

論文審査の結果の要旨

申請者氏名 小暮 高久

酵母の中には炭化水素を資化して生育するものが多くあり、そのような資化能は多くの場合、誘導性である。*n*-アルカンを原料とする長鎖ジカルボン酸の生産に利用される *n*-アルカン資化性酵母 *Candida maltosa* では、*n*-アルカンやその誘導体を単一炭素源として培養した場合、*n*-アルカンの初発酸化反応に関与するチトクローム P450 (P450alk) が転写段階で顕著に誘導される。P450alk は 8 種の *ALK* 遺伝子群によってコードされており、そのうち、*n*-アルカンで強く誘導される *ALK1*、*ALK2*、*ALK3* および *ALK5* がコードする 4 種の P450alk 分子種が *n*-アルカンの資化において主要な役割を担っている。これらは基質とする炭化水素鎖に対する特異性が異なっている。本論文では、これらのうち、主要な *ALK* 遺伝子群のプロモーター領域を解析して、*ALK* 遺伝子群の転写誘導機構の特徴を明らかにした。ついで、*n*-アルカン応答領域に選択的に結合するタンパク質を精製し、その分析によって、*n*-アルカンに応答する転写調節への関与が予想される 2 種の遺伝子を単離したものである。

まず序論では、各生物が保有するチトクローム P450、*n*-アルカン資化性酵母の *n*-アルカン誘導性 P450alk の諸性質、及び本論文の研究目的について概説した。

第一章では、主要な 3 種の *ALK* 遺伝子 *ALK1*、*ALK2*、及び *ALK5* の誘導特異性をレポーター遺伝子を用いた解析、及びノーザン解析により調べ、*ALK* 遺伝子の誘導特異性と、それらがコードする P450 分子種の基質特異性との間に有意な相関関係が認められることを明らかにした。

第二章では、これら 3 種の *ALK* 遺伝子のプロモーター領域の解析を行い、*n*-アルカン、オレイン酸、及びペルオキシソーム増殖剤の一種であるクロフィブレート等に応答した誘導性に関わる 6 ヶ所のシス領域を特定した。また個々のシス領域に特異的に結合するタンパク質がそれぞれのシス領域に対して存在することから、予想外に複雑な転写制御機構が存在する可能性を示した。また、*n*-アルカンとクロフィブレートによって強く誘導される *ALK2* 遺伝子プロモーター領域の欠失解析と変異導入解析の結果、*n*-アルカン応答配列 (ARE2) は E-box に相当する配列 (CATGTG) を含み、クロフィブレート応答配列 (CRE2) は 3 個の CCG 配列を重要な因子として含むことを明らかにした。このことから、*n*-アルカンに応答する転写調節と、クロフィブレートに応答する転写調節の経路が異なるものであることを示した。さらに、CRE2 に特異的に結合するタンパク質の存在を明らかにするとともに、CRE2 は不飽和脂肪酸やステロイドホルモンにも強く応答することを示した。

第三章では、二種の *n*-アルカン応答領域 (ARR1-1 及び ARR1-2) にそれぞれ特異的に結合するタンパク質を、DNA アフィニティー精製法を用いて精製し、これらに由来

するペプチド断片の質量分析と、近縁の *Candida albicans* のゲノム配列データベースの検索によって、これらをコードする 2 種の遺伝子(それぞれ *CmNDT80* 及び *CmCBF1*)を特定、単離した。その結果、*CmNDT80* は、*Saccharomyces cerevisiae* において減数分裂の進行を制御する転写因子をコードする *NDT80* 遺伝子のホモログであった。また、もう一方は、*S. cerevisiae* においてセントロメア結合タンパク質として染色体の安定性に必要とされる他、*MET* 遺伝子群などの転写活性化にも関与する basic helix-loop-helix 型タンパク質をコードする *CBF1* 遺伝子のホモログであった。これらのうち、大腸菌で発現させた *CmNdt80* は DNA アフィニティー精製のプローブに用いた ARR1-1 領域に強い親和性で特異的に結合することを示した。また、 $\Delta cmndt80$ 株では、野生型株に比べ、ARR1-1 領域によってもたらされる *n*-アルカンによる誘導性が選択的に大幅に低下することから、*CmNdt80* が *ALK1* の転写調節に関わる可能性を示した。

第四章では、*C. maltosa* の長鎖ジカルボン酸高生産変異株における *ALK* 遺伝子群の発現レベルを解析し、変異株では主要な *ALK* 遺伝子の誘導発現レベルがいずれも高まっていること、特に生産物である P450alk5 が脂肪酸 ω 酸化能の高い *ALK5* の誘導発現レベルの上昇が顕著であることを見いだした。それゆえ、特に脂肪酸の ω 位の水酸化活性の上昇が、変異株における長鎖ジカルボン酸高生産の一因であることを示唆した。

以上、本論文は、*ALK* 遺伝子群のプロモーターの解析によってそれらの転写調節の特性を明らかにするとともに、転写調節に関与すると思われる DNA 結合タンパク質を捕捉したものであり、学術上、応用上貢献するところが少なくない。よって審査委員一同は本論文が博士(農学)の学位論文として価値あるものと認めた。