

氏 名 かな やま なお き  
 金 山 直 樹  
 学位(専攻分野) 博 士 (工 学)  
 学位記番号 工 博 第 1757 号  
 学位授与の日付 平 成 10 年 5 月 25 日  
 学位授与の要件 学 位 規 則 第 4 条 第 1 項 該 当  
 研究科・専攻 工 学 研 究 科 合 成・生 物 化 学 専 攻  
 学位論文題目 Studies on physiological functions of thiolase isozymes of *n*-alkane-assimilating yeast

(炭化水素資化性酵母のチオラーゼアイソザイムの生理的機能に関する研究)

(主査)

論文調査委員 教 授 田 中 渥 夫 教 授 砂 本 順 三 教 授 今 中 忠 行

### 論 文 内 容 の 要 旨

*Candida tropicalis*は、炭化水素を炭素源として資化できる二倍体酵母であり、特定の条件下でその細胞中に細胞内小器官ペルオキシソームが発達するという特徴を持つことから、高等真核細胞のペルオキシソームの機能を研究する際のモデル系として適している。また、炭化水素を出発原料としたジカルボン酸などの有用物質の工業的生産にも利用されている。*C. tropicalis*の炭化水素代謝経路は、ペルオキシソーム等の細胞内小器官に区分されて局在する。チオラーゼは脂肪酸 $\beta$ 酸化系の最終段階を触媒する酵素であるが、本酵母には基質特異性および細胞内局在性によって分類される三つのアイソザイム[ペルオキシソーム局在3-ケトアシル-CoAチオラーゼ(チオラーゼⅢ)、ペルオキシソーム局在アセトアセチル-CoAチオラーゼ(PsチオラーゼⅠ)、細胞質型アセトアセチル-CoAチオラーゼ(CsチオラーゼⅠ)]が存在する。本研究は、*C. tropicalis*のペルオキシソームの機能を明らかにするために、チオラーゼアイソザイムに注目してその構造、発現および生理的機能を解析したものであり、緒論、結論および本論2編5章よりなっている。

第1編では、チオラーゼアイソザイムの遺伝子構造を明らかにし、構造の比較およびアイソザイムの発現様式の比較からチオラーゼアイソザイムの生理的機能に関する知見を得ることを目的としている。第1章では、チオラーゼⅢをコードする遺伝子を単離・解析し、PsチオラーゼⅠと構造および発現様式の違いを明らかにしている。特に、チオラーゼⅢとPsチオラーゼⅠの各種炭素源における発現様式には違いがあることを明らかにし、これら二つのチオラーゼがともにペルオキシソームに局在して脂肪酸 $\beta$ 酸化系に関与していると考えられるにもかかわらず、炭素源による発現誘導機構に相違点があることを示唆している。第2章では、*C. tropicalis*のペルオキシソーム局在の二つのチオラーゼの分子進化を検討している。二つのペルオキシソーム局在チオラーゼアイソザイムと、他の生物の様々なチオラーゼの分子進化的考察から、これらペルオキシソーム局在の二つのチオラーゼアイソザイムが、 $\beta$ 酸化系の進化や細胞内小器官であるペルオキシソームの起源を論じる上で重要であることを示している。第3章では、第三のアイソザイムであるCsチオラーゼⅠを精製し、PsチオラーゼⅠとのタンパク化学的性質、酵素化学的性質、およびN末端構造の比較から、CsチオラーゼⅠとPsチオラーゼⅠが同一遺伝子産物であることを明らかにしている。また、外来遺伝子発現系においてPsチオラーゼⅠ遺伝子を発現させることによって得た、組換えタンパクの解析からも同一の結論を導いている。

第2編では、タンパクの生理的機能を直接知る上で効果的な方法の一つである遺伝学的手法を*C. tropicalis*に適用し、チオラーゼアイソザイムの生理的機能を明らかにすることを目的としている。第1章では、*C. tropicalis*において遺伝子破壊や、染色体遺伝子への点変異導入を行い、細胞内に存在するチオラーゼアイソザイムの組み合わせを変化させた場合の各種生育条件下での表現型を調べることにより、二つの遺伝子にコードされた三種のチオラーゼの生理的機能に関する知見を得ている。*C. tropicalis*におけるチオラーゼアイソザイムの生理的機能については、CsチオラーゼⅠは、ステロール合成系の

