

氏 名	はら 明 浩
学位(専攻分野)	博 士 (工 学)
学 位 記 番 号	論 工 博 第 3619 号
学位授与の日付	平 成 13 年 11 月 26 日
学位授与の要件	学 位 規 則 第 4 条 第 2 項 該 当
学位論文題目	Studies on the development of transformation system of the diploid yeast <i>Candida tropicalis</i> and its application (二倍体酵母 <i>Candida tropicalis</i> の形質転換系の開発とその応用)
論文調査委員	(主 査) 教 授 田 中 渥 夫 教 授 今 中 忠 行 教 授 木 村 俊 作

論 文 内 容 の 要 旨

二倍体酵母 *Candida tropicalis* は、優れた炭化水素の資化能をもち、*n*-アルカンを炭素源として培養すると、細胞内にペルオキシソームと β -酸化系の諸酵素が顕著に誘導される。また、*Candida tropicalis* の突然変異体は、ジカルボン酸 (DCA) 生産に利用されている。本研究は *Candida tropicalis* の形質転換系を開発し、その形質転換系を用いてチオラーゼ遺伝子のプロモーターと DCA 生産菌を分子レベルで解析したものであり、緒言、結論および本論 2 編 6 章よりなっている。

第 1 編は栄養要求性をマーカーとした *Candida tropicalis* の形質転換系の開発とその応用についての報告である。第 1 章では、*Candida tropicalis* の野生株からウラシル要求性株と *URA3* 遺伝子を取得し、形質転換系を確立した。さらに *Candida tropicalis* から自律的複製配列 (ARS) をクローニングし、大腸菌と *Candida tropicalis* で複製可能なシャトルベクターを作成した。第 2 章では、チオラーゼ遺伝子 (*CT-T3A*) のプロモーターを解析した。チオラーゼは、 β -酸化系の酵素であり *n*-アルカンにより発現が誘導される。ここでは、色々な長さのチオラーゼプロモーターにマーカー遺伝子の *LAC4* を結合し、*n*-アルカン存在下で *LAC4* の発現を調べた。その結果、*n*-アルカンによる発現誘導に重要な役割を果たしていると考えられる 10bp の配列が同定された。また、この配列は β -酸化系の酵素の遺伝子に広く見いだされたが、*P450* 遺伝子には見られなかった。第 3 章では、DCA 生産菌の β -酸化系の諸酵素を酵素活性測定法とウエスタンブロッティング法で調べた。その結果、DCA 生産菌では β -酸化系の諸酵素が減少しており、特にアシル-CoA オキシダーゼとチオラーゼの活性が著しく低下していることが判明した。また電子顕微鏡観察により、DCA 生産菌ではペルオキシソームがあまり発達していないことが判明した。第 4 章では、*Candida tropicalis* の野生株と DCA 生産菌から β -酸化系の初期酸化酵素のアシル-CoA オキシダーゼをコードする *POX4* 遺伝子をクローニングした。その結果、DCA 生産菌の *POX4* は、プロモーターと構造遺伝子の両方に変異をもつことが判明した。このことからアシル-CoA オキシダーゼ活性の減少が DCA 生産に重要な役割を果たしていると考えられた。しかしながら、相同組換え法で *POX4* を破壊した株では、DCA 生産菌のような多量の DCA 生産は見られなかった。また、生産株に野生株の *POX4* を導入し、アシル-CoA オキシダーゼを過剰発現させても、DCA 生産は低下しなかった。これらのことから、アシル-CoA オキシダーゼ活性の減少と DCA 生産には直接的な関係はないと考えられた。第 2 編は、抗生物質耐性をマーカーとした形質転換系の開発についての報告である。第 1 章では、細菌のハイグロマイシン耐性遺伝子を改変し、*Candida tropicalis* で発現するハイグロマイシン耐性遺伝子を作成した。最初の段階では、ハイグロマイシン耐性遺伝子に *Candida tropicalis* 由来のプロモーターを付加した遺伝子を作成したが、その遺伝子は *Candida tropicalis* 細胞内で発現しなかった。この原因として、*Candida* 酵母特有のローカルコドンの問題が考えられた。すなわち、数種の *Candida* 属酵母では、ロイシンコドンの CTG が、セリンに翻訳される。そこで、ハイグロマイシン耐性遺伝子内の 9 個の CTG コドンを全て、別のロイシンコドン (CTC) に改変した。その遺伝子を *Candida tropicalis* 細胞内へ導入したところ、ハイグロマイシン耐性が発現し、さらに形質転換体の選抜にも成功した。第 2 章では、ハイグロマイシン耐性遺伝子を用いた 2 種類の遺伝子破壊方法を開発した。一つは、遺伝子破壊法によりウラシル要求性株を作出する方法であり、ハイグロマイシン耐性遺伝子を用いて *URA3* を 1 個破壊し、その後 *URA3* 破壊カ

