

Title	Molecular genetic study on regulatory system of fatty acid elongation in the methylotrophic yeast <i>Hansenula polymorpha</i>
Author(s)	Prasitchoke, Phatthanon
Citation	大阪大学, 2007, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/48702">https://hdl.handle.net/11094/48702</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	フラスィッチョーク PRASITCHOKE	パッタノン PHATTHANON
博士の専攻分野の名称	博 士 (工 学)	
学位記番号	第 2 1 5 2 2 号	
学位授与年月日	平成 19 年 7 月 26 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	Molecular genetic study on regulatory system of fatty acid elongation in the methylotrophic yeast <i>Hansenula polymorpha</i> (メタノール資化酵母 <i>Hansenula polymorpha</i> における脂肪酸鎖長延長制御システムに関する分子遺伝学的研究)	
論文審査委員	(主査) 教授 原島 俊  (副査) 教授 小林 昭雄 大阪府立大学大学院生命環境科学研究科教授 小森 雅之 教授 福井 希一 教授 塩谷 捨明 教授 金谷 茂則 教授 仁平 卓也	

#### 論 文 内 容 の 要 旨

本論文はメタノール資化酵母 *Hansenula polymorpha* における脂肪酸鎖長延長システムの遺伝学的研究についての研究成果をまとめたものであり、緒論（一章）、本文（二、三、四章）、総合考察（五章）の5章からなっている。

第一章の緒論では脂肪酸合成システムに関する遺伝解析の必要性、今までに脂肪酸生産制御について報告されていること、酵母をモデル生物とした脂肪酸鎖長延長に関わる遺伝子の同定や機能解析を述べ、本研究の目的と意義を明確にした。

第二章では、*H. polymorpha* の脂肪酸鎖長延長酵素遺伝子 *HpELO1* をクローン化し、その機能解析を行った。系統樹解析の結果によって *HpELO1* は *Saccharomyces cerevisiae* の超長鎖脂肪酸（C20 : 0 ~ C26 : 0）鎖長延長酵素遺伝子 *ELO3* に類似性が高いことが分かった。*HpELO1* の発現によって *S. cerevisiae* *elo2Δ elo3Δ* 二重破壊株の致死性が回復した。Gas chromatography/mass spectrometry 解析により *Hpel1Δ* 破壊株の脂肪酸組成を調べたところ C24 : 0 と C26 : 0 は検出できず、C22 : 0 が顕著に蓄積していた。このことから、*HpELO1* は超長鎖脂肪酸鎖長延長機能を持ち、その活性は C22 : 0 から C24 : 0 の脂肪酸に延長することに必須であると考えられた。

第三章では、*S. cerevisiae* の超長鎖脂肪酸鎖長延長酵素遺伝子 *ELO2* に類似性が高い *HpELO2* 遺伝子をクローン化し、機能解析を行った。*Hpel2Δ* 破壊株の脂肪酸組成を調べたところ C18 : 0 と C24 : 0 が顕著に蓄積し、C26 : 0 が減少していた。*Hpel1Δ Hpel2Δ* 二重破壊株は致死になったことから *HpELO1* と *HpELO2* は超長鎖脂肪酸合成において重複した機能を持っていることが明らかになった。また *HpELO1* と *HpELO2* の転写レベルを調べた結果、*HpELO1* と *HpELO2* 転写量は長鎖脂肪酸（C14 : 0 ~ C18 : 0）によって一過的に上昇することが分かった。この転写量の増加はプロモータ置換実験の結果よりプロモータ領域のシス配列による転写促進であると考えられた。

第四章では、ミリスチン酸添加培地で、*Hpel1Δ* と *Hpel2Δ* 単独破壊株の生育が野生型株に比べて顕著に遅いことを見出した。この表現型は *S. cerevisiae* の *elo2Δ* 株及び *elo3Δ* 株では見られなかった。*Hpel1Δ* 破壊株からミ

リスチン酸添加培地でよく生育する抑圧変異株を分離した。その結果、2種類の抑圧変異株が得られ、その一つ *rem1* 抑圧変異株はミリスチン酸を取り込めないことが明らかになり、ミリスチン酸取り込み酵素に関する変異である可能性が示唆された。本研究で分離した抑圧変異株は脂肪酸取り込みメカニズム、また細胞増殖に関わるミリスチン酸の役割の研究に重要な材料になると考えられる。

第五章の総合考察では、真核生物の脂肪酸生合成に関する制御システムについて本研究で得られた成果と知見をまとめた。

## 論文審査の結果の要旨

本論文はメタノール資化酵母 *Hansenula polymorpha* における脂肪酸鎖長延長制御システムの分子遺伝学的研究に関する研究成果をまとめたものである。その内容は、*H. polymorpha* の脂肪酸鎖長延長酵素遺伝子 *HpELO1* と *HpELO2* の分離、同定とその機能解析から構成される。本論文の成果を要約すると次の通りになる。

まず、*H. polymorpha* の脂肪酸鎖長延長酵素遺伝子を同定するため、既にクローン化されている *Saccharomyces cerevisiae* と *Shizosaccharomyces pombe* の脂肪酸鎖長延長酵素 (Elo) で保存されているアミノ酸配列領域を用いて degenerate primer を設計し、*H. polymorpha* のゲノム DNA を鋳型として PCR 増幅を試みた。得られた増幅断片の塩基配列を決定したところ、PCR 産物には二種類あることが分かった。それぞれの DNA 断片をプローブとして *HpELO1* と *HpELO2* 遺伝子の全長をクローン化し、その塩基配列を決定した。

次に、*HpELO1* と *HpELO2* 遺伝子破壊株の作成、脂肪酸組成の分析、転写産物の測定などによる機能解析を行い、i) *HpELO1* と *HpELO2* は超長鎖脂肪酸の生合成において重複した機能を持つが、HpElo2 より HpElo1 の方が基質特異性が広い、ii) また *H. polymorpha* の超長鎖脂肪酸の生合成には *HpELO1* と *HpELO2* の二つの遺伝子のみが関係している、iii) さらに、*HpELO1* と *HpELO2* の転写は長鎖脂肪酸の添加によって、一過的に上昇するが、この一過的な上昇はそれらの遺伝子のプロモータ領域にあるシス配列を介して起こることを明らかにした。

また、ミリスチン酸によって、*Hpelo1Δ* と *Hpelo2Δ* 単独破壊株の生育が野生型株に比べて顕著に遅くなることを見出した。この生育遅延のメカニズムについて調べるため、ミリスチン酸耐性抑圧変異株を分離した。二種類の耐性抑圧変異株が得られたが、その一つ *rem1* 抑圧変異株はミリスチン酸を取り込めないことを明らかにした。これらのごとより細胞増殖に関わる脂肪酸のバランスにミリスチン酸のレベルが重要であることを明らかにした。

以上のように、本論文は、真核生物における脂肪酸生合成の制御システム、特に脂肪酸鎖長延長の制御システムを明らかにしたものであり、博士論文として十分に価値あるものと認められる。