

審査の結果の要旨

氏名 岩間 亮

n-アルカンは石油の主要成分であり、燃料だけではなく各種化成品の原料としても使用されている。将来的な *n*-アルカンの枯渇に備え、*n*-アルカンの有効利用系の構築は喫緊の課題である。現在、微生物を利用して *n*-アルカンを有用物質に変化する系の構築が期待されている。*n*-アルカン資化性酵母 *Yarrowia lipolytica* は *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し、*n*-アルカンからの有用物質生産のための宿主として使用できる可能性を持つ。*Y. lipolytica* において、*n*-アルカンは細胞内で長鎖アルコール、長鎖アルデヒド、脂肪酸へと順次酸化され、脂肪酸が細胞内で脂質の構成要素あるいはエネルギー源として使用されると考えられてきたが、この代謝経路に関与する因子の多くは未解明であった。本論文は、*Y. lipolytica* において *n*-アルカンから脂肪酸に至る反応に関与する因子の同定と機能解析を行うとともに、*n*-アルカン資化に関わるその他の遺伝子を同定し、*n*-アルカン資化の制御を解析したものである。本論文は序章、研究の成果を述べた第1章から第6章、および終章により構成される。

第1章では *n*-アルカンから長鎖アルコールの変換に関わる CYP52 ファミリーの P450 について解析を行った。本酵母は CYP52 ファミリーの P450 をコードする 12 種の *ALK* 遺伝子を有している。*ALK* 遺伝子 12 重破壊株の解析が行われ、本破壊株では *n*-アルカン誘導性の P450 生産が見られないこと、*n*-アルカンを長鎖アルコールへと代謝できないことが明らかとなった。したがって、*ALK* 遺伝子が *n*-アルカンの資化に必須であることが示された。

第2章では、まずアルコールデヒドロゲナーゼ遺伝子 *ADH1*、*ADH2*、*ADH3*、*ADH4*、*ADH5*、*ADH6*、*ADH7*、*FADH* および長鎖アルコール酸化酵素遺伝子 *FAO1* を全て破壊した株 (ALCY02 株) を作製し、その株の解析を行った。ALCY02 株は比較的短鎖の *n*-アルカンや長鎖アルコールを単一の炭素源とした培地で生育欠損を示した。また、ALCY02 株を *n*-ドデカン存在下で培養すると、野生型株と比較して 1-ドデカノールを細胞内に顕著に蓄積することも明らかになった。ALCY02 株に各遺伝子を 1 つずつ戻した解析から、*ADH1*、*ADH3*、*FAO1* が長鎖アルコール資化において主要な役割を担うことが示唆された。これらの遺伝子産物の細胞内局在解析を行ったところ、*Adh1p* と *Adh3p* が細胞質および膜画分に局在すること、*Faolp* がペルオキシソームに局在することが示唆された。

第3章では *Y. lipolytica* の網羅的転写解析から、*n*-デカンで誘導される遺伝子が3つ見出され、*HFD1*、*HFD2*、*HFD3* とした。また、*n*-デカンでは誘導されないが、これらと相同性のある遺伝子が1つ見出され、*HFD4* とした。これら *HFD* 遺伝子を全て破壊した株は炭素鎖長12以上の *n*-アルカンを単一の炭素源とした場合に著しい生育の欠損を示したが、*HFD* 遺伝子を1つ以上持つ株は生育することが示された。また、*n*-アルカン存在下で培養した場合には、野生型株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が大きく増加したのに対して、*HFD* 遺伝子4重破壊株の細胞破碎液中では活性の増加は見られなかった。また、各 Hfd タンパク質を発現させた大腸菌の細胞破碎液からは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 タンパク質が *n*-アルカンの代謝過程で生じる長鎖アルデヒドの酸化酵素であると考えられた。

第4章では *ALK1* と同様な発現パターンを示す遺伝子を探索し、*Saccharomyces cerevisiae* においてオキシステロール結合タンパク質ホモログをコードする *OSH3* の *Y. lipolytica* におけるオルソログ(*OSH3* と命名)の破壊株では、*n*-アルカン資化能が低下していることが明らかになった。また、*S. cerevisiae* の *OSH6* の *Y. lipolytica* におけるオルソログ(*OSH6* と命名)の破壊株においても、*n*-アルカン資化能が低下していることを示した。これらの破壊株では、*ALK1* のプロモーター活性や転写量は野生型株と比較して低下していなかったが、*OSH6* 破壊株では *n*-アルカン誘導性の P450 の発現が低下していた。少なくとも、*OSH6* 破壊株では、P450ALK の翻訳またはフォールディングに異常があることが示された。

第5章では、*S. cerevisiae* において細胞膜-小胞体のコンタクトサイト形成に関わる遺伝子の *Y. lipolytica* におけるオルソログを破壊した株が *n*-アルカンを炭素源とした培地で生育が悪化することが示され、*n*-アルカン資化に細胞膜-小胞体のコンタクトサイトが関与する可能性が考えられた。

第6章では、*ALK1* が *n*-アルカンにより発現が誘導されるが、グリセロールの共存によりその発現が抑制されるグリセロール抑制に焦点を当てて解析が行われた。グリセロールをグリセロール-3-リン酸に変換する酵素をコードする *GUT1* の破壊株ではグリセロール抑制が見られないことが示され、グリセロールのリン酸化がグリセロール抑制に必要なことが示唆された。

以上、本論文では、酵母 *Y. lipolytica* の *n*-アルカン代謝において、*n*-アルカンの変換に関与する酵素を同定し、その機能解析を行うとともに、その他にも *n*-アルカン代謝に関与する遺伝子を同定した。また、それら遺伝子の転写パターンも明らかにした。これらは本菌ならびに *n*-アルカン資化性酵母を利用した有用物質生産に応用できる基礎的知見であり、学術上応用上寄与するところが少なくない。よって、審査委員一同は本論文が博士（農学）の学位論文として価値あるものと認めた。