

## 論文の内容の要旨

応用生命工学専攻

平成 21 年度博士課程進学

氏名 小林 哲

指導教員名 太田 明德

## 論文題目

アルカン資化性酵母の *n*-アルカン応答における遺伝子発現制御機構に関する研究

真核微生物においてアルカンや中性脂質、脂肪酸などの疎水性物質が特定の遺伝子群の発現を誘導する例が多く知られているが、その分子機構については不明な点が多い。石油成分の一つであるアルカンは自然界にも広く存在し、植物の表面や昆虫の体表面などに見出される。アルカンは高エネルギー物質であり、これまでにアルカン資化能を有する酵母や糸状菌が数多く見つかった。

アルカン資化性酵母において、*n*-アルカンは細胞に取り込まれた後、チトクローム P450 により末端が水酸化され *n*-アルコールとなる。*n*-アルコールは脂肪酸にまで酸化された後、 $\beta$ 酸化系で分解される他、リン脂質や中性脂質に取り込まれる。様々なアルカン資化性酵母において、*n*-アルカン存在時に *n*-アルカン代謝に関わる遺伝子の発現が誘導されることが知られているが、*n*-アルカンのような極めて疎水性の高い化合物がどのような機構でこれらの遺伝子の発現を誘導するかは不明である。

アルカン資化性酵母 *Yarrowia lipolytica* は糖類やポリアルコールの他に、脂肪酸や *n*-アルカンなどの疎水性物質を炭素源として利用できる。*Y. lipolytica* において、*n*-アルカンの末端水酸化を行うチトクローム P450 をコードすると推定される遺伝子は 12 個 (*ALK1*~*ALK12*) 存在し、その大部分は *n*-アルカンの存在により発現が誘導される。これまでに、basic Helix-Loop-Helix 型転写因子である *Yas1p* と *Yas2p* のヘテロ複合体が *ALK1* プロモーター中の Alkane Responsive Element 1 (ARE1) に結合し、*ALK1* の転写を活性化することが見出され

ている。また、Yas2p と結合し ARE1 を介した転写を抑制する因子として Yas3p が同定されている。しかし、*n*-アルカンがどのような経路でこれらの転写因子の機能制御に関与するのかは不明であった。そこで本研究では、Yas1p、Yas2p、Yas3p による ARE1 を介した *n*-アルカン依存的な転写調節の分子機構を明らかにすることを目的とし、主に Yas3p について解析をおこなった。

## 1. *n*-アルカン応答における転写調節因子 Yas3p の機能解析

酵母 *Saccharomyces cerevisiae* において脂質合成制御に関わる転写調節因子として、転写抑制因子である Opi1p が知られており、イノシトールに応答する脂質合成関連遺伝子の発現は主に Opi1p の局在変化によって制御される。Yas3p が Opi1p のオルソログであることから、ARE1 を介した *n*-アルカン依存的な転写調節も Yas3p の局在変化により制御される可能性が考えられた。そこで Yas3p の C 末端に EGFP を付加した融合タンパク質を発現する株を作製し、Yas3p-EGFP の局在を観察した。その結果、Yas3p-EGFP は *n*-デカン非存在下では核に局在するが、*n*-デカン存在下では小胞体に局在することが示された。また、Yas2p の C 末端に EGFP を付加した融合タンパク質を発現する株を作製し、Yas2p-EGFP の局在を観察したところ、Yas2p-EGFP は *n*-デカンの有無によらず核に局在することが示された。以上より、転写活性化因子である Yas2p は常に核に局在するのに対して、転写抑制因子である Yas3p が *n*-アルカンの有無に応じて局在を変化させることで ARE1 を介した転写を制御する可能性が示唆された。

次に、ARE1 配列を含むプロモーター下にレポーター遺伝子 *lacZ* を連結して YAS3 遺伝子破壊株に導入し、 $\beta$ -ガラクトシダーゼ活性測定をおこなったところ、*n*-デカン存在時においても非存在時と同等の活性値を示した。また、この時の活性値はいずれも野生型株の *n*-デカン存在時における活性値よりも高かった。以上より、Yas1p および Yas2p は *n*-アルカン非存在時でも転写活性化能を有しており、ARE1 を介した転写は主に Yas3p の局在変化により制御されることが示唆された。

## 2. Yas3p のリガンドの探索

*n*-アルカン存在時に Yas3p-EGFP が小胞体に局在することから、Yas3p が小胞体に存在する何らかの物質と結合する可能性が考えられた。そこで N 末端に GST あるいはヘキサヒスチジンタグを融合した Yas3p (GST-Yas3p, His<sub>6</sub>-Yas3p) を大腸菌で発現させ精製し、Yas3p のリガンドの探索をおこなった。

*n*-アルカンの水酸化は小胞体で起こるとされることから、Yas3p が *n*-アルカンやその代謝産物と結合する可能性が考えられた。そこで、Biacore および等温滴定カロリーメトリーを用

いて、これらの化合物との結合について調べたが、結合を示すシグナルは得られなかった。

*S. cerevisiae* において Opi1p はリン脂質であるホスファチジン酸 (PA) と結合する。Opi1p の PA 結合ドメインが Yas3p においても一部保存されていたことから、Yas3p も PA などのリン脂質と結合する可能性が考えられた。そこで、Protein Lipid overlay assay (PL assay) により Yas3p とリン脂質との結合について調べたところ、GST-Yas3p は PA と特異的に結合することが示された。また、シグナルリン脂質であるホスホイノシチド (PIPs) と Yas3p との結合についても調べたところ、GST-Yas3p は PIPs と結合することが示された。さらに、Yas3p がリン脂質 2 重膜中の PA や PIPs と結合できるかについて、リポソームを用いて調べたところ、リポソームに PA あるいは PI(4)P を加えた場合に GST-Yas3p の結合量が増加することが示された。以上より、PA および PIPs が Yas3p のリガンドである可能性が示唆された。

