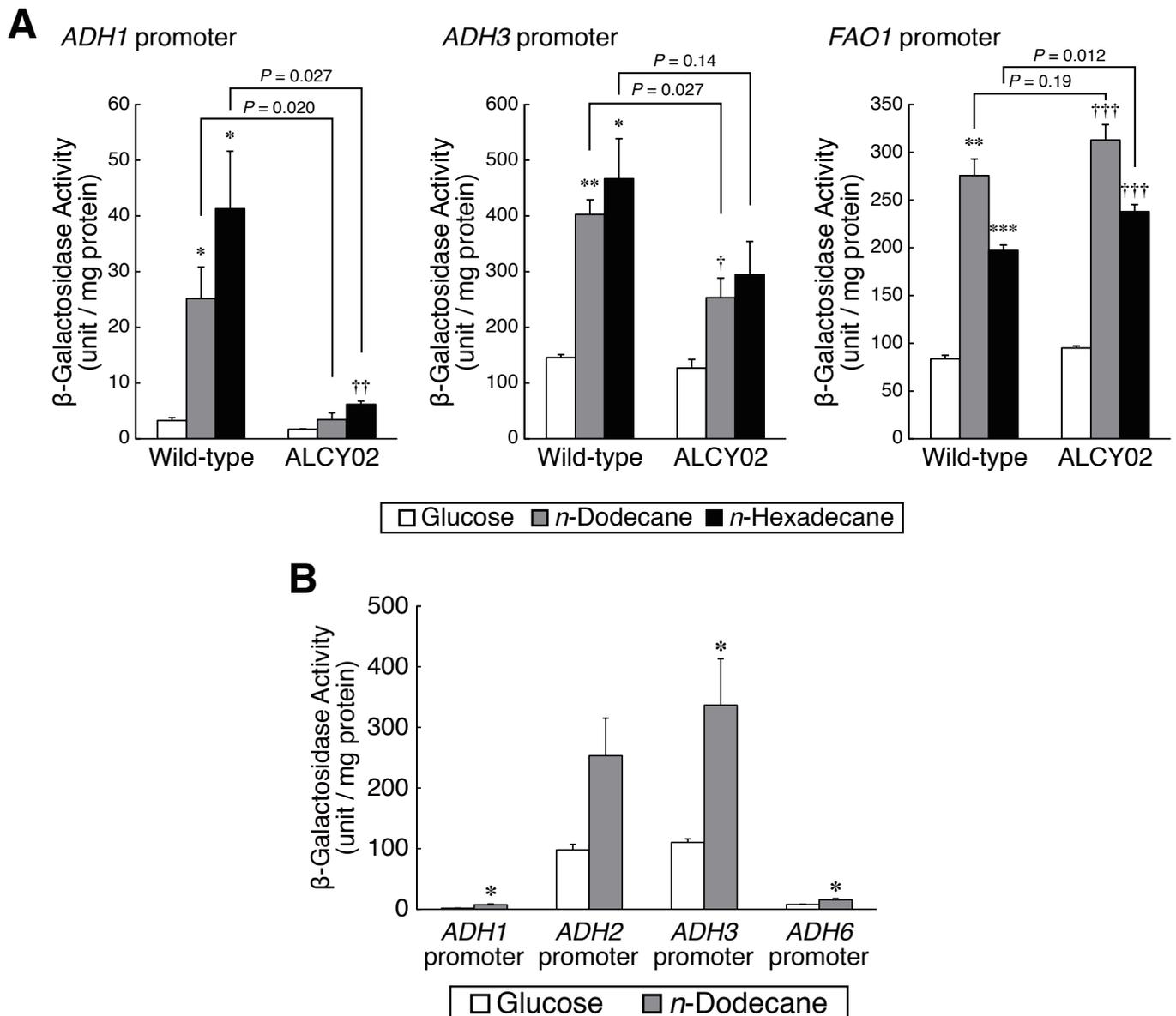
**Figure 2-5. 長鎖アルコール酸化に関わる遺伝子の同定**

(A) pSUT5 を導入した CXAU/A1 株 (WT/*vec*)、pSUT5 (02/*vec*)、pSADH1 (02/*ADH1*)、pSADH2 (02/*ADH2*)、pSADH3 (02/*ADH3*)、pSADH4 (02/*ADH4*)、pSADH5 (02/*ADH5*)、pSADH6 (02/*ADH6*)、pSADH7 (02/*ADH7*)、pSFADH (02/*FADH*)、pSFAO1 (02/*FAO1*) を導入した ALCY02 株を 1-ドデカノール、1-テトラデカノール、1-ヘキサデカノールを単一の炭素源とした培地で 5 日間培養した。(B) CXAU/A1 株 (Wild-type) および ALCY03 株を対数増殖期まで培養した後、各炭素源のプレートにスポット法により植菌した。グルコース、グルコースおよび 1-ドデカノール、グルコースおよび 1-テトラデカノールを炭素源とした培地で 2 日間、*n*-デカン、*n*-ドデカン、*n*-テトラデカン、*n*-ヘキサデカン、*n*-オクタデカン、1-ドデカノール、1-テトラデカノール、ドデカノール、テトラデカノール、ドデカン酸、テトラデカン酸を炭素源とした培地で 4 日間培養した。10 x Cell Density はそれぞれを 10 倍濃度でスポットしたことを示す。



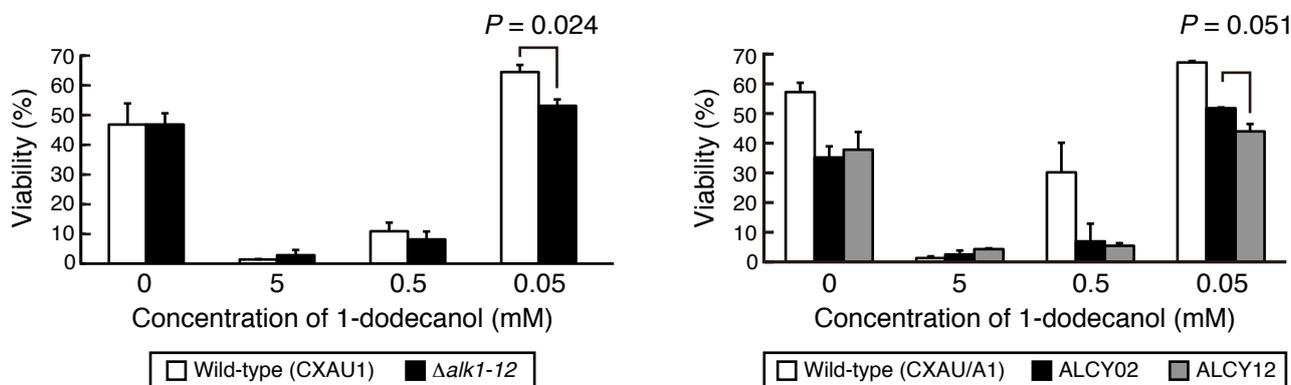
### Figure 2-6. Adh1p、Adh3p および Fao1p の細胞内局在解析

(A-B) EGFP-Adh1p (A)、EGFP-Adh3p (B)を発現する CXAU/A1 株を SD 液体培地で対数増殖期まで培養した細胞 (Glc)、または SD 液体培地で対数増殖期まで培養した後、*n*-ドデカンを終濃度 2%で加えてさらに 1 時間培養した細胞 (Glc + C12)について蛍光顕微鏡観察を行った。スケールバーは 3  $\mu$ m を示す。(C) EGFP-Fao1p を発現する REA1 株または POC 株を SD 液体培地で対数増殖期まで培養した細胞 (Glc)、または SD 液体培地で対数増殖期まで培養した後、*n*-ドデカンを終濃度 2%で加えてさらに 1 時間培養した細胞 (Glc + C12)について蛍光顕微鏡観察を行った。スケールバーは 3  $\mu$ m を示す。(D) EGFP-Adh1p または EGFP-Adh3p を発現する SEMC 株を SD 液体培地で対数増殖期まで培養した菌体から細胞抽出液 (WCE 画分)を調製し、簡易分画法により P10、P100、S100 画分を取得した。WCE 画分においてタンパク質量 50  $\mu$ g に相当する体積を各画分についてロードし、SDS-PAGE を行った後、 $\alpha$ -EGFP 抗体、 $\alpha$ -DsRed 抗体 (mCherry 検出用)を用いたウェスタン解析に供した。



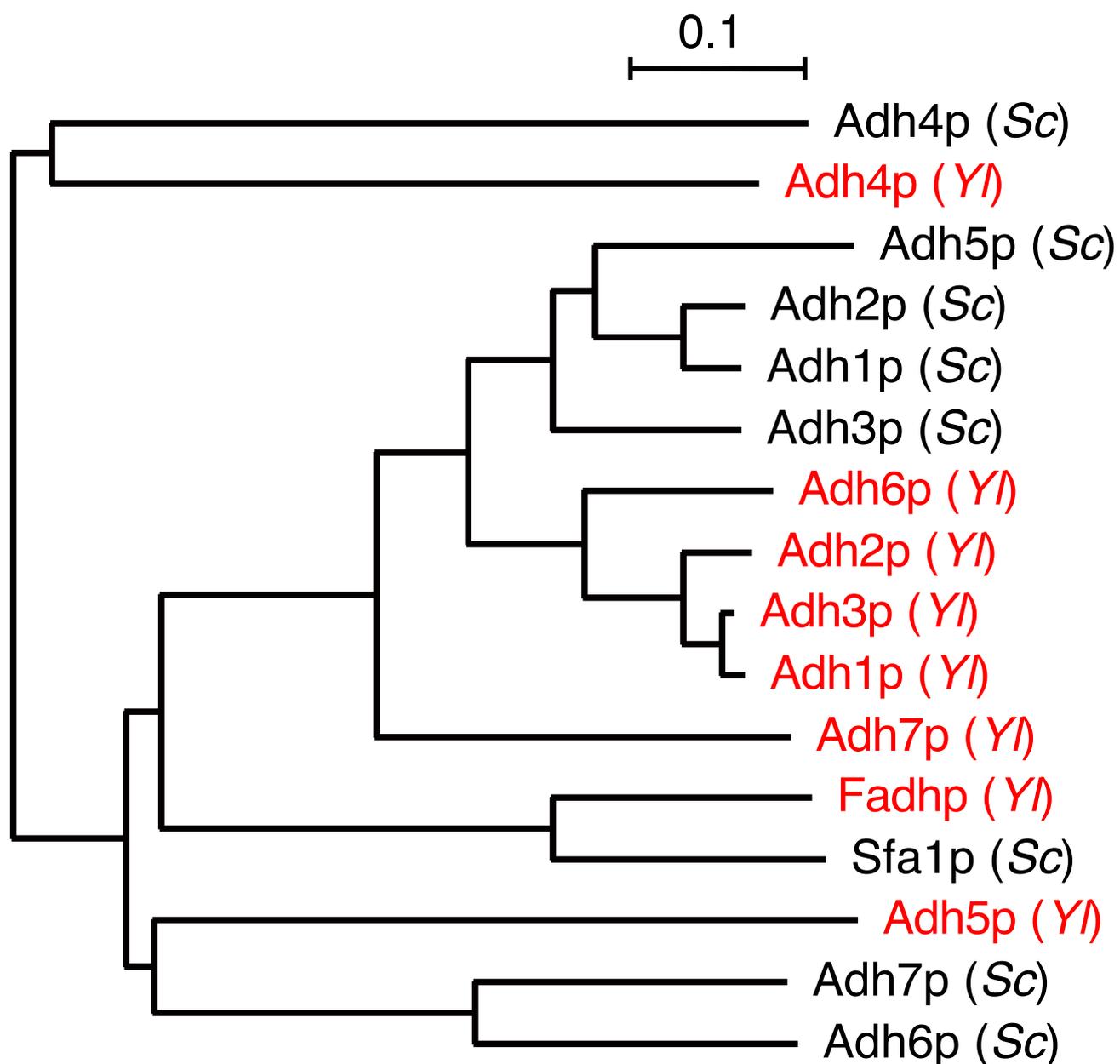
**Figure 2-7. *ADH1*、*ADH3*、*FAO1* のプロモーター活性**

(A) p*ADH1p-lacZ*、p*ADH3p-lacZ*、または p*FAO1p-lacZ* を導入した CXAU/A1 株 (Wild-type) および ALCY02 株を SD 液体培地で対数増殖期まで培養した後、2% グルコース、2% *n*-ドデカン、または 2% *n*-ヘキサデカンを含む YNB 液体培地にシフトして 3 時間培養した。得られた菌体から粗酵素液を抽出し、β-ガラクトシダーゼ活性測定を行った。独立した 3 回の実験の平均値を棒グラフ、標準誤差をエラーバーで示した。\*、\*\*、\*\*\* グルコースで培養した Wild-type の結果と比較して統計的有意差がある (独立 2 標本 *t* 検定、両側検定、\*  $P < 0.05$ 、\*\*  $P < 0.005$ 、\*\*\*  $P < 0.0005$ )。†、††、††† グルコースで培養した ALCY02 株の結果と比較して統計的有意差がある (独立 2 標本 *t* 検定、両側検定、†  $P < 0.05$ 、††  $P < 0.005$ 、†††  $P < 0.0005$ )。一部について独立 2 標本 *t* 検定 (両側検定) の  $P$  値を示す。(B) p*ADH1p-lacZ*、p*ADH2p-lacZ*、p*ADH3p-lacZ*、または p*ADH6p-lacZ* を導入した CXAU/A1 株 (Wild-type) を SD 液体培地で対数増殖期まで培養した後、2% グルコースまたは 2% *n*-ドデカンを含む YNB 液体培地にシフトして 3 時間培養した。得られた菌体から粗酵素液を抽出し、β-ガラクトシダーゼ活性測定を行った。独立した 3 回の実験の平均値を棒グラフ、標準誤差をエラーバーで示した。\* グルコースで培養した Wild-type の結果と比較して統計的有意差がある ( $P < 0.05$ 、独立 2 標本 *t* 検定、両側検定)。



**Figure 2-8. Alk タンパク質群の長鎖アルコール酸化に対する機能**

CXAU1 株 (Wild-type)、CXAU/A1 株 (Wild-type)、 $\Delta alk1-12$  株、ALCY02 株および ALCY12 株を 0.1% Triton X-100 を含む SD 液体培地 (SDtx 液体培地) または 5、0.5、0.05 mM 1-ドデカノールを含む SDtx 液体培地で 6 時間培養した。培養後の生菌率をフロキシン B 染色により測定した。独立した 3 回の実験の平均値を棒グラフ、標準誤差をエラーバーで示した。一部について独立 2 標本  $t$  検定 (両側検定) の  $P$  値を示す。



**Figure 2-9. Adh タンパク質群の系統樹**

*S. cerevisiae* (Sc)と *Y. lipolytica* (Yl)のアルコールデヒドロゲナーゼのアミノ酸配列を ClustalW (DDBJ, v2.1)で解析し、Njplotで分子系統樹を描画した。スケールバーは 0.1 substitutions per site を示す。使用した各配列の UniprotKB における Accession number を次に示す。*S. cerevisiae* では Adh1p (P00330)、Adh2p (P00331)、Adh3p (P07246)、Adh4p (P10127)、Adh5p (P38113)、Adh6p (Q04894)、Adh7p (P25377)、Sfa1p (P32771) 。*Y. lipolytica* では Adh1p (Q6C7T0)、Adh2p (F2Z678)、Adh3p (Q6CGT5)、Adh4p (Q6C5R5)、Adh5p (Q6CAJ7)、Adh6p (Q6CGX5)、Adh7p (Q6C6P0)、Fadhp (Q6C297)。括弧内に酵母種を示す。



## 第3章 長鎖アルデヒドの酸化に関わる酵素の同定と機能解析

### 3-1 緒言

第1章において  $\Delta alk1-12$  株が単一の炭素源として長鎖アルコールのみならず長鎖アルデヒドでも生育できたことから、*Y. lipolytica* は長鎖アルデヒドを酸化する酵素を Alk タンパク質群とは別に有すると考えられた。*n*-アルカン資化性酵母では長鎖アルデヒドの酸化に関与する酵素についての報告は少なく、*C. tropicalis* ATCC 20336 株、*Y. lipolytica* NRRL Y-6795 株、*Candida intermedia* NRRL-Y6328-1 株の細胞抽出液中に長鎖アルデヒドデヒドロゲナーゼ活性があることが報告されているだけであり[98-100]、長鎖アルデヒドデヒドロゲナーゼをコードする遺伝子は同定されていない。一方、Scheller らの報告により、*C. maltosa* においては P450ALK が長鎖アルデヒドの酸化に関与することが示唆されたことから[28]、*Y. lipolytica* でも Alk タンパク質群が長鎖アルデヒドデヒドロゲナーゼとともに長鎖アルデヒドの酸化に関わる可能性も考えられた。

本章では、*Y. lipolytica* の網羅的転写解析の結果から、*n*-デカンにより誘導される遺伝子の中から長鎖アルデヒドデヒドロゲナーゼをコードすると推定される候補遺伝子を見出し、その解析を行った。

### 3-2 実験方法と材料

#### 3-2-1 菌体、遺伝子、培地

<菌株>

*Yarrowia lipolytica*

CXAU1 株	第1章に記載
CXAU/A1 株	第2章に記載
$\Delta hfd1$ 株	<i>MATA adel ura3 \Delta hfd1</i> , CXAU1 株由来 (本論文)
$\Delta hfd2$ 株	<i>MATA adel ura3 \Delta hfd2</i> , CXAU1 株由来 (本論文)
$\Delta hfd3$ 株	<i>MATA adel ura3 \Delta hfd3</i> , CXAU1 株由来 (本論文)
$\Delta hfd4$ 株	<i>MATA adel ura3 \Delta hfd4</i> , CXAU1 株由来 (本論文)
$\Delta hfd1-2$ 株	<i>MATA adel ura3 \Delta hfd1 \Delta hfd2</i> , $\Delta hfd1$ 株由来 (本論文)
$\Delta hfd1,3$ 株	<i>MATA adel ura3 \Delta hfd1 \Delta hfd3</i> , $\Delta hfd1$ 株由来 (本論文)
$\Delta hfd1,4$ 株	<i>MATA adel ura3 \Delta hfd1 \Delta hfd4</i> , $\Delta hfd1$ 株由来 (本論文)
$\Delta hfd2,3$ 株	<i>MATA adel ura3 \Delta hfd2 \Delta hfd3</i> , $\Delta hfd2$ 株由来 (本論文)
$\Delta hfd2,4$ 株	<i>MATA adel ura3 \Delta hfd2 \Delta hfd4</i> , $\Delta hfd2$ 株由来 (本論文)
$\Delta hfd3,4$ 株	<i>MATA adel ura3 \Delta hfd3 \Delta hfd4</i> , $\Delta hfd3$ 株由来 (本論文)
$\Delta hfd1-3$ 株	<i>MATA adel ura3 \Delta hfd1 \Delta hfd2 \Delta hfd3</i> , $\Delta hfd1-2$ 株由来 (本論文)

$\Delta hfd1,2,4$ 株	<i>MATA ade1 ura3 <math>\Delta hfd1 \Delta hfd2 \Delta hfd4</math>, <math>\Delta hfd1-2</math></i> 株由来 (本論文)
$\Delta hfd1,3,4$ 株	<i>MATA ade1 ura3 <math>\Delta hfd1 \Delta hfd3 \Delta hfd4</math>, <math>\Delta hfd1,3</math></i> 株由来 (本論文)
$\Delta hfd2,3,4$ 株	<i>MATA ade1 ura3 <math>\Delta hfd2 \Delta hfd3 \Delta hfd4</math>, <math>\Delta hfd2,3</math></i> 株由来 (本論文)
$\Delta hfd1-4$ 株	<i>MATA ade1 ura3 <math>\Delta hfd1 \Delta hfd2 \Delta hfd3 \Delta hfd4</math>, <math>\Delta hfd1,2,4</math></i> 株由来 (本論文)
$\Delta hfd1-4\Delta ald2$ 株	<i>MATA ade1 ura3 <math>\Delta hfd1 \Delta hfd2 \Delta hfd3 \Delta hfd4 \Delta ald2</math>, <math>\Delta hfd1-4</math></i> 株由来 (本論文)
$\Delta hfd1-4\Delta ald2,3$ 株	<i>MATA ade1 ura3 <math>\Delta hfd1 \Delta hfd2 \Delta hfd3 \Delta hfd4 \Delta ald2 \Delta ald3</math>, <math>\Delta hfd1-4\Delta ald2</math></i> 株由来 (本論文)
$\Delta hfd1-4\Delta ald2-4$ 株	<i>MATA ade1 ura3 <math>\Delta hfd1 \Delta hfd2 \Delta hfd3 \Delta hfd4 \Delta ald2 \Delta ald3 \Delta ald4</math>, <math>\Delta hfd1-4\Delta ald2,3</math></i> 株由来 (本論文)
$\Delta hfd1-4\Delta ald1-4$ 株	<i>MATA ade1 ura3 <math>\Delta hfd1 \Delta hfd2 \Delta hfd3 \Delta hfd4 \Delta ald1 \Delta ald2 \Delta ald3 \Delta ald4</math>, <math>\Delta hfd1-4\Delta ald2-4</math></i> 株由来 (本論文)
$\Delta alk1-12$ 株	第 1 章に記載
$\Delta alk1-12\Delta hfd2$ 株	<i>MATA ade1 ura3 <math>\Delta alk1 \Delta alk2 \Delta alk3 \Delta alk4 \Delta alk5 \Delta alk6 \Delta alk7 \Delta alk8 \Delta alk9 \Delta alk10 \Delta alk11 \Delta alk12 \Delta hfd2</math>, <math>\Delta alk1-12</math></i> 株由来 (本論文)
$\Delta alk1-12\Delta hfd2,3$ 株	<i>MATA ade1 ura3 <math>\Delta alk1 \Delta alk2 \Delta alk3 \Delta alk4 \Delta alk5 \Delta alk6 \Delta alk7 \Delta alk8 \Delta alk9 \Delta alk10 \Delta alk11 \Delta alk12 \Delta hfd2 \Delta hfd3</math>, <math>\Delta alk1-12\Delta hfd2</math></i> 株由来 (本論文)
$\Delta alk1-12\Delta hfd2-4$ 株	<i>MATA ade1 ura3 <math>\Delta alk1 \Delta alk2 \Delta alk3 \Delta alk4 \Delta alk5 \Delta alk6 \Delta alk7 \Delta alk8 \Delta alk9 \Delta alk10 \Delta alk11 \Delta alk12 \Delta hfd2 \Delta hfd3 \Delta hfd4</math>, <math>\Delta alk1-12\Delta hfd2,3</math></i> 株由来 (本論文)
$\Delta alk1-12\Delta hfd1-4$ 株	<i>MATA ade1 ura3 <math>\Delta alk1 \Delta alk2 \Delta alk3 \Delta alk4 \Delta alk5 \Delta alk6 \Delta alk7 \Delta alk8 \Delta alk9 \Delta alk10 \Delta alk11 \Delta alk12 \Delta hfd1 \Delta hfd2 \Delta hfd3 \Delta hfd4</math>, <math>\Delta alk1-12\Delta hfd2-4</math></i> 株由来 (本論文)
REA1 株	第 2 章に記載
POC 株	第 2 章に記載
<i>Escherichia coli</i>	
JM109 株	第 1 章に記載
DH5 $\alpha$ 株	第 1 章に記載
BL21(DE3)株	F <sup>-</sup> <i>ompT gal dcm hsdS<sub>B</sub>(r<sub>B</sub>m<sub>B</sub>)</i> [DE3]

#### <遺伝子>

本章で解析した遺伝子の一覧

遺伝子名	Systematic name
<i>HFD1</i>	<i>YALI0F23793g</i>
<i>HFD2</i>	<i>YALI0E15400g</i>
<i>HFD3</i>	<i>YALI0A17875g</i>
<i>HFD4</i>	<i>YALI0B01298g</i>
<i>ALD1</i>	<i>YALI0E00264g</i>
<i>ALD2</i>	<i>YALI0D07942g</i>
<i>ALD3</i>	<i>YALI0F04444g</i>
<i>ALD4</i>	<i>YALI0C03025g</i>

*ALK1* – *ALK12* は第 1 章に記載

<培地>

酵母用完全培地

YPD 培地 第 1 章に記載

酵母用最少培地

YNB 培地 第 1 章に記載

SG 培地 第 1 章に記載

SD 培地 第 1 章に記載

*n*-デカン培地 第 1 章に記載

*n*-ドデカン培地 第 1 章に記載

*n*-テトラデカン培地

<i>n</i> -テトラデカン	2.0%
Yeast nitrogen base w/o amino acids and ammonium sulfate (Difco)	0.17%
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0.5%

*n*-ヘキサデカン培地

<i>n</i> -ヘキサデカン	2.0%
Yeast nitrogen base w/o amino acids and ammonium sulfate (Difco)	0.17%
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0.5%

オレイン酸培地

オレイン酸	2.0%
-------	------

Yeast nitrogen base w/o amino acids	
and ammonium sulfate (Difco)	0.17%
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0.5%

1-ドデカノール培地	第1章に記載
ドデカノール培地	第1章に記載
ドデカン酸培地	第1章に記載

寒天培地には寒天 (Wako Pure Chemical Industries, Ltd.)を最終濃度 2%となるように加えた。また、1-ドデカノール、ドデカノール、ドデカン酸を含む培地に関しては、5% TritonX-100、1% 1-ドデカノール (ドデカノールまたはドデカン酸) を小型アナログ超音波ホモジナイザー Sonifier 250A (BRANSON)で乳化処理し、培地に 10 倍希釈で添加して作製した。

#### 酵母用最少培地 (固体培地で *n*-アルカンを与える場合)

<i>n</i> -アルカン培地	第1章に記載
SD+ <i>n</i> -アルカン培地	第1章に記載

#### 酵母用ウラシル要求性選抜培地

YPD+5-FOA 培地	第2章に記載
SG+5-FOA 培地	第2章に記載

#### 大腸菌用完全培地

L-broth 培地	第1章に記載
------------	--------

### 3-2-2 培養条件

1-2-2 に従った。

### 3-2-3 プラスミド

以下のプラスミドを使用した。

pSUT5	第1章に記載
pBURA3	第2章に記載
pGEM-T Vector	第1章に記載
pET-3a	(Novagen)
pBS-EGFP	第2章に記載

以下のプラスミドを作製し、使用した。

pBUHFD1PT	<i>HFD1</i> の上流約 1.1 kbp および下流約 1.0 kbp の領域を pBURA3 の EcoRI-XbaI サイトに挿入したプラスミド。pop-in/pop-out 法による <i>HFD1</i> の破壊に使用した。
pBUHFD2PT	<i>HFD2</i> の上流約 1.0 kbp および下流約 1.0 kbp の領域を pBURA3 の EcoRI-XbaI サイトに挿入したプラスミド。pop-in/pop-out 法による <i>HFD2</i> の破壊に使用した。
pBUHFD3PT	<i>HFD3</i> の上流約 1.1 kbp および下流約 1.0 kbp の領域を pBURA3 の EcoRI-XbaI サイトに挿入したプラスミド。pop-in/pop-out 法による <i>HFD3</i> の破壊に使用した。
pBUHFD4PT	<i>HFD4</i> の上流約 1.0 kbp および下流約 1.0 kbp の領域を pBURA3 の EcoRI-BamHI サイトに挿入したプラスミド。pop-in/pop-out 法による <i>HFD4</i> の破壊に使用した。
pSHFD1	<i>HFD1</i> の ORF、その上流約 1.1 kbp および下流約 0.5 kbp を含む DNA 断片を pSUT5 の EcoRI-ApaI サイトに挿入したプラスミド。
pSHFD2	<i>HFD2</i> の ORF、その上流約 1.0 kbp および下流約 0.5 kbp を含む DNA 断片を pSUT5 の BamHI-ApaI サイトに挿入したプラスミド。
pSHFD3	<i>HFD3</i> の ORF、その上流約 1.0 kbp および下流約 0.5 kbp を含む DNA 断片を pSUT5 の EcoRI-ApaI サイトに挿入したプラスミド。
pSHFD4	<i>HFD4</i> の ORF、その上流約 1.0 kbp および下流約 0.5 kbp を含む DNA 断片を pSUT5 の BamHI-ApaI サイトに挿入したプラスミド。
pSHFD2A	<i>HFD2</i> の A 型タンパク質をコードする ORF 領域とその上流約 1.0 kbp を含む DNA 断片を pSUT5 の <i>XPR2</i> ターミネーター上流に挿入したプラスミド。
pSHFD2B	<i>HFD2</i> の B 型タンパク質をコードする ORF 領域とその上流約 1.0 kbp を含む DNA 断片を pSUT5 の <i>XPR2</i> ターミネーター上流に挿入したプラスミド。
pET3a-HFD1	<i>HFD1</i> の ORF を pET-3a の NdeI-BamHI サイトに挿入したプラスミド。
pET3a-HFD2A	<i>HFD2</i> の A 型タンパク質をコードする ORF 領域を pET-3a の NdeI-BamHI サイトに挿入したプラスミド。
pET3a-HFD3	<i>HFD3</i> の ORF を pET-3a の NdeI-BamHI サイトに挿入したプラスミド。

pET3a-HFD4	<i>HFD4</i> の ORF を pET-3a の NdeI-BamHI サイトに挿入したプラスミド。
pSEGFP-HFD1	Hfd1p の N 末端に EGFP を付加した EGFP-Hfd1p を発現させるプラスミド。
pSEGFP-HFD2	Hfd2p の N 末端に EGFP を付加した EGFP-Hfd2p を発現させるプラスミド。
pSEGFP-HFD3	Hfd3p の N 末端に EGFP を付加した EGFP-Hfd3p を発現させるプラスミド。
pSEGFP-HFD4	Hfd4p の N 末端に EGFP を付加した EGFP-Hfd4p を発現させるプラスミド。
pSEGFP-HFD2A	A 型 Hfd2p の N 末端に EGFP を付加した EGFP-Hfd2Ap を発現させるプラスミド
pSHFD2A-EGFP	A 型 Hfd2p の C 末端に EGFP を付加した Hfd2Ap-EGFP を発現させるプラスミド
pSEGFP-HFD2B	B 型 Hfd2p の N 末端に EGFP を付加した EGFP-Hfd2Bp を発現させるプラスミド
pBUALD1PT	<i>ALD1</i> の上流約 0.7 kbp および下流約 1.1 kbp の領域を pBURA3 の EcoRI-XbaI サイトに挿入したプラスミド。pop-in/pop-out 法による <i>ALD1</i> の破壊に使用した。
pBUALD2PT	<i>ALD2</i> の上流約 1.1 kbp および下流約 0.9 kbp の領域を pBURA3 の EcoRI-XbaI サイトに挿入したプラスミド。pop-in/pop-out 法による <i>ALD2</i> の破壊に使用した。
pBUALD3PT	<i>ALD3</i> の上流約 1.0 kbp および下流約 1.0 kbp の領域を pBURA3 の EcoRI-XbaI サイトに挿入したプラスミド。pop-in/pop-out 法による <i>ALD3</i> の破壊に使用した。
pBUALD4PT	<i>ALD4</i> の上流約 0.8 kbp および下流約 0.7 kbp の領域を pBURA3 の EcoRI-BamHI サイトに挿入したプラスミド。pop-in/pop-out 法による <i>ALD4</i> の破壊に使用した。

### 3-2-4 プラスミドの構築

#### 3-2-4-1 pBUHFD1PT

CXAU1 株の全 DNA を鋳型として、プライマー-HFD1P-F と HFD1P-R を用いて *HFD1* の上流約 1.1 kbp の領域を KOD-Plus-Neo による PCR 法で増幅した後、EcoRI と BamHI で切断した。同様にプライマー-HFD1T-F と HFD1T-R を用いて *HFD1* の下流約 1.0 kbp の領域を増幅した後、BamHI と XbaI で切断した。これらの DNA 断片を pBURA3 の EcoRI-XbaI サイトに挿入し、pBUHFD1PT を得た。このプラスミドを PshAI で直鎖状に

した後、形質転換に用いた。

本項で使用したプライマーの配列 (下線部は制限酵素サイトを示す)

---

HFD1P-F	5'-TTGA <u>ATTCGCA</u> ATTATTTTACAATCATCGACATC-3'
HFD1P-R	5'-TTGGATCCTTGGTGGTGTGTTTGAGGAAGGAGG-3'
HFD1T-F	5'-TTGGATCCACTAACCCCTACTTCCTCATAGAAT-3'
HFD1T-R	5'-GGTCTAGACAACAGTGTACGTAGGGGTCCAACA-3'

---

#### 3-2-4-2 pBUHFD2PT

CXAU1 株の全 DNA を鋳型として、プライマー HFD2P-F と HFD2P-R を用いて *HFD2* の上流約 1.0 kbp の領域を KOD-Plus-Neo による PCR 法で増幅した後、EcoRI と BamHI で切断した。同様にプライマー HFD2T-F と HFD2T-R を用いて *HFD2* の下流約 1.0 kbp の領域を増幅した後、BamHI と XbaI で切断した。これらの DNA 断片を pBURA3 の EcoRI-XbaI サイトに挿入し、pBUHFD2PT を得た。このプラスミドを EcoT22I で直鎖状にした後、形質転換に用いた。

