

学位论文要旨

氏名 Mochamad Nurcholis

題目 **Global metabolic regulation via Mig1 as a transcriptional regulator in thermotolerant yeast *Kluyveromyces marxianus* DMKU3-1042**

Kluyveromyces marxianus as a nonconventional yeast has attractive characteristics including fast growth speed, GRAS (generally recognized as safe), thermotolerance, ability to utilize broad range of sugars, ability to produce useful materials such as hydrolytic enzymes, ethanol, biomass and volatile compounds. These excellent characteristics of *K. marxianus* are potential to be applied for industrial ethanol production in tropical countries. However, one of problems for ethanol production is the presence of glucose when mixed sugars like sugarcane juice or lignocellulosic biomass are used as carbon sources. Glucose repression is a general phenomenon in organisms including yeast, by which the utilization of other sugars is delayed. Unlike *Saccharomyces cerevisiae*, which exhibits a strong glucose repression on sucrose utilization, *K. marxianus* utilizes sucrose resistantly to glucose repression. In order to investigate the glucose repression mechanism in *K. marxianus*, disrupted mutants of genes for Mig1 and Rag5 as orthologs of Mig1 and Hxk2, respectively, in *S. cerevisiae* were constructed using a thermotolerant strain DMKU3-1042 that was isolated from Thailand, and their characteristics were compared with those of the corresponding mutants of *S. cerevisiae*.

In this study, two research topics on *K. marxianus* were performed: 1) analysis of Mig1 and Rag5 as expressional regulators, 2) analysis of *MIG1* as a positive regulator for the histidine biosynthesis pathway and as global regulators. *MIG1* mutants of both yeasts exhibited more resistance than the corresponding parental strains to 2-deoxyglucose (2-DOG). *Kmmig1*, but not *Kmrag5*, exhibited a histidine-auxotrophic phenotype, suggesting that *MIG1* is required for histidine biosynthesis in *K. marxianus*. Moreover, *Kmrag5* and *Schxk2* were more resistant than the corresponding *MIG1* mutant to 2-DOG, and only the latter increased the utilization speed of sucrose in the presence of glucose. *Kmrag5* exhibited very low activities for gluco-hexokinase and hexokinase and, unlike *Schxk2*, showed very slow growth and a low level of ethanol production in a glucose medium. Furthermore, *Kmrag5*, but not *Kmmig1*, exhibited

high inulinase activity in a glucose medium and exhibited greatly delayed utilization of accumulated fructose in the medium containing both glucose and sucrose. Transcription analysis revealed that the expression levels of *INU1* for inulinase and *GLK1* for glucokinase were much higher in *Kmrag5* and higher but not significantly higher in *Kmmig1* compared than those in the parental strain but that the expression levels of *RAG1* for a low-affinity glucose transporter were low in *Kmmig1* and *Kmrag5*. These findings suggest that except for regulation of histidine biosynthesis, Mig1 and Rag5 of *K. marxianus* play similar roles in the regulation of gene expression and share some functions with Mig1 and Hxk2, respectively, in *S. cerevisiae*.

In order to understand molecular mechanism of a histidine-auxotrophic phenotype of *Kmmig1*, genome-wide gene expression analysis by RNA-Seq was carried out. The analysis revealed that only *HIS4* in seven *HIS* genes for histidine biosynthesis was down-regulated in *Kmmig1*. Consistently, introduction of *HIS4* into *Kmmig1* suppressed the requirement of histidine. Considering the fact that His4 catalyzes four of ten steps in histidine biosynthesis, *K. marxianus* has evolved a novel and effective regulation mechanism via Mig1 for the control of histidine biosynthesis. According to RNA-seq analysis, more than 1,000 differentially expressed genes (DEGs) in *Kmmig1*. This result indicated that Mig1 is directly or indirectly involved in the regulation of their expression as a global regulator.

(別紙様式第7号)

学位論文審査の結果の要旨

報告番号	甲 第 1548 号	氏 名	MOCHAMAD NURCHOLIS
論文審査担当者	主査	山田 守	
	副査	内海 俊彦	
	副査	薬師 寿治	
	副査		印
	副査		印
学位論文題目名 (題目名が英文の場合は、行を変えて和訳を括弧書きで記載する。) Global metabolic regulation via Mig1 as a transcriptional regulator in thermotolerant yeast <i>Kluyveromyces marxianus</i> DMKU3-1042 (耐熱性酵母 <i>Kluyveromyces marxianus</i> DMKU3-1042 における転写制御因子 Mig1 による広範な代謝制御)			
関連論文 (題目名が英文の場合は、行を変えて和訳を括弧書きで記載する。) <基礎となる学術論文> 題目 <i>MIG1</i> as a positive regulator for the histidine biosynthesis pathway and as a global regulator in thermotolerant yeast <i>Kluyveromyces marxianus</i> (耐熱性酵母 <i>Kluyveromyces marxianus</i> におけるヒスチジン生合成の正の調節因子および広範な代謝調節因子としての <i>MIG1</i>) 掲載誌 <i>Scientific Reports</i> , doi: 10.1038/s41598-019-46411-5 (2019年 7月 <input checked="" type="checkbox"/> 掲載・掲載予定) 題目 Functional analysis of Mig1 and Rag5 as expressional regulators in thermotolerant yeast <i>Kluyveromyces marxianus</i> (耐熱性酵母 <i>Kluyveromyces marxianus</i> における発現調節因子としての Mig1 と Rag5 の機能解析) 掲載誌 <i>Appl. Microbiol. Biotechnol.</i> , doi:10.1007/s00253-018-9462-y (2018年 11月 <input checked="" type="checkbox"/> 掲載・掲載予定)			
<参考論文> 題目 Characteristics of <i>kanMX4</i> -inserted mutants that exhibit 2-deoxyglucose resistance in thermotolerant yeast <i>Kluyveromyces marxianus</i> (耐熱性酵母 <i>Kluyveromyces marxianus</i> における2-デオキシグルコース耐性を示す <i>kanMX4</i> 挿入変異株の特性) 掲載誌 <i>The Open Biotechnology Journal</i> , doi: 10.2174/18740707016100100208 (2016年 5月 <input checked="" type="checkbox"/> 掲載・掲載予定) 題目 Potential of thermotolerant ethanologenic yeasts isolated from ASEAN countries and their application in high-temperature fermentation <i>s</i> (アセアン諸国から分離した耐熱性エタノール生産性酵母の潜在能力と高温発酵への応用) 掲載誌 <i>Fuel Ethanol Production from Sugarcane</i> Thalita Peixoto Basso and Luiz Carlos Basso (eds) ISBN: 978-1-78984-937-0 (print) 978-1-78984-937-7 (online) IntechOpen, pp121-154 (2019年 2月 <input checked="" type="checkbox"/> 掲載・掲載予定)			

