

博士論文

酵母 *Candida maltosa* における  
cytochrome P450 ALK 遺伝子群の転写誘導機構の解析

大友 量

①

博士論文

酵母 *Candida maltosa* における  
cytochrome P450 ALK 遺伝子群の転写誘導機構の解析

東京大学農学生命科学研究科応用生命工学専攻

平成6年度入学 大友 量

指導教官 高木正道

## 博士論文目次

序章	1
第1章 <i>Candida maltosa</i> における P450 ALK 遺伝子群の誘導現象	
1-1 材料と方法	
1-1-1 菌株と培地	7
1-1-2 誘導培養用培地への誘導剤の添加	9
1-1-3 プラスミドの構築	10
1-1-4 PCR 法	11
1-1-5 DNA 塩基配列の解析方法	12
1-1-6 <i>Candida maltosa</i> の形質転換法	12
1-1-7 $\beta$ -ガラクトシダーゼ活性測定法	12
1-1-8 mRNA の調製方法とノーザンハイブリダイゼーション	13
1-2 結果	
1-2-1 <i>Candida maltosa</i> の P450 は <i>n</i> -アルカン およびその誘導体によって転写レベルの誘導を受ける。	16
1-2-2 タイムコース実験によって明らかになった転写誘導の多様性	20
1-2-3 ALK2 遺伝子はペルオキシソーム増殖剤によっても 著しい転写誘導を受けた。	24
1-3 考察	
1-3-1 <i>n</i> -アルカン添加によって最初に引き起こされる転写誘導は 迅速な反応である	30
1-3-2 酵素活性との対応 (基質特異性と誘導特異性)	30
1-3-3 クロフィプレートによる P 450 ALK の誘導はノーザン解析、 レポーター遺伝子による解析、及びCO還元差スペクトルで 確認された。	31
1-3-4 他の酵母との誘導機構の共通性について	31
第2章 P450 ALK 遺伝子群の転写誘導に関する <i>cis</i> -配列の解析	
2-1 材料と方法	
2-1-1 プラスミドの構築	33
2-1-2 ノーザンハイブリダイゼーション	35
2-1-3 ゲル移動度シフトアッセイ	35
2-1-4 UV-架橋法	36

2-2	結果	
2-2-1	ALK5 プロモーターの欠失解析と ARR5 の同定	38
2-2-2	ARR5 に配列特異的に結合する蛋白質の検出	44
2-2-3	ALK2 プロモーター領域の欠失解析	47
2-3	考察	50
第3章	ALK5 の転写誘導に関与する <i>trans</i> 因子のクローニングの試み	
3-1	材料と方法	
3-1-1	菌株と培地	56
3-1-2	サザンハイブリダイゼーション	57
3-1-3	ARR5 のマルチマリゼーション	57
3-1-4	<i>Candida maltosa</i> の発現ライブラリーの構築	59
3-1-5	サウスウエスタン法	59
3-2	結果と考察	
3-2-1	他の生物での相同機構の探索	60
3-2-2	菌体内の <i>trans</i> 因子の deplete の試み	60
3-2-3	サウスウエスタン法の条件検討	60
3-2-4	サウスウエスタン法によるクローニングの試み	62
第4章	<i>Candida maltosa</i> における <i>in vitro</i> 転写系の構築と <i>trans</i> 因子の単離の試み	
4-1	材料と方法	
4-1-1	<i>Candida maltosa</i> における <i>in vitro</i> 転写法	65
1)	<i>in vitro</i> 転写に用いる鋳型の合成	65
2)	転写活性のある無細胞抽出液の調製法	66
3)	転写活性のある酵母核抽出液の調製法	67
4)	<i>in vitro</i> 転写法	68
4-1-2	ゲル移動度シフトアッセイ	70
4-1-3	DNA アフィニティーマトリックスを用いた 無細胞抽出液の分画	70
4-1-4	ヘパリンアガロース アフィニティーカラムを用いた 無細胞抽出液の分画	70
4-2	結果	
4-2-1	<i>in vitro</i> 転写に用いる鋳型の合成	71
4-2-2	転写活性のある無細胞抽出液の調製	71
4-2-3	転写活性のある酵母核抽出液の調製と それを用いた <i>in vitro</i> 転写	80
4-2-4	転写活性のある抽出液の分画	82



## 序章

水がその大部分を占める生体にとって環境中に存在する疎水性物質に対する応答は死活問題である。それらは特別な受容体や輸送系を介さずに生体内に侵入し、水に可溶性形（このような形になって初めて生体は物質を自分の思うところに輸送できるようになる）に代謝されない限りは生体内に蓄積し続けることになる。このような外来疎水性物質の酸化の最初のステップを触媒し、その解毒代謝に重要な役割を果たす酵素の代表的なものとして cytochrome P450 (以下 P450 と略す) を挙げるができる。

生体はまた、単に受動的に疎水性物質の侵入に対応しているだけでなく、それを積極的に利用するシステムをも有している。ステロイドホルモンや甲状腺ホルモン、あるいは脂溶性ビタミンといった疎水性生理活性物質のシグナル伝達物質としての利用である。これらは疎水性であるがゆえに容易に細胞膜を通過し、細胞内に存在する受容体と結合することできわめて低濃度で生体に刺激を伝えることができる。P450 のあるものはまたこのような内因性の疎水性物質の代謝 (ステロイドの生合成、脂質代謝、ビタミンDの活性化など) にも関与している。

P450 は生物界に非常に広範に存在している酵素である。還元型で一酸化炭素と結合して 450nm 付近に特徴的な吸収極大を示す一群のプロトヘム含有蛋白質であり、様々な疎水性の有機化合物への一原子酸素添加反応を触媒する。これまでに原核微生物から高等動植物に至るまで、多くの生物から実に 500 以上の遺伝子が報告され、解析が為されてきた。これらの1次構造には有意な相同性が見られ、巨大なスーパーファミリーを形成していることが明らかにされている。このことはこれら多種の P450 が共通の祖先を持ち、様々な基質に適應する形で多様な進化を遂げてきたことを示唆するものである。と同時に P450 の持つ機能が生物にとって非常に基本的でかつ非常に応用範囲の広いものであることを意味する。

一般に内因性疎水性物質の酸化に関与する P450 の基質特異性はかなり厳密なものであるが、薬物酸化能をもつものの基質特異性は異常に広く、また分子間でかなり重複している。疎水性物質からの生体防御という観点からはこの基質特異性の広さは合目的であると考えられる。このような柔軟性が、P450 が他に類を見ない多様な進化を遂げたことの大きな要因であり、また結果でもありと考えられる。

P450 の研究はまた、生体の疎水性物質に対する応答機構に関しても多くの知

見をもたらした。外来の疎水性物質代謝に関与する P450 の多くはその基質によって転写レベルで誘導される。このような誘導機構が P450 の進化と協調する形で多様化してきたことがうかがえる。従って P450 の有する基質特異性の多様性がそのまま転写誘導機構の多様性に反映されると考えられる。つまり P450 は疎水性物質による転写誘導研究における材料の宝庫なのである。Table 0-1 (Denison M. S. *et al.* (1995)) にはそのような P450 のうち代表的なものリストを示してある。

これらのうち幾つかについてはその転写誘導機構 (DNA 上の機能配列とそこに作用して転写活性化を指示する転写因子) が解析され、明らかにされてきている。これら疎水性物質の受容体は、概して細胞内に存在し細胞膜を通過してきた疎水性物質と直接結合することで活性化され転写誘導を行う、というリガンドの性質を反映した共通性を有している。そのような細胞内受容体のうち、核内受容体と総称される一群は近年精力的に研究が進められ、P450 同様、スーパーファミリーを形成していることが明らかにされてきた。グルココルチコイド、エストロゲン、甲状腺ホルモン、ビタミンA、ビタミンD 等の受容体は 2 個の Zn フィンガーから構成される DNA 結合ドメインと、その C 末端側に位置する  $\alpha$ -ヘリックスに富んだリガンド結合ドメインによって特徴づけられる共通のドメイン構造を有する、リガンド依存的な転写因子である。また一群のペルオキシソーム増殖剤による転写誘導に関与すると考えられる PPAR (後述) もこの 1 群に含まれる。

ホメオドメイン蛋白質や bZIP 型の転写因子が酵母から動植物に至るまで広く分布するのに対し、これら核内受容体蛋白質はこれまでのところ刺胞動物のサンゴやヒトデから哺乳動物に至る後生動物にしか存在が確認されておらず (梅園和彦 (1995)), 今後これらの原型にあたるものが下等真核生物にも見いだされるか否か、興味深い。

ダイオキシンや PCB (polychlorinated biphenyl) などのハロゲン化芳香族炭化水素 (HAH、halogenated aromatic hydrocarbon)、あるいはベンツピレン、メチルコラントレンといった多環芳香族化合物 (PAH、polycyclic aryl hydrocarbone) の受容体である AhR (aryl hydrocarbon receptor) による転写誘導も、これらの化合物がリガンドとして結合することから始まる。当初、その作用形式の類似性から AhR もステロイドホルモン受容体と同じファミリーを形成すると考えられてきたが、一次構造決定の結果、特徴的な構造として HLH ドメインのほか PAS ドメインをもつ、全く新しいタイプのリガンド依存性転写因子であることが明らかとなった。

**Table 0-1-1 P450 genes which are induced by exogenous hydrophobic compounds and their specific enzyme substrates**

Inducer	Cytochrome P450s	Specific P450 Substrate(s)
Some PAHs, HAHs, and PCBs	CYP1A1 CYP1A2 CYP1B1 CYP2A3	PAHs Drugs, steroids PAHs Steroids
Barbiturates, DDT, dieldrin, Some PCBs	CYP2A1 CYP2B1/2 CYP2H1/2 CYP2C1/6/7/11 CYP3A1/2 CYP6A1 CYP102/106	Steroids Drugs, steroids, PAHs Drugs, steroids, PAHs Steroids, fatty acids, drugs Steroids, drugs, antibiotics Pesticides Fatty acids
Peroxisome Proliferators	CYP2B1 CYP4A1/2/3/6/7 CYP73 CYP102	Drugs, steroids, PAHs Fatty acids Fatty acids Fatty acids
Dexamethasone, PCN, AGs	CYP3A1 CYP2B1/2 CYP2C6	Steroids, drugs, antibiotics Drugs, steroids, PAHs Steroids, fatty acids, drugs
<i>n</i> -Alkane and its derivatives	CYP52	<i>n</i> -Alkane and its derivatives

哺乳動物におけるフェノバルビタールによる転写誘導に関しては、現在のところそのプロモーター上の機能領域が明らかにされているだけであり、フェノバルビタール受容体の同定には至っていない。しかし興味深いことにフェノバルビタールによって転写誘導される P450 (P450BM3, CYP102) が原核生物である *Bacillus megaterium* において見いだされており、その上流に見いだされた機能配列 (Barbie Box と呼ばれている) は高等動物で見いだされた機能領域と配列上の相同性を有していた (He J-S. *et al.* (1991))。 *B. megaterium* においてはフェノバルビタール依存性の転写誘導に関与する因子として Bm3R1 が報告されており (Shaw G-C. *et al.* (1992)、誘導機構としては抑制因子である Bm3R1 がフェノバルビタール存在下ではそのオペレーターサイトから解離するというものだった (Shaw G-C. *et al.* (1993))。この場合もやはり、フェノバルビタールはリガンドとして Bm3R1 に直接認識されるのである。

P450BM3 はまた、ペルオキシソーム増殖剤 (以下 PP と略す) と総称される一群の化学物質 ([4-chloro-6-(2,3-xylylidino)-2-pyrimidinyl-thio] acetic acid (Wy-14,643)、methyl-2-[4-(*p*-chlorophenyl) phenoxy]-2-methyl propionate (methylclofenopate)、2-methyl-2-[*p*-(1,2,3,4-tetrahydro-1-naphthyl) phenoxy]-propionic acid (nafenopin) あるいは ethyl  $\alpha$ -*p*-chlorophenoxyisobutyrate (clofibric acid) など) によっても転写レベルの誘導を受ける。これらは構造上の共通性を持たない非変異原性の発癌物質であり (Schiestl R. H. *et al.* (1990))、齧歯類の肝細胞において細胞内膜構造や脂質代謝に大きな影響を与える事が知られている。

PP による遺伝子の転写誘導には、高等動物では核内受容体の一種であるペルオキシソーム増殖剤活性化受容体 (PPAR) (総説は Motojima K. (1993)、Auwerx J. (1992)、Gearing K. L. *et al.* (1994) を参照) が関与すると考えられている。近年、PPAR のサブメンバーが相次いで報告され、そのうちの幾つかについてはチアゾリジンジオン (Lehmann J. M. *et al.* (1995)) やプロスタグランジン類 (Forman B. M. *et al.* (1995)) が生体内において直接のリガンドとなっている事が指摘されてきた。しかし PP 自体に関してはこれらの受容体と結合するという直接的な証拠は得られておらず (酵母で PPAR 遺伝子を発現させてもこれらの薬剤に依存的な転写誘導が見られないこと (Henry K. *et al.* (1995)、Marcus S. L. *et al.* (1995)) から、PP が直接 PPAR のリガンドとなっているというモデルは現在ではむしろ否定的にとらえられている)、結局これらの物質の転写誘導機構に関しては高等動物では依然明らかにはされていない。

一方 *B. megaterium* における P450BM-3 の PP による転写誘導機構は、フェノバルビタールや脂肪酸と同様、PP が Bm3RI に直接結合することで、リプレッサーが DNA 結合性を失うことによるものであることが明らかにされている (English N. *et al.* (1994))。

興味深いことに PP による転写誘導現象は高等植物においても見いだされている (Reichhart D. *et al.* (1980)、Salaün J-P. *et al.* (1986)、Fonne-Pfister R. *et al.* (1987) など)。しかしそれらの機構については明らかではない。これらの報告から PP 応答性は生物界全般において脂質代謝と密接な関連を持っていると推察される。実際、酵母細胞で mouse PPAR  $\alpha$  を発現させることで PPRE を持つプロモーター支配下の遺伝子は脂肪酸に応答ようになる (Marcus S. L. *et al.* (1995))。また P450BM-3 のオペレーター配列には *Saccharomyces cerevisiae* の Pox-Box (Filipits M. *et al.* (1993)) あるいは ORE (Einerhand A. W. C. *et al.* (1992)、Einerhand A. W. C. *et al.* (1993)) と呼ばれる機能配列 (ペルオキシソーム関連遺伝子のプロモーター領域に見いだされており、これらの遺伝子の脂肪酸による転写誘導を指示する) と同性的のあることも指摘されている (English N. *et al.* (1994)。Fig. 2-3-1 参照)。PP と脂肪酸とでその関与する転写誘導の機構においても何らかの共通性があるのか否か、あるいはそれらの機構は生物間で共通性があるのか否か、興味深い。

このように振り返ってみると疎水性物質による転写誘導機構の解析は、親水性物質のそれに比べて知見の乏しいのに驚かされる。殊に高等動物以外では幾つかのトピックが散在しているのみといった印象すら受ける。その意味において P450 のように生物界全般にわたって広く存在が認められる、疎水性物質を基質とする酵素の転写誘導機構の解析は魅力的なテーマであるといえる。前述のように P450 の疎水性物質による誘導機構が酵素の進化と協調する形で多様化してきたという仮説は、逆に言えば高等真核生物で見いだされた誘導機構の原型にあたるものももっと下等な生物で見いだされる可能性を示唆する。

本研究において対象とした *Candida maltosa* は *n*-アルカン資化能を有する無孢子酵母であり、*n*-アルカンを単一炭素源として培養した場合、その資化に関与するチトクローム P450 (P450 ALKs) を転写レベルで誘導する。また *n*-アルカン培養時に小胞体 (ER) 膜など細胞内膜系の顕著な発達が観察されるが、この現象は P450 ALKs の大量発現によっても認められた。すなわち本菌におけるこのような細胞内構造の劇的変化においても *n*-アルカンを炭素源とすることによる P450 ALKs をはじめとした遺伝子の転写活性化が最初の重要なステップであると考えられる。

生物の *n*-アルカン応答性の転写誘導機構に関しては解析例が少なく、わずかに *Pseudomonas oleovorans* の持つ *n*-アルカン資化遺伝子群 (*alk* genes) の制御因子である *alkS* (Eggink G. *et al.* (1988)) について部分的な塩基配列が報告されているにすぎない。ほかにも *n*-アルカンを資化代謝できる微生物は多く知られている (Radwan S. S. *et al.* (1993) 参照) が、*C. maltosa* のようにその初期酸化に関与する遺伝子群の全貌が明らかとされている例はほかにない。さらに本菌では同じ遺伝子ファミリー (CYP52) に属する構造的に相関した複数の P450 ALK 遺伝子が見いだされており、これらは本菌が種々の疎水性物質の代謝能を獲得する過程でそれに応じた多様な進化を遂げてきた結果と考えられている。従ってこれら複数の遺伝子の誘導性の多様性を解析することにより、本菌における P450 ALK の誘導機構に関しても進化の面からの貴重な示唆が得られると期待される。この知見は他の真核生物一般の疎水性物質への応答機構とその進化を考える上でも有用であろうと考えられる。

以上の背景をもとに、本研究は *C. maltosa* における P450 ALKs の転写誘導機構を明らかにし、それを一つのモデルとして真核生物の疎水性物質に対する応答機構を考察することを目的としている。

本論文は4章よりなる。第1章では *C. maltosa* P450 ALKs の転写誘導の特徴について解析を行った。第2章においてはそれらのプロモーター領域の解析を行い、*n*-アルカンによる転写誘導に重要と考えられる領域を特定し、またそこに配列特異的に結合する細胞内蛋白質の存在を示した。その DNA 結合性蛋白質をコードする遺伝子の単離を試みた第3章では、クローニングの成功には至らなかったが、この蛋白質の持つ幾つかの特性を明らかにすることが出来た。第4章では *in vitro* 転写系を構築し、*n*-アルカンによる誘導現象の *in vitro* での再構築とその生化学的解析を試みた。

本研究に用いた基本的な実験的手法に関しては本文中特に触れなかったが、大腸菌および核酸の基本的な取り扱い (大腸菌の形質転換、プラスミドの回収法、核酸の精製法、核酸の定量法、核酸の電気泳動法等) に関しては成書 (Sambrook J. *et al.* (1989)、Ausubel F. M. *et al.* (1994)) を、蛋白質の基本的な取り扱い (SDS-変性アクリルアミドゲル電気泳動、硫酸沈澱、透析、蛋白質の定量法など) に関しては成書 (Ausubel F. M. *et al.* (1994)、堀尾武一ら (1981)) を、転写因子研究の基本的な教科書としては成書 (田村隆明編 (1993)、堀越正美訳 (1996)) を参照した。その他の手法に関しては論文中のそれぞれの箇所ですべて詳述した。

## 第1章 *Candida maltosa* における P450 ALK 遺伝子群の誘導現象

当研究室ではこれまでに *Candida maltosa* の *n*-アルカン資化能について解析し、その初期酸化に関与する8種の P450 ALK 遺伝子群 (以下 ALK 遺伝子群) を単離・解析してきた (Ohkuma M. *et al.* (1991a), Ohkuma M. *et al.* (1991b), Ohkuma M. *et al.* (1995))。これらは CYP52 ファミリーに属する一群であり、偽遺伝子と考えられている ALK4 を除いて、すべてその基質である *n*-アルカンによって転写レベルで誘導される (Ohkuma M. *et al.* (1995))。また、最近これら P450 ALK の基質特異性の差異についても解析がなされ、これらの P450 が *n*-アルカン資化において基質の違いや資化の段階に応じた役割分担を行っている可能性も示唆されている (Zimmer T *et al.* (1996))。

本章ではこのような背景に基づき、ALK 遺伝子群の誘導機構の解析を始めるにあたって、その誘導特異性を 1) 誘導基質 2) 誘導時間 3) 他の酵母との誘導機構の共通性の検討、の3点から検討した。

### 1-1 材料と方法

#### 1-1-1 菌株と培地

以下の菌株を用いた。

##### *Escherichia coli* HB101

F<sup>-</sup>, *supE44*, *hsdS20*(rB<sup>-</sup>mB<sup>-</sup>), *recA13*, *ara14*, *proA2*, *lacY1*,  
*galK2*, *xyl-5mtl-1*, *rpsL20*(Sm<sup>r</sup>), λ<sup>-</sup>

##### *Escherichia coli* MV1190

Δ(*lac-proAB*), *thi*<sup>-</sup>, *supE*, Δ(*sr1recA*)306::Tn10 (Tet<sup>r</sup>)[F<sup>-</sup>, *traD36*,  
*proAB*, *lacI*<sup>q</sup>, *lacZ*ΔM15]

##### *Escherichia coli* SURE

*e14*<sup>-</sup> (*mcrA*), Δ(*mcrCB-hsdSMR-mrr*)171, *endA1*, *supE44*, *thi-1*,  
*gyrA96*, *relA1*, *lac*, *recB*, *recJ*, *sbcC*, *umuC*, Tn5 (Kan<sup>r</sup>), *uvrC*  
[F<sup>-</sup>, *proAB*, *lacI*<sup>q</sup>, *lacZ*ΔM15, Tn10 (Tet<sup>r</sup>), *Amy*, *Cam*<sup>r</sup>]

*Escherichia coli* MC1061

*hsdR*, *mcrB*, *araD139*,  $\Delta(\text{araABC-leu})7679$ , *AlacX 74*, *galU*,  
*galK*, *rpsL*, *thi*

*Candida maltosa* IAM12247 (以下 IAM12247)

野性株

*Candida maltosa* CHA1 (以下 CHA1 (Kawai S. *et al.* (1991))

*his5*, *ade1*

*Candida maltosa* CHAU1 (以下 CHAU1 (Ohkuma M. *et al.* (1993))

*his5*, *ade1*, *ura3*

*Candida maltosa* DA1235-12 (以下 DA1235)

*his5*, *ade1*, *ura3*, *alk1::URA3/alk1::HIS5*,  $\Delta\text{alk2-alk3}$ ,  $\Delta\text{alk5}$ ,

*Saccharomyces cerevisiae* DBY747

*MATa*, *his3- $\Delta$ 1*, *leu2-3*, *leu2-112*, *ura3-52*, *trp1-289a*, *gal<sup>s</sup>*, *can1*  
, *CUP<sup>r</sup>*

*Saccharomyces cerevisiae* R27-1B-7C

*MATa*, *his3*, *leu2*, *ura3*, *trp1*

*Yarrowia lipolytica* CXU1 (飯田敏也、未発表)

*ade1*, *ura3*

以下の培地を使用した。

LB 培地            1% Bacto-Tryptone (Difco)、0.5% Yeast Extract (Difco)  
                      0.5% NaCl

必要に応じて ampicillin (SIGMA) を終濃度100 $\mu$ g/mlで添加した。

YEPD 培地        2% Polypepton (和光)、2% glucose (和光)  
                      1% Yeast Extract (Difco)

SD 培地      0.17% Yeast Nitrogen Base  
                  (w/o amino acid and ammonium sulfate) (Difco)  
                  0.5% 硫酸アンモニウム、2% glucose (和光)  
必要に応じて adenine、uracil、L-histidine、L-leucine、L-tryptophan をそれぞれ終濃度 24 $\mu$ g/ml で添加した。

誘導培養用培地    0.17% Yeast Nitrogen Base  
                  (w/o amino acid and ammonium sulfate) (Difco)  
                  0.5% 硫酸アンモニウム、1% glycerol (和光)

これに誘導剤をそれぞれの濃度で添加した (下記参照)。  
ただし *n*-アルカンを炭素源兼誘導剤として用いたときは特に断らない限り glycerol は除いた。必要に応じて adenine、uracil、L-histidine、L-leucine、L-tryptophan をそれぞれ終濃度 24  $\mu$ g/ml で添加した。

以上の培地を液体培地として用いる場合にはアンチホーム AF エマルジョン (ナカライ) を終濃度 0.02% で、固体培地として用いる場合には寒天を 2% に添加した。

#### 1-1-2 誘導培養用培地への誘導剤の添加

本章で誘導剤として用いた物質はすべて疎水性のものである。そこで以下の要領で液体培地に添加した。

- 1) 常温で液体のもの (*n*-アルカン、脂肪酸エステル、クロロアルカン)  
そのまま培地に添加し、ボルテックスによって分散させた。
- 2) 常温で固体のもの (脂肪酸、アルコール)  
水中で加熱溶解し、激しく攪拌しながら冷却することでエマルジョンとしてから培地に加えた。
- 3) ベルオキシソーム増殖剤  
DMSO に溶解して培地に加えた。この際、培地中の DMSO の終濃度は 0.5% に統一した。

### 1-1-3 プラスミドの構築

ALK プロモーターの活性を定量するためのプロモータープローブベクター pPL1、およびその誘導体 (pPL-A1、pPL-A2、pPL-A3、pPL-A35、pPL-A5 および pPL-RED) に関しては文献 (Ohkuma M *et al.* (1995a)、村岡真一郎ら、(1994)) 参照。

同様のことを DA1235 株中で検討するため pPL1 と同じタイプのベクターで、URA3 をマーカーとするプラスミド pPLU1 を構築した。C. maltosa の URA3 をマーカーとする YCp 型プラスミド pUTU1 (Wolf K. (1995)、p537) を Pvu II によって消化し、マーカーおよび複製配列を含む約 5kbp の断片をアガロースゲルより回収した。また、pPL1 を Pvu II 消化し、Kluyveromyces lactis の LAC4 構造遺伝子を含む約 3.8 kbp の断片をアガロースゲルより回収した。両者を連結し、Hin dIII による消化パターンから pPL1 と同じ方向に lac4 が挿入されたものを pPLU1、逆向きのもを pPLU2 とした。最後に pPL-A1~5 および pPL-RED を Sph I と Cla I によって消化してプロモーターおよび lac4 構造遺伝子の上流部分を含む断片を切り出し、pPLU1 の Sph I-Cla I 部位に挿入して pPLU-A1~5 および pPLU-RED とした。

他の酵母での ALK 遺伝子プロモーターの機能を検討するために、大腸菌 lacZ をレポーター遺伝子とする一連のプラスミドを構築した。また、誘導レベルを標準化するために S. cerevisiae の CYC1 遺伝子のコアプロモーター (以下 CYC1 コアプロモーター) を用いた。

大腸菌の lac オペロン全領域を pBR327 にクローニングしたプラスミド pLAC10 を鋳型とし、オリゴヌクレオチド 5'-CAC ACA GTC GAC AGC TAT GAC C-3' 及び 5'-TTC GCG AAA TAC GGG CAG ACA TG-3' をプライマーとして、PCR 法により上流に Sal I 部位を導入した lacZ 遺伝子を取得し、平滑末端化及び末端リン酸化の後に pUC18 の Sma I 部位に挿入した。ここから pUC 上の lacZ $\alpha$  と順向きに挿入されたものを選択し (pUC18LZ)、Sal I-Bam HI 部位に挿入し、再び lacZ $\alpha$  と順向きに挿入されたものを選択した (pUC19LZ)。増幅された配列は上流側の塩基配列を決定することによって目的のものであることを確認した。また、pUC19LZ においては pUC 上の lacZ $\alpha$  と挿入された lacZ とがインフレームで連結している事から大腸菌 MC1061 株に導入し IPTG (Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranoside) 及び X-gal (5-Bromo-4chloro-3-indoyl- $\beta$ -D-galactoside) の存在下で濃青色の発色を確認し、機能的に正常な  $\beta$ -ガラクトシダーゼ遺伝子が得られたと判断した。

CYC1 コアプロモーターは *S. cerevisiae* DBY747 株の全 DNA (第3章) を鋳型とし、オリゴヌクレオチド 5'-AAT CCT CGA GCA GAT CCG C-3' 及び 5'-CTC GAG AAG TAT AGT AAT TTA TGC-3' をプライマーとして PCR によって取得した。増幅した断片は *Xho* I で消化後、アガロースゲルから切り出して pBluescript KS M13- (STRATAGENE) の *Sal* I-*Xho* I 部位に挿入し、下流側の *Xho* I 部位が残っているものを選択した (pB-CYC)。得られた断片は塩基配列を決定して確認した。

pBS-CYC より *Pst* I-*Xho* I による消化で切り出した CYC1 コアプロモーターを pUC19LZ の *Pst* I-*Sal* I 部位に挿入して pCYC-LZ を得た。pCYC-LZ を MC1061 株に導入すると X-gal 存在下で薄い青色を呈する。これは CYC1 コアプロモーターが大腸菌で弱い活性を有することによるものであるとされている (Guarente L. *et al.* (1981))。

pBA2pHH 及び pBA5pHH (第2章参照) より *Pst* I-*Xho* I 消化によって切り出した *ALK2* プロモーター及び *ALK5* プロモーターを pUC19LZ の *Pst* I-*Sal* I 部位に挿入して pA2-LZ 及び pA5-LZ を得た。

pCYC-LZ、pA2-LZ、pA5-LZ からそれぞれ *Bam* HI-*Hind* III による消化によってプロモーターと *lacZ* のユニットを切り出し、YCP50 の *Bam* HI-*Hind* III 部位に挿入して Ycp-CYCLZ、Ycp-A2LZ、Ycp-A5LZ を構築し、*S. cerevisiae* R27-1B-7C 株に導入した。

