

Title	Studies on two transcription factors responsible for methanol-inducible gene expression in the methylotrophic yeast <i>Candida boidinii</i> (Abstract_要旨)
Author(s)	Sasano, Yu
Citation	Kyoto University (京都大学)
Issue Date	2008-05-23
URL	http://hdl.handle.net/2433/123959
Right	
Type	Thesis or Dissertation
Textversion	none

(論文内容の要旨)

メチロトロフ酵母は、強力なメタノール誘導性プロモーターを有することから、これを用いた異種遺伝子発現によるタンパク質高生産の宿主として、実験室レベルから工業レベルまで広く利用されている。メタノール誘導性プロモーターのなかでも特に強力なアルコールオキシダーゼ (AOD) とジヒドロキシアセトンシンターゼ (DAS) の両遺伝子プロモーターは、メタノール培地において、メタノール特異的な誘導により最大の転写活性に達する。一方、両プロモーターともグルコース培地では転写が完全に抑制されているが、グルコース以外の炭素源 (グルコース脱抑制条件) では、*AOD1* プロモーターではグルコース脱抑制によって転写活性化が起こるのに対し、*DAS1* プロモーターではほとんど起こらない。本論文では、メチロトロフ酵母 *Candida boidinii* において、**gene-tagging** 変異法による変異誘起法を確立し、これを用いてメタノール特異的誘導とグルコース脱抑制を司る二つの転写因子を単離し、その機能解析を行った。その主な内容は以下の通りである。

- 1) *C. boidinii* のコドン頻度に最適化したゼオシン耐性遺伝子を含むベクター **pREMI-Zc** を構築した。**pREMI-Zc** をエレクトロポレーション法により *C. boidinii* 染色体上の非特異的部位に挿入する変異誘起法 (**gene-tagging** 変異法) を確立し、挿入破壊された遺伝子領域の回収に成功した。
- 2) *C. boidinii* の *AOD1*, *DAS1* プロモーター支配下に酸性フォスファターゼを発現する株を宿主として、1) で確立した **gene-tagging** 変異法を適用し、プロモーター活性が低下した多数の調節変異株を取得した。
- 3) 真菌類に特異的な $\text{Zn(II)}_2\text{Cys}_6$ タイプの Zn フィンガータンパク質をコードしている *TRM1* 遺伝子の破壊株を作製し、様々な炭素源での生育を測定したところ、メタノール培地でのみ生育不能であった。また、*TRM1* 遺伝子破壊株での各種メタノール誘導性プロモーターの転写活性を、酸性フォスファターゼをレポーター遺伝子として定量的に測定した。その結果、メタノール誘導条件において、測定した5種のメタノール誘導性プロモーターの転写活性が 10% 以下に低下していた。これより、*TRM1* 遺伝子産物 **Tm1p** は複数のメタノール誘導性プロモーターの転写活性化に必要であることを明らかにした。
- 4) **Tm1p** の N 末端に蛍光タンパク質 **YFP** を融合させた **YFP-Tm1p** を *TRM1* プロモーター支配下で発現させた。そのウェスタン解析及び蛍光顕微鏡による観察から、

Trm1p は構成的に発現しており、常に核に局在していることを明らかにした。また、クロマチン免疫沈降法により、**Trm1p** が、メタノール培養時には各種メタノール誘導性プロモーターに結合しているが、グルコース培養時には結合していないことを示した。

- 5) **Trm1p** の機能領域と推定される 7 つの領域をそれぞれ欠失させた変異型 **Trm1p** を作製し、これを *TRM1* 遺伝子破壊株で発現させて、それぞれの変異体の表現型を解析した。その結果、**Trm1p** のプロモーターへの結合は **Zn cluster** と N 末端から二番目の **coiled-coil** 領域に依存していること、**acidic region** が転写活性化に関与していることを示した。
- 6) メタノール特異的な誘導により主な制御を受けている *DASI* プロモーターの上流または内部を欠損させた、種々の変異プロモーターの転写活性を測定し、2 つのメタノール応答配列 (**MRE1, MRE2**) を決定した。**MRE1** に依存したメタノール誘導が *TRM1* 遺伝子破壊株では起こらなかったことから、**Trm1p** は **MRE1** を介したメタノール誘導に必要であることを明らかにした。
- 7) **C₂H₂** タイプの **Zn** フィンガータンパク質をコードしている *TRM2* 遺伝子を同定し、その遺伝子破壊株の表現型を解析した。その結果、*TRM2* 遺伝子産物 **Trm2p** はメタノールのみならず、グリセロール、オレイン酸などの非発酵性炭素源での生育に必要であること、グルコース脱抑制条件でのメタノール誘導性プロモーターの転写活性化に必要であることを明らかにした。
- 8) *TRM2* 遺伝子破壊株においてはペルオキシソーム移行シグナルを付加した **YFP** タンパク質によりペルオキシソームが観察されなかったことから、**Trm2p** はペルオキシソームへのタンパク質輸送にも関与していることを示した。
- 9) **Trm2p** の C 末端に **YFP** を融合した **Trm2p-YFP** を *TRM2* プロモーター支配下で発現させた。蛍光顕微鏡による観察から、**Trm2p** は構成的に発現しており、グルコース培地では細胞質に局在し、グルコース脱抑制条件では核へ局在することを示した。また、クロマチン免疫沈降法により、グルコース脱抑制条件で **Trm2p** がメタノール誘導性プロモーターに結合していることも示した。
- 10) **Trm1p** と **Trm2p** の相互関係を調べるため、両遺伝子の二重破壊株を作製し、*AOD1* プロモーターのメタノール誘導条件での転写活性を測定した。その結果から、**Trm1p** によって制御されるメタノール特異的な誘導が引き起こされるためには、**Trm2p** によって制御されるグルコース脱抑制が必要であることを明らかにした。

