

[ 別紙 2 ]

## 論文審査の結果の要旨

申請者氏名 提箸 祥幸

---

序章では、研究の背景と目的を述べている。

微生物を用いた物質生産は、化学合成による物質生産に比べると、反応時の副産物が少なく、有機溶媒や化石燃料の使用を抑えることができ、環境への配慮の点からも優れている。従って、微生物生産における新たな技術の開発は化学物質の生産において重要である。

アルカン資化性酵母 *Candida maltosa* は *n*-アルカンや脂肪を唯一の炭素源として生育することができ、これらの代謝産物の中には工業的に利用しうる、有用な物質が含まれている。本論文で研究材料とした長鎖ジカルボン酸(DCA)生産株は、低レベルの DCA 生産能を持つ *C. maltosa* の野生型株より、変異誘発処理と選別を繰り返し行って得られたもので(ジャパンエナジー (株))、*n*-アルカンを原料として、香料の原料などの用途を持つ炭素数 10 以上の DCA を高生産する菌株である。なお、長鎖 DCA のうち経済的な化学合成法が確立されているものは少なく、微生物の *n*-アルカン酸化能を利用した発酵法が主要な生産方法である。

本論文は、*n*-アルカンからの長鎖 DCA の生産に重要な過程で、その解明が DCA の高生産に寄与すると考えられる、細胞内への *n*-アルカンの取り込みと、DCA 高生産株における DCA の細胞外への排出に注目して解析を行ったものである。

第一章では、*C. maltosa* におけるアルカンの細胞内への取り込みについて検討している。酵母菌液に *n*-[<sup>14</sup>C]ヘキサデカンを一時間投与し、ガラス線維濾紙上に捕集した菌体の、冷エタノールによる洗浄後残存する放射能によって取り込みを測定した。*C. maltosa* による経時的な *n*-[<sup>14</sup>C]ヘキサデカンの蓄積は、KCN によって阻害され、低温条件で抑制された。さらに、グルコースの添加によっても抑制が観察された。このことから、*C. maltosa* による *n*-アルカンの取り込みは、エネルギー依存的で、グルコースによるカタボライト抑制を受けるものであることを結論している。また、この取り込みは、*n*-アルカンの存在によって誘導されることも示している。

第二章では、*C. maltosa* の ABC トランスポーターをコードする *CmCDR1* 遺伝子の取得とその発現について述べている。*C. maltosa* の DCA 高生産株は *n*-アルカンを代謝し、大量の DCA を培地中に蓄積する。そこで、DCA 高生産株が、細胞内で生産された DCA を疎水性薬剤の排出に関わる ABC トランスポーターなどによって排出していることを想定し、

*C. maltosa* の ABC トランスポーターをコードする遺伝子を取得した。まず、複数の酵母 ABC トランスポーターに保存されている領域のアミノ酸配列に基づいて、PCR プライマーを設計し、*C. maltosa* 野生型株の DNA を鋳型として、ABC トランスポーター遺伝子断片を複数得た。それらの中で、*n*-アルカン上で培養した DCA 高生産株において強い遺伝子発現を検出できる断片をプローブとして、*C. maltosa* の野生型株の遺伝子ライブラリーを検索し、ABC トランスポーターをコードすると予想される 6 種の遺伝子の断片を得た。これらの遺伝子のうち、*n*-アルカン上の培養で最も強く DCA 生産株において発現が誘導される遺伝子は、*Candida albicans* にシクロヘキシミド耐性を与える *CDR1* と高い相同性を示したので、これを *CmCDR1* と命名した。*CmCDR1* は、DCA 高生産株において DCA 添加によって顕著に発現が誘導されたので、DCA 高生産株において DCA の排出に関与している可能性が考えられるとしている。

第三章では、*CmCDR1* の高発現の DCA 高生産株に対する影響について述べている。*CmCDR1* を高発現する DCA 高生産株を作製し、与える影響について検討した。*CmCDR1* 高発現用のプラスミドを YRp 型多コピーベクターにプロモーター領域を含む *CmCDR1* 全長を組み込むことによって作製した。これを導入した DCA 高生産株では、*n*-アルカン培養時に *CmCDR1* の mRNA レベルは 5 から 7 倍に上昇し、また、シクロヘキシミドによる誘導の場合では、約 18 倍であった。*CmCDR1* 高発現株は対照株に比べ、シクロヘキシミドに対してより耐性であった。このように *CmCDR1* を高発現する DCA 高生産株は、試験管培養の条件において、対照株に比べて平均 20% の DCA 生産量の上昇を観察している。また、*n*-アルカン培地では強く生育が抑制される DCA 高生産株に頻出する、DCA を生産しない見かけの復帰変異株を含む培養の出現が抑制された。加えて、*CmCDR1* を高発現する DCA 高生産株では、対照株に比べて、アルカンの初発酸化酵素であるチトクローム P450<sub>ALK</sub> をコードする *ALK1* 及び *ALK5* など、DCA 生産に重要な遺伝子の発現が、*n*-アルカン培養後期に強く誘導されていることを示した。

以上要するに、本研究は *C. maltosa* におけるアルカンの細胞内への取り込みと、アルカンの代謝物である DCA の生産における ABC トランスポーターの役割とその可能性に関して新たな知見を与えており、学術上、応用上貢献するところが少なくない。よって審査委員一同は本論文が博士（農学）の学位論文として価値あるものと認めた。