

[ 別紙 2 ]

## 論文審査の結果の要旨

申請者氏名 岩 切 亮

*Candida utilis* は安価な培地で高密度連続培養が可能な産業上重要な酵母で、核酸タンパク質やグルタチオン、CoA、NAD 等医薬品原料の生産に広く利用され、食用酵母としてアメリカ食品医薬品局が認可し安全性が高い。しかし、遺伝学的解析がほとんどできず、菌株改良は従来からのランダムな変異の集積のみによってきた。本菌をより高度に利用するためには、上記の特長を削ぐことのないセルフクローニング形質転換系の開発が必須である。本論文は、本菌 DNA のみからなる選択マーカーや遺伝子導入法の開発と基礎的解析に関する研究をまとめたもので、4章から成る。

本菌の特性や研究の現状と目的を解説した序論に続く第1章では、自律複製起点 (ARS) の取得と構造解析について述べている。数例報告がある *C. utilis* の ARS は最小でも 1.8 kb とされていたが再検討が必要と考え、より小型の ARS の探索を行なった。数少ない既知遺伝子塩基配列からグリセロアルデヒド 3-リン酸デヒドロゲナーゼ遺伝子 (*CuGAP*) のプロモーターとターミネーターを選出し本菌で細菌の G418 耐性マーカーが機能しうるようにし、*Sau3AI* 部分消化のゲノムライブラリーを構築して、形質転換効率が高いプラスミドを選抜した。この探索と組合せて多くの *C. utilis* 菌株を調べ AHU3053 株が酢酸リチウム法で効率良く形質転換できることを見出した。98 個の G418 耐性コロニーから挿入断片の短縮化を行い、 $10^3$  形質転換体/ $\mu\text{g}$  以上の効率を示す、1490 bp と 552 bp の DNA を取得した。酵母 *Saccharomyces cerevisiae* の ARS 最小単位は 100–150 bp で、11bp の必須な共通配列 (ACS) を含むが、取得した配列中の ACS 類似配列は ARS 活性に寄与せず、最少機能領域も数倍大きいことから、*C. utilis* の ARS は独自の特徴をもつことが分かった。これらは他の *C. utilis* 菌株でも機能した。

第2章では、*C. utilis* の Yap1 ホモログ遺伝子の単離とその選択マーカー化について述べている。汎用的マーカーとして優性の薬剤耐性遺伝子が望まれるが、遺伝解析ができない本菌ではその取得が困難である。*S. cerevisiae* では各種ストレスに応答する転写因子 Yap1 の高発現がシクロヘキシミド (CYH) などの多剤耐性を誘導することから、*C. utilis* の *YAP1* ホモログ (*CuYAPI*) をクローニングした。438 アミノ酸の産物は、Yap1 ホモログ中で最小だが、特長的な領域は極めて高く保存されていた。*CuGAPI* と *CuYAPI* の組合せで、 $3.8 \times 10^3$  形質転換体/ $\mu\text{g}$  DNA の効率で選択マーカーとして機能することを認めた。形質転換体はカドミウムやフルコナゾールにも高い耐性を示した。*CuYAPI* は *S. cerevisiae* で過剰発現させると多剤耐性となるが、逆に *S. cerevisiae* の *YAPI* は *C. utilis* で機能しなかった。

第3章では、選択マーカーとしての *CuYAPI* の発現に適したプロモーターの単離と解析が述べられている。G418 耐性マーカーに比べると、*CuYAPI* マーカーは選択効率が低い。*CuYAPI* 依存の CYH 耐性を指標にプロモーター探索を行ない、*CuGAP* より形質転換効率が 5–10 倍高

いプロモーター、P2-1-2 (0.5kbp) と P2-33-2 (1.4kbp) を取得した。下流の DNA 断片の解析から、それぞれリボソーム蛋白質 RPL31 と RPL29 遺伝子のプロモーターと推定された。*lacZ* をレポーターとしてプロモーター活性を解析すると、CYH がないと P2-1-2 と P2-33-2 の転写活性は *CuGAP* の 1/10 以下だが、CYH 存在下では、*CuGAP* の転写は抑えられるのに対し、約 5 倍転写が上昇した。この誘導特性から形質転換効率は高く、形質転換体取得後は誘導しなければ宿主の負担が少ない優れた選択マーカーである。

第 4 章では、非相同組換えによる染色体への遺伝子導入について述べている。制限酵素作用により DNA を染色体へ導入する REMI 法の条件検討中に、線状化したキメラカセット P2-1-2-*CuYAPI* が、制限酵素に依存せず、効率よく染色体のさまざまな位置に挿入されることを発見した。耐性を与えるために挿入断片は多コピー化していた。詳細な機構は不明だが、*C. utilis* 染色体上に遺伝子の直接導入が可能である。

以上、本論文は酵母 *C. utilis* の実用的な育種を可能にするセルフクロニング形質転換系を構築・解析しており、学術上ならびに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。