

[別紙 2]

論文審査の結果の要旨

ナパポーン プパニッチパーン

申請者氏名 Napapol Poopanitpan

Yarrowia lipolytica は *n*-アルカン及び脂肪酸などの疎水性基質を効率よく利用して生育する酵母である。この酵母はクエン酸生産生物として米国 FDA より GRAS (Generally Regarded As Safe) の認定を受けており、*n*-アルカン及び脂肪酸などに由来する様々な産業上有用な物質の生産微生物として期待され、これら疎水性物質の代謝のしくみについて研究が進められている。

本酵母における *n*-アルカンの末端を水酸化するチトクローム P450ALK の制御については、転写活性化因子 2 種と抑制因子 1 種を含めてかなり詳細が判明しつつある。一方で、脂肪酸の利用に関わる遺伝子の発現の調節に関しては未解明であった。本論文は脂肪酸によって誘導される、パーオキシソーム及び β 酸化系を構成する様々な遺伝子に共通する転写調節因子の探索を行い、得られた候補遺伝子の性質を調べたものである。本論文は 5 章よりなり、第 1 章の序論を受け、第 2 章から第 4 章において研究の成果が述べられている。

第 2 章では、酵母 *Saccharomyces cerevisiae* においてヘテロ複合体を形成して脂肪酸に応答して転写活性化を行う、互に高い相同性を有する Oaf1p と Pip2p の *Y. lipolytica* におけるオルソログ遺伝子を求めて *Y. lipolytica* ゲノムデータベースを検索した。OAF1 に対して Zn₂Cys₆ 領域近傍においてのみ、それぞれ 38%、45%、及び 38% のアミノ酸相同性を有する YALI0F13321g、YALI0D10681g、及び YALI0D17988g を得た。これら遺伝子についての単独あるいは二重の遺伝子破壊株はオレイン酸を炭素源とする培地で正常に生育し、本酵母には OAF1 や PIP2 に相当する遺伝子は存在しないものと推定された。そこで、糸状菌 *Aspergillus nidulans* の Zn₂Cys₆ 型転写因子をコードし、この菌の脂肪酸による生育に必要とされる *farA* のオルソログの探索を行い、全領域にわたって高い相同性を有す YALI0D126281g を得た。この遺伝子の破壊株はグリセロール、グルコース、*n*-テトラデカン、*n*-ヘキサデカンを炭素源とする培地で正常に生育したが、ラウリン酸、ミリスチン酸を含む培地で生育せず、オレイン酸でも生育が制限されていた。そこで、この遺伝子を

POR1 (Primary Oleate Regulator 1)と命名した。

第3章では、*POR1*の性質について解析を行っている。RLM-RACE解析から、*POR1*は2個のイントロンを有し、916アミノ酸のタンパク質をコードしていた。Por1pはアミノ酸32から71の間に菌類の転写因子に特有なZn₂Cys₆ binuclear cluster domainを有していた。β酸化系のチオラーゼ遺伝子*PATI*と*POT1*、アシル CoA オキシダーゼ遺伝子*POX2*、及びパーオキシシン*PEX5*の脂肪酸存在下における発現をノーザン解析によって調べたところ、*POR1*の破壊株($\Delta por1$)においてはこれらの転写レベルは野生型株に比べ顕著に低下していた。また、*PATI*のプロモーターの*lacZ*によるレポーター解析では、 $\Delta por1$ 株ではオレイン酸による誘導は野生型株よりも抑制されていた。これらの結果から、Por1pが脂肪酸に応答する転写活性化因子であることを示唆している。

さらにPor1pとEGFPとの融合タンパク質を発現させ、Por1pが核に局在することを推定した。この融合タンパク質が脂肪酸存在下では核膜近傍で少数の強い輝点を形成したことを報告し、転写活性化との関係を示唆している。

また、欠失解析により*PATI*プロモーター上の-173から-166にあるCGAGCCGAの配列に注目し、これを変異配列に置き換えると、 $\Delta por1$ 株と同等レベルに脂肪酸による転写活性化が失われたことから、Por1pによる転写活性化はこの配列を介するものと推定したが、残念なことに大腸菌の高生産系ではPor1pの分解が激しく、Por1pの結合等を実証するには至らなかった。

第4章では、 $\Delta por1$ 株でなお脂肪酸含有培地における転写誘導が見られ、それがグルコース存在下で抑制されることから、*S. cerevisiae*の非醗酵性炭素源による転写調節遺伝子*ADR1*の*Y. lipolytica*オルソログを検索し、C₂H₂ zinc finger タンパク質コードする*YALI0D18678g*を得ている。この遺伝子の破壊株ではオレイン酸あるいは*n*-デカンを含む培地における*PATI*プロモーターの活性化の程度が低下し、*POR1*遺伝子との二重破壊株ではオレイン酸培地における誘導のさらなる低下が観察された。そこで、この遺伝子を*CFU1* (Control of Fatty acid Utilization 1)と命名した。

以上、本研究は*Y. lipolytica*における脂肪酸に応答する遺伝子調節系を検討し、これに2つの転写因子が関わる証左を得ている。これらは菌類における脂溶性物質利用のための遺伝子調節システムに関する基礎的知見でもあり、学術的、応用的に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。