

Title	アルカン酵母の細胞融合とイソクエン酸リアーゼ変異体の解析
Author(s)	松岡, 正佳
Citation	大阪大学, 1985, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/35032">https://hdl.handle.net/11094/35032</a>
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉</a> 大阪大学の博士論文について <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">〈/a〉</a> をご参照ください。

***Osaka University Knowledge Archive : OUKA***

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

氏名・(本籍)	まつ 松	おか 岡	まさ 正	よし 佳
学位の種類	工	学	博	士
学位記番号	第	7035	号	
学位授与の日付	昭和60年11月29日			
学位授与の要件	学位規則第5条第2項該当			
学位論文題目	アルカン酵母の細胞融合とイソクエン酸リアーゼ変異体の解析			
論文審査委員	(主査) 教授 合葉 修一			
	教授 大嶋 泰治	教授 岡田 弘輔	教授 田口 久治	

### 論 文 内 容 の 要 旨

本論文は、アルカン酵母 *Saccharomycopsis lipolytica* によるクエン酸とイソクエン酸の生産に関し、代謝経路の炭素流束解析からの補養反応の同定及びイソクエン酸リアーゼ突然変異株を遺伝的かつ生化学的に解析したもので、序論と本論(5章)及び総括と展望より成る。

アルカン酵母の特異性と有機酸生産に関する研究の背景を序論でまとめ、第1章では *S. lipolytica* の連続培養系における定常状態での物質収支から細胞内炭素流束を決定する方法を述べている。炭素流束と酵素活性の比較によって律速段階の酵素反応の推定及び代謝経路の同定が可能であることを解明している。

第2章では、アルカンの代謝に必須なイソクエン酸リアーゼの役割と調節を、イソクエン酸リアーゼ欠損株の性質とグリオキシル酸経路酵素群の活性レベルから考察している。

第3章では、アルカン酵母の遺伝的解析法としてのプロトプラスト融合法を開発している。この融合法における細胞質融合と核融合の相違を、原栄養融合体の表現型の観察や単相化による両親由来の栄養要求マーカーの回収などで明らかにしている。

第4章では、新たに単離したイソクエン酸リアーゼ欠損株及びその復帰変異株中から取得したイソクエン酸リアーゼ合成温度感受性株の特徴を調べ、プロトプラスト融合法で遺伝的に解析している。

第5章では、イソクエン酸リアーゼの合成温度感受性変異の成因を究明するため、野生型と変異型の精製酵素の諸特性を比較している。さらにこの変異株のイソクエン酸生産への応用とその数学モデルの意義を総括と展望の中で述べている。

## 論文の審査結果の要旨

本論文は、アルカン酵母 *S. lipolytica* による *n*-アルカンからの有機酸生産の基礎に関するものである。それは代謝経路における炭素流束の推定、補養反応のイソクエン酸リアーゼの役割を明らかにすることから始まり、イソクエン酸リアーゼ欠損変異株の細胞融合による遺伝的解析、さらにイソクエン酸リアーゼ合成温度感受性変異の生成機構に至る、広範囲な方法論を駆使し多様な角度からの研究をまとめたもので、その主な成果は次のごとくである。

- (1) 酵素の活性効率を *in vivo* 炭素流束から求めた活性と *in vitro* 酵素活性との比と定義し、*n*-アルカン及びグルコース生育菌ではそれぞれイソクエン酸リアーゼ及びピルビン酸カルボキシラーゼの活性効率が他の酵素に比べて高いことを見出している。したがって、クエン酸生産では補養反応としてのグリオキシル酸経路や炭酸固定が律速段階になる可能性を示唆している。
- (2) イソクエン酸リアーゼ欠損株はコハク酸、グリセロール、グルコース培地ではいずれも正常に生育したが、酢酸、*n*-アルカン、脂肪酸、 $\alpha$ 、 $\omega$ -ジカルボン酸では全く生育できず、イソクエン酸リアーゼ活性すなわちグリオキシル酸経路が酢酸をはじめとするこれらの炭素源の代謝に不可欠であることを明らかにしている。また、アセチル CoA 合成酵素欠損株を用い、アセチル CoA がグリオキシル酸経路の酵素群（イソクエン酸リアーゼとリンゴ酸合成酵素）の誘導物質となる可能性も指摘している。
- (3) *S. lipolytica* の対数増殖期菌体をキチナーゼと  $\beta$ -1, 3-グルカナーゼの併用処理によって 100% の収率でプロトプラスト化する方法を確立し、再生率 10% 以上、融合頻度は再生体当たり約  $10^{-4}$  の結果を得ている。二つの相補する栄養要求性変異株から得た原栄養融合体は安定かつ単核性としている。また、ミトコンドリアゲノムの変異と考えられる細胞質性オリゴマイシン耐性変異はプロトプラスト融合によって、核融合を伴わず感受性細胞へ移入する現象を見出している。
- (4) イソクエン酸リアーゼ欠損株のうち *icl-3* 変異株から単離した殆ど全部の温度感受性復帰変異株がイソクエン酸リアーゼの合成温度感受性 (TSS) 表現型を示すことを発見している。すなわち、23°C では野生株と同程度の熱安定なイソクエン酸リアーゼを合成し 33°C で合成を停止している。この現象はイソクエン酸リアーゼのポリペプチド鎖の合成後の温度依存性欠陥によると結論している。以上の成果は、アルカン酵母による有機酸生産に関し多くの基礎的知見を与えており、生物化学工学上貢献するところが大きい。よって本論文は博士論文として価値あるものと認める。