OUKA
The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	Investigation of non-mevalonate-like pathway for terpene biosynthesis in Yarrowia lipolytica
Author(s)	Dissook, Sivamoke
Citation	大阪大学, 2021, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.18910/85367
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

Abstract of Thesis

Name （DISSOOK SIVAMOKE）

Title: Investigation of non-mevalonate-like pathway for terpene biosynthesis in *Yarrowia lipolytica* (*Yarrowia lipolytica* のテルペン生合成のための非メバロン酸様経路に関わる研究)

Yarrowia is one of the fungal genera in the family Dipodascaceae. For some time, the genus was monotypic, containing the single species *Yarrowia lipolytica*. This yeast is an attractive host for converting the various carbon source to high-value chemicals in an economical and environmentally friendly way. During the survey on the *Y. lipolytica* metabolome response to different carbon to nitrogen ratio, a chromatographic peak annotated as MEP was observed in the intracellular extract of *Y. lipolytica* cultured in a nitrogen limiting condition. This phenomenon is inconsistent with a conventional understanding regarding isoprenoid biosynthesis in yeast. This result raises an intriguing hypothesis of whether *Y. lipolytica* could utilize the MEP pathway for isoprenoid biosynthesis. Therefore, the objective of this study is to investigate the existence of the MEP pathway in *Y. lipolytica.* Four independent approaches were used to investigate the existence of the MEP pathway in *Y. lipolytica*; the spiking of the authentic standard, the MEP pathway inhibitor, the ^{13}C labeling incorporation analysis, and the *Y. lipolytica* reference genome analysis.

In this study the time-course sampling of one *Y. lipolytica* strain was conducted to probe the suitable time points for multiple strains study. Since the variable changes in this study highly affect the growth of *Y. lipolytica*, it might not be suitable to choose the sampling point based on the growth phase alone. Therefore, the metabolome profile was considered to help understand the dynamics of metabolic changes occurring during the cultivation with several different C:N ratios and determined the crucial sampling time point and C:N ratio for multiple strains study. Further studied on the metabolic responses of several *Yarrowia* strains to nitrogen-limiting conditions was conducted, including *Y. lipolytica* PO1d, *Y. lipolytica* JCM 2304, *Y. lipolytica* JCM 21924, *Y. lipolytica* JCM 8061, and two recently identified species, *Y. deformans* JCM 1694 and *Y. keelungensis* JCM 14894. This study found that cultivation time of 36 h and carbon to nitrogen ratio of 4:1 and 5:0 was suitable for studying the effects of nitrogen-limiting conditions on *Yarrowia* and these conditions were applied to six strains of *Yarrowia*. These six strains of *Yarrowia* showed similar responses to nitrogen-limiting conditions; however, each strain had a unique metabolomic profile. Purine and pyrimidine metabolism were the most highly affected biological pathways in nitrogen-limiting conditions, indicating that these conditions affect energy availability within cells. This stress leads to a shift in cells to the utilization of a less ATP-dependent biological pathway.

In the next chapter, a more in-depth investigation of the existence of the MEP pathway in *Y. lipolytica* was presented. Four independent approaches were used to investigate the existence of the MEP pathway in *Y. lipolytica*; the spiking of the authentic standard, the MEP pathway inhibitor, the ^{13}C labeling incorporation analysis, and the *Y. lipolytica* reference genome analysis. The study suggested that the mevalonate and MEP pathways co-exist in *Y. lipolytica* and the nitrogen limiting condition triggers the utilization of the MEP pathway in *Y. lipolytica*.

In conclusion, the elucidation of cellular functions is an enormous effort and requires various strategies to capture the entire system. The metabolomics-based analysis offers a complete view of the metabolic shifts under environmental perturbations. This study demonstrated that the metabolomics analysis of oleaginous yeast *Yarrowia* spp. can yield known and unknown metabolic behavior, which raised an interesting follow-up experiment. The metabolome dataset presented in this study does not only provide information about key metabolites but also represents a useful resource for future research regarding non-mevalonate-like pathway in yeast. With the current data, this study proposed that the mevalonate pathway and the non-mevalonate-like pathway co-exist in *Y. lipolytica*. Notably, the nitrogen limiting condition triggered the utilization of the non-mevalonate-like pathway.

