

論文の内容の要旨

応用生命工学専攻
平成 12 年度博士課程 進学
氏名 角田 徹
指導教官名 太田 明德

論文題目

酵母 *Yarrowia lipolytica* の *n*-アルカン誘導型チトクローム P450 及び
n-アルカンの細胞内への輸送に関する研究

チトクローム P450 (以下 P450) は、高等真核生物から酵母、バクテリア、古細菌に至るまで生物界に幅広く分布するモノオキシゲナーゼ (一酸素添加酵素) であり、還元状態で一酸化炭素と結合することにより 450nm 付近に極大を持つ特徴的な差スペクトルを示すヘムタンパク質として見出された。アルカン資化性酵母が *n*-アルカン類を資化して生育する際には、この P450 の反応が関与している。すなわち、細胞内へ取り込まれたアルカンは、まずアルカン誘導型チトクローム P450 (P450ALK) によって末端酸化反応を受けてアルカノールへと変換される。その後順次酸化反応を受けて脂肪酸やジカルボン酸へと変換される。一部の脂肪酸は acyl-CoA を経て、菌体内の脂質として取り込まれるか、あるいはペルオキシソームで β 酸化を受けて代謝される。

本研究で扱った *Yarrowia lipolytica* もアルカン資化性酵母の一種である。現在までに本酵母より P450ALK をコードする遺伝子が 8 種類 (*YIALK1* ~ *YIALK8*) 単離されており、多重遺伝子群を形成していると考えられている。しかし、これら 8 種類の遺伝子のうちでアルカンによる誘導発現が認められるのは一部であり、これらの遺伝子産物がアルカン代謝において実際にどのように関与しているのか、不明な点が数多く残されている。また、これらの

遺伝子の発現は転写段階における制御を受けていると考えられているが、転写因子を含め、発現機構は未だ解明されていない。

そこで、本研究では *Y. lipolytica* における P450ALK をコードする遺伝子の転写制御機構、その遺伝子産物の基質特異性、細胞内へのアルカン輸送機構に関して研究を行い、アルカン代謝機構の全容を解明することを目的とした。

1. *YIALK1* 遺伝子の転写制御に関する解析

YIALK1 は 8 種類の *YIALK* 遺伝子の中で最もアルカンによる発現レベルが高く、8 種類の中で最も主要な役割を担う P450ALK をコードすると考えられている。その転写制御機構を解明するため、プロモーター解析を行った。*YIALK1* プロモーター全長および上流から段階的に欠失させていったプロモーターを、大腸菌由来の *lacZ* 遺伝子と融合させ、 β -ガラクトシダーゼ活性を指標に転写活性を測定した。その結果、開始コドン ATG の A を+1 とすると-400~-304 の領域がアルカン応答に関与していることが判明した。そこでこの領域を ARR1 (alkane responsive region) と命名した。ARR1 をさらに細かく上流から欠失させることにより 2 段階に活性値が減少することが見出され、ARR1 内で転写制御を受けている領域が少なくとも 2 カ所あることが示唆された。

次に、ARR1 内の様々な領域をプローブとし、アルカン培養菌体から調製した細胞抽出液を用い、ゲルシフト解析を行った。その結果、-394~-371 の領域と-325~-305 の領域をプローブとした場合に、シフトバンドが観察された。前者の領域には E-box (CANNTG) 様の配列が 2 カ所存在しており、2 カ所ともにシフトバンドの生成における末端の TG の重要性が示された。以上の結果より、これらの小領域をそれぞれ ARE1 (alkane responsive element)、ARE2 と命名した。また、これらの配列に結合するタンパク質因子は互いに異なることも示された。

2. *Y. lipolytica* 由来新規遺伝子 *YIPEX10* の解析

YIPEX10 は *YIALK1* の転写活性化因子を取得するスクリーニングによって取得された遺伝子である。*PEX10* は動物細胞や他の酵母でも取得されており、その遺伝子産物はペルオキシソーム膜に局在し、ペルオキシソーム生合成に関与する。しかし、*YIPEX10* 破壊株では *n*-デカンによる *YIALK1* の転写レベルが著しく低下したことから、転写因子として機能している可能性が示唆されていたため、解析を行った。

アルカン培地で生育させた *YIPEX10* 破壊株を電子顕微鏡で観察すると、ペ

ルオキシソームが細胞内に認められず、YIPEX10 も他の PEX10 同様ペルオキシソーム生合成に関与していることが示唆された。次に YIPEX10 の局在を観察したところ、ペルオキシソームに局在していることが示された。さらに、YIPEX10 中の核移行シグナル様配列に変異を導入しても影響がなかったことから、転写因子としての機能はほぼ否定された。