また pCYC-LZ、pA2-LZ、pA5-LZ の *Sma* I 部位 (*lacZ* の下流) に *Y. lipolitica* の YCp 型プラスミド pSUT1 (飯田敏也、未発表) から *Nsp* V、*Eco* T22I 消化によって切り出した *CEN*、*ARS* 及び *URA3* を含む断片を挿入して得られたプラスミドを *Y. lipolitica* CXU 株に導入した。

なお、DNA 断片のアガロースゲルからの回収については、500bp より大きな断片に関しては GENE CLEAN II (フナコシ) あるいは Prep-A-Gene DNA Purification Systems (Bio-Rad) を用いたマトリックス吸着法で、それ以下の短い断片に関してはウルトラフリー遠心濾過ユニット (MILLIPORE) を用い、それぞれ添付説明書に従って行った。

#### 1-1-4 PCR 法

PCR による遺伝子の増幅には TakaRa LA PCR Kit Ver.2 (宝酒造) を用い、添付説明書に従って行った。PCR 反応におけるサーマルサイクラーは PCR Thermal Cycler MP TaKaRa を用いた。PCR の反応条件は特に断らない限り

(94℃、1分)→(98℃、20秒、65℃、3分を30サイクル)→(72℃、10分)で行った。

#### 1-1-5 DNA 塩基配列の解析方法

DNA の塩基配列の解析には DNA Sequencing System Model 373A (ABI)、および同社の Taq Dye Primer Cycle Sequencing Kit もしくは Taq Dye Terminators Cycle Sequencing Kit を用いるか、または、DNA Sequencer Model 4000 (LI-COR)、および SequiTherm Excel™ Long Read™ Cycle Sequencing Kit (Epicenter Technology) を用いた。いずれの場合も添付説明書にしたがって反応を行い、解析した。

#### 1-1-6 *Candida maltosa* の形質転換法

*C. maltosa* の形質転換にはエレクトロポレーション法を用いた (Wolf K. (1995) p541-542)。YEPD 培地 10ml で 30℃ 一昼夜振盪培養した菌体を遠心分離によって集菌し、氷冷した 1M ソルビトールで 2 回洗浄した後、200μl の氷冷 1M ソルビトールまたは氷冷 15% グリセロール (-80℃ で凍結保存する場合) に懸濁しコンピテント細胞とした。コンピテント細胞 40μl に対し TE 緩衝液に溶解した DNA 1μl を添加し、Bio-Rad Gene Pulser と電極間の間隔が 0.2cm のキューベットを用い、200 ohm、25μF、1.9kV の条件でエレクトロポレーションを行った。形質転換した細胞を 200μl の SD 培地に懸濁して選択培地に塗布し、30℃、2 昼夜静置培養して得られたコロニーを形質転換体として用いた。

#### 1-1-7 β-ガラクトシダーゼ活性測定法

ALK1、ALK2、ALK3、ALK5 の 5' 上流域をレポーター遺伝子 *lac4* の上流に連結したプラスミド (後述) を導入した *C. maltosa* CHA1 株を、2ml の SD 培地に 1 白金耳量植菌し 30℃ で一昼夜振とう培養し (前々培養)、ここから 1ml を 100ml の SD 培地に植菌してさらに 30℃ で 12 時間振とう培養した (前培養)。遠心分離 (約 3,000rpm、5min、4℃) によって集菌し、滅菌水で洗浄した後、培養液の約 1/10 量の滅菌水に懸濁して、別に用意した誘導培養用培地 9ml に菌体懸濁液 1ml を加えて 30℃ で振とう培養 (誘導培養) した。誘導培養後の菌体を集菌 (3,000rpm、5min、4℃) ・洗浄した後、Z-緩衝液 (下記) 1ml およびグ

ラスビーズを適量 (約 200 $\mu$ l) 加え、ボルテックスミキサーによって菌体を破碎し、遠心分離 (約 3,000rpm、4 $^{\circ}$ C で 5min の上清をさらに 15,000rpm、4 $^{\circ}$ C で 20min の遠心) によって未破碎の細胞をのぞいた上清を回収し、細胞抽出液とした。これを Z-緩衝液で適当に希釈した後、500  $\mu$ l に対し、100 $\mu$ l の ONPG (o-nitrophenyl- $\beta$ -D-galactopyranoside) 溶液を加えて 30 $^{\circ}$ C で適当な時間インキュベートし、最後に 250 $\mu$ l の 1M 炭酸ナトリウム溶液を加えて反応を停止した。この反応により細胞抽出液中の  $\beta$ -ガラクトシダーゼ活性によって ONPG から ONP が遊離する。ONPG 溶液を加える前に 1M 炭酸ナトリウム溶液を加えて反応を停止したものをコントロールとして、遊離した ONP 量を 420nm の吸光度差を測定することにより定量した。一方で細胞抽出液の蛋白質濃度を Bradford らの方法に基づく Bio-Rad の発色液 (Bio-Rad Protein Assay) を添付説明書に従って用い、牛血清アルブミンを標準として定量した。

活性値の計算は、1 unit を 30 $^{\circ}$ C で 1 分間あたり 1 nmol の ONP を生ずる酵素量とし、反応に用いた蛋白質溶液の総蛋白質濃度 (mg/ml) で割って、菌体内の可溶性蛋白質 1 mg あたりの活性値を求めた。すなわち

[ $\beta$ -ガラクトシダーゼ活性 (unit/mg protein)]

$$= 79.8 \times [420\text{nm の吸光度差}] / [\text{総蛋白質濃度 (mg/ml)}] / [\text{反応時間 (分)}]$$

Z-緩衝液     0.06M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>、0.04M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、0.001M MgSO<sub>4</sub>  
                   0.05M  $\beta$ -メルカプトエタノール

ONPG 溶液     リン酸緩衝液 (0.06M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>、0.04M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>)  
                   に ONPG を終濃度 4mg/ml で溶解

#### 1-1-8 m-RNA の調製方法とノーザンハイブリダイゼーション

酵母からの全 RNA の調製は hot phenol 法 (Schmitt M. E. *et al.* (1990))、あるいはグラスビーズ法の変法 (下記) で行った。前項と同様の方法で培養した菌体から得られた全 RNA を TEN 緩衝液に溶解し、ホルムアミドを含む変性アガロースゲルで分離した後、Hybond N<sup>+</sup> ナイロンメンブレン (Amersham) にブロットし、ノーザンハイブリダイゼーションを行った。それぞれの *ALK* 遺伝子に特異的なプローブについては文献 (Ohkuma M. *et al.* (1995b)) 参照。56 $^{\circ}$ C で一晩ハイブリダイゼーションを行った後、2x SSPE、1x SSPE を含む洗浄液で順次

洗浄し、結果をバイオイメージアナライザー (Fuji Photo Film) で解析した。

TEN 緩衝液 10mM Tris-HCl pH8.0、10mM NaCl、1mM EDTA

20xSSPE 3.6M NaCl、174.1mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>、25.9mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>  
20mM EDTA

100x デンハルト溶液 2% Bovine serum albumin 2% polyvinyl pyrrolidone  
2% Ficoll400 (Pharmacia Biotech)

ハイブリダイゼーション溶液 5xSSPE、50% formamide、5x デンハルト溶液  
0.5% SDS

洗浄液 適当な濃度の SSPE を含む0.1% SDS

#### <グラスビーズ変法による酵母からの全 RNA の回収法>

##### A) 菌体の培養と貯蔵

- 1) 培養液 10ml を 3,000rpm で 3 分間遠心。
- 2) 上清を捨て、液体窒素で菌体を凍結する。
- 3) 凍結菌体の重量を測定する。
- 4) RNA 抽出を行うまで菌体を -70℃ で保存。

##### B) RNA の調製

- 5) 凍結菌体 100-200mg につき 250μl の LETS 緩衝液、300μl の 0.1M Tris-Cl (pH 8.0) 飽和フェノールおよび 1g のグラスビーズを加える。
- 6) ボルテックスミキサーによる菌体の破碎 (1 分 x 5 回)。
- 7) 500μl の LETS 緩衝液を加えて混合し、3,000rpm で 5 分間遠心。
- 8) 上清を新しいエッペンドルフチューブに移し、15,000rpm で 15 分間冷却遠心。上清に 1/10 量の 5M LiCl を加え、-20℃ で 3 時間以上おいて RNA を沈殿させる。
- 9) 6,000rpm で 10 分間遠心した沈殿を 500μl の水に溶解した後、1ml のエタノールを加えてドライアイス上に 5 分間以上おく

10) 15,000rpm で10分間遠心し、RNAを回収する

LETS緩衝液；0.1M LiCl、10mM EDTA、10mM Tris-HCl (pH 7.5)、  
0.2% SDS

## 1-2 結果

1-2-1 *Candida maltosa* の P450 は *n*-アルカンおよびその誘導体によって転写レベルの誘導を受ける。

Fig. 1-2-1 に pPLA1、pPLA2、pPLA35 および pPLA5 を導入した CHA1 株を、グリセロールを基本炭素源とし、各種 *n*-テトラデカン誘導体を補った培地で 12 時間培養した菌体抽出液の  $\beta$ -ガラクトシダーゼ活性を示した。

この結果が示すように、これら *C. maltosa* における主要な 4 種の P450 遺伝子の転写は *n*-アルカンおよびその誘導体の存在によって活性化された。誘導体による転写活性化の度合いは各遺伝子によって異なっており、ALK1 および ALK3 ではクロロテトラデカン以外の *n*-アルカン誘導体による転写の活性化は *n*-アルカンで誘導を行った場合のそれと比較して弱かった。一方、ALK5 は *n*-アルカン誘導体においても *n*-アルカンと同程度の誘導性を示した。ALK2 では脂肪酸による誘導がやや弱かった。

テトラデカンの培地への添加量による誘導性の差異はそれほど認められなかった。一般に *n*-アルカンの様な非常に疎水性の高い物質は直接細胞膜にとけ込み、それ自体がシグナルとなって細胞の応答を引き起こすと考えられる。ALK 遺伝子の転写誘導には 0.1% 程度のアルカンが充分シグナルとして機能すると考えられた。

ALK5 など *n*-アルカン酸化の中間代謝産物によっても比較的強く誘導される P450 遺伝子の *n*-アルカンによる転写誘導が、他の P450 による *n*-アルカン酸化の副次的な影響によるものではないことを確認するために、主要な 4 種の P450 遺伝子 (ALK1、ALK2、ALK3、ALK5) の破壊によって *n*-アルカン資化能を失った株 (DA1235) におけるプロモーター活性を検討した。結果を Fig. 1-2-2 に示す。この図が示すようにいずれの P450 遺伝子のプロモーターも DA1235 株中で *n*-アルカンによって強く活性化されていた。このことは *n*-アルカンによる転写誘導は *n*-アルカンの資化とは独立した、アルカン自体がシグナルとなって細胞に作用した結果であることを示している。

DA1235 株に導入された (ALK プロモーター) + (LAC4) のユニットは pPL1 を用いて作成したものと基本的にと同じ構造をしているにも関わらず、全体的な誘導レベルがやや高かった。この結果が導入したプラスミドの違いによるものではない、ということは同じ pPLU1 を用いて構築したプラスミドを CHA1 に導入した形質転換体では誘導レベルが非常に低いという観察(データは示さ

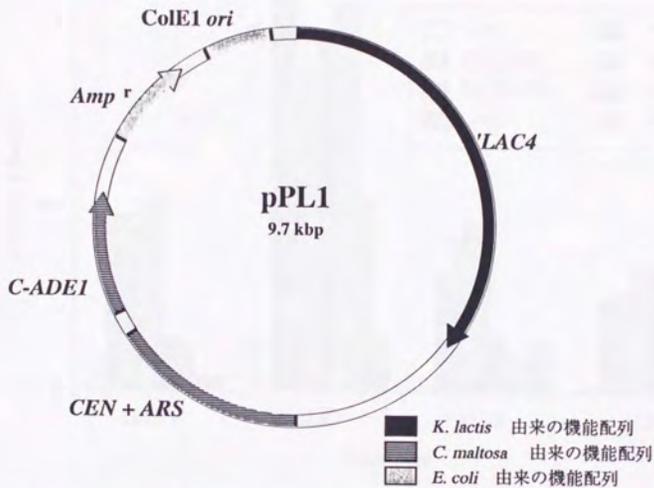


Fig. 1-2-1 様々な *n*-アルカン誘導体による  
各種 ALK プロモーターの誘導レベル ( 12 時間誘導)

活性測定に用いたプロモータープローブベクター pPL1 の簡単なマップを示した。このプラスミドは pUC19 をベースに構築されており、LAC4 上流の pUC19 のマルチクローニングサイトに由来する *Sma*I、*Xba*I、*Sal*I、*Sse* 8387I および *Sph*I 認識部位に目的のプロモーター断片を挿入できる。挿入した断片の配列は M13 RV プライマーを用いて解析できる。  
なおこの C-ADE1 を C-URA3 に置換して pPLU1 とした (本文参照)。

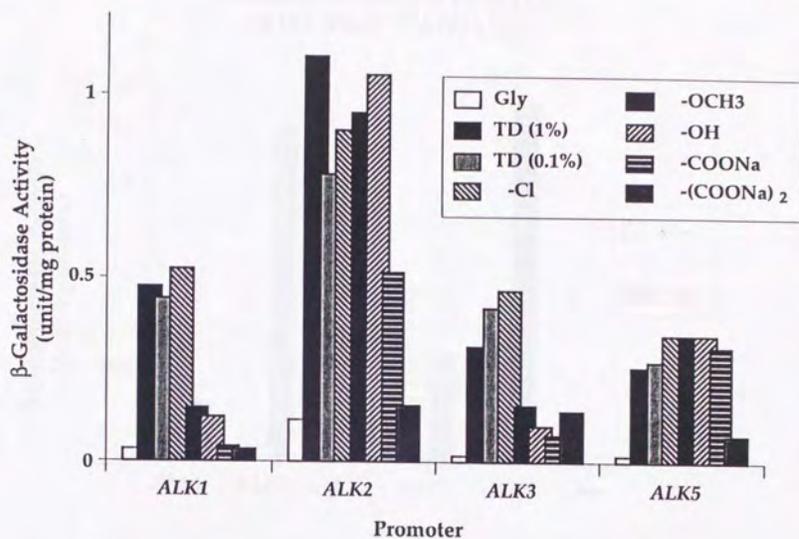


Fig. 1-2-1 (続き) 様々な *n*-アルカン誘導体による  
各種 P450 ALK プロモーターの誘導レベル (12時間誘導)

pPL-A1, pPL-A2, pPL-A35 (pPL-A3 より高い活性を有する。第2章考察参照)、およびpPL-A5 を形質転換した野生株を用いてそれぞれの誘導培養開始後 12 時間後の  $\beta$ -ガラクトシダーゼ活性を測定した。凡例は Gly, グリセロール(誘導剤を添加しないコントロール); TD(1%), 1% *n*-テトラデカン; TD, 0.1% *n*-テトラデカン; -Cl, 1-クロロテトラデカン; -OCH<sub>3</sub>, ミリスチン酸メチル; -OH, 1-テトラデカノール; -COONa, 1-テトラデカン酸ナトリウム (ミリスチン酸ナトリウム); -(COONa)<sub>2</sub>, 1,14-テトラデカン2酸2ナトリウム

Promoter Activity of *P450*ALKs  
in the Strain DA1235-121

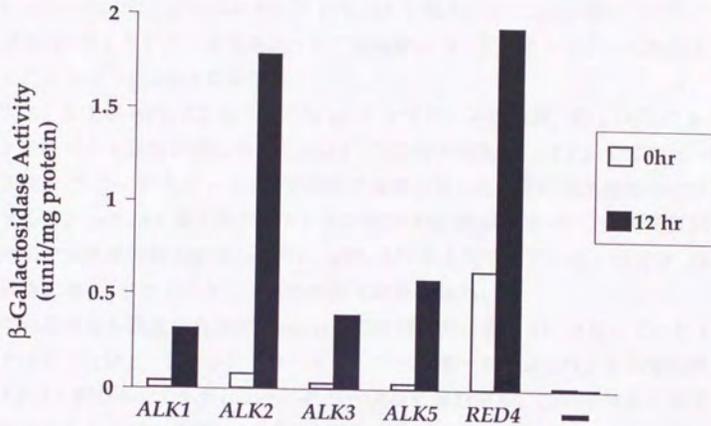


Fig. 1-2-2 *P450* 破壊株 (DA1235-121) における  
各 *P450* ALK プロモーターの活性

pPLU-A1 ~ A5 を導入した DA-1235 株の誘導培養開始直前および *n*-アルカン存在下 12時間誘導培養を行った場合の  $\beta$ -ガラクトシダーゼ活性を比較した。  
RED, pPLU-RED 導入株; -, pPLU1 (ベクター) 導入株

ない) から明らかである。栄養要求性の違いが何らかの形で転写レベルに影響しているのかも知れない。

#### 1-2-2 タイムコース実験によって明らかになった転写誘導の多様性

pPL-A1、pPL-A2、pPL-A3 および pPL-A5 を導入した CHA1 株について、それぞれ *n*-テトラデカンを炭素源として経時的に  $\beta$ -ガラクトシダーゼ活性を測定した結果を Fig. 1-2-3 に示した。

pPL-A1 および pPL-A2 導入株では *n*-テトラデカン添加後、約 1 時間で  $\beta$ -ガラクトシダーゼ活性が検出され、ALK1 では約 6 時間後、ALK2 では約 10~16 時間後まで  $\beta$ -ガラクトシダーゼ活性の増加が見られ、その後活性値は次第に低下した。pPL-A5 導入株ではアルカン添加後約 10 時間までと 24 時間以降の 2 段階の活性値の増加が見られた。pPL-A3 導入株ではアルカン添加後 24 時間以降に  $\beta$ -ガラクトシダーゼ活性の増加が見られた。

いずれの場合も総蛋白質濃度 (mg/ml) は時間と共に緩やかに増加していた (データは示さない)。またコントロールとしてベクターである pPL1 を形質転換した CHA1 株の  $\beta$ -ガラクトシダーゼ活性値は培養期間中、低いレベルでほぼ一定であることは別に確認した (データは示さない)。

以上の LAC4 をレポーターとして用いた系で観察された現象が *in vivo* の状況を反映したものである事を確認するためにホストとして用いた CHA1 株をテトラデカンを炭素源として培養し、経時的に全 RNA を回収し、ALK1、2、3、5 にそれぞれ特異的なプローブを用いてノーザン解析を行った。この際、*S. cerevisiae* の ACT1 遺伝子をプローブとして得られたシグナルを内部コントロールとして各シグナルを標準化した。得られたシグナルをイメージアナライザーで画像処理した結果を Fig. 1-2-4 (A) に示した。さらにそれぞれのシグナル強度を定量し、バックグラウンド値を差し引いた後に、同様の処理をしたアクチンのシグナル強度で割った結果をグラフ化して Fig. 1-2-4 (B) に示した。

ALK1 および ALK5 では、最も強いシグナルはアルカン培養開始後 1 時間のサンプルで得られたのに対し、ALK3 では培養時間が経過するにしたがって強いシグナルが観察された。また ALK5 では 24 時間のサンプルからも 1 時間のサンプルと同程度のシグナルが得られた。ALK2 では培養期間全体に渡ってシグナルが観察されたが 38 時間後のシグナルが最も強かった。いずれも 0 時間のサンプル、あるいはグルコースを炭素源として培養した菌体より調製したサン

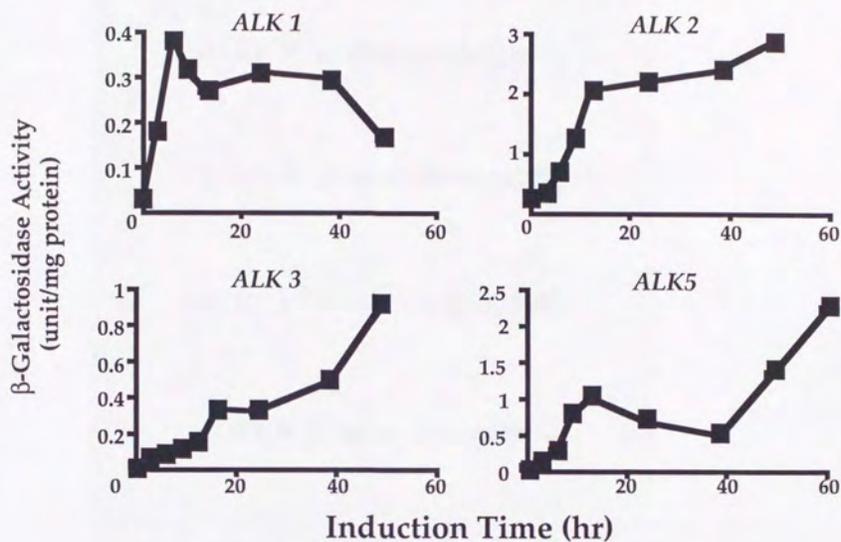


Fig. 1-2-3 P450 ALK プロモーター活性のタイムコース  
( $\beta$ -ガラクトシダーゼをレポーターとした解析)

横軸は誘導培養開始後の経過時間 (hr) を、縦軸は各形質転換体の  $\beta$ -ガラクトシダーゼ活性を示す。

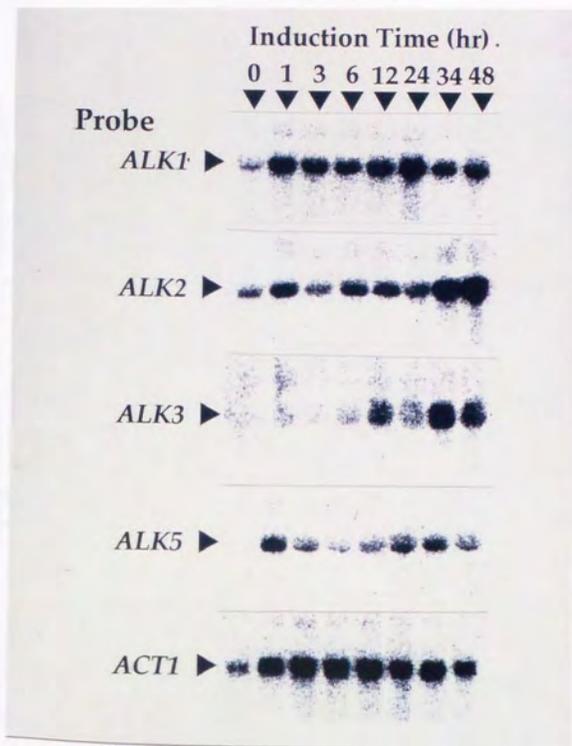


Fig. 1-2-4 A P450 ALK プロモーター活性のタイムコース  
(ノーザンハイブリダイゼーションによる解析)

得られた結果をイメージアナライザーにより画像解析した。  
上の数字は誘導培養開始後の経過時間 (hr) を示す。

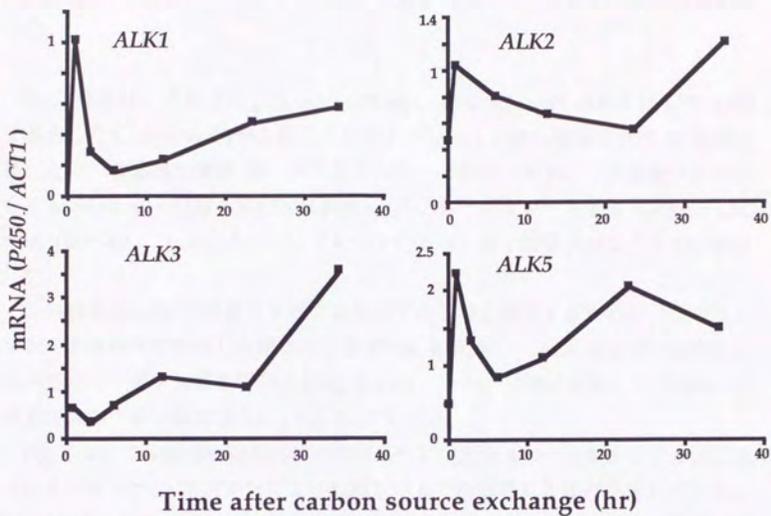


Fig. 1-2-4 B *P450 ALK* プロモーター活性のタイムコース (続き)  
 (ノーザンハイブリダイゼーションによる解析)

(A) (前頁) で得られたシグナル強度をアクチンを内部コントロールとして標準化し、  
 グラフ化した。縦軸はシグナル強度の相対値を表す。

ル(データは示さない)では有為なシグナルは観察されなかった。

1-2-3 ALK2 遺伝子はベルオキシソーム増殖剤によっても著しい転写誘導を受けた。

Fig. 1-2-5 は、それぞれ pPL-A1、pPL-A2、pPL-A3、pPL-A5 及び pPL-RED を導入した *C. maltosa* CHA1 株をクロフィプレートを含む誘導培地で 12 時間培養した時の菌体抽出液の  $\beta$ -ガラクトシダーゼ活性である。この結果から少なくとも ALK2 と RED4 (NADPH P450 レダクターゼをコードする (Ohkuma M. *et al.* (1995a)). ) は、クロフィプレートによって強く誘導されることが示唆された。

この結果が *in vivo* の現象を反映するものである事を確認するために、クロフィプレート存在下で培養した菌体から全 RNA を抽出し、ALK 遺伝子 mRNA についてのノーザン解析を行った (Fig. 1-2-6)。また、同様に培養した菌体の CO 還元差スペクトルを測定した (Fig. 1-2-7)。

Fig. 1-2-6 では誘導培養開始後 2 時間以内に主要な 4 つの P450 全てが先に述べたように *n*-テトラデカンにより転写レベルで誘導される事が示されている。0.5mM のクロフィプレート存在下で培養した菌体では、まず ALK2 の転写が 2 時間以内に誘導され、6 時間後には ALK3 の mRNA の増加も観察された。ALK1 は長時間 (40 時間以上) の培養によってのみ誘導されたが、ALK5 プロモーターからの転写は実験期間を通じて、非常に少なかった。

Fig. 1-2-7 にクロフィプレート存在下で 6 時間誘導培養を行った *C. maltosa* IAM 12247 株の CO 還元差スペクトルを示す。この結果から *C. maltosa* の P450 はクロフィプレートの存在により単に転写レベルで誘導されるのみならず、蛋白質として発現していることが明らかとなった。P450 の吸光係数を  $91 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  とすると (Ohmura T. *et al.* (1993)) 誘導合成された P450 量は、*n*-テトラデカンによって誘導を行った場合は  $1.09 \text{ m mol/g}$  湿菌体重量、クロフィプレートの場合では  $0.82 \text{ m mol/g}$  湿菌体重量、と計算された。

クロフィプレートやベルオキシソーム増殖剤に含まれるそれ以外の幾つかの疎水性薬剤について、培地への添加濃度と ALK2 プロモーター活性の程度の間関係をまとめたのが Fig. 1-2-8 である。3 種のベルオキシソーム増殖剤はどれも、培地に 0.1mM の濃度で添加することで ALK2 プロモーターを活性化した。その程度は Wy-14,643 > クロフィプリン酸 > クロフィプレートの順であった。

Activities of Each ALK Promoter after Induced  
by Clofibrate (0.5mM)