本項で使用したプライマーの配列 (下線部は制限酵素サイトを示す)

---

HFD2P-F	5'-TTGA <u>ATTCGTG</u> AAATCAATAACGTCAAATGTAG-3'
HFD2T-F	5'-TTGGATCCGCGTGTGTTCAAATGTTAGTAAAT-3'
HFD2T-F	5'-TTGGATCCATATTTTACTAACCCACAGTTCGCC-3'
HFD2T-R	5'-GGTCTAGAAATCCTTCTCCTCTTCTTGGAGGGTT-3'

---

#### 3-2-4-3 pBUHFD3PT

CXAU1 株の全 DNA を鋳型として、プライマー HFD3P-F と HFD3P-R を用いて *HFD3* の上流約 1.1 kbp の領域を KOD-Plus-Neo による PCR 法で増幅した後、EcoRI と EcoT22I で切断した。同様にプライマー HFD3T-F と HFD3T-R を用いて *HFD3* の下流約 1.0 kbp の領域を増幅した後、EcoT22I と XbaI で切断した。これらの DNA 断片を pBURA3 の EcoRI-XbaI サイトに挿入し、pBUHFD3PT を得た。このプラスミドを BspT104I で直鎖状にした後、形質転換に用いた。

本項で使用したプライマーの配列 (下線部は制限酵素サイトを示す)

---

HFD3P-F	5'-TTGA <u>ATTCGCGT</u> GCCGGTGCAACCTCCCTCCAGA-3'
HFD3P-R	5'-TTATGCATGGTCTCTCTCACTGTCTTATACTA-3'
HFD3T-F	5'-TTATGCATGATAAAGAGATAACAGCGGGGTATG-3'
HFD3R-R	5'-GGTCTAGACAGAAGCGCGCGTGTGTGGTAATTG-3'

---

#### 3-2-4-4 pBUHFD4PT

CXAU1 株の全 DNA を鋳型として、プライマー-HFD4P-F と HFD4P-R を用いて *HFD4* の上流約 1.0 kbp の領域を KOD-Plus-Neo による PCR 法で増幅した後、EcoRI と EcoT22I で切断した。同様にプライマー-HFD4T-F と HFD4T-R を用いて *HFD4* の下流約 1.0 kbp の領域を増幅した後、EcoT22I と BamHI で切断した。これらの DNA 断片を pBURA3 の EcoRI-BamHI サイトに挿入し、pBUHFD4PT を得た。このプラスミドを MunI で直鎖状にした後、形質転換に用いた。

本項で使用したプライマーの配列 (下線部は制限酵素サイトを示す)

---

HFD4P-F	5'-TTGAATTCGGAGATGGAGCGTTTGAGGACTCTG-3'
HFD4P-R	5'-TTATGCATGCGAGTGAGGAAGAAGGCGTGGAAG-3'
HFD4T-F	5'-TTATGCATAGTTTATGGGTGAGTAATGGATCGT-3'
HFD4T-R	5'-GGGGATCCTTTACCCGTCTGTCTCAACCCTTCA-3'

---

#### 3-2-4-5 pSHFD1

CXAU1 株の全 DNA を鋳型として、プライマー-HFD1P-F2 と HFD1T-R2 を用いて *HFD1* の ORF とその上流約 1.1 kbp と下流約 0.5 kbp を含む領域を KOD-Plus-Neo による PCR 法で増幅した後、EcoRI と ApaI で切断した。この DNA 断片を pSUT5 の EcoRI-ApaI サイトに挿入し、pSHFD1 を得た。塩基配列を読み、挿入した DNA 断片に誤りが無いことを確認した。

本項で使用したプライマーの配列 (下線部は制限酵素サイトを示す)

---

HFD1P-F2	5'-TTGAATTCGGAATCAGAACATAGACAGTCCAGC-3'
HFD1T-R2	5'-TTGGGCCCATGAGGTACAAGAGATAGGGAGACG-3'

---

#### 3-2-4-6 pSHFD2

CXAU1 株の全 DNA を鋳型として、プライマー-HFD2P-F2 と HFD2T-R2 を用いて *HFD2* の ORF とその上流約 1.0 kbp と下流約 0.5 kbp を含む領域を KOD-Plus-Neo による PCR 法で増幅した後、BamHI と ApaI で切断した。この DNA 断片を pSUT5 の BamHI-ApaI サイトに挿入し、pSHFD2 を得た。塩基配列を読み、挿入した DNA 断片に誤りが無いことを確認した。

本項で使用したプライマーの配列 (下線部は制限酵素サイトを示す)

---

HFD2P-F2	5'-TTGGATCCTCCAGAGGTTGTGAAATCAATAACG-3'
HFD2T-R2	5'-TTGGGCCCGTGATTGGCATCTCATTGGACTGGA-3'

---

#### 3-2-4-7 pSHFD3

CXAU1 株の全 DNA を鋳型として、プライマー HFD3P-F2 と HFD3T-R2 を用いて *HFD3* の ORF とその上流約 1.0 kbp と下流約 0.5 kbp を含む領域を KOD-Plus-Neo による PCR 法で増幅した後、EcoRI と ApaI で切断した。この DNA 断片を pSUT5 の EcoRI-ApaI サイトに挿入し、pSHFD3 を得た。塩基配列を読み、挿入した DNA 断片に誤りが無いことを確認した。

本項で使用したプライマーの配列 (下線部は制限酵素サイトを示す)

---

HFD3P-F2	5'-TTGA <u>ATTCT</u> CCCCGACCACAAGAAGACATACCC-3'
HFD3T-R2	5'-TTGGG <u>CCCCA</u> ACATGATGCGTGGAACCTGGGC-3'

---

#### 3-2-4-8 pSHFD4

CXAU1 株の全 DNA を鋳型として、プライマー HFD4P-F2 と HFD4T-R2 を用いて *HFD4* の ORF とその上流約 1.0 kbp と下流約 0.5 kbp を含む領域を KOD-Plus-Neo による PCR 法で増幅した後、BamHI と ApaI で切断した。この DNA 断片を pSUT5 の BamHI-ApaI サイトに挿入し、pSHFD4 を得た。塩基配列を読み、挿入した DNA 断片に誤りが無いことを確認した。

本項で使用したプライマーの配列 (下線部は制限酵素サイトを示す)

---

HFD4P-F2	5'-TTGGATCC <u>GGATG</u> AGGAGATGGAGCGTTTGAGG-3'
HFD4T-R2	5'-TTGGG <u>CCCAT</u> TGGAGATGGAATGTGGCACGGCA-3'

---

#### 3-2-4-9 pSHFD2A

CXAU1 株の全 DNA を鋳型として、プライマー HFD2P-F2 と HFD2A-R を用いて *HFD2* の ORF とその上流約 1.0 kbp を含む領域を KOD-Plus-Neo による PCR 法で増幅した後、BamHI と ApaI で切断した。この DNA 断片を pSUT5 の BamHI-ApaI サイトに挿入し、pSHFD2A を得た。塩基配列を読み、挿入した DNA 断片に誤りが無いことを確認した。

本項で使用したプライマーの配列 (下線部は制限酵素サイトを示す)

---

HFD2P-F2	5'-TTGGATCCTCCAGAGGTTGTGAAATCAATAACG-3'
HFD2A-R	5'-TTGGG <u>CCCTC</u> ATAAGAAAATTCCTGACT-3'

---

#### 3-2-4-10 pSHFD2B

CXAU1 株の全 DNA を鋳型として、プライマー HFD2P-F2 と HFD2B-R を用いて *HFD2* の ORF とその上流約 1.0 kbp を含む領域を KOD-Plus-Neo による PCR 法で増幅した後、BamHI と ApaI で切断した。この DNA 断片を pSUT5 の BamHI-ApaI サイトに挿入し、

pSHFD2B を得た。塩基配列を読み、挿入した DNA 断片に誤りが無いことを確認した。

本項で使用したプライマーの配列 (下線部は制限酵素サイトを示す)

---

HFD2P-F2	5'-TTGGATCCTCCAGAGGTTGTGAAATCAATAACG-3'
HFD2B-R	5'-TTGGGCCCTTATAGCTTTGGGCGAACAAATATCCGCTC CAACA-3'

---

#### 3-2-4-11 pET3a-HFD1

CXAU1 株の全 DNA を鋳型として、プライマー HFD1-F2 と HFD1-R を用いて *HFD1* の ORF 領域を KOD-Plus-Neo による PCR 法で増幅した後、NdeI と BamHI で切断した。この DNA 断片を pET-3a の NdeI-BamHI サイトに挿入し、pET3a-HFD1 を得た。塩基配列を読み、挿入した DNA 断片に誤りが無いことを確認した。

本項で使用したプライマーの配列 (下線部は制限酵素サイトを示す)

---

HFD1-F2	5'-TTCATATGATGTCTACCTTTGATTGGGAATCCA-3'
HFD1-R	5'-TTGGATCCCTAGAGCAGAGCCTTGGCACCAGCA-3'

---

#### 3-2-4-12 pET3a-HFD2

CXAU1 株の全 DNA を鋳型として、プライマー HFD2-F2 と HFD2-R を用いて *HFD2* の ORF 領域を KOD-Plus-Neo による PCR 法で増幅した後、NdeI と BamHI で切断した。この DNA 断片を pET-3a の NdeI-BamHI サイトに挿入し、pET3a-HFD2 を得た。塩基配列を読み、挿入した DNA 断片に誤りが無いことを確認した。

本項で使用したプライマーの配列 (下線部は制限酵素サイトを示す)

---

HFD2-F2	5'-TTCATATGATGTCAGAGTTCGATTGGGAGTC-3'
HFD2-R	5'-TTGGATCCTCATAAGAAAATTCCTGACTTCAAA-3'

---

#### 3-2-4-13 pET3a-HFD3

CXAU1 株の全 DNA を鋳型として、プライマー HFD3-F2 と HFD3-R を用いて *HFD3* の ORF 領域を KOD-Plus-Neo による PCR 法で増幅した後、NdeI と BamHI で切断した。この DNA 断片を pET-3a の NdeI-BamHI サイトに挿入し、pET3a-HFD3 を得た。塩基配列を読み、挿入した DNA 断片に誤りが無いことを確認した。

本項で使用したプライマーの配列 (下線部は制限酵素サイトを示す)

---

HFD3-F2	5'-TTCATATGATGTCCTGGGAAACAATCACTCC-3'
HFD3-R	5'-TTGGATCCCTACTTAATAAACACCGACATAATC-3'

---

#### 3-2-4-14 pET3a-HFD4

CXAU1 株の全 DNA を鋳型として、プライマー-HFD4-F2 と HFD4-R を用いて *HFD4* の ORF 領域を KOD -Plus- Neo による PCR 法で増幅した後、NdeI と BamHI で切断した。この DNA 断片を pET-3a の NdeI-BamHI サイトに挿入し、pET3a-HFD4 を得た。塩基配列を読み、挿入した DNA 断片に誤りが無いことを確認した。

本項で使用したプライマーの配列 (下線部は制限酵素サイトを示す)

---

HFD4-F2	5'-TTC <u>ATATG</u> ATGACTACCACTGCCACAGAGAC-3'
HFD4-R	5'-TTGGATCCCTAGTTGAAGAGTCTCGACCAAAT-3'

---

#### 3-2-4-15 pSEGFP-HFD1

CXAU1 株の全 DNA を鋳型として、プライマー-HFD1P-F3 と HFD1P-R2 を用いて *HFD1* の開始コドンを含む上流約 1.1 kbp の領域を KOD -Plus- Neo による PCR 法で増幅した後、BamHI と EcoRI で切断した。同様にプライマー-HFD1-F と HFD1T-R2 を用いて *HFD1* の ORF と下流約 0.5 kbp の領域を増幅した後、EcoRI と ApaI で切断した。これらの DNA 断片を pSUT5 の BamHI-ApaI サイトに挿入し、pSHFD1pROt を得た。塩基配列を読み、挿入した DNA 断片に誤りが無いことを確認した。

pBS-EGFP を EcoRI と EcoRV で切断して得られた *EGFP* の ORF を含む断片を pSHFD1pROt の EcoRI-EcoRV サイトに挿入し、pSEGFP-HFD1 を得た。

本項で使用したプライマーの配列 (下線部は制限酵素サイトを示す)

---

HFD1P-F3	5'-TTGGATCCGGAATCAGAACATAGACAGTCCAGC-3'
HFD1P-R2	5'-CCGAATTCGATATCCATTTTTATTGGTGGTGTGTTGAGG-3'
HFD1-F	5'-CCGAATTCATGTCTACCTTTGATTGGGAATC-3'
HFD1T-R2	5'-TTGGGCCCATGAGGTACAAGAGATAGGGAGACG-3'

---

#### 3-2-4-16 pSEGFP-HFD2

CXAU1 株の全 DNA を鋳型として、プライマー-HFD2P-F3 と HFD2P-R2 を用いて *HFD2* の開始コドンを含む上流約 1.0 kbp の領域を KOD -Plus- Neo による PCR 法で増幅した後、NotI と BamHI で切断した。同様にプライマー-HFD2-F と HFD2T-R2 を用いて *HFD2* の ORF と下流約 0.5 kbp の領域を増幅した後、BamHI と ApaI で切断した。これらの DNA 断片を pSUT5 の NotI-ApaI サイトに挿入し、pSHFD2pROt を得た。塩基配列を読み、挿入した DNA 断片に誤りが無いことを確認した。

pBS-EGFP を StuI と BamHI で切断して得られた *EGFP* の ORF を含む断片を

pSHFD2pROt の StuI-BamHI サイトに挿入し、pSEGFP-HFD2 を得た。

本項で使用したプライマーの配列 (下線部は制限酵素サイトを示す)

---

HFD2P-F3	5'-TTGCGGCCGCTCCAGAGGTTGTGAAATCAATAACG-3'
HFD2P-R2	5'-TTGGATCCTTTAGGCCTCATGATTGGCGTTGTGTTCAA ATGTT-3'
HFD2-F	5'-TTGGATCCATGTCAGAGTTCGATTGGGAGTC-3'
HFD2T-R2	5'-TTGGGCCCGTGATTGGCATCTCATTGGACTGGA-3'

---

### 3-2-4-17 pSEGFP-HFD3

CXAU1 株の全 DNA を鋳型として、プライマー HFD3P-F3 と HFD3P-R2 を用いて *HFD3* の開始コドンを含む上流約 1.0 kbp の領域を KOD -Plus- Neo による PCR 法で増幅した後、BamHI と HindIII で切断した。同様にプライマー HFD3-F と HFD3T-R2 を用いて *HFD3* の ORF と下流約 0.5 kbp の領域を増幅した後、HindIII と ApaI で切断した。これらの DNA 断片を pSUT5 の BamHI-ApaI サイトに挿入し、pSHFD3pROt を得た。塩基配列を読み、挿入した DNA 断片に誤りが無いことを確認した。

pBS-EGFP を HindIII と EcoRI で切断して得られた *EGFP* の ORF を含む断片を pSHFD3pROt の HindIII-EcoRI サイトに挿入し、pSEGFP-HFD3 を得た。

本項で使用したプライマーの配列 (下線部は制限酵素サイトを示す)

---

HFD3P-F3	5'-TTGGATCCTCCCGACCACAAGAAGAACATACCC-3'
HFD3P-R2	5'-CCAAGCTTCATTGTGGCGGAAGTTGTACACCCAA-3'
HFD3-F	5'-CCAAGCTTGAATTCATGTCCTGGGAAACAATCACTCC T-3'
HFD3T-R2	5'-TTGGGCCCCCAACATGATGCGTGGAACCTGGGC-3'

---

### 3-2-4-18 pSEGFP-HFD4

CXAU1 株の全 DNA を鋳型として、プライマー HFD4P-F3 と HFD4P-R2 を用いて *HFD4* の開始コドンを含む上流約 1.0 kbp の領域を KOD -Plus- Neo による PCR 法で増幅した後、NotI と HindIII で切断した。同様にプライマー HFD4-F と HFD4T-R2 を用いて *HFD4* の ORF と下流約 0.5 kbp の領域を増幅した後、HindIII と ApaI で切断した。これらの DNA 断片を pSUT5 の NotI-ApaI サイトに挿入し、pSHFD4pROt を得た。塩基配列を読み、挿入した DNA 断片に誤りが無いことを確認した。

pBS-EGFP を HindIII と BamHI で切断して得られた *EGFP* の ORF を含む断片を pSHFD4pROt の HindIII-BamHI サイトに挿入し、pSEGFP-HFD4 を得た。

本項で使用したプライマーの配列 (下線部は制限酵素サイトを示す)

---

HFD4P-F3	5'-TTGCGGCCGCGGATGAGGAGATGGAGCGTTTGAGG-3'
HFD4P-R2	5'-CCAAGCTTCATTCTTCGCGAGTGAGGAAGAAGGC-3'
HFD4-F	5'-CCAAGCTTGGATCCATGACTACCACTGCCACAGAGA C-3'
HFD4T-R2	5'-TTGGGCCCATTTGGAGATGGAATGTGGCACGGCA-3'

---

### 3-2-4-19 pSEGFP-HFD2A

CXAU1 株の全 DNA を鋳型として、プライマー HFD2-F と HFD2A-R を用いて *HFD2* の ORF 領域を KOD -Plus- Neo による PCR 法で増幅した後、BamHI と ApaI で切断し、pSHFD2pROt の BamHI-ApaI サイトに挿入し、pSHFD2ApROt を得た。pBS-EGFP を StuI と BamHI で切断して得られた *EGFP* の ORF を含む断片を pSHFD2ApROt の StuI-BamHI サイトに挿入し、pSEGFP-HFD2A を得た。塩基配列を読み、挿入した DNA 断片に誤りが無いことを確認した。

本項で使用したプライマーの配列 (下線部は制限酵素サイトを示す)

---

HFD2-F	5'-TTGGATCCATGTCAGAGTTTCGATTGGGAGTC-3'
HFD2A-R	5'-TTGGGCCCTCATAAGAAAATTCCTGACT-3'

---

### 3-2-4-20 pSHFD2A-EGFP

CXAU1 株の全 DNA を鋳型として、プライマー HFD2P-F3 と HFD2A-R2 を用いて *HFD2* の ORF と上流約 1.0 kbp の領域を KOD -Plus- Neo による PCR 法で増幅した後、NotI と BamHI で切断し、pSUT5 の NotI-BamHI サイトに挿入し、pSHFD2AORt を得た。pBS-EGFP を StuI と BamHI で切断して得られた *EGFP* の ORF を含む断片を pSHFD2AORt の StuI-BamHI サイトに挿入し、pSHFD2AORt2 を得た。BamTAABspApa-F と BamTAABspApa-R をアニーリングして得られた断片をリン酸化した後、pSHFD2AORt2 の BamHI-ApaI サイトに挿入して、pSHFD2A-EGFP を得た。塩基配列を読み、挿入した DNA 断片に誤りが無いことを確認した。

本項で使用したプライマーの配列 (下線部は制限酵素サイトを示す)

---

HFD2P-F3	5'-TTGCGGCCGCTCCAGAGGTTGTGAAATCAATAACG-3'
HFD2A-R2	5'-TTGGATCCTTTAGGCCTTAAGAAAATTCCTGACT-3'
BamTAABspApa-F	5'-GATCCTAATTCGAAGGGCC-3'
BamTAABspApa-R	5'-CTTCGAATTAG-3'

---

### 3-2-4-21 pSEGFP-HFD2B

CXAU1 株の全 DNA を鋳型として、プライマー-HFD2-F と HFD2B-R を用いて *HFD2* の ORF 領域を KOD-Plus-Neo による PCR 法で増幅した後、BamHI と ApaI で切断し、pSHFD2pROt の BamHI-ApaI サイトに挿入し、pSHFD2BpROt を得た。pBS-EGFP を StuI と BamHI で切断して得られた *EGFP* の ORF を含む断片を pSHFD2BpROt の StuI-BamHI サイトに挿入し、pSEGFP-HFD2B を得た。塩基配列を読み、挿入した DNA 断片に誤りが無いことを確認した。

本項で使用したプライマーの配列 (下線部は制限酵素サイトを示す)

HFD2-F	5'-TTGGATCCATGTCAGAGTTCGATTGGGAGTC-3'
HFD2B-R	5'-TTGGGCCCTTATAGCTTTGGGCGAACAAATATCCGCTC CAACA-3'

#### 3-2-4-22 pBUALD1PT

CXAU1 株の全 DNA を鋳型として、プライマー-ALD1P-F と ALD1P-R を用いて *ALD1* の上流約 0.7 kbp の領域を KOD-Plus-Neo による PCR 法で増幅した後、EcoRI と EcoT22I で切断した。同様にプライマー-ALD1T-F と ALD1T-R を用いて *ALD1* の下流約 1.1 kbp の領域を増幅した後、EcoT22I と BamHI で切断した。これらの DNA 断片を pBURA3 の EcoRI-BamHI サイトに挿入し、pBUALD1PT を得た。このプラスミドを NheI で直鎖状にした後、形質転換に用いた。

本項で使用したプライマーの配列 (下線部は制限酵素サイトを示す)

ALD1P-F	5'-TTGAATTCCTCGGTACGAGGCAGTATGCAAGT-3'
ALD1P-R	5'-TTATGCATCTGTACAGAGAGATCCGAATCCAAC-3'
ALD1T-F	5'-CCATGCATATAAGATAGATCAACGAACAACGAG-3'
ALD1T-R	5'-TTGGATCCTCTGGCTGGCTTGTGCACAAACGTA-3'

#### 3-2-4-23 pBUALD2PT

CXAU1 株の全 DNA を鋳型として、プライマー-ALD2P-F と ALD2P-R を用いて *ALD2* の上流約 1.1 kbp の領域を KOD-Plus-Neo による PCR 法で増幅した後、EcoRI と BamHI で切断した。同様にプライマー-ALD2T-F と ALD2T-R を用いて *ALD2* の下流約 0.9 kbp の領域を増幅した後、BamHI と XbaI で切断した。これらの DNA 断片を pBURA3 の EcoRI-XbaI サイトに挿入し、pBUALD2PT を得た。このプラスミドを Bsp1407I で直鎖状にした後、形質転換に用いた。

本項で使用したプライマーの配列 (下線部は制限酵素サイトを示す)

ALD2P-F	5'-TTGAATTCCTGTGCGAGCGCATCCCCAATTGCTA-3'
---------	--

ALD2P-R	5'-TTGGATCCTGTGTTTCAATTGGGTTCTTGTGCT-3'
ALD2T-F	5'-TTGGATCCATGGGACAGATTGAGAGAGATGTGA-3'
ALD2T-R	5'-CCTCTAGATATTGTCTTCCAGTACCCAAAACCC-3'

---

#### 3-2-4-24 pBUALD3PT

CXAU1 株の全 DNA を鋳型として、プライマー-ALD3P-F と ALD3P-R を用いて *ALD3* の上流約 1.0 kbp の領域を KOD-Plus-Neo による PCR 法で増幅した後、XbaI と EcoT22I で切断した。同様にプライマー-ALD3T-F と ALD3T-R を用いて *ALD3* の下流約 1.0 kbp の領域を増幅した後、EcoT22I と SacII で切断した。これらの DNA 断片を pBURA3 の XbaI-SacII サイトに挿入し、pBUALD3PT を得た。このプラスミドを BspT104I で直鎖状にした後、形質転換に用いた。

本項で使用したプライマーの配列 (下線部は制限酵素サイトを示す)

ALD3P-F	5'-AATCTAGAGGCTGATCGATTTATGGACTTTT-3'
ALD3P-R	5'-TTATGCATATATTTAGAGTTCGGGATAAAGT-3'
ALD3T-F	5'-TTATGCATACGATGAGCGAACGAATCGTCTT-3'
ALD3T-R	5'-TTCCGCGGTAGGTCATCACAACGGTGTCTTCT-3'

---

#### 3-2-4-25 pBUALD4PT

CXAU1 株の全 DNA を鋳型として、プライマー-ALD4P-F と ALD4P-R を用いて *ALD4* の上流約 0.8 kbp の領域を KOD-Plus-Neo による PCR 法で増幅した後、EcoRI と BamHI で切断した。同様にプライマー-ALD4T-F と ALD4T-R を用いて *ALD4* の下流約 0.7 kbp の領域を増幅した後、BamHI と XbaI で切断した。これらの DNA 断片を pBURA3 の EcoRI-XbaI サイトに挿入し、pBUALD4PT を得た。このプラスミドを EcoT22I で直鎖状にした後、形質転換に用いた。

本項で使用したプライマーの配列 (下線部は制限酵素サイトを示す)

ALD4P-F	5'-TTGAATTCATTTCGCATAGACCCCAGGCTTTG-3'
ALD4P-R	5'-TTGGATCCAGACGTCAGCTTATATACACTA-3'
ALD4T-F	5'-TTGGATCCCAAGTAGTTGAATGAACGAATTT-3'
ALD4T-R	5'-AATCTAGAACCGTCAAGGCCTGTTTCCCCGA-3'

---

### 3-2-5 遺伝子操作

1-2-5 に従った。

### 3-2-6 PCR

1-2-6 に従った。

### 3-2-7 塩基配列の決定

1-2-7 に従った。

### 3-2-8 *Y. lipolytica* の形質転換

1-2-8 に従った。

### 3-2-9 Pop-in/pop-out 法による破壊株の作製

2-2-9 に従った。

### 3-2-10 *Y. lipolytica* の全 DNA の調製

1-2-9 に従った。

### 3-2-11 サザンハイブリダイゼーション

2-2-11 に従った。

### 3-2-12 *Y. lipolytica* の全 RNA の調製

1-2-10 に従った。

### 3-2-13 ノーザンハイブリダイゼーション

RNA の電気泳動は成書 Molecular Cloning 及び Current Protocols in Molecular Biology に従った。メンブレンには Nylon Membranes, positively charged (F. Hoffmann-La Roche, Ltd.) を使用し、シグナルの検出には CSPD system (F. Hoffmann-La Roche, Ltd.)を用い、添付の説明書に従った。

プローブ DNA の標識には PCR DIG Probe Synthesis Kit (F. Hoffmann-La Roche, Ltd.)を使用し、CXAU1 株の全 DNA より以下に示すプライマーを用いて PCR 法により増幅した。

遺伝子	プライマー	配列
<i>HFD1</i>	Northern(HFD1-F)	5'-CTGGATTAACGAGTTCTACAGTGGT-3'
	Northern(HFD1-R)	5'-CTTGTCAGTGAAGACGTACATGG-3'
<i>HFD2</i>	Northern(HFD2-F)	5'-CTCAAGTACAAGTTCGACAAAATCA-3'
	Northern(HFD2-R)	5'-TTGCAATATGAGTGAAGTCCTTATG-3'
<i>HFD3</i>	Northern(HFD3-F)	5'-ATCTGTCCCATATCATTTCCAAG-3'

	Northern(HFD3-R)	5'-ATGACCTCGTTGATGTTTACAGAA-3'
<i>HFD4</i>	Northern(HFD4-F)	5'-TGGACAAGTTCTACCCTAACAACTC-3'
	Northern(HFD4-R)	5'-TTATCTGAAAAGATGTACTCTGCCA-3'

---

### 3-2-14 RACE

1-2-11 に従った。遺伝子特異的プライマーとして以下のプライマーを用いた。

#### Primers for *HFD1* RACE

---

HFD1_RACE-GSP1	5'-CGTACATGGCAAGAGGGGTGTCGTGG-3'
HFD1_RACE-NGSP1	5'-CGGGGACCTTTGCGACGACAGTAGGAGC-3'
HFD1_RACE-GSP2	5'-GCTCTGGCTGCCGGTAACACTGTGGCTG-3'
HFD1_RACE-NGSP2	5'-GCTTGCCGCTAAGCGAGCCCTGTGG-3'

#### Primers for *HFD2* RACE

---

HFD2_RACE-GSP1	5'-CCCATAGCCGGATTGGCCGACACCACC-3'
HFD2_RACE-NGSP1	5'-GGCTGTCAGGATGGGCAGGATAGGGC-3'
HFD2_RACE-GSP2	5'-GACCATCTCTCCCCTGCTTGCTGCTC-3'
HFD2_RACE-NGSP2	5'-CAGGGAGGCGTTCCGGTAGTGTCGGAG-3'

#### Primers for *HFD3* RACE

---

HFD3_RACE-GSP1	5'-CCACTGAGAGGCAGAGAGGCCAGTCC-3'
HFD3_RACE-NGSP1	5'-CACCTGGATGTCTCCCTTGGTCTGGGCG-3'
HFD3_RACE-GSP2	5'-CCCCGAATCCGACCCGTTCCCTCTG-3'
HFD3_RACE-NGSP2	5'-CCGAAACGGAGCCGTTGGTTCGAATC-3'

#### Primers for *HFD4* RACE

---

HFD4_RACE-GSP1	5'-CAGGGGGGTGGGGTGGTGCTCAAG-3'
HFD4_RACE-NGSP1	5'-TCGTGGACCTCGGGACACACCAGAAC-3'
HFD4_RACE-GSP2	5'-CGTCGCCAAAGATCCGAAACGGCCC-3'
HFD4_RACE-NGSP2	5'-GCTGCCCTGGACCCCAGCTCTTTCA-3'

---

### 3-2-15 全 RNA からの DNA の除去

1-2-11 に従って調製した全 RNA 溶液から DNaseI (Takara Bio Inc.)を用いて DNA を除去した。操作は添付の説明書に従った。DNaseI 処理の際に用いる RNase inhibitor としては RNase OUT (invitrogen)を用いた。

### 3-2-16 全 RNA を鋳型とした逆転写反応

RNA の逆転写には、DNA の除去を行った全 RNA 溶液に対して PrimeScript™ reagent Kit (Perfect Real Time) (Takara Bio Inc.)を用い、方法は添付の説明書に従った。但し、逆転写に用いた全 RNA は反応液 10 µl 中 500 ng とした。

### 3-2-17 定量的リアルタイム PCR

定量的リアルタイム PCR (quantitative real-time PCR; qRT-PCR)用試薬には SYBR® Premix Ex Taq™ (Perfect Real Time) (Takara Bio Inc.)を用い、反応は Smart Cycler II (Cepheid Inc.)を用いて行い、いずれの操作も添付の説明書に従った。但し、PCR 反応は 1 サイクル (95°C 10 sec)、40 サイクル (95°C 5sec、60°C 20 sec)で行った。遺伝子特異的プライマーとして以下のプライマーを用いた。

遺伝子	プライマー	配列
HFD1	RT-PCR (HFD1-F)	5'-CTGGATTAACGAGTTCTACAGTGGT-3'
	RT-PCR (HFD1-R)	5'-TGTTACCTCCAGTAATGATCTCTCC-3'
HFD2	RT-PCR (HFD2-F)	5'-TAGGTGAGATCGAGAAGGATATTCA-3'
	RT-PCR (HFD2-R)	5'-GAGCATAGAAAAGCTTACGAATCTG-3'
HFD3	RT-PCR (HFD3-F)	5'-CAGGTTGATTACGTCACAAGAAAC-3'
	RT-PCR (HFD3-R)	5'-AATGACCTCGTTGATGTTTACAGA-3'
HFD4	RT-PCR (HFD4-F)	5'-GTACAACAAGAGCAACGAGAAGTTT-3'
	RT-PCR (HFD4-R)	5'-TAGTTGAAGAGTCTCGACCAAATC-3'

### 3-2-18 *Y. lipolytica* 細胞破碎液 (FALDH 活性測定用) の調製

#### 試薬

#### 菌体破碎用緩衝液

4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid (HEPES)-KOH 緩衝液(pH 7.25)	25 mM
KCl	100 mM
グリセロール	10%(w/v)
DTT	1 mM
Protease inhibitor cocktail for use with fungal and yeast extracts, DMSO solution	1%(v/v)

#### Tween-80

Tween-80	10%(v/v)
----------	----------

## 操作

- 1) 適当な培養液から回収した菌体を破砕チューブに集菌した。
- 2) 500  $\mu$ l の菌体破砕バッファーおよび菌体と同体積のガラスビーズ（直径 0.5 mm、低アルカリ）を加えた後、マルチビーズショッカー（YASUI KIKAI）を用いて 2,700 rpm で 1 分間の運転の後、1 分間の停止を 3 サイクル行い菌体破砕した。
- 3) 1,000 xg、2 min、4°C の遠心分離によりガラスビーズと未破砕の菌体を分離し、その上清をさらに 1,000 xg、10 min、4°C の遠心分離を 2 回行い、未破砕菌体を分離し、上清を分取した。
- 4) 上清に終濃度 1%(v/v) となるように Tween-80 を加えて、氷上で 20 分静置した。
- 5) 15,000 xg、10 min、4°C の遠心分離を行い、上清を細胞抽出液とした。

細胞抽出液のタンパク質濃度の定量には Protein Assay (Bio-Rad Laboratories) を用い、BSA をスタンダードとした。

### 3-2-19 FALDH 活性測定

#### 試薬

##### M-Buffer

HEPES-KOH 緩衝液 (pH 7.25)	25 mM
グリシン	100 mM

##### Tween-80 溶液

3-2-18 に記載

##### DTT 溶液

DTT	1 M
-----	-----

##### NAD<sup>+</sup>溶液

$\beta$ -Nicotinamide Adenine Dinucleotide Hydrate, oxidized form  
[for Biochemical Research] (Tokyo Chemical Industry Co., Ltd.)  
4 mM in M-Buffer

