



Title	Genetic and molecular biological study of genes involved in desaturation of fatty acids in yeasts
Author(s)	Sarintip, Anamnart
Citation	大阪大学, 1998, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/40559
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、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

氏 名	Sarintip Anamnart
博士の専攻分野の名称	博士(工学)
学 位 記 番 号	第 13875 号
学 位 授 与 年 月 日	平成10年3月25日
学 位 授 与 の 要 件	学位規則第4条第1項該当 工学研究科応用生物工学専攻
学 位 論 文 名	Genetic and molecular biological study of genes involved in desaturation of fatty acids in yeasts (酵母における不飽和脂肪酸合成の遺伝的制御機構)
論 文 審 査 委 員	(主査) 教授 原島 俊
	(副査) 教授 室岡 義勝 教授 ト部 格 教授 山田 靖宙 教授 小林 昭雄 教授 菅 健一 教授 塩谷 捨明 教授 吉田 敏臣 教授 関 達治 教授 金谷 茂則 教授 二井 将光

論文内容の要旨

本論文は、酵母における不飽和脂肪酸生合成の遺伝的制御機構についての一連の研究成果をまとめたもので、序章、および本文5章から構成されている。

序章では、生命維持における不飽和脂肪酸の役割、医薬、栄養学分野における重要性について述べた後、植物や魚などの供給源に加えて、微生物による不飽和脂肪酸生産のバイオテクノロジーが必要であること、しかし、その基盤となる知見が乏しいことを述べ、本研究の意義と目的を明確にしている。

第1章では、高等動物や植物における脂肪酸の生合成と不飽和化について既往の研究を概説するとともに、酵母 *Saccharomyces cerevisiae* における脂肪酸生合成の遺伝的制御機構について現在までに確立された知見を詳述している。

第2章では、酵母 *Pichia angusta*, *Kluyveromyces thermotolerans*, *Yarrowia lipolytica* に、*S. cerevisiae* の $\Delta 9$ -脂肪酸不飽和化酵素遺伝子、*OLE1*、のホモログ（それぞれ *P-OLE1*, *K-OLE1*, *Y-OLE1* と命名）があることを明らかにし、*P-OLE1*についてはその全長を、また *K-OLE1*, *Y-OLE1* についてはその一部をクローニングしている。そして、そのアミノ酸配列の相同性から、それらが $\Delta 9$ -脂肪酸不飽和化酵素の構造遺伝子である可能性を示唆している。さらに *P-OLE1*については、*S. cerevisiae* の *ole1* 変異を相補することから、実際に $\Delta 9$ -脂肪酸不飽和化酵素の構造遺伝子であることを明らかにしている。*OLE1* 遺伝子は、培地中に添加したオレイン酸によって転写が抑制されることが知られているが、*P-OLE1*, *Y-OLE1*、も同様にオレイン酸による転写抑制を受けること、しかし *K-OLE1* は受けないことを示している。さらに *OLE1* および *P-OLE1* を導入した *S. cerevisiae* 形質転換体の脂肪酸組成の分析から、*P-OLE1* にコードされる $\Delta 9$ -不飽和化酵素は、*S. cerevisiae* のものとは基質特異性が違うことを明らかにしている。

第3章では、*P. angusta* の synonym である *Hansenula polymorpha* の遺伝学研究標準株 CBS1976を材料として、不飽和脂肪酸要求株を分離している。また、遺伝解析により、それらの変異は全て劣性の単一遺伝子変異であること、そして一つの相補群に属することを明らかにしている。また、種々の不飽和脂肪酸添加培地での変異株の増殖挙動と脂肪酸組成の分析から、変異が $\Delta 9$ -不飽和化酵素遺伝子、あるいはその調節遺伝子に起きた可能性を示唆している。さらに、変異株の中に遺伝子内相補現象を示すものがあることを見いだし、遺伝子産物がサブユニット構造を取っている可能性を示唆している。