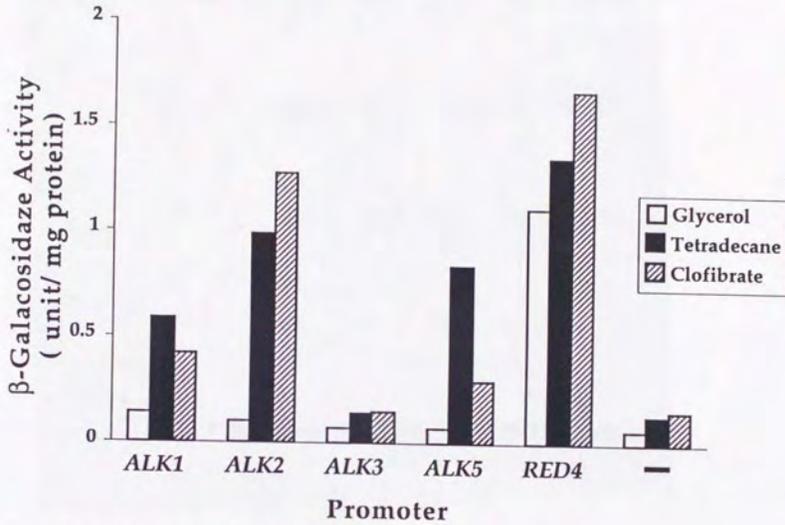


Fig. 1-2-5 クロフィブレートによる

P450 ALK プロモーターの活性化 (1)

(β-ガラクトシダーゼをレポーターとした解析)

pPL-A1、pPL-A2、pPL-A3、pPL-A5 および pPL-RED を導入した CHA1 株を表記の条件で 12 時間誘導培養を行い、菌体抽出液の β-ガラクトシダーゼ活性を測定した。Glycerol は誘導剤を含まないコントロール (ただし 0.5% DMSO を含む)。テトラデカンおよびクロフィブレートはそれぞれ 1% および 0.5mM で添加した。

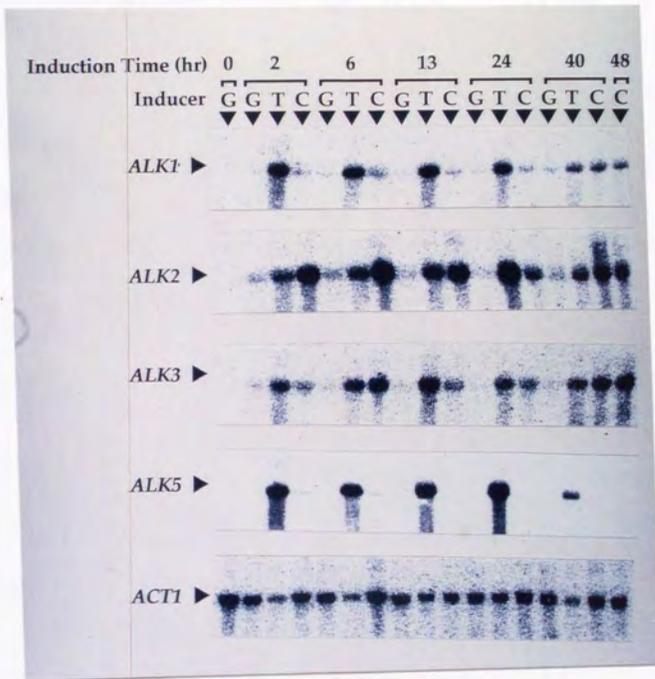


Fig. 1-2-6 クロフィブレート存在下で培養した菌体から抽出した全 RNA のノーザンハイブリダイゼーションによる解析

G、グリセロール培養菌体 (誘導剤を含まないコントロール。0.5% DMSO を含む)。T、*n*-テトラデカン (1%) による誘導菌体。C、クロフィブレート (0.5mM) による誘導菌体

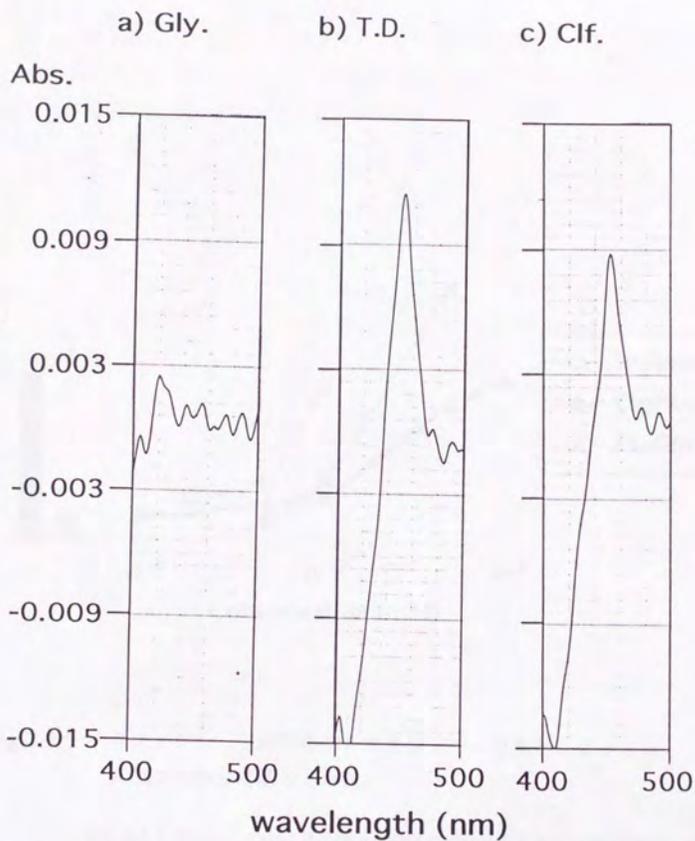


Fig.1-2-7 クロフィブレート存在下で 6時間培養した *C. maltosa* IAM12247 株の CO 還元差スペクトル。(縦軸は吸光度差)

- a) グリセロール培養 (0.5%DMSO を含む)
- b) 1% *n*-テトラデカンを補った誘導培地
- c) 0.5mM クロフィブレートを補った誘導培地

*C. maltosa* P450ALK はクロフィブレートによって単に転写レベルで誘導されるのみならず、機能を持つ蛋白質として発現している事が明らかとなった。

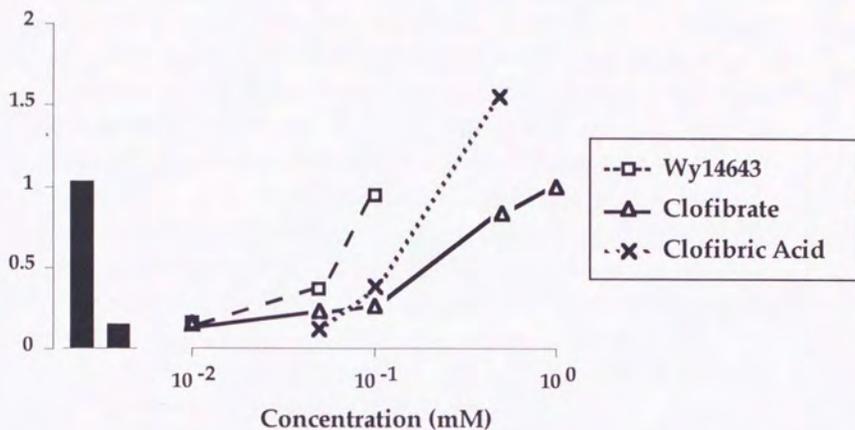


Fig. 1-2-8 クロフィブレート以外のペルオキシソーム増殖剤によっても  
ALK2 の転写は誘導された。

pPL-A2 を導入した CHA1 株を種々の濃度の誘導剤存在下で 12 時間培養したときの  $\beta$ -ガラクトシダーゼ活性。

濃度を示す横軸は log で示した。1mM クロフィブリン酸、或いは 0.5mM 及び 1mM Wy-14,643 存在下では菌体の生育が著しく阻害されたため、活性を測定することは出来なかった。

なお、Wy-14,643 は 0.5mM 以上、クロフィブリン酸では 1mM (以上) の添加により菌体の生育が著しく抑制され充分な蛋白質濃度の抽出液を回収する事が出来なかった。このため、そのような条件下の  $\beta$ -ガラクトシダーゼ活性を決定することが出来なかった。

### 1-3 考察

#### 1-3-1 *n*-アルカン添加によって最初に引き起こされる転写誘導は迅速な反応である

*C. maltosa* の主要な 4 種の P450 遺伝子 (*ALK1*, *ALK2*, *ALK3* 及び *ALK5*) は共通して基質である *n*-アルカンによって転写レベルで誘導される (Ohkuma M. *et al.* (1995))。この応答は迅速であり、誘導培養開始後 1 時間後には *ALK1*, 2、5 の mRNA の蓄積が認められた (Fig. 1-2-4)。また主要な 4 種の *ALK* 遺伝子の破壊によって *n*-アルカン酸化能を失った株においてもレポーター遺伝子の誘導が見られたこと (Fig. 1-2-2) から *n*-アルカンが直接誘導シグナルとなっていると考えられた。更に、データには示さなかったが、高濃度シクロヘキシミドの存在下で誘導培養を行った場合にも有意な *ALK* 遺伝子 mRNA の蓄積が認められたことから、転写活性化には新規の蛋白合成を必要としないことも示唆された。つまり、構成的に細胞内に存在する蛋白質が *n*-アルカンによる刺激を受けて転写の活性化を行っている、という機構が考えられる。

#### 1-3-2 酵素活性との対応 (基質特異性と誘導特異性)

種々の *n*-アルカン誘導体もまた *ALK* 遺伝子の転写を誘導するが、そのレベルは *ALK* 遺伝子間で大きく異なっていた。テトラデカン誘導体を用いた解析 (Fig. 1-2-1) によれば、アルカノールや脂肪酸は *ALK2* 及び *ALK5* の転写をアルカンに匹敵するレベルで活性化したが *ALK1*, *ALK3* の誘導にはそれ程有効ではなかった。Zimmer ら (Zimmer T. *et al.* (1996)) の報告によれば、Alk2p はミリスチン酸に対してテトラデカンに対する場合とほぼ同等の水酸化活性を持ち (誘導特異性と一致)、Alk5p は脂肪酸に対する活性がアルカンのそれに比べて非常に高い (誘導の特異性とは一致していない)。一方、Alk1p は全般に脂肪酸よりもアルカンに対する活性が高いのに対し (誘導特異性と一致)、Alk3p は少なくともミリスチン酸に関してはアルカンよりも高い活性を有していた (誘導の特異性とは一致していない)。つまり、P450ALK の基質特異性と誘導特異性との間には、有意と考えられる相関があるもの (*ALK1*, *ALK2*) と必ずしも一致していないもの (*ALK3*, *ALK5*) とが認められた。(P450ALK の基質特異性と誘導特異性が一致しない例として、他に Alk5p は、オレイン酸を良好な基質とするが (Zimmer T. *et al.* (1996)) オレイン酸自身によっては誘導が認められ

なかった (Ohkuma M. *et al.* (1995)) ことが挙げられる)。C. *maltosa* におけるアルカン資化のシステムは現在まだ、その進化の途上にあるのかもしれない。

1-3-3 クロフィブレートによる P 450 ALK の誘導はノーザン解析、レポーター遺伝子による解析、及びCO還元差スペクトルで確認された。

本章において C. *maltosa* の主要 ALK 遺伝子群がペルオキシソーム増殖剤によって著しく誘導されることを見いだした。この誘導は、ノーザン解析 (Fig 1-2-6)、及びレポーター遺伝子を用いた解析 (Fig. 1-2-5) から *n*-アルカンによる誘導と同様、主に転写レベルで行われていることが示唆された。ガスクロマトグラフィーを用いて培地中のクロフィブレート濃度を追跡したところ、長時間の培養でもその濃度にはほとんど変化が認められなかった (データは示さない)。このことから、この場合もやはりクロフィブレートが *n*-アルカン同様、直接シグナルとして転写誘導に関与している可能性が考えられる。また他の *n*-アルカン資化酵母においてもクロフィブレート応答機構が存在する可能性が示唆されたこと (後述)、プロモーターの欠失解析によって *n*-アルカン応答領域とクロフィブレート応答に関与する領域とを区分することが出来なかったこと (第2章)はアルカンとクロフィブレートの応答機構に関連があることを伺わせる。反面、P450ALK 分子種によりクロフィブレートへの応答の度合いは異なる (ALK2は最も早く、強く応答するが、ALK5のクロフィブレートによる誘導レベルは非常に弱い。) という事実は *n*-アルカンによる誘導機構とは異なっている部分がある事を示唆していると考えられる。

1-3-4 他の酵母との誘導機構の共通性について

ALK2 のペルオキシソーム増殖剤応答性という性質は、下等真核生物の遺伝子では、これまでに報告例がなかった (序章参照)。そこで他の酵母における ALK2 プロモーターの機能について予備的な結果ではあるが検討した。Candida *tropicalis* のイソクエン酸リアーゼの上流域 (UPR-ICL) は E. coli や S. cerevisiae 中でも C. *tropicalis* 中と同様に酢酸による転写誘導を指示する (Umemura K *et al.* (1995)、Atomi H *et al.* (1995))。ALK2 のペルオキシソーム増殖剤応答性が他の酵母中에서도発現されれば、それらに共通するペルオキシソーム増殖剤応答性転写因子が C. *maltosa* では使えない変異株の作成などの手法を通じて取得できる可能性がある。

材料と方法に記した方法で *ALK* プロモーター支配下に置いたレポーター遺伝子を他の酵母 (*S. cerevisiae*, *Y. lipolytica*) に導入してたところ、データは示さないが、*S. cerevisiae* では *ALK5* プロモーターを用いた場合、誘導剤の有無によらず、ほぼ構成的な  $\beta$ -ガラクトシダーゼの発現が見られたが、*ALK2* プロモーターでは培養条件によらず殆ど発現が認められなかった。一方、*Y. lipolytica* を用いた場合クロフィプレートによる *ALK2* プロモーターの活性化が認められた。(クロフィプレート存在下で培養した菌体の  $\beta$ -ガラクトシダーゼ活性は非添加の場合の約 2 倍程度 (データは示さない) であった)。*Y. lipolytica* は *C. maltosa* 同様、長鎖 *n*-アルカンを単一炭素源として資化でき、その資化に関与する P450 もまた *n*-アルカン誘導性であることが示唆されている (飯田敏也、未発表)。このことから、*n*-アルカン誘導性とペルオキシソーム増殖剤誘導性との間にも何らかの共通機構が関与する可能性も考えられる。

一般にクロフィプレートの培地への添加は酵母の生育に阻害的な影響を及ぼした。本研究で用いた 0.5mM の添加では遅滞期の長期化、生育速度の低下、および最終到達濁度の低下が認められ、その度合いは *S. cerevisiae* で最も著しく、*C. maltosa* での阻害は比較的穏やかであった。従ってこの生育阻害効果により  $\beta$ -ガラクトシダーゼ活性が十分に発現できなかった可能性も考えられる。

Greenspan と Germershausen (Greenspan M. D. and Germershausen J. I. (1973)) はこの生育阻害機構について解析し、オレイン酸や酢酸を補うことでこの阻害が回復することからピルビン酸脱水素酵素の阻害が一次的な標的であるとしている。今後は酢酸の存在下でのクロフィプレートの効果を検討することが有効かも知れない。

## 第2章 P450 ALK 遺伝子群の転写誘導に関する *cis*-配列の解析

前章では P450 ALK の転写誘導現象に関して主に誘導剤の多様性と誘導時間の2点について解析し、この転写誘導が少なくとも ALK 1、2、5 の3種に関しては非常に迅速な反応であることを明らかにした。シクロヘキシミドを用いた実験の結果とあわせて、この転写活性化の機構としては、非誘導時にも細胞内に存在する転写因子が *n*-アルカンのシグナルに直接応答している可能性が考えられた。ところでこれらの結果はノーザン解析とレポーター遺伝子を用いた解析によるものであるが、この2つの結果がおおむね一致したということはこの転写誘導が、主にそれぞれの遺伝子のプロモーター内に存在する機能配列 (*cis*-配列) によって指示されていることを意味している。そこで本章では 幾つかの P450 ALK のプロモーター領域について解析を行い、これらの転写誘導に関する *cis*-配列の同定を試みた。

### 2-1 材料と方法

菌株と培地、*Candida maltosa* の形質転換法、 $\beta$ -ガラクトシダーゼ活性測定法、塩基配列の解析法に関しては第1章参照

#### 2-1-1 プラスミドの構築

それぞれの ALK プロモーターの欠失変異体の作成のため、まず ALK プロモーター領域を pBluescript KS M13- (STRATAGENE) にクローニングした。欠失変異体作成の手順を Fig. 2-1-1 に示す。ALK5 プロモーターに関しては ALK5 遺伝子全領域を pUTU1 にクローニングしたものからプロモーター領域を含む *Hin* dIII-*Dra* I の 0.75kbp 断片を切り出し、pBluescript KS M13- の *Hin* dIII-*Hin* cII 部位または *Hind*III-*Eco*RV 部位に挿入し、前者を pBA5pHH、後者を pBA5pHE とした。両方のプラスミドについて、pBluescript のマルチクローニングサイトに認識部位を持つ、*Pst* I および *Eco* RI で消化し、Kilo-Sequence 用 Deletion Kit (宝酒造) を用い、添付説明書に従って、欠失変異体を作成した。以上の操作により pBA5pHH を用いた場合にはプロモーター上流からの、pBA5pHE の場合には下流からの欠失変異体をそれぞれ得ることが出来る。得られた変異体は塩基配列を決定したのち、pBA5pHH 由来 (それぞれ 5pHD (N.O.) と命名) のものは *Xho* I 消化・平滑末端化の後 *Spe* I で処理して目的の断片を切り出し、

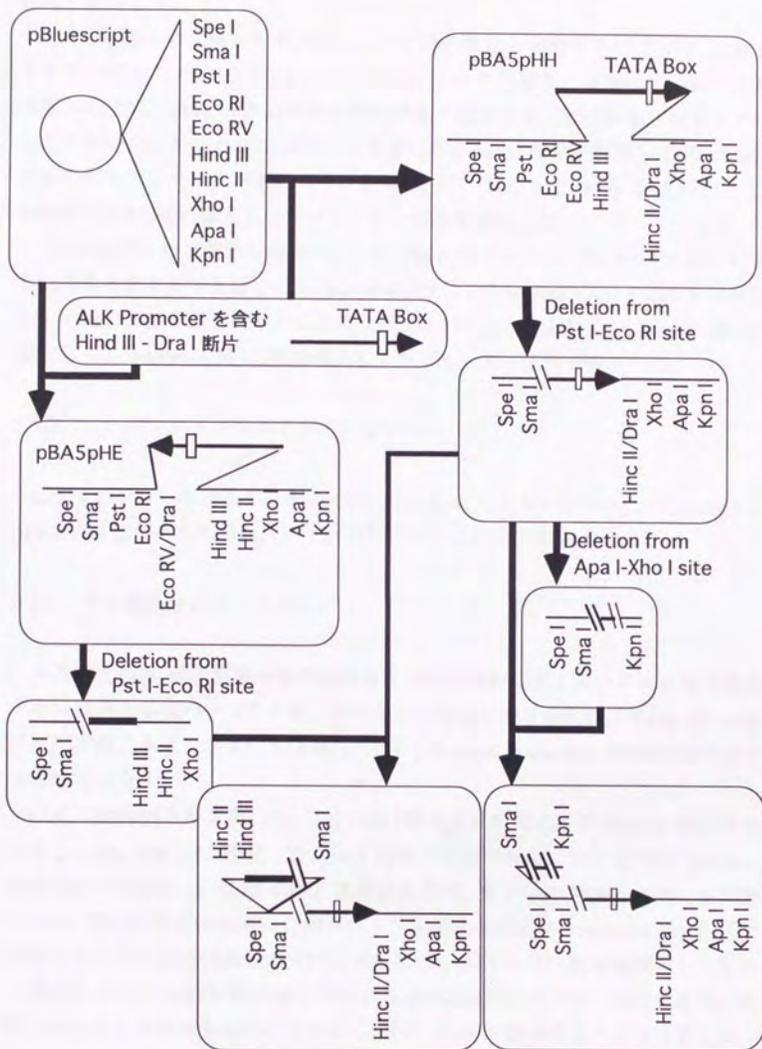


Fig. 2-0-1 ALK5 プロモーター欠失変異体の作成 (本文参照)

pPLI の *Sma* I-*Xba* I 部位に挿入して *C. maltosa* CHA1 株に導入し、プロモーター活性を測定した。

pBA5pHH の上流からの欠失によって得られたもののうちで TATA 配列を含む最小のもの (5pHD 7) は *n*-アルカンによる転写誘導能を失っていることを確認した上で、pBA5pHE 由来の欠失変異体を連結する上での基本プロモーターとして用いた。すなわち 5pHD 7 の上流にある *Sma* I 部位を利用して pBA5pHE 由来の欠失プロモーター断片 (それぞれ 5pED (N.O.) と命名) を連結し、*C. maltosa* CHA1 株に導入し、プロモーター活性を測定した。

pBA5pHH の上流からの欠失によって得られたものうち *n*-アルカンによる転写誘導能を有する最小のもの (5pHD 4) はさらに *Xho* I-*Apa* I 部位を利用して、上記の方法で逆方向からの欠失変異体を作成し、5pHD 7 の *Sma* I 部位に挿入して *C. maltosa* CHA1 株に導入し、プロモーター活性を測定した。

#### 2-1-2 ノーザンハイブリダイゼーション

LAC4 のプローブとして、その ORF の約 50% を含む *Cla* I-*Kpn* I (1.73kbp) を pPL1 より切り出して用いた。それ以外に関しては第 1 章参照

#### 2-1-3 ゲル移動度シフトアッセイ

本法は DNA-蛋白質複合体の検出および性状解析に広く用いられる最も簡便でかつ鋭敏な手法の一つである。原理および応用に関する総説は Lane D. *et al.* (1992) 参照。本章では主に BandShift Kit (Pharmacia Biotech) の添付説明書をもとに行った。

pUC 5Δ48x8 (次章参照) から 1) *Bam* HI-*Bgl* II 消化により 5Δ48x8 断片を切り出した後、*Sau* 3AI 消化 2) *Xba* I 消化、のいずれかにより ARR5 (alkane-responsive region of *ALK5* の略。本章結果参照) を含む約 180bp の断片を調製し、[ $\alpha$ -<sup>32</sup>P] dCTP (Amersham) の存在下、末端を Klenow Fragment (宝酒造) で修復することにより標識してプローブとした (異なる制限酵素処理をしたものを作成したのは ARR5 の両端に付随する pUC 由来のリンカー配列が結果に影響しないことを確認するためである)。また 10ml の誘導培地で前章に準じた方法で 1 時間誘導培養を行った菌体を集菌・洗浄した後、1ml の細胞破碎用緩衝液に懸濁してガラスビーズを用いて破碎し、遠心上清を菌体抽出液とした。

標識プローブと菌体抽出液を 1x 結合反応用緩衝液中で混合し、室温で 15 分

間静置する事で DNA- 蛋白質複合体を形成させた。これに 1/10 量の電気泳動用色素を添加し、1xTBE を泳動用緩衝液に用いた 5% 非変性アクリルアミドゲルで分離し、イメージアナライザーで解析した。

細胞破碎用緩衝液	100mM Tris-Cl (pH 7.5)、500mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、 1mM EDTA、10% glycerol、1mM PMSF、5mM DTT
1x 結合反応用緩衝液	10mM Tris-Cl (pH 7.5)、100mM NaCl、10% glycerol 0.05% NP-40、25ng/ml Poly (di-dC) · Poly (di-dC) 7mM BME、1mM PMSF
電気泳動用色素	250mM Tris-Cl (pH 7.5)、0.2% Bromophenol Blue、 0.2% Xylene cyanol、40% glycerol

#### 2-1-4 UV- 架橋法

本法では DNA 結合タンパク質をその結合部位を含む内部標識したプローブ DNA に結合させ、UV 照射により DNA- 蛋白質間に共有結合を形成させた後にプローブを分解除去することで目的の蛋白質を放射標識する。標識された DNA 結合タンパク質は、SDS 変性アクリルアミドゲルを用いて分離することにより、その数や分子量を知ることが出来る。基本的には文献 ( 田村隆明編、( 1993) ) の方法に従い、他の文献 ( Ausubel F. M. *et al.* ( 1994) 、 Kneale G. G. ( 1994) ) を参照して条件検討などを行った。

pUC 5A48 ( 次章参照 ) を Bam HI で完全消化した後、dNTP 非存在下で T4 DNA polymerase 処理によって ARR5 の下流半分の本鎖化を行った ( 1 $\mu\text{g}$  DNA あたり 1unit の酵素を用い、37 $^{\circ}\text{C}$  で 10 分間処理した。TOYOBO カタログ・テクニカルノートによればこの条件で約 134bp が一本鎖に分解される ) 。その後 dATP、dGTP および BrdUTP ( プロモデオキシウリジン 3 リン酸、dTTP のアナログとして DNA に取り込まれ、DNA- 蛋白質間の共有結合形成を促進する ) をそれぞれ終濃度 0.5mM、 $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]$  dCTP ( Amersham ) を 1.25 $\mu\text{Ci}/\mu\text{l}$  となるように添加し、再び二本鎖とすることによって ARR5 下流半分の標識を行った。反応の最後には Klenow fragment ( 宝酒造 ) を 0.1unit/ $\mu\text{l}$  となるように添加して末端の修復を行った。標識 DNA は Bgl II 消化の後、約 180bp の断片をアガロースゲルより回収し、プローブとして用いた。また、最初に Bgl II 消化を行っ

て同様の処理をし、最後に *Bam* HI 消化によって断片を切り出すことで ARR5 の上流半分を標識したプローブも同時に作成した。

ゲル移動度シフト法と同じ緩衝液中で標識プローブと菌体抽出液を混合し、エッペンドルフチューブのふたの部分に移し、サランラップで覆いをしてエッペンドルフの口の部分を切り取って作成したリングで固定し、4℃ で 253.7nm の紫外線 (東芝殺菌ランプを使用) を約10cm の高さから 1 時間照射して架橋を行った。紫外線照射後の抽出液は DNase I (SIGMA) 消化によりプローブを分解除去した後、SDS 変性アクリルアミドゲルで分離してイメージアナライザーで解析した。

## 2-2 結果

### 2-2-1 ALK5 プロモーターの欠失解析と ARR5 の同定

Fig. 2-2-1 に ALK5 プロモーターの上流からの欠失の結果得られたプロモーター断片と、そのプロモーター活性を測定した結果をまとめた。ここに示した4種のプロモーターはいずれも TATA ボックスを含んでおり、またグリセロールを炭素源として培養したときの  $\beta$ -ガラクトシダーゼ活性がどのプロモーターでもほとんど変わらないことから、基本的なプロモーター活性は失われていないものと考えられた。それに対して *n*-テトラデカンを炭素源として培養したときの  $\beta$ -ガラクトシダーゼ活性には顕著な違いが見られた。すなわち翻訳開始点上流 243 bp までの欠失 (5pHA4) では大きな誘導レベルの低下は見られなかったものの、さらに 119 bp を欠失させることによって (すなわち翻訳開始点上流 124 bp までの欠失によって) テトラデカンによる誘導はほとんど失われた (5pHA7)。そこでこの欠失プロモーター断片を以後、ALK5 の最小プロモーターとして以後の解析に用いた。

以上の結果から、この約 120 bp の間にテトラデカンによる転写活性化に必要な領域が含まれているものと考えられた。そこでこの領域に特に注目して ALK5 プロモーターの下流からの欠失変異体の作成を行い、同様にテトラデカンによる誘導活性を測定した。結果を Fig. 2-2-2 にまとめて示す。

まず上流からの欠失によりテトラデカンによる顕著な転写誘導が見られた最小のプロモーター断片 (5pHA4) の下流からの欠失を行い、TATA ボックスを除いて 5pHA7 の上流に連結したところ、テトラデカンによる転写誘導は有意なレベルに回復した。そこでこの断片 (5pHA48) に対応する ALK5 プロモーター

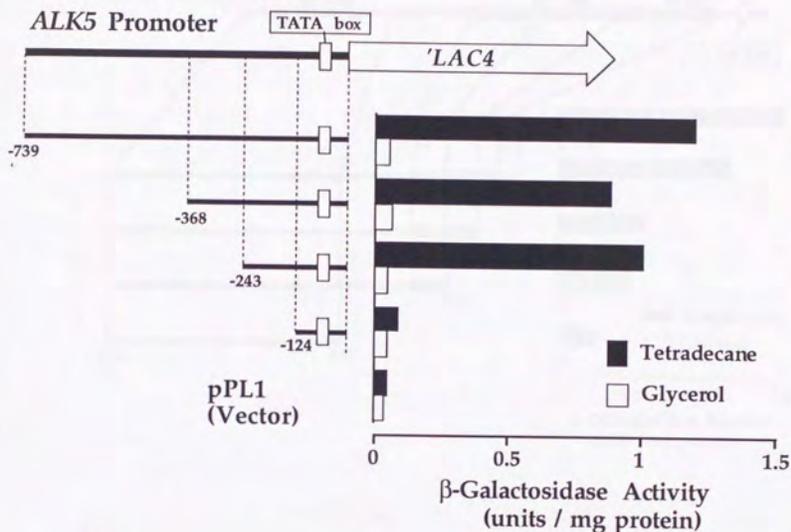


Fig. 2-2-1 ALK5プロモーター領域の欠失解析 (1)

