

氏名	金井保
学位(専攻分野)	博士(工学)
学位記番号	工博第1847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	工学研究科合成・生物化学専攻
学位論文題目	STUDIES ON ISOCITRATE LYASE GENE PROMOTER OF <i>CANDIDA TROPICALIS</i> : ITS REGULATION AND APPLICATION TO HETEROLOGOUS GENE EXPRESSION (酵母 <i>Candida tropicalis</i> のイソクエン酸リアーゼ遺伝子プロモーターの転写制御機構に関する基礎的研究, およびその外来遺伝子発現系への応用に関する研究) (主査)
論文調査委員	教授 田中渥夫 教授 砂本順三 教授 今中忠行

論文内容の要旨

酵母は外来遺伝子の発現に広く用いられるホストである一方、真核生物のモデル細胞としても位置づけられ、盛んに研究が行われている。酵母 *Candida tropicalis* のイソクエン酸リアーゼ (ICL) 遺伝子をそのプロモーター領域 (*UPR-ICL*) と共にパン酵母 *Saccharomyces cerevisiae* に導入すると、炭素源に応じた ICL 活性の上昇が起きることから、両酵母間で ICL 遺伝子の転写活性化機構において共通のメカニズムが存在する事が示唆される。本研究はこの *UPR-ICL* に注目して、その転写制御機構の解明とその外来遺伝子発現への応用の可能性についての研究を行ったものであり、緒論、結論および本論 2 編 5 章より成っている。

第 1 編は、*S. cerevisiae* をホストとして用いた *UPR-ICL* の外来遺伝子発現系への応用に関する報告である。第 1 章では、*UPR-ICL* を用いた *S. cerevisiae* 内における新規な外来遺伝子発現系の構築とその評価を行った。大腸菌の β -ガラクトシダーゼ遺伝子を用いて *UPR-ICL* のプロモーター活性の評価を行った結果、 β -ガラクトシダーゼの比活性は、酢酸を唯一の炭素源として培養した場合にグルコースの場合と比較して約 300 倍に誘導された。またその際の組換えタンパクは総可溶性タンパク中の約 6% を占めたことから、*UPR-ICL* は *S. cerevisiae* 内で機能する強力な誘導発現型のプロモーターであると判断した。また発現ベクターの構築に要する作業を簡便にする目的で、発現カセットベクター pWI3 の構築を行った。これを用いてラットのグルタミン酸脱炭酸酵素遺伝子の誘導発現にも成功した。第 2 章では、ヒトヒスチジン脱炭酸酵素 (HDC) の発現を行った。発現ベクターを導入した組換え株において HDC は可溶性画分に活性体で発現され、その比活性は対数増殖後期に最大となった。第 3 章では、シクロフラクタン合成酵素 (CFTase) の *S. cerevisiae* における分泌生産を行った。CFTase はイヌリンに作用して環状のシクロフラクタンを産生する酵素である。CFTase 発現ベクターを組み込んだ酵母の培養上清に酵素活性を確認したので、培養上清からの組換え型 CFTase (ScCFTase) の精製を行った。精製した ScCFTase は真核細胞特有の糖鎖の付加によりその熱安定性が天然型の酵素に比べ大きく向上していた。また CFTase 遺伝子を酵母の染色体に組み込み、ScCFTase を安定に発現させる系を確立した。

第 2 編は、*UPR-ICL* の転写制御機構に関与する制御因子についての基礎的解析に関する報告である。第 1 章では、*S. cerevisiae* において *UPR-ICL* の転写活性化に関与する新たな因子の同定を行った。*UPR-ICL* による転写の活性化が起きない *S. cerevisiae* の変異株を用い、変異を相補する遺伝子 *FIL1* (Factor of Isocitrate Lyase Expression) を同定した。*Fil1* タンパクは原核生物の Ribosome Recycling Factor とのホモロジーを有し、ミトコンドリアへの輸送シグナルを持っていた。*FIL1* 破壊株を用いた解析から、*Fil1* タンパクはミトコンドリア内に局在し、ミトコンドリア内のタンパク合成に関与

していることが示唆された。また ρ^0 株およびグロラムフェニコールやアンチマイシンAを作用させた株における解析の結果から、*S.cerevisiae*においてUPR-ICLを含む糖新生過程に必要な酵素遺伝子群の転写活性化において、呼吸鎖の働きが必須であることを明らかにした。第2章では、*C.tropicalis*内におけるICL遺伝子の転写活性化機構を調べるため、*C.tropicalis*のSNF1遺伝子の単離を行った。*S.cerevisiae*のSnf1タンパクはセリン・スレオニン型タンパクキナーゼであり、ICLを含むグルコース抑制により制御を受ける遺伝子群のグルコース非存在下における抑制解除に中心的な役割を果たしている。*C.tropicalis*のICLはn-アルカンにおいてその転写が誘導される一方、グルコースにおいてその転写は抑制されるというグルコース抑制型の調節を受ける。そこで本酵母のICLの誘導過程におけるSnf1タンパクの関与を調べるため、*C.tropicalis*のSNF1ホモログ(*CtSNF1*)の単離を行った。単離した*CtSNF1*は*S.cerevisiae*のSNF1破壊株を相補することが可能であった。*CtSNF1*の片方の遺伝子を破壊した株はn-アルカン培養時において、野性株と比較して7割程度の生育の低下とそれに呼応したカタラーゼおよびアシルCoAオキシダーゼなどの酵素活性の低下が観察された一方で、ICL活性の変化は見られなかった。また*CtSNF1*は炭素源に関わらず菌体の生育に必須の遺伝子であることを明らかにした。

論文審査の結果の要旨

本論文は、炭化水素資化性酵母*Candida tropicalis*のイソクエン酸リアーゼ(ICL)遺伝子のプロモーター領域(UPR-ICL)に関する研究をまとめたものであり、得られた主な成果は以下の通りである。

1. UPR-ICLがパン酵母*Saccharomyces cerevisiae*において機能する強力な誘導型プロモーターであることを明らかにした。またUPR-ICLを用いてラット由来グルタミン酸脱炭酸酵素およびヒト由来ヒスチジン脱炭酸酵素の活性型での発現に成功した。

2. UPR-ICLを用いてシクロフラクタン合成酵素の分泌発現に成功した。また得られた組換え酵素が、糖鎖の付加によりその熱安定性が大きく向上していることを明らかにした。

3. *S.cerevisiae*内においてUPR-ICLの転写活性化に関与する新規な制御因子FIL1の単離と特性解析を行い、Fil1タンパクがミトコンドリア内のタンパク合成に関与することを示した。また*S.cerevisiae*内において、糖新生過程に必要な酵素遺伝子群の転写活性化において呼吸鎖の働きが必須であることも明らかにした。

4. *C.tropicalis*内におけるICLの誘導過程を調べるため、SNF1ホモログ(*CtSNF1*)の単離を行った。*CtSNF1*の片方の遺伝子を破壊した株はn-アルカン培養時において、生育の低下とそれに呼応したカタラーゼおよびアシルCoAオキシダーゼなどの活性の低下が観察された一方、ICL活性の変化は見られなかった。また*CtSNF1*は炭素源に関わらず菌体の生育に必須の遺伝子であることを明らかにした。

以上のように、本論文は酵母の強力な誘導型プロモーターであるイソクエン酸リアーゼ遺伝子のプロモーターに関する基礎および応用研究をまとめたものであり、学術上、実際上寄与するところが少なくない。よって本論文は博士(工学)の学位論文として価値あるものと認める。また、平成11年2月19日、論文内容とそれに関連する事項について試問を行った結果、合格と認めた。