セットを形質転換することにより、ウラシル要求性株を取得した。また、ハイグロマイシン耐性遺伝子とシャトルベクターを用いた cotransformation 法により、*POX4* 遺伝子の破壊にも成功した。

このように酵母 *Candida tropicalis* の形質転換系を確立するとともに、その系を用いて、DCA 生産菌の解析やプロモーターの解析が可能なることを示したが、本研究は DCA 生産菌の改良や他の *Candida* 酵母の形質転換に応用しうるものと期待される。

論文審査の結果の要旨

本論文は、二倍体酵母 *Candida tropicalis* の形質転換系を開発し、その形質転換系を用いてチオラーゼ遺伝子のプロモーターとジカルボン酸 (DCA) 生産菌を分子レベルで解析した研究をまとめたものであり、得られた成果は以下のとおりである。

1. *Candida tropicalis* のウラシル要求性株と *URA3* を取得し、形質転換系を確立した。さらに自律的複製配列 (ARS) をクローニングし、大腸菌と *Candida tropicalis* で複製するシャトルベクターを作成した。
2. チオラーゼ遺伝子 (*CT-T3A*) のプロモーターを解析し、n-アルカンによる発現誘導に重要な役割を果たしていると考えられる 10bp の配列を同定した。
3. 野生株と DCA 生産菌の β -酸化系の諸酵素の活性を比較したところ、DCA 生産菌では β -酸化系の諸酵素、特にアシル-CoA オキシダーゼとチオラーゼの活性が低下していることを明らかとした。
4. *Candida tropicalis* の野生株と DCA 生産菌から、アシル-CoA オキシダーゼをコードする *POX4* をクローニングしたところ、生産菌の *POX4* に変異が見つかった。しかしながら、野生株の *POX4* を生産菌に導入し、アシル-CoA オキシダーゼを過剰発現させても生産株の DCA 生産能は低下しなかったことから、アシル-CoA オキシダーゼ活性の減少と DCA 生産には直接的な関係はないと考察した。
5. 抗生物質耐性をマーカーとした形質転換系を開発した。ハイグロマイシン耐性遺伝子内の CTG コドンを含め、別のロイシンコドン (CTC) に改変し、*Candida tropicalis* 細胞内へ導入したところ、ハイグロマイシン耐性の発現が見られた。さらに、形質転換体の選抜にも成功した。
6. ハイグロマイシン耐性遺伝子を用いた 2 種類の遺伝子破壊法を開発した。一つはウラシル要求性株を作出する方法であり、ハイグロマイシン耐性を用いて *URA3* を 1 個破壊し、その後 *URA3* 破壊カセットを形質転換することにより、*URA3* 破壊株を取得した。また、ハイグロマイシン耐性遺伝子とシャトルベクターを用いた cotransformation 法により、*POX4* を破壊することにも成功した。

以上のように、本論文は二倍体酵母 *Candida tropicalis* の形質転換系の開発と応用に関して重要な成果を挙げたものであり、学術上、實際上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13年10月19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。