(5' - 側からの欠失 )

左側に欠失によって得られたプロモーター断片を右側にその誘導条件下、及び非誘導条件下における $\beta$ -ガラクトシダーゼ活性を示す(誘導培養は12時間行った)。左側の欠失部位を示す数値は、ALK5 翻訳開始点を+1とした塩基数を示す。この結果から、翻訳開始点上流124bpから下流をALK5の最少プロモーターとして同定した。

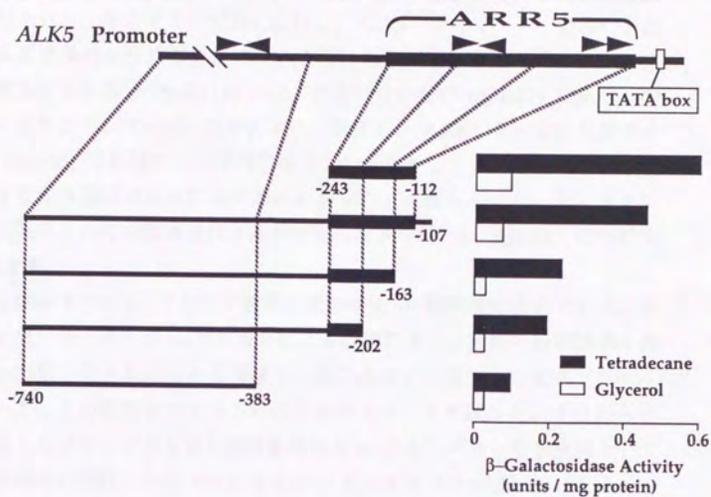


Fig. 2-2-2 ALK5 プロモーター領域の欠失解析 (2)  
(3' - 側からの欠失 )

図の構成は Fig.2-2-1 と同じ。この結果から、翻訳開始点上流 122bp ~ 243bp の領域を ARR5 として同定した。

内の領域に *n*-アルカンによる転写誘導に必要な配列が含まれていると結論し、ARR5 (alkane-responsive region of ALK5) と命名した。この領域付近の塩基配列は Fig. 2-2-3 参照。この領域の特徴的な配列として CGG を含む 2 つの反復配列が見いだされた。そこでこの配列に注目し、ALK5 プロモーター全体の下流からの欠失変異体の転写誘導活性について検討した。最も下流のダイレクトリピートを欠失させた場合 (5pEΔ12) には、そうでないもの (5pEΔ7) に比べ、誘導時の β-ガラクトシダーゼ活性が約半分に低下し、ARR5 を完全に欠失させることで (5pEΔ5) それはさらに半分に低下した。しかし、この場合にもテトラデカンによる転写誘導は完全には失われなかった。上流のインバーティッドリピートの欠失によっては誘導はほとんど変化しなかった (5pEΔ9 の活性を 5pEΔ12 と比較)。

上の活性値はすべて *n*-アルカン誘導培養開始後 12 時間後のものである。前章で ALK5 プロモーターが *n*-アルカンによる誘導により 2 段階の転写誘導を指示することが見いだされたことを考慮し、既に作成した幾つかの変異プロモーターについて、その活性をタイムコースで追跡することを試みた。すなわちそれぞれ対応するプラスミドを含む形質転換体を *n*-テトラデカンを炭素源として培養し、経時的に回収した全 RNA を LAC4 遺伝子をプローブに用いたノーザンハイブリダイゼーションで解析した。最終的に得られたシグナルを ACT1 をプローブとして得られたシグナルで標準化した結果を Fig.2-2-4 に示す。

ALK5 プロモーターとして最も長い領域を含む 5pH 断片では既に前章で指摘したとおり培養期間を通じて 2 回にわたる転写活性の増加が認められた。また先に最小プロモーターとして用いた 5pHΔ7 では全培養期間を通じて mRNA 量は低いレベルで一定していた。ARR5 の下流のダイレクトリピート配列を欠失させた内部欠失変異体 (5pEΔ12) では全体的な誘導レベルが半分以下に低下していた。このことからこの配列の重要性が示唆される。しかし依然として *n*-アルカン応答性を有しており、誘導培養開始直後の転写活性化の後いったん転写量が減少した後、緩やかに上昇する傾向が認められた。この傾向は 5pHΔ7 に ARR5 全領域を連結したもの (5pHΔ48) においても同様であった。ARR5 (またはその一部) はアルカン培養後期における転写活性化にも関与している可能性が考えられる。

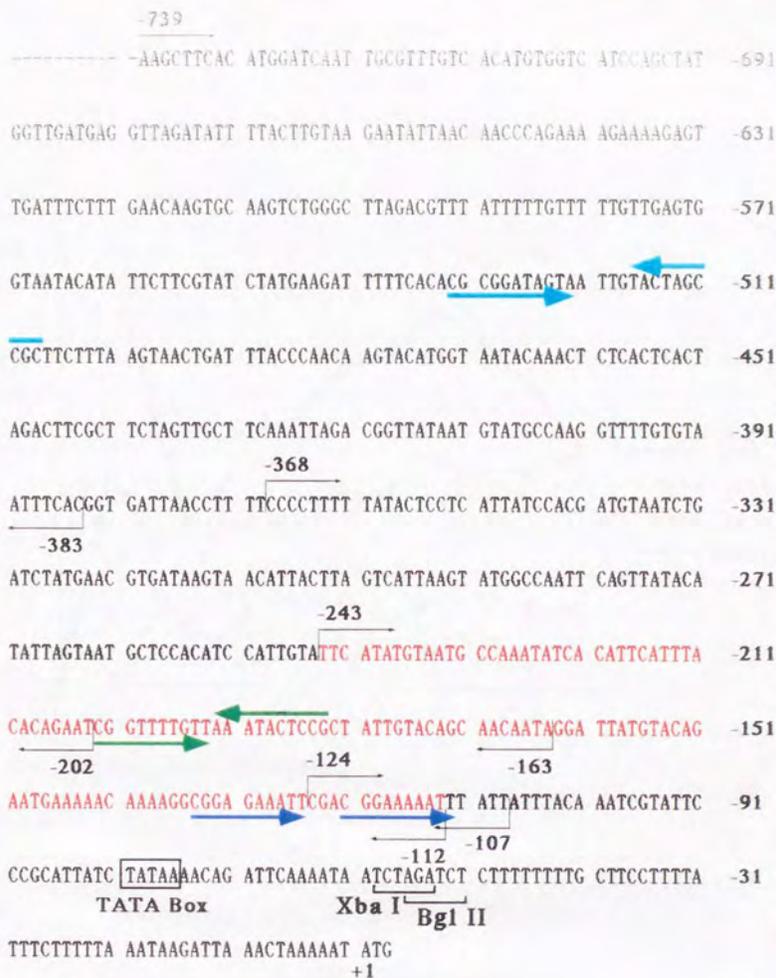


Fig. 2-2-3 ALK5 プロモーター領域の塩基配列

数字は翻訳開始点からの塩基数を示す。図中赤字で示した領域が ARR5 に相当する部分。今回作成し、活性を測定した欠変異体の範囲を鍵で示した。また注目している反復配列については色付きの矢印で示した。

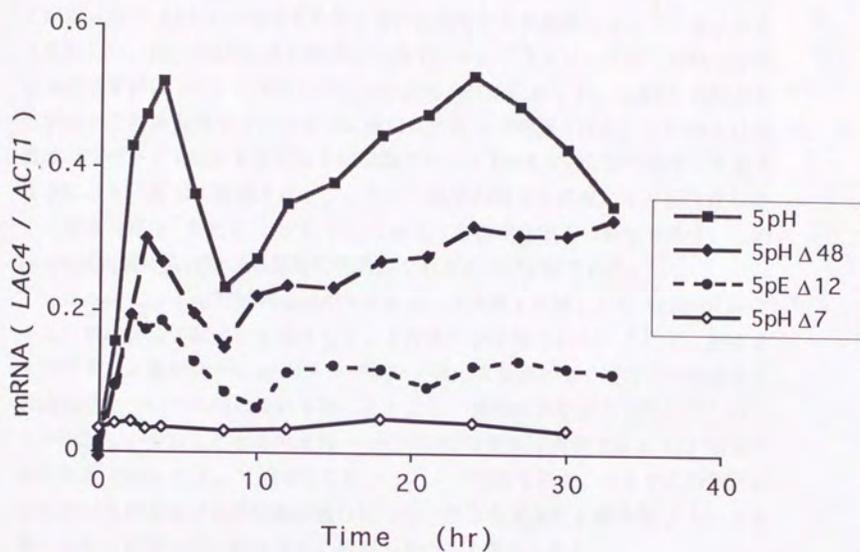


Fig. 2-2-4 ALK5 欠失変異プロモーターの活性のタイムコース

それぞれのプラスミドを導入した CHA1 株を 1% *n*-テトラアカンを炭素源として培養し、そこから回収した全 RNA を LAC4 をプローブとしたノーザンハイブリダイゼーションにより解析した。グラフは LAC4 をプローブとして得られたシグナルを ACT1 のシグナルにより標準化した結果を示す。

## 2-2-2 ARR5 に配列特異的に結合する蛋白質の検出

プロモーター内の機能領域は、そこに配列特異的に結合する蛋白によって認識され、機能を持つと考えられる。そこで今回 ALK5 の cis- エlement として同定された ARR5 に結合する蛋白質の存在をゲル移動度シフトアッセイにより検討した。Fig. 2-2-5 にその結果の一例を示す。グラスビーズ法で回収した細胞抽出液中には *n*-テトラデカンによる誘導の有無によらず、ARR5 に結合してプローブの移動度をシフトさせる蛋白質の存在が確認された。この結合は非標識のプローブ DNA を反応液中に標識プローブ DNA の 20 倍の濃度で添加する事により、著しく阻害された。しかし同濃度の超音波処理により断片化したウシ胸腺 DNA を競合 DNA として加えても顕著な阻害は観察されず、この DNA-蛋白質相互作用は塩基配列特異的であることが示唆された。

5pH $\Delta$ 48 による転写誘導活性のタイムコース実験 (前節) より ARR5 が *n*-アルカン培養後期の誘導にも関与している可能性が示唆された。そこで、前培養を行わず、培養初期から *n*-テトラデカンを単一炭素源として培養した菌体からの抽出液について同様の検討を行ったところ、複数の非常に大きなシフトバンドが出現し、少なくともそのうち一つについては配列特異的である (20 倍量のウシ胸腺 DNA によって阻害されない) ことが示唆された。つまりこの領域はアルカンを炭素源とした培養が進むにつれ、異なる蛋白質 (複合体) と相互作用することによって、転写誘導に関わっていると考えられる。

ゲル移動度シフト法により存在の確認された蛋白質の数や分子量について情報を得るために UV-架橋法による解析を試みた。結果を Fig. 2-2-6 に示す (2つのパネルは異なる濃度のアクリルアミド (A 7.5%、B 15%) を用いて解析した結果を示す)。ここから少なくとも 3 種の異なる分子量の蛋白質が、ARR5 の下流域を中心に結合していることが示唆された (図中 $\square$ で示した)。最も強いシグナルとして検出されたのは約 27kDa の蛋白質であった。これは 1 アミノ酸の平均分子量を 113 とすれば約 240 アミノ酸 (720 塩基対) に相当する比較的小さな蛋白質である。またこれによりかなり弱いシグナルとして約 57kDa 及び 72kDa の蛋白質も検出された (それぞれ約 500 アミノ酸 1,500 塩基対、及び 640 アミノ酸 1,920 塩基対に相当)。これらはいずれも ARR5 の下流を標識したプローブ DNA を用いた実験では検出されず、配列特異的な結合であると考えられたことから、ゲル移動度シフト法で検出された DNA-蛋白質複合体中に含まれていると考えられた。

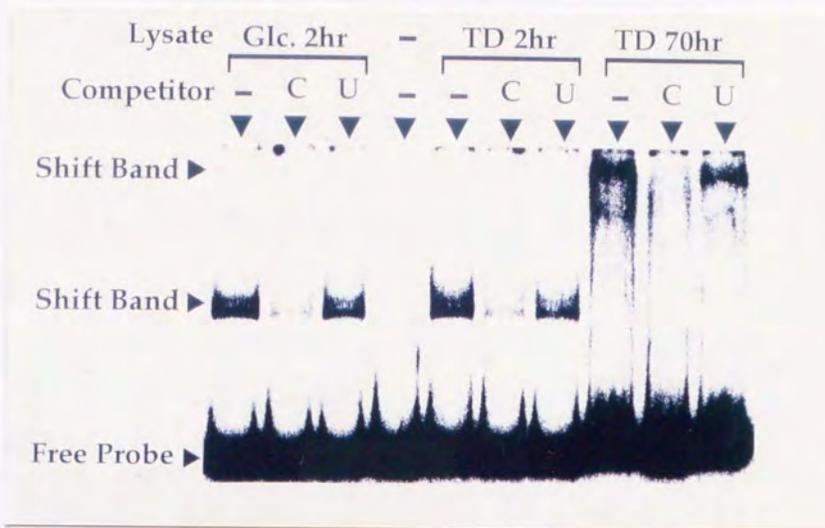


Fig. 2-2-5 全細胞抽出液を用いたゲル移動度シフトアッセイ

反応条件は材料と方法参照。プローブは B42B を標識し、1レーンあたり 0.5ng/μl の濃度で用いた。コンペティターは、1レーンあたり 10ng/μl(プローブ DNA の 20倍量)を用いた。-、コンペティターを含まないコントロール; C、Cold Target (未標識のプローブ DNA); U、unrelated DNA (超音波処理したウシ胸腺 DNA)

細胞抽出液は 0.5mg/ml の濃度で用いた。Glc.2hr、グルコースを炭素源として 2 時間の本培養を行った菌体の抽出液; TD 2hr、*n*- テトラデカンを炭素源として 2 時間の本培養を行った菌体の抽出液; TD.70hr、*n*- テトラデカンにより 70 時間培養した菌体の抽出液 (この培養では前培養は行わず、o/n カルチャーを誘導培養用培地に 1/100 量、接種した。)

写真の左側にフリープローブ、及びシフトバンドの位置を ▶ で示した。

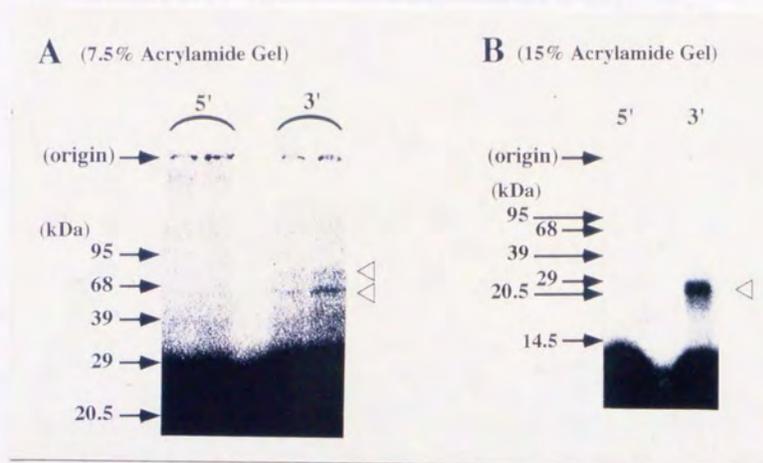


Fig. 2-2-6 *n*-テトラデカン誘導菌体抽出液の  
UV-クロスリンク法による解析

A. 7.5% アクリルアミドゲル B. 15% アクリルアミドゲル

5' は *Bgl* II サイトを用いて上流側から、3' は *Bam* HI サイトを用いて下流側から標識したプローブを用いている。写真の左側に分子量マーカーのバンドの位置を示した。また、写真の右側には検出されたバンドの位置を ◀ で示した。

### 2-2-3 ALK2 プロモーター領域の欠失解析

Fig. 2-2-7 に ALK2 プロモーターを上流から順次欠失させた変異体のプロモーター活性を、LAC4 をレポーター遺伝子として用いた系 (前章参照) で定量化した結果を示す。また Fig. 2-2-8 に ALK2 プロモーター領域の配列を示した。この結果、誘導時の ALK2 プロモーター活性は翻訳開始点上流 625bp - 398bp と同 189bp - 138bp の 2 つの領域に依存している可能性が示唆された。興味深いことに、この 2 つの領域は、*S. cerevisiae* の Pox-Box や *B. megaterium* P450 BM-3 のオペレーター配列と相同性のある CGG を含む反復配列を含んでいた。また、翻訳開始点上流 138bp 迄の欠失により誘導培養時の  $\beta$ -ガラクトシダーゼ活性は、ベクターに用いた pPL1 導入株のそれとほぼ同等のレベルに低下しており、この欠失プロモーター断片は転写誘導能を失っていると判断した。(グリセロール培養菌体との見かけ上の活性値の差は、疎水性物質存在下で培養したことによる菌体抽出液の白濁等が主要な原因であり、有意なものではないと考えている)。そこで次にこの翻訳開始点上流 138bp 迄の欠失プロモーター断片の上流に転写活性に関与すると考えられた領域を連結する事で転写誘導の回復を試みた。しかし、試みた複数の構築物において有意な誘導活性の回復を認めることは出来なかった。なお、一連の解析で *n*-テトラデカンによる活性化領域とクロフィブレートによる活性化領域とを区別する事は出来なかった。第一章でプロモーターによる反応性の違いから両者の応答配列は異なる可能性を示唆したが、仮にそうだとした場合にも非常に近傍に存在する可能性が高いと考えられた。

## Deletion Analysis of ALK2 Promoter Region

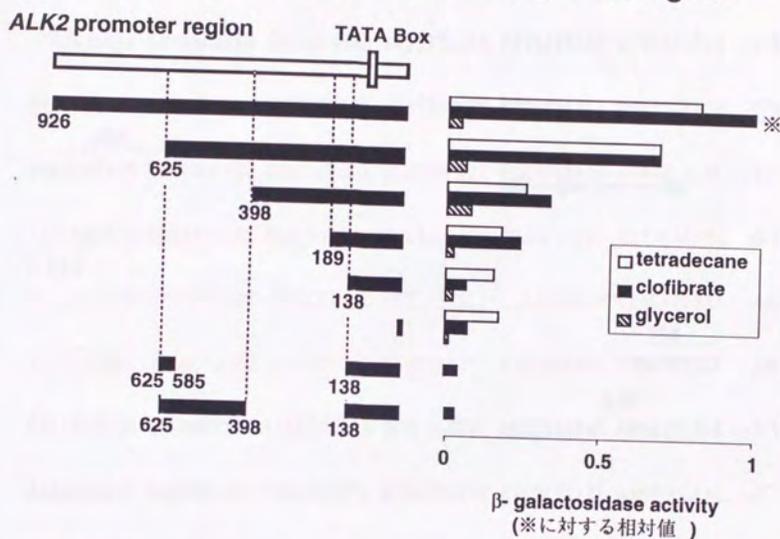


Fig. 2-2-7 ALK2 プロモーターの欠失解析

図の構成は Fig. 2-2-1 と同じ。β-ガラクトシダーゼ活性は、926bp のプロモーターを導入した CHA1 株をクロフィプレート存在下で培養した際の値（図中※で示した）を基準とした相対値で示している。なお2つの内部欠失変異プロモーターについてはクロフィプレートを誘導条件下の菌体の活性値しか決定していない。

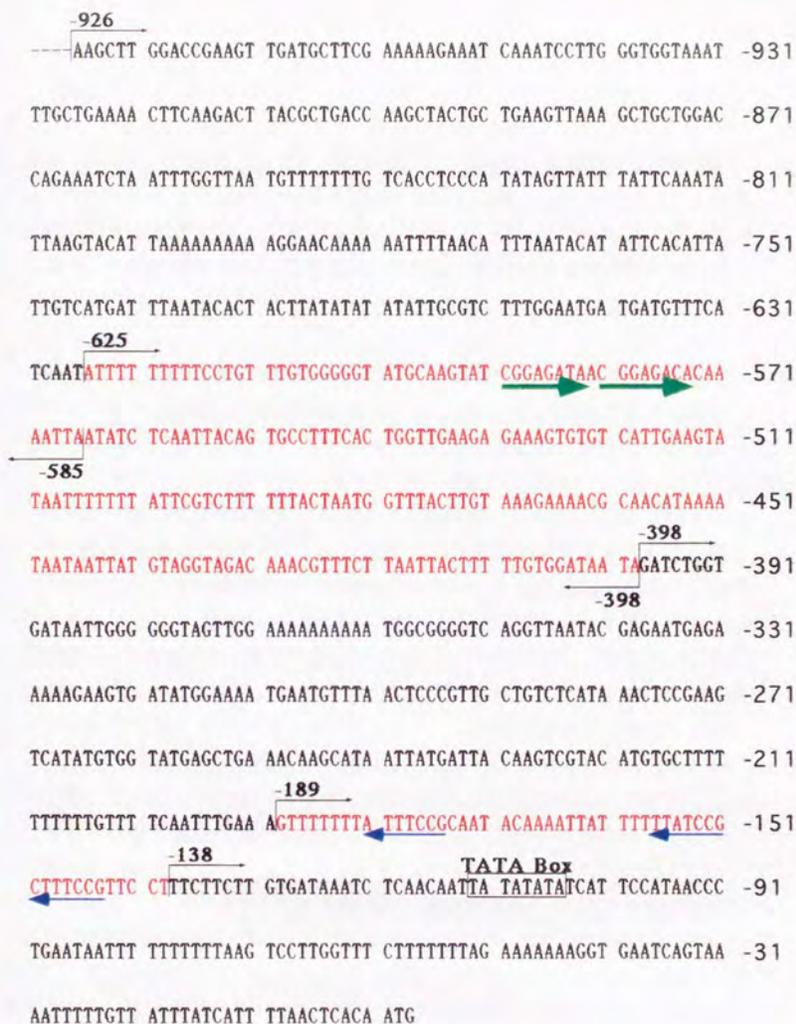


Fig. 2-2-8 ALK2 プロモーター領域の塩基配列

数字は翻訳開始点からの塩基数を示す。今回作成し、活性を測定した欠失変異体の範囲を鍵で示した。また注目している反復配列については色付きの矢印で示した。

### 2-3 考察

本章では主に *ALK5*, *ALK2* についてプロモーター領域の欠失解析を行い *ALK5* については *n*-アルカンによる誘導に必要な領域 *ARR5* を同定した。本領域は翻訳開始点上流 112bp から 243bp 迄のプロモーター内で比較的下流に位置しており、特徴的な配列としては CGG モチーフを含む 2 つの反復配列を含んでいた (Fig. 2-2-3)。Fig. 2-3-1 にこれまで報告のあった CGG モチーフを一覧にまとめた。

この領域内の機能配列を決定するために、3'-側からの欠失変異体を作成し最小プロモーターに連結して誘導活性を検討したが、欠失に従って徐々に誘導能が低下する傾向にあり、1 つのエLEMENTの同定には至らなかった。*n*-アルカンによる転写誘導には複数の *cis*-ELEMENT が関与しており、それらの相互作用によって全体の活性化が行われている可能性が考えられる。実際 *ALK1* プロモーターの欠失解析でも欠失に従って誘導レベルが徐々に低下する結果が得られており、複数の機能配列の関与が示唆されている (大熊盛也 (1990))。注意すべき点として、5'-側からの欠失解析の際にさほど重要でないと考えられた翻訳開始点上流 368bp から更に上流にも CGG モチーフを含む反復配列が認められた (Fig. 2-2-2, Fig. 2-3-1)。*ARR5* を完全に欠失させた変異プロモーター (5pE Δ 5) においても弱いながら *n*-テトラデカンによる転写活性化が認められた原因として、この上流の反復配列が内部欠失により TATA 近傍に位置したため、機能を持つようになった可能性も考えられる。この可能性について検討するには、欠失ではなく塩基置換による変異プロモーターの活性を検討する必要があるだろう。

ゲル移動度シフトアッセイ、および UV-架橋法により *ARR5* を配列特異的に認識して結合する蛋白質の存在が示唆された。データは示さなかったが、今回用いたゲル移動度シフト法の条件では細胞内の存在量やプローブ DNA との親和性について、培養条件による有意な差異は認められなかった。しかしこのことはこの蛋白質が *n*-アルカン応答性の転写因子であるということを否定する根拠にはならない。既に第 1 章で述べたように *C. maltosa* P450 の *n*-アルカンによる初期の転写誘導には新規の蛋白質合成は必要ないと考えられるからである。転写誘導の機構としては修飾による転写因子の核への移動、あるいは *n*-アルカン応答性転写因子の基本転写因子への親和性の変化といったことが考えられる。

a) *S. cerevisiae* Pox-Box (also referred as ORE)  
(peroxisomal genes; fatty acid responsive)

CTA1    aaaaagga CGGcttta caaaataaa ctCCG aaaaatccccac  
 POX1    aaggaatt CGGtcattagc ggctaata gCCG ttggggta  
 FOX2    actct CGGcggtta tttgccaattttactc caaCGG ggatca acatc  
 FOX3    aaggga aaCGG gataata gtatta acaCCG cagc

b) *B. megaterium* Bm3R1 binding site  
(phenobarbital, fatty acid, peroxisome proliferator responsible)

BM-3    aattgtag CGGaatga cgttcattccat ttttgaaa

c) *C. maltosa* ALK 2 operator  
(n-alkane, peroxisome proliferator responsible)

ALK 2    gcaagtat CGGaga aaCGGagaca caaaatt  
 ALK 2    ttttattt CCGcaata caa aatta ttttat CCGctttCCG ttccttt

d) Other ALK genes from *C. maltosa* (n-alkane responsible)

ALK 1    ttagtcta CGGcta tgaat gttgatatac  
 ALK 1    aat aCGGta aca tg tgctttgtaacatgcagg gatttc tcCCG ttgct  
 ALK 1    aaaac CGGcata ta agcat CGGag tta cattg ttaacta  
 ALK 3    ctectctaaaa aaact CCGcaa tact CCG gtg caataaag  
 ALK 5    ttttcacac gCGGatag ta attg tactag CCGc ttcttaag taaactgat  
 ALK 5    acagaat CGGtttg ttaa at act CCG ctattgtac  
 ALK 5    aaaagg CGGga aaatt cga CGG aaaatt tatt

Fig. 2-3-1 ORE 相同配列の比較

これまでに報告された ORE 配列及びその相同配列と ALK プロモーター上流の ORE 類似反復配列を示した。

UV-架橋法によって同定された主要な DNA 結合タンパク質の分子量は約 27 kDa であった。これは真核生物の転写因子としては比較的小さなものであると考えられる。このほかに 60 kDa 前後に複数のシグナルが得られたが、これらの蛋白質が直接 DNA と結合しているのかについては議論を要する。ゲル移動度シフト法で観察されたシフトバンドは 30 kDa 足らずの蛋白質が単独で結合した結果としてはいささか移動度の変化が大きいと思われた。これらの弱いシグナルは、あるいは DNA 蛋白質複合体中で DNA の近傍に位置した蛋白質が副次的に標識された結果である可能性も考えられる。

*ALK2* プロモーターの欠失解析の結果からもやはりプロモーター中の CGG 反復配列を含む領域がその転写誘導に関与している可能性が示唆された (Fig. 2-2-6 および Fig. 2-3-1)。しかし、この領域に注目して作製した内部欠失変異体ではクロフィプレートによる効果的な転写活性化は認められなかった。欠失させた翻訳開始点上流 398bp - 138bp の間に基本的な転写レベルの上昇に必要な配列があるのかもしれない。或いは *ALK5* の所で考察したように *cis*-エレメントと基本転写エレメント (TATA ボックス) との距離が重要である可能性も考えられる。

### 第3章 ALK5の転写誘導に関与する *trans* 因子のクローニングの試み

これまで第1章では P450 ALK 遺伝子群の転写誘導現象に関して解析し、その特異性について考察した。また第2章では ALK5を中心に、そのプロモーター領域の解析を行い、*n*-アルカンによる転写誘導に重要と考えられる領域の縮小化を行った。また、この領域を配列特異的に認識している蛋白質の存在を示し、転写誘導への関与の可能性を示唆した。本章ではこのような ALK5 の転写因子をコードする遺伝子のクローニングを 1) 他の生物との相同性を利用した方法 2) 細胞内に存在する転写因子の結合領域を持つ DNA を多コピー導入し、転写因子を枯渇させることによる形質の変化を利用する方法 (*in vivo*) 3) 転写因子の特異性の高い DNA 結合能を利用する方法 (*in vitro*) の3点から検討した。

