

氏名	なか がわ とも ゆき 中 川 智 行
学位(専攻分野)	博 士 (農 学)
学位記番号	農 博 第 1045 号
学位授与の日付	平成 11 年 3 月 23 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当
研究科・専攻	農学研究科農芸化学専攻
学位論文題目	Peroxisomal transport and expression of dihydroxyacetone synthase and alcohol oxidase in the methylotrophic yeast (メチロトロフ酵母におけるジヒドロキシアセトンシンターゼとアルコールオキシターゼのペルオキシソーム輸送機構と活性発現)
	(主査)
論文調査委員	教授 加藤暢夫 教授 清水 昌 教授 熊谷英彦

論 文 内 容 の 要 旨

メタノールを唯一の炭素源として増殖するメチロトロフ酵母のユニークな代謝系は、有用物質生産への利用の観点から高い関心が寄せられてきた。この酵母におけるメタノール代謝で最も特徴的な点は、アルコールオキシダーゼ (AOD) によるメタノールのホルムアルデヒドへの酸化とジヒドロキシアセトンシンターゼ (DHAS) によるホルムアルデヒドの固定であり、両酵素は細胞内小器官であるペルオキシソームに局在する。メチロトロフ酵母では、ペルオキシソームが高度に発達し、そのマトリックスの大部分がAODとDHASによって占められている。この強力なタンパク質の発現誘導とペルオキシソームへの局在化から、メチロトロフ酵母は、異種遺伝子発現系の宿主として、また、真核細胞におけるタンパク質輸送のモデル生物として注目されている。本研究では、AODとDHASの活性発現の調節と、それらのペルオキシソームへの輸送の機構を、生化学的、分子生物学的手法を駆使して明らかにし、物質生産への利用の新たな可能性をも示したもので、その結果は以下のように要約できる。

1) メチロトロフ酵母のうち、*Pichia methanolica* を含むグループのものに、AODが9種のアイソザイムとして存在することを見出し、そのアイソザイムの形成機構と生理的意義について検討した。その結果、*P. methanolia* には2つの異なるAOD遺伝子、*MOD 1*と*MOD 2*が存在し、発現した2種のサブユニットが8量体のサブユニットオリゴマーを形成することによってこの多形性が生じることを、*in vivo*および*in vitro*の系で明らかにした。また、両遺伝子の発現誘導や、両遺伝子を*Candida boidinii* AOD 1 遺伝子破壊株で発現させて得た精製酵素の性質から、*MOD 2*が高濃度の、*MOD 1*が低濃度のメタノールにそれぞれ対応して発現し、その結果として生じるアイソザイムによってメタノール酸化が効率よく起こることを明確にした。

2) DHASがメタノール生育時に強力に誘導されることに着目し、*C. boidinii* のDHAS遺伝子 (*DAS 1*) をクローニングしてその発現が転写レベルで制御されることを認め、*DAS 1* プロモーターの機能を明らかにした。また、*DAS 1* および *AOD 1* 遺伝子破壊株の増殖特性を基に、DHASがホルムアルデヒドの毒性回避ではなく、その資化に必須の役割をもつことを明確にするともに、*AOD 1* 遺伝子破壊株を宿主とし、*DAS 1* プロモーターを用いる発現系が異種タンパク質をペルオキシソームに蓄積させるための新しい生産系として有効であることを示した。

3) AODおよびDHASなどのペルオキシソーム・ターゲティング・シグナル1 (PTS 1) を認識するレセプターの遺伝子 (*PEX 5*) を *C. boidinii* よりクローニングして *PEX 5* 遺伝子破壊株を構築し、さらに green fluorescent protein をレポータータンパク質として発現タンパク質の局在化を調べることによって、このレセプターがPTS 1をもつタンパク質のペルオキシソームへの輸送に特異的に機能すること、さらに、two-hybrid法を適用して、レセプタータンパク質の一次構造上に、PTS 1 を認識する部位に加えてペルオキシソームへの輸送に関わる新しい機能領域が存在することを見出した。

4) DHASの活性発現に関与するペルオキシソーム膜タンパク質であるPmp47の機能について、その遺伝子破壊株を調製して調べ、中鎖脂肪酸代謝がペルオキシソーム内で起こること、その代謝に関与するアシルCoAシンテターゼ反応に必要なATPのペルオキシソーム内への取り込みにPmp47が必須の役割を演じることを実証した。

論文審査の結果の要旨

メチロトロフ酵母は、そのユニークな代謝系に加えて、強力なプロモーターをもつ遺伝子が存在すること、細胞内小器官であるペルオキシソームが高度に発達することなどの特徴を有することから、微生物生産の領域で高い関心が寄せられ、また、ペルオキシソームの機能解析のためのモデル生物としても注目されており、タンパク質の誘導とタンパク質輸送の機構解明に大きな期待が寄せられてきた。本研究では、メタノール代謝の鍵酵素であり、ペルオキシソームマトリックスの主要なタンパク質である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テターゼ (DHAS) の活性発現調節とペルオキシソームへのタンパク質輸送を分子レベルで明らかにして、新たな異種遺伝子発現系を構築するための基盤的知見を提供したものであり、評価すべき点は以下の4点である。

1) *Pichia methanolica* に9種のAODアイソザイムが存在することを見出し、2つの異なるAOD遺伝子、*MOD 1*および*MOD 2*をクローニングした。炭素源によるAODのアイソザイム形成パターンの変化や、*MOD 1*および*MOD 2*を*Candida boidinii* AOD 1遺伝子破壊株を用いてそれぞれ単独に発現させて得た精製酵素標品の性質などから、このアイソザイムが、両遺伝子の発現産物をサブユニットとする8量体のサブユニットオリゴマーとして形成されること、および、このAODの多形性によって、メタノール酸化がその濃度に対応してより効率的に起こることを明確にした。

2) *C. boidinii* によりDHAS遺伝子 (*DAS 1*) をクローニングし、その発現が転写レベルで制御され、DHASがホルムアルデヒドの資化に必須な役割を有することを認めた。さらに、*DAS 1* プロモーターは強力で、異種遺伝子発現系を構築するために有用であること、その場合、*AOD 1* 遺伝子破壊株を宿主とする系がペルオキシソームへの異種タンパク質蓄積に有効であることを示した。

3) AODやDHASなどのペルオキシソーム・ターゲッティング・シグナル1 (PTS 1) をもつタンパク質のレセプター遺伝子、*PEX 5*を*C. boidinii* よりクローニングし、このレセプターがPTS 1タンパク質のペルオキシソームへの輸送に特異的に作用すること、および、レセプターの一次構造上に、PTS 1に対する結合部位に加えて新たな機能領域が存在することを見出した。

4) DHASのペルオキシソームでの活性発現に必須なペルオキシソーム膜タンパク質であるPmp47に、中鎖脂肪酸代謝に関与するアシルCoAシンテターゼ反応に必要なATPのトランスポーターとしての役割があることを明らかにした。

以上のように本論文は、メチロトロフ酵母におけるペルオキシソーム酵素の細胞内での機能と各遺伝子の発現調節特性を明らかにし、新しい異種タンパク質大量調製法の可能性をも示したもので、制御発酵学、応用微生物学、細胞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11年2月12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。