

氏 名	ゆ り も と ひ ろ や 由 里 本 博 也
学位(専攻分野)	博 士 (農 学)
学位記番号	論 農 博 第 2369 号
学位授与の日付	平 成 13 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	Gene regulation and its applied aspects of peroxisomal enzymes in the methylotrophic yeast <i>Candida boidinii</i> (メタノール資化性酵母 <i>Candida boidinii</i> におけるペルオキシソーム酵素の遺伝子発現制御機構とその応用)
論文調査委員	(主 査) 教 授 加 藤 暢 夫 教 授 清 水 昌 教 授 熊 谷 英 彦

### 論 文 内 容 の 要 旨

メタノール資化性酵母 *Candida boidinii* は、メタノールだけでなくオレイン酸や D-アラニンをも単一炭素源としても生育し、その際、細胞内には単膜オルガネラであるペルオキシソームが顕著に発達する。ペルオキシソームには各炭素源の代謝に関わる酵素が局在している。その中で、メタノールによって誘導されるアルコールオキシダーゼ (AOD) は細胞内可溶性タンパク質の数十%にも達することから、この強力な AOD 遺伝子 (*AOD1*) プロモーターを利用した異種遺伝子大量発現系が開発されている。

本論文では、*C. boidinii* におけるペルオキシソーム酵素の遺伝子発現制御機構を分子レベルで精査し、D-アミノ酸オキシダーゼ (DAO) の生理的役割と有毒な代謝中間体であるホルムアルデヒドの細胞内蓄積を回避するための新規な代謝調節機構を明らかにするとともに、メタノール培養時に発達するペルオキシソームをタンパク質蓄積の場とする新しい酵素生産系を確立したもので、得られた結果は以下のように要約できる。

1) D-アラニンによって誘導されるペルオキシソームの増殖および DAO の生成は、他の炭素源によるペルオキシソーム誘導とは異なり、グルコース抑制を受けないこと、またこれらの調節が主に転写レベルで行われることを示した。次に、*C. boidinii* より DAO をコードする遺伝子 *DAO1* をクローン化するとともに、真核生物において初めて DAO 遺伝子破壊株 *dao1Δ* 株を取得し、その生育特性から、*C. boidinii* が D-アラニンを炭素源として利用するためには DAO が不可欠であることを明らかにした。一方、*dao1Δ* 株が D-アラニンを窒素源とした培地では生育できることから、DAO 以外にも D-アミノ酸を窒素源として代謝するための酵素が存在することを示唆した。

2) *C. boidinii* のペルオキシソーム酵素および膜タンパク質 5 種について、各遺伝子プロモーターにおけるメタノール誘導性の強さを定量的に比較した結果、ジヒドロキシアセトンシンターゼ (DAS) 遺伝子 (*DAS1*) のプロモーターが最も強力であることが判明した。また、メタノール誘導初期においては、*DAS1* が *AOD1* に先行して強力に誘導されること、および、*AOD1* プロモーターは、DAS の触媒反応によって生じる同化代謝産物であるジヒドロキシアセトンやグリセルアルデヒドによって活性化されることを見出した。以上の実験事実は、代謝の初期段階に関与する酵素遺伝子の発現が、その下流の代謝産物によって調節を受けることを意味し、この新規な代謝調節機構に対して「anabolite induction」という名称を提唱した。すなわち、*C. boidinii* では、増殖基質であるメタノールによって *AOD1* が急激に誘導され、細胞内に毒性の高いホルムアルデヒドが蓄積することを回避するための巧みな仕組みをもつことが明らかとなった。

3) DAO は D-アミノ酸の定量や  $\alpha$ -ケト酸の合成などに広く利用されていることから、本酵素の大量発現系を構築した。AOD 遺伝子破壊株 (*aod1Δ* 株) を宿主とし、*DAO1* を *AOD1* プロモーター制御下で発現させた場合に、*DAO1* の発現量 (mRNA 量) には野生株を宿主としたものとの差は認められないにもかかわらず、DAO の生産性が著しく向上することを認めた。これは *aod1Δ* 株を宿主とすることで、AOD が占有していたペルオキシソーム内の空間、ペルオキシソームへの輸送装置および補酵素が専ら DAO に使われ、翻訳後の段階が増強されて生産性が向上したためと推定した。発現ベクターのコピー数や培養条件を最適化し、最終的に細胞内可溶性タンパク質の 30% に相当する DAO をペルオキシソームに蓄