まず ALK 遺伝子の転写誘導に既知の転写因子の同族体が関与している可能性について検討した。最近 *S. cerevisiae* の Pox-Box に結合してペルオキシソーム関連遺伝子の転写誘導を司る転写因子 Pip2 の構造遺伝子が単離された (Rottensteiner H. *et al.* (1996))。ALK 遺伝子の転写が脂肪酸によっても誘導されること (第1章)、及び ALK プロモーター領域には共通して Pox-Box 類似の配列が見られ、転写誘導に関与している可能性が示唆された事 (第2章) から Pip2 の同族体が ALK 遺伝子群の転写誘導に関与している可能性が考えられ、これは *S. cerevisiae* の PIP2 遺伝子をプローブとしたサザン解析によってクローニングできると期待された。実際 *C. albicans* からは *S. cerevisiae* との近縁性を利用して多くの遺伝子が単離されており (Sudbery P.E. (1994))、我々の研究室においても *S. cerevisiae* の *ura3* 変異を相補することを指標として *C. maltosa* URA3 の単離が為されている (Ohkuma M. *et al.* (1993))。また、ペルオキシソーム増殖剤応答機構について、真核生物では唯一明らかにされている高等動物の例では核内受容体の一種である PPAR が重要な役割を担っていると考えられている (序章参照)。そこで PPAR の同族体が酵母に存在する可能性についても検討した。

次に配列特異的 DNA 結合タンパク質の存在が示唆されたことと、*in vitro* における競合実験により、比較的低い (20倍程度の) 競合 DNA によってゲルシフトの阻害が観察されたことから、同様のことを *in vivo* で行えば ALK 遺伝子の誘導レベルの低下という形質の変化として検出できるのではないかと考え、検討した (Fig. 3-0-1 にその概念図を示した)。実際に結合配列を多コピーで導入するによって細胞内で転写制御因子が枯渇し、形質が変化する例が報告さ

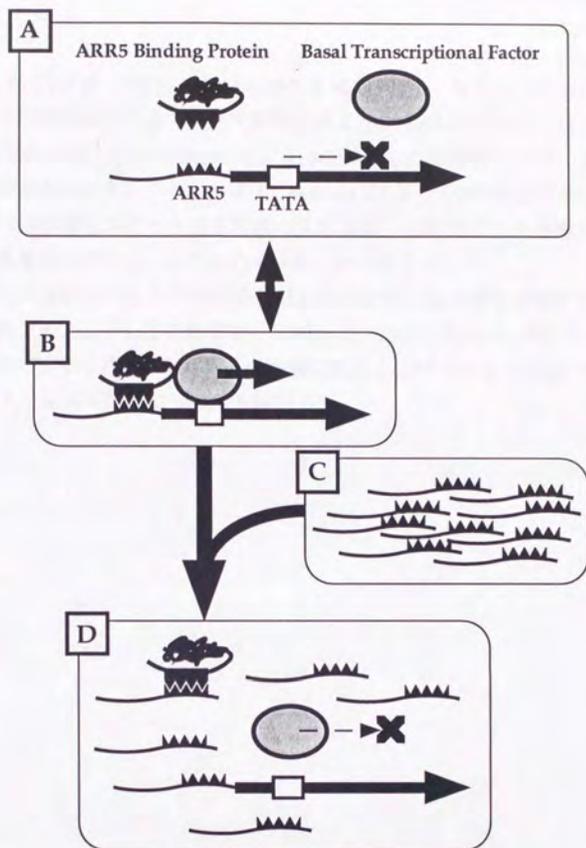


Fig. 3-0-1 ARR5 に結合する転写因子クローニングのストラテジー (1)  
(多コピーの ARR5 による細胞内因子の枯渇)

*n*-アルカン非存在下（非誘導条件下）では転写の活性化は起こらない（A）が、*n*-アルカン存在下では ARR5 結合因子が *n*-アルカンをリガンドとして ARR5 に結合し、その下流のプロモーターからの転写を活性化する（B）。しかし、多コピーの ARR5（C）を細胞内に導入することで ARR5 結合因子はプロモーター上流の ARR5 と結合することができなくなり、その結果 ARR5 に依存する転写の活性化は起こらなくなる（D）と期待される。この転写誘導能の欠損は ARR5 結合因子の大量発現によって回復すると考えられる。

れている (Shaw, G-C. *et al.* (1992)、Virolle M-J. *et al.* (1994))。もしこの方法がうまく行けば、その形質変化を多コピーで抑制するような DNA 断片は、多コピーで導入された結合配列 (*cis*-element) によって枯渇した転写因子をコードしている可能性が考えられる。このことは *C. maltosa* が不完全2倍体菌であるが故に変異株の取得が難しいという点を考慮に入れば、変異遺伝子の相補に代わる遺伝子の単離方法として、有望なのではないかと考えた。

最後に機能検定は後回しにして特異的結合配列を認識する蛋白質を直接ライブラリーから単離する方法としてこれまで MBP-1、Oct-1、Oct-2、IRF-1、CREB、Ets-1、NF-E1 など多くの転写因子の単離に成果を上げている (Singh H、(1993))、サウスウエスタン法についても検討した。

### 3-1 材料と方法

#### 3-1-1 菌株と培地

第1章で触れたもの以外に以下の菌株を用いた。

λファージベクター (λExCell (Pharmacia Biotech)) の宿主として

*Escherichia coli* NM522

*supE, thi, Δ(lac - proAB), Δhsd5 (r<sup>-</sup>, m<sup>-</sup>),*

[ F<sup>+</sup>, proAB, lacI<sup>q</sup>, lacZΔM15 ]

λファージベクター (λExCell) からプラスミド (pExCell) の放出用として

*Escherichia coli* NP66

*thr, leu, pro, thi, bio, cl<sup>157</sup>int<sup>+</sup> xis<sup>+</sup>, ΔH1, lacZΔM15, cm<sup>r</sup>, /*

pJN13 (φ80 repressor, pACYC184 replicon) /

pXis (*xis<sup>+</sup>, str<sup>r</sup>, spec<sup>r</sup>*, pSC101 replicon)

また第1章で触れたもの以外に以下の培地を用いた。

NZYCM 培地    1% NZ amine, Type A (和光)、0.5% Yeast Extract (Difco)  
0.5% NaCl、0.1% Casamino acids、0.2% MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O

2x YT 培地    1.6% Bacto-Tryptone (Difco)、1% Yeast Extract (Difco)  
0.5% NaCl

M9 最少培地    1x M9 salts、0.4% glucose、1 μg/ml thiamine  
(5x M9 salts 6.4% Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O、1.5% KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、  
0.25% NaCl、0.5% NH<sub>4</sub>Cl)

これらに必要なに応じて Spectinomycin (SIGMA) (終濃度 50 μg/ml)  
Chloramphenicol (SIGMA) (終濃度 30 μg/ml) を添加した。

### 3-1-2 サザンハイブリダイゼーション

酵母からの全 DNA の回収は Philippsen らの方法 (Philippsen P. *et al.* (1991)) に従って行った。回収した全 DNA を制限酵素消化の後、アガロースゲル電気泳動で分離し、Hybond-N+ (Amersham) 上に、添付説明書に従って固定した。

*S. cerevisiae* PIP2 遺伝子は、*S. cerevisiae* DBY747株全 DNA を鋳型とし 5'-AAG GGT GAA ATG GAT GAT GAT GCG G-3'、5'-GTC GAC ACT CTA CCG TAT TAG GCG C-3' をプライマーとして PCR 法により取得した。PCR の条件については第 1 章参照。増幅された 3.5 kbp の DNA 断片は、アガロースゲルから回収後、末端平滑化、リン酸化を経て pUC18 の *Sma* I 部位に挿入し、塩基配列を確認した。ここから *Sal* I 消化によって 3.5 kbp の断片を回収し、Random Primer Labelling Kit Ver.2 (宝酒造) を用いて添付説明書に従って標識し、サザン解析のプロープとした。

マウス PPAR $\alpha$  cDNA (Issemann I. *et al.* (1990)) は加藤茂明博士 (東大分生研) のご好意により供与していただいた。ここから *Kpn* I-*Bgl* II 消化によって 0.2kbp の DNA 結合領域を、また *Sac* I-*Bgl* II 消化によって 0.5kbp のリガンド結合領域をそれぞれ切り出し、前述の方法で標識してサザン解析のプロープとして用いた。

### 3-1-3 ARR5 のマルチマリゼーション

pUC119 の *Pst* I 部位に *Bgl* II 部位を持つオリゴヌクレオチド 5'-CAGATCTG-3' を 2 本鎖にして挿入し、pUC119P/B とした。この *Hin* cII 部位に 5pH $\Delta$ 48 断片を末端平滑化の後挿入し、pUC 5 $\Delta$ 48 とした。ここから *Eco* RI-*Bgl* II および *Bam* HI-*Hin* dIII 消化によって切り出した 5pH $\Delta$ 48 断片を pUC119 の *Eco* RI-*Hin* dIII 部位に挿入して pUC 5 $\Delta$ 48x2 を得た (Fig. 3-1-1)。以下、同様の手順を繰り返すことで 5pH $\Delta$ 48 断片を 8 コピー順向きに連結した断片を持つプラスミド (pUC 5 $\Delta$ 48x8) を得た。これらのプラスミドから、並列した *cis*-- エlement を含む断片を *Bam* HI-*Bgl* II 消化によって切り出し、URA3 をマーカーとする *C. maltosa* の YRp 型プラスミド pBTH30A の *Bam* HI 部位に挿入して得られたプラスミド (pBTH-5 $\Delta$ 48x1、pBTH-5 $\Delta$ 48x2、pBTH-5 $\Delta$ 48x4、pBTH-5 $\Delta$ 48x8) を *C. maltosa* CHAU1 に導入した。

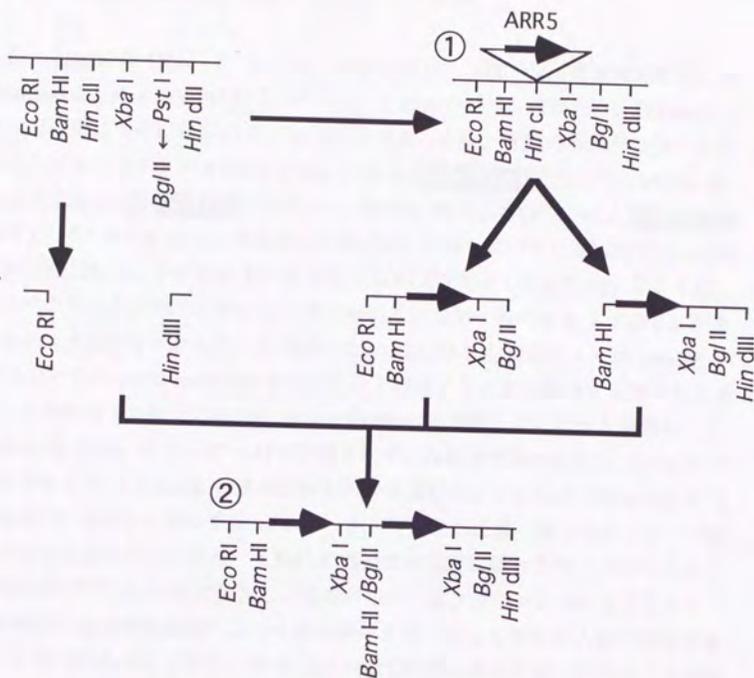


Fig. 3-1-1 ARR5 のマルチマー化の方法

最初の単量体から二量体を作成する手順を示した。最後に得られた二量化 ARR5 (2) は材料の単量体 ARR5 (1) と *Eco* RI・*Bam* HI・*Bgl* II 及び *Hin* dIII についての制限地図が一致する。従ってこの二量化 ARR5 を用いて同様の手順を踏むことで四量体化した ARR5 を作成することができる。さらに以下、同様の手順で任意の多量化 ARR5 が得られる。またこのようにして多量化した ARR5 からは *Xba* I または *Sau* 3A1 (*Bam* HI / *Bgl* II 部位を消化できる) 消化により単量体 ARR5 を含む断片を切り出すことが可能である。

### 3-1-4 *Candida maltosa* の発現ライブラリーの構築

*C. maltosa* 全 DNA を *Sau* 3AI で部分消化した後、シヨ糖密度勾配遠心法 (Sambrook J. *et al.* (1989)) によって 0.5 ~ 4 kbp の断片を回収した。*Eco* RI メチラーゼ処理により断片中の *Eco* RI 部位を保護した後、3種の合成リンカー (合成オリゴヌクレオチド BEBL2 (5'-GAT CCA **GGA ATT CCT** G-3'), BEBL3 (5'-GAT CCA CAG **AAT TCT** GTG-3'), BEBL4 (5'-GAT CCC ACA **GAA TTC** TGT GG-3')) をそれぞれ二本鎖化して用いた。これらはいずれも末端が *Bam* HI 対合末端となり、中央部に *Eco* RI 部位 (反転文字で示した) を生ずるように、かつベクターと連結した際にリンカー中にインフレームのストップコドンが生じないようにデザインした) を連結した。*Eco* RI で完全消化した後 *SizeSep*<sup>TM</sup> 400 Spun Column (Pharmacia Biotech) を2回通すことで過剰のリンカーを除去し、 $\lambda$  ExCell *Eco* RI / CIP (Pharmacia Biotech) と連結した。これとは別に、*C. maltosa* 全 DNA を *Eco* RI と対合末端を生ずる四塩基認識制限酵素 *Tsp* 509I で部分消化して  $\lambda$  ExCell と連結したのもも作成した。これらは GIGAPACK II (STRATAGENE) を用いて *in vitro* パッケージを行った後、得られたファージ粒子の力価を測定した。また、 $\lambda$  ExCell の添付説明書に従ってライブラリーを *E. coli* NP66 中で pExCell に変換し、任意の 10 ~ 20 クローンについてプラスミドを回収し、制限酵素処理によって挿入断片を切り出して平均挿入断片長を計算した。得られたライブラリーは *E. coli* NM522 株に感染させ、常法により増幅してスクリーニングに用いた。

### 3-1-5 サウスウエスタン法

文献 (田村隆明編 (1993)、村松正實ら (1996)) を参考におこなった。

## 3-2 結果と考察

### 3-2-1 他の生物での相同機構の探索

*C. maltosa* の全 DNA を用いたサザン解析ではプローブとして *S. cerevisiae* PIP2 および mouse PPAR  $\alpha$  (DNA 結合領域およびリガンド結合領域) のいずれをプローブとして用いた場合にも有意なシグナルを認めることは出来なかった。文献(太田美智男、1996)によれば今回用いた最も緩やかな条件(56°C で一昼夜ハイブリダイゼーションを行った後、2xSSC を含む洗浄液で5分間4回、室温で洗浄)では20%程度の相同性を有する遺伝子をも検出できることが期待される。従って以上の結果より *C. maltosa* は PIP2 および PPAR  $\alpha$  に塩基配列で有意な相同性のある遺伝子を持っていないと考えられた。

### 3-2-2 菌体内の *trans* 因子の deplete の試み

pBTH30A、pBTH-5 $\Delta$ 48x1、pBTH-5 $\Delta$ 48x2、pBTH-5 $\Delta$ 48x4 および pBTH-5 $\Delta$ 48x8 を pPLA5 (第1章)とともに形質転換した CHAU1 株の  $\beta$ -ガラクトシダーゼ活性および *n*-アルカン資化性について検討したが、導入したプラスミド間で有意と考えられる差異を見いだすことはできなかった。

第4章で詳しく述べるがこの断片による転写の阻害は *in vitro* 転写系においても認められなかった。この配列は TATA 配列を含んでおらず、目的の転写活性化因子(複合体)が TATA 配列を下流に持つ ARR5 により優先的に結合することが原因であると推察される(第4章参照)。

### 3-2-3 サウス-ウエスタン法の条件検討

まず、メンブラン上に固定化した DNA 結合性の蛋白質を放射標識した DNA 断片で検出するための条件について検討した。プローブには 5 $\Delta$ 48x8 断片(pUC 5 $\Delta$ 48x8 から *Bam* HI-*Bgl* II 消化により切り出した)をランダムプライマー標識して用いた。メンブランは Hybond-C ニトロセルロースメンブラン(Amersham)を用い、蛋白質の固定には、SDS-PAGE で分離したものをエレクトロブロットティングする方法と、蛋白質溶液を直接スポットする方法とを試みた。

エレクトロブロットティングしたサンプルからは有意なシグナルは検出されなかった(データは示さない)。一方、スポットアッセイにおいては *C. maltosa* の

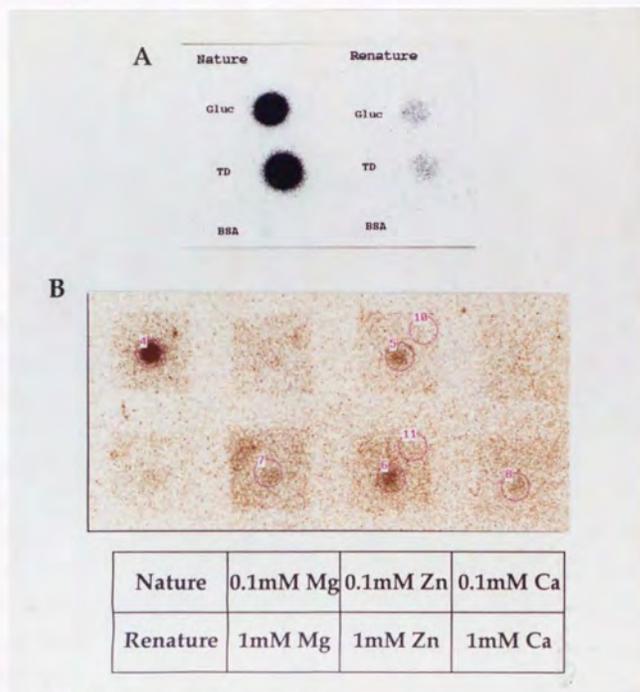


Fig.3-2-1 全抽出液のスポットアッセイ

- A メンブレン上に固定化した DNA 結合蛋白質の、標識 DNA プロープによる  
検出条件の検討

nature、抽出液をスポットしたメンブレンをそのままハイブリダイゼーション  
に用いた(非変性)。

renature、抽出液をスポットしたメンブレンを塩酸グアニジンを用いて変性、  
再生操作の後、ハイブリダイゼーションを行った。

gluc、グルコース培養菌体の抽出液; TD、*n*-テトラアカン誘導菌体の抽出液;  
BSA、ウシ血清アルブミン水溶液

- B 再生条件の検討

スポットした細胞抽出液は全て*n*-テトラアカン誘導菌体より抽出したものである。

Nature, 非変性; Renature, 塩酸グアニジン変性後、再生; 0.1mM Mg, 0.1mM 塩  
化マグネシウムを添加したバッファーで再生; 1mM Mg, 1mM 塩化マグネシウ  
ムを添加したバッファーで再生; 0.1mM Zn, 0.1mM 塩化亜鉛を添加したバッ  
ファーで再生; 1mM Zn, 1mM 塩化亜鉛を添加したバッファーで再生; 0.1mM Ca,  
0.1mM 塩化カルシウムを添加したバッファーで再生; 1mM Ca, 1mM 塩化カル  
シウムを添加したバッファーで再生

菌体抽出液をスポットした箇所に有意なシグナルが認められた (Fig. 3-2-1 A)。このシグナルは対照として牛血清アルブミン溶液をスポットした箇所には認められなかった。また、グルコース培養菌体からの抽出液とテトラアカン培養菌体からの抽出液との両方にシグナルが観察されたが、テトラアカン培養菌体抽出液のシグナルがグルコース培養菌体のそれと比較して約2倍の強さであった。同様に菌体抽出液をスポットしたメンブランを 6M 塩酸グアニジンで変性処理した後、徐々にグアニジン濃度を低下させることで蛋白質の再生を試みたところ、元のもの 1/10 以下程度の強度のシグナルしか得られなかった。SDS-PAGE からエレクトロブロットニングしたメンブランで有意なシグナルが得られなかった原因の一つとして、この塩酸グアニジン法による目的蛋白質の再生効率の低さが考えられた。そこで再生に用いる緩衝液に種々の二価イオンを補うことで再生効率を上昇させることができないか検討した。その結果、Fig. 3-2-2 B に示すように、亜鉛イオンを補うことで部分的に効率が上昇するのを見いだした。マグネシウムイオンおよびカルシウムイオンでは有意な差異は認められなかった。この結果から、目的とする蛋白質が DNA 結合能を発揮する上で亜鉛イオンを要求することが示唆された。しかし、スポットアッセイにおいてシグナル強度を完全に回復するような再生条件を見いだすことはできなかった。そこで以下のスクリーニングにおいては蛋白質の変性は行わず、大腸菌中で発現させた DNA 結合蛋白質を直接スクリーニングすることを試みた。

### 3-2-4 サウスウェスタン法によるクローニングの試み

上記した方法で *Sau* 3AI 消化のものからは平均挿入断片長 1.15kbp、ライブラリーサイズ  $5.0 \times 10^5$  クローンの、*Tsp* 509I 消化のものからは平均挿入断片長 2.69kbp ライブラリーサイズ  $2.2 \times 10^6$  クローンのライブラリーを得ることができた。文献 (Ausubel F. M. et al. (1994)) によれば、*C. maltosa* のゲノムサイズを約 20Mbp と仮定した場合に、全 DNA の 99.9% をカバーするクローン数は平均挿入断片長 1.15kbp のライブラリーの場合  $1.2 \times 10^5$  クローン、平均挿入断片長 2.69kbp のライブラリーの場合  $5.1 \times 10^4$  クローンと計算される。これに発現ライブラリーであることから挿入方向 (2通り) と読み枠 (3通り) を考慮して、*Sau* 3AI 消化によるライブラリーでは  $7.2 \times 10^5$  クローンを、*Tsp* 509I 消化のものからは  $3.1 \times 10^5$  クローンをそれぞれスクリーニングすれば充分であると考えられた (*Sau* 3AI 消化のライブラリーでのライブラリーサイズは  $5.0 \times 10^5$  クローン

であり、99.9% カバーの必要クローン数に満たないがゲノムの 99% をカバーする (推計  $4.8 \times 10^5$  クローン) には十分である)。本方法においては  $9.5 \text{ cm} \times 13.5 \text{ cm}$  の角プレートを用いれば  $5 \times 10^4$  程度を一度にスクリーニングすることが可能である (田村隆明編、1993)、すなわち数をこなせることが最も大きな利点の一つであると考えられるので、クローン間による増幅効率の差異も考慮して、各々から  $10 \times 10^5$  クローンをスクリーニングに供した。しかし、最終的に二次スクリーニングで陽性と判断されるクローンを得ることはできなかった。

一般にサウスウエスタン法において DNA 結合蛋白質遺伝子 DNA のクローニングができない原因として考えられることは、(1) ヘテロダイマーのような複合体を形成することによって DNA 結合能が発揮される可能性、(2) 複合体を形成するわけではないが DNA 結合能の発現にリン酸化や糖鎖の付加などの修飾が必要である場合、が挙げられる (田村隆明編 (1993))。前章で ARR5 を特異的に認識して結合する主な蛋白質はゲル移動度シフトアッセイにおいても UV- 架橋法においても一本のバンドを与えることを述べたが、ゲル移動度シフトアッセイ (これは非変性アクリルアミドゲルを用いているので蛋白複合体は解離しない) で検出されたバンドの移動度が比較的小さなものであったことから、これが複数の蛋白質の複合体である可能性は充分考えられる。UV- 架橋法 (SDS 変性ゲルを使用) では主要な一本のバンド以外に複数の弱いシグナルが認められたが、これらは DNA とは直接結合しないものの DNA 結合タンパク質と複合体を形成することによりプローブ DNA の近傍に存在することで副次的に標識された可能性が考えられる。またこれに加えて *C. maltosa* は *C. albicans* 同様、通常ロイシンとして翻訳される CUG コドンをセリンに翻訳するという特性を持つ (Sugiyama H. *et al.* (1995))。従って CUG コドン (*C. maltosa* においては比較的希なコドンではあるが) が目的とする転写因子の DNA 結合領域に含まれるなど DNA 結合能の発現に影響するとすれば、大腸菌中で発現させることを利用している本方法ではクローニングすることはできないと考えられる。

本章でのスクリーニングには *C. maltosa* 全 DNA を制限酵素処理して構築したゲノムライブラリーを用いている。これは *C. maltosa* において、イントロンを持つ遺伝子が希であること (これまでに 3 種の報告例がある (Wolf K., 1995))、仮にあったとしても一つの機能領域 (DNA 結合領域) がイントロンによって分断されているとは考えにくいこと、を前提としている。またライブラリー構築に用いた制限酵素処理 DNA 断片は  $0.5 \sim 4 \text{ kbp}$  と比較的小さいサイズのものを用いたが、これは前章の UV- 架橋法の結果検出された主要な蛋白質が  $27 \text{ kDa}$  (推定約 240 アミノ酸、720 塩基対) と、比較的小さなものであったこと、およ

び本方法により目的とする転写因子の DNA 結合領域 (を中心とする領域) を  $\beta$ -  
ガラクトシダーゼとの融合タンパク質として発現させようという目的に基づい  
てのことである。この場合、目的とする DNA 結合領域がアミノ末端近くに存  
在する場合には、それがカルボキシル末端に存在する場合と比較してスクリー  
ニングすべきクローン数が多くなる可能性も考えらる。目的とする転写因子  
は非誘導状態でも発現していると考えられるため (転写条件の検討を必要とし  
ない) cDNA ライブラリーを構築するのがより確実な方法であったのかも知れ  
ない。

## 第4章 *Candida maltosa* における *in vitro* 転写系の構築と *trans* 因子の単離の試み

前章で転写活性化に関与する因子をコードする遺伝子の単離を試みたが、成功を見なかったことを踏まえて、本章ではこの因子を生化学的手段で解析・分離する事を試みた。

この場合2つの手法の検討が必要であると考えられる。一つには転写因子の活性を *in vitro* 再構築系で評価する手段 (*in vitro* 転写法) の検討であり、もう一つは分離精製方法の検討である。前者に関しては、*S. cerevisiae* における幾つかの報告を参考にして行った。後者に関しては 1) 酵母核の単離、2) アフィニティークロマトグラフィー (DNA アフィニティークロマトグラフィー およびヘパリンアガロースアフィニティークロマトグラフィー (Farooqui A. (1980))), の2つについて検討を行った。

### 4-1 材料と方法

#### 4-1-1 *Candida maltosa* における *in vitro* 転写法

*Candida maltosa* における *in vitro* 転写は、基本的には Woontner ら (Woontner M. and Jaehning J. A. (1990)、Woontner M. *et al.* (1991)) の *Saccharomyces cerevisiae* における報告を元に条件を検討・改良して行った。本法は G-フリーカセット法と呼ばれる手法で、プロモーターの下流に連結したグアニンを含まない配列を GTP 非存在下で転写させる。現在までに Run-off 法による *in vitro* 転写産物が確認されていない酵母の系において、最も一般的に用いられている方法の一つであるといえる。また *S. cerevisiae* や動物細胞のみならず、*C. utilis* (Patturajan M. *et al.* (1994)) や *Nectria haematococca* (Ruan Y. and Straney D. C. (1994)) の細胞抽出液を用いての成功例も報告されている。最終的なプロトコルを以下に示す。

#### 1) *in vitro* 転写に用いる鋳型の合成

鋳型の合成は当初、Ruan と Straey の方法 (Ruan Y. and Straney D. C. (1994)) に従い、pBluescript 上にクローン化したプロモーターの下流に直接合成する方

