

氏 名	こめ だ とし ひろ 米 田 俊 浩
学位(専攻分野)	博 士 (農 学)
学 位 記 番 号	論 農 博 第 2536 号
学位授与の日付	平 成 16 年 7 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	Molecular basis of formate-induced gene expression and establishment of heterologous protein production in the methylotrophic yeast (ギ酸誘導性遺伝子発現機構の解明とメタノール資化性酵母異種タンパク質生産系の確立)
論文調査委員	(主 査) 教 授 加 藤 暢 夫 教 授 清 水 昌 教 授 喜 多 恵 子

論 文 内 容 の 要 旨

メタノール資化性酵母は、メタノールを炭素源として培養したときに、その代謝に関連するアルコールオキシダーゼ、ジヒドロキシアセトンシンターゼ、ギ酸デヒドロゲナーゼなどを顕著に誘導することから、これらに相当する遺伝子プロモーターを用いた異種遺伝子発現系が構築され有用タンパク質の生産に利用されてきた。これらの中で、ギ酸デヒドロゲナーゼ遺伝子 (*FDH1*) のプロモーターは他の遺伝子プロモーターと同様にメタノールを含む培地で最も高い転写活性を示すが、*FDH1* プロモーターのギ酸による転写誘導はグルコースによるカタボライト抑制を受けない点で他のプロモーターと異なっている。従って、このプロモーターを用いる異種遺伝子発現系は、グルコースによって高い菌体濃度を維持しながら遺伝子発現誘導することが可能であり、有用タンパク質の大量生産に適している。本論文では、メタノール資化性酵母 *Candida boidinii* の *FDH1* プロモーター領域を解析してそのギ酸による転写誘導機構を解明するとともに、宿主株の分子育種系に検討を加え、他の遺伝子発現系では困難であったウシ・カテプシン C の大量生産を可能にした。得られた結果は以下のように要約できる。

1) *C. boidinii* の *FDH1* プロモーター領域に対して様々な欠失変異体を作成し、*Saccharomyces cerevisiae* 酸性ホスファターゼをコードする *PHO5* 遺伝子をレポーターとして、プロモーター領域内の転写活性化に関与する配列を調べた結果、このプロモーター領域内には、メタノール誘導に必須な配列 UAS-M とギ酸およびメタノール誘導に必須な配列 UAS-FM との2つの転写活性化領域があることを見出した。40 bp の UAS-FM を *FDH1* プロモーター領域に新たに4コピー付加することにより、ギ酸およびメタノール誘導時の *FDH1* プロモーター転写活性が最大となることを認めた。さらに UAS-FM を構成的なアクチン遺伝子 (*ACT1*) プロモーターに付加することによってメタノールおよびギ酸誘導による転写活性化が起こることを認め、UAS-FM がギ酸誘導に必要な十分なシス因子であることを示した。また、元株とアルコールオキシダーゼ遺伝子破壊株を宿主として用いた *FADH1* 遺伝子誘導を比較することによって、元株のメタノールによる *FDH1* 遺伝子発現は、最初に UAS-M でメタノールによって誘導され、次いで UAS-FM でメタノールとギ酸とによって誘導されることを明確にした。

2) *C. boidinii* の分子育種のための栄養要求相補性遺伝子としてホスホリボシルアミノイミダゾールカルボキシラーゼ遺伝子 (*ADE2*)、構成発現遺伝子として3-ホスホグリセリン酸キナーゼ遺伝子 (*PGK*) および *ACT1* をクローニングした。*ADE2* 遺伝子破壊株が赤色コロニーとして判別できることから、該当遺伝子は有用な形質転換選抜マーカー遺伝子になることを認めた。*PGK* プロモーター、*ACT1* プロモーターはともに構成的発現が認められ、優性マーカー遺伝子作製に有用であることを明らかにした。

3) 宿主株のタンパク質分解活性を抑制することは異種タンパク質生産の収率を向上させる上で有効である。そこで、*C. boidinii* より液胞のプロテイナーゼ A およびプロテイナーゼ B をそれぞれコードする *PEP4*、*PRB1* をクローニングした。*PEP4*、*PRB1* 遺伝子破壊株では、プロテイナーゼ A とプロテイナーゼ B の不活化、およびカルボキシペプチダーゼ活性の抑制が確認された。このことは、プロテイナーゼ A および B は、液胞プロテアーゼの成熟化に関与することを示してお

