

## 論文審査の結果の要旨

申請者氏名 小林 哲

様々な生物においてアルカンや中性脂質、脂肪酸などの疎水性物質が特定の遺伝子群の発現を誘導する例が数多く知られているが、その分子機構については不明な点が多い。石油成分の一つであるアルカンは自然界にも広く存在し、アルカン資化能を有する細菌や酵母、糸状菌が数多く見つかっている。これらの生物において、アルカン代謝に関わる遺伝子の発現はアルカンにより誘導されるが、アルカンのような極めて疎水性の高い化合物を細胞がどのように認識するのかを含め、その詳細な機構は不明である。

アルカン資化性酵母 *Yarrowia lipolytica* は糖類やポリアルコールの他に、脂肪酸や *n*-アルカンなどの疎水性物質を炭素源として利用でき、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。本酵母において、*n*-アルカンの末端水酸化を行うチトクローム P450 をコードする遺伝子の発現は *n*-アルカンにより誘導される。この発現制御における転写活性化因子として Yas1p と Yas2p が、転写抑制因子として Yas3p がこれまでに同定されており、これらが作用するシス配列として Alkane Responsive Element-1 (ARE1)が見出されている。しかし、*n*-アルカンがどのような経路でこれらの転写因子の機能制御に関与するのかは不明であった。本論文は、これらの転写因子がどのような分子機構で *n*-アルカン依存的に転写調節を行うかについて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 3 章、および終章により構成される。

第 1 章では *n*-アルカン依存的な転写制御における Yas2p および Yas3p の役割について解析をおこなった。Yas2p あるいは Yas3p と EGFP の融合タンパク質を発現させ、Yas2p が *n*-アルカンの有無によらず核に局在するのに対し、Yas3p は *n*-アルカン非存在下では核に局在するが、*n*-アルカン存在下では小胞体に局在することを示唆した。また、YAS3 破壊株では *n*-アルカン非存在下でも ARE1 を介した転写が強く活性化されており、*n*-アルカンを添加してもさらなる活性化は見られなかった。以上の結果より、Yas1p および Yas2p は *n*-

アルカン非存在時でも転写活性化能を有しており、ARE1 を介したアルカン依存的な転写誘導は主に転写抑制因子である Yas3p の局在変化により制御されることが示唆された。

第 2 章では、*n*-アルカン存在時に Yas3p が小胞体に局在することから、Yas3p が小胞体の脂質リガンドと結合する可能性を考え、その探索をおこなった。まず Yas3p と *n*-アルカンやその代謝産物との結合について調べたが、結合を示すシグナルは得られなかった。次に、Yas3p と膜脂質との結合について調べたところ、Yas3p はホスファチジン酸 (PA) およびホスホイノシチド (PIPs) と結合することが示された。さらに、Yas3p がリン脂質 2 重膜中の PA や PIPs と結合できるかについて、リポソームを用いて調べたところ、リポソームに PA あるいは PIPs を加えた場合に Yas3p の結合量が増加することが示された。以上より、PA および PIPs が Yas3p のリガンドである可能性が示唆された。さらに PA ホスファターゼ遺伝子の破壊株の解析により、細胞内の PA 量が増加する条件において ARE1 を介した転写が増加することが示され、PA が細胞内においても Yas3p のリガンドとして機能することが示唆された。しかし、*n*-アルカン存在時の細胞内リン脂質組成を調べた結果、細胞内 PA の割合は *n*-アルカン非存在時と同程度であった。したがって、*n*-アルカン依存的な Yas3p の局在変化は小胞体におけるリガンド量の変化によって起こるわけではないと考えられる。また、*n*-アルカン存在下ではリポソームに対する Yas3p の結合が増加したことから、*n*-アルカンが存在するとリン脂質二重層への Yas3p の結合が促進される可能性が提起された。

第 3 章では、Yas3p の変異体を作製、解析し、リガンドとの結合領域の特定を試みた。部分欠失変異体の解析により、Yas3p は少なくとも 2 ヶ所の領域で PA と結合することが示された。また、これらの領域内に変異の生じた YAS3 変異株では *n*-アルカンによる転写誘導に欠損が見られたことから、これらの領域は Yas3p の機能に重要であると考えられる。

以上、本研究により ARE1 を介した *n*-アルカン依存的な転写調節は主に転写抑制因子である Yas3p の局在変化により制御されることが、この局在変化にはリン脂質との結合に関わることが明らかとなった。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。