

氏 名	しお 塩 見 尚 史
学位(専攻分野)	博 士 (工 学)
学位記番号	論 工 博 第 2562 号
学位授与の日付	平 成 4 年 3 月 23 日
学位授与の要件	学 位 規 則 第 4 条 第 2 項 該 当
学位論文題目	遺 伝 子 組 換 え 酵 母 に よ る <i>S</i> -アデノシルメチオニンの生産に関する基礎的研究

論文調査委員 (主 査)  
 教 授 佐 田 榮 三 教 授 田 中 渥 夫 教 授 橋 本 健 治

### 論 文 内 容 の 要 旨

遺伝子組換え酵母を利用して有用物質を生産する場合、生産プロセスに適した組換え体を設計することが重要な課題となっている。

本論文は、肝機能低下症や脳障害の治療薬として期待されている *S*-アデノシルメチオニン (SAM) の遺伝子組換え酵母による生産に関して、野生酵母用のマーカー遺伝子の開発と目的遺伝子の宿主内での安定化の方法に関して基礎的な研究をまとめたものであり、8章から成っている。

第1章は序論であり、組換え微生物による有用物質の生産に関する既往の研究をまとめ、本研究の背景と目的を述べている。

第2章では、野生酵母用のマーカー遺伝子としてエチオニン耐性遺伝子をクローニングし、その生化学的特性を解析した。まず、酵母 *S. cerevisiae* の遺伝子ライブラリーより、エチオニンに耐性を示す形質転換体を得た。これより得られたプラスミド pYSMH1 を有する酵母 DKD-5D-H 株の生化学的特性を調べた結果、このエチオニン耐性遺伝子は、SAM の液胞への蓄積を高める遺伝子であることが分った。従って、エチオニンは、アデノシルエチオニンに変換された後、液胞に蓄積されることにより耐性を示すものと考えられる。

第3章では、エチオニン耐性遺伝子の産物を明らかにするために遺伝学的解析を行った。まず、エチオニン耐性遺伝子を有するプラスミド pYSMH1 をサブクローニングし、全塩基配列を決定した。その結果、エチオニン耐性遺伝子と考えられる長いオープンリーディングフレーム (ORF) が決定された。この ORF は、アミノ酸残基617であり、それから算出されるタンパク質は、N 末端側に疎水性を有し、分子量は67977であった。

第4章では、スペルミン耐性遺伝子のクローニングと SAM の蓄積への影響について検討した。ポリアミンの中で、細胞毒性が強いスペルミンに耐性を示す遺伝子のクローニングを行った。得られた遺伝子の1つは、エチオニン耐性遺伝子と一致した。これから、SAM の蓄積とスペルミンの耐性との関係が示唆された。

第5章では、エチオニン耐性遺伝子を有する酵母によるSAMとその関連物質の生産について検討した。DKD-5D-H/pYSMH1の細胞を5mMメチオニンと50mM燐酸カリウムを含有する培地で培養した時、0.26kg/kg-dry cellsの値まで蓄積を高めることができた。また、ホモシステインを添加した場合、多量のS-アデノシルホモシステインを蓄積することができた。

第6章では、発現と安定性の高いベクタープラスミドの開発を試みた。エチオニン耐性遺伝子をpJDB207に挿入したプラスミドpER9を新たに作成した。このpER9は、コンパクトでクローニング部位を有し、野生酵母で発現できることから、野生酵母用ベクターとして用いることが分った。pER9のSAMの蓄積と安定性はpYSMH1より優れていた。さらに、エチオニンを含有して培養した場合、プラスミドの脱落をほぼ抑えることができた。

第7章では、染色体内に多コピー数挿入することにより発現と安定性を高める試みを行った。エチオニン耐性遺伝子とデルタ配列部分とを有するYIpおよびYE<sub>p</sub>系のプラスミドpNS2およびpNS4を作成し、染色体への挿入を試みた。その結果、pNS2では2-3コピー数、pNS4では多コピー数染色体に挿入できた。pNS4が挿入された形質転換体は、SAMの蓄積がpER9よりもさらに高めることができたが、安定性は低下した。また、選択圧を加えた場合、挿入された遺伝子を安定に保持することができた。

第8章は結論で、本論文で得られた成果をまとめるとともに、遺伝子組換え酵母を利用した物質生産に対する考え方、今後の課題について言及している。

### 論文審査の結果の要旨

野生酵母用のマーカーとしてエチオニン耐性遺伝子のクローニングを行い、その生化学的ならびに遺伝学的特性を明らかにし、さらに、エチオニン耐性遺伝子を有する酵母を用いてS-アデノシルメチオニン(SAM)の生産を検討したもので、得られた主な成果は次の通りである。

1. エチオニンに耐性を示す酵母 *S. cerevisiae* の遺伝子をクローニングし、この遺伝子が液胞へSAMの蓄積を高めることに関与する遺伝子であることを明らかにした。

2. エチオニン耐性遺伝子の全塩基配列を決定し、その最も可能性の高いオープンリーディングフレームを確認した。これから推定されるタンパク質は、アミノ酸残基617、分子量67977であり、N末端側に疎水性の領域を有していることを明かにした。

3. スベルミンに耐性を有する酵母 *S. cerevisiae* の遺伝子をクローニングし、スベルミン耐性遺伝子の一つが、エチオニン耐性遺伝子であることを明かにした。

4. エチオニン耐性遺伝子を有する酵母をメチオニンと燐酸カリウムを含有する培地で培用した場合、高いSAMの蓄積量が得られることを明らかにした。また、ホモシステインを含有する場合には、S-アデノシルホモシステインを高い濃度まで蓄積することができた。

5. エチオニン耐性遺伝子とプラスミドpJDB207とからプラスミドpER9を作成した。このプラスミドは野生酵母用のベクターとして使えること、SAMの蓄積とプラスミドの安定性が高いことを明かにした。

6. デルタ因子とエチオニン耐性遺伝子とを含有するYE<sub>p</sub>系のプラスミドpNS4が、酵母の染色体に

高コピー数挿入できることを示した。さらに、この染色体に挿入された酵母のSAMの蓄積量は、pER9が挿入された酵母よりもさらに高いこと、選択圧を加えることにより染色体からの脱落を抑えうることを明らかにした。

以上要するに本論文は、S-アデノシルメチオニンの遺伝子組換え酵母による生産に関して、野生酵母用のマーカー遺伝子の開発と目的遺伝子の宿主内での安定化の方法について基礎的研究を行い、その生産性および安定性を高めたものであり、学術上、實際上、寄与するところが少なくない。よって本論文は、京都大学博士（工学）の学位論文として価値あるものと認める。

また、平成4年1月14日、論文内容とそれに関連した事項について試問を行った結果、合格と認めた。