

論文内容の要旨

応用生命工学専攻
平成 11 年度博士課程進学
氏 名 高久 洋暁
指導教官 太田 明徳

論文題目

酵母 *Candida maltosa* のシクロヘキシミド耐性を誘導する分子機構に関する研究

動植物の細胞や多くの真菌などほとんどの真核生物細胞は蛋白質合成阻害剤であるシクロヘキシミド(CYH)に感受性であるが、ある種の真菌だけは CYH に耐性である。この性質は酵母の分類学上では重要な指標となりうる。我々は、酵母 *Candida maltosa* が CYH 耐性であり、その耐性は CYH により誘導されるいわゆる誘導的耐性であることを見出した。*C. maltosa* には二種類の L41 リボソーム蛋白質をコードする遺伝子があり、一つは 56 番目のアミノ酸残基がプロリンである *L41-P* 遺伝子で、構成的に発現し、これの遺伝子がコードする L41-P を構成成分とするリボソームは CYH 感受性を示す。もう一つは 56 番目のアミノ酸残基がグルタミンである *L41-Q* 遺伝子で、CYH 存在下で誘導的に発現し、この遺伝子がコードする L41-Q を構成成分とするリボソームは CYH 耐性を示す。*C. maltosa* は、CYH 添加後、後者の *L41-Q* 遺伝子の発現を誘導し、CYH 耐性リボソームを合成することにより CYH 耐性化することが明らかになっている。*L41-Q* 遺伝子のプロモーター領域には、CYH 存在下、或いはアミノ酸飢餓などの蛋白質合成が抑えられた時に発現が誘導されるのに必要な配列が同定されており、そこには *Saccharomyces cerevisiae* などアミノ酸飢餓時に働く Gcn4p responsive element と類似の配列が含まれている。一般にリボソーム蛋白質をコードする遺伝子の発現量は細胞の成長速度に比例しており、蛋白質合成阻害条件下ではその発現は抑制されるが、逆に *L41-Q* 遺伝子の発現は誘導された。このような発現誘導はリボソーム蛋白質をコードする遺伝子としては初めての例である。

本研究では、*C. maltosa* における *LAI-Q* 遺伝子の発現制御機構及び、CYH 添加後に起こるリボソームの CYH 耐性化の機構の解明を目的とした。

1. *LAI-Q* 遺伝子の転写制御因子 C-Gcn4p

LAI-Q 遺伝子のプロモーター領域の解析により *C. maltosa* Gcn4p ホモログが CYH 存在下における *LAI-Q* 遺伝子の発現誘導に関与することが予想された。*GCN4* 遺伝子は酵母から哺乳動物まで広く保存されている転写因子であり、アミノ酸合成の普遍的制御に関与している。そこで本研究では、まず *GCN4* 遺伝子の *C. maltosa* ホモログを取得し、全塩基配列を決定し、*C-GCN4* と命名した。大腸菌内で GST との融合蛋白質として発現、精製した C-Gcn4p を用い、この蛋白質が *LAI-Q* 遺伝子プロモーター中の CYH 存在下での発現誘導に関わるエレメントに直接結合することを示した。また *C-GCN4* 遺伝子破壊株を作製したところ、この株は CYH 感受性を示し、CYH 添加後 *LAI-Q* 遺伝子の発現が誘導されなかった。これらのことより C-Gcn4p は *LAI-Q* 遺伝子の転写制御因子であることが示された。さらに *C-GCN4* 遺伝子破壊株は、ヒスチジン合成系の遺伝子の一つである *C-HIS5* 遺伝子の 3-aminotriazole (3-AT) 添加によるヒスチジン飢餓条件下における転写をも誘導できないことから *C. maltosa* におけるアミノ酸の普遍的制御機構に必要であることも示唆された。*C-GCN4* 遺伝子の転写について検討したところ、CYH あるいは 3-AT 添加において転写の誘導が見られたことから、*C-GCN4* 遺伝子は転写レベルにおいて制御されていることが示された。しかしながら、Gcn4p の生産は *GCN4* mRNA の Gcn4p をコードする ORF の 5' 上流領域に存在する 4 つの miniORF (uORF) を介して翻訳レベルで制御されていることが知られている。*C-GCN4* mRNA の 5' 領域にも 3 つの uORF が存在していることから翻訳レベルにおける制御の存在も推定された。そこでこれら 3 つの uORF の開始コドン塩基置換により破壊し、その効果をレポーター遺伝子を用いて解析したところ、C-Gcn4p の生産が非ストレス条件下においてこれら 3 つの uORF により抑制されているが、CYH 添加またはヒスチジン飢餓による誘導でその翻訳が誘導されることが分かった。そしてその制御機構は *C. maltosa* におけるアミノ酸合成の普遍的制御と CYH 耐性化の両方に関与することが明らかとなった。この研究より得られた 3 つの uORF に塩基置換を入れた変異型 *C-GCN4* 遺伝子による Gcn4p の生産についてレポーターを用いて検討したところ、非ストレス条件下において野生型の 100 倍高い発現量を示した。このことより、この系は *Candida* 属酵母において前例のない有用な遺伝子発現系として利用できる可能性があると考えられる。