初期合成経路であるメバロン酸経路の初発段階に必須であり、一方、Psチオラーゼ I とチオラーゼ III はともに  $\beta$  酸化に関与し、特にチオラーゼ III は長鎖脂肪酸分解に必須であることを明らかにしている。さらに、チオラーゼ III は、 $C_4$  基質である酪酸を炭素源とした場合でさえも、脂肪酸  $\beta$  酸化系に対して主な役割を担っていることを示唆している。また、チオラーゼ I の C 末端にペルオキシソーム輸送シグナルが存在することを明らかにしている。第 2 章では、チオラーゼ III と Psチオラーゼ I の脂肪酸  $\beta$  酸化系に対する寄与を詳細に検討し、 $\beta$  酸化系の調節機構に関して新たな知見を得ている。酪酸生育下で、ペルオキシソーム局在チオラーゼの一方を欠損した場合の菌体に与える影響を、他のペルオキシソーム局在タンパクの発現量の変化から評価した結果、チオラーゼ III の欠損によってのみ、ペルオキシソーム  $\beta$  酸化系の他の酵素を含むペルオキシソームタンパク質の発現が上昇することを明らかにし、*C. tropicalis* のペルオキシソーム  $\beta$  酸化系が代謝流量を構成酵素の発現量の増減により調節する機構を有していることを推察している。さらに、二つのチオラーゼの欠損の影響の違いを、量的に少ない Psチオラーゼ I をチオラーゼ III 欠損株において大量発現させることによって検討し、 $C_4$  基質を炭素源とした場合でさえ、 $C_4$  基質に特異的な Psチオラーゼ I ではなく、広い基質特異性を持つチオラーゼ III が  $\beta$  酸化系において主な役割を有していることを示し、*C. tropicalis* の  $\beta$  酸化系におけるチオラーゼ III の不利な酵素化学的性質に打ち勝つような構造、たとえば酵素複合体の存在を推察している。

### 論文審査の結果の要旨

本論文は、炭化水素資化性酵母 *Candida tropicalis* のペルオキシソームの機能を解明する研究の一環として、脂肪酸  $\beta$  酸化系の最終段階を触媒するチオラーゼに注目し、*C. tropicalis* に存在する三種のチオラーゼアイソザイム (Csチオラーゼ I, Psチオラーゼ I, チオラーゼ III) の構造、発現および生理的機能を解析したものであり、得られた主な成果は以下の通りである。

1. チオラーゼ III をコードする遺伝子を単離・解析し、Psチオラーゼ I との構造および発現様式の違いを明らかにした。
2. ペルオキシソーム局在の Psチオラーゼ I とチオラーゼ III の分子進化を解析し、脂肪酸  $\beta$  酸化系やペルオキシソームの進化を論じている。
3. 細胞質に存在する Csチオラーゼ I を精製して、酵素化学的性質を明らかにし、Psチオラーゼ I との比較から両者が同一遺伝子産物であることを明らかにした。
4. *C. tropicalis* における遺伝子破壊や、染色体遺伝子への点変異導入により作製した株の生育における表現型を明らかにし、Csチオラーゼ I は、ステロール合成系の初発段階に必須であり、一方、Psチオラーゼ I とチオラーゼ III はともに脂肪酸  $\beta$  酸化に関与し、チオラーゼ III は長鎖脂肪酸分解に必須であることを明らかにした。
5. 酪酸生育下で、チオラーゼ III の欠損によってのみ、ペルオキシソーム脂肪酸  $\beta$  酸化系の他の酵素の発現が上昇することを明らかにし、チオラーゼ III が  $\beta$  酸化系において主な役割を有していることを明らかにするとともに、*C. tropicalis* の  $\beta$  酸化系が、代謝流量を構成酵素の発現量の増減により調節する機構を有していることを示唆した。

以上のように、本論文は酵母におけるチオラーゼアイソザイムについて多くの重要な知見を得たものであり、学術上、実際に寄与するところが少なくない。よって本論文は博士 (工学) の学位論文として価値あるものと認める。また、平成10年4月23日、論文内容とそれに関連した事項について試問を行った結果、合格と認めた。