## 操作

- 1) 15 ml シーラムチューブに M-Buffer 6750  $\mu$ l、Tween-80 溶液 250  $\mu$ l、DTT 溶液 10  $\mu$ l、基質 (終濃度 1 mM) を混合し、30°C で振盪した。
- 2) 小型アナログ超音波ホモジナイザー Sonifier 250A (BRANSON) で乳化処理した。
- 3) 96 穴マイクロプレート (Greiner Bio-One) に上記の混合液を 140  $\mu$ l 入れた。細胞抽出

液 10  $\mu$ l 入れた後、NAD<sup>+</sup>溶液を 50  $\mu$ l 添加して攪拌した。

- 4) マイクロプレート を グレーティング マイクロプレート リーダー SH-8000(Lab) (CORONA ELECTRIC) に セット して 測定 した。測定 条件 は、測定 方式; 吸光度 (1 波長)、測定 法; カイネティック (Plate)、プレート; 96 ウェル、波長; 340 nm、半値幅; 12 nm、焦点; 3、ミキシング レベル; 中、ミキシング モード; 回転、ミキシング 時間; 10.0 秒、測定 感度; x1、フラッシュ 回数; 20、温度; 30°C、測定 方向; 横、カイネティック 繰り返し 回数; 20、カイネティック 測定 間隔; 30.0 秒、カイネティック ミキシング; 初回のみ、とした。

反応の結果生じる NADH ( $\beta$ -Nicotinamide Adenine Dinucleotide Hydrate, reduced form) のモル吸光係数は  $6.22 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  である。1 unit を 1 分間で 1  $\mu$ mol の NADH を生じる酵素量として定義し、粗酵素溶液中のタンパク質 1 mg あたりの munit 数を算出した。

### 3-2-20 *E. coli* を用いた Hfd タンパク質の発現

#### 試薬

##### IPTG 溶液

Isopropyl  $\beta$ -D-1-thiogalactopyranoside (IPTG) (nacalai tesque)

200 mg/ml

##### PBS

1-2-14 に記載

#### 操作

- 1) プラスミド pET3b-HFD1、pET3b-HFD2、pET3b-HFD3、pET3b-HFD4 をそれぞれ BL21 (DE3) のコンピテントセル (Novagen) に導入した。
- 2) 一晚培養後、現れたコロニーを 10 ml LB 培地に植菌し、25°C において  $\text{OD}_{600} = 0.4 \sim 0.6$  となるまで培養し、誘導基質として IPTG を終濃度 1 mM となるように添加した。
- 3) 25°C において 4 時間の誘導培養後、4°C にて 3,300 rpm で 5 分間遠心して集菌し、冷却した PBS にて一度洗浄した。

### 3-2-21 *E. coli* 細胞破碎液 (FALDH 活性測定用) の調製

#### 試薬

##### 菌体破碎用緩衝液

3-2-18 に記載

#### 操作

- 1) 菌体を破碎チューブに回収した。

- 2) 200  $\mu$ l の菌体破碎バッファーおよび菌体と同体積のガラスビーズ（直径 0.3 mm、低アルカリ）を加えたのち、マルチビーズショッカー（YASUI KIKAI）を用いて 2,700 rpm で 1 分間の運転の後、30 秒間の停止を 5 サイクル行い、菌体を破碎した。
- 3) 1,000 g、2 min、4°C の遠心分離によりガラスビーズと未破碎の菌体を分離し、その上清をさらに 1,000 g、10 min、4°C の遠心分離を 2 回行い、未破碎菌体を分離し、上清を分取した。
- 4) 13,000 g、10 min、4°C の遠心分離を行い、上清を細胞抽出液とした。

### 3-2-22 SDS-PAGE

2-2-18 に従った。

### 3-2-23 蛍光顕微鏡観察

2-2-15 に従った。

### 3-2-24 スポットアッセイによる酵母の植菌

2-2-12 に従った。

## 3-3 結果

### 3-3-1 長鎖アルデヒドデヒドロゲナーゼ遺伝子の探索と RACE 解析

#### 3-3-1-1 長鎖アルデヒドデヒドロゲナーゼ遺伝子の探索

小林らにより行われた *Y. lipolytica* の網羅的転写解析の結果から、グルコースを炭素源とした場合と比較して *n*-デカンを炭素源とした場合に発現が大きく誘導される遺伝子の中に、哺乳類の ALDH3A2 と相同性のあるタンパク質をコードする遺伝子として、*YALI0A17875g*、*YALIOE15400g*、*YALIOF23793g* が見出された。さらに、*Y. lipolytica* のゲノムにはこれらと類似性の高い遺伝子として *YALIOB01298g* も見出された。ALDH3A2 は炭素鎖長 6 から 24 の不飽和脂肪族アルデヒドに対して活性がある長鎖アルデヒドデヒドロゲナーゼであり[101]、ヒトにおいて ALDH3A2 の欠損は遺伝性魚鱗癬の一種であるシェーグレン・ラルソン症候群(Sjögren-Larsson syndrome; SLS)の原因であることが報告されている[102]。*S. cerevisiae* において、ALDH3A2 と相同性のあるタンパク質をコードする遺伝子として *HFD1* が見出されているが、その産物である Hfd1p がスフィンゴシン-1-リン酸 (sphingosine-1-phosphate; S-1-P)の代謝過程において生じるヘキサデセナールをヘキサデセン酸へと変換することが示されている[103]。*Y. lipolytica* においては、*YALIOF23793g* が *HFD1* と名付けられていたが、その機能は不明であった[104]。そこで、*YALIOE15400g*、*YALIOA17875g*、*YALIOB01298g* をそれぞれ *HFD2*、*HFD3*、*HFD4* と命名した。*S. cerevisiae* でアセトアルデヒドに対して活性があることが分かっている

アルデヒドデヒドロゲナーゼをコードする *ALD* 遺伝子群および *Y. lipolytica* におけるこれらのホモログを加えて、*S. cerevisiae* と *Y. lipolytica* のアルデヒドデヒドロゲナーゼ遺伝子産物群の分子系統樹を Figure 3-1A に示す。これらアルデヒドデヒドロゲナーゼ遺伝子群は大きく2つのクレードに分かれ、*ALD* 遺伝子産物群と *HFD* 遺伝子産物群はそれぞれ別のクレードに属することが分かった。

### 3-3-1-2 *HFD* 遺伝子群の RACE 解析

Hfd タンパク質にタグを付加した融合タンパク質を発現させてそれらの挙動や局在を解析するためには、*HFD* 遺伝子の ORF を明らかにする必要がある。そこで、野生型株をグルコースで対数増殖期まで培養し、*n*-デカンで1時間誘導した細胞から抽出した RNA を用いて RACE 解析を行い、*HFD1*、*HFD2*、*HFD3*、*HFD4* の mRNA 配列を決定した。それぞれの遺伝子の5'側、3'側について5サンプルずつシーケンスした結果、*HFD1*、*HFD3*、*HFD4* の ORF 領域は Génolevures プロジェクト (<http://www.genolevures.org>) で予想された領域と一致し、それぞれ 519、533、529 アミノ酸をコードすると推定された。一方、*HFD2* からは2種の mRNA が転写されることが示唆され、それぞれの mRNA から翻訳されると推定されるタンパク質をそれぞれ、Hfd2Ap、Hfd2Bp と命名した。Hfd2Ap は Génolevures プロジェクトで予想された 521 アミノ酸のタンパク質であるのに対して、Hfd2Bp はペルオキシソームターゲティングシグナル1 (peroxisomal targeting signal 1; PTS1) 様の配列を C 末端に有する 503 アミノ酸のタンパク質であった。Hfd2Bp をコードする mRNA は 1494 番目から 1588 番目までの領域がスプライシングにより除去されたものであると考えられる (Figure 3-1B)。グルコースで培養した菌体から調製した cDNA を用いて *HFD2* の 3'-RACE 解析を行ったところ、2つの mRNA の比は 1:1 であった (Table 3-1)。グルコースおよび *n*-ドデカンを含む培地、または *n*-ドデカンのみを含む培地で培養した菌体から調製した cDNA を用いて *HFD2* の 3'-RACE 解析を行ったが、グルコースで培養した場合と比較して、2つの mRNA の量比に有意な差は見られなかった ( $\chi^2 = 0.1081$ , 自由度 2,  $P = 0.9474$ ) (Table 3-1)。

RACE 解析の結果から予測される ORF からアミノ酸配列を推定し、SMART (<http://smart.embl-heidelberg.de>)、PROSITE (<http://prosite.expasy.org>) によりドメイン、モチーフ等を調べた。Hfd1p、Hfd3p、Hfd4p には典型的な PTS1 様の配列は見られなかった。全ての Hfd タンパク質群はアルデヒドデヒドロゲナーゼファミリーに属するとともに、ニコチンアミドリボースに配位するグルタミン酸残基、およびアルデヒドデヒドロゲナーゼ活性中心に位置し触媒作用を担うシステイン残基は全ての Hfd タンパク質群に保存されていた[105]。それぞれのタンパク質の分子量は、Hfd1p では 60.0 kDa、Hfd2Ap では 58.1 kDa、Hfd3p では 57.8 kDa、Hfd4p では 58.4 kDa であった。TMHMM (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>) を用いて解析したところ、Hfd1p と Hfd2Ap の C 末端に膜貫通領域が1つ予想された。

### 3-3-2 HFD 遺伝子群の発現解析

*HFD1*、*HFD2*、*HFD3*、*HFD4* の転写をノーザン解析および qRT-PCR 解析により調べた。

#### 3-3-2-1 HFD 遺伝子群のノーザン解析

*Y. lipolytica* を SD 液体培地で前培養した後、グルコース培地あるいは *n*-デカンを炭素源とした培地で 1 時間培養した。回収した菌体から全 RNA を抽出して、*HFD1*、*HFD2*、*HFD3*、*HFD4* のノーザン解析を行った (Figure 3-2A)。ノーザン解析用のプローブの特異性を確認するため、それぞれ *HFD* 遺伝子の単独破壊株を pop-in/pop-out 法により作製し、解析に用いた (Figure 3-3)。*n*-デカン培地で培養した野生型株では、*HFD1*、*HFD2*、*HFD3* の転写産物量はグルコース培地で培養した場合と比較して大きく増加していた。それに対して、*HFD4* はグルコース培地および *n*-デカン培地のいずれで培養しても、転写産物量に大きな変化は見られなかった。この結果は、網羅的転写解析の結果と一致した。

#### 3-3-2-2 HFD 遺伝子群の qRT-PCR 解析

SD 液体培地で前培養した野生型株をグルコース、*n*-デカン、*n*-ドデカン、*n*-テトラデカン、*n*-ヘキサデカンあるいはオレイン酸を炭素源とする培地で 1 時間培養した後、全 RNA を抽出して cDNA を調製し、*HFD1*、*HFD2*、*HFD3*、*HFD4* に特異的なプライマーを用いて qRT-PCR を行った (Figure 3-2B)。網羅的転写解析およびノーザン解析の結果と同様に、*HFD1*、*HFD2*、*HFD3* の mRNA 量はグルコース培地と比較して *n*-アルカン培地で大きく増加したのに対して、*HFD4* は *n*-アルカン培地では大きな増加は見られなかった。また、*HFD4* の mRNA 量は *HFD1*、*HFD2*、*HFD3* と比較して少なかった。*HFD3* は *n*-ヘキサデカン培地で培養した場合に *n*-デカン、*n*-ドデカン、*n*-テトラデカン培地で培養した場合と比較して mRNA 量が多いのに対して、*HFD1*、*HFD2* は *n*-デカン培地で培養した場合に mRNA 量が多くなった。さらに、*HFD1* はグルコース培地で培養した場合と比較してオレイン酸で培養した場合には mRNA 量の増加が見られた。

### 3-3-3 HFD 遺伝子群破壊株の生育

*HFD* 遺伝子群の単独破壊株に加えて、2 重破壊株、3 重破壊株、4 重破壊株も作製した (Figure 3-3)。作製した破壊株の *n*-アルカンを単一の炭素源とした場合の生育を調べた (Figure 3-4A, Table 3-2)。単独破壊株はいずれもグルコースや *n*-アルカンを単一の炭素源とした培地で野生型株と同程度の生育を示した。それに対して、*HFD* 遺伝子群 4 重破壊株 ( $\Delta hfd1-4$  株) はグルコースでは野生型株と同程度の生育を示したが、炭素鎖長 12 以上の *n*-アルカンを炭素源した場合には生育できず、*n*-デカンや *n*-ウンデカンを炭

素源とした場合にも野生型株と比較して生育の遅延を示した。また、*HFD* 遺伝子群の中で、*HFD1* を単独で持つ株はいずれの *n*-アルカンを炭素源として与えても野生型株と同程度の生育を示した。*HFD3* を単独で持つ株は炭素鎖長 12 以上の *n*-アルカンを炭素源した場合には野生型株と同程度の生育を示したが、*n*-デカンや *n*-ウンデカンを炭素源とした場合に僅かに生育の遅延を示した。*HFD2* と *HFD4* のそれぞれを単独で持つ株はいずれの *n*-アルカンを炭素源とした場合も野生型株と比較して生育の遅延が見られた。また、 $\Delta hfd1-4$  株に *HFD* 遺伝子群をそれぞれ単独にプラスミドで戻した場合についても、染色体上にそれぞれの遺伝子を 1 つずつ持つ 3 重破壊株と同様の傾向を示した (Table 3-2)。次に、*HFD1*–*HFD4* を単独で持つ株の *n*-ヘキサデカンを炭素源とした場合のコロニーの形状を観察したところ、*HFD1* または *HFD3* を単独で発現する株は野生型株と同様に菌糸状に大きく広がって生育していた (Figure 3-4B)。それに対して、*HFD2* または *HFD4* を単独で発現する株は菌糸状の広がりが小さかった (Figure 3-4B)。これらの結果から、*HFD1* と *HFD3* が *n*-アルカン代謝において主要な役割を果たす長鎖アルデヒドデヒドロゲナーゼ遺伝子群であることが示唆された。このことと一致するように、*HFD1* と *HFD3* の 2 重破壊株は長鎖 *n*-アルカンにおいて生育遅延を示した (Table 3-2)。 $\Delta hfd1-4$  株の *n*-アルカンを炭素源とした場合の生育の悪化が *n*-アルカンの毒性によるものかを調べるために、SD 固体培地に *n*-アルカンを与えた場合の生育を観察した (Figure 3-4A, Table 3-3)。 $\Delta hfd1-4$  株は SD 固体培地上ではいずれの *n*-アルカンを与えた場合にも野生型株と同程度に生育したことから、 $\Delta hfd1-4$  株が *n*-アルカンで生育できないのは *n*-アルカンの毒性によるものではなく、*n*-アルカンを資化できないためであることが示唆された。

また  $\Delta hfd1-4$  株の *n*-アルカンの代謝産物を炭素源とした場合の生育も調べた。1-ドデカノール、ドデカナール、ドデカン酸のいずれを単一の炭素源とした場合にも、 $\Delta hfd1-4$  株は野生型株と同様に生育した (Figure 3-4A, Table 3-4)。これらの結果から、*n*-アルカン代謝の結果生じる長鎖アルデヒドの代謝酵素と細胞外から取り込んだ長鎖アルデヒドの代謝酵素が異なる可能性が考えられる。

### 3-3-4 長鎖アルデヒドデヒドロゲナーゼ活性測定

#### 3-3-4-1 *Y. lipolytica* の細胞破碎液中の長鎖アルデヒドデヒドロゲナーゼ活性

SD 液体培地で前培養した野生型株および  $\Delta hfd1-4$  株を SD 液体培地で 24 時間培養した後、*n*-デカンを添加してさらに 6 時間培養した菌体と、SD 液体培地で 30 時間培養した菌体から細胞抽出液を調製した。これら細胞抽出液を用いて、ドデカナールまたはテトラデカナールを基質にした長鎖アルデヒドデヒドロゲナーゼ活性 (FALDH 活性) を測定した (Figure 3-5A)。いずれの基質を用いた場合にも、*n*-デカンを含む培地で培養した野生型株の細胞抽出液の FALDH 活性はグルコースで培養した場合と比較して顕著に上昇することが示された。それに対して、 $\Delta hfd1-4$  株においては、*n*-デカンを含む培地で

培養しても FALDH 活性の上昇は見られなかった。これらの結果から、野生型株を *n*-デカンを炭素源として培養するとグルコース培地で培養した場合と比較して FALDH 活性が増加すること、 $\Delta hfd1-4$  株は *n*-アルカンによって誘導される FALDH 活性に欠損があることが示された。

#### 3-3-4-2 大腸菌で発現させた Hfd タンパク質の FALDH 活性

Hfd タンパク質群が FALDH 活性を持つのかを確認するために、それぞれの Hfd タンパク質を大腸菌で生産させ、精製することを試みた。しかしながら、N 末端に His<sub>6</sub> タグまたはグルタチオン-S-トランスフェラーゼ (glutathione S-transferase; GST) タグを融合した Hfd タンパク質を大腸菌で発現させた場合には精製することができなかった。そこで、タグを付加しない Hfd タンパク質を大腸菌で発現させ、細胞破碎液を用いて FALDH 活性測定を行うことにした。pET-3a に各 HFD 遺伝子群 (HFD2 に関しては Hfd2Ap をコードする ORF) の ORF 領域をクローニングして、pET3a-HFD1、pET3a-HFD2A、pET3a-HFD3、pET3a-HFD4 を作製し、ベクターである pET-3a も含めて *E. coli* BL21 (DE3) 株に導入した。25°C において LB 液体培地で OD<sub>600</sub> = 0.4 ~ 0.6 になるまで培養し、IPTG を終濃度 0.1 mM となるように添加して、さらに 4 時間培養し、菌体を回収した。これら菌体の全タンパク質を SDS-PAGE に供したところ、pET3a-HFD1、pET3a-HFD2A、pET3a-HFD3、pET3a-HFD4 を導入した株では、pET-3a を導入した株では見られないバンドが検出され (Figure 3-5B, upper panel, arrowhead)、大腸菌内でタンパク質が発現していることが示唆された。Hfd2Ap、Hfd3p および Hfd4p 由来と考えられるバンドの移動度から予想される分子量がアミノ酸配列から予想された分子量と同程度にあるのに対して、Hfd1p 由来のバンドの移動度が高かったため、Hfd1p は大腸菌内で分解されている可能性が考えられた。細胞破碎液を用いて FALDH 活性を測定したところ、Hfd タンパク質を発現していない大腸菌の細胞破碎液では FALDH 活性はほとんど検出されなかったのに対して、Hfd1p、Hfd2Ap、Hfd4p を発現する大腸菌から調製した細胞破碎液ではドデカナルおよびテトラデカナルに対する顕著な FALDH 活性が検出された (Figure 3-5B, lower panel)。Hfd3p を発現する大腸菌の細胞破碎液ではドデカナルに対して僅かな FALDH 活性が検出された (Figure 3-5B, lower panel)。これらの結果から、Hfd タンパク質群が FALDH 活性を持つことが示された。

#### 3-3-5 Hfd タンパク質の細胞内局在解析

Hfd タンパク質の局在を解析するため、N 末端に EGFP を融合した Hfd タンパク質を自身のプロモーター下で発現させるための低コピー型プラスミド pSEGFP-HFD1、pSEGFP-HFD2、pSEGFP-HFD3、pSEGFP-HFD4 を作製した。これらのプラスミドを  $\Delta hfd1-4$  株に導入したところ、*n*-アルカンを単一の炭素源とした場合の生育が支持されたことから (Figure 3-6A)、EGFP 融合タンパク質は *Y. lipolytica* 内で機能していることが

示された。

次にこれらのプラスミドを Sec61p-DsRed を小胞体マーカーとして発現する REA1 株または Pot1p-mCherry をペルオキシソームマーカーとして発現する POC 株に導入した。これらの株を SD 液体培地で対数増殖期まで培養した後、*n*-ドデカンを追加してさらに 1 時間培養した細胞を用いて蛍光の局在を観察した (Figure 3-6B)。その結果、EGFP-Hfd1p と EGFP-Hfd2p の蛍光シグナルが Sec61p-DsRed および Pot1p-mCherry と共局在することが示され、Hfd1p と Hfd2p が小胞体とペルオキシソームの両方に局在することが示唆された。EGFP-Hfd3p の蛍光シグナルは Pot1p-mCherry の蛍光シグナルとのみ共局在しており、Hfd3p がペルオキシソームタンパク質であることが示唆された。EGFP-Hfd4p の蛍光シグナルは他の Hfd タンパク質群と比較して弱く、Sec61p-DsRed や Pot1p-mCherry と異なった局在を示した。EGFP-Hfd1p、EGFP-Hfd2p、EGFP-Hfd3p、EGFP-Hfd4p の蛍光シグナルはグルコースのみで培養した場合にも同様の局在を示した。

### 3-3-6 HFD2 の 2 つのスプライシングバリエーションの機能解析

RACE 解析から明らかとなった HFD2 の 2 つの mRNA の存在の意義を調べるために、Hfd2Ap または Hfd2Bp のいずれか片方のみを自身のプロモーター下で発現する低コピー型プラスミド pSHFD2A、pSHFD2B を作製した。これらのプラスミドを  $\Delta hfd1-4$  株に導入して、その生育を調べた。その結果、Hfd2Ap、Hfd2Bp のどちらのタンパク質を発現させた場合にも  $\Delta hfd1-4$  株の *n*-ドデカン、*n*-ヘキサデカンを炭素源とした培地での生育欠損が回復した (Figure 3-7A)。

次に、これら 2 つのタンパク質の局在を解析するために、N 末端に EGFP を融合した Hfd2Ap または Hfd2Bp を発現するプラスミド pSEGFP-HFD2A または pSEGFP-HFD2B を作製した。これら 2 つの EGFP 融合タンパク質が  $\Delta hfd1-4$  株の *n*-アルカン資化能欠損を相補できることを確認した。pSEGFP-HFD2A、pSEGFP-HFD2B を REA1 株または POC 株に導入した株を SD 液体培地で対数増殖期まで培養した後、*n*-ドデカンを追加してさらに 1 時間培養した細胞を用いて蛍光の局在を観察した (Figure 3-7B)。EGFP-Hfd2Ap の蛍光シグナルは Sec61p-DsRed および Pot1p-mCherry と共局在し、Hfd2Ap が小胞体およびペルオキシソームに局在することが示唆された。同様の局在パターンは C 末端に EGFP を融合した Hfd2Ap でも観察された (Figure 3-7B)。これに対して、EGFP-Hfd2Bp の蛍光シグナルは Pot1p-mCherry のみと共局在し、PTS1 様の配列から予想されるとおり、Hfd2Bp はペルオキシソームに局在することが示唆された。

### 3-3-7 Alk タンパク質群や Ald タンパク質群の長鎖アルデヒド酸化への関わり

$\Delta hfd1-4$  株は、*n*-デカンや *n*-ウンデカンなど短鎖の *n*-アルカンを単一の炭素源とした培地では生育が悪化するものの生育することができたこと (Table 3-2)、 $\Delta hfd1-4$  株はドデカナルを単一の炭素源とした培地で生育することができたことから (Figure 3-4A)、

*Y. lipolytica* には比較的短いアルデヒドや細胞外から直接取り込んだ長鎖アルデヒドを酸化する別の酵素がある可能性が考えられた。

これらのアルデヒドを酸化する酵素の候補として P450 が考えられた。そこで、 $\Delta alk1-12\Delta hfd1-4$  株を作製し、 $\Delta alk1-12$  株、 $\Delta hfd1-4$  株と併せて長鎖アルデヒドの資化能や長鎖アルデヒドに対する感受性を解析した。ドデカナールを単一の炭素源とした培地での生育を調べたところ、 $\Delta alk1-12\Delta hfd1-4$  株の生育は  $\Delta hfd1-4$  株より僅かに悪いことが示された (Figure 3-8A)。一方、テトラデカナールを単一の炭素源とした培地では、 $\Delta alk1-12\Delta hfd1-4$  株と  $\Delta hfd1-4$  株は野生型株よりも僅かに生育が悪いことが示されたが、 $\Delta alk1-12\Delta hfd1-4$  株と  $\Delta hfd1-4$  株の間で生育の違いは見られなかった (Figure 3-8A)。次に、ドデカナールに対する感受性を調べた。野生型株、 $\Delta alk1-12$  株、 $\Delta alk1-12\Delta hfd1-4$  株、 $\Delta hfd1-4$  株を SD 液体培地で対数増殖期まで培養した後、終濃度 0.1% となるように Triton X-100 を加え、0、5、0.5、または 0.05 mM となるようにドデカナールを添加して、さらに 6 時間培養した。これらの条件で培養した細胞の生存率をフロキシン B 染色により定量した。野生型株と  $\Delta alk1-12$  株を比較した場合、あるいは  $\Delta hfd1-4$  株と  $\Delta alk1-12\Delta hfd1-4$  株を比較した場合に有意水準 5% での有意差は見られなかったが 0.5 mM および 0.05 mM ドデカナールの存在下での生菌率は *ALK* 遺伝子群を破壊した場合に低下する傾向が見られた (Figure 3-8B)。これらの結果から、Alk タンパク質群が細胞外の長鎖アルデヒドの毒性を緩和する可能性が考えられた。

次に、アルデヒドデヒドロゲナーゼである Ald タンパク質群の関与を調べた。 $\Delta aldl-4\Delta hfd1-4$  株を作製し (Figure 3-3)、ドデカナールやテトラデカナールを単一の炭素源とした培地での生育を調べたところ、*ALD* 遺伝子群を破壊した影響は見られなかった (Figure 3-8C)。この結果から、細胞外の長鎖アルデヒドの資化に Ald タンパク質群は関与しないことが示唆された。

### 3-4 考察

本章における研究から、*Y. lipolytica* において、長鎖アルデヒドデヒドロゲナーゼをコードする 4 つの *HFD* 遺伝子が見出された。 $\Delta hfd1-4$  株は炭素鎖長 12–18 の *n*-アルカン炭素源とした培地で生育できず、炭素鎖長 10–11 の *n*-アルカン炭素源とした場合にも僅かな生育欠損を示した。また、 $\Delta hfd1-4$  株の細胞抽出液中には、*n*-アルカン誘導性の FALDH 活性が見られなかった。さらに、大腸菌で発現させた Hfd タンパク質群は FALDH 活性を持つことが示された。これらの結果から、*HFD* 遺伝子群が *n*-アルカン代謝の過程で生じる長鎖アルデヒドを脂肪酸に酸化する長鎖アルデヒドデヒドロゲナーゼをコードすることが強く示唆された。

### 3-4-1 *Y. lipolytica* における *HFD* 遺伝子群の役割

#### 3-4-1-1 *HFD* 遺伝子群の転写

*HFD1*、*HFD2*、*HFD3* は *n*-アルカンの存在により大きく転写量が上昇したが、*HFD4* については、顕著な転写量の上昇は見られなかった (Figure 3-2)。網羅的転写解析の結果から、*HFD1*、*HFD2*、*HFD3* が転写活性化因子 *Yas1p*、*Yas2p* および転写抑制因子 *Yas3p* に制御されていることが示唆されている。*Yas1p*、*Yas2p*、*Yas3p* は *ALK1* の転写制御に関わるが[58, 59, 62]、*n*-アルカン代謝過程で生じる長鎖アルデヒドの酸化に関わる遺伝子群の転写など、*n*-アルカン代謝全体の制御に関わることが示唆された。

qRT-PCR の結果から、*HFD1* の転写がオレイン酸により強く活性化することが明らかになった (Figure 3-2)。*Y. lipolytica* において、脂肪酸の代謝に関わる遺伝子群の転写は  $Zn_2Cys_6$  転写因子である *Por1p* により活性化されることが分かっているが[67]、網羅的転写解析の結果からは、*POR1* の破壊株では *HFD1* の転写が逆に上昇することが明らかになっており、*HFD1* のオレイン酸による転写活性化に関与する因子は興味深い課題である。

#### 3-4-1-2 *HFD* 遺伝子群の細胞内での役割

本章の結果から、*HFD* 遺伝子群は長鎖アルデヒドの酸化に関わることが示唆されたが、長鎖アルデヒドの酸化以外の機能を持つかは興味深い。特に、*HFD1* はオレイン酸により転写が活性化するため、脂肪酸の変換に関わる機能を持つ可能性が考えられる。第1章の結果から、 $\Delta alk1-12$  株において *ALK3*、*ALK5*、*ALK7* のいずれかを単独で高発現させると、培地中のドデカン酸がドデカン二酸に変換されることが示された。このドデカン二酸生産において、12-ヒドロキシ脂肪酸が酸化されて生じる 12-オキシドデカン酸の酸化に *Hfd1p* が関与する可能性も考えられる。

#### 3-4-1-3 $\Delta hfd1-4$ 株のアルコール、アルデヒドでの生育

$\Delta hfd1-4$  株は 1-ドデカノールやドデカノール、テトラデカノールを炭素源として生育することができたが (Figure 3-4A)、その理由は不明である。 $\Delta hfd1-4$  株は *n*-デカンおよび *n*-ウンデカンを炭素源として生育することができるので (Table 3-2)、*Y. lipolytica* は *Hfd* タンパク質以外に炭素鎖長 10 および 11 のアルデヒドに対して活性のある酵素を持つことが予想される。1-ドデカノールやドデカノールは培地に過剰量存在するため、この未知の酵素が炭素鎖長 12 や 14 のドデカノールを僅かに酸化することができたのかもしれない。実際に、 $\Delta hfd1-4$  株の細胞破碎液からも *n*-アルカン誘導性ではないものの、ドデカノールやテトラデカノールを基質にした FALDH 活性が検出されている (Figure 3-5)。あるいは、*n*-アルカンの代謝の過程で生成する長鎖アルコールや長鎖アルデヒドと、細胞の外から与えた長鎖アルコールや長鎖アルデヒドでは代謝経路やそれに関わる酵素が異なる可能性も考えられる。本章では、この候補として *Alk* タンパク質群や *S*.