そこで、一般にペルオキシソーム生合成に支障が生じると *YIALK1* の転写レベルが低下する機構が存在することを予想し、*YIPEX5* 破壊株と *YIPEX6* 破壊株を作製した。これらの株における *YIALK1* の mRNA レベルを測定した結果、*YIPEX10* 破壊株と同様に mRNA レベルの低下が認められた。ペルオキシソームが細胞内に存在しない場合、アルカンの中間代謝産物が細胞内に蓄積することが考えられるため、*n*-ドデカンおよびその中間代謝産物を用いて、これらの物質が *YIALK1* の転写に及ぼす影響について調べた。その結果、*n*-ドデカンと同時に中間代謝産物を添加すると、その濃度が高いほど *YIALK1* の転写レベルが低下することが分かった。この結果は、前述の機構の存在を裏付ける結果である。すなわち、*n*-アルカンの酸化後さらにペルオキシソームで代謝されない場合、初発の酸化を抑制することで無駄なエネルギーを消費しないように、また細胞毒性のあるアルカン酸化物を蓄積させないようにするための制御機構が存在すると思われる。

3. P450ALK の基質特異性の解析

P450ALK の基質特異性については *C. maltosa* について詳細に解析されているが、*Y. lipolytica* については P450ALK1 が短鎖アルカンを基質とすることが予想されている以外、ほとんど何も分かっていない。そこで、8 種類の P450ALK および P450 レダクターゼを発現させ、無細胞で基質と反応させる系を確立することを試みた。

まず、P450ALK を持たない *Saccharomyces cerevisiae* や大腸菌での P450ALK1 の発現が困難であったため、*Y. lipolytica* で発現させることを前提にした。構成的で強力な *TEF1* プロモーターの直下流に His タグが付く発現ベクター (pSUHT) を構築した。このプロモーターはグリセロール培地における顕著な発現が認められているため、グリセロールによるカタボライト抑制を受けるゲノム上の *YIALK* の発現を抑制し、導入する *YIALK1* を選択的に発現させるのに有効である。しかし、P450ALK1 をグリセロール存在下で発現させても P450 の存在を示すスペクトルは認められなかった。一方、*n*-ドデカン存在下では高発現が認められた。この結果から、*Y. lipolytica* では、機能ある P450ALK

が合成されるまでの過程がアルカンで制御されており、その過程が正常に働かない限り機能ある P450ALK が生産されないことが示唆された。そこで、目的の P450ALK を選択的に発現させるために、アルカン培地で強く発現する *YIALK1* と *YIALK2* を破壊して、CXUD12 株を作製した。この株は *n*-デカン培養によっても P450 の存在を示すスペクトルを与えないので、目的の P450ALK の高生産が期待される。

また、8 種類の *YIALK* 遺伝子について、単独（8 種類）および二重破壊株（28 種類）を作製し、アルカン、アルコール、脂肪酸など様々な培地での生育を野生株と比較した。その結果、*YIALK1* と *YIALK2*、3、4、6 の二重破壊株が 1-ドデカノールを炭素原とする培地、*YIALK2* と *YIALK5*、8 の二重破壊株が *n*-ドデカノールを炭素原とする培地、*YIALK1* と *YIALK4* の二重破壊株がラウリン酸やステアリン酸などの飽和脂肪酸を炭素原とする培地での生育の悪化が認められた。すなわち、P450ALK1 と P450ALK2 がアルカンとその酸化物の代謝に主要な役割を担っていることが改めて示されたと共に、その他の P450ALK の基質特異性が初めて示唆された。

4. *n*-ヘキサデカンの細胞内への輸送に関する解析

アルカン資化性酵母におけるアルカンの細胞内への輸送については、現在のところエネルギー依存的なアルカントランスポーターの可能性が示唆されているだけで、その輸送機構は不明である。そこで、*n*-[1-¹⁴C]ヘキサデカンを用いて、細胞内へのアルカン輸送に関する解析を行った。

まず、野生株を用いて *n*-[1-¹⁴C]ヘキサデカンが取り込まれる速さを経時的に測定する条件等を検討した。次に、24 株のアルカン資化能欠損変異株の中からアルカンの取り込み能が低下している株を選択した。しかし、アルカンの取り込みには影響がないと考えられた *YIPEX10* 破壊株を用いてアルカンの取り込み速度を調べたところ、*YIPEX10* 破壊株でも取り込みが著しく抑制されることが分かった。この現象は *YIPEX5*、*YIPEX6* 破壊株でも確認された。この結果は、ペルオキシソーム生合成に異常が生じると、アルカンの細胞内への輸送も抑制されることを示唆している。すなわち、ペルオキシソームの異常によって引き起こされる、アルカン代謝に関与する遺伝子の発現の抑制と、アルカンの細胞内への取り込みの抑制とは、共通の機構によるものではないかと考えられる。