2. *C-GCN4* 遺伝子の制御因子 C-Gcn2p

酵母 *S. cerevisiae* において Gcn2p 活性が細胞内の蛋白質合成を調節し、その結果として *GCN4* 遺伝子の発現が制御されている。*C-GCN4* 遺伝子の発現も *GCN4* 遺伝子と同様なストレスで誘

導されることから *C-GCN4* 遺伝子の発現制御にも *C. maltosa* の *GCN2* ホモログの関与が考えられた。そこで *C. maltosa* における *GCN2* ホモログをクローニングし、全塩基配列を決定し、*C-GCN2* と命名した。*C. maltosa* にはこの遺伝子以外に *GCN2* ホモログが存在しないことはサザン解析の結果により推定された。そして *C-GCN2* 遺伝子破壊株を作製し、その *CYH* あるいは *3-AT* に対する感受性を調べた結果、*C-GCN2* 遺伝子破壊株は *3-AT* に感受性を示したが、*CYH* に対して野生株同様誘導的耐性を示した。また、*C-GCN2* 遺伝子破壊株における *CYH* 添加後の *C-GCN4*, *C-HIS5*, *L41-Q* 遺伝子の転写の誘導レベルは野生株と変わらなかったことに比べ、*3-AT* 添加後の *C-GCN4*, *C-HIS5*, *L41-Q* 遺伝子の転写の誘導レベルは野生株に比べ減少していた。*C-GCN4* 遺伝子は翻訳レベルにおいてもその発現が制御されているためレポーター遺伝子を用いて解析を行った結果、*3-AT* 添加後の *C-GCN4* 遺伝子の翻訳レベルは *C-GCN2* 遺伝子破壊株においてのみ上昇が見られなかった。以上のことから、*CYH* 耐性化とアミノ酸の普遍的制御は共に *C-Gcn4p* 依存的であるが、その上流は別々の経路が働いていることが示唆された。すなわち、*CYH* 耐性化には *C-Gcn2p* 非依存的な経路が働いていると考えられる。