*cerevisiae*においてアセトアルデヒドのアセチル-CoAへの代謝に関わる酵素 Ald タンパク質群[106]に焦点を当てて解析を行った。Alk タンパク質群が僅かに長鎖アルデヒドを酸化する活性を持つ可能性が示唆された (Figure 3-8A, B)が、その効果は非常に小さかった。また、Ald タンパク質は長鎖アルデヒドを酸化する活性をほとんど持たない可能性が考えられた (Figure 3-8C)。長鎖アルデヒドは不安定な物質であるため、培地に添加して生育を見る場合には、長鎖アルデヒド自体の酸化や重合、培地成分との反応などを考慮する必要があるかもしれない。

#### 3-4-1-3 *Y. lipolytica* における *HFD* 遺伝子群の分子進化

*S. cerevisiae* において、*HFD1* は S-1-P の代謝過程において生じる 1-ヘキサデセナールのヘキサデセン酸への変換に関わることが示されていることから[103]、*Y. lipolytica* においても *HFD* 遺伝子群が S-1-P 代謝に関わる可能性は十分考えられる。*S. cerevisiae* では *HFD1* と同源性のある遺伝子は他には見出されないが、*Y. lipolytica* では本研究の結果から 4 種のコモログが見出された。*Y. lipolytica* の中で *HFD* 遺伝子が重複し、分子進化を経て、*HFD1*、*HFD2*、*HFD3* が *n*-アルカンにより誘導されるようになり、*n*-アルカン資化に関わるようになったのかもしれない。*n*-アルカンにより強く転写誘導されない *HFD4* は *S. cerevisiae* における *HFD1* と同様 S-1-P 由来の 1-ヘキサデセナールの代謝に関わる可能性も考えられる。*n*-アルカン資化性酵母である *C. albicans*、*C. parapsilosis*、*L. elongisporus* および *C. tropicalis* のゲノム配列には *HFD* 遺伝子と同源性のある遺伝子が 2 種ずつ見出された。*n*-アルカンや疎水性化合物を資化する過程で生じる有害な長鎖アルデヒドを代謝、解毒するのに *HFD* 遺伝子群が重複あるいは多重化した可能性が考えられる。

#### 3-4-2 *n*-アルカン代謝における長鎖アルデヒドの酸化

序章に述べたように、酵母の *n*-アルカン代謝経路において、長鎖アルデヒドは小胞体およびペルオキシソームで脂肪酸に酸化されることが提唱されていたが、本研究では Hfd1p、Hfd2p および Hfd3p が小胞体やペルオキシソームに局在すること (Figure 3-6)が示唆され、これまでのモデルが支持される結果となった。ペルオキシソームに局在する Hfd2Bp や Hfd3p のみを発現する株が *n*-アルカンで生育できることから (Table 3-2, Figure 3-7A)、*n*-アルカン代謝における長鎖アルデヒドから脂肪酸への酸化にはペルオキシソームだけで十分であると考えられる。Alk タンパク質群による *n*-アルカンから長鎖アルコールへの水酸化が小胞体で行われることを考えると、Hfd2Bp や Hfd3p のみを発現する株においては、長鎖アルコールまたは長鎖アルデヒドが小胞体からペルオキシソームに輸送されると考えられる。Hfd1p、Hfd2Ap、Hfd3p は小胞体とペルオキシソームの両方に局在するため、*n*-アルカン資化において長鎖アルデヒドの酸化が小胞体で行われるだけで十分であるかどうかは現在のところでは不明である。また、典型的な PTS1

様配列を持たない Hfd1p、Hfd2Ap、Hfd3p がペルオキシソームにも局在する分子機構も不明である。

EGFP-Hfd4p の蛍光シグナルは Sec61p-DsRed や Pot1p-mCherry の蛍光シグナルと共局在せず (Figure 3-6B)、本章の結果からは Hfd4p の局在を明らかにすることは出来なかった。Hfd4p のみを  $\Delta hfd1-4$  株で発現させると、 $\Delta hfd1-4$  株の *n*-アルカンにおける生育欠損が回復することから (Table 3-2)、Hfd4p の局在は *n*-アルカン代謝経路を理解する上で興味深い課題である。EGFP-Hfd4p の蛍光シグナルは Sec61p-DsRed のシグナルと部分的に重なっているようにも見えることから、Hfd4p の一部が小胞体にも局在している可能性も考えられる。

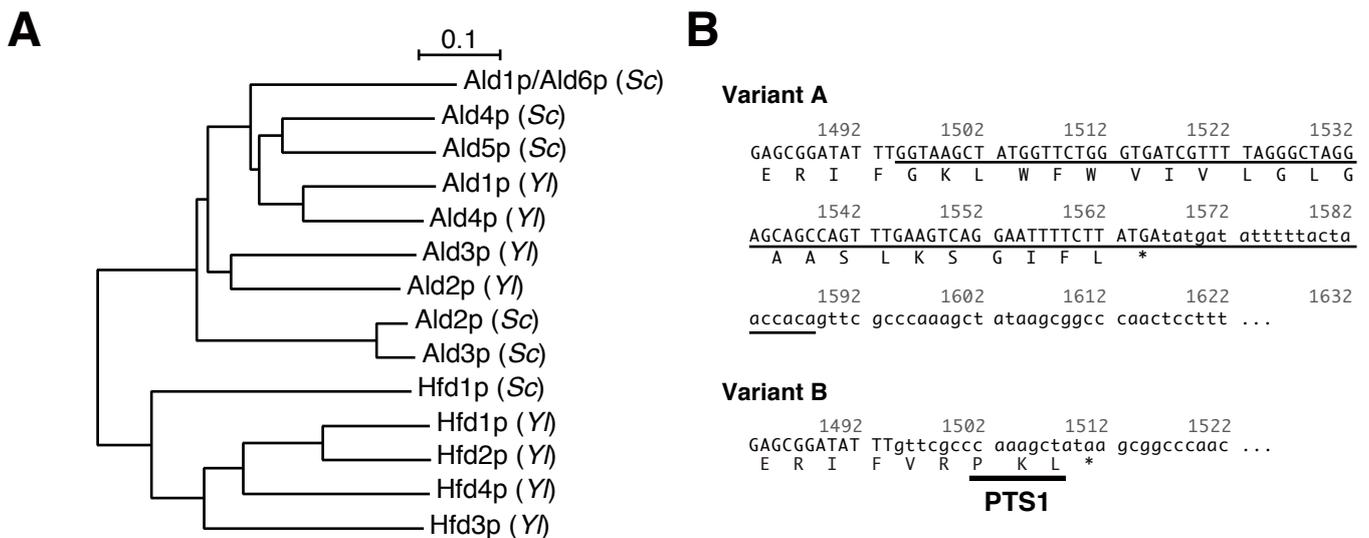
### 3-4-3 HFD2 のスプライシングバリエーションの役割

RACE 解析の結果から、HFD2 から 2 つの転写産物が生じ、一方から小胞体とペルオキシソームに局在する Hfd2Ap が生産され、もう一方からは PTS1 様配列を持ちペルオキシソームに局在する Hfd2Bp が生産されることが明らかになった (Figure 3-1B, 7B)。選択的スプライシングにより、小胞体またはペルオキシソームに局在する異なった FALDH が翻訳される例はマウスやヒトにおいても見られる[107]。マウスにおいては、ALDH3A2 から選択的スプライシングにより、FALDH-N、-V、-V2、-V3 の 4 種類の FALDH が翻訳されることが知られている[108]。これらのうち、FALDH-N、-V2、-V3 が小胞体に局在し、FALDH-V がペルオキシソームに局在する[109]。本章で得られた結果は、選択的スプライシングにより FALDH の局在が変化する機構が酵母から哺乳類まで保存されていることを示唆するものである。FALDH-V および FALDH-N の過剰発現は HEK293 細胞のドデカナールに対する耐性を付与することができるが、HEK293 細胞においてフィタン酸により引き起こされる細胞傷害を低減することができるのはペルオキシソームに局在する FALDH-V の過剰発現であることが示されており[107]、選択的スプライシングによる複数のバリエーションの存在により FALDH の機能に多様性が生じることが知られている。*Y. lipolytica* の *n*-アルカン代謝における Hfd2Ap と Hfd2Bp の機能の違いは見られなかったことから (Figure 3-7A)、*n*-アルカン代謝とは別の機能を有する可能性も考えられる。

### 3-4-4 Hfd タンパク質群の鎖長特異性

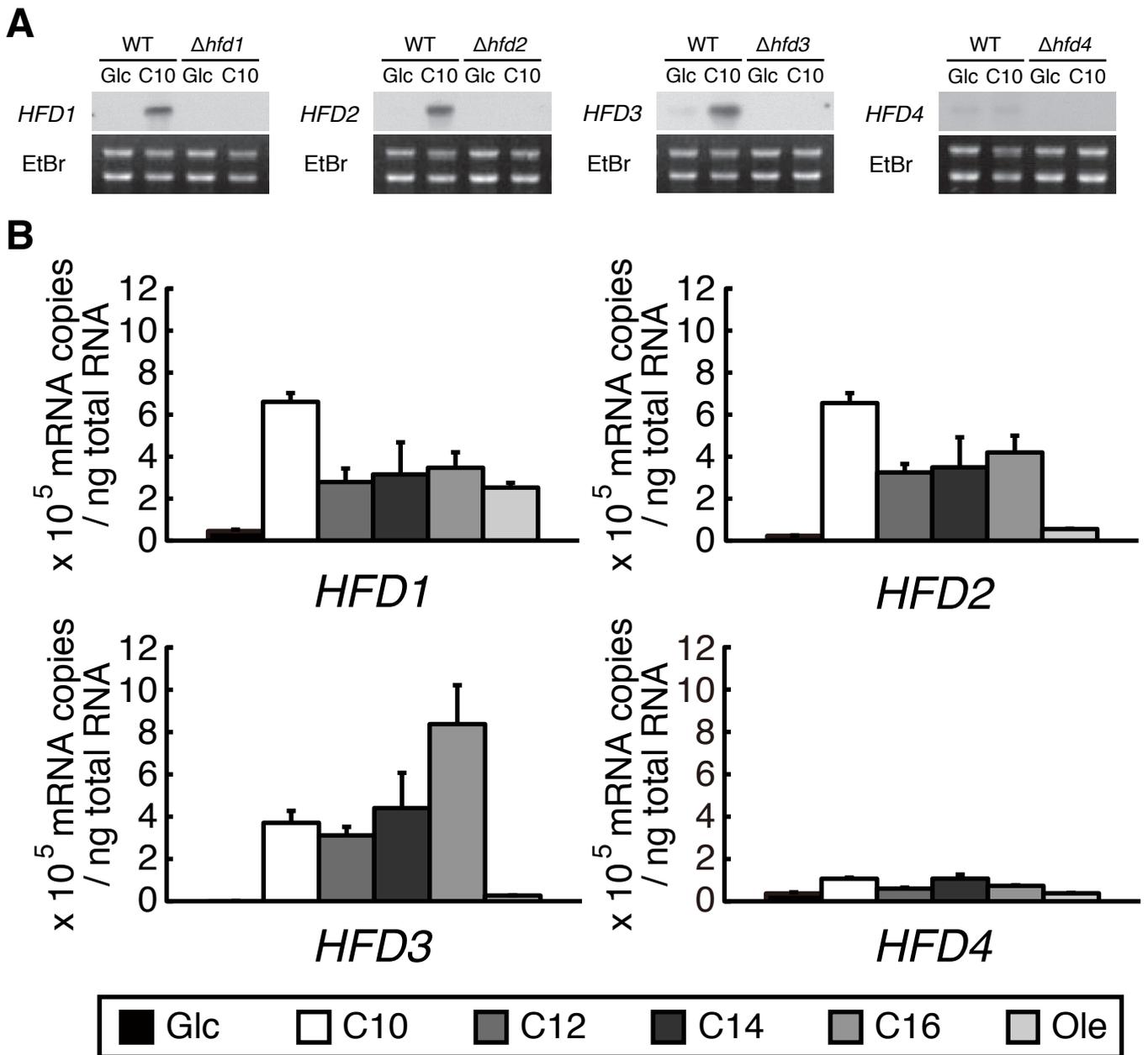
HFD 遺伝子群の転写解析の結果から、HFD1 と HFD2 の転写量は *n*-アルカンのうち短鎖の *n*-デカンで誘導した場合に最も多くなるのに対して、HFD3 の転写量は短鎖の *n*-アルカンよりも長鎖の *n*-ヘキサデカンで誘導した場合に最も多くなることが示された (Figure 3-2)。本研究では、Hfd を発現させた大腸菌の細胞破碎液や酵母の細胞破碎液を用いた FALDH 活性測定において、ドデカナールやテトラデカナールを基質として行った (Figure 3-5)。酸素鎖長 10 であるデカナールや炭素鎖長 16 であるヘキサデカナール

を基質にした場合の FALDH 活性測定も試みたが、その活性を測定することは出来なかった。ヘキサデカナールに関しては、今回用いたアッセイ系で行うには、ヘキサデカナールの溶媒への溶解性が低い可能性がある。したがって、*HFD* 遺伝子群の各鎖長の *n*-アルカンに応答した転写量の違いと *Hfd* タンパク質群が基質として選択する長鎖アルデヒドの鎖長との間に関連性があるのかは不明である。



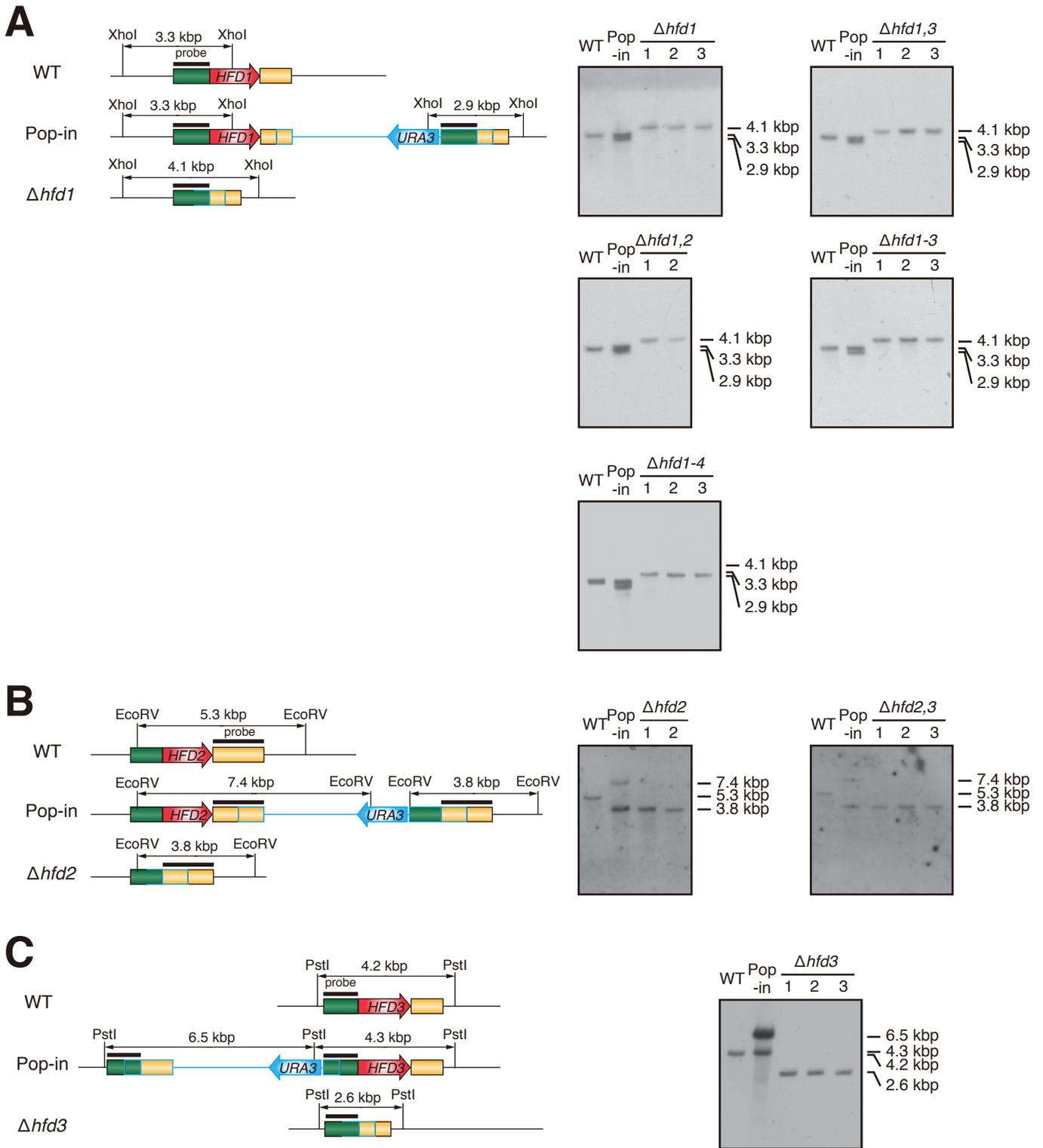
### Figure 3-1. *Y. lipolytica* における長鎖アルデヒドデヒドロゲナーゼ

(A) *S. cerevisiae* と *Y. lipolytica* のアルデヒドデヒドロゲナーゼの系統樹。*S. cerevisiae* (Sc)と *Y. lipolytica* (Yl) のアルデヒドデヒドロゲナーゼのアミノ酸配列を ClustalW (DDBJ, v2.1)で解析し、Njplot で分子系統樹を描画した。スケールバーは 0.1 substitutions per site を示す。使用した各配列の UniprotKB における Accession number を次に示す。*S. cerevisiae* では Ald1p/Ald6p (P54115)、Ald2p (P47771)、Ald3p (P54114)、Ald4p (P46367)、Ald5p (P40047)、Hfd1p (Q04458)。*Y. lipolytica* では Ald1p (Q6C7J6)、Ald2p (Q6C9V7)、Ald3p (Q6C2W9)、Ald4p (Q6CD79)、Hfd1p (Q6C0L0)、Hfd2p (Q6C5T1)、Hfd3p (Q6CGN3)、Hfd4p (Q6CG32)。括弧内は生物種を表す。(B) *HFD2* の2つの転写産物 (バリエント A およびバリエント B) の核酸配列と産物の推定アミノ酸配列。バリエント A において下線で示す核酸配列がバリエント B では除去されている。PTS1 様の配列を太下線で示す。\*は終止コドンを示す。



**Figure 3-2. *HFD1* – *HFD4* の転写解析**

(A) CXAU1 株 (WT)、 $\Delta hfd1$  株、 $\Delta hfd2$  株、 $\Delta hfd3$  株および  $\Delta hfd4$  株から抽出した全 RNA を用いたノーザン解析。SD 液体培地で対数増殖期まで培養した後、グルコース (Glc) または *n*-デカン (C10) を終濃度 2% で含む YNB 液体培地にシフトしてさらに 1 時間培養した菌体から全 RNA を抽出した。臭化エチジウム (EtBr) で染色したリボソーム RNA をローディングコントロールとした。(B) qRT-PCR 解析。CXAU1 株 (野生型株) を SD 液体培地で対数増殖期まで培養した後、グルコース (Glc)、*n*-デカン (C10)、*n*-ドデカン (C12)、*n*-テトラデカン (C14)、*n*-ヘキサデカン (C16)、またはオレイン酸 (Ole) を含む YNB 液体培地にシフトしてさらに 1 時間培養した。これらの菌体から全 RNA を抽出し、cDNA を調製した。*HFD1*、*HFD2*、*HFD3*、*HFD4* に特異的なプライマーを用いて cDNA の量を定量した。独立した 3 回の実験の平均値を棒グラフ、標準誤差をエラーバーで示した。



### Figure 3-3. 本章で使う株の作製とサザン解析

本章で作製した株の確認のためのサザン解析のストラテジーとサザン解析の結果。各パネルの左側のサザンストラテジーを、右側にサザン解析の結果を示す。WTはCXAU1株、Pop-inはその右側に示す株を作製するために破壊カセットを導入した株を示す。それぞれのパネルは、(A) *HFD1* 破壊株、(B) *HFD2* 破壊株、(C) *HFD3* 破壊株、(D) *HFD4* 破壊株について示す。いずれも1の株を解析に使用した。

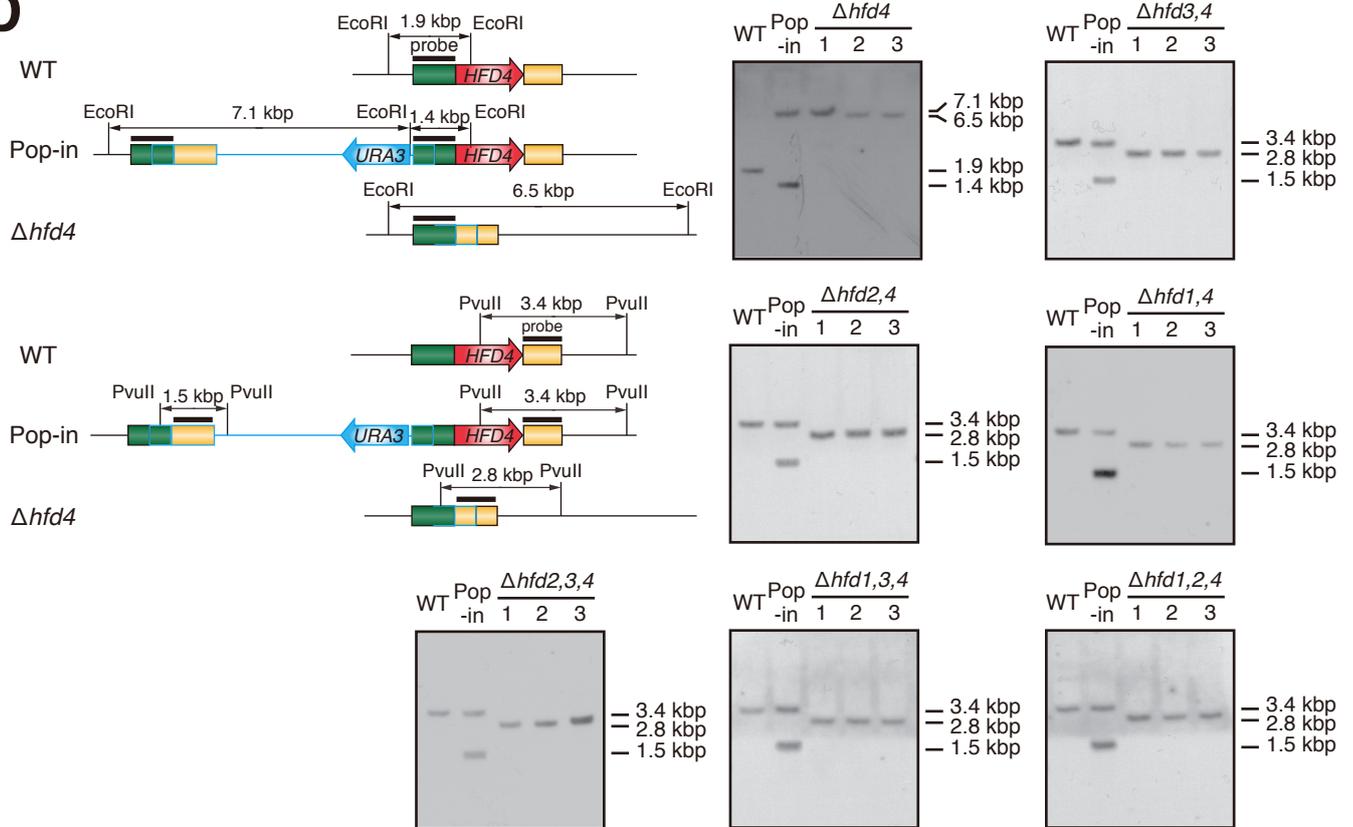
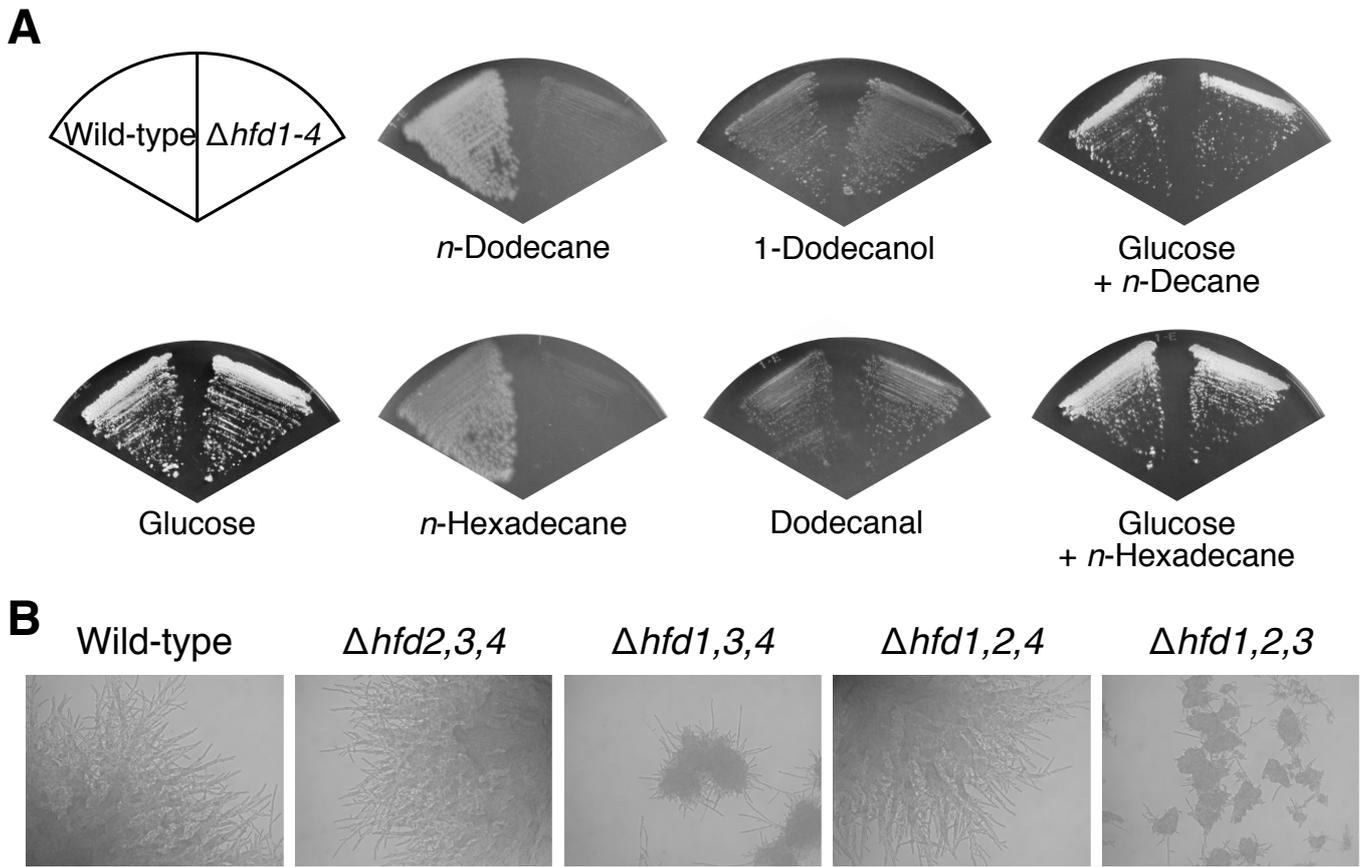
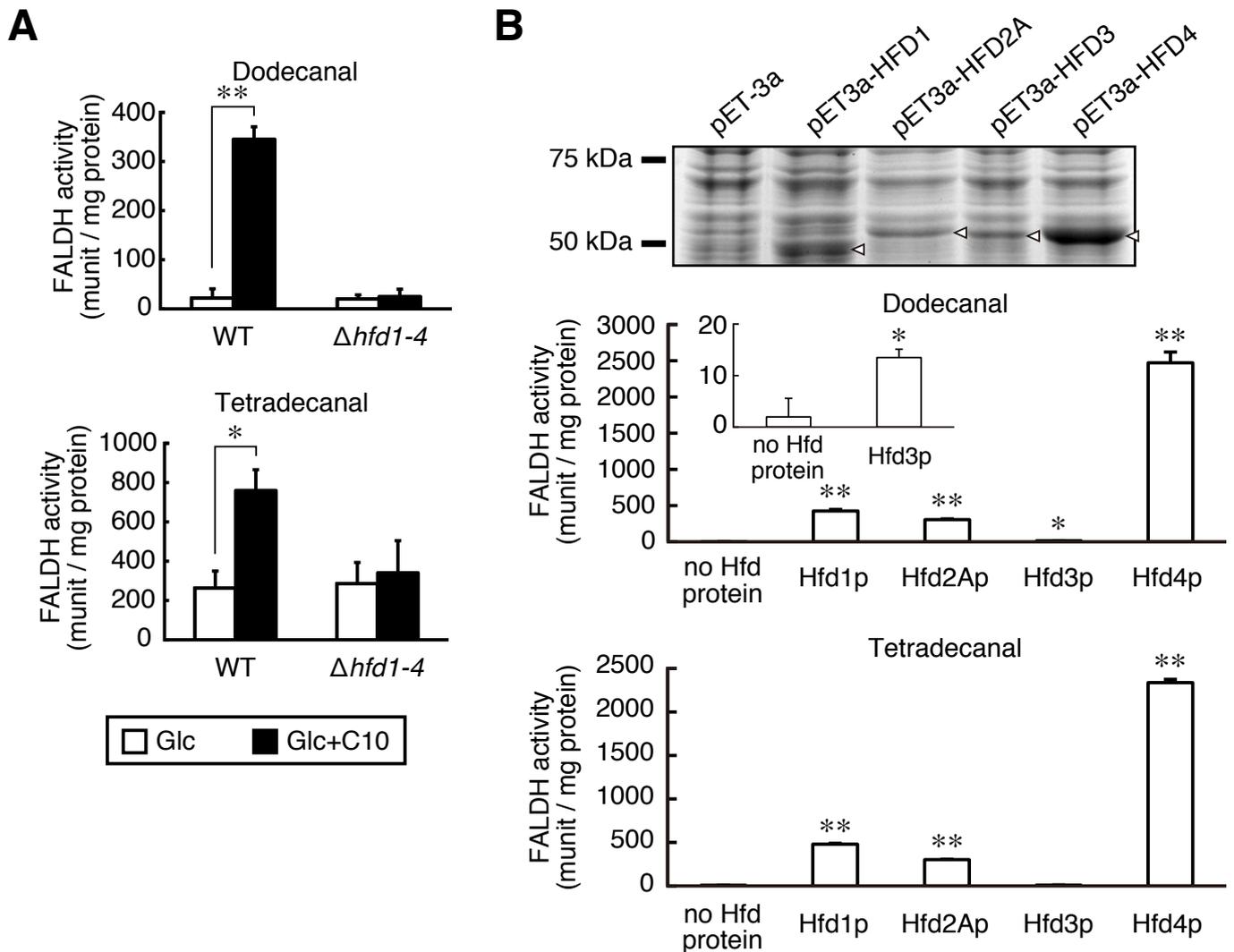
**D**

Figure 3-3. 本章で使う株の作製とサザン解析 (continued)



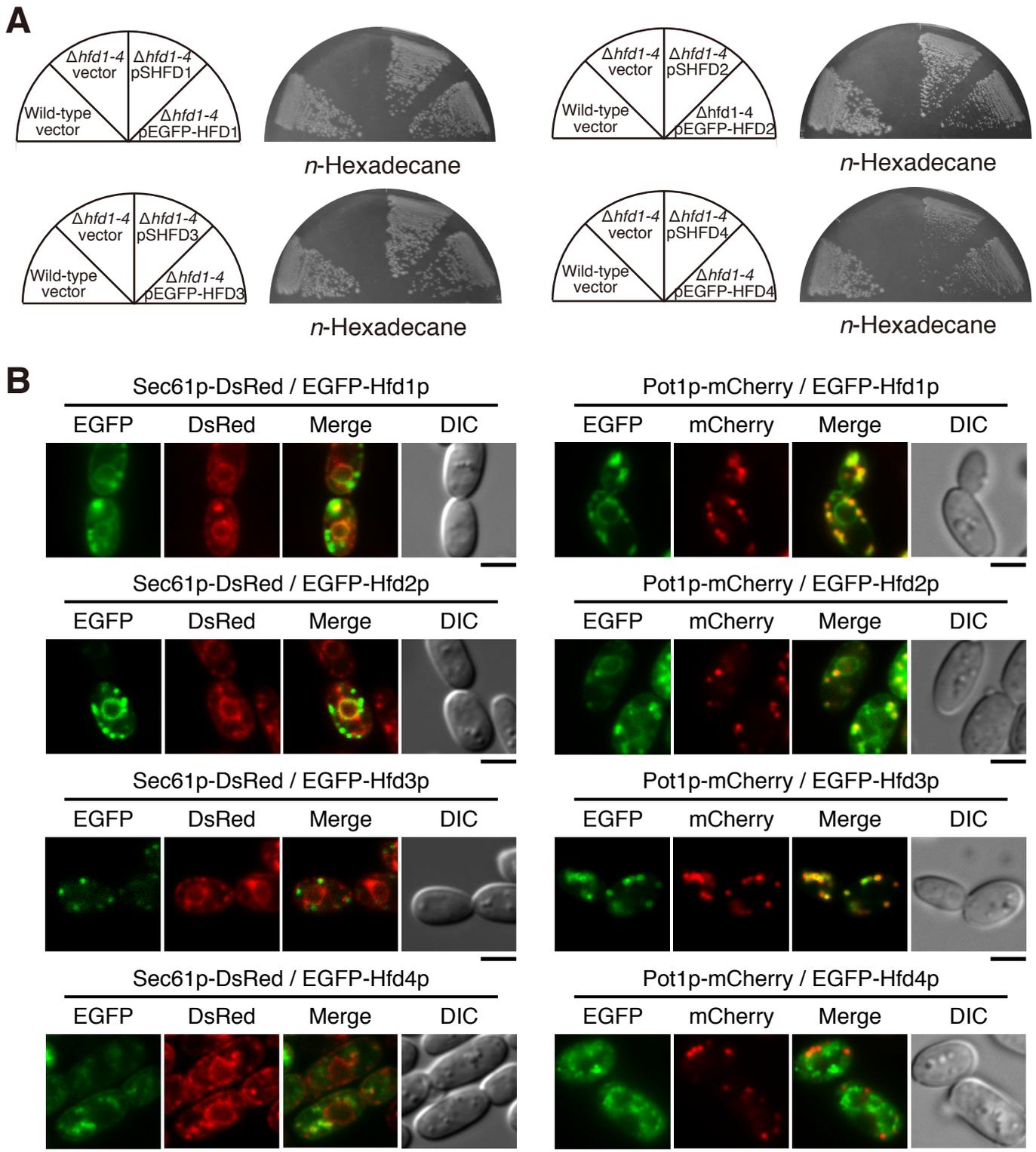
**Figure 3-4. HFD 遺伝子群の破壊株の様々な炭素源における生育とコロニー形態**

(A) CXAU1 株 (Wild-type)、 $\Delta hfd1-4$  株を各炭素源の培地における生育。グルコース培地、グルコース/*n*-デカン培地、グルコース/*n*-ヘキサデカン培地では 3 日間、*n*-ドデカン培地、*n*-ヘキサデカン培地では 7 日間、1-ドデカノール培地、ドデカナール培地では 10 日間培養した。(B) CXAU1 株 (Wild-type)、 $\Delta hfd2,3,4$  株、 $\Delta hfd1,3,4$  株、 $\Delta hfd1,2,4$  株、 $\Delta hfd1,2,3$  株を *n*-ヘキサデカンを単一の炭素源とした培地で 5 日間培養したコロニーの形態。スケールバーは 100  $\mu\text{m}$  を示す。