法を試みたが、うまく行かなかった。これは Phage T7 gp6 exonuclease の活性を調製するのが困難であったためと考えられた。また terminal deoxynucleotide transferase (TdT) の活性が通常使われるカコジル酸と塩化コバルトを用いた緩衝液中では不安定である可能性も考えられた。そこで合成オリゴヌクレオチド 5'-GGG **GAT ATC** ACT CA-3' (反転文字はアニーリングした際に Eco RV 部位となる部位を示す。ここに目的のプロモーター断片を挿入した。Fig. 4-2-1 参照) をプライマーとして、dATP:dCTP:dTTP = 1:2:1 の存在下 (dGTP の非存在下)、TdT の反応緩衝液として 1x OnePhorAll buffer (OPA buffer) (Pharmacia Biotech) を用いて伸長反応を行った (この dNTP 比は鋳型中に TATA 様配列が生じるのを極力防ぐためと鋳型配列の GC 含量が 50% 程度となることを期待して決定した)。この酵素による伸長反応産物の塩基数は dNTP 濃度に依存するので、dATP 濃度として 50mM・100mM・200mM の 3 段階の反応系を作り、それぞれの反応生成物を等量ずつ混合して以下の処理に用いた。合成した一本鎖 DNA は cDNA 合成の要領で二本鎖化した、すなわち C を含まない 6 塩基のランダムプライマーとアニーリングした後、Klenow Fragment (宝酒造) を用いて反対鎖を合成し、T4 polynucleotide kinase (宝酒造) を用いて末端をリン酸化した。得られた G-フリーカセットは pUC19 の Sma I 部位にクローニングし、Eco RV-Eco RI 消化または Eco RV-Sal I 消化によって挿入断片長と挿入方向を判断し、適当なものを選択した後、塩基配列を決定した。最後に合成プライマー中に導入された Eco RV 部位に目的のプロモーター領域を挿入して以下の実験に用いた。

## 2) 転写活性のある無細胞抽出液の調製法

YEPD 培地で 30 °C 一晚振盪培養した *C. maltosa* IAM12247 株を 0.01% Yeast Extract を補った誘導培地に 1/100 量植菌し 5 時間振盪培養した (誘導をかける場合には本培養開始後 4 時間後に誘導剤を添加)。遠心により菌体を回収した後、氷冷した蒸留水で一回洗浄し、得られた菌体ペレットを液体窒素で凍結した。以下の操作は氷上もしくは低温室でおこなった。1g の凍結菌体に対し 1ml の緩衝液 A に懸濁し、完全に解凍した後、フレンチプレスを用いて 20,000 psi、2 回の条件で細胞を破碎した。得られた細胞破碎懸濁液を氷冷した緩衝液 A で 2 倍に希釈した後、クボタ遠心機スイングローター RS-4 を用いて 2,000 rpm 3 分間の後、日立超遠心機ローター RP50T を用いて 48,000 rpm 90 分間で順次遠心し上清を回収した。この上清 1ml に対し 322.4 mg の硫酸アンモニウム、

および加えた 1g の硫酸アンモニウムに対し 10  $\mu$ l の 1M 水酸化カリウムを加えて硫酸沈殿を行い、日立超遠心機ローター RP45T を用いて 38,200 rpm で 1 時間超遠心して沈殿を回収した。得られた沈殿は元の菌体 1g あたり 50  $\mu$ l の氷冷した緩衝液 B に溶解し、プロテアーゼ阻害剤溶液の代わりに 1mM PMSF を添加した緩衝液 B に対して 2 時間以上 3 回、透析した (分画分子量 10,000 のセロース膜を用いた)。得られた抽出液を日立超遠心機ローター RP65T を用いて 40,000 rpm 30 分間超遠心し、上清を小分けして液体窒素で凍結し、-80  $^{\circ}$ C で保存して以下の実験に用いた。

緩衝液 A 0.2M Tris-Acetate (pH7.9)、0.5M  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、10mM  $\text{MgSO}_4$ 、  
20% (v/v) glycerol  
使用前にジチオスレイトール (終濃度 1mM) およびプロテアーゼ阻害剤溶液を添加)

緩衝液 B 20mM HEPES - KOH (pH 7.5)、20% (v/v) glycerol、10mM EGTA  
10mM  $\text{MgSO}_4$ 、10 mM Zn  $(\text{OCOCH}_3)_2$   
使用前にジチオスレイトール (終濃度 5mM) およびプロテアーゼ阻害剤溶液を添加

#### 100x プロテアーゼ阻害剤溶液

100mM PMSF, 200mM ベンズアミジン塩酸塩, 200 $\mu$ M ペプスタチン A, 60 $\mu$ M ロイペプチン, 0.2mg/ml キモスタチン,  
(エタノール溶液)

### 3) 転写活性のある酵母核抽出液の調製法

凍結菌体の作成は前項に同じ。1g の凍結菌体に対し 1ml の HM 緩衝液を加えて完全に解凍した後、フレンチプレスを用いて 20,000 psi、2 回の条件で細胞を破碎した。これを液体窒素で再び凍結した後、同量の 1% ノニデット P-40 を含む HM 緩衝液を加え、4  $^{\circ}$ C でローターを用いて穏やかに攪拌しながら完全に解凍し、サイトカラシン B (1mg/ml の DMSO 溶液) を 1/100 加えて、さらに 10 分間攪拌した。得られた抽出液から日立遠心機 RPR20 ローターを用いて、分別遠心法 ((1) 7,000rpm で 5 分間遠心し、上清と緩く沈殿となったものを回収、(2) 6,500rpm で 5 分間遠心し、上清と緩く沈殿となったものを回収、(3)

6,000rpm で5分間遠心し、上清を回収)により未破壊の細胞を除いた後、日立超遠心機 RP45T ローターを用いて 16,500rpm、30分間の高速遠心によって核をペレットとして分離した。得られた粗核画分は再び氷冷した HM 緩衝液 (ノニデットP-40 を含まない) に懸濁して、前述の分画遠心および高速遠心を行い、沈澱を精製核とした。得られた核ペレットは氷冷したHM緩衝液で洗浄した後、氷冷した緩衝液 B に懸濁し、1/5 量の 3M 硫酸アンモニウム (水酸化カリウムであらかじめpH7に調製) を加え、4℃でローテーターを用いて穏やかに攪拌することによって核を破壊した後、Beckman TLA45 ローターを用いて 45,000 rpm、30分間の超遠心によって得られた上清を核抽出液とした。得られた抽出液はプロテアーゼ阻害剤溶液の代わりに 1mM PMSF を添加した緩衝液 B に対して2時間以上3回、透析した(分画分子量 10,000のセルロース膜を用いた)後、Beckman TLA45 ローターを用いて 45,000rpm で30分間超遠心し、上清を小分けして液体窒素で凍結し、-80℃で保存して以下の実験に用いた。

HM 緩衝液 (Wintersberger U. *et al.* (1973))

1M Sorbitol、7% Ficoll 400 (Pharmacia Biotech)、0.5mM Ca(OCOCH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>、20mM リン酸カリウム (pH 6.5)、  
使用直前に PMSF を終濃度 1mM に添加

#### 4) *in vitro* 転写法

- 1) 無細胞抽出液 (又はそれを緩衝液 B で適宜希釈したもの) 12 μl に 0.5M ジチオスレイトール 0.2 μl およびリボヌクレアーゼインヒビター (宝酒造、もしくは和光) 0.3 μl を添加し氷上でインキュベートしておく。
- 2) 5x IVTC 緩衝液 6μl に鋳型プラスミドを適当量 (通常 1 mg/ml を 1μl) および 1% ノニデットP-40 1.25 μl を添加し蒸留水で 11.5 μl とする。氷上でインキュベートしておいた抽出液 (12.5 μl) を加え (総量 25 μl) を室温 (25℃) で 30 分間静置。
- 3) 6x NTP 混合液 5 μl を加え、さらに室温で 1 時間静置。(3'-O-Me GTP 濃度は抽出液のバッチごとに検討)
- 4) 0.32 unit/μl の RNase T1 (SIGMA) を含む T1 緩衝液 120μl を添加し、

37 °C 20分間静置。

- 5) 反応停止緩衝液 25  $\mu$ l と 2mg/ml プロテイナーゼ K (和光) 25 $\mu$ l を添加し37 °C 30分間静置。
- 6) 反応生成物を 1M Tris-HCl (pH 8.0) で飽和したフェノール・クロロホルム・イソアミルアルコール (25:24:1) 200 $\mu$ l で 2 回抽出し、3 M 酢酸ナトリウム (酢酸で pH を 5.3 に調製) 10 $\mu$ l とエタノール 500 $\mu$ l を加え、-80°C に 1 時間以上静置。
- 7) 15,000rpm、15分間冷却遠心して反応生成物を沈澱させ、上清を完全にのぞき、10 $\mu$ l のホルムアミドサンプル緩衝液に溶解した後 95°C 3分間静置して RNA を変性させる。氷上で急冷した後、8.3M 尿素を含む 6% 変性アクリルアミドゲルで分離。ゲルを乾燥した後、転写反応生成物のシグナルをイメージアナライザーで解析。

5x IVTC 緩衝液 210mM HEPES-KOH (pH 7.5)、30% glycerol、  
290mM  $\text{CH}_3\text{COOK}$ 、50mM  $\text{Mg}(\text{OCOCH}_3)_2$ 、5mM EGTA、  
3.75% PEG4000

6x NTP 混合液 12mM ATP、12mM CTP、0.2mM UTP、1mM 3'-O-Me GTP  
(以上 Pharmacia Biotech)、0.06unit クレアチンホスホキナーゼ、  
200mM ホスホクレアチン (以上SIGMA)、  
0.4  $\mu\text{Ci}/\mu\text{l}$  [ $\alpha$ - $^{32}\text{P}$ ] UTP (SP6/T7 grade) (Amersham)

T1 緩衝液 10mM Tris-Cl (pH 7.5)、300mM NaCl、5mM EDTA

反応停止緩衝液 0.8 mg/ml 酵母 tRNA、4% SDS

ホルムアミドサンプル緩衝液

80% formamide (deionised)、0.1% Bromophenol Blue、  
0.1% Xylene Cyanol FF、1x TBE

#### 4-1-2 ゲル移動度シフトアッセイ

今回 *in vitro* 転写が確認された緩衝液条件でゲル移動度シフトアッセイを再検討した。

1x バインディング緩衝液で適宜希釈した細胞抽出液 2 $\mu$ l を10x バインディング緩衝液 0.8 $\mu$ l、50% グリセロール 2 $\mu$ l、1% ノニデット P-40 0.5 $\mu$ l、1mg/ml poly (dI-dC) poly (dI-dC) 0.5 $\mu$ l、 $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{dCTP}$  で末端標識した B42B プロープ 1 $\mu$ l (第3章参照) および蒸留水 3.2 $\mu$ l と混合して室温で 30 分間静置した。以降の解析方法は第2章参照。

1x バインディング緩衝液 50mM HEPES-KOH (pH 7.5)、70mM  $\text{CH}_3\text{COOK}$ 、  
10mM  $\text{Mg}(\text{OCOCH}_3)_2$ 、4mM  $\text{MgSO}_4$ 、5mM EGTA

#### 4-1-3 DNA アフィニティーマトリックスを用いた無細胞抽出液の分画

DNA アフィニティーマトリックスはニッポンジーン社の EASY ANCHOR Bam HI-N を使い、添付説明書に従って 8x B42B (第3章参照) を固定して作成した。無細胞抽出液 1ml に DNA を固定化したマトリックスをゲル体積で 10  $\mu$ l 懸濁し、氷上で 30 分間インキュベートした後、5,000rpm、2 分間の冷却速度でマトリックスを沈澱させた。上清を完全に取り除き、氷冷した 1x バインディング緩衝液 500 $\mu$ l で三回洗浄した後、より高濃度の酢酸カリウムを含む 1x バインディング緩衝液 50 $\mu$ l で順次洗浄して DNA に結合した蛋白質を溶出した。

#### 4-1-4 ヘパリンアガロース アフィニティーカラムを用いた 無細胞抽出液の分画

ヘパリンアガロースカラムは HiTrap Heparin 1ml (Pharmacia Biotech) を用いた。ペリスタポンプを用いて緩衝液 B でカラムを平衡化した後、シリンジを用いて 1ml の抽出液をロードした。10ml 以上の緩衝液 B で非吸着画分を洗い流した後、より高濃度の酢酸カリウムを含む緩衝液 B で順次溶出した。使用後のカラムは 0.5M 塩化ナトリウムを含む 0.1M トリス塩酸 (pH8.5) および 0.5M 塩化ナトリウムを含む 0.1M 酢酸ナトリウム (pH4.5) で交互に洗浄した後、0.1% アジ化ナトリウムを含む 20% エタノールを満たして 4 $^{\circ}$ C で保存した。

## 4-2 結果

### 4-2-1 *in vitro* 転写に用いる鋳型の合成

Fig. 4-2-1 に合成し、塩基配列を決定した G-フリー配列の幾つかを示す。Ruan と Straney の報告よれば用いる鋳型 DNA の配列によって *in vitro* 転写の効率は大きく影響を受ける (Ruan Y. and Straney D. C. (1994))。そこでそれぞれの *Eco* RV 部位に *ALK5* のプロモーター領域を TATA 配列直下流の *Bgl* II 部位を用いて連結 (TATA 配列下流の G 塩基を出来るだけ除くため、切り出したプロモーターは Mung Bean Nuclease を用いた平滑末端化の後、*Eco* RV 部位に挿入した) したものを用いて *S. cerevisiae* の無細胞抽出液中で実際に転写反応を行い (*ALK5* プロモーターは *S. cerevisiae* 中で構成的に発現している。第1章参照) 効率的に転写反応が進むことを確認して、以下の実験に用いることとした。

Fig. 4-2-2 に *S. cerevisiae* の抽出液を用いて *in vitro* 転写を行った結果を示す。GF5、GF8 を鋳型に用いた場合にはそれぞれ合理的な位置に特異的転写の結果と考えられるバンドを検出することが出来た (図中矢印で示した)。GF7 を鋳型に用いた場合には特異的転写の結果と考えられるバンド以外に、それより短い約 120b の転写産物が確認された。何らかの原因で転写反応が途中で止まってしまった結果と考えられる。GF5 と GF8 では前者の方が長い配列を含んでおり、また転写反応で得られるシグナルも強かった。GF5 は *Eco* RV 切断部位から 40bp の位置に TATA ボックスに類似の配列を含んでおり (Fig.4-2-1)、*in vitro* 転写反応への影響が懸念されたが、仮にここが転写開始を指示する配列として機能を持つならば 200b より短い転写産物が観察されるはずであり、そのようなバンドが観察されなかったことからこの配列は機能を持たないと判断した。GF5 はまた、鋳型配列の末端に制限酵素 (*Mun* I) 認識部位を生じており (Fig. 4-2-1)、鋳型となる部分のみを切り出すことができるという点でも今後の应用到有利であると考え、以後の解析にコントロールとして用いることとした。

なお、同時に *C. maltosa* の細胞抽出液を調製して同様の実験を行ったが、有意な転写が認められなかったので、以下、反応条件の検討を行った。

### 4-2-2 転写活性のある無細胞抽出液の調製

*C. maltosa* の抽出液を用いて *in vitro* 転写を行った結果を Fig. 4-2-3 に示す。より早いステージで回収した菌体から調製した比較的高濃度の抽出液を用い

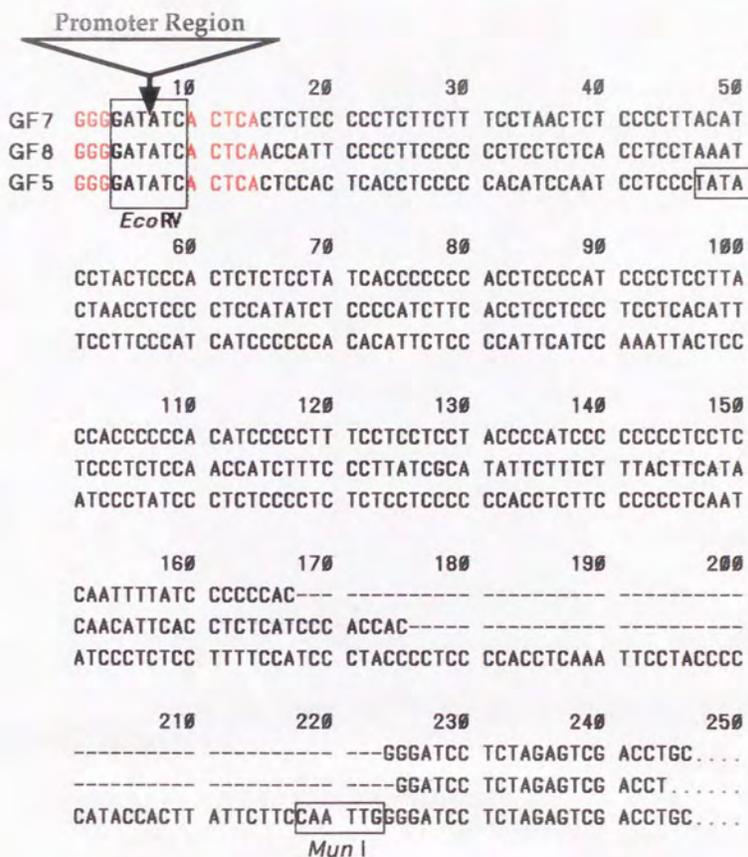


Fig. 4-2-1 合成した G-フリー配列の塩基配列

合成し塩基配列を決定したもののうち実際に転写反応に用いた3種を示す。

G-フリーセット中の注目すべき配列（制限酵素認識部位、及び TATA ボックス様配列）は四角で囲った（本文参照）。

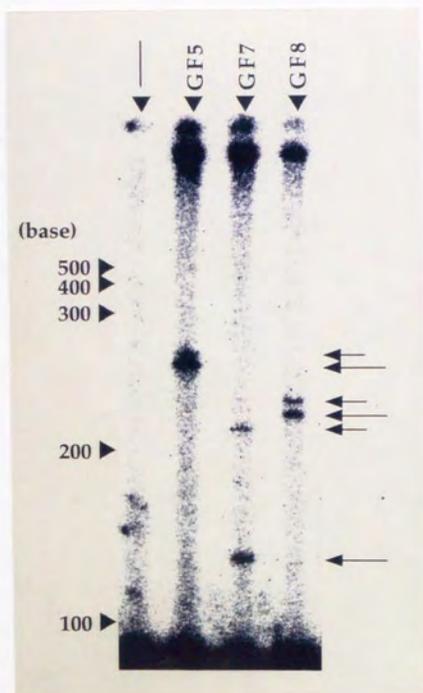


Fig. 4-2-2 *S. cerevisiae* 抽出液による *in vitro* 転写

プロモーターは全て *ALK5* プロモーター。分子量マーカーには核酸分子量マーカー 100bp ラダー (NEB) をリン酸化により末端ラベルして用いた。なお、本実験は標識した CTP を用いている。

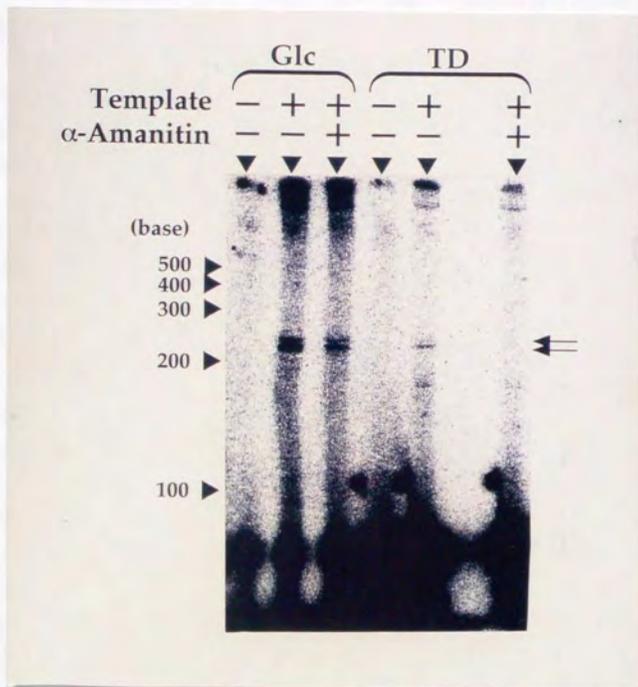


Fig. 4-2-3 *C. maltosa* 抽出液を用いた *in vitro* 転写

鋳型には GF5 を *ALK5* プロモーターに連結して使用した。α-アミニチンには終濃度 10μg/ml で添加した。Glc (グルコース培養菌体抽出液) 及び TD (*n*-テトラアekan 誘導菌体の抽出液) は総蛋白質として約 30μg を 1 レーンの反応に用いた。なお、本実験には標識ヌクレオチドとして CTP を用いている。

ることで、鋳型プラスミド依存的な約 200b の転写産物の生成を確認できた。この転写反応は 10 $\mu$ g/ml の  $\alpha$ -アミニチン (SIGMA) の存在で阻害されたがその有効濃度は一般に知られているより高かった (RNA ポリメラーゼ II は通常 1 $\mu$ g/ml の  $\alpha$ -アミニチンで完全に阻害される)。

Fig. 4-2-2 および Fig. 4-2-3 の実験では標識ヌクレオチドとして [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P] CTP を用いた。これは鋳型として C 残基を多く含む配列を用いていることから標識 CTP を用いることでより高感度で転写産物を検出できると考えたためである (Ruan Y and Straney D.C. (1994) 参照)。しかしその結果 tRNA- シチジルトランスフェラーゼ活性に由来すると考えられる 100b 以下の非特異シグナルが非常に強くなる結果を得た。さらにこの酵素の活性が培養条件によって著しく異なる (テトラデカン誘導菌体で強い。Fig. 4-2-3 参照) ことから、実験結果の定量的な評価に影響を与えると考えられた。そこでこの実験以後の反応では標識ヌクレオチドとして [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P] UTP を用いることとした (Swadogo M. *et al.* (1985) および Fig. 4-2-3 脚注参照)。

Fig. 4-2-4 に *C. maltosa* の細胞抽出液を用いた *in vitro* 転写の反応条件について検討した結果の 1 例を示した。鋳型としては ALK 5 プロモーター下流に連結した GF5 を用いた (以後、特に断らない場合にはこの鋳型を標準として用いている)。この実験の結果から明らかになったことを列挙する。

- i) 細胞抽出液濃度、および鋳型 DNA 濃度への依存性が *S. cerevisiae* 抽出液を用いた既報の場合より高い。すなわち、どちらを減らしても転写活性は著しく減少した。また、鋳型プラスミド濃度を上げることで転写産物量が著しく増加した。
- ii) 未標識の UTP 濃度は 30 $\mu$ M が最適であった (データは示さない)。50 $\mu$ M では標識 UTP の取り込みに若干の阻害が見られ、100 $\mu$ M ではほとんど阻害された。
- iii) 反応中の ATP 再生産系に関してはホスホエノールピルビン酸 (PEP) を用いる場合 10 mM で添加したが、この量を増やしても転写量にはほとんど影響がなかった。50mM ではむしろ *in vitro* 転写に阻害的であった。
- iv) Zabetta と Boam (1996) はブレインキュベーション時に 10 $\mu$ M ATP (また

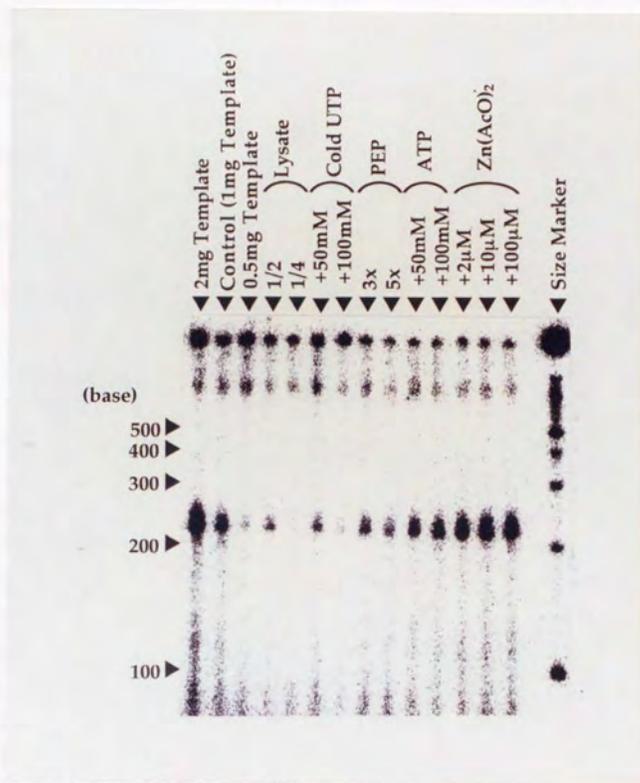


Fig. 4-2-4 *C. maltosa* の *in vitro* 転写反応条件の検討

左から2レーン目がコントロール反応(鋳型DNA 1 $\mu$ g、総蛋白質 30 $\mu$ g)。Cold UTP、PEP(ホスホエノールピルビン酸)、ATP及び酢酸亜鉛はプレインキュベート時に添加した。なお、本実験には標識ヌクレオチドとしてCTPを用いている。

はそのアナログ)を添加することで転写開始複合体の形成が促進され、*in vitro* 転写を著しく亢進すると報告している (Coda-Zabetta F. and Boam D. S. (1996)) が、検討した限りでは目立った効果は見られなかった(データは示さない)。添加濃度を上げて再検討したが、やはり転写産物の増加はなかった。

- v) プレインキュベーション時に  $10\mu\text{M Zn}(\text{OCOCH}_3)_2$  (Fig. 4-2-4) や 0.05% ノニデットP-40 (Fig.4-2-11, Fig. 4-2-12 など) を添加する事で転写反応が促進された。  $\text{Zn}(\text{OCOCH}_3)_2$  の場合には  $10\mu\text{M}$  以上添加しても転写産物量がそれ以上増えることはなかったが、ノニデットP-40 の場合には 0.5% の添加ではさらに転写反応が促進された (Fig.4-2-11)。

以上の条件検討をもとに *in vitro* での *n*-アルカンによる転写誘導の再現を試みた。すなわち、グルコース培養菌体および *n*-アルカン誘導菌体からそれぞれ調製した抽出液中で *ALK5* プロモーターおよび *CYC1* コアプロモーターからの転写量を検討したが、いずれの反応条件下においても有意と認められる転写産物量の差は確認されなかった (Fig. 4-2-5 Fig. 4-2-11 を参照)。

そこで、2種のプロモーターを同一反応中で競合させることを試みた。このとき長さの異なる G-フリーカセットを用いればそれぞれのプロモーターからの転写産物を区別できると考え、Fig. 4-2-2 で用いた *ALK5* プロモーター下流に *GF8* を連結したもの (*A5-GF8*) を *CYC-GF5* と競合させた。また対照として *A5-GF8* と *A5-GF5* の競合実験もおこなった。Fig. 4-2-5 にその結果を示す。用いた3種の鋳型を単独で転写させた場合、それぞれの転写量に抽出液による有意な差は見られない。*A5-GF8* を *CYC-GF5* を競合させた場合には、グリセロール培養菌体の抽出液では *CYC-GF5* の転写が優先的に行われるのに対して、テトラデカン誘導菌体の抽出液中では両方の鋳型が同様に転写された。一方、*A5-GF8* と *A5-GF5* の競合ではどちらの抽出液においても両方の鋳型からの転写反応産物が認められたことから、グリセロール培養菌体抽出液における *CYC-GF5* の鋳型としての優先性は G-フリーカセットの配列の違いに起因するものではない、つまり *n*-アルカンによる誘導によって、転写の際の *ALK5* プロモーターの選択性が上昇した結果であると考えられた。

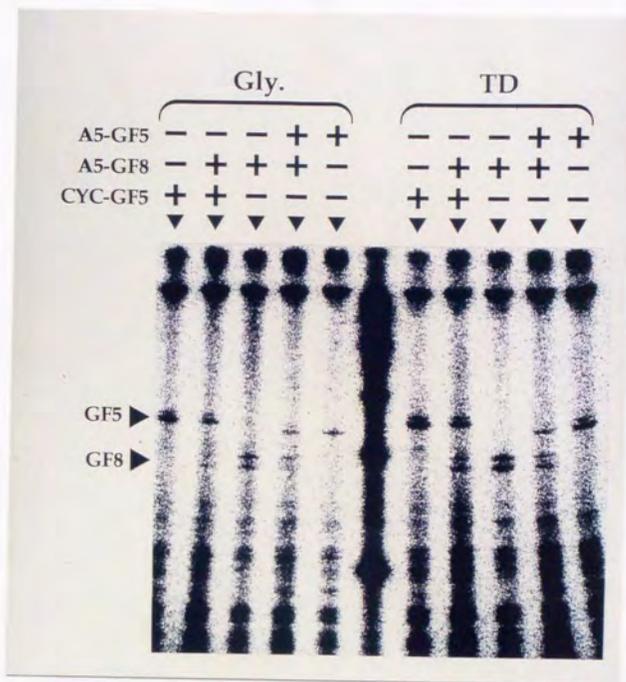


Fig. 4-2-5 プロモーターの選択性

鋳型プラスミドは、+では全て1 $\mu$ g添加した。

菌体抽出液は総蛋白質として1反応あたり30 $\mu$ gを用いた。写真の右側にそれぞれの鋳型の転写産物の位置を示した。中央のレーンは分子量マーカー。Glc, グルコース培養菌体抽出液; TD, テトラデカン誘導菌体抽出液