(論文審査の要旨)

Kluyveromyces marxianus は、速い生育速度、GRAS (食品としての安全性)、耐熱性、広い糖質化スペクトルをもつことに加えて、加水分解酵素、エタノール、バイオマスおよび揮発性化合物などの有用物質を生産する能力を含む魅力的な特徴を有する。これらの優れた特性は、熱帯諸国での工業用エタノール生産に応用できる可能性がある。しかしながら、エタノール生産に関する問題の1つとして、サトウキビ搾汁やリグノセルロース系バイオマスのような混合糖が炭素源として使用されるときに起こるグルコース抑制がある。グルコース抑制は酵母を含む生物における一般的な現象であり、それによって他の糖の利用が遅延する。世界的にエタノール生産に使用されている *Saccharomyces cerevisiae* はスクロース利用に対して強いグルコース抑制を示すが、*K. marxianus* はスクロース利用に対してグルコース抑制が見られない。*S. cerevisiae* のグルコース抑制機構は、*K. marxianus* とは異なり、比較的研究が進んでおり、Mig1 および Hxk2 が複合体を形成しグルコース抑制の中心的役割を果たす。

本研究では、*K. marxianus* におけるグルコース抑制機構を調べるために、*S. cerevisiae* の Mig1 と Hxk2 のそれぞれのオルソログである Mig1 と Rag5 の遺伝子破壊変異体 (*Kmmig1* と *Kmrag5*) を構築し、Mig1 および Rag5 の発現調節因子として役割を検討したものである。また、その研究の中から Mig1 がヒスチジン生合成経路および代謝全体における調節因子として重要な役割を果たすことを見出している。まず、両酵母の *MIG1* 変異体は、対応する親株よりも 2-デオキシグルコース (2-DOG) に対してより高い耐性を示した。また、*Kmrag5* および *Schxk2* は、対応する *MIG1* 変異体よりも 2-DOG に対してより耐性があり、後者のみがグルコースの存在下でのスクロースの利用速度を増加させた。*Kmrag5* は、非常に低いグルコヘキソキナーゼおよびヘキソキナーゼ活性を示し、そして *Schxk2* とは異なり、グルコース培地中で非常に遅い増殖および低レベルのエタノール生産を示した。さらに、*Kmmig1* ではなく *Kmrag5* がグルコース培地中で高いイヌリナーゼ活性を示し、グルコースとスクロースの両方を含有する培地中で蓄積したフルクトースの利用が大幅に遅れることを示した。転写分析により、イヌリナーゼ遺伝子およびグルコキナーゼ遺伝子の発現レベルは、親株のそれと比較して *Kmrag5* でははるかに高く、*Kmmig1* では有意には高くないが、低親和性グルコーストランスポーター遺伝子の発現レベルは両変異株で低下した。これらの知見は、*K. marxianus* の Mig1 および Rag5 が遺伝子発現調節において同様な役割を果たし、*S. cerevisiae* の Mig1 および Hxk2 といくつかの機能を共有することを示唆している。一方、*Kmmig1* がヒスチジン栄養要求性の表現型を示すのに対して *Kmrag5* は同様な表現型を示さないことから、Mig1 は単独でも転写調節因子として働く可能性が示唆された。

次に、*Kmmig1* のヒスチジン要求性表現型の分子機構を理解するために、RNA-Seq によるゲノムワイドな遺伝子発現解析を行った。その結果、ヒスチジン生合成に働く 7 つの *HIS* 遺伝子のうちの *HIS4* のみが *Kmmig1* において下方制御されていることを見出した。さらに、*Kmmig1* に *HIS4* を導入したところヒスチジン要求性を抑制した。*His4* がヒスチジン生合成の 10 段階のうち 4 段階を触媒するということを考慮すると、*K. marxianus* はヒスチジン生合成の制御のための Mig1 を介した新規かつ効果的な調節機構を進化させたと考えられる。さらに、RNA-Seq 解析の結果、*Mig1* 破壊によって 1,000 を超える遺伝子の発現が変動することが分かった。この結果は、Mig1 が調節因子として代謝全体に亘って直接的または間接的に関与していることを示唆している。

本研究は、耐熱性酵母 *K. marxianus* DMKU3-1042 のグルコース抑制に関する調節因子について、詳細な分子生物学的解析を行った初めてのものである。特に上述のように、*S. cerevisiae* のグルコース抑制機構と類似な点を示すと同時に異なる点を明らかにした。加えて、グルコース抑制に関わる Mig1 がヒスチジン生合成や代謝全体の制御に関わることを初めて明らかにした。よって学位論文として十分に相応しいと評価した。