次に、PA や PIPs が細胞内でも Yas3p のリガンドとして機能するか検討した。*S. cerevisiae* において PA ホスファターゼをコードする *PAH1* を破壊すると細胞内の PA 量が増加する。そこで、*PAH1* のオルソログ (*YIPAH1*) の破壊株を作製し、その細胞内リン脂質組成を調べたところ、特にオレイン酸を炭素源とした場合に PA の割合が大きく増加していた。そこで、ARE1 配列の下流に *lacZ* 遺伝子を連結したプラスミドをこの破壊株に導入し、 $\beta$ -ガラクトシダーゼ活性測定をおこなった結果、オレイン酸を炭素源とした場合に ARE1 を介した転写が活性化することが示された。

一方、*S. cerevisiae* においては PI(4)P ホスファターゼをコードする *SAC1* を破壊すると細胞内の PI(4)P 量が増加する。*SAC1* のオルソログ (*YISAC1*) は生育に必須であることが示唆されたため、Auxin inducible degron system によりオーキシン存在下において YISac1p の存在量が減少する *YISAC1* の条件変異株を作製した。この変異株に、ARE1 配列の下流に *lacZ* 遺伝子を連結したプラスミドを導入し、 $\beta$ -ガラクトシダーゼ活性測定をおこなった結果、YISac1p の存在量が減少した状態では *n*-デカンによる ARE1 を介した転写誘導が過剰に起こることが示された。以上の結果から、細胞内でも PA や PIPs が Yas3p のリガンドとして機能することが示唆された。

*n*-アルカン依存的に Yas3p が小胞体に局在する機構として、*n*-アルカン存在時に小胞体で Yas3p のリガンドが増加する可能性が考えられた。そこで、*n*-デカン存在時、非存在時における細胞内リン脂質組成を調べたところ、*n*-デカン存在時でも PA の割合に変化は見られなかった。さらに、PIPs の合成酵素をコードすると推定される遺伝子についても *YISAC1* と同様の条件変異株を作製し、解析したところ、これらの変異株においても *n*-デカンによる ARE1 を介した転写誘導が観察された。以上より、*n*-アルカン依存的な Yas3p の局在変化は PA や PIPs の量の変化によって起こるわけではないことが示唆された。

*n*-アルカンはリン脂質 2 重膜に入り込むことが知られている。そこで、*n*-アルカンの存在

が Yas3p とリン脂質 2 重膜との結合にどのような影響を与えるかについて、*n*-デカンを含むリポソームと GST-Yas3p を用いて解析した。その結果、*n*-デカンの濃度が増加するに従って、PA を含むリポソームに対する GST-Yas3p の結合量が増加した。したがって、Yas3p は *n*-アルカンを含むリン脂質 2 重膜を認識して結合する可能性が示唆された。

### 3. Yas3p 変異体の解析

Yas3p の PA 結合領域および PIPs 結合領域を特定するために、Yas3p の部分欠失変異体を作製した。C 末端側の領域 (209~422 aa) あるいは N 末端側の領域 (1~208 aa) を欠失した Yas3p の C 末端に EGFP を融合したタンパク質 (それぞれ Y3N-EGFP、Y3C-EGFP) を発現させるプラスミドをそれぞれ作製し、これらのキメラタンパク質の局在を観察したところ、Y3N-EGFP は細胞膜近傍に局在するのに対して、Y3C-EGFP は *n*-デカン存在時に小胞体に局在することが示された。そこで、C 末端側の領域 (209~422 aa) あるいは N 末端側の領域 (1~208 aa) を欠失した Yas3p の N 末端に GST を融合したタンパク質 (それぞれ GST-Y3N、GST-Y3C) を大腸菌で発現させ精製し、これらのタンパク質と PA との結合について調べたところ、いずれも PA と結合することが示された。さらに、GST-Y3N の部分欠失変異体を作製、解析した結果、GST-Y3N は Opi1p の PA 結合ドメインと相同性を持つ領域 (112~208 aa) において PA と結合することが示された。また、この領域および GST-Y3C はともに、PI(4)P とも結合した。以上より、Yas3p は N 末端側および C 末端側の少なくとも 2 ヶ所の領域で PA や PIPs と結合すること、PA と PIPs の結合領域は同じである可能性が示唆された。

### 総括

本研究により、ARE1 を介した *n*-アルカン依存的な転写調節は主に転写抑制因子である Yas3p の局在変化により制御されることが明らかとなった。また、Yas3p のリガンドとして PA や PIPs を特定し、*in vitro* において *n*-アルカン存在時に Yas3p とリン脂質 2 重膜との結合が増加することを示した。これらの結果から、小胞体に *n*-アルカンが存在する場合に Yas3p と PA あるいは PIPs の結合が増加することで Yas3p が小胞体に係留され、それにより Yas3p の核内への輸送が阻害されて ARE1 を介した転写が活性化される可能性が示唆された。

### 発表論文

- (1) Kobayashi S., Hirakawa K., Fukuda R., Ohta A., *Biosci Biotechnol Biochem* 72, 2219-2223 (2008)
- (2) Hirakawa K., Kobayashi S., Inoue T., Endoh-Yamagami S., Fukuda R., Ohta A., *J Biol Chem* 284, 7126-7137 (2009)