積させることに成功した。さらに、異種有用酵素の例として、糖尿病診断に有効な糸状菌の糖化アミノ酸オキシダーゼの大量生産に本手法を適用し、細胞内可溶性タンパク質の18%に相当する糖化アミノ酸オキシダーゼの生産に成功した。これは酵母のペルオキシソームを蓄積の場とするタンパク質の大量生産系を構築した初めての例であり、他の有用酵素生産への応用も可能である。

## 論文審査の結果の要旨

メタノール資化性酵母は安価なメタノールを炭素源として生育できることに加えて強力なメタノール誘導性プロモーターをもつことから、異種遺伝子大量発現宿主として広く利用されている。また生育する炭素源に応じて、ペルオキシソームが顕著に発達することから、ペルオキシソーム形成機構を研究するためのモデル生物としても利用されてきた。しかし種々の炭素源によるペルオキシソーム酵素の発現調節やメタノール誘導性遺伝子発現の分子機構については多くの不明の点を残していた。本論文では、メタノール資化性酵母 *Candida boidinii* において、各種炭素源、窒素源によるペルオキシソーム酵素の遺伝子発現制御機構を詳細に調べ、メタノール誘導性遺伝子における新しい転写調節機構を見出すとともに、メタノール培養時に発達するペルオキシソームに有用酵素を大量に蓄積させる系を構築したものであり、評価すべき点は以下の3点である。

- 1) D-アラニンによって誘導されるペルオキシソームの増殖およびD-アミノ酸オキシダーゼ(DAO)の誘導は、メタノールやオレイン酸によるペルオキシソーム誘導と異なり、グルコース抑制を受けないことを示し、これが転写レベルでの調節によることを明らかにした。さらにDAO遺伝子破壊株を取得し、その生育特性から、DAOがD-アラニンを炭素源として利用するために必須であること、および、D-アラニンを窒素源として利用する場合には別種の酵素が機能することを明らかにした。これは真核生物において、遺伝子破壊株を用いてDAOの生理的意義を解明した最初の例である。
- 2) 5種類の遺伝子のプロモーターにおけるメタノール誘導性の強さを定量的に評価し、ジヒドロキシアセトンシンターゼ(DAS)の遺伝子プロモーターが最も強力であることを示した。一方、メタノール資化性酵母がメタノールに生育するとき、その代謝中間体で毒性の高いホルムアルデヒドの蓄積をいかにして回避するかは、微生物生理学上重要であり、また本酵母の工業利用の上でも明らかにすべき問題である。この点に関して本論文では、アルコールオキシダーゼ(AOD)よりも代謝上で下流の反応を触媒するDASがAODに先行して大量に誘導されること、および、AOD遺伝子プロモーターが、DASの触媒反応によって得られる同化代謝産物であるジヒドロキシアセトンやグリセルアルデヒドによって活性化されることを見出した。これは、代謝の初期酵素遺伝子の転写が、その下流の代謝と共役して調節されることを意味し、生理的にはAODによる反応で生じるホルムアルデヒドが急激に蓄積しないようにするための巧みな細胞機能として理解できる。酵母のメタノール代謝に初めて見出したこのような代謝調節機構を、「anabolite induction」として提唱した。
- 3) D-アミノ酸の定量や $\alpha$ -ケト酸の合成に利用されるDAO、および糖尿病臨床診断に有効な糖化アミノ酸オキシダーゼの遺伝子をAOD遺伝子プロモーター制御下で発現させ、*C. boidinii* AOD遺伝子破壊株のペルオキシソームに大量に蓄積させる系を確立するとともに、この発現系がペルオキシソームを蓄積の場とするオキシダーゼ大量生産系として広く有効であることを示した。

以上のように本論文は、メタノール資化性酵母におけるペルオキシソーム酵素の生理的役割を明らかにし、当該オルガネラへのタンパク質の局在化を利用した新しい異種遺伝子発現系を構築したもので、制御発酵学、応用微生物学、微生物生理学に貢献するところが大きい。

よって、本論文は博士(農学)の学位論文として価値あるものと認める。

なお、平成13年2月8日、論文並びにそれに関連した分野にわたり試問した結果、博士(農学)の学位を授与される学力が十分あるものと認めた。