第4章では、*S. cerevisiae*の $OLE1$ 遺伝子発現異常変異株、すなわち、 $OLE1$ の発現が低下する $pfo1 \sim pfo3$ 変異株、オレイン酸による発現抑制を受けない $nfo1 \sim nfo4$ 変異株を分離している。そして $pfo1$ 、 $pfo3$ 変異は転写レベルで $OLE1$ の発現を低下させる変異であること、また、 $pfo3$ 変異は同時に呼吸欠損も引き起こすことから、 $OLE1$ 遺伝子の発現にミトコンドリアの機能が関連していることを明らかにしている。 nfo 変異株については、それらが $OLE1$ の基礎転写に影響を及ぼすglobal repressorの変異であることを示している。

第5章では、以上の結果を総括し、本研究で得られた知見、クローン化した遺伝子、分離した変異株が、真核生物における不飽和脂肪酸生合成の遺伝的制御機構の解明や遺伝子工学による有用脂質の生産においていかに有用な情報や材料となるかを考察している。

論文審査の結果の要旨

不飽和脂肪酸は生命維持において重要な役割を果たしているだけでなく、応用微生物学、栄養学などの観点からも重要な生体物質である。しかし、その供給源は特定の植物や魚などに限られており、微生物による効率的で付加価値の高い不飽和脂肪酸、特に高度不飽和脂肪酸の生産の必要性が指摘されているにもかかわらず、その基盤となる知見は乏しい。一方、種々の生物シグナルの受容と伝達機構の解明が、様々な生命現象の根元的な理解に重要であると認識されつつあるが、真核生物における不飽和脂肪酸シグナルの伝達機構については、ほとんど知見がない。本研究は、酵母を用いて、これらの問題に対し応用、基礎両面から答えようとしたものであり、その主な成果は以下の通りである。

- (1) 酵母 *Pichia angusta*, *Kluyveromyces thermotolerans*, *Yarrowia lipolytica* に、*S. cerevisiae* の $\Delta 9$ -脂肪酸不飽和化酵素遺伝子、 $OLE1$ のホモログ（それぞれ $P-OLE1$, $K-OLE1$, $Y-OLE1$ ）があることを明らかにし、それらの全長あるいは一部をクローン化している。
- (2) $P-OLE1$ について、アミノ酸配列の相同性や *S. cerevisiae* の $ole1$ 変異の相補能から、これが実際に $\Delta 9$ -脂肪酸不飽和化酵素の構造遺伝子であることを明らかにし、さらに $P-OLE1$ にコードされる $\Delta 9$ -脂肪酸不飽和化酵素は、*S. cerevisiae* のものと基質特異性が違うことを明らかにしている。
- (3) $P-OLE1$, $Y-OLE1$ のホモログが、*S. cerevisiae* の $OLE1$ と同様、培地中に添加したオレイン酸による転写抑制を受けることを明らかにし、不飽和脂肪酸のシグナル伝達機構の存在を示唆している。
- (4) 酵母 *Hansenula polymorpha* から不飽和脂肪酸要求株を分離し、それらの変異が劣性の単一遺伝子変異であること、一つの相補群に属することを明らかにしている。また、脂肪酸組成の分析をはじめとする表現型の解析から、変異が $\Delta 9$ -不飽和化酵素遺伝子あるいはその調節遺伝子に起きた可能性を示唆している。
- (5) *S. cerevisiae* の $OLE1$ 遺伝子の発現が低下する $pfo1 \sim pfo3$ 変異株、オレイン酸による発現抑制を受けない $nfo1 \sim nfo4$ 変異株を分離している。さらに $pfo3$ 変異は同時に呼吸欠損も引き起こす事から、 $OLE1$ 遺伝子の発現にミトコンドリアの機能が関連していることを明らかにしている。 nfo 変異株については、それらが $OLE1$ の基礎転写に影響を及ぼすglobal repressorの変異であることを明らかにしている。

以上のように、本論文は、種々の酵母から、この分野の研究に有用な材料となる種々の脂肪酸不飽和化酵素をクローン化して、分子生物学的な解析を行っただけでなく、脂肪酸不飽和化酵素遺伝子の発現異常変異株を分離することによって、その制御に関与する種々の遺伝子を同定するなど多くの新しい知見を得ている。これらの成果は、「真核生物における不飽和脂肪酸生合成の遺伝的制御機構およびその酵母脂質工学への応用」に関わる分野の発展に寄与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。