論文審査の結果の要旨及び担当者

様式７

氏 名 (DISSOOK SIVAMOKE)		
論文審査担当者	（職）	氏名
	主 査　教 授	福崎英一郎
	副 査　教 授	村中 俊哉
	副 査　教 授	藤山 和仁

論文審査の結果の要旨

Yarrowia 属は、Dipodascaceae 科に属する真菌の一分類であり、単一の種 *Yarrowia lipolytica* を含んでいます。この酵母は、経済的で環境低負荷条件でさまざまな炭素源を高付加価値の化学物質に変換する能力に優れた魅力的な宿主です。異なる炭素対窒素比における *Y. lipolytica* のメタボローム解析を実施中に原核微生物に特徴的な代謝物である MEP が、窒素制限条件で培養された *Y. lipolytica* の細胞内抽出物で検出されました。この現象は、酵母におけるイソプレノイド生合成に関する従来の理解と矛盾していました。すなわち、この結果は、*Y. lipolytica* がイソプレノイド生合成に MEP 経路が利用されているという興味深い仮説を提起しました。当該仮説を証明するために *Y. lipolytica* における MEP 経路の存在を調査することを本研究の目的としました。

当該研究では、*Y. lipolytica* 株の経時的サンプリングを実施して、一連の研究に適したサンプリングポイントを調査しました。この研究における重要な変動は *Y. lipolytica* の成長に大きな影響を与えるため、成長段階のみに基づいてサンプリングポイントを選択することは適切ではない可能性があります。したがって、メタボロームプロファイルは、いくつかの異なる C： N 比での培養中に発生する代謝変化のダイナミクスを理解するのに役立つと考えられ、複数の株の研究の重要なサンプリング時点と C:N 比を決定しました。*Y. lipolytica* PO1d、*Y. lipolytica* JCM 2304、*Y. lipolytica* JCM 21924、*Y. lipolytica* JCM 8061、および最近同定された 2 つの種 Y を含む、窒素制限条件に対するいくつかの *Yarrowia* 属酵母の代謝応答についてさらに研究を実施しました。この研究では、36 時間の培養時間と、4：1 および 5：0 の炭素対窒素比が、*Yarrowia* 属酵母に対する窒素制限条件の影響を研究するのに適していることがわかり、これらの条件が適用しました。*Yarrowia* 属酵母のこれらの 6 つの菌株は、窒素制限条件に対して同様の応答を示しました。ただし、各菌株には固有のメタボロミクスプロファイルがありました。プリンとピリミジンの代謝は、窒素制限条件で最も影響を受けた生物学的経路であり、これらの条件が細胞内のエネルギー利用可能性に影響を与えることを示しています。このストレスは、ATP 依存性の低い生物学的経路の利用への細胞のシフトにつながります。

次に、*Y. lipolytica* における MEP 経路の存在のより詳細な調査を行いました。 *Y. lipolytica* における MEP 経路の存在を調査するために 4 つの独立したアプローチが使用されました。MEP 標準品のスパイク添加、MEP 経路阻害剤、^{13}C 標識取り込み分析、および *Y. lipolytica* 比較ゲノム解析。当該研究は、メバロン酸経路と MEP 経路が *Y. lipolytica* に存在し、窒素制限条件が *Y. lipolytica* の MEP 経路の利用を引き起こすことを示唆しました。

結論として、メタボローム解析により油性酵母である *Yarrowia lipolytica* にメバロン酸経路に加えて本来酵母には存在しないとされていた非メバロン酸様経路が共存することを強く示唆することができました。当該結果は、従来の真菌属のテルペノイド生合成経路の常識を一部覆す結果と言えます。

以上より，本論文は博士論文として価値あるものと認めます。