(A) 全体図 (B) Glcの5レーンの拡大図 (次頁) (c) T.Dの5レーンの拡大図 (次頁)

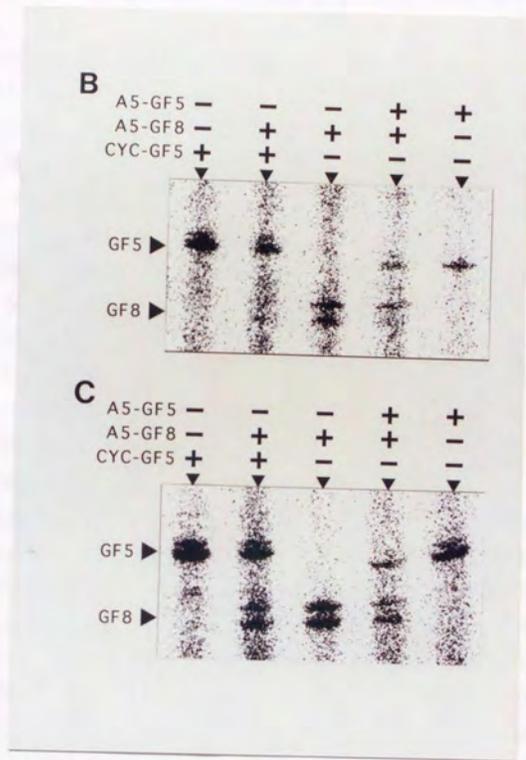


Fig. 4-2-5 プロモーターの選択性 (続き)

(B) Glc の 5 レーンの拡大図 (次頁) (c) T.D の 5 レーンの拡大図

#### 4-2-3 転写活性のある酵母核抽出液の調製とそれを用いた *in vitro* 転写

全細胞抽出液を用いた *in vitro* 転写で、誘導条件下での *ALK* プロモーターからの転写の上昇がわずかであった原因として、細胞質にはもともと活性をもつ形でアルカンによる転写誘導に関与する因子が存在し、アルカンによる刺激によってこの因子が核内へ移動することが *ALK5* の転写誘導に重要である可能性を考えた。つまり非誘導菌体では目的の転写因子は細胞質に存在するため *ALK5* プロモーターからの転写は起こらないが、細胞抽出液ではその様な転写因子の局在性は失われるため *in vivo* の場合と異なり転写が起こるようになったと考えられる。もしこの仮定が正しければ非誘導菌体の核抽出液を用いた *in vitro* 転写では *ALK5* プロモーターからの転写は *CYC1* コアプロモーターからの転写と比べて著しく弱いもしくは誘導培養を行った菌体の核抽出液では *ALK5* プロモーターからの転写が *CYC1* コアプロモーターからの転写と比べて著しく強いことが期待される。そこで *C. maltosa* の核を単離する事を試みた。

酵母核の単離方法についてはこれまでに幾つか報告例がある (田村隆明編、(1993)、Lohr D. (1988)、Lue N. F. *et al.* (1991)、Aris J. P. and Blobel G. (1991) 総説は Zinser E. *et al.* (1995) を参照) が、いずれの方法も、酵母細胞のスフェロプラスト化が最初の重要なステップであり、その後炭素源と窒素源を加えてインキュベートする事によりスフェロプラスト化の間に低下する転写活性を回復させるステップを必要とする。しかし、本研究で誘導剤として用いている *n*-アルカンは非常に疎水性であるため誘導培養には激しい振盪が必須であることから、*n*-アルカン培養菌体から既存の方法で十分な転写活性のある核を調製することは難しいと考えた。

(実際にこれら幾つかの方法を用いて試みたが、有意な転写活性は検出されなかった。また試みに *ALK* 遺伝子の転写を誘導した細胞をスフェロプラスト化し、その過程における *ALK* の転写をノーザンハイブリダイゼーションにより追跡したところ (Fig. 4-2-6) 全体的な転写活性はスフェロプラスト化の間に検出限界以下までに減少し、以後 *n*-テトラデカンを添加 (シャーレに薄く広げた細胞懸濁液にエマルジョン化したアルカンを加えてスフェロプラストの溶菌が最小限となるように振盪し、アルカンの油滴を拡散させた。) しても回復する事はできなかった。)

そこでスフェロプラスト化を行わずに核を単離する事を検討した (本章、材料と方法の項参照)。全細胞抽出液の調製の際にフレンチプレスをを用いたが、

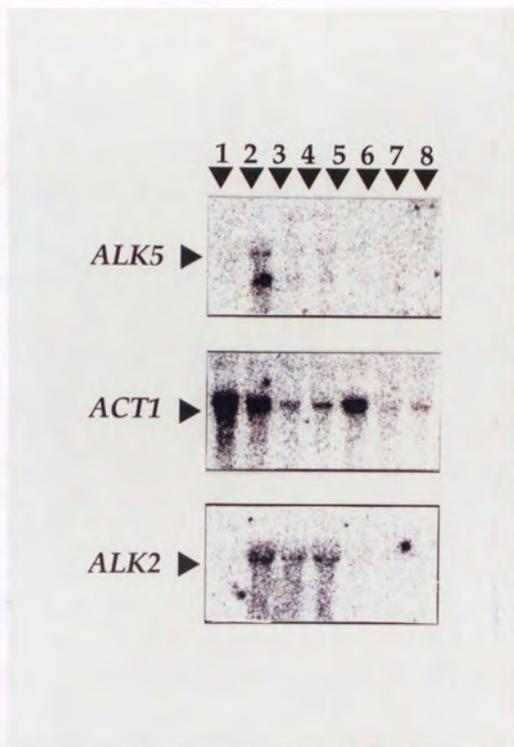
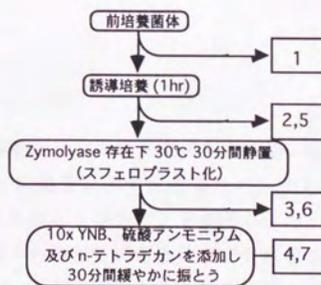


Fig. 4-2-6 スフェロプラスト化による転写の停止

左記の手順でスフェロプラスト化を行い、そこから回収した菌体の全RNAを抽出して *ALK5*、*ALK2*、及び *ACT1* のプローブ (第一章) を用いてノーザン解析を行った。左の図中、四角囲みの数字は上の写真のレーンの番号と対応している。



これによって得られる抽出液の粘度は用いる緩衝液のイオン強度によって異なり、核の破碎効率の差を反映していると考えられた（低イオン強度の緩衝液を用いると核が十分に破壊されず染色体 DNA が抽出液中に放出されないため、低粘度の抽出液が得られる）。また、界面活性剤 ノニデット P-40 は細胞膜を可溶化するが核膜には作用しない (Lohr D. (1988) など)。そこで浸透圧安定化剤 (1M ソルビトール) 存在下で細胞を破壊し、凍結融解 (Schlenstedt G. *et al.* (1993)) および ノニデット P-40 処理によって細胞膜を破壊し、さらに サイトカラシン B 処理によって細胞骨格を破壊 (Kalinich J. F. *et al.* (1989)) すれば核を細胞質成分から分離できると考えた。このようにして得られた酵母核は Ficoll 400 を用いた分別遠心法 (Lohr D. (1988)) により集めることが出来ると期待される。以上の考察に基づき、本章材料と方法の項に記した方法に従って核の単離を行い、DAPI を用いた蛍光顕微鏡観察により核の単離を確認した (データは示さない)。ここから調製した抽出液は全細胞抽出液より高い DNA / 蛋白質比を示し (すなわち  $A_{280} / A_{260}$  あるいは  $A_{230} / A_{260}$  値 (吸光度比) が低い)、有効に核が単離できていると考えられた。調製した核抽出液の SDS- 変性アクリルアミドによる電気泳動パターンを Fig. 4-2-7 に示す。

この方法で調製した核抽出液は転写活性を有していた (Fig. 4-2-8)。しかし、*n*-テトラデカン誘導菌体より調製した核抽出液において *ALK5* プロモーターからの転写産物量は、*CYC1* コアプロモーターからの転写産物量を標準としたとき、グリセロール培養菌体核抽出液のものより増加しておらず、*CYC1* コアプロモーターとの競合実験においても全細胞抽出液を用いた時との有意な差を認める事はできなかった。従って、現段階では冒頭に書いた仮説、つまり転写因子の核への移行がアルカンによる転写誘導における唯一重要なステップであるとは考えにくいと結論した。

#### 4-2-4 転写活性のある抽出液の分画

Fig. 4-2-9 (A) に全菌体抽出液のゲル移動度シフトアッセイを *in vitro* 転写で活性が認められた緩衝液条件で再検討した結果を示す。主要なバンドとして Fig. 2-2-4 で認められたものと同じと考えられるシフトバンドが得られた。これにより、この蛋白質-DNA 複合体は転写が行われている条件下でも形成されていると考えられる。Fig. 4-2-9 (B) に Fig. 4-2-9 (A) で得られた競合実験の結果から各バンドを定量して片対数グラフにプロットした結果を示した。この結果得

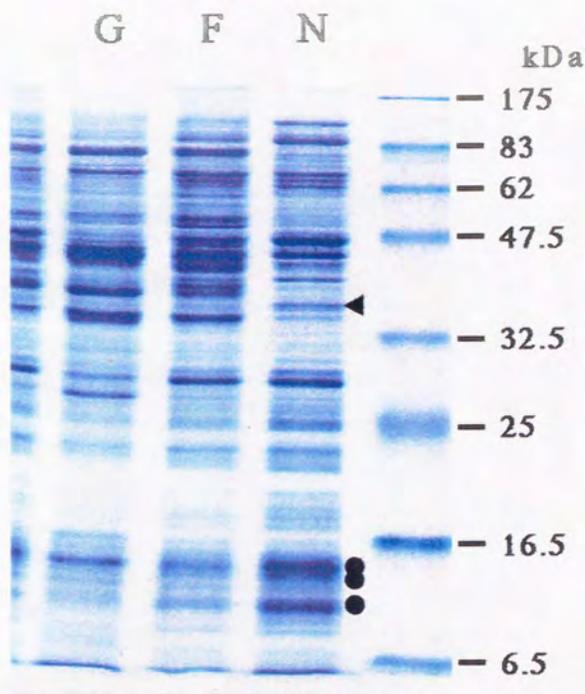


Fig. 4-2-7 スフェロプラスト化を行わずに調製した核抽出液の SDS-PAGE

抽出法については本文参照。

G, 凍結菌体をバッファー B に懸濁してグラスビーズ法により破碎して得た全細胞抽出液

F, フレンチプレスを用いて細胞を破碎した後にグラスビーズ法で抽出して得た全細胞抽出液

N, 核抽出液

◄ は酵母の核蛋白質である fibrillarín (分子量 38kDa) と推定されるバンドを、● はヒストンと推定されるバンドを示す。

(*S. cerevisiae* から調製された核抽出液の SDS-PAGE のパターン (Aris and Blobel (1991) との比較による。)

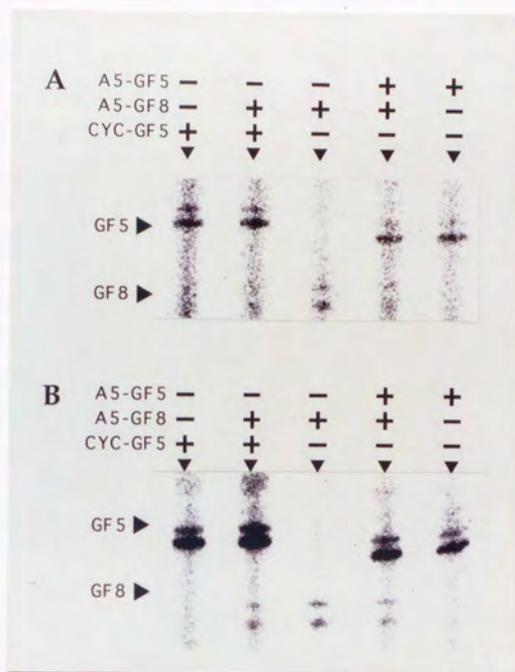


Fig. 4-2-8 核抽出液を用いた *in vitro* 転写

(A) グルコース培養

(B) テトラデカン培養

図の構成は Fig. 4-2-5. 参照

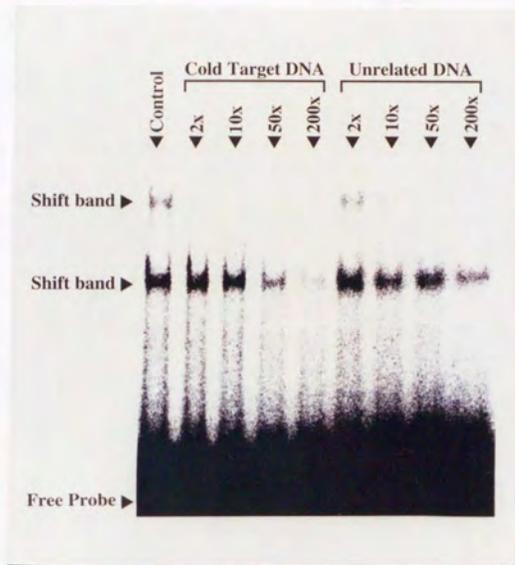


Fig. 4-2-9 (A) 転写反応条件におけるゲルシフトアッセイと、その競合阻害

Cold Target DNA として B42B 断片を、unrelated DNA として超音波処理したウシ胸腺 DNA を用いた。写真左側にシフトバンドの位置を示す。

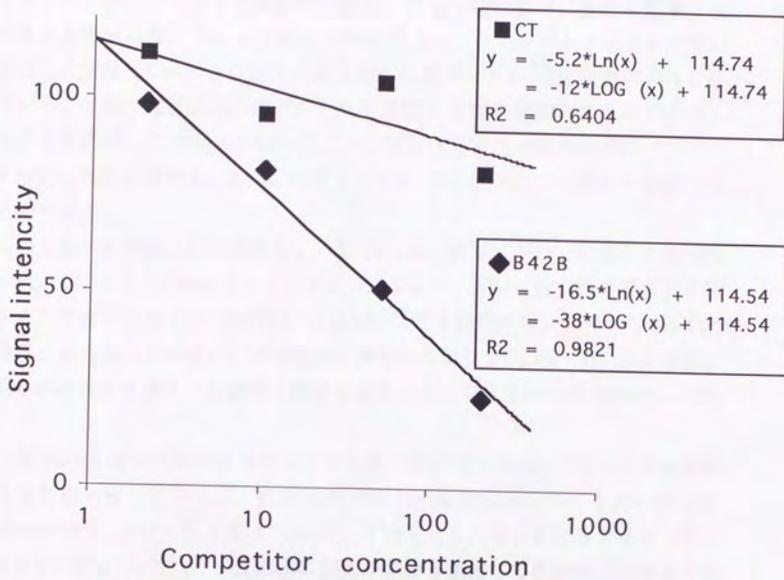


Fig. 4-2-9 (B) 転写反応条件におけるゲルシフトアッセイと、その競合阻害

A (前頁) の各バンドを定量し、バックグラウンド値を差し引いた後、片対数グラフにプロットした。回帰計算で得られた近似曲線、近似式、及び  $R^2$  値を併記した。

られた回帰式からこの抽出液中の ARR5 結合蛋白質は B42B に対してはウシ胸腺 DNA と比較して約 2000 倍の親和性を持つと計算される。

このシフトバンドを与える蛋白質を抽出して *in vitro* 転写に与える影響を検討することを試みた。Fig. 4-2-10 に DNA アフィニティーマトリックスを用いて分画した結果 (このときは溶出には 2.0M 酢酸カリウム 溶出緩衝液のみを用いている。以後の解析からこのゲルシフト活性は 1.0M 酢酸カリウムで溶出されることを確認した (Fig.4-2-13))。この分画によりもとの抽出液中のバンドシフト活性は完全に消失し、2.0M 酢酸カリウム 溶出画分にこの活性を濃縮することができた。

この分画の結果得られた画分を用いて *in vitro* 転写について検討した結果を Fig. 4-2-11 に示す。DNA アフィニティーによって、ARR5 結合性の蛋白質を枯渇させた画分では *in vitro* 転写活性は (CYC-GF5 を鋳型に用いた場合も A5-GF5 を鋳型とした場合と同様に) ほほ完全に消失しており (DEP1~3)、この画分に抽出された画分を加えても活性を回復させることはできなかった (DEP3 + BP)。

一方 ARR5 結合性蛋白質を枯渇させる前の画分 (Control) に分画した結合性蛋白質を加えることにより、転写効率の向上が認められることを見いだした (Control+BP)。この活性上昇は A5-GF5 を鋳型とした場合に顕著であると考えられたが (Fig. 4-2-11)、反応系に加える画分を濃縮して再検討した結果では CYC-GF5 を鋳型に用いた場合においても有意な転写効率の向上が認められた (Fig. 4-2-12)。

Fig. 4-2-13 に、ヘパリン - アガロース アフィニティーカラムを用いて分画した結果を示す。予想外の結果としてこれまで 1 種類のシフトバンドと考えていたものが 0.4M 酢酸カリウム溶出画分と 1.0M 酢酸カリウム溶出画分とに分離された。Fig. 4-2-14 ではそれぞれの画分について改めてゲル移動度シフトの競合実験を行った。その結果 0.4M 酢酸カリウム溶出画分のシフトバンドの結合特異性が 1.0M 酢酸カリウム溶出画分のそれと比べてきわめて高いことを確認した。これらの画分の *in vitro* 転写に与える影響に関しては現在のところ明らかではない。

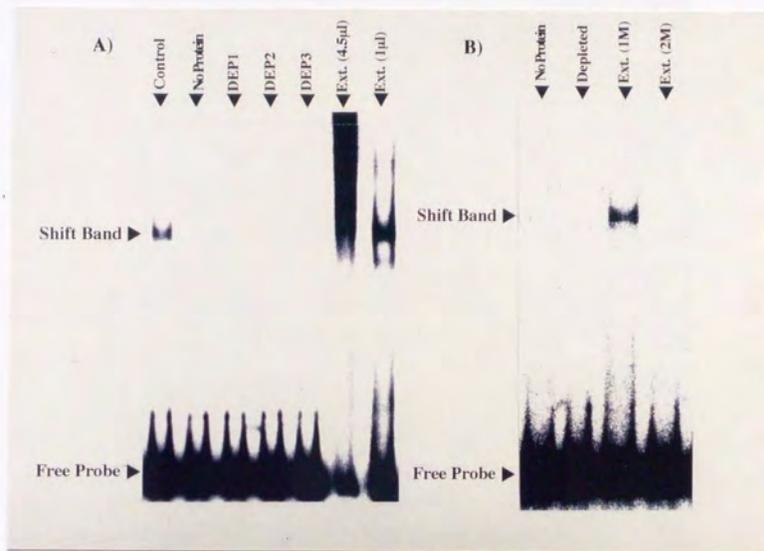


Fig.4-2-10 DNA アフィニティレジンを用いた DNA 結合蛋白の分画

Control は分画を行う前の抽出液によるゲルシフト。DEP1 ~ 3 はアフィニティ抽出操作を 1、2、3 回行った抽出液のゲルシフト。レジンに吸着した蛋白質は 2.0 M NaCl を含む溶出バッファーで抽出した後、脱塩してゲル移動度シフト法により解析した。

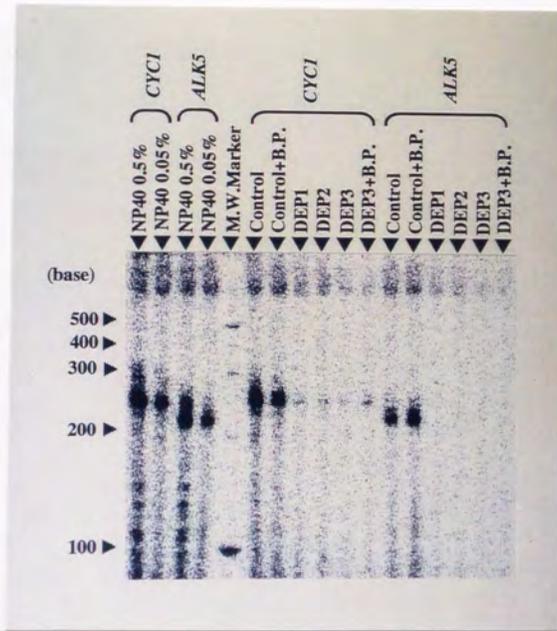


Fig. 4-2-11 アフィニティー抽出した画分による *in vitro* 転写反応の活性化 (1)

*n*-テトラデカン培養菌体の抽出液に DNA アフィニティーにより分画した画分を加える事で *in vitro* 転写活性の向上が見られた。一方 DNA アフィニティーで結合蛋白質を枯渇させた抽出液の *in vitro* 転写活性は著しく低下しており、これに分画した画分を添加しても転写活性の回復は見られなかった。lane 1 ~ 4 では NP-40 の添加効果について再検討した。

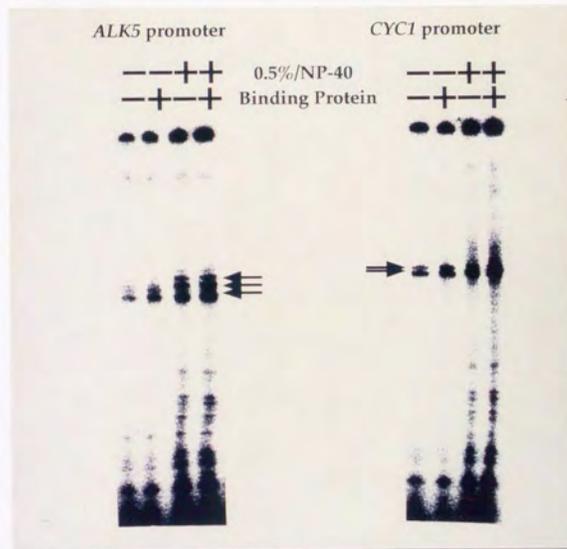


Fig. 4-2-12 アフィニティー抽出した画分による *in vitro* 転写反応の活性化 (2)

Fig. 4-2-11 で用いた抽出画分を限外濾過によって濃縮して反応系に添加したところ *CYC1* コアプロモーターからの転写も著しく促進された。

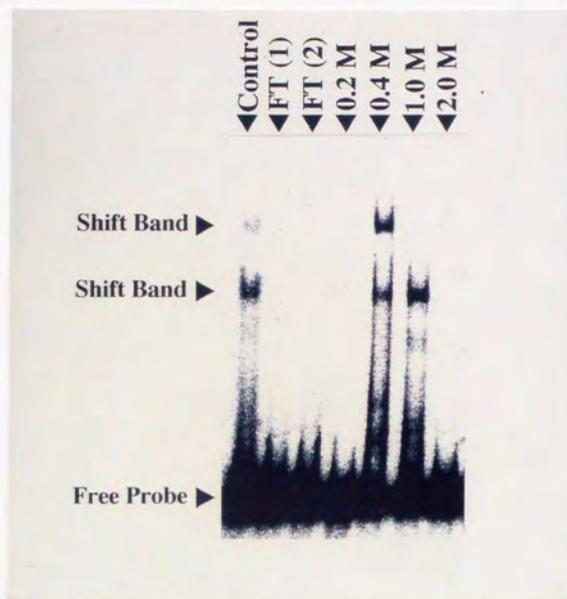


Fig. 4-2-13 ヘパリンアガロースアフィニティーカラムによる DNA 結合蛋白質の分画

"Control" レーンにロードした抽出液をヘパリンアガロース、アフィニティカラムで分画した。FT は素通り画分。その後カラムに吸着した蛋白質を順次高濃度の酢酸カリウムを含むバッファーで洗浄したところ 0.4M 及び 1.0M の画分で溶出を確認した。(この間に溶出の見られない画分が存在する事は別に確認している。)

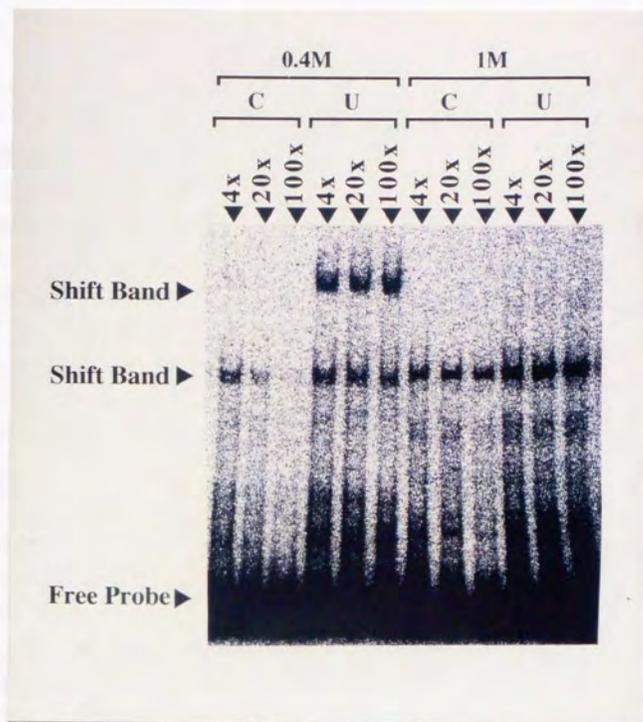


Fig. 4-2-14 ヘパリンカラムによって分離した画分のゲル移動度シフトアッセイ競合阻害実験

C、Cold Target DNA (B42B) ; U、unrelated DNA (ウシ胸腺 DNA)。  
 0.4M 溶出画分のそれと比較して、非常に強い配列特異性を示した。

### 4-3 考察

本章では *C. maltosa* の *in vitro* 転写系を用いて *n*-アルカンによる転写誘導について生化学的な解析を行うことを試みた。その過程において本菌の *in vitro* 転写条件について検討を行い、その特性を明らかにした。また *n*-アルカン培養条件下の菌体からの核の調製法の開発を行った。この方法は酵母核の調製法においてザイモリアーゼによる細胞壁の破壊を行わない最初の報告である。

#### 4-3-1 *Candida maltosa* における *in vitro* 転写

*in vitro* 転写における ALK5 プロモーターからの転写は以下のような特徴を持っていた。

- i) 細胞抽出液濃度、および鋳型 DNA 濃度への依存性が高く、異なる抽出液や鋳型を用いた複数の実験結果を定量的に比較するのは難しいと考えられる。(定性的なデータを取るべきである)
- ii) 標識ヌクレオチドとして CTP を用いた場合、鋳型に依存しない放射活性の取り込みが認められ、この取り込み活性 (tRNA シチジルトランスフェラーゼに由来すると考えられる) は培養条件によって異なった。故に標識ヌクレオチドとしては UTP を用いるべきである。
- iii) ブレインキューベーション時 (NTP mix 添加前) の亜鉛イオンおよびノニデット P-40 の存在が転写を促進する。亜鉛イオンに関しては前章で SDS で変性させた蛋白質の再生を試みた際に再生効率を上昇させることを見いだしており、おそらく DNA 結合能の発揮に亜鉛イオンが必要なのだと考えている ( $Zn_2$ -Cys<sub>2</sub>型の DNA 結合領域を持つ可能性を考えている。実際 GAL4、PIP2、PPR1、LEU2、PUT3 など多くの酵母の転写因子がこの型の DNA 結合領域を持つ (Marmostein R. and Harrison S. D. (1994), Marmostein R. *et al.* (1992), Rottensteiner H. *et al.* (1996))。ノニデット P-40 に関してはその作用は不明である。(一般に *in vitro* 転写においては界面活性剤の存在は潜在的に害であると考えられている (Lohr D. (1988))。反応溶液中での蛋白質の凝集を防止し、転写に必要な因子の回転を補助する効果があるのがあるのかも知

れない。

なお、反応の際の温度条件や反応時間に関しては *S. cerevisiae* での条件を使用しており詳しい検討は加えていないが、30 °C で反応を行った際にも転写産物が認められることを確認しており、今後検討すべき点と考える。また、*n*-アルカンがリガンドとなって転写因子に結合しているという仮定の下に、使用する緩衝液をアルカンで飽和させて細胞抽出液の調製の際のリガンドの拡散を防止することを試みたが効果は認められなかった。疎水性物質によって転写活性化された状態をそのまま再現するための条件についても今後さらに検討していく必要があると考えられる。