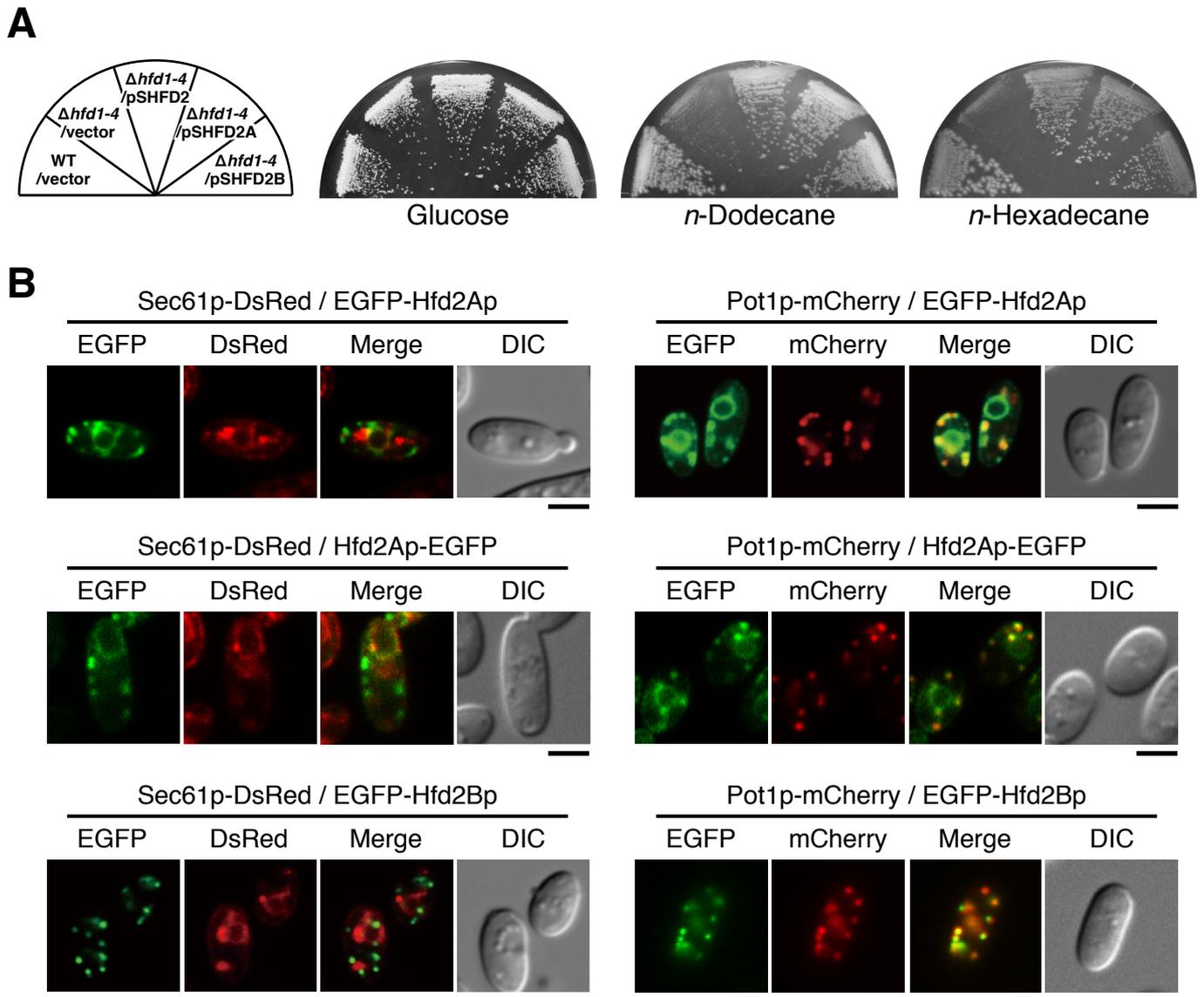
**Figure 3-5. Hfd タンパク質群の FALDH 活性**

(A) 野生型株および  $\Delta hfd1-4$  株の FALDH 活性。野生型株および  $\Delta hfd1-4$  株を SD 液体培地で対数増殖期まで培養した菌体 (Glc)、および SD 液体培地で対数増殖期まで培養した後、*n*-デカンを加えて 6 時間培養した菌体 (Glc + C10) から調製した細胞抽出液を用いて、ドデカナルまたはテトラデカナルを基質とした FALDH 活性を測定した。独立した 3 回の実験の平均値を棒グラフ、標準誤差をエラーバーで示した。\* $P < 0.05$ 、\*\* $P < 0.005$  (独立 2 標本 *t* 検定、両側検定) (B) pET3a、pET3a-HFD1、pET3a-HFD2A、pET3a-HFD3、pET3a-HFD4 を導入した *E. coli* 細胞の FALDH 活性。(Upper panel) これらの株の全タンパク質を SDS-PAGE で分離し、クマシー染色した。白矢頭は pET3a を持つ菌株と比較して強度が上がったバンドを示す。(Lower panel) pET3a (no Hfd)、pET3a-HFD1 (Hfd1p)、pET3a-HFD2A (Hfd2Ap)、pET3a-HFD3 (Hfd3p)、pET3a-HFD4 (Hfd4p) を導入した *E. coli* 細胞の FALDH 活性。独立した 3 回の実験の平均値を棒グラフ、標準誤差をエラーバーで示した。\*、\*\* pET3a を導入した株と比較して統計的有意差がある (独立 2 標本 *t* 検定、両側検定、\* $P < 0.05$ 、\*\* $P < 0.005$ )。



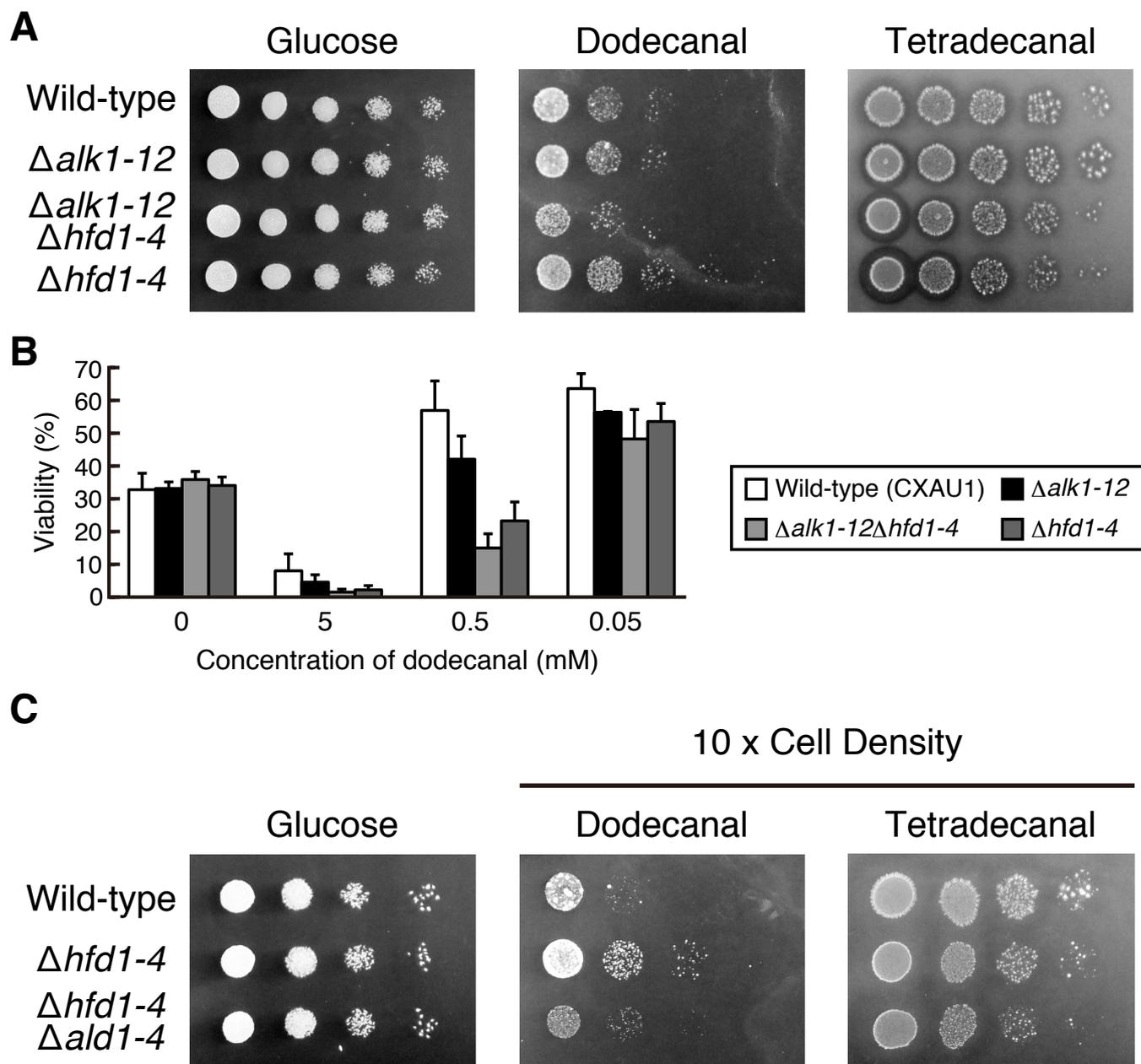
### Figure 3-6. Hfd タンパク質の細胞内局在

(A) pSUT5 を導入した野生型株 (Wild-type vector)、pSUT5 ( $\Delta hfd1-4$  vector)、pSHFD1 ( $\Delta hfd1-4$  pSHFD1)、pEGFP-HFD1 ( $\Delta hfd1-4$  pSEGFP-HFD1)、pSHFD2 ( $\Delta hfd1-4$  pSHFD2)、pEGFP-HFD2 ( $\Delta hfd1-4$  pSEGFP-HFD2)、pSHFD3 ( $\Delta hfd1-4$  pSHFD3)、pEGFP-HFD3 ( $\Delta hfd1-4$  pSEGFP-HFD3)、pSHFD4 ( $\Delta hfd1-4$  pSHFD4)、pEGFP-HFD4 ( $\Delta hfd1-4$  pSEGFP-HFD4) を導入した  $\Delta hfd1-4$  株を *n*-ヘキサデカン を炭素源として 7 日間培養した。(B) N 末端に EGFP を付加した各 Hfd タンパク質および Sec61p-DsRed または Pot1p-mCherry を発現する株を対数増殖期まで培養した後、*n*-ドデカンを加えてさらに 1 時間培養した。これらの細胞を用いて蛍光顕微鏡観察を行った。スケールバーは 3  $\mu$ m を示す。



### Figure 3-7. Hfd2Ap および Hfd2Bp の機能と細胞内局在

(A) pSUT5 を導入した野生型株 (WT/vector)、pSUT5 ( $\Delta hfd1-4$ /vector)、pSHFD2 ( $\Delta hfd1-4$ /pSHFD2)、pSHFD2A ( $\Delta hfd1-4$ /pSHFD2A)、pSHFD2B ( $\Delta hfd1-4$ /pSHFD2B) を導入した  $\Delta hfd1-4$  株をグルコース培地で 3 日間、*n*-ドデカン培地、*n*-ヘキサデカン培地で 7 日間培養した。(B) N 末端または C 末端に EGFP を付加した Hfd2Ap または Hfd2Bp および Sec61p-DsRed または Pot1p-mCherry を発現する株を対数増殖期まで培養した後、*n*-ドデカンを加えてさらに 1 時間培養した。これらの細胞を用いて蛍光顕微鏡観察を行った。スケールバーは 3  $\mu$ m を示す。



**Figure 3-8. Alk タンパク質群の長鎖アルデヒド資化・解毒に対する機能**

(A) CXAU1 株 (Wild-type)、 $\Delta alk1-12$  株、 $\Delta hfd1-4$  株および  $\Delta alk1-12 \Delta hfd1-4$  株を各炭素源のプレートにスポット法で植菌した。グルコース培地では 2 日間、ドデカナル、テトラデカナル培地では 4 日間培養した。

(B) CXAU1 株、 $\Delta alk1-12$  株、 $\Delta hfd1-4$  株および  $\Delta alk1-12 \Delta hfd1-4$  株を 0.1% Triton X-100 を含む SD 液体培地 (SDtx 液体培地) または 5、0.5、0.05 mM ドデカナルを含む SDtx 液体培地で 6 時間培養した。培養後の生菌率をフロキシシン B 染色により測定した。独立した 3 回の実験の平均値を棒グラフ、標準誤差をエラーバーで示した。

(C) CXAU1 株 (Wild-type)、 $\Delta hfd1-4$  株および  $\Delta hfd1-4 \Delta ald1-4$  株を各炭素源のプレートにスポット法で植菌した。グルコース培地では 2 日間、ドデカナル培地、テトラデカナル培地では 4 日間培養した。10 x Cell Density はそれぞれ 10 倍濃度でスポットしたことを示す。

**Table 3-1****3'-RACE 解析により得られた *HFD2* のバリエント A およびバリエント B の転写産物の数**

Carbon sources	variant A	variant B	<i>n</i>
Glucose	8	8	16
Glucose and <i>n</i> -dodecane	8	10	18
<i>n</i> -decane	6	7	13

CXAU1 株を SD 液体培地で対数増殖期まで培養した後、2%グルコース、2%グルコース/2% *n*-ドデカンまたは 2% *n*-デカンを含む YNB 液体培地にシフトした後、さらに 1 時間培養した。これらの菌体から全 RNA を抽出し cDNA を調製して、*HFD2* の 3'-RACE 解析に供した。*n* は配列を読んだクローン数を示す。

**Table 3-2**  
各破壊株の様々な鎖長の *n*-アルカンにおける生育

Strain	Glc	C10	C11	C12	C13	C14	C15	C16	C17	C18
WT	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
<i>Δhfd1</i>	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
<i>Δhfd2</i>	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
<i>Δhfd3</i>	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
<i>Δhfd4</i>	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
<i>Δhfd1,2</i>	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
<i>Δhfd1,3</i>	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	++	++
<i>Δhfd1,4</i>	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
<i>Δhfd2,3</i>	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
<i>Δhfd2,4</i>	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
<i>Δhfd3,4</i>	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
<i>Δhfd1,2,3</i>	+++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
<i>Δhfd1,2,4</i>	+++	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
<i>Δhfd1,3,4</i>	+++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
<i>Δhfd2,3,4</i>	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
<i>Δhfd1-4</i>	+++	++	+	-	-	-	-	-	-	-
<i>Δhfd1-4</i>										
pSUT5	+++	++	+	-	-	-	-	-	-	-
pSHFD1	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
pSHFD2	+++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
pSHFD3	+++	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
pSHFD4	+++	++	++	++	++	++	++	++	++	++

それぞれの株を *n*-アルカンを単一の炭素源として培地で1週間培養した。野生型株と比較して同程度の生育を“+++”として表した。

**Table 3-3**各破壊株のグルコースおよび *n*-アルカンを炭素源とした生育

Strain	Glc	Glc+C10	Glc+C11	Glc+C12	Glc+C13	Glc+C14	Glc+C15	Glc+C16	Glc+C17	Glc+C18
WT	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
<i>Δhfd1</i>	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
<i>Δhfd2</i>	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
<i>Δhfd3</i>	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
<i>Δhfd4</i>	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
<i>Δhfd1,2</i>	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
<i>Δhfd1,3</i>	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
<i>Δhfd1,4</i>	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
<i>Δhfd2,3</i>	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
<i>Δhfd2,4</i>	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
<i>Δhfd3,4</i>	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
<i>Δhfd1,2,3</i>	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
<i>Δhfd1,2,4</i>	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
<i>Δhfd1,3,4</i>	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
<i>Δhfd2,3,4</i>	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
<i>Δhfd1-4</i>	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++

それぞれの株をグルコースおよび *n*-アルカンを炭素源として培地で3日間培養した。野生型株と比較して同程度の生育を“+++”として表した。

**Table 3-4**

各破壊株の長鎖アルコール、長鎖アルデヒド、脂肪酸における生育

Strain	1-dodecanol	dodecanal	dodecanoic acid
WT	+++	+++	+++
<i>Δhfd1</i>	+++	+++	+++
<i>Δhfd2</i>	+++	+++	+++
<i>Δhfd3</i>	+++	+++	+++
<i>Δhfd4</i>	+++	+++	+++
<i>Δhfd1,2</i>	+++	+++	+++
<i>Δhfd1,3</i>	+++	+++	+++
<i>Δhfd1,4</i>	+++	+++	+++
<i>Δhfd2,3</i>	+++	+++	+++
<i>Δhfd2,4</i>	+++	+++	+++
<i>Δhfd3,4</i>	+++	+++	+++
<i>Δhfd1,2,3</i>	+++	+++	+++
<i>Δhfd1,2,4</i>	+++	+++	+++
<i>Δhfd1,3,4</i>	+++	+++	+++
<i>Δhfd2,3,4</i>	+++	+++	+++
<i>Δhfd1-4</i>	+++	+++	+++

それぞれの株を 1-ドデカノール、ドデカナール、ドデカン酸を炭素源として培地で 7 日間培養した。野生型株と比較して同程度の生育を“+++”として表した。

## 第4章 $n$ -アルカン資化に関わる Osh タンパク質群の機能解析

本章の内容は、学術雑誌論文として出版する計画があるため公表できない。5年以内  
に出版予定。



## 第5章 細胞膜-小胞体コンタクトサイトの *n*-アルカン資化への関与

本章の内容は、学術雑誌論文として出版する計画があるため公表できない。5年以内  
に出版予定。



## 第6章 *n*-アルカン代謝に関与する遺伝子の転写制御

### 6-1 緒言

序章で述べたとおり、*ALK1* の転写には bHLH 型転写制御因子である Yas1p、Yas2p および Opi1 ファミリーに属する転写抑制因子 Yas3p が関与する。*n*-アルカン存在下では、Yas3p は小胞体に局在し、Yas1p および Yas2p が複合体を形成して *ALK1* 上流の ARE1 に結合することにより、*ALK1* の転写を活性化する。それに対して、*n*-アルカン非存在下では、Yas3p は核内に移行し、Yas2p に結合することで Yas1p-Yas2p 複合体の転写活性を抑制していると考えられている (Figure 0-2)。このように Yas3p の局在制御が *ALK1* の発現制御に対して重要な役割を果たしている。Yas3p が小胞体に局在する機構としては、Yas3p が PA や PIPs に結合して小胞体に局在する可能性が考えられている[63]。また、Yas3p に点変異を導入したタンパク質や Yas3p を切り縮めたタンパク質の解析から、Yas3p の 259 番目から 422 番目の断片が酸性リン脂質には結合しないが、*n*-アルカン存在下でも小胞体に局在すること、その断片中 360 番目のトリプトファンまたは 361 番目のシステインをアルギニンに置換すると小胞体局在が見られなくなることが示された[110]。これらの結果から、Yas3p を小胞体に係留する役割を果たすタンパク質の存在も予想されている。しかしながら、Yas3p の局在制御機構には不明な点が多く残されている。

一方、*Y. lipolytica* において、*ALK1-ALK6* の *n*-テトラデカン存在下での転写産物の量はグルコース共存下で変化は見られないが、グリセロール共存下で顕著に減少する[52]。グルコースによるカタボライト抑制は様々な生物種で知られている。*S. cerevisiae* では培地中にグルコースが存在すると、呼吸や糖新生、他の炭素源資化に関与する遺伝子が抑制される。また、*n*-アルカン資化性酵母である *C. maltosa* においては、P450*ALK* をコードする遺伝子群の大部分はグルコースによりその発現が抑制され、グリセロールでは抑制されないことが報告されている[111]。酵母におけるグルコースシグナル機構については、*S. cerevisiae* を用いて詳細な解析がなされている。グルコースの存在を感知する機構に関しては、ヘキソキナーゼ (Hxk1p、Hxk2p) およびグルコキナーゼ (Glc1p) により培地中のグルコース濃度が間接的に感知されるという仮説やヘキソース輸送体のホモログである Snf3p、Rgt2p などグルコース結合部位をもつタンパク質によってグルコースが直接感知されるという仮説が提唱されている[112, 113]。また、*S. cerevisiae* における主要なグルコース抑制経路の活性化には Hxk1p、Hxk2p、Glc1p によるグルコースのリン酸化が必要であることが報告されている[114]。グルコースからのシグナルは主に Snf1p 複合体や転写因子 Mig1p を介して、標的遺伝子の発現制御につながると考えられている[115-117]。グルコース濃度が高い条件では、Mig1p は核内に存在し、標的遺伝子の上流配列に結合して基本転写抑制因子 Cyc8p-Tup1p 複合体をリクルートするこ

とで転写抑制を行っている。それに対して、グルコース濃度が低い条件では、タンパク質リン酸化酵素である Snf1p が活性化されて Mig1p をリン酸化することで Mig1p の核外への排出を促進し、標的遺伝子の転写抑制を解除されると考えられている。

一方で、グリセロールによる発現抑制については、酵母 *Kluyveromyces lactis* のイソクエン酸リアーゼをコードする *KIICL1* で報告されているのみである[113]。*K. lactis* をエタノールを含む培地で培養すると *KIICL1* mRNA 量やイソクエン酸リアーゼ活性は増加するが、グリセロール添加によりそれらの増加は見られなくなる。Zaman らはグリセロール代謝に関わる遺伝子に着目し、グリセロール代謝の初発酵素であるグリセロールキナーゼをコードする *KIGUT1* がグリセロール添加による *KIICL1* の発現抑制に関わること、グリセロール 3-リン酸デヒドロゲナーゼをコードする *KIGUT2* がその抑制に関わらないことを示唆した。*Y. lipolytica* におけるグリセロール抑制の機構については、森により、グリセロールによる *ALK1* の転写抑制が生じない変異株の単離と解析が行われ、*GUT1* が *K. lactis* と同様にグリセロールによる転写抑制に必要であることが示唆された[118]。また、森はグリセロール代謝経路 (Figure 6-0)の他の構成因子の関与を調べるため、*GUT2* の *Y. lipolytica* でのオルソログの破壊株について解析を行い、*GUT2* はグリセロールによる *ALK1* の転写抑制には関わらない可能性を示した[119]。

本章では、*ALK1* と  $\beta$  酸化経路の酵素であるアセトアセチル CoA チオラーゼをコードする *PAT1* の発現に対するグリセロールの影響を改めて調べるとともに、*GUT1* および *GUT2* の関与について詳細な解析を行った。

(本章後半部の内容は、学術雑誌論文として出版する計画があるため公表できない。5年以内に出版予定。)

## 6-2 実験方法と材料

### 6-2-1 菌体、遺伝子、培地

<菌株>

*Yarrowia lipolytica*

CXAU1 株	第 1 章に記載
CXAU/A1 株	第 2 章に記載
$\Delta gut1$ 株	<i>MATA adel ura3 gut1::ADE1</i> , CXAU1 株由来[118]
$\Delta gut2$ 株	<i>MATA adel ura3 gut2::ADE1</i> , CXAU1 株由来 (森亮樹, 未発表)
$\Delta gut1\Delta gut2$ 株	<i>MATA adel ura3 gut1::ADE1 gut2::URA3</i> , $\Delta gut1$ 株由来 (森亮樹, 未発表)
$\Delta yas3$ 株	<i>MATA adel ura3 yas3::ADE1</i> , CXAU1 株由来[62]
$\Delta yas3LZ$ 株	<i>MATA adel ura3::3xARE1s-minimal pLEU2-lacZ-ADE1 yas3</i> , CXU3xLZ1 株由来[58, 63]

*Escherichia coli*

JM109

第 1 章に記載

<遺伝子>

本章で解析した遺伝子の一覧

遺伝子名	Systematic name
<i>PAT1</i>	<i>YALI0E11099g</i>
<i>GUT1</i>	<i>YALI0F00484g</i>
<i>GUT2</i>	<i>YALI0B13970g</i>
<i>YAS3</i>	<i>YALI0C14784g</i>
<i>TRX2</i>	<i>YALI0F01496g</i>

*ALK1* は第 1 章に記載

<培地>

酵母用完全培地

YPD 培地

第 1 章に記載

酵母用最少培地

YNB 培地

第 1 章に記載

SG 培地

第 1 章に記載

SD 培地

第 1 章に記載

*n*-デカン培地

第 1 章に記載

オレイン酸培地

第 3 章に記載

グルコース/*n*-デカン培地

D(+)-グルコース	1.0%
<i>n</i> -デカン	1.0%
Yeast nitrogen base w/o amino acids and ammonium sulfate (Difco)	0.17%
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0.5%

グルコース/オレイン酸培地

D(+)-グルコース	1.0%
オレイン酸	1.0%
Yeast nitrogen base w/o amino acids	

and ammonium sulfate (Difco)	0.17%
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0.5%
グリセロール/ <i>n</i> -デカン培地	
グリセロール	1.0%
<i>n</i> -デカン	1.0%
Yeast nitrogen base w/o amino acids	
and ammonium sulfate (Difco)	0.17%
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0.5%
グリセロール/オレイン酸培地	
グリセロール	1.0%
オレイン酸	1.0%
Yeast nitrogen base w/o amino acids	
and ammonium sulfate (Difco)	0.17%
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0.5%
グルコース/グリセロール培地	
D(+)-グルコース	1.0%
グリセロール	1.0%
Yeast nitrogen base w/o amino acids	
and ammonium sulfate (Difco)	0.17%
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0.5%
クエン酸培地	
クエン酸ナトリウム	2.0%
Yeast nitrogen base w/o amino acids	
and ammonium sulfate (Difco)	0.17%
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0.5%
グリセロール/クエン酸培地	
グリセロール	1.0%
クエン酸ナトリウム	1.0%
Yeast nitrogen base w/o amino acids	
and ammonium sulfate (Difco)	0.17%
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0.5%

#### 酢酸培地

酢酸カリウム	1.0%
Yeast nitrogen base w/o amino acids and ammonium sulfate (Difco)	0.17%
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0.5%

#### グリセロール/酢酸培地

グリセロール	1.0%
酢酸カリウム	1.0%
Yeast nitrogen base w/o amino acids and ammonium sulfate (Difco)	0.17%
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0.5%

寒天培地には寒天 (Wako Pure Chemical Industries, Ltd.)を終濃度 2%となるように加えた。また、過酸化水素を培地に加える際には、100 mM 過酸化水素水を調製し、100 倍希釈となるように培地に添加した。

#### 酵母用最少培地 (固体培地で *n*-アルカンを与える場合)

<i>n</i> -アルカン培地	第 1 章に記載
SD+ <i>n</i> -アルカン培地	第 1 章に記載
SG + <i>n</i> -アルカン培地	
<i>n</i> -アルカン	*
グリセロール	2%
Yeast nitrogen base w/o amino acids and ammonium sulfate (Difco)	0.17%
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0.5%

寒天培地には寒天 (Wako Pure Chemical Industries, Ltd.)を終濃度 2%となるように加えた。  
\*寒天培地で *n*-アルカンを炭素源として培養する場合には、滅菌した濾紙をシャーレの蓋側に置き、*n*-アルカン (直径 85 mm のシャーレに対し 1 ml) を濾紙に染み込ませ、揮発させて与えた。濾紙の乾燥具合を見て適宜アルカンを加えた。*n*-アルカンとして、*n*-デカン (C10)、*n*-ヘキサデカン (C16)を使用した。

#### 大腸菌用完全培地

L-broth 培地	第 1 章に記載
------------	----------

### 6-2-2 培養条件

1-2-2 に従った。

### 6-2-3 プラスミド

以下のプラスミドを使用した。

pSUT5	第 1 章に記載
pSUT1642	第 4 章に記載
pBS-EGFP	第 2 章に記載
pSYAS1-HA	<i>YAS1</i> 自身のプロモーター制御下で C 末端に 3 コピーの HA タグを連結した <i>Yas1p-3xHA</i> を発現させるためのプラスミド [58]。

以下のプラスミドを作製し、使用した。

本項の内容は、学術雑誌論文として出版する計画があるため公表できない。5 年以内に出版予定。

### 6-2-4 プラスミドの構築

本項の内容は、学術雑誌論文として出版する計画があるため公表できない。5 年以内に出版予定。

### 6-2-5 遺伝子操作

1-2-5 に従った。

### 6-2-6 PCR

1-2-6 に従った。

### 6-2-7 塩基配列の決定

1-2-7 に従った。

### 6-2-8 *Y. lipolytica* の形質転換

1-2-8 に従った。

### 6-2-9 *Y. lipolytica* の全 DNA の調製

1-2-9 に従った。

### 6-2-10 *Y. lipolytica* の全 RNA の調製

1-2-10 に従った。

### 6-2-11 ノーザンハイブリダイゼーション

3-2-13 に従った。ただし、プローブ DNA の標識には PCR DIG Probe Synthesis Kit (F. Hoffmann-La Roche, Ltd.) を使用し、CXAU1 株の全 DNA より以下に示すプライマーを用いて PCR 法により増幅した。

遺伝子	プライマー	配列
<i>ALK1</i>	Northern(ALK1-F)	5'-ATGTCCAACGCCCTCAAC-3'
	Northern(ALK1-R)	5'-TGAGGTTCTCAGGGTCGAC-3'
<i>PAT1</i>	Northern(PAT1-F)	5'-GACTCACTCTGCCCCGAC-3'
	Northern(PAT2-R)	5'-CATGGACTCCATTCCACC-3'
<i>TRX2</i>	Northern(TRX2-F)	5'-ATGGCCGTTACCCAGATCACCTC-3'
	Northern(TRX2-R)	5'-TTAGACGTTCTGCTTGATGGCAG-3'

また、ノーザン解析におけるバンドの定量を次のようにして行った。各条件における標的遺伝子の mRNA のバンド強度 ( $I_T$ ) およびリボソーム RNA のバンド強度 ( $I_C$ ) を定量し、単位リボソーム RNA 量あたりの mRNA 量 ( $Q_T = I_T/I_C$ ) を算出した。それぞれの実験において、各条件における mRNA 量を対照となる条件を 1 とした相対値で示した。

### 6-2-12 $\beta$ -ガラクトシダーゼ活性測定

1-2-14 に従った。

### 6-2-13 酵母の生菌率測定

2-2-13 に従った。

### 6-2-14 蛍光顕微鏡観察

2-2-15 に従った。

### 6-2-15 *Y. lipolytica* 細胞抽出液の調製

2-2-16 に従った。

### 6-2-16 SDS-PAGE

2-2-18 に従った。

### 6-2-17 ウェスタン解析

2-2-19 に従った。但し、抗体として以下に示すものを利用した。

#### 抗体

一次抗体

$\alpha$ -HA 抗体            Anti-HA tag antibody [16B12] (Phycoerythrin) (Abcam PLC)

二次抗体

$\alpha$ -Mouse IgG 抗体    Anti-mouse IgG, HRP-linked Antibody (Cell Signaling Technology, Inc.)

