

論文の内容の要旨

応用生命工学専攻
平成 13 年度博士課程 進学
氏 名 山神 撰
指導教官名 太田明徳

論文題目

酵母 *Yarrowia lipolytica* における *n*-アルカン誘導型チトクローム P450 遺伝子の 発現制御機構に関する研究

チトクローム P450 (P450) はバクテリアから哺乳動物に至るまで広く存在し、様々な内因性及び外因性の疎水性物質の代謝に中心的な役割を果たしている。P450 の多くは、特に外因性物質の代謝に関わる場合、その基質となる物質によって発現誘導されることが知られている。哺乳動物の肝 P450 の発現制御機構については盛んに研究が進められてきているが、一般に疎水性の高い物質が細胞内でどのような挙動をし、転写の活性化を引き起こすのかについては知見が乏しい。

アルカン資化性酵母ではアルカンの初発酸化を P450 (P450ALK)が触媒し、その発現は基質となるアルカンによって誘導されることが知られている。しかし細胞がアルカンの存在を感知し転写誘導に至るまでの過程は明らかにされていない。アルカン代謝の研究によく用いられてきたのは二倍体もしくは部分二倍体で存在する *Candida* 属酵母であるが、アルカン資化性酵母の中でも *Yarrowia lipolytica* は安定な一倍体の生活環を持ち、遺伝学的解析に適している。細胞遺伝学研究室において、*Y. lipolytica* の P450ALK をコードする 8 つの遺伝子、*ALK1* から *ALK8* が単離され、中でも *ALK1* が *n*-デカンの資化に必須であり、*n*-デカンによって強く転写が誘導されることが見出された⁽¹⁾。本研究では、酵母 *Y. lipolytica* においてアルカンという極めて疎水性の高い物質が *ALK1* 遺伝子の転写を誘導する機構を明らかにし、疎水性物質に対する生物の応答機構についての知見を得ることを目的とした。

1. *n*-デカン資化に必須なアセトアセチル-CoA チオラーゼ遺伝子の単離と解析⁽²⁾

細胞遺伝学研究室では、*Y. lipolytica* において *ALK1* 遺伝子の破壊は *n*-デカン資化能を大きく損なうことが明らかにされ、更に *n*-デカン資化能に欠損を持つ変異株が取得されていた。そのような変異株は *ALK1* 遺伝子の発現制御系に変異を持つ可能性があると考えられ、それらの変異株の中から *n*-デカンを炭素源とした場合に *ALK1* プロモーターの活性が野生株に比べ特に低下した B10 株を選出し、解析を行った。

CXAU1 株由来の遺伝子ライブラリーを作製し B10 株に導入して、*n*-デカン資化能の回復を指標に変異を相補する DNA 断片を取得した。塩基配列を決定したところ、有意な open reading frame (ORF)を見出した。この ORF は 397 アミノ酸から成るタンパク質をコードしており、推定アミノ酸配列はアルカン資化性酵母 *Candida tropicalis* のペルオキシソームのアセトアセチル-CoA チオラーゼと 50%の同一性を、また、酵母 *Saccharomyces cerevisiae* の細胞質のアセトアセチル-CoA チオラーゼと 49%の同一性を示した。また、この ORF にコードされるタンパク質の N 末端にはペルオキシソーム移行シグナル 2 によく似た配列が存在した。さらに、推定アミノ酸配列上においてチオラーゼの活性中心と考えられている 2 つのシステイン残基が保存されていること、B10 変異株はチオラーゼの活性部位付近のよく保存された領域内に変異を持つことを確認した。これらの結果から、この ORF はペルオキシソームに局在するアセトアセチル-CoA チオラーゼをコードしていると考えられ、*PAT1* (peroxisomal acetoacetyl-CoA thiolase)と命名した。

ノーザン解析により、*PAT1* の転写は *n*-デカン、及びオレイン酸によって誘導されることが示された。また、*PAT1* 遺伝子破壊株を作製し解析したところ、破壊株では *n*-デカン誘導的なアセトアセチル-CoA チオラーゼ活性が失われ、更に *n*-デカン資化能が失われていた。これらの結果から、*PAT1* にコードされるチオラーゼは *n*-デカン代謝に必須であると結論され、 β 酸化の最終段階に関与している可能性が考えられた。*PAT1* 遺伝子破壊株では *n*-デカン培養時に *ALK1* の発現が誘導されるものの、その発現レベルが野生株に比べ低いことから、*n*-デカン代謝の下流の異常がフィードバック的に初発酸化酵素をコードする *ALK1* の発現を抑制していると推察された。

2. アルカン応答配列の同定⁽³⁾

ALK1 遺伝子と今回単離した *PAT1* 遺伝子がともにデカンによって強く転写が誘導されることから、両プロモーター配列を比較したところ、CTTGTGNxCATGTG から成るよく保存された領域を見出した。この配列が共に *n*-デカン誘導に重要と考えられたことから、*Y. lipolytica* のアルカン資化に関与すると考えられる他の遺伝子上流域において配列の有無を確認したところ、アシル-CoA オキシダーゼをコードする *POX3* や 3-オキソアシル-CoA チオラーゼをコードする *POT1* にも相当する配列が認められた。そこで、*ALK1* プロモーターの CTTGTGNxCATGTG 配列を 3 つタンデムにつなぎ *LEU2* のコアプロモーターの上流に配置し、そのプロモーター活性を

lacZ をレポーターとして解析した。その結果、プロモーター活性はグリセロールやグルコースを炭素源とした時に比べ、アルカン存在時に 10 倍以上に上昇した。この配列はアルカンに依る転写誘導に重要な配列であることが示され、アルカン応答配列 (alkane responsive element 1; ARE1) と命名した。更に ARE1 を用いてゲル移動度シフトアッセイを行ったところ、本配列に特異的に結合するタンパク質の存在が示された。

