

論文の内容の要旨

応用生命工学専攻

平成 11 年度博士課程 進学

氏名 小暮 高久

指導教官名 太田 明德

論文題目

酵母 *Candida maltosa* の *n*-アルカン誘導型チトクローム P450 遺伝子群の
転写誘導機構の解析

n-アルカン資化性酵母 *Candida maltosa* は *n*-アルカンやその誘導体を単一炭素源として培養した場合、小胞体やペルオキシソームなどの細胞内膜系が顕著に増殖するとともに、アルカンの初発酸化反応に関与する小胞体膜タンパク質であるチトクローム P450 (P450alk) を顕著に誘導する。*C. maltosa* IAM12247 株において、P450alk をコードする 8 種の *ALK* 遺伝子群 (*ALK1*~*ALK8*) は、*ALK4* を除きすべてアルカンによる転写誘導を受け、そのうち強く誘導される 4 種 (*ALK1*、*ALK2*、*ALK3*、*ALK5*) の *ALK* 遺伝子がコードする P450 分子種がアルカンの資化において主要な役割を果たしていることが遺伝子破壊実験によって示されている。また P450alk にはクロフィブレートなどの疎水性の薬剤によっても顕著な誘導を受ける分子種が存在し、哺乳動物における薬物代謝型 P450 の誘導現象との類似性も示されている。一方、P450alk は分子種によりアルカンや脂肪酸といった炭化水素鎖末端に対する基質特異性に違いが存在することから、各 *ALK* 遺伝子の発現の誘導性にも遺伝子産物の基質特異性に応じた差異が存在する可能性が示唆されている。アルカンを資化する微生物は多種存在するが、酵母におけるアルカンによる転写誘導機構はいまだ不明である。そこで本研究では、*C. maltosa* における *ALK* 遺伝子群のアルカンによる誘導現象をモデルとして、脂溶性物質による多重遺伝子群の転写誘導機構を解析することを目的とした。

1. ALK 遺伝子の誘導特異性

異なる基質特異性を有する主要な ALK 遺伝子 (*ALK1*, *ALK2*, *ALK5*) の種々の誘導物質による誘導性をレポーター遺伝子を用いたプロモーター活性測定、およびノーザン解析によって検討した。*ALK1* 遺伝子産物は P450alk 分子種の中で最も強いアルカン水酸化活性を有するのに対し、脂肪酸に対する活性は非常に弱いことが示されているが、これと一致して、*ALK1* 遺伝子も、アルカンによって非常に強く誘導される一方、脂肪酸による誘導性は非常に弱いものであることが示された。一方、*ALK2* や *ALK5* の遺伝子産物は脂肪酸に対して比較的強い水酸化活性を有することと一致して、*ALK2* や *ALK5* は脂肪酸によっても比較的強く誘導されることが示された。しかしながら、脂肪酸に対して *ALK5* 遺伝子産物は *ALK2* 遺伝子産物よりも強い活性を示すのに対し、脂肪酸による転写誘導レベルは逆に *ALK5* よりも *ALK2* の方がやや高いことが示された。これらの結果は、P450alk の分子進化に対応して、それらの転写調節に関与する因子も生存に有利になるような分子進化を重ねてきていることを示唆しているが、その機構は脂肪酸を基質とする場合必ずしも最大限効率的なものとはなっていないことが示された。

2. ALK 遺伝子プロモーター中の誘導物質応答配列の特定

主要 ALK 遺伝子 (*ALK1*, *ALK2*, *ALK5*) のプロモーター領域の解析を行い、*ALK1* プロモーター上の 3ヶ所 (ARR1-1, ARR1-2, ARR1-3) の領域を含め、各プロモーターにおける種々の誘導物質に対する応答領域 (シス領域) を特定した。また、*ALK2* プロモーターにおいては、アルカン応答エレメント (ARE2) とクロフィプレート応答エレメント (CRE2) を特定し、それら構造的関連性をもたない脂溶性物質に対する応答に関わるシスエレメントが部分的にオーバーラップしながらも、異なる配列であることが示された。オレイン酸に対する応答は、ARE2 と CRE2 のどちらでも起こった。これらの結果から、アルカン応答型転写因子とクロフィプレート応答型転写因子が別々に存在し、オレイン酸などの不飽和脂肪酸による転写誘導は、その両者を介して起こることが示唆された。一方、ARE2 エレメント中に存在した E-box 配列 (CANNTG) に相当する CATGTG 配列はアルカン特異的な応答に関与することが示され、また、ARE2 と CRE2 の両エレメントがオーバーラップする領域中に存在した CCG 配列を含むダイレクトリピート型配列は、アルカンとクロフィプレートのどちらの応答性にも重要であることが示された。また、それと同時に、これらのモチーフは各シスエレメントへの特異的タンパク質結合にも重要であることが示された。このことから、それらの配列を認識する転写活性化因子の存在の可能性が考えられた。これらのモチーフは *ALK5* プロモーターのアルカン応答領域 (ARR5) 等にも存在することから、複数の ALK 遺伝子の誘導性に関与していることが示唆されたが、*ALK1* プロモーターの 3 種のシス領域には存在しないことから、それらの領域では