抗体は 5000 倍希釈で使用した。

## 6-3 結果

### 6-3-1 *Y. lipolytica* におけるグリセロール抑制の解析

#### 6-3-1-1 グリセロール共存下における *ALK1* と *PAT1* の転写産物量

これまでに *ALK1* は *n*-アルカンにより、 $\beta$ 酸化経路の酵素であるアセトアセチル CoA チオラーゼをコードする *PAT1* はオレイン酸により発現が誘導され、グリセロール共存下で発現が低下することが示されていた[52, 118]。本研究では、まずこれらの遺伝子の発現に対する様々な炭素源およびその組み合わせの影響を解析した。SD 液体培地で前培養した野生型株をグルコース、グリセロール、*n*-デカン、オレイン酸、グルコースおよびグリセロール、グルコースおよび *n*-デカン、グルコースおよびオレイン酸、グリセロールおよび *n*-デカン、グリセロールおよびオレイン酸を炭素源とした培地で 1 時間培養し、全 RNA を抽出して、*ALK1*、*PAT1* のノーザン解析を行った (Figure 6-1A)。その結果、グルコースを炭素源とした場合と比較して *n*-デカンを炭素源とした場合には、*ALK1* mRNA の量は増加し、その量は *n*-デカンとグルコース共存下でも大きな変化は見られなかったのに対して、*n*-デカンとグリセロール共存下では *ALK1* mRNA の量は大きく減少した。*PAT1* mRNA の量は *n*-デカンまたはオレイン酸で培養すると増加し、グルコース共存下で大きな変化は見られなかった。それに対して、グリセロールの添加により *n*-デカンでの *PAT1* mRNA の増加は大きく抑制され、オレイン酸での *PAT1* mRNA の増加はわずかに抑制された。

それぞれの培地における *ALK1* mRNA 量の変化が転写レベルの増減によることを確かめるため、*ALK1* プロモーター下に *lacZ* を挿入したプラスミドを導入した野生型株を SD 液体培地で前培養した後、グルコース、グリセロール、*n*-デカン、グルコースおよび *n*-デカン、グリセロールおよび *n*-デカンで 3 時間培養し、その細胞抽出液中の  $\beta$ -ガラクトシダーゼ活性を測定した (Figure 6-1B)。その結果、*n*-デカンで培養すると  $\beta$ -ガラ

クトシダーゼ活性は大きく上昇したが、グリセロール添加により、活性は顕著に減少した。この結果から、グリセロール添加による *ALK1* mRNA 量の減少は転写抑制によることが再度確認された。

#### 6-3-1-2 *GUT1* 破壊株、*GUT2* 破壊株、*GUT1*, *GUT2* 二重破壊株の生育

森により作製された *Y. lipolytica* の *GUT1*、*GUT2* の単独破壊株 ( $\Delta gut1$  株、 $\Delta gut2$  株) および二重破壊株 ( $\Delta gut1\Delta gut2$  株) について各々の炭素源を含む固体培地での生育を調べた (Figure 6-2)。グリセロールを単一の炭素源とした場合、 $\Delta gut1$  株および  $\Delta gut1\Delta gut2$  株では著しい生育の遅延が見られ、 $\Delta gut2$  株では生育が見られなかった。それに対して、いずれの破壊株もグルコース、クエン酸、酢酸、*n*-デカン、*n*-ヘキサデカンを単一の炭素源とした場合に野生型株と同様の生育を示した。 $\Delta gut1$  株および  $\Delta gut1\Delta gut2$  株はグリセロールを含む培地にこれらの炭素源をさらに添加すると生育することができたが、 $\Delta gut2$  株はグリセロールを含む培地に他の炭素源を添加しても生育できなかった。このことから、グリセロールは  $\Delta gut2$  株に対して毒性があることが示唆された。

#### 6-3-1-3 $\Delta gut1$ 株、 $\Delta gut2$ 株、 $\Delta gut1\Delta gut2$ 株における *ALK1* および *PAT1* のノーザン解析

SD 液体培地で前培養した  $\Delta gut1$  株、 $\Delta gut2$  株および  $\Delta gut1\Delta gut2$  株をグリセロール、*n*-デカン、グリセロールあるいは *n*-デカンで 1 時間培養し、全 RNA を抽出して、*ALK1*、*PAT1* のノーザン解析を行った (Figure 6-3A)。その結果、 $\Delta gut1$  株、 $\Delta gut1\Delta gut2$  株ではグリセロール添加による *ALK1* および *PAT1* の転写産物量の減少が見られなかった。一方、 $\Delta gut2$  株では野生型株と同様にグリセロール添加による *ALK1* および *PAT1* の転写産物量の減少が見られた。次に、この mRNA 量の変化が転写レベルによるものであるか確認するため、*ALK1* プロモーター下に *lacZ* を挿入したプラスミドを導入した野生型株、 $\Delta gut1$  株および  $\Delta gut2$  株を SD 液体培地で前培養した後、グリセロール、*n*-デカン、グリセロールおよび *n*-デカンを炭素源とした培地で 1 時間培養し、細胞抽出液中の  $\beta$ -ガラクトシダーゼ活性を測定した (Figure 6-3B)。野生型株と  $\Delta gut2$  株ではグリセロール添加により  $\beta$ -ガラクトシダーゼ活性の減少が見られたのに対し、 $\Delta gut1$  株ではその減少は見られなかった。したがって、各破壊株におけるグリセロールによる *ALK1* および *PAT1* の転写産物の変化は転写レベルによるものであると考えられた。これらの結果から、グリセロールによる *ALK1* および *PAT1* の転写抑制には *GUT1* が必須であることが示された。また、 $\Delta gut1$  株、 $\Delta gut2$  株、 $\Delta gut1\Delta gut2$  株を SD 液体培地で前培養した後、グルコース、*n*-デカン、グルコースおよび *n*-デカンを炭素源とした培地で 1 時間培養し、全 RNA を抽出して、*ALK1* および *PAT1* のノーザン解析を行ったところ、これら破壊株において、*ALK1* および *PAT1* の mRNA 量のグルコース添加による変化は見られなかった (Figure 6-4)。

#### 6-3-1-4 $\Delta gut2$ 株へのグリセロールの影響

Figure 6-3 の結果からグリセロールによる *ALK1* および *PAT1* の転写抑制はグリセロール-3-リン酸により引き起こされる可能性が考えられた。一方で、Figure 6-2 の結果からグリセロールが  $\Delta gut2$  株に対し毒性を示すことが示唆されたことから、 $\Delta gut2$  株で見られたグリセロール添加による *ALK1* および *PAT1* の転写産物の減少は細胞が死滅したためである可能性も考えられた。

そこで、グリセロールを含む培地で1時間または3時間培養した野生型株、 $\Delta gut1$  株、 $\Delta gut2$  株および  $\Delta gut1\Delta gut2$  株の生菌率をフロキシシンB染色により測定した (Figure 6-5A)。その結果、 $\Delta gut2$  株は他の株と同様にグリセロール培地で1時間または3時間培養した後でもほとんど死滅していないことが示された。また、グリセロール培地で20時間培養した後でも、70%以上生存していることが示された (Figure 6-5A)。以上の結果から、Figure 6-3 で見られた  $\Delta gut2$  株におけるグリセロール添加による *ALK1*、*PAT1* の転写産物の減少は、 $\Delta gut2$  株が死滅したためでないことが示唆された。

次に、 $\Delta gut2$  株をグリセロールを含む培地で培養した時に転写が起こっているのかを明らかにするため、炭素源代謝とは無関係の遺伝子の転写誘導に対するグリセロール添加の影響を調べることにした。*S. cerevisiae* において、チオレドキシシンをコードする *TRX2* の発現は過酸化水素の添加により誘導される [120]。*Y. lipolytica* のゲノムデータベースを検索したところ、Trx2p とアミノ酸レベルで57%の同一性を示すタンパク質をコードすると推定される遺伝子 *YALI0F01469g* が見出され、これを *Y. lipolytica* において *TRX2* と命名した。そこで、*TRX2* の発現に対するグリセロールの効果を解析した。野生型株および  $\Delta gut2$  株をグルコースまたはグルコースおよびグリセロールで1時間培養した後、終濃度 1 mM となるように過酸化水素を添加してさらに1時間培養し、細胞から全 RNA を抽出して、*TRX2* のノーザン解析を行った (Figure 6-5B)。その結果、野生型株ではグルコースまたはグルコースおよびグリセロールのどちらの培養条件でも過酸化水素添加により *TRX2* mRNA 量が増加したことから、*S. cerevisiae* と同様に、*Y. lipolytica* においても *TRX2* の発現は酸化ストレスにより誘導されることが示唆された。一方、 $\Delta gut2$  株ではグルコースを炭素源とした場合には野生型株と同程度の *TRX2* の転写産物量が認められ、さらに、過酸化水素処理により *TRX2* の転写産物量は野生型株と同様に増加したのに対して、グリセロールを添加した場合には *TRX2* の転写産物の量は大きく減少し、さらに、過酸化水素を添加した場合には僅かに転写産物量は増加したものの、そのレベルは野生型株と比較するとはるかに低かった。これらの結果から、 $\Delta gut2$  株はグリセロール添加によりすぐに死滅することはないが、広範な遺伝子の転写が大きく低下していることが示唆された。

#### 6-3-1-5 ジヒドロキシアセトンによる *ALK1* の転写抑制

グリセロール代謝において、グリセロールはグリセロール-3-リン酸またはジヒドロキシアセトン (dihydroxyacetone; DHA) を経て、ジヒドロキシアセトンリン酸 (dihydroxyacetone phosphate; DHAP) になると考えられている (Figure 6-0B)。そこで、DHA 添加により *ALK1* の転写抑制が生じなければ、グリセロール-3-リン酸がグリセロールによる *ALK1* の転写抑制に必要であることを支持できると考えられた。*ALK1* プロモーター下に *lacZ* を挿入したプラスミドを導入した野生型株を DHA、*n*-デカン、DHA および *n*-デカンで 3 時間培養し、その細胞抽出液中の  $\beta$ -ガラクトシダーゼ活性を測定した (Figure 6-6)。その結果、DHA の添加によっても、*ALK1* プロモーター活性の減少が見られ、DHA も *ALK1* の誘導を抑制することが示唆された。

#### 6-3-2 *Yas3p* の局在制御に関する解析

本項の内容は、学術雑誌論文として出版する計画があるため公表できない。5 年以内に出版予定。

### 6-4 考察

#### 6-4-1 *n*-アルカンと脂肪酸による転写誘導とグリセロールによる抑制

*ALK1* および *PAT1* mRNA は *n*-デカンの存在により発現が誘導され、グリセロール添加により抑制された。また、オレイン酸により増加した *PAT1* mRNA の量はグリセロールの添加により僅かに減少した (Figure 6-1A)。*ALK1* と *PAT1* は ORF 上流に ARE1 を持っており、*n*-アルカンによる発現制御には *Yas1p*、*Yas2p*、*Yas3p* が関与する [58, 59, 62]。また、*PAT1* はオレイン酸によっても発現が促進されるが、これには  $Zn_2Cys_6$  型転写因子である *Por1p* が関与する [67]。この様に異なる機構により活性化された遺伝子の転写をグリセロールがどのように抑制するのかは興味深い問題である。小林らにより行われた *Y. lipolytica* の網羅的転写解析の結果では、グルコースを含む培地と比較して *n*-デカンを含む培地で発現が 2 倍以上誘導される遺伝子の中で、*Yas2p* および *Yas3p* に発現が制御されている遺伝子は 79 種あるが、*n*-デカン存在下で 79 遺伝子の全ての転写がグリセロールの共存により抑制されることが示されている (Figure 0-3C)。この結果から、グリセロールからのシグナルが転写因子である *Yas1p*、*Yas2p* あるいは *Yas3p* に伝わる可能性が考えられる。また、転写活性化因子をコードする *YAS1* および *YAS2* の発現は *n*-アルカンにより活性化されるが、グリセロールの共存下で抑制されることから、この影響によりこれら遺伝子の発現が抑制された可能性も考えられる。いずれにしても、今後レポーター解析などにより、グリセロール抑制への ARE1 の関与を解析する必要があるであろう。一方で、*Yas1p*、*Yas2p*、*Yas3p* に依存しないが *n*-アルカンにより発現が活性化される遺伝子も多数存在するが、これら遺伝子の多くもグリセロール添加により発現が抑制される (Figure 0-3C)。このことから、グリセロールからのシグナルを受ける他の

転写抑制因子の存在も予想される。

グリセロールの存在により *ALK1* の転写が抑制されることから、*Y. lipolytica* は炭素源として *n*-アルカンよりもグリセロールを好み、グリセロールを優先的に資化するために *n*-アルカンを資化するための遺伝子を抑制していると考えられる。また、*Y. lipolytica* の網羅的転写解析から  $\beta$  酸化やペルオキシソーム生合成に関わる 20 以上の遺伝子の転写は *n*-アルカンの存在により活性化されるがグリセロールの存在により抑制されること、グルコースにより誘導されるグルコキナーゼをコードする *YIGLK1* がグリセロール共存下では発現が強く抑制されること [121]が分かっている。したがって、*Y. lipolytica* において、*n*-アルカンのみならず脂肪酸やグルコースなどの他の炭素源資化に関わる遺伝子の転写がグリセロールにより抑制され、グリセロールが優先的に利用されることが考えられる。実際に、*Y. lipolytica* の倍加時間はグルコースを単一の炭素源とした最少培地では  $126 \pm 4$  分であるのに対して、グリセロールを単一の炭素源とした場合は  $83 \pm 1$  分であり、グリセロールを炭素源とした方が生育が早いこと (当研究室, 小林)、*n*-デカンとグリセロール共存下ではグリセロールが優先的に消費されること [121]が示されている。このように、*Y. lipolytica* は多くの酵母と異なりグリセロールを効率的に利用できると考えられる。

#### 6-4-2 グリセロールによる転写抑制の分子機構

$\Delta gut1$  株では、野生型株と同様に *n*-デカンにより *ALK1* および *PAT1* の発現が誘導されるが、グリセロール共存下における発現抑制が見られなかった (Figure 6-3)。これまで、グリセロールによる転写抑制の直接的な引き金となっている物質は不明であったが、この結果および森の結果から、グリセロールによる転写抑制にグリセロールのリン酸化が必要であることが示唆された。 $\Delta gut2$  株では、グリセロール添加による *ALK1*、*PAT1* の転写産物の減少が野生型株と同様に見られたが (Figure 6-3)、野生型株ではグリセロールの有無により発現量に変化が現れない *TRX2* の mRNA 量が  $\Delta gut2$  株ではグリセロールの添加により著しく低下していたことから (Figure 6-5C)、 $\Delta gut2$  株における *ALK1* や *PAT1* のグリセロールによる発現量の減少は広範な遺伝子の転写が低下していることによるものであり、*ALK1* や *PAT1* に特異的ではない可能性も考えられた。

#### 6-4-3 DHA による *ALK1* プロモーターの転写抑制

DHA 添加による *ALK1* の発現への影響を調べたところ、DHA の添加により *ALK1* プロモーターの転写抑制が見られた (Figure 6-6)。DHA や DHAP なども転写抑制に関与する可能性が考えられる。また、DHA は DHAP を経て解糖系に入り、利用されることが考えられるが、DHA からグリセロールへの変換に関わる酵素の存在も *Y. lipolytica* のゲノムデータベースから推定されており [122]、DHA 添加による *ALK1* の転写抑制は DHA がグリセロールへと変換されたためである可能性も考えられる。

#### 6-4-4 グリセロールの $\Delta gut2$ 株への毒性

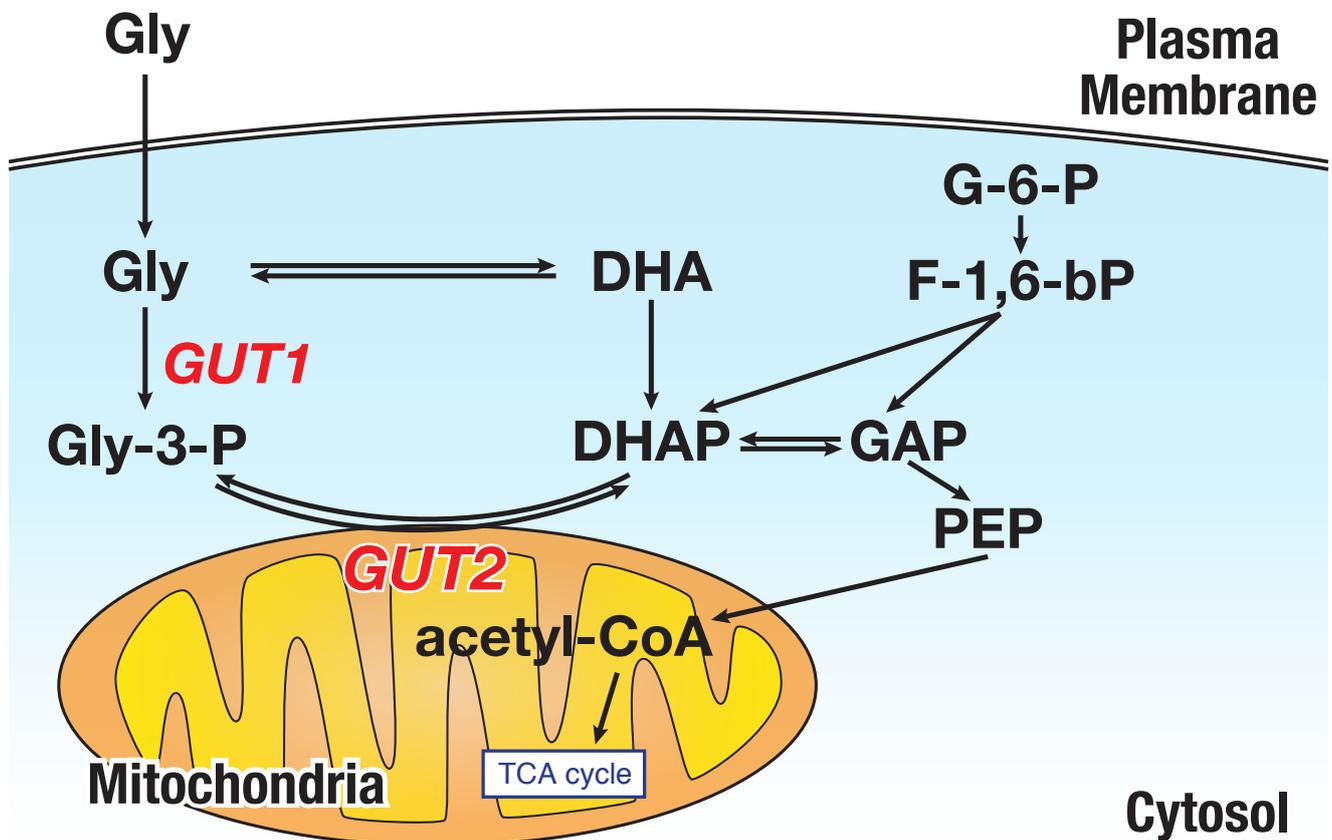
グリセロール存在下で  $\Delta gut2$  株はすぐに死滅することはないが、広範な遺伝子の転写が抑えられることが示唆された (Figure 6-5)。現時点ではグリセロールによる生育阻害が広範な遺伝子の転写抑制につながるのか、または、広範な遺伝子の転写抑制が細胞周期の停止につながるのかは明らかではない。*GUT2* 欠損によるグリセロール-3-リン酸の過剰な蓄積が *Y. lipolytica* への毒性に関与する可能性が考えられる。*S. cerevisiae* における *gut2* 変異株の解析から、*GUT2* 欠損は G3P シヤトルによる NADH の消費を抑え、特にグリセロール存在下において細胞内の  $NAD^+/NADH$  比の不均衡をもたらし、生育を阻害すると考えられており [123]、*Y. lipolytica* の *GUT2* 破壊株におけるグリセロールの毒性もこのことで説明できるかもしれない。

#### 6-4-5 グリセロール抑制の生理的意義

*Y. lipolytica* がグリセロールを優先して資化する意義は明らかではない。*Y. lipolytica* は疎水性物質として *n*-アルカンや脂肪酸の他にトリグリセリドを利用できるが、トリグリセリドを利用する際に、*Y. lipolytica* は細胞外にリパーゼを分泌し、トリグリセリドを構成単位である脂肪酸とグリセロールに分解して資化すると考えられている [124]。*Y. lipolytica* はグリセロール抑制機構により、脂肪酸を含めて他の生物種が比較的に利用しづらいた疎水性物質に優先してグリセロールを資化することにより、生存を有利にしているのかもしれない。

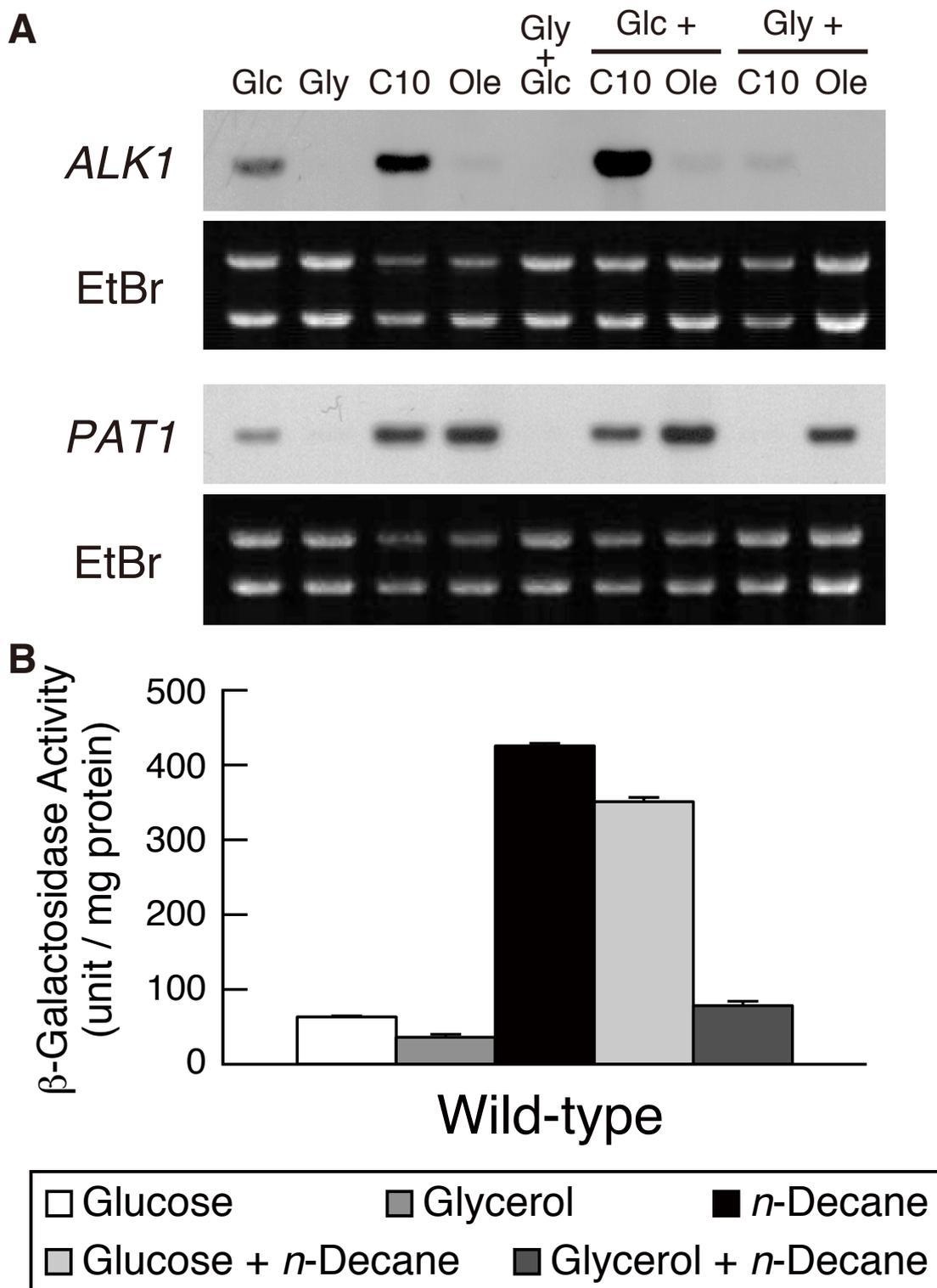
#### 6-4-6 *Yas3p* のリン酸化

本項の内容は、学術雑誌論文として出版する計画があるため公表できない。5年以内に出版予定。



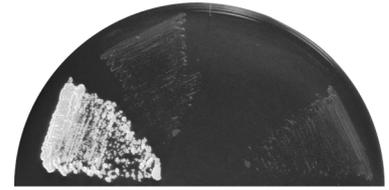
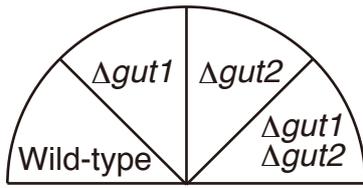
**Figure 6-0. *S. cerevisiae* におけるグリセロール代謝**

細胞内に取り込まれたグリセロール (glycerol; Gly)は Gut1p によりグリセロール-3-リン酸 (glycerol 3-phosphate; G-3-P)となる。続いて、ミトコンドリアに局在する Gut2p によりジヒドロキシアセトンリン酸 (dihydroxyacetone phosphate; DHAP)へと変換される。DHAP はその後、解糖系、TCA 回路を経て細胞内で利用される。Gly から DHAP への経路として、ジヒドロキシアセトン (dihydroxyacetone; DHA)を経由する経路もある。DHAP はグリセルアルデヒド-3-リン酸 (glyceraldehyde 3-phosphate; GAP)へと異性化され、後の解糖系に入る。G-6-P; glucose 6-phosphate, F-1,6-bP; fructose 1,6-bisphosphate, PEP; phosphoenolpyruvic acid, TCA cycle; tricarboxylic acid cycle.

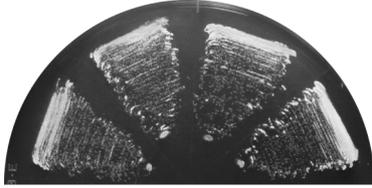


**Figure 6-1. *ALK1* と *PAT1* のグリセロール抑制**

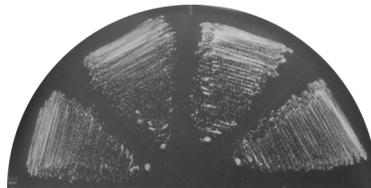
(A) CXAU1/A1 株 (野生型株) から抽出した全 RNA を用いたノーザン解析。SD 液体培地で対数増殖期まで培養した後、グルコース (Glc)、グリセロール (Gly)、*n*-デカン (C10)、オレイン酸 (Ole)、グルコースおよびグリセロール (Glc + Gly)、グルコースおよび *n*-デカン (Glc + C10)、グルコースおよびオレイン酸 (Glc + Ole)、グリセロールおよび *n*-デカン (Gly + C10)、またはグリセロールおよびオレイン酸 (Gly + Ole) を含む YNB 液体培地にシフトしてさらに 1 時間培養した菌体から全 RNA を抽出した。臭化エチジウム (EtBr) で染色したリボソーム RNA をローディングコントロールとした。(B) *ALK1* プロモーターを用いた  $\beta$ -ガラクトシダーゼ活性測定。pSUT1642 を導入した CXAU/A1 株 (Wild-type) を SD 液体培地で対数増殖期まで培養した後、グルコース、グリセロール、*n*-デカン、グルコースおよび *n*-デカン、またはグリセロールおよび *n*-デカンを含む YNB 液体培地に OD<sub>600</sub>=1.0 となるようにシフトして 3 時間培養した。得られた菌体から粗酵素液を抽出し、 $\beta$ -ガラクトシダーゼ活性測定を行った。独立した 3 回の実験の平均値を棒グラフ、標準誤差をエラーバーで示した。

**A**

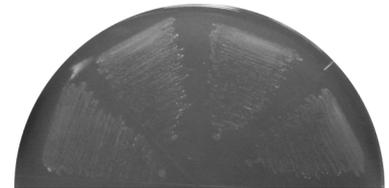
Glycerol



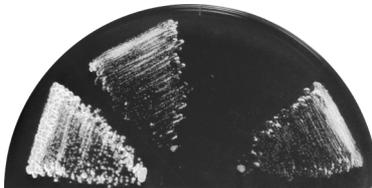
Glucose



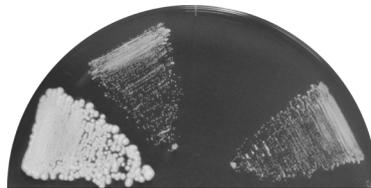
Acetate



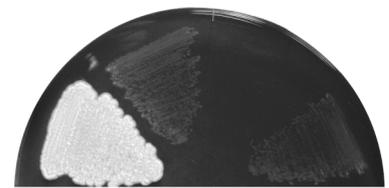
Citrate



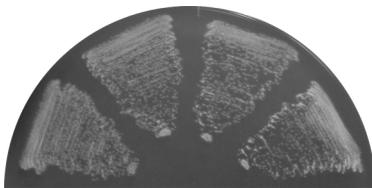
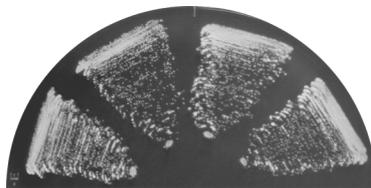
Glycerol + Glucose



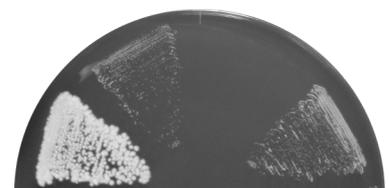
Glycerol + Acetate



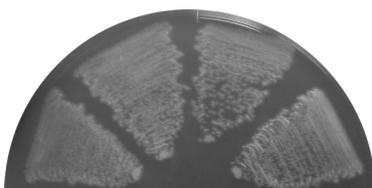
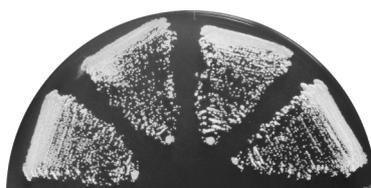
Glycerol + Citrate

**B***n*-Decane (C10)

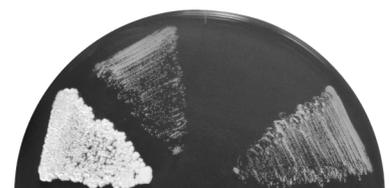
Glucose + C10



Glycerol + C10

*n*-Hexadecane (C16)

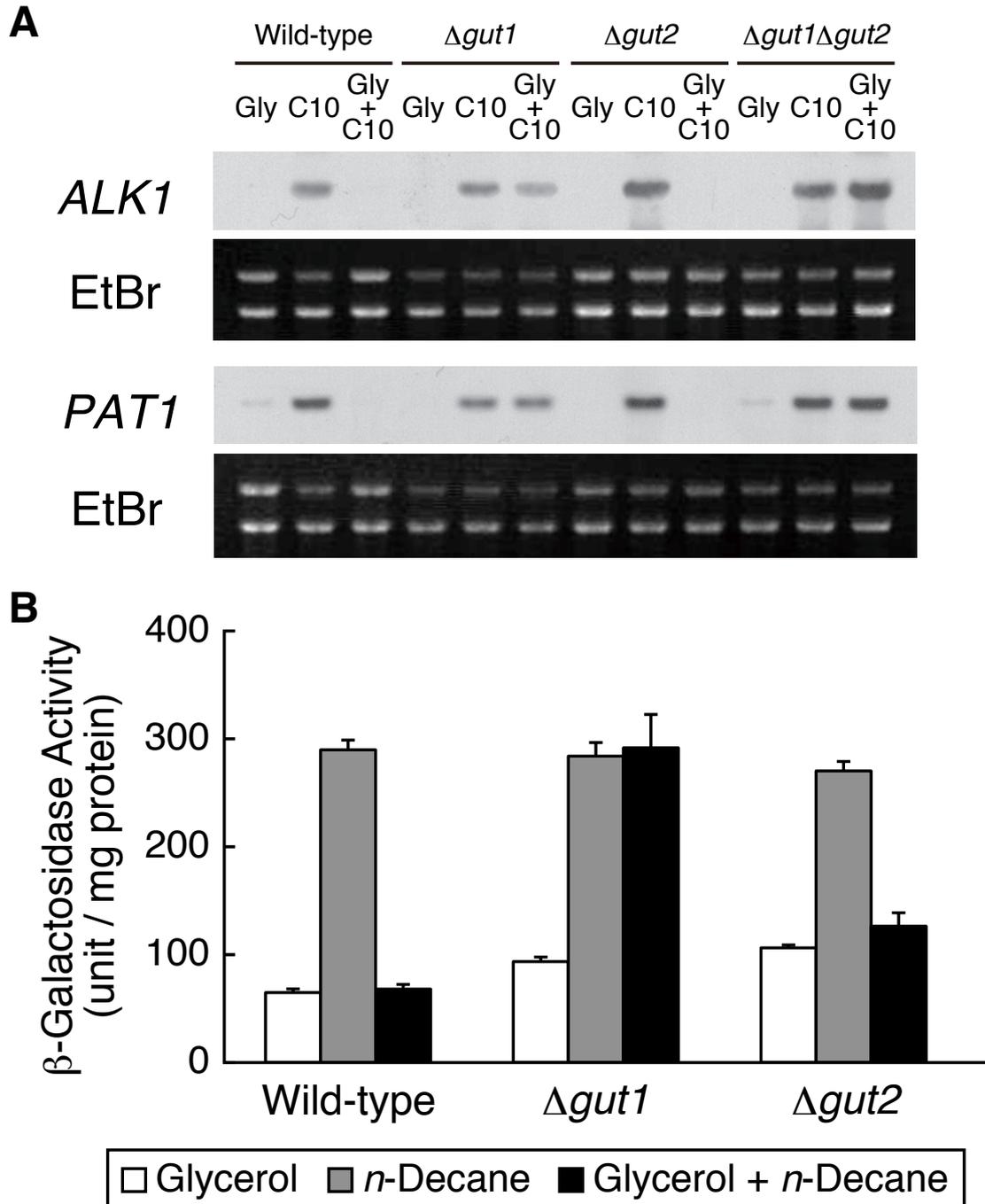
Glucose + C16



Glycerol + C16

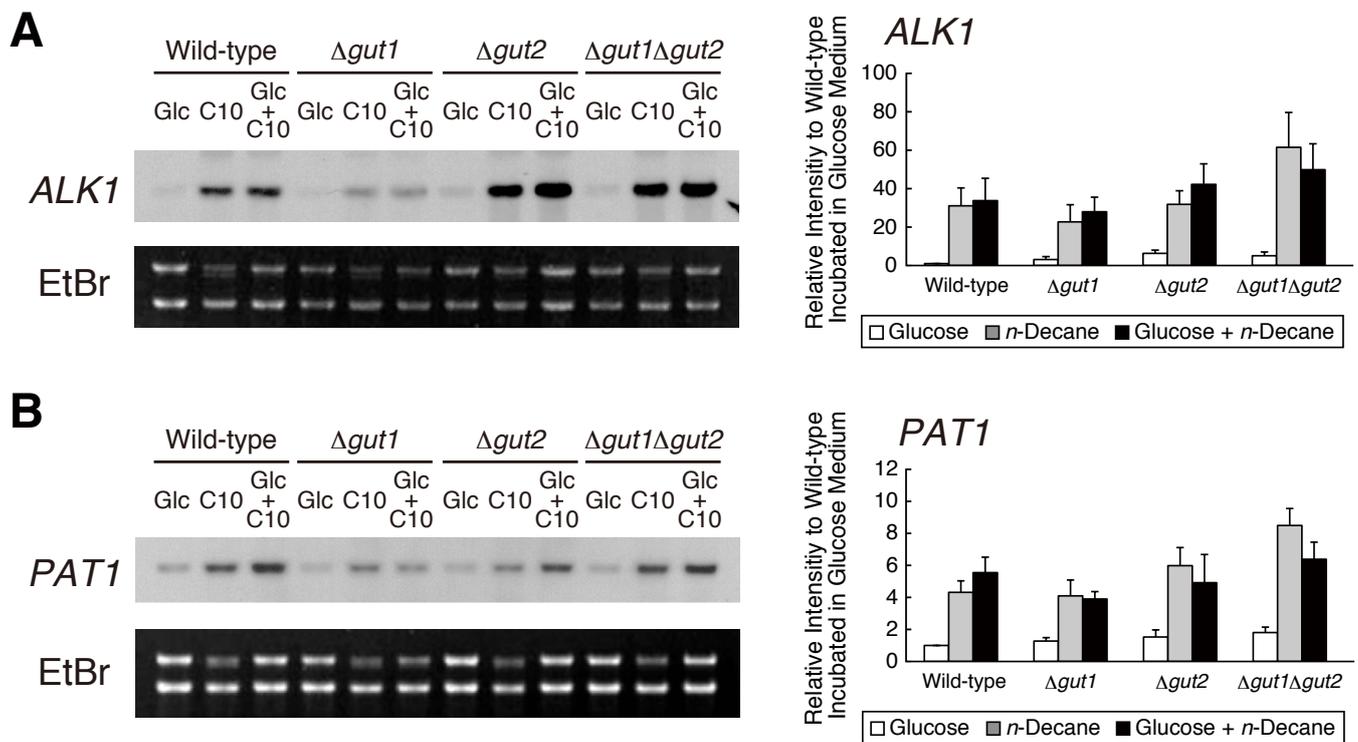
**Figure 6-2.  $\Delta gut1$  株、 $\Delta gut2$  株、 $\Delta gut1\Delta gut2$  株の生育**