3. 新規リボソーム会合蛋白質 Ray38p

CYH 添加時のリボソームの構成成分の変化を検討する過程で、*CYH* 添加により *C. maltosa* 野生株のリボソーム画分から消失し、*L41-Q* リボソーム蛋白質の誘導的合成による *CYH* 耐性化に伴って再び現れる 38kDa の蛋白質を二次元電気泳動(RFHR-PAGE)により見いだした。この蛋白質の消失は、*de novo* の蛋白質合成を必要とせず、温度依存的なリボソームからの脱離反応によるものであり、38kDa の蛋白質の *CYH* 添加による脱離反応は、*CYH* 感受性である *L41-P* を構成成分とするリボソームにおいては見られたが、*CYH* 耐性である *L41-Q* を構成成分とするリボソームにおいては見られなかった。また、この 38kDa の蛋白質のリボソームからの脱離は、*CYH* 添加後だけでなく、*C. maltosa* において *CYH* 添加以外の *CYH* 耐性 *L41-Q* 遺伝子の誘導条件であるグルタルイミド系抗生物質アニソマイシン添加、栄養源変化においても見られたことから、*L41* リボソーム蛋白質と 38kDa の蛋白質の機能的関連が示唆された。この 38kDa の蛋白質をコードする遺伝子とその部分アミノ酸配列を利用してクローニングし、*RAY38* (Ribosome-associated protein of yeast) と命名した。この遺伝子の構造からこの遺伝子がコードする *Ray38p* は、C末端にRNA結合モチーフとして知られる *RGG* モチーフを持っていた。抗 *Ray38p* 抗体を利用したイムノアフィニティー精製により得られた *Ray38p* を抗リン酸化セリン抗体、抗リン酸化スレオニン抗体、抗リン酸化チロシン抗体を用いたウエスタン解析によりそのリン酸化の状態を検討した。その結果、*Ray38p* はセリン・スレオニン残基がリン酸化を受ける蛋白質であり、*CYH* 添加後リボソームより脱離した *Ray38p* は、そのスレオニン残基が高度にリン酸化されていることが明らかになった。これらのことからこのスレオニンの高リン酸化を介し

て Ray38p のリボソームからの脱離が起こることが考えられた。RAY38 遺伝子破壊株を作製したところこの破壊株は、野生株に比べ CYH 添加後の CYH 耐性化が早く起こることから、リボソームからの Ray38p の脱離は、CYH 耐性化の誘導を促進していることが示唆された。また、この破壊株は非ストレス条件下では野生株と生育に差が見られないことから、本来のリボソームの機能には必須な蛋白質でなく、新規リボソーム会合蛋白質であることが推定された。

4. CYH 誘導的耐性化の機構

CYH 誘導的耐性化機構においての問題点の一つは CYH 存在下で蛋白質合成が停止した状態でいかにして L41-Q を含む耐性なリボソームを合成するかという点である。80 種類以上のリボソーム蛋白質を合成することは、細胞にとって非常に困難であると考えられたため、リボソーム蛋白質 L41-P と L41-Q のリボソーム上における直接の交換について、CYH 添加後経時的にパルスラベルを行い、調製されたリボソーム画分を二次元電気泳動に分離し、そのオートラジオグラフィーの比較検討を行った。その結果、CYH 添加後にリボソーム中の L41 リボソーム蛋白質のみが交換されることはなく、非常に少ないながらもすべてのリボソーム蛋白質が合成されていることが示唆された。

5. C-GCN4 遺伝子破壊による偽菌糸形成

酵母型と菌糸型の間で変換が起こる現象を二形成と呼び、*Candida albicans* においてはその増殖形態と病原性の相関性が推察されている。*C. maltosa* も病原性を持たないが二形成酵母である。本研究において C-GCN4 遺伝子破壊株は最少培地においては常に偽菌糸型成長を行うことが明らかになった。これは GCN4 ホモログの破壊がその増殖形態に影響を及ぼすことを示した初めての例であり、C-Gcn4p はアミノ酸飢餓条件下では偽菌糸形成の情報伝達を負に制御していると考えられた。

6. まとめ

本研究において CYH 耐性 L41-Q 遺伝子の発現制御及びリボソームの CYH 耐性化の機構に関する新たな知見が得られた。リボソームに関する知見に比べ、リボソーム蛋白質の合成についてはの知見は現在まで非常に乏しいため、本研究で明らかとなった制御機構が今後のリボソーム及びリボソーム蛋白質における発現制御機構の完全解明に寄与していく可能性が考えられる。また、CYH 添加後の C-GCN4 遺伝子の転写制御が、哺乳動物において知られる superinduction と呼ばれる未だによく理解されていない現象と非常に類似しているため、本研究が非常に良いモデルとなることが期待される。