異なる配列が誘導性に関わっていることが考えられた。

また、各シス領域はアルカン、オレイン酸、クロフィプレートなどの異なる誘導物質に対する応答性においてシス領域に応じた特異性が認められた。さらに、各シス領域に対するゲルシフト解析を行った結果、シス領域に応じて異なる配列特異性をもった因子が特異的に結合することが示された。また一方で、ARR1-1 領域と ARR5 領域には類似の配列特異性をもった因子が結合することが示され、また ARE2 や CRE2 に強く結合する因子は親和性は比較的弱い。他のシス領域にも特異的に結合することが示された。これらの結果は、シス領域の種類に応じて特異的な転写因子が各種誘導物質に対する応答に関与すること、機能的に重複する複数の異なるアルカン応答型転写因子が存在すること、複数のシス領域で機能する転写因子も存在することを示唆している。

3. アルカン応答領域に結合するタンパク質のアフィニティー精製、及びそれらをコードする遺伝子の単離とその機能解析

ゲルシフト解析において異なる配列特異性をもった因子が結合することが示された 2 種のアルカン応答領域 (ARR1-1 と ARR1-2) に特異的に結合する因子を、DNA アフィニティー精製法を用いて生化学的に精製することを試みた。アルカン誘導菌体の全細胞抽出液をヘパリンアガロースアフィニティーカラムで分画した後、各シス領域に相当する DNA 断片をアフィニティープローブとする DNA アフィニティー精製を繰り返し行うことで、ARR1-1 領域または ARR1-2 領域に特異的に強いアフィニティーで結合する約 80kDa および約 40kDa のタンパク質をそれぞれ精製した。それらのタンパク質の推定アミノ酸配列を質量分析法により特定し、その配列をもとにそれらのタンパク質をコードする遺伝子を単離した。その結果、ARR1-1 領域に特異的に結合するタンパク質をコードする遺伝子は、酵母 *Saccharomyces cerevisiae* において減数分裂時に中期孢子形成遺伝子群の転写活性化に関わり、減数分裂の進行を制御する主要な転写因子をコードする *NDT80* 遺伝子のホモログであることが示された。そこで、この遺伝子を *CmNDT80* とした。大腸菌で発現させた *CmNdt80* は、ARR1-1 領域に最も強い親和性で特異的に結合することから、*CmNdt80* は ARR1-1 領域等に直接結合する因子であることが示された。*CmNDT80* 破壊株はアルカンを炭素源とした場合、野生型株と同様の生育を示したが、ARR1-1 領域に依存するアルカンによる転写誘導活性が特異的に野生型株に比べ大幅に低下したことから、*CmNdt80* は ARR1-1 領域を介した転写活性化因子として機能していることが示唆された。*CmNDT80* の破壊の影響は *ALK1* の転写誘導に特異的なものであったことから、*CmNdt80* は *ALK1* 特異的なアルカンによる誘導性の制御に関与する因子であることが考えられた。

一方、ARR1-2 領域に特異的に結合するタンパク質をコードする遺伝子は、*S. cerevisiae* においてセントロメア結合タンパク質として染色体の安定性に関わる他、メチオンニン生合成系遺伝子の転写活性化因子としても機能することが報告されている basic helix-loop-helix 型タンパク

質をコードする *CBF1* (centromere binding factor 1) 遺伝子のホモログであることが示された。そこで、この遺伝子を *CmCBF1* とした。Cbf1 が転写活性化因子としても機能することから、CmCbf1 も染色体における機能の他、*ALK* 遺伝子の転写調節にも同時に関与している可能性が示唆された。しかしながら、大腸菌で発現させた CmCbf1 はアフィニティー精製に用いた ARR1-2 領域への結合性を有していなかったことから、CmCbf1 は他のタンパク質と複合体を形成して DNA に結合し、機能している可能性が示唆された。

4. *C. maltosa* の長鎖ジカルボン酸高生産株における *ALK* 遺伝子の発現解析

C. maltosa はアルカンによって生育させた場合、アルカン代謝産物として長鎖ジカルボン酸 (DCA) を生成する。*C. maltosa* には、複数回の変異源処理を経て、アルカンを代謝して DCA を高生産するようになった変異株が存在し、DCA の発酵高生産に用いられている。そのような株において、DCA が高生産される要因の一つとして、アルカンや脂肪酸の炭化水素鎖末端の酸化反応に関わる P450alk の発現量の上昇に伴う活性上昇が考えられた。そこで、野生型株と DCA 高生産株における P450alk の発現量を比較したところ、DCA を高生産する変異株では P450alk のアルカン誘導時の発現が転写段階で顕著に上昇していることが示され、それが主に *ALK* 遺伝子プロモーターの転写誘導活性の上昇に起因するものであることが示された。また、脂肪酸の水酸化活性が特に強い P450 分子種をコードする *ALK5* の発現が変異株で特に顕著に上昇していたことから、*ALK5* 遺伝子産物の高発現による脂肪酸 ω 末端の水酸化活性の上昇が DCA の高生産に大きく寄与している可能性が示唆された。

本研究では主要な *ALK* 遺伝子のプロモーター領域の解析を通じて、種々の誘導物質による *ALK* 遺伝子の誘導性の制御に関わる応答配列を特定し、その解析を通じて、*ALK* 遺伝子群の転写誘導機構の特殊性および複雑性を明らかにした。また、アルカン応答領域に特異的に結合する因子の精製を介して *ALK* 遺伝子群の転写調節に関与すると考えられる 2 種の転写因子をコードする遺伝子を単離した。今後は、本研究の成果に基づき、これらの遺伝子産物の機能を解明し、他のアルカン応答に関わる遺伝子を同様に単離、解析していくことで、*C. maltosa* における *ALK* 遺伝子群の脂溶性物質による転写調節機構の全貌が明らかにされることが期待される。