(A) pSUT5 を導入した CXAU/A1 株 (Wild-type)、pSUT5 を導入した  $\Delta gut1$  株 ( $\Delta gut1$ )、pSUT5 を導入した  $\Delta gut2$  株 ( $\Delta gut2$ )、 $\Delta gut1\Delta gut2$  株 ( $\Delta gut1\Delta gut2$ ) の各炭素源における生育。グルコース、グリセロール、またはグルコースおよびグリセロールを炭素源とした場合には 2 日間、酢酸ナトリウム、酢酸ナトリウムおよびグリセロール、クエン酸ナトリウム、またはクエン酸ナトリウムおよびグリセロールを炭素源とした場合には 3 日間培養した。(B) (A) で用いた株の *n*-アルカンを含む培地における生育。*n*-デカンまたは *n*-ヘキサデカン を炭素源とした場合には 5 日間、グルコースおよび *n*-デカンまたはグルコースおよび *n*-ヘキサデカン を炭素源とした場合には 3 日間、グリセロールおよび *n*-デカンまたはグリセロールおよび *n*-ヘキサデカン を炭素源とした場合には 4 日間培養した。



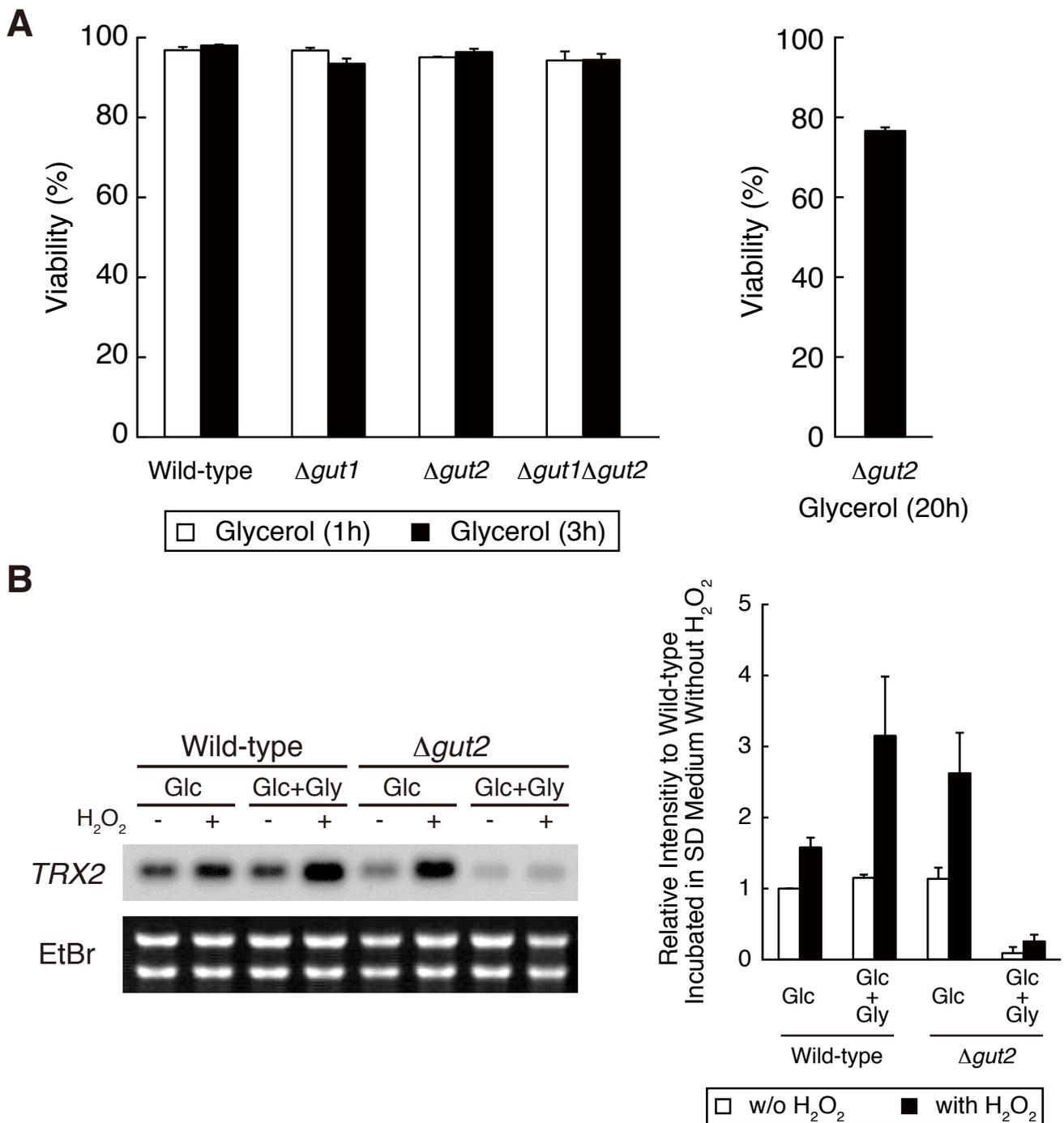
**Figure 6-3. *GUT1*、*GUT2* 破壊株における *ALK1* および *PAT1* の発現解析**

(A) CXAU1/A1 株 (Wild-type)、 $\Delta gut1$  株、 $\Delta gut2$  株、 $\Delta gut1\Delta gut2$  株から抽出した全 RNA を用いたノーザン解析。SD 液体培地で対数増殖期まで培養した後、グリセロール (Gly)、*n*-デカン (C10)、またはグリセロールおよび *n*-デカン (Gly + C10) を含む YNB 液体培地にシフトしてさらに 1 時間培養した菌体から全 RNA を抽出した。臭化エチジウム (EtBr) で染色したリボソーム RNA をローディングコントロールとした。(B) *ALK1* プロモーターを用いた  $\beta$ -ガラクトシダーゼ活性測定。pSUT1642 を導入した CXAU1/A1 株 (Wild-type)、 $\Delta gut1$  株、 $\Delta gut2$  株を SD 液体培地で対数増殖期まで培養した後、グリセロール、*n*-デカン、またはグリセロールおよび *n*-デカンを含む YNB 液体培地に OD<sub>600</sub>=1.0 となるようにシフトして 3 時間培養した。得られた菌体から粗酵素液を抽出し、 $\beta$ -ガラクトシダーゼ活性測定を行った。独立した 3 回の実験の平均値を棒グラフ、標準誤差をエラーバーで示した。



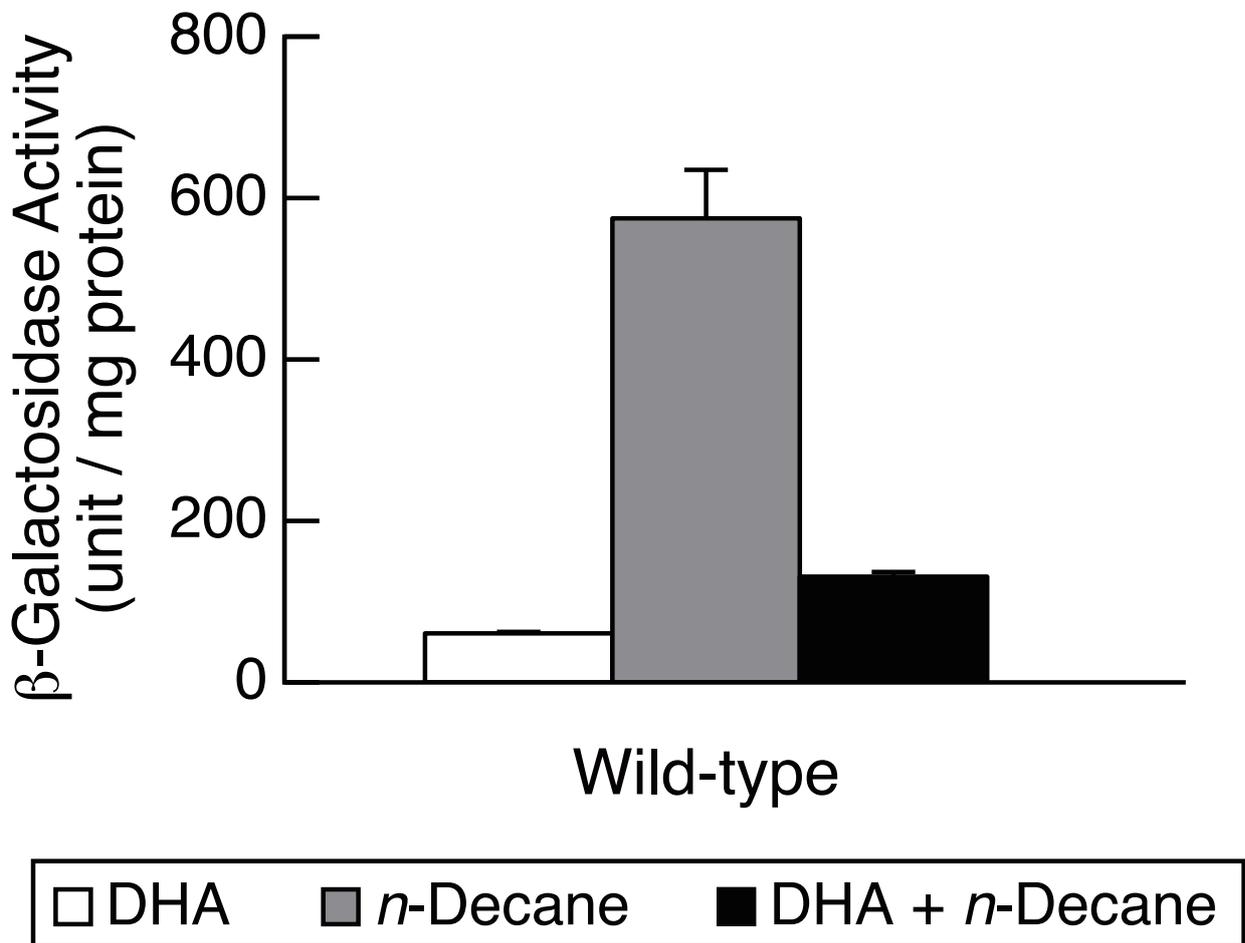
**Figure 6-4. グルコース存在下における *ALK1* および *PAT1* の発現解析**

(A) (left panel) CXAU1/A1 株 (Wild-type)、 $\Delta gut1$  株、 $\Delta gut2$  株、 $\Delta gut1\Delta gut2$  株から抽出した全 RNA を用いた *ALK1* のノーザン解析。SD 液体培地で対数増殖期まで培養した後、グルコース (Glc)、*n*-デカン (C10)、またはグルコースおよび *n*-デカン (Glc + C10) を含む YNB 液体培地にシフトしてさらに 1 時間培養した菌体から全 RNA を抽出した。臭化エチジウム (EtBr) で染色したリボソーム RNA をローディングコントロールとした。(right panel) それぞれの条件におけるバンド強度を定量し、グルコースを含む YNB 液体培地で培養した CXAU/A1 株を 1 とした相対値を示す。独立した 3 回の実験の平均値を棒グラフ、標準誤差をエラーバーで示した。(B) (A) と同様の実験を *PAT1* に関しても行った。



**Figure 6-5. *GUT2* 単独破壊株へのグリセロールの影響**

(A) グリセロール培地における CXAU1/A1 株 (Wild-type)、 $\Delta gut1$  株、 $\Delta gut2$  株、 $\Delta gut1\Delta gut2$  株の生菌率。pSUT5 を導入した CXAU1/A1 株 (Wild-type)、pSUT5 を導入した  $\Delta gut1$  株 ( $\Delta gut1$ )、pSUT5 を導入した  $\Delta gut2$  株 ( $\Delta gut2$ )、 $\Delta gut1\Delta gut2$  株 ( $\Delta gut1\Delta gut2$ ) を SD 液体培地で対数増殖期まで培養した後、SG 培地にシフトして 1 時間または 3 時間培養した。培養後の生菌率をフロキシシン B 染色により測定した。独立した 3 回の実験の平均値を棒グラフ、標準誤差をエラーバーで示した。また、pSUT5 を導入した  $\Delta gut2$  株を SD 液体培地で対数増殖期まで培養した後、SG 培地にシフトして 20 時間培養した。培養後の生菌率をフロキシシン B 染色により測定した。独立した 3 回の実験の平均値を棒グラフ、標準誤差をエラーバーで示した。(B) CXAU1/A1 株 (Wild-type)、 $\Delta gut2$  株から抽出した全 RNA を用いた *TRX2* のノーザン解析。(left panel) CXAU1/A1 株 (Wild-type)、 $\Delta gut2$  株を SD 液体培地で対数増殖期まで培養した後、グルコース (Glc) またはグルコースおよびグリセロール (Glc + Gly) を含む YNB 液体培地にシフトしてさらに 2 時間培養した菌体、あるいはグルコース (Glc) またはグルコースおよびグリセロール (Glc + Gly) を含む YNB 液体培地にシフトして 1 時間培養した後、終濃度 1 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> を加えてさらに 1 時間培養した菌体から全 RNA を抽出した。臭化エチジウム (EtBr) で染色したリボソーム RNA をローディングコントロールとした。(right panel) それぞれの条件におけるバンド強度を定量し、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> を添加しないグルコースで培養した CXAU1/A1 株を 1 とした相対値を示す。独立した 3 回の実験の平均値を棒グラフ、標準誤差をエラーバーで示した。



**Figure 6-6. DHA を含む培地における *ALK1* プロモーター活性**

pSUT1642 を導入した CXAU1/A1 株 (Wild-type) を SD 液体培地で対数増殖期まで培養した後、DHA、*n*-デカン、または DHA および *n*-デカンを含む YNB 液体培地に OD<sub>600</sub>=1.0 となるようにシフトして 3 時間培養した。得られた菌体から粗酵素液を抽出し、β-ガラクトシダーゼ活性測定を行った。独立した 3 回の実験の平均値を棒グラフ、標準誤差をエラーバーで示した。

## 終章

本研究では酵母 *Y. lipolytica* における *n*-アルカンの代謝経路とその制御機構の解明を目的として研究を行った。

第1章では、*Y. lipolytica* において、P450<sub>ALK</sub> をコードすると推定された12種の *ALK* 遺伝子を全て破壊した  $\Delta alk1-12$  株の詳細な解析を行い、 $\Delta alk1-12$  株では実際に *n*-アルカン誘導性 P450 の生産が見られないこと、 $\Delta alk1-12$  株は *n*-アルカンを経路変換できないこと、 $\Delta alk1-12$  株は *n*-アルカンを炭素源とした培地では生育できないが長鎖アルコールや長鎖アルデヒド、脂肪酸では生育できることを示し、*ALK* 遺伝子が *n*-アルカンの資化に必須であることを示した。また、 $\Delta alk1-12$  株において各 Alk タンパク質を単独で生産させ、*n*-アルカンを炭素源とした培地での生育や脂肪酸を培地に与えた場合のジカルボン酸生産量を指標として、各 Alk タンパク質の活性を評価した。その結果、Alk1p は幅広い鎖長の *n*-アルカンを基質にすること、Alk2p は比較的長鎖の *n*-アルカンを基質とすることが示された。また、Alk3p、Alk6p、Alk9p、Alk10p は高発現した場合に *n*-アルカンを炭素源とした生育を支持できることが示された。さらに、これらの Alk タンパク質の *n*-アルカンの鎖長に対する特異性について解析を行い、Alk3p は幅広い鎖長の *n*-アルカンを基質にすること、Alk6p は幅広い鎖長の *n*-アルカンを基質にできるが、比較的長鎖の *n*-アルカンに対して活性が高いこと、Alk9p は長鎖の *n*-アルカンを基質にすること、Alk10p は比較的短鎖の *n*-アルカンを基質にすることが示唆された。一方、Alk3p、Alk4p、Alk5p、Alk6p、Alk7p を発現させた株にドデカン酸を与えた場合にドデカン二酸が生産されたことから、これらの Alk タンパク質は脂肪酸の  $\omega$  末端を水酸化する活性を持つことが示唆された。さらに Alk1p、Alk2p、Alk8p、Alk9p、Alk11p についても活性は低いもののドデカン酸を基質にする可能性が示唆された。さらに、*n*-アルカンを基質にするが脂肪酸に対してほとんど活性を示さない Alk1p と、脂肪酸を基質にするが *n*-アルカンを基質にしない Alk5p を用いて、基質認識機構の解明を試みた。*B. megaterium* の P450<sub>BM-3</sub> を鋳型としたホモロジーモデリングから、Alk5p において脂肪酸認識に関与すると考えられる塩基性残基を抽出し、アミノ酸変異体の解析を行ったが、Alk1p と Alk5p の基質認識に関与する領域を特定することはできなかった。

第2章では、*ADH1* – *ADH7*、*FADH*、*FAO1* を全て破壊した株は細胞外から与えた長鎖アルコールを資化できないこと、細胞外の長鎖アルコールに対して感受性を示すことが明らかとなった。また、それぞれの遺伝子を単独で戻した株の解析を行い、細胞外から与えた長鎖アルコールの資化に *ADH1*、*ADH3*、*FAO1* が関与することが示された。実際に、*ADH1*、*ADH3*、*FAO1* の3つの遺伝子を破壊した株は培地に与えた長鎖アルコールを資化できなくなった。さらに、Adh1p、Adh3p は細胞質あるいはいずれかの細胞小器官に存在すること、Faolp はペルオキシソームに局在することが示唆された。また、

Alk タンパク質群が細胞外から与えた長鎖アルコールの酸化・解毒に関与する可能性が考えられた。

第3章では、小林らにより行われた網羅的転写解析の結果および *Y. lipolytica* のゲノム情報から *n*-アルカンの代謝に関わる可能性のある長鎖アルデヒドデヒドロゲナーゼをコードすると推定される遺伝子を4種 (*HFD1*、*HFD2*、*HFD3*、*HFD4*)見出し、その解析を行った。4つの *HFD* 遺伝子を全て破壊した  $\Delta hfd1-4$  株は炭素鎖長12から18の *n*-アルカンを単一の炭素源として生育できず、また炭素鎖長10、11の *n*-アルカンを炭素源とした培地でも生育が悪化した。また、野生型株を *n*-デカン培地で培養すると細胞抽出液中の長鎖アルデヒドデヒドロゲナーゼ活性が増加したのに対し、 $\Delta hfd1-4$  株では細胞抽出液中の長鎖アルデヒドデヒドロゲナーゼ活性が野生型株と比較して大きく低下することが示された。さらに、個々の Hfd タンパク質を発現させた *E. coli* の細胞抽出液から長鎖アルデヒドデヒドロゲナーゼ活性が検出された。これらの結果から、Hfd タンパク質群が *Y. lipolytica* における *n*-アルカンの代謝過程で長鎖アルデヒドの酸化に関わる長鎖アルデヒドデヒドロゲナーゼであることが示唆された。これらタンパク質の細胞内局在を解析したところ、Hfd1p および Hfd2p は小胞体またはペルオキシソームに、Hfd3p はペルオキシソームに局在することが示唆された。*HFD2* からは PTS1 様配列を持つ Hfd2Ap と PTS1 様配列を持たない Hfd2Bp をコードする2つ mRNA が生じることが明らかとなった。これらのタンパク質を単独で発現させたところ、どちらも *n*-アルカン培地での生育を支持した。

第4章、第5章の内容は、学術雑誌論文として出版する計画があるため公表できない。5年以内に出版予定。

第6章では、*ALK1* と *PAT1* の発現に対するグリセロールの影響を再度調べるとともに、*GUT1* および *GUT2* の関与について詳細な解析を行った。森により明らかにされたように、*ALK1* と *PAT1* の *n*-デカンによる転写誘導はグリセロールの共存により抑制された。また、 $\Delta gut1$  株ではグリセロールによる転写抑制が見られないことが確認され、グリセロールのリン酸化がグリセロール抑制に必要であることが示唆された。さらに、 $\Delta gut2$  株はグリセロール存在下で広範な遺伝子の転写が抑えられ、生育が阻害されることも示唆された。

第1章の結果により *n*-アルカンから長鎖アルコールへの水酸化には、Alk1p、Alk2p、Alk3p、Alk6p、Alk9p、Alk10p が関与する可能性が示唆された。また、第2章と第3章の結果により長鎖アルコールの酸化には Adh1p、Adh3p、Fao1p が、細胞内で *n*-アルカンの代謝により生じる長鎖アルデヒドの酸化には Hfd1p、Hfd2p、Hfd3p、Hfd4p が関与することが示された(Figure 7-1)。これまでの *n*-アルカン代謝経路モデルでは、小胞体とペルオキシソームで主に反応が行われていると考えられてきたが[12]、本研究における細胞内局在解析の結果はこのモデルを強く支持する。*ADH1* - *ADH7*、*FADH*、*FAO1* を

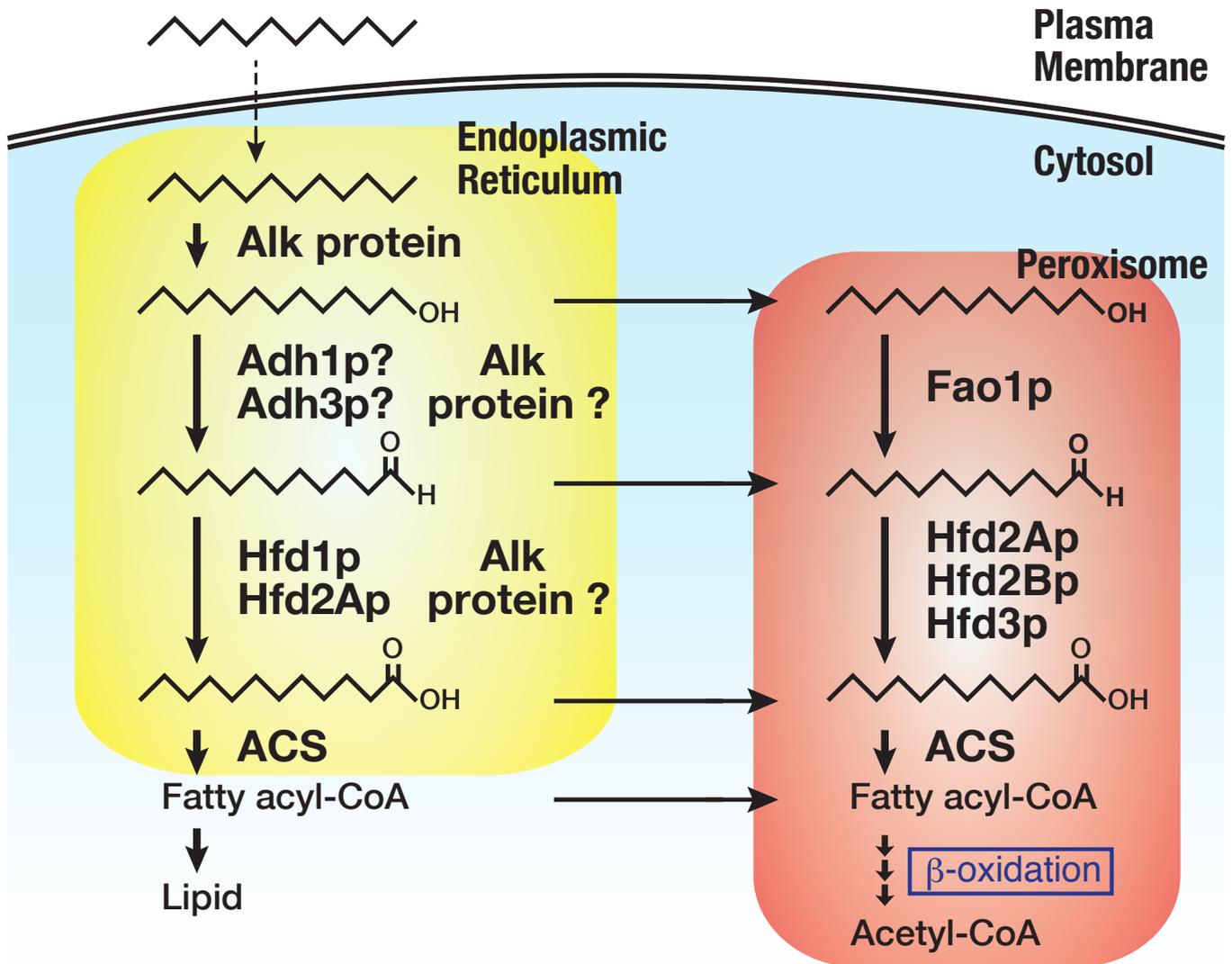
全て破壊した ALCY02 株が *n*-アルカンで生育できること、 $\Delta hfd1-4$  株が培地に与えた長鎖アルデヒドを資化できることなどから、*n*-アルカン代謝の結果により生じる長鎖アルコールや長鎖アルデヒドと細胞外から直接取り込んだ長鎖アルコールや長鎖アルデヒドではその代謝に関与する酵素が異なる可能性も考えられた。また、*n*-アルカン代謝の各過程には複数の機能重複した遺伝子が関与することが示されたことから、*Y. lipolytica* は、*n*-アルカン代謝を獲得する過程で毒性のある *n*-アルカンやその代謝産物を効率よく解毒・代謝するためにそれらの酸化に関わる遺伝子が多重化した可能性が考えられる。

本研究では、P450 が長鎖アルコールや長鎖アルデヒドの酸化に関与する可能性を示唆する結果が得られたが、それを証明するには至らなかった。P450 の活性化状態で生じる酸素原子が結合したヘム鉄 ( $\text{Fe}^{\text{IV}}=\text{O}$ )の存在により、P450 には C-H 結合の水酸化反応以外に、オレフィンのエポキシ化、アルデヒド形成、ベンゼンのフェノール化、窒素酸化、アルデヒドの酸化、脱水素化などの多様な反応を行うものが存在する[125-128]。Scheller らにより報告されたように[28]、*Y. lipolytica* においても Alk タンパク質群が *n*-アルカン代謝経路で長鎖アルコールと長鎖アルデヒドの酸化を担う可能性は十分考えられる。また、高等真核生物が持つ P450 の中で、CYP1A1、CYP1A2、CYP1B1、CYP2B1、CYP2E1、CYP2D6、CYP2C11、CYP3A2、CYP4A1 は小胞体に局在するが、かなりの量がミトコンドリアにも存在することが報告されている[129, 130]、*Y. lipolytica* において Alk タンパク質は小胞体に局在するとされてきたが、Alk タンパク質の局在を実際に解析することで、細胞内における *n*-アルカン代謝の位置についての新たな知見が得られるかもしれない。第 1 章の考察でも述べたように、*Y. lipolytica* が 12 種の ALK 遺伝子を持つことの意義は未だ不明である。過去の知見や本研究の結果から、通常の培養条件下では炭素鎖長 10 から 18 の *n*-アルカンで炭素源とした生育には Alk1p と Alk2p があれば十分である。他の Alk タンパク質は温度や pH など条件の異なる環境で *n*-アルカンの資化に関わる可能性が考えられる。また長鎖の *n*-アルカンの代謝や二次代謝産物の生成に関わるかもしれない。今後、各 Alk タンパク質群の更なる解析により基質が特定されることが期待される。

*n*-アルカン代謝において、*n*-アルカンの鎖長とその資化能の関係も残された課題の 1 つである。本研究においても、*n*-アルカン資化能欠損を示す株の *n*-アルカンの鎖長の違いに対する生育の程度は非常に多様であった。ALCY02 株は短鎖の *n*-アルカンを単一の炭素源とした培地では生育遅延を示すが長鎖の *n*-アルカンを単一の炭素源とした培地では野生型株とほぼ同様の生育を示した (第 2 章)。また、 $\Delta hfd1-4$  株は *n*-デカンや *n*-ウンデカンを炭素源とした培地で僅かな生育遅延を示したが、炭素鎖長 12 以上の *n*-アルカンを炭素源とした培地では顕著な生育遅延を示した (第 3 章)。これらの結果から、*Y. lipolytica* 内では短鎖の *n*-アルカンと長鎖の *n*-アルカンでは代謝機構が異なると考えられる。 $\Delta alk1-12$  株を用いた解析から、*n*-デカンなど短鎖の *n*-アルカンはそれを代謝することができない場合には、*Y. lipolytica* に対して毒性を示すことから (第 1 章)、短鎖

の *n*-アルカンには毒性があると考えられる。一方、長鎖の *n*-ヘキサデカンを与えると、菌糸型成長が促進されるとともに脂質顆粒が発達する。*n*-アルカンの鎖長とその資化能について明らかにすることは、*Y. lipolytica* の進化を理解する上で重要であると考えられる。

*Y. lipolytica* は基礎科学的研究に用いられているだけでなく、疎水性化合物から有用有機酸を生産し細胞外に分泌する性質や脂質を高度に蓄積する性質を持つことから産業上重要な酵母でもある。*n*-アルカンなどの疎水性物質を含めた細胞内の代謝経路の解明は本酵母の産業利用のための宿主改良に対して基礎的な知見を与えるものである。また、酸素原子 1 つを基質に付加する P450 の機能は化学的には合成が難しい化合物の合成を容易にする可能性を持っており、様々なシトクロム P450 の基質特異性が明らかになることで、生産できる化合物の選択が広がるだろうと期待される。本研究で得られた知見は、*Y. lipolytica* の応用利用にも貢献するものである。



**Figure 7-1.** 本研究で明らかとなった *n*-アルカン代謝に関わる酵素群

*n*-アルカンの水酸化に関わる Alk タンパク質群として、Alk1p、Alk2p、Alk6p が考えられる。Alk3p、Alk9p、Alk10p も *n*-アルカン酸化能があると考えられるが、野生型株で *n*-アルカン代謝に関与するかは不明である。Adh1p および Adh3p は細胞質またはいずれかの細胞小器官で長鎖アルコールの酸化に関わると考えられる。小胞体上で反応に関わる可能性が考えられるが、その証明には至っていない。Hfd4p の局在は本研究では明らかとなっていない。また、Alk タンパク質群が長鎖アルコールや長鎖アルデヒドの酸化に関わるかもしれないが、それを明確に示すデータは得られていない。

## 参考文献

1. Spormann, A. M. & Widdel, F. (2000) Metabolism of alkylbenzenes, alkanes, and other hydrocarbons in anaerobic bacteria, *Biodegradation*. **11**, 85-105.
2. Pedrini, N., Ortiz-Urquiza, A., Huarte-Bonnet, C., Zhang, S. & Keyhani, N. O. (2013) Targeting of insect epicuticular lipids by the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*: hydrocarbon oxidation within the context of a host-pathogen interaction, *Frontiers in microbiology*. **4**, 24.
3. Napolitano, R. & Juarez, M. P. (1997) Entomopathogenous fungi degrade epicuticular hydrocarbons of *Triatoma infestans*, *Archives of biochemistry and biophysics*. **344**, 208-14.
4. van Beilen, J. B. & Funhoff, E. G. (2007) Alkane hydroxylases involved in microbial alkane degradation, *Appl Microbiol Biotechnol*. **74**, 13-21.
5. Kurtzman, C. P., Fell, J. W., Boekhout, T. & (Eds.) (2011) *The Yeasts: A Taxonomic Study*.
6. Ohkuma, M., Muraoka, S., Tanimoto, T., Fujii, M., Ohta, A. & Takagi, M. (1995) CYP52 (cytochrome P450alk) multigene family in *Candida maltosa*: identification and characterization of eight members, *DNA and cell biology*. **14**, 163-73.
7. Seghezzi, W., Meili, C., Ruffiner, R., Kuenzi, R., Sanglard, D. & Fiechter, A. (1992) Identification and characterization of additional members of the cytochrome P450 multigene family CYP52 of *Candida tropicalis*, *DNA and cell biology*. **11**, 767-80.
8. Kim, D., Cryle, M. J., De Voss, J. J. & Ortiz de Montellano, P. R. (2007) Functional expression and characterization of cytochrome P450 52A21 from *Candida albicans*, *Archives of biochemistry and biophysics*. **464**, 213-20.
9. Yadav, J. S. & Loper, J. C. (1999) Multiple p450alk (cytochrome P450 alkane hydroxylase) genes from the halotolerant yeast *Debaryomyces hansenii*, *Gene*. **226**, 139-46.
10. Van Bogaert, I. N., De Mey, M., Develter, D., Soetaert, W. & Vandamme, E. J. (2009) Importance of the cytochrome P450 monooxygenase CYP52 family for the sophorolipid-producing yeast *Candida bombicola*, *FEMS yeast research*. **9**, 87-94.
11. Huang, F. C., Peter, A. & Schwab, W. (2014) Expression and characterization of CYP52 genes involved in the biosynthesis of sophorolipid and alkane metabolism from *Starmerella bombicola*, *Appl Environ Microbiol*. **80**, 766-76.
12. Fickers, P., Benetti, P. H., Wache, Y., Marty, A., Mauersberger, S., Smit, M. S. & Nicaud, J. M. (2005) Hydrophobic substrate utilisation by the yeast *Yarrowia lipolytica*, and its potential applications, *FEMS yeast research*. **5**, 527-43.
13. Wickerham, L. J., Kurtzman, C. P. & Herman, A. I. (1970) Sexual reproduction in *Candida lipolytica*, *Science*. **167**, 1141.