り、両遺伝子の破壊株が異種タンパク質生産に有用であることが明らかになった。

4) ウシ・リソソームに存在するシステインプロテアーゼであるカテプシン C はタンパク質のアミノ酸配列の決定や融合タンパク質のプロセッシングに利用される。この遺伝子を大腸菌で発現させたところ、発現産物は封入体を形成し、しかも 2 つのペプチド断片に分断され、活性型酵素を得るに至らなかった。そこで、*C. boidinii* を宿主とし、カテプシン C 遺伝子を *FDH1* プロモーター制御下で発現誘導させたところ、活性型カテプシン C の菌体外への蓄積が確認できた。さらに、プロテアーゼ欠損株の使用、カテプシン C の発現誘導温度の最適化、培養条件の検討により生産性が向上し、90 時間の培養で、12 mg/l の高生産が達成できた。

論文審査の結果の要旨

メタノール資化性酵母の C_1 化合物代謝経路は酵素と遺伝子のレベルで詳細に調べられており、細胞構造との関連も明らかにされている。当該酵母をメタノールで培養するとその代謝に関与する酵素が強力に誘導されることが知られており、アルコールオキシダーゼ遺伝子プロモーターを利用した異種遺伝子発現系は実用に供されている。一方、ギ酸デヒドロゲナーゼ遺伝子 (*FDH1*) プロモーターは、アルコールオキシダーゼ遺伝子プロモーターと異なり、ギ酸によっても転写誘導され、しかもカタボライト抑制を受けないという工業上有利な性質を有するが、これを異種タンパク質生産系に応用するために必要なギ酸による発現誘導機構の詳細は不明であった。本論文では、*FDH1* プロモーター領域を詳細に解析するとともに宿主酵母の育種を行い、メタノール資化性酵母による新しい異種遺伝子発現系を構築し、それまで大量生産が不可能であった有用プロテアーゼの大量生産に成功した研究成果がまとめられている。評価すべき点は以下の 4 点である。

1) *Candida boidinii* の *FDH1* プロモーター領域内に、メタノール誘導に必須な配列 UAS-M とギ酸およびメタノール誘導に必須な配列 UAS-FM との 2 つの転写活性化領域を見出した。40 bp の UAS-FM の 4 コピーを *FDH1* プロモーターに付加することにより、ギ酸およびメタノール誘導時の転写活性が最高となることを認めている。一方、構成的に発現するアクチン遺伝子 (*ACT1*) プロモーターに付加することによってもメタノールおよびギ酸誘導による転写活性化が認められたことから、UAS-FM はギ酸誘導に必要な十分なシス因子であることを示した。さらに、アルコールオキシダーゼ遺伝子破壊株を用いた解析から、元の宿主株では、UAS-M および UAS-FM が協調して働く *FDH1* プロモーター転写機構を明らかにしている。これはメタノール資化性酵母のギ酸による遺伝子発現誘導機構を実証した初めての結果である。

2) *C. boidinii* 分子育種における栄養要求相補性形質転換株選抜マーカー遺伝子としてのホスホリボシルアミノイミダゾールカルボキシラーゼ遺伝子、および構成発現遺伝子としての 3-ホスホグリセリン酸キナーゼ遺伝子と *ACT1* をクローニングし、それぞれが、胞子形成能を有さない *C. boidinii* の分子育種ツールとして有効であることを示している。

3) 液胞のプロテイナーゼ A、プロテイナーゼ B をコードする *PEP4*、*PRB1* 遺伝子をクローニングして *PEP4*、*PRB1* 遺伝子破壊株を作製し、タンパク質分解活性が抑制された宿主株の構築に成功した。

4) 大腸菌遺伝子発現系ではウシ・カテプシン C を活性型タンパク質を生産することができなかったが、*FDH1* プロモーターを利用する *C. boidinii* 形質転換系によって、これを活性型成熟タンパク質として分泌生産させることに初めて成功した。さらに、プロテアーゼ遺伝子破壊株を宿主とし、培養温度を宿主株の生育至適温度より低い 20°C に保つことなどによりカテプシン C の生産性を向上させることができた。これは、タンパク質分析や有用タンパク質生産に有効な当該酵素の大量生産をメタノール資化性酵母の異種遺伝子発現系を用いることによって初めて可能にしたものである。

以上のように本論文は、メタノール資化性酵母のユニークな遺伝子プロモーターを精査するとともに宿主株の育種を行い、工業レベルで使用可能な異種タンパク質生産系を構築し、それを用いて有用タンパク質の高生産に成功したもので、制御発酵学、応用微生物学、微生物遺伝子工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16年6月17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。