3. アルカン依存的な P450 遺伝子の転写誘導に必須な bHLH 転写因子の同定と解析⁽³⁾

ARE1 を介したアルカンによる転写誘導の機構を遺伝学的手法を用いて明らかにするために、ARE1 を介した転写活性を *lacZ* の発現を指標にアッセイできる上記レポーター系を *Y. lipolytica* のゲノムに組み込んだ CXU3xLZ1 株を作製した。CXU3xLZ1 株を親株として変異誘発処理を行い、*n*-デカン存在時の β -ガラクトシダーゼ活性の低下した株を選択した。変異株の 1 つでは、*n*-デカン存在時の *ALK1* mRNA 量が親株に比べて低下していたが、オレイン酸による *PAT1* mRNA の誘導には変化が見られなかった。また、その変異株はアルカン資化能を失っていたが、オレイン酸を炭素源とした際には親株と同様の生育を示した。これらのことから変異株はアルカンの認識から ARE1 を介した転写誘導に至るまでの経路に変異を有すると考えられ、*yas1-1* (yeast alkane signaling) 変異株と命名した。*yas1-1* 変異株に CXAU1 株由来の遺伝子ライブラリーを導入し、デカン資化能の回復を指標に変異を相補する DNA 断片を取得した。塩基配列を決定したところ basic helix-loop-helix 構造を有するタンパク質をコードする ORF が見出され、その遺伝子を *YAS1* と命名した。*YAS1* 遺伝子破壊株では、アルカンによる *ALK1* 遺伝子の転写誘導が見られず、アルカン資化能も失われており、変異株と同様の表現型が見られた。

また、HA タグを付加した *Yas1p* (*Yas1p*-HA) が核に存在することを確認した。更に、ARE1 には bHLH 転写因子の結合配列である E-box モチーフ(CANNTG)が含まれていることから、*Yas1p* が ARE1 を持つプロモーターに結合する可能性を考え、クロマチン免疫沈降法により検討した。その結果、*Yas1p*-HA は *ALK1* プロモーターや *PAT1* プロモーターに特異的に結合していることを見出した。これらの結果から、*Yas1p* はアルカン応答に関わる転写因子であると結論した。

YAS1 の発現も炭素源による制御を受けるかどうかを調べたところ、アルカン存在時に *YAS1* の転写誘導、*Yas1p*-HA 量の増加が見られた。*YAS1* プロモーター領域にも ARE1 様配列が確認され、*Yas1p*-HA がクロマチン免疫沈降法により *YAS1* プロモーターに結合していることを見出した。これらのことから、アルカン応答に関わる正の転写因子の発現が、自身によって誘導されるという自己制御機構の存在が示唆された。このような正のフィードバック機構によって、アルカン存在時に *Yas1p* が素早く増加し、アルカンが存在する環境へ直ちに適応することが可能であると考えられる。

まとめ

本研究ではアセトアセチル-CoA チオラーゼ遺伝子を単離し、そのプロモーター配列の情報を利用してアルカン応答配列を決定した。さらに、アルカン応答配列を介した転写の活性化、アルカン依存的な P450 遺伝子の転写誘導に必須な bHLH 型転写因子、Yas1p を同定した。大腸菌より精製した His₆-Yas1p は単独ではアルカン応答配列に結合しなかったことと、多くの bHLH 型転写因子がヘテロダイマーを形成して DNA に結合することから、Yas1p とヘテロダイマーを形成して DNA に結合するようなパートナーが存在すると考えられる。そのようなパートナーの同定を含め、アルカンによる転写誘導のシグナル伝達系全体の解明が今後の課題であるが、本研究はその全貌解明への糸口となると思われる。また、外因性の疎水性物質による P450 の転写誘導に必須な転写因子に関して下等真核生物ではこれまでに報告がなく、本研究で得られた知見は他の生物における P450 の発現制御機構の解明にも寄与するものと期待される。

(1) Iida, T., Ohta, A., and Takagi, M. (1998) Cloning and Characterization of an *n*-alkane-inducible Cytochrome P450 Gene Essential for *n*-Decane Assimilation by *Yarrowia lipolytica*. *YEAST* **14**: 1387-1397

(2) Yamagami, S., Iida, T., Nagata, Y., Ohta, A., and Takagi, M. (2001) Isolation and Characterization of Acetoacetyl-CoA Thiolase Gene Essential for *n*-Decane Assimilation in Yeast *Yarrowia lipolytica*. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **282** : 832-838

(3) Yamagami, S., Morioka, D., Fukuda, R., and Ohta, A. (投稿中) A Basic Helix-Loop-Helix Transcription Factor Essential for Cytochrome P450 Induction in Response to Alkanes in Yeast *Yarrowia lipolytica*.