14. Barth, G. & Gaillardin, C. (1997) Physiology and genetics of the dimorphic fungus *Yarrowia lipolytica*, *FEMS microbiology reviews*. **19**, 219-37.
15. Ashy, M. A. & Abou-Zeid, A. (1982) Potentialities of yeasts in production of single-cell proteins (SCP), *Zentralblatt fur Mikrobiologie*. **137**, 387-94.
16. Gonçalves, F. A., Colen, G. & Takahashi, J. A. (2014) *Yarrowia lipolytica* and its multiple applications in the biotechnological industry, *TheScientificWorldJournal*. **2014**, 476207.
17. Smit, M. S., Mokgoro, M. M., Setati, E. & Nicaud, J. M. (2005)  $\alpha$ ,  $\omega$ -Dicarboxylic acid accumulation by acyl-CoA oxidase deficient mutants of *Yarrowia lipolytica*, *Biotechnology letters*. **27**, 859-64.
18. Xue, Z., Sharpe, P. L., Hong, S. P., Yadav, N. S., Xie, D., Short, D. R., Damude, H. G., Rupert, R. A., Seip, J. E., Wang, J., Pollak, D. W., Bostick, M. W., Bosak, M. D., Macool, D. J., Hollerbach, D. H., Zhang, H., Arcilla, D. M., Bledsoe, S. A., Croker, K., McCord, E. F., Tyreus, B. D., Jackson, E. N. & Zhu, Q. (2013) Production of  $\omega$ -3 eicosapentaenoic acid by metabolic engineering of *Yarrowia lipolytica*, *Nature biotechnology*. **31**, 734-40.
19. Madzak, C., Gaillardin, C. & Beckerich, J. M. (2004) Heterologous protein expression and secretion in the non-conventional yeast *Yarrowia lipolytica*: a review, *Journal of biotechnology*. **109**, 63-81.
20. Fukuda, R. (2013) Metabolism of hydrophobic carbon sources and regulation of it in *n*-alkane-assimilating yeast *Yarrowia lipolytica*, *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*. **77**, 1149-54.
21. Fukuda, R. & Ohta, A. (2013) Utilization of hydrophobic substrate by *Yarrowia lipolytica*. In: Barth G (ed). *Yarrowia lipolytica Genetics, Genomics, and Physiology*. Heidelberg: Springer, 2013, 111-9.
22. Titorenko, V. I., Smith, J. J., Szilard, R. K. & Rachubinski, R. A. (2000) Peroxisome biogenesis in the yeast *Yarrowia lipolytica*, *Cell biochemistry and biophysics*. **32 Spring**, 21-6.
23. Domínguez, A., Fermiñán, E. & Gaillardin, C. (2000) *Yarrowia lipolytica*: an organism amenable to genetic manipulation as a model for analyzing dimorphism in fungi, *Contributions to microbiology*. **5**, 151-72.
24. Kerscher, S., Dröse, S., Zwicker, K., Zickermann, V. & Brandt, U. (2002) *Yarrowia lipolytica*, a yeast genetic system to study mitochondrial complex I, *Biochimica et biophysica acta*. **1555**, 83-91.
25. Nicaud, J. M. (2012) *Yarrowia lipolytica*, *Yeast*. **29**, 409-18.
26. 角田 徹 (2003) 東京大学 大学院農学生命科学研究科 博士論文「酵母 *Yarrowia lipolytica* の *n*-アルカン誘導型チトクローム P450 及び *n*-アルカンの細胞内への輸送に関する研究」.
27. Thevenieau, F., Le Dall, M. T., Nthangeni, B., Mauersberger, S., Marchal, R. & Nicaud, J.

- M. (2007) Characterization of *Yarrowia lipolytica* mutants affected in hydrophobic substrate utilization, *Fungal genetics and biology : FG & B.* **44**, 531-42.
28. Scheller, U., Zimmer, T., Becher, D., Schauer, F. & Schunck, W. H. (1998) Oxygenation cascade in conversion of *n*-alkanes to  $\alpha, \omega$ -dioic acids catalyzed by cytochrome P450 52A3, *The Journal of biological chemistry.* **273**, 32528-34.
29. Smith, J. J., Brown, T. W., Eitzen, G. A. & Rachubinski, R. A. (2000) Regulation of Peroxisome Size and Number by Fatty Acid  $\beta$ -Oxidation in the Yeast *Yarrowia lipolytica*, *The Journal of biological chemistry.* **275**, 20168-78.
30. Berninger, G., Schmidtchen, R., Casel, G., Knörr, A., Rautenstrauss, K., Kunau, W. H. & Schweizer, E. (1993) Structure and metabolic control of the *Yarrowia lipolytica* peroxisomal 3-oxoacyl-CoA-thiolase gene, *European journal of biochemistry / FEBS.* **216**, 607-13.
31. Yamagami, S., Iida, T., Nagata, Y., Ohta, A. & Takagi, M. (2001) Isolation and characterization of acetoacetyl-CoA thiolase gene essential for *n*-decane assimilation in yeast *Yarrowia lipolytica*, *Biochemical and biophysical research communications.* **282**, 832-8.
32. Garfinkel, D. (1958) Studies on pig liver microsomes. I. Enzymic and pigment composition of different microsomal fractions, *Archives of biochemistry and biophysics.* **77**, 493-509.
33. Klingenberg, M. (1958) Pigments of rat liver microsomes, *Archives of biochemistry and biophysics.* **75**, 376-86.
34. Omura, T. & Sato, R. (1964) The Carbon Monoxide-Binding Pigment of Liver Microsomes. I. Evidence for Its Hemoprotein Nature, *The Journal of biological chemistry.* **239**, 2370-8.
35. Nelson, D. R. (2009) The cytochrome p450 homepage, *Human genomics.* **4**, 59-65.
36. Jung, K. H., Cao, P., Sharma, R., Jain, R. & Ronald, P. C. (2015) Phylogenomics databases for facilitating functional genomics in rice, *Rice (N Y).* **8**, 60.
37. Nazmul Hussain Nazir, K. H., Ichinose, H. & Wariishi, H. (2010) Molecular characterization and isolation of cytochrome P450 genes from the filamentous fungus *Aspergillus oryzae*, *Archives of microbiology.* **192**, 395-408.
38. Nelson, D. R., Goldstone, J. V. & Stegeman, J. J. (2013) The cytochrome P450 genesis locus: the origin and evolution of animal cytochrome P450s, *Philosophical transactions of the Royal Society of London Series B, Biological sciences.* **368**, 20120474.
39. Hamberger, B. & Bak, S. (2013) Plant P450s as versatile drivers for evolution of species-specific chemical diversity, *Philosophical transactions of the Royal Society of London Series B, Biological sciences.* **368**, 20120426.
40. Ichinose, H. (2012) Molecular and functional diversity of fungal cytochrome P450s, *Biological & pharmaceutical bulletin.* **35**, 833-7.

41. Nebert, D. W., Wikvall, K. & Miller, W. L. (2013) Human cytochromes P450 in health and disease, *Philosophical transactions of the Royal Society of London Series B, Biological sciences.* **368**, 20120431.
42. Parkinson, A., Ogilvie, B., Buckley, D., Kazmi, F., Czerwinski, M. & Parkinson, O. (2013) Biotransformation of xenobiotics. In: Klaassen CD, editor. Casarett and Doull's Toxicology. The basic science of poisons, 8th ed. McGraw-Hill, New York. 2013; pp: 185-366. 2013.
43. Doehmer, J., Goeptar, A. R. & Vermeulen, N. P. (1993) Cytochromes P450 and drug resistance, *Cytotechnology.* **12**, 357-66.
44. Aoyama, Y. & Yoshida, Y. (1978) The 14  $\alpha$  -demethylation of lanosterol by a reconstituted cytochrome P-450 system from yeast microsomes, *Biochemical and biophysical research communications.* **85**, 28-34.
45. Aoyama, Y., Yoshida, Y. & Sato, R. (1984) Yeast cytochrome P-450 catalyzing lanosterol 14  $\alpha$  -demethylation. II. Lanosterol metabolism by purified P-450<sub>14DM</sub> and by intact microsomes, *The Journal of biological chemistry.* **259**, 1661-6.
46. Yoshida, Y. & Aoyama, Y. (1984) Yeast cytochrome P-450 catalyzing lanosterol 14  $\alpha$  -demethylation. I. Purification and spectral properties, *The Journal of biological chemistry.* **259**, 1655-60.
47. Kalb, V. F., Loper, J. C., Dey, C. R., Woods, C. W. & Sutter, T. R. (1986) Isolation of a cytochrome P-450 structural gene from *Saccharomyces cerevisiae*, *Gene.* **45**, 237-45.
48. Briza, P., Eckerstorfer, M. & Breitenbach, M. (1994) The sporulation-specific enzymes encoded by the *DIT1* and *DIT2* genes catalyze a two-step reaction leading to a soluble LL-dityrosine-containing precursor of the yeast spore wall, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* **91**, 4524-8.
49. Kelly, S. L., Lamb, D. C., Corran, A. J., Baldwin, B. C., Parks, L. W. & Kelly, D. E. (1995) Purification and reconstitution of activity of *Saccharomyces cerevisiae* P450 61, a sterol  $\Delta^{22}$ -desaturase, *FEBS letters.* **377**, 217-20.
50. Briza, P., Kalchhauser, H., Pittenauer, E., Allmaier, G. & Breitenbach, M. (1996) *N,N'*-Bisformyl dityrosine is an *in vivo* precursor of the yeast ascospore wall, *European journal of biochemistry / FEBS.* **239**, 124-31.
51. Kelly, S. L., Lamb, D. C., Baldwin, B. C., Corran, A. J. & Kelly, D. E. (1997) Characterization of *Saccharomyces cerevisiae* CYP61, sterol  $\Delta^{22}$ -desaturase, and inhibition by azole antifungal agents, *The Journal of biological chemistry.* **272**, 9986-8.
52. Iida, T., Sumita, T., Ohta, A. & Takagi, M. (2000) The cytochrome P450ALK multigene family of an *n*-alkane-assimilating yeast, *Yarrowia lipolytica*: cloning and characterization of genes coding for new CYP52 family members, *Yeast.* **16**, 1077-87.

53. Hanley, K., Nguyen, L. V., Khan, F., Pogue, G. P., Vojdani, F., Panda, S., Pinot, F., Oriedo, V. B., Rasochova, L., Subramanian, M., Miller, B. & White, E. L. (2003) Development of a plant viral-vector-based gene expression assay for the screening of yeast cytochrome p450 monooxygenases, *Assay and drug development technologies*. **1**, 147-60.
54. Chen, W., Lee, M. K., Jefcoate, C., Kim, S. C., Chen, F. & Yu, J. H. (2014) Fungal cytochrome p450 monooxygenases: their distribution, structure, functions, family expansion, and evolutionary origin, *Genome biology and evolution*. **6**, 1620-34.
55. Moktali, V., Park, J., Fedorova-Abrams, N. D., Park, B., Choi, J., Lee, Y. H. & Kang, S. (2012) Systematic and searchable classification of cytochrome P450 proteins encoded by fungal and oomycete genomes, *BMC genomics*. **13**, 525.
56. Ohkuma, M., Zimmer, T., Iida, T., Schunck, W. H., Ohta, A. & Takagi, M. (1998) Isozyme function of *n*-alkane-inducible cytochromes P450 in *Candida maltosa* revealed by sequential gene disruption, *The Journal of biological chemistry*. **273**, 3948-53.
57. Zimmer, T., Iida, T., Schunck, W. H., Yoshida, Y., Ohta, A. & Takagi, M. (1998) Relation between evolutionary distance and enzymatic properties among the members of the CYP52A subfamily of *Candida maltosa*, *Biochemical and biophysical research communications*. **251**, 244-7.
58. Yamagami, S., Morioka, D., Fukuda, R. & Ohta, A. (2004) A basic helix-loop-helix transcription factor essential for cytochrome p450 induction in response to alkanes in yeast *Yarrowia lipolytica*, *The Journal of biological chemistry*. **279**, 22183-9.
59. Endoh-Yamagami, S., Hirakawa, K., Morioka, D., Fukuda, R. & Ohta, A. (2007) Basic helix-loop-helix transcription factor heterocomplex of Yas1p and Yas2p regulates cytochrome P450 expression in response to alkanes in the yeast *Yarrowia lipolytica*, *Eukaryotic cell*. **6**, 734-43.
60. White, M. J., Hirsch, J. P. & Henry, S. A. (1991) The *OP11* gene of *Saccharomyces cerevisiae*, a negative regulator of phospholipid biosynthesis, encodes a protein containing polyglutamine tracts and a leucine zipper, *The Journal of biological chemistry*. **266**, 863-72.
61. Loewen, C. J., Gaspar, M. L., Jesch, S. A., Delon, C., Ktistakis, N. T., Henry, S. A. & Levine, T. P. (2004) Phospholipid metabolism regulated by a transcription factor sensing phosphatidic acid, *Science*. **304**, 1644-7.
62. Hirakawa, K., Kobayashi, S., Inoue, T., Endoh-Yamagami, S., Fukuda, R. & Ohta, A. (2009) Yas3p, an Opi1 family transcription factor, regulates cytochrome P450 expression in response to *n*-alkanes in *Yarrowia lipolytica*, *The Journal of biological chemistry*. **284**, 7126-37.
63. Kobayashi, S., Hirakawa, K., Horiuchi, H., Fukuda, R. & Ohta, A. (2013) Phosphatidic acid and phosphoinositides facilitate liposome association of Yas3p and potentiate derepression of ARE1 (alkane-responsive element one)-mediated transcription control, *Fungal genetics and*

*biology : FG & B.* **61**, 100-10.

64. Kobayashi, S., Hirakawa, K., Fukuda, R. & Ohta, A. (2008) Disruption of the SCS2 ortholog in the alkane-assimilating yeast *Yarrowia lipolytica* impairs its growth on *n*-decane, but does not impair inositol prototrophy, *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*. **72**, 2219-23.
65. Gurvitz, A. & Rottensteiner, H. (2006) The biochemistry of oleate induction: transcriptional upregulation and peroxisome proliferation, *Biochimica et biophysica acta*. **1763**, 1392-402.
66. Hynes, M. J., Murray, S. L., Duncan, A., Khew, G. S. & Davis, M. A. (2006) Regulatory genes controlling fatty acid catabolism and peroxisomal functions in the filamentous fungus *Aspergillus nidulans*, *Eukaryotic cell*. **5**, 794-805.
67. Poopanitpan, N., Kobayashi, S., Fukuda, R., Horiuchi, H. & Ohta, A. (2010) An ortholog of *farA* of *Aspergillus nidulans* is implicated in the transcriptional activation of genes involved in fatty acid utilization in the yeast *Yarrowia lipolytica*, *Biochemical and biophysical research communications*. **402**, 731-5.
68. Iida, T., Ohta, A. & Takagi, M. (1998) Cloning and characterization of an *n*-alkane-inducible cytochrome P450 gene essential for *n*-decane assimilation by *Yarrowia lipolytica*, *Yeast*. **14**, 1387-97.
69. 高井 寛 (2010) 東京大学 大学院農学生命科学研究科 修士論文「酵母 *Yarrowia lipolytica* における *n*-アルカン依存的なチトクローム P450ALK 遺伝子の機能に関する研究」.
70. Sumita, T., Iida, T., Yamagami, S., Horiuchi, H., Takagi, M. & Ohta, A. (2002) *YLALK1* encoding the cytochrome P450ALK1 in *Yarrowia lipolytica* is transcriptionally induced by *n*-alkane through two distinct *cis*-elements on its promoter, *Biochemical and biophysical research communications*. **294**, 1071-8.
71. Boddupalli, S. S., Pramanik, B. C., Slaughter, C. A., Estabrook, R. W. & Peterson, J. A. (1992) Fatty acid monooxygenation by P450<sub>BM-3</sub>: product identification and proposed mechanisms for the sequential hydroxylation reactions, *Archives of biochemistry and biophysics*. **292**, 20-8.
72. Ito, A. & Inoue, S. (1982) Sophorolipids from *Torulopsis bombicola*; possible relation to alkane uptake., *Appl Environ Microbiol*. **43**, 1278-1283.
73. Copper, D. & Paddock, D. (1984) Production of biosurfactant from *Torulopsis bombicola*, *Appl Environ Microbiol*. **47**, 173-176.
74. Asmer, H., Lang, S., Wagner, F. & V., W. (1988) Microbial production, structure elucidation and bioconversion of sophorose lipids., *J Am Oil Chem Soc*. **65**, 1460-1466.
75. Cirigliano, M. C. & Carman, G. M. (1984) Isolation of a bioemulsifier from *Candida*

- lipolytica*, *Appl Environ Microbiol.* **48**, 747-50.
76. Cirigliano, M. C. & Carman, G. M. (1985) Purification and Characterization of Liposan, a Bioemulsifier from *Candida lipolytica*, *Appl Environ Microbiol.* **50**, 846-50.
77. Gotoh, O. (1992) Substrate recognition sites in cytochrome P450 family 2 (CYP2) proteins inferred from comparative analyses of amino acid and coding nucleotide sequences, *The Journal of biological chemistry.* **267**, 83-90.
78. Monk, B. C., Tomasiak, T. M., Keniya, M. V., Huschmann, F. U., Tyndall, J. D., O'Connell, J. D., 3rd, Cannon, R. D., McDonald, J. G., Rodriguez, A., Finer-Moore, J. S. & Stroud, R. M. (2014) Architecture of a single membrane spanning cytochrome P450 suggests constraints that orient the catalytic domain relative to a bilayer, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* **111**, 3865-70.
79. Cosme, J. & Johnson, E. F. (2000) Engineering microsomal cytochrome P450 2C5 to be a soluble, monomeric enzyme. Mutations that alter aggregation, phospholipid dependence of catalysis, and membrane binding, *The Journal of biological chemistry.* **275**, 2545-53.
80. Mast, N., Liao, W. L., Pikuleva, I. A. & Turko, I. V. (2009) Combined use of mass spectrometry and heterologous expression for identification of membrane-interacting peptides in cytochrome P450 46A1 and NADPH-cytochrome P450 oxidoreductase, *Archives of biochemistry and biophysics.* **483**, 81-9.
81. Johnson, E. F. & Stout, C. D. (2013) Structural diversity of eukaryotic membrane cytochrome p450s, *The Journal of biological chemistry.* **288**, 17082-90.
82. Kelly, S. L. & Kelly, D. E. (2013) Microbial cytochromes P450: biodiversity and biotechnology. Where do cytochromes P450 come from, what do they do and what can they do for us?, *Philosophical transactions of the Royal Society of London Series B, Biological sciences.* **368**, 20120476.
83. Feyereisen, R. (2011) Arthropod CYPomes illustrate the tempo and mode in P450 evolution, *Biochimica et biophysica acta.* **1814**, 19-28.
84. Kemp, G., Dickinson, F. & Ratledge, C. (1994) Occurrence of fatty alcohol oxidase in alkane- and fatty-acid-utilising yeasts and moulds., *Appl Microbiol Biotechnol.* **40**, 873-875.
85. Eirich, L. D., Craft, D. L., Steinberg, L., Asif, A., Eschenfeldt, W. H., Stols, L., Donnelly, M. I. & Wilson, C. R. (2004) Cloning and characterization of three fatty alcohol oxidase genes from *Candida tropicalis* strain ATCC 20336, *Appl Environ Microbiol.* **70**, 4872-9.
86. Vanhanen, S., West, M., Kroon, J. T., Lindner, N., Casey, J., Cheng, Q., Elborough, K. M. & Slabas, A. R. (2000) A consensus sequence for long-chain fatty-acid alcohol oxidases from *Candida* identifies a family of genes involved in lipid  $\omega$ -oxidation in yeast with homologues in plants and bacteria, *The Journal of biological chemistry.* **275**, 4445-52.
87. Boeke, J. D., Trueheart, J., Natsoulis, G. & Fink, G. R. (1987) 5-Fluoroorotic acid as a

- selective agent in yeast molecular genetics, *Methods in enzymology*. **154**, 164-75.
88. Gatter, M., Förster, A., Bär, K., Winter, M., Otto, C., Petzsch, P., Ježková, M., Bahr, K., Pfeiffer, M., Matthäus, F. & Barth, G. (2014) A newly identified fatty alcohol oxidase gene is mainly responsible for the oxidation of long-chain  $\omega$ -hydroxy fatty acids in *Yarrowia lipolytica*, *FEMS yeast research*. **14**, 858-72.
89. Napora-Wijata, K., Strohmeier, G. A., Sonavane, M. N., Avi, M., Robins, K. & Winkler, M. (2013) Enantiocomplementary *Yarrowia lipolytica* Oxidoreductases: Alcohol Dehydrogenase 2 and Short Chain Dehydrogenase/Reductase, *Biomolecules*. **3**, 449-60.
90. Ganzhorn, A. J., Green, D. W., Hershey, A. D., Gould, R. M. & Plapp, B. V. (1987) Kinetic characterization of yeast alcohol dehydrogenases. Amino acid residue 294 and substrate specificity, *The Journal of biological chemistry*. **262**, 3754-61.
91. Thomson, J. M., Gaucher, E. A., Burgan, M. F., De Kee, D. W., Li, T., Aris, J. P. & Benner, S. A. (2005) Resurrecting ancestral alcohol dehydrogenases from yeast, *Nature genetics*. **37**, 630-5.
92. de Smidt, O., du Preez, J. C. & Albertyn, J. (2012) Molecular and physiological aspects of alcohol dehydrogenases in the ethanol metabolism of *Saccharomyces cerevisiae*, *FEMS yeast research*. **12**, 33-47.
93. Cheng, Q., Liu, H. T., Bombelli, P., Smith, A. & Slabas, A. R. (2004) Functional identification of AtFao3, a membrane bound long chain alcohol oxidase in *Arabidopsis thaliana*, *FEBS letters*. **574**, 62-8.
94. Zhao, S., Lin, Z., Ma, W., Luo, D. & Cheng, Q. (2008) Cloning and characterization of long-chain fatty alcohol oxidase *LjFAO1* in *Lotus japonicus*, *Biotechnology progress*. **24**, 773-9.
95. Rajangam, A. S., Gidda, S. K., Craddock, C., Mullen, R. T., Dyer, J. M. & Eastmond, P. J. (2013) Molecular characterization of the fatty alcohol oxidation pathway for wax-ester mobilization in germinated jojoba seeds, *Plant physiology*. **161**, 72-80.
96. Cheng, Q., Sanglard, D., Vanhanen, S., Liu, H. T., Bombelli, P., Smith, A. & Slabas, A. R. (2005) Candida yeast long chain fatty alcohol oxidase is a c-type haemoprotein and plays an important role in long chain fatty acid metabolism, *Biochimica et biophysica acta*. **1735**, 192-203.
97. Mauersberger, S., Kärger, E., Matyashova, R. N. & Müller, H. G. (1987) Subcellular organization of alkane oxidation in the yeast *Candida maltosa*, *Journal of Basic Microbiology*. **27**, 565-582.
98. Liu, C. M. & Johnson, M. J. (1971) Alkane oxidation by a particulate preparation from *Candida*, *Journal of bacteriology*. **106**, 830-4.
99. Yamada, T., Nawa, H., Kawamoto, S., Tanaka, A. & Fukui, S. (1980) Subcellular localization of long-chain alcohol dehydrogenase and aldehyde dehydrogenase in

- n*-alkane-grown *Candida tropicalis*, *Archives of microbiology*. **128**, 145-51.
100. Ueda, M. & Tanaka, A. (1990) Long-chain aldehyde dehydrogenase of *Candida* yeast, *Methods in enzymology*. **188**, 176-8.
101. Kelson, T. L., Secor McVoy, J. R. & Rizzo, W. B. (1997) Human liver fatty aldehyde dehydrogenase: microsomal localization, purification, and biochemical characterization, *Biochimica et biophysica acta*. **1335**, 99-110.
102. Rizzo, W. B. (2007) Sjögren-Larsson syndrome: molecular genetics and biochemical pathogenesis of fatty aldehyde dehydrogenase deficiency, *Molecular genetics and metabolism*. **90**, 1-9.
103. Nakahara, K., Ohkuni, A., Kitamura, T., Abe, K., Naganuma, T., Ohno, Y., Zoeller, R. A. & Kihara, A. (2012) The Sjögren-Larsson syndrome gene encodes a hexadecenal dehydrogenase of the sphingosine 1-phosphate degradation pathway, *Molecular cell*. **46**, 461-71.
104. Seip, J., Jackson, R., He, H., Zhu, Q. & Hong, S. P. (2013) Snf1 is a regulator of lipid accumulation in *Yarrowia lipolytica*, *Appl Environ Microbiol*. **79**, 7360-70.
105. Perozich, J., Nicholas, H., Wang, B. C., Lindahl, R. & Hempel, J. (1999) Relationships within the aldehyde dehydrogenase extended family, *Protein science : a publication of the Protein Society*. **8**, 137-46.
106. Navarro-Aviño, J. P., Prasad, R., Miralles, V. J., Benito, R. M. & Serrano, R. (1999) A proposal for nomenclature of aldehyde dehydrogenases in *Saccharomyces cerevisiae* and characterization of the stress-inducible *ALD2* and *ALD3* genes, *Yeast*. **15**, 829-42.
107. Ashibe, B., Hirai, T., Higashi, K., Sekimizu, K. & Motojima, K. (2007) Dual subcellular localization in the endoplasmic reticulum and peroxisomes and a vital role in protecting against oxidative stress of fatty aldehyde dehydrogenase are achieved by alternative splicing, *The Journal of biological chemistry*. **282**, 20763-73.
108. Lin, Z., Carney, G. & Rizzo, W. B. (2000) Genomic organization, expression, and alternate splicing of the mouse fatty aldehyde dehydrogenase gene, *Molecular genetics and metabolism*. **71**, 496-505.
109. Masaki, R., Yamamoto, A. & Tashiro, Y. (1994) Microsomal aldehyde dehydrogenase is localized to the endoplasmic reticulum via its carboxyl-terminal 35 amino acids, *The Journal of cell biology*. **126**, 1407-20.
110. Kobayashi, S., Tezaki, S., Horiuchi, H., Fukuda, R. & Ohta, A. (2015) Acidic phospholipid-independent interaction of Yas3p, an Opi1-family transcriptional repressor of *Yarrowia lipolytica*, with the endoplasmic reticulum, *Yeast*.
111. Ohtomo, R., Kobayashi, K., Muraoka, S., Ohkuma, M., Ohta, A. & Takagi, M. (1996) Peroxisome proliferators activate cytochrome P450 genes in an alkane-assimilating yeast,

- Candida maltosa*, *Biochemical and biophysical research communications*. **222**, 790-3.
112. Santangelo, G. M. (2006) Glucose signaling in *Saccharomyces cerevisiae*, *Microbiology and molecular biology reviews : MMBR*. **70**, 253-82.
113. Zaman, S., Lippman, S. I., Zhao, X. & Broach, J. R. (2008) How *Saccharomyces* responds to nutrients, *Annual review of genetics*. **42**, 27-81.
114. Sanz, P., Nieto, A. & Prieto, J. A. (1996) Glucose repression may involve processes with different sugar kinase requirements, *Journal of bacteriology*. **178**, 4721-3.
115. Rolland, F., Winderickx, J. & Thevelein, J. M. (2002) Glucose-sensing and -signalling mechanisms in yeast, *FEMS yeast research*. **2**, 183-201.
116. Schüller, H. J. (2003) Transcriptional control of nonfermentative metabolism in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*, *Current genetics*. **43**, 139-60.
117. Gancedo, J. M. (2008) The early steps of glucose signalling in yeast, *FEMS microbiology reviews*. **32**, 673-704.
118. 森 亮樹、福田良一、太田明德 (2009) 日本農芸化学会 2009 年度大会「酵母 *Yarrowia lipolytica* における炭素源代謝制御の解析」.
119. 森 亮樹、福田良一、太田明德 (2009) 酵母遺伝学フォーラム第 42 回研究報告会「酵母 *Yarrowia lipolytica* におけるグリセロールによる遺伝子発現制御の解析」.
120. Kuge, S. & Jones, N. (1994) *YAPI* dependent activation of *TRX2* is essential for the response of *Saccharomyces cerevisiae* to oxidative stress by hydroperoxides, *The EMBO journal*. **13**, 655-64.
121. 森 亮樹 (2002) 東京大学 大学院農学生命科学研究科 修士論文「酵母 *Yarrowia lipolytica* のグリセロールによるカタボライト抑制に関する研究」.
122. Dulermo, T. & Nicaud, J. M. (2011) Involvement of the G3P shuttle and beta-oxidation pathway in the control of TAG synthesis and lipid accumulation in *Yarrowia lipolytica*, *Metabolic engineering*. **13**, 482-91.
123. Overkamp, K. M., Bakker, B. M., Kötter, P., Luttik, M. A., Van Dijken, J. P. & Pronk, J. T. (2002) Metabolic engineering of glycerol production in *Saccharomyces cerevisiae*, *Appl Environ Microbiol*. **68**, 2814-21.
124. Fickers, P., Marty, A. & Nicaud, J. M. (2011) The lipases from *Yarrowia lipolytica*: genetics, production, regulation, biochemical characterization and biotechnological applications, *Biotechnology advances*. **29**, 632-44.
125. Krest, C. M., Onderko, E. L., Yosca, T. H., Calixto, J. C., Karp, R. F., Livada, J., Rittle, J. & Green, M. T. (2013) Reactive intermediates in cytochrome p450 catalysis, *The Journal of biological chemistry*. **288**, 17074-81.
126. Rittle, J. & Green, M. T. (2010) Cytochrome P450 compound I: capture, characterization, and C-H bond activation kinetics, *Science*. **330**, 933-7.

127. Green, M. T., Dawson, J. H. & Gray, H. B. (2004) Oxoiron(IV) in chloroperoxidase compound II is basic: implications for P450 chemistry, *Science*. **304**, 1653-6.
128. Meunier, B., de Visser, S. P. & Shaik, S. (2004) Mechanism of oxidation reactions catalyzed by cytochrome p450 enzymes, *Chemical reviews*. **104**, 3947-80.
129. Sangar, M. C., Bansal, S. & Avadhani, N. G. (2010) Bimodal targeting of microsomal cytochrome P450s to mitochondria: implications in drug metabolism and toxicity, *Expert opinion on drug metabolism & toxicology*. **6**, 1231-51.
130. Avadhani, N. G., Sangar, M. C., Bansal, S. & Bajpai, P. (2011) Bimodal targeting of cytochrome P450s to endoplasmic reticulum and mitochondria: the concept of chimeric signals, *The FEBS journal*. **278**, 4218-29.

## 謝辞

本研究を行う場を与えて下さり、御指導、御教示賜りました東京大学 大学院農学生命科学研究科 応用生命工学専攻 細胞遺伝学研究室 教授、堀内裕之先生にこそより感謝いたします。普段から、親身に討論して頂き、また本論文も丁寧に校閲してくださいました東京大学 大学院農学生命科学研究科 応用生命工学専攻 細胞遺伝学研究室 助教、福田良一先生にこそより感謝いたします。

細胞遺伝学研究室の前教授である中部大学 副学長、太田明德先生には御停年される前、ならびに御停年された後も非常に多くのご助言を頂きました。深く感謝致します。

ガスクロマトグラフ質量分析装置の操作について多くのご指導頂きました、明治大学 農学部農芸化学科 環境分析化学研究室 准教授、安保充先生に深く感謝致します。

*Y. lipolytica* における候補遺伝子探索の際の基礎データとなる網羅的転写解析を行って頂きました、東京農業大学 応用生物科学部バイオサイエンス学科 教授、吉川博文先生、いわて東北メディカル・メガバンク機構 講師、志波優先生にこそより感謝いたします。

Alk タンパク質群のホモロジーモデリングを行って頂きました、東京大学 大学院農学生命科学研究科 応用生命工学専攻 (兼)アグリバイオインフォマティクス教育研究ユニット 准教授、寺田透先生にこそより感謝いたします。

当研究室に配属されてからの最初の3年間、研究の手ほどきをして頂きました小林哲氏に深く感謝いたします。また、*S. cerevisiae* のゲノム DNA の供与を筆頭に多くの御協力、御助言を頂きました細胞遺伝学研究室のOBも含めた皆さまにこそより感謝いたします。