(論文審査の結果の要旨)

異種遺伝子発現によるタンパク質高生産の宿主として、メタノールを単一の炭素源として資化することのできるメチロトロフ酵母が、実験室レベルから工業レベルまで、広く利用されている。その異種遺伝子発現に用いられているメタノール誘導性プロモーターは、グルコース培地では転写が完全に抑制されているが、メタノール培地において最大の転写活性に達する。一方、グルコース以外の炭素源（グルコース脱抑制条件）では、アルコールオキシダーゼ (AOD) プロモーターはグルコース脱抑制によって転写活性化が起こるのに対し、ジヒドロキシアセトンシンターゼ (DAS) プロモーターはほとんど脱抑制されない。このようなメタノール誘導性でプロモーターの特性は、タンパク質生産菌株の育種や培養法の確立のために、多くの情報と知見を与えるが、メタノール誘導性遺伝子発現調節の分子機構については明らかにされていなかった。本論文では、メチロトロフ酵母 *Candida boidinii* において、gene-tagging 変異法による変異誘起法を初めて確立し、これを用いてメタノール特異的誘導とグルコース脱抑制を司る二つの転写因子を新たに単離し、それぞれのメタノール誘導性遺伝子発現における役割を明らかにした。評価すべき点は以下の6点である。

- 1) ゼオシン耐性遺伝子を *C. boidinii* のコドン頻度に最適化した pREMI-Zc ベクターを構築し、形質転換法の最適化により、*C. boidinii* において初めて gene-tagging 変異法を用いたランダムな変異導入法と変異遺伝子の回収法を確立した。
- 2) 1) で確立した gene-tagging 変異法を用い、メタノール誘導性遺伝子の発現に必要な分子として、真菌類に特異的な $Zn(II)_2Cys_6$ タイプの Zn フィンガータンパク質 Trm1p と C_2H_2 タイプの Zn フィンガータンパク質 Trm2p を同定した。Trm1p 及び Trm1p は少なくとも5種のメタノール誘導性遺伝子を制御する主要な転写活性化因子であることを示した。
- 3) メタノール特異的な誘導により主な制御を受けている *DASI* プロモーター上に、2

つのメタノール応答配列 (MRE1, MRE2) を決定した。MRE1 に依存したメタノール誘導が *TRM1* 遺伝子破壊株では起こらなかったことから、Tm1p は MRE1 に依存したメタノール特異的な誘導に必要な転写因子であることを明らかにした。

- 4) Tm2p はメタノールのみならず、グリセロール、オレイン酸などの非発酵性炭素源での生育に必要で、グルコース脱抑制を制御する転写因子であることを明らかにした。またペルオキシソームへのタンパク質輸送にも関与していることを示した。
- 5) Tm2p は構成的に発現しており、グルコース培地では細胞質に局在し、グルコース脱抑制条件では核へ局在することを示した。また、グルコース脱抑制条件で Tm2p がメタノール誘導性プロモーターに結合していることを明らかにした。
- 6) Tm1p によって制御されるメタノール特異的な誘導が引き起こされるためには、Tm2p によって制御されるグルコース脱抑制が必要であることを示した。

以上のように、本論文は、メチロトロフ酵母 *C. boidinii* において、新たに変異誘起法を確立し、これを用いてメタノール誘導性遺伝子の発現調節に関わる 2 つの転写因子 Tm1p と Tm2p を同定した。さらに、これらのメタノール特異的誘導及びグルコース脱抑制における分子レベルでの役割を初めて明らかにし、メタノール誘導性遺伝子発現分子機構の解明に重要な知見を提供したもので、制御発酵学、応用微生物学、分子生物学などの分野に大きく寄与するものである。

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 20 年 4 月 16 日、論文なら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。