#### 4-3-2 *in vitro* 転写を用いた *n*-アルカンによる転写誘導の解析 (1)

##### ..... *in vitro* 転写におけるプロモーターの競合実験

本研究では *n*-アルカン誘導による転写誘導を *in vitro* 転写で評価するために二つの対照を用いている。一つは *C. maltosa* 内で *n*-アルカンによる転写誘導を受けない *S. cerevisiae* CYC1 コアプロモーターの転写活性を基準とした *ALK5* プロモーターの転写活性の評価であり、もう一つはグルコース (あるいはグリセロール) を炭素源として培養した菌体抽出液とテトラデカンによって誘導培養を行った菌体から調製した抽出液との転写活性の比較である。これは前節で述べたように細胞抽出液の転写活性はロットによりかなり異なっており、単純に同じ鑄型からの転写産物量を異なる抽出液を用いて比較することは危険であると考えられたからである。

しかしながら鑄型となるプラスミドをそれぞれ単独で用いた実験においては、抽出液の差による有意な転写活性の差を検出することはできなかった。この原因として考えられるのは *in vitro* と *in vivo* での転写条件の違いである。一般に *in vitro* 転写では転写産物を効果的に検出するために過剰量の鑄型を添加し、いわば "強制的に" 転写を行わせる。このため *in vivo* における転写活性の差を必ずしも正確に再現できるとは限らないと考えられる。本研究ではこの可能性を考慮して同じ濃度で添加した 2 種類の鑄型の競合実験を試みており、その結果有意と考えられるプロモーターの選択性の差を検出することに成功した (Fig.4-2-5)。この結果は、単独のプロモーターとしては反応液中に過剰に存在することによって転写されてしまうような場合 (この場合非誘導条件の菌体からの抽出液における *ALK5* プロモーター)でも、それより強く転写されるプロモーター

(この場合 *CYC1* コアプロモーター) が同等のレベルで反応液中に存在することで弱いプロモーターからの転写が抑制されたと解釈できる。このような競合実験において注意すべきなのは、検出された転写量比の差が鋳型とした G-フリーカセット配列の違いによるものではないということを証明する必要がある点である。本研究ではこの点を同じ *ALK5* プロモーターの下流に異なる G-フリーカセット (GF5 および GF8) を連結した場合には前記したような優先的転写が見られなかったことを挙げてこの問題をクリアする事を試みている。しかし本文中で触れたとおり GF5 より GF8 の方が鋳型としては転写されやすいため、GF8 のシグナルを検出するためには長時間の露光を必要とするといった問題点があった。やはり同じ配列の鋳型を用いて競合実験を行うのが理想であろう。その意味で GF5 が制限酵素で切り出し可能な構造になっている (Fig.4-2-1) ことは有利であると考えられる。今後は GF5 を 2 コピーまたは 3 コピー順向きに連結したものを異なるプロモーターの下流に連結して競合実験を行うことで、より明確な結果を得ることができであろう。

#### 4-3-3 *in vitro* 転写を用いた *n*-アルカンによる転写誘導の解析 (2)

・ ・ ・ ・ *ARR5* を用いた *ALK5* 特異的な転写因子の反応系からの除去の試み

本研究において *n*-アルカン誘導条件下の特異的転写を再現する方法としても一つ行ったのが、転写活性のある抽出液から *n*-アルカンによる転写に特異的な因子を取り除くことにより *n*-アルカン特異的な転写のみを減少させようという試みである。これには2つの異なる方法を取った。一つは転写反応系に *ARR5* を含む DNA 断片を過剰量添加することで *ALK5* プロモーターの転写を抑制する方法であり、もう一つは *ARR5* を含む DNA 断片を固定化したマトリックスによって *ARR5* 結合性の蛋白質を反応系から完全に除去する方法である。特に後者では、それによって *ALK5* プロモーターに特異的な転写活性の低下が認められた場合、その活性を回復するような画分を分離することで目的とする転写因子の精製の指標とできることが期待された。また、そのような *ARR5* 結合性因子を除去した抽出液で他の *ALK* プロモーターの転写活性を検討すれば、*ALK* 遺伝子群の転写誘導に関与する転写因子の異同についても議論することが可能である。

ところが予想に反し、これらの方法によって *ALK5* 特異的な転写量の変化は認められなかった。すなわち B42B 断片の反応系への添加によっては *CYC1* コ

アプロモーターおよび ALK5 プロモーターからの転写量にはどちらも有意な減少が認められず、逆に固定化した ARR5 を用いた場合には (抽出液のゲルシフトの活性の消失と呼応して) 両方の鋳型からの転写が著しく減少した (ALK5 プロモーターからの転写はほぼ完全に消失した)。

多コピーの ARR5 が共存する環境でも ALK5 プロモーターからの転写量はほとんど影響を受けない、という実験結果は同様のことを *in vivo* で検討した結果 (第3章参照) と一致する。しかし仮にこの結果から ARR5 結合性の因子が ALK5 の転写になんら影響を及ぼさないと結論すれば、固定化 ARR5 を用いてこの因子を除去したときの転写活性の低下を説明できない。また逆に固定化した ARR5 を用いて細胞抽出液を処理した際に CYC1 プロモーターからの転写も消失したこと、そこから溶出した画分を (多量に) *in vitro* 転写系に加えることで CYC1 プロモーターからの転写が増強されたことから、ARR5 結合性の因子はプロモーターの特異性には関係なく転写反応全般の活性化に関与する、という可能性がある。しかし、CYC1 コアプロモーター領域と ARR5 には有意な配列上の相同性が見られないこと、ARR5 結合性因子は配列特異的に DNA に結合していると考えられることなどからこの可能性は低いと考えられる。

この一見矛盾する 2 つの結果を説明する仮説としては、目的の転写因子が (少なくとも *n*-アルカン培養菌体の抽出液中では) TBP などの基本転写因子と既に会合していて、その結果 TATA ボックスの近傍にある ARR5 に対しては単独で存在する ARR5 に対するよりも高い親和性を持つ、という可能性が挙げられる (Fig. 4-3-1)。そのため、

- 1) 独立した ARR5 への因子の結合を阻害できる程度の競合 DNA の量では ARR5 を持つプロモーターへの因子の結合を阻害できない (*in vivo* および *in vitro* での転写を競合阻害するために必要な ARR5 の量はゲル移動度シフトアッセイで競合阻害できる量よりも多くなる)
- 2) ARR5 を持つプロモーターが高濃度で反応系に存在しない場合、その結合因子は単独の ARR5 にも効果的に結合しうる (ゲル移動度シフトアッセイで検出可能)。故に固定化した ARR5 によってこの因子を濃縮することが可能である (ARR 固定化した DNA アフィニティーマトリックスによる ARR5 結合因子の濃縮の可能性)。ただしこの場合に ARR5 と会合している基本転写因子も一緒に反応系から除かれてしまう可能性がある (DNA アフィニティーマトリックスで処理した抽出液では ALK5 プロ

モーターのみならず CYC1 コアプロモーターからの転写も減少してしまう)。

- 3) 固定化 ARR5 に吸着した、ARR5 結合因子と基本転写因子との複合体は溶出の際に高い塩濃度で処理することによって解離する (その結果 ARR5 結合因子との会合を介して二次的に固定化 ARR5 に吸着していた基本転写因子は ARR5 結合因子が溶出されるよりも低い塩濃度で溶出される)。従ってゲル移動度シフトアッセイの活性を指標に分離した溶出画分には (ARR5 結合因子のみが濃縮されているため) 基本転写因子を除かれた抽出液の転写活性を回復することができない。
- 4) 逆に充分な量の基本転写因子を元来持っている抽出液に溶出画分 (ARR5 結合因子が濃縮されている) を加えることでまず ARR5 依存的なプロモーターからの転写の促進が認められる。この際、3) で述べた基本転写因子の解離が不完全であれば溶出画分を大量に加えることで ARR5 に依存しないプロモーターからの転写量も上昇することが観察されるであろう。

以上の仮説を証明するためには、ARR5 の下流に TATA 配列を連結したものをゲル移動度シフトアッセイの競合 DNA として用いる、DNA アフィニティーによる分画の際に低い塩濃度で溶出してくる画分の転写刺激活性について検討する、といった実験が必要であろう。また、もしこの仮説が正しければ DNA アフィニティーによって分画精製を試みる際には非特異 DNA として poly (dA-dT) poly (dA-dT) を用いることが有効かも知れない。この仮説では ARR5 結合性の転写因子が *n*-アルカン培養菌体の抽出液中では TBP などの基本転写因子と会合している、という仮定をおいている。もしこの段階 (ARR5 結合因子と基本転写因子の結合) が *n*-アルカンからのシグナルによって制御されている (例えば *n*-アルカンがリガンドとして結合した ARR5 結合因子は基本転写因子に対する親和性が高い) とすればこの ARR5 結合因子の精製を行う際には非誘導条件下の菌体の抽出液を分離源とする方がよいという可能性も考えられる。

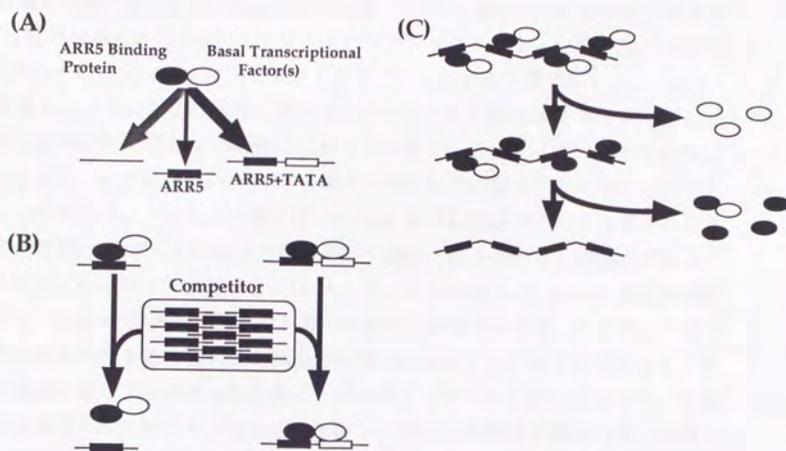


Fig. 4-3-1 DNA アフィニティーマトリックスを用いた分画結果より推定されるモデル

- 1) ARR5 結合因子は基本転写因子と会合しているため、単独で存在する ARR5 (b) よりも近傍に TATA Box を持つ ARR5 (c) に対してより強いアフィニティーで結合する (太い矢印で示した)。
- 2) 従って単独で存在する ARR5 (a) と結合タンパク質との会合を競合阻害できる量の非標識プローブ DNA を加えても TATA Box 近傍にある ARR5 (b) への会合を阻害できない場合がある。
- 3) DNA アフィニティーによって ARR5 結合性の因子の単離を試みた場合に、条件によってはこれらと会合している基本転写因子もレジンに吸着する。これらは溶出塩濃度を順次上げるに従って、まず二次的に吸着した基本転写因子が解離して溶出液中に回収され (a)、その後 ARR5 結合因子 (をより多く含む画分) が溶出される (b)。(b) の溶出画分によって ARR5 依存的な転写はより強く活性化されると期待される。

#### 4-3-4 転写活性を持つ細胞抽出液の分画

本章では転写活性をもつ抽出液の分画法として 3 種の方法を試みた。すなわち 1) 核の分離 2) DNA アフィニティーマトリックスによる分画 3) ヘパリン-アガロース アフィニティークロマトグラフィーによる分画である。

前述したように、核の分離に関してここで述べた方法はザイモリアーゼによる細胞壁の分解を行わない調製法の初めての例である。従って一時的な転写活性の上昇を *in vitro* 転写で解析する場合など、ほかの酵母でも有効に活用できる可能性がある。ただし、一般には *in vitro* 転写に阻害的であると考えられる界面活性剤(ノニデット P40)を分離の過程で用いているといった問題点がある。他の酵母での応用を考える場合には ノニデット P-40 による *in vitro* 転写の活性化が *C. maltosa* 特異的であるのか否かの検討が必要であろう。またフレンチプレスと凍結融解を組み合わせた細胞の破壊方法は必ずしも効率的ではなく、また分画遠心法による核の分離の際にもある程度のロスが予想されるため、大量の菌体を効率的に処理する必要がある場合 (例えば転写因子精製の第一段階として核の単離を行う場合) に、この方法が適当であるか否かは検討しなくてはいけない課題の一つである。

DNA アフィニティーマトリックスを用いた分画では検出される ARR5 結合蛋白質の大部分を 1M 酢酸カリウム溶出画分に回収することに成功した。しかしこの画分の SDS-PAGE による解析 (データは示していない) では依然多くのバンドが検出され、精製には至っていない。本章の実験では ARR5 結合蛋白質を除いた抽出液の *in vitro* 転写活性を測定することを目的の一つとしていたため、抽出の際に非特異 DNA を加えることを省いている。今後精製を目的とする場合にはまず抽出の際に加える非特異 DNA の量と質を検討することで精製効率が格段に上昇することが期待される。

最後に試みたヘパリンアガロースアフィニティークロマトグラフィーによる分画では予想外の結果として、それまで一つの画分として考えていた ARR5 結合性の蛋白質が溶出塩濃度の異なる 2 つの画分に分かれるという興味深い結果を得た。これらは 2 つの画分の間に蛋白質が溶出されない画分があること、およびこれら 2 つの画分に含まれる ARR5 結合蛋白質は結合の際の配列特異性が異なることから、別種のものである可能性が高い。あるいは一種の ARR5 結合蛋白質がリガンドとの結合状態、あるいは修飾状態の違いから 2 つの画分に分かれた可能性も考えられる。本章では *n*-アルカン誘導菌体の抽出液についての

分画を検討したが、ほかの培養条件でもこの2種の画分が検出されるか否かは早急に検討する必要があると考える。またこれらの画分の *in vitro* 転写に対する影響についても解析が待たれる。

## 終章

*n*-アルカン資化能を有する無孢子酵母 *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、その資化に関与するチトクローム P450 (P450 ALKs) を転写レベルで誘導された。また *n*-アルカン培養時に小胞体 (ER) 膜など細胞内膜系の顕著な発達が観察されるが、この現象は P450 ALKs の大量発現によっても認められた (Ohkuma M. *et al.* (1995c)。すなわち本菌における劇的な細胞内構造の変化においても *n*-アルカンを炭素源とすることによる P450 ALKs をはじめとした遺伝子の転写活性化が最初の重要なステップであると考えられる。本研究では *C. maltosa* における P450 ALKs の転写誘導機構を明らかにすることを目的とした。

まず第1章ではノーザン解析、レポーター遺伝子を用いた解析によって、主要な ALK 遺伝子の転写は非常に迅速に誘導されることを確認した。この転写誘導には新規の蛋白質合成を必要としないこと、4種の主要な P450 遺伝子の破壊によって *n*-アルカン資化能を失った株においてもレポーター遺伝子の発現が誘導されることなどから、*n*-アルカンが低分子リガンドとして転写因子に作用し、直接転写誘導に関与している可能性が考えられた。さらに ALK3、ALK5 では *n*-アルカンを炭素源とした培養の後期に2次的な誘導が起こることを見いだした。

また *n*-アルカンによる誘導とは別に、動物細胞においてある種のチトクローム P450 の誘導合成やペルオキシソームの増殖を引き起こすことが知られている疎水性薬剤であるクロフィブレードの存在下で *C. maltosa* を培養することによっても P450 のスペクトルが上昇することを見いだした。ノーザン解析の結果から、ALK2、ALK3 の2種の遺伝子の転写がクロフィブレード、Wy-14,643 などのペルオキシソーム増殖剤によって活性化される事を確認した。ガスクロマトグラフィーによる解析から、添加したクロフィブレードは培養中に代謝分解されないことが示唆されたため、この場合もやはりクロフィブレードが直接のシグナル物質となって転写誘導に関与していると考えられる。しかし ALK1 ではクロフィブレードによる誘導培養後期にのみ転写が見られ、また ALK5 はクロフィブレードによってはほとんど誘導されなかった事から *n*-アルカンによる転写誘導とは異なる機構が関与しているであろうことが示唆された。

第2章では ALK 遺伝子のプロモーター領域を解析し、アルカンやクロフィブレードによる転写誘導に必要な *cis* のエレメントの同定を行った。ALK5 プロモーター領域の欠失解析により *n*-アルカンによる直接の転写誘導に必要な領域

約 130bp (ARR5) を同定した。この領域を含む DNA 断片をプローブとしたゲル移動度シフトアッセイにより、この領域に配列特異的に結合する蛋白質の存在を示した。この蛋白質は非誘導条件下、あるいはグルコースによって ALK 遺伝子群の転写を抑制した菌体内にも認められた。同じ DNA 断片をプローブとして用いたUV-クロスリンク実験からはこれらの蛋白質が ARR5 の下流約 60bp に配列特異的に結合していることが示唆された。

一方 ALK2 プロモーター領域の欠失解析によりクロフィプレートによる転写誘導に必要な領域を約 250bp に縮小化した。この領域内には *n*-アルカンによる転写誘導活性も含まれていた。この領域内の特徴的な配列として、他の ALK 遺伝子のプロモーター領域にも共通に見られ、また *S. cerevisiae* において脂肪酸によるペルオキシソーム関連遺伝子の転写誘導のシスエレメントとして同定されている Pox-Box (または ORE (Oleate Responsive Element)) に類似したCCG を含むリピート配列が見いだされた。

第3章ではこれらの転写誘導に関与する転写因子のクローニングを試みた。しかし試みた3種の方法ではいずれも最終的なクローニングには成功しなかったが、その過程でこの転写因子の性質を示唆するいくつかの結果を得ることができた。

第4章では *C. maltosa* の *in vitro* 転写系を構築し、転写誘導に関与する因子を生化学的に解析することを試みた。まず *C. maltosa* の無細胞抽出液を用い、AKL5 プロモーターおよび *S. cerevisiae* 由来のCYC1 コアプロモーターからの転写を行わせる事に成功した。それぞれのプロモーターを単独で用いた系では誘導時・非誘導時の細胞抽出液で転写産物量に有意な差はなかったが、両方のプロモーターを同時に加えた系では、グリセロール培養の抽出液では CYC1 コアプロモーターからの転写しか確認できなかったのに対し、*n*-アルカン培養菌体からの抽出液では両方の転写産物を確認する事が出来た。このことから *n*-アルカン培養菌体の抽出液ではグリセロール培養の抽出液と比べて ALK5 プロモーターの選択性が上昇していることが考えられる。

この *in vitro* 転写系に競合 DNA として ALK5 の *cis* 配列を含む断片を加えても ALK5 プロモーターからの転写を抑制することは出来なかった。これは第3章で同様のことを試みた *in vivo* での結果と同じであった。しかし ALK5 プロモーターの *cis* 配列を固定化した DNA アフィニティーカラムで細胞抽出液を処理することによって、ゲルシフトのバンドの消失と同時に ALK5 プロモーターからの転写だけではなく、CYC1 コアプロモーターからの転写も完全に消失する事が確認された。このアフィニティーカラムから高塩濃度のバッファー

を用いて溶出した画分は ARR5 をプローブとしたゲル移動度シフトアッセイにおいて元の細胞抽出液と同じシフトバンドを与えた。またこの画分を *in vitro* 転写系に加えることによってプロモーターの種類に関わらず転写産物量を約2倍に上昇させることが出来た。この *cis* 配列に結合すると考えられる転写因子は細胞抽出液中ですでに基本転写因子と複合体を形成していたものと考えられる。*n*-アルカン培養菌体からの抽出液をヘパリンアガロースアフィニティークラムによって分画することも試みた。ゲル移動度シフトアッセイを指標として酢酸カリウムのステップグラジエントにより抽出液を分画したところ、0.3M および 0.7M の2つの溶出画分で活性が確認された。これらの画分はゲルシフトの競合実験から、先に同定した ARR5 に対するアフィニティーが異なる事が示され、ALK5 の転写誘導に関して異なる活性を持つことが期待された。

以上の解析により目的の転写因子について

- 1) アルカンによる誘導の有無に関わらず常に菌体内(核内)に存在する
- 2) アルカンによる刺激によって修飾を受け基本転写因子との親和性が増すことが転写誘導に必要と考えられる。
- 3) DNA 結合活性の発揮に亜鉛イオンを必要とする
- 4) *Saccharomyces cerevisiae* の PIP2 およびマウス PPAR $\alpha$  といった関連が予想された他の転写因子とは相同性が低い。
- 5) 複数の蛋白質の複合体であると考えられる。

といった性質が予測される。

以上のように ALK5、ALK2 の2つの遺伝子を中心に *C. maltosa* の有する、*n*-アルカン応答性、ペルオキシソーム増殖剤応答性の機構に関して解析し、この誘導に関与するプロモーター上の機能領域を明らかに出来た。また転写因子の単離には至らなかったが、その特殊性・新奇性を示すことが出来た。最後に、本研究で構築した *in vitro* 転写による解析系は不完全菌であるため遺伝学的手法が充分活用できない本菌において、その特徴的な転写誘導現象を生化学的に解析していく上で有用であると考えられる。

## 論文の内容の要旨

応用生命工学専攻  
平成6年度博士課程 入学  
氏名 大友 量  
指導教官 高木正道

### 論文題目

酵母 *Candida maltosa* における  
cytochrome P450 ALK 遺伝子群の転写誘導機構の解析

*n*-アルカン資化能を有する無孢子酵母 *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、その資化に関与するチトクローム P450 (P450 ALKs) を転写レベルで誘導する。この誘導はグルコースの共存により抑制される。また *n*-アルカン培養時に小胞体 (ER) 膜など細胞内膜系の顕著な発達が観察されるが、この現象は P450 ALKs の大量発現によっても認められた。すなわち本菌におけるこのような細胞内構造の劇的变化においても *n*-アルカンを炭素源とすることによる P450 ALKs をはじめとした遺伝子の転写活性化が最初の重要なステップであると考えられる。現在まで他の生物も含めて *n*-アルカン応答性の転写因子については報告例がない。本研究は *C. maltosa* における P450 ALKs の転写誘導機構を明らかにし、それを一つのモデルとして真核生物の疎水性物質に対する応答機構を考察することを目的とした。

#### 1 *n*-アルカンによる転写誘導とその *cis*-配列に関する解析

ノーザン解析、レポーター遺伝子を用いた解析によって、これまでに単離された 8 種の ALK 遺伝子のうち ALK1、ALK2、ALK5 の 3 種は *n*-アルカンを単一炭素源として含む培地に移した後、2 時間以内という比較的早い時期に転写レベルが最大に達することを確認した。この転写誘導には新規の蛋白質合成を必要としないこと、4 種の主要な P450 遺伝子の破壊によって *n*-アルカン資化能を失った株においてもレポーター遺伝子の発現が誘導されることなどから、*n*-アルカンが低分子リガンドとして転写因子に作用し、直接転写誘導に関わっている可能性が考えられた。さらに ALK3、ALK5 では

*n*-アルカンを炭素源とした培養の後期に2次的な誘導が起こることを見いだした。

次にALK5 プロモーター領域の欠失解析により *n*-アルカンによる直接の転写誘導に必要な領域約 130bp (ARR5と命名) を同定した。この領域を含む DNA 断片をプローブとしたゲル移動度シフトアッセイにより、この領域に配列特異的に結合する蛋白質の存在を見いだした。この蛋白質は非誘導条件下、あるいはグルコースによって ALK 遺伝子群の転写を抑制した菌体内にも認められた。同じ DNA 断片をプローブとして用いたUV-クロスリンク実験からはこれらの蛋白質が ARR5 の下流約 60bpに配列特異的に結合していることが示唆された。そこでサウスウエスタン法によりこの DNA 結合タンパク質をコードする遺伝子のクローニングを試みた。すなわち大腸菌の発現ベクターλ-ExCell を用いて構築した *C. maltosa* のゲノムライブラリーにおいて、β-ガラクトシダーゼとの融合タンパク質として発現していることが期待された目的とする転写因子の DNA 結合領域を、放射ラベルした ARR5 をプローブとしてスクリーニングすることを試みた。しかし条件を変えながら最終的に約200万クローンをスクリーニングしたにも関わらず、ポジティブなクローンを得ることは出来なかった。

*C. maltosa* は一般にはロイシンとして翻訳される CUG コドンをセリンとして翻訳するという特殊性を有する。このため大腸菌や *S. cerevisiae* 内で発現した *C. maltosa* の蛋白質が本来の活性を持たない可能性は十分に考えられる。またサウスウエスタン法では複数の蛋白質の相互作用によって初めて DNA 結合活性を獲得するような蛋白質は原理的に単離できない。UV-クロスリンク実験では主要な一本のバンド以外に幾つかの弱いシグナルが確認されている。これらの蛋白質の相互作用が目的の転写因子の DNA 結合活性に大きな影響を与えているのかも知れない。

## 2 ベルオキシソーム増殖剤による転写誘導

*n*-アルカンによる誘導とは別に、動物細胞においてある種のチトクローム P450 の誘導合成やベルオキシソームの増殖を引き起こすことが知られている疎水性薬剤であるクロフィブレードの存在下で *C. maltosa* を培養することによって P450 のスペクトルが上昇することを見いだした。ノーザン解析の結果から、ALK2、ALK3 の2種の遺伝子の転写がクロフィブレード、Wy-14,643 などのベルオキシソーム増殖剤によって活性化される事を確認した。ガスクロマトグラフィーによる解析から、添加したクロフィブレードは培養中に代謝分解されないことが示唆されたため、この場合もやはりクロフィブレードが直接のシグナル物質となって転写誘導に関与していると考えられる。しかし ALK1 ではクロフィブレードによる誘導培養後期にのみ転写が見られ、また ALK5 はクロフィブレードによってはほとんど誘導されなかった事から *n*-アルカンによる転写誘導とは異なる機構が関与しているで

あることが示唆された。

動物細胞ではペルオキシソーム増殖剤による転写の誘導には核内受容体の一つである PPAR (Peroxisome Proliferator Activated Receptor) が関与していることが明らかにされている。そこで同様の機構が酵母でも働いている可能性を考え、マウス PPAR  $\alpha$  遺伝子の DNA 結合領域およびリガンド結合領域をプローブとして *C. maltosa* 全 DNA に対するサザン解析を行ったが有意なシグナルは認められなかった。

ALK2 のクロフィブレートによる転写誘導は下等真核生物におけるペルオキシソーム増殖剤応答遺伝子の初めての例である。そこで ALK2 プロモーターの下流にレポーター遺伝子として大腸菌由来の *LacZ* 遺伝子を連結し、他の酵母に導入してクロフィブレートによる転写誘導を検討した。その結果、やはり *n*-アルカン質化能を有する酵母 *Yarrowia lipolytica* においてクロフィブレートによる  $\beta$ -ガラクトシダーゼ活性の上昇を確認した。下等真核生物におけるペルオキシソーム増殖剤応答機構には何らかの共通性があるのかも知れない。しかし *Saccharomyces cerevisiae* では培養条件による転写活性の変化は認められなかった。

次に ALK2 プロモーター領域の欠失解析によりクロフィブレートによる転写誘導に必要な領域を約 250bp に縮小化した。この領域内には *n*-アルカンによる転写誘導活性も含まれていた。この領域内の特徴的な配列として、他の ALK 遺伝子のプロモーター領域にも共通に見られ、また *S. cerevisiae* において脂肪酸によるペルオキシソーム関連遺伝子の転写誘導のシスエレメントとして同定されている ORE (Oleate Responsive Element) に類似した CCG を含むリピート配列が見いだされた。最近、この配列に結合してペルオキシソーム関連遺伝子の転写誘導を行う転写因子 Pip2 をコードする遺伝子がクローニングされたことから、*C. maltosa* においてこの類似体が *n*-アルカンやその誘導体、またはペルオキシソーム増殖剤による転写誘導に関与している可能性を考え、PCR によって増幅した *PIP2* 遺伝子ををプローブとして *C. maltosa* 全 DNA に対するサザン解析を行った。しかし検討した最も温和な条件下においても有意なシグナルは認められなかったことから、本菌における疎水性物質による転写誘導にはこれとは別種の転写因子が関与していると考えられた。

### 3 *C. maltosa* の *in vitro* 転写系を用いた解析

以上述べたような状況を背景として、*C. maltosa* の *in vitro* 転写系を構築し、転写誘導に関与する因子を生化学的に解析することを試みた。まず *C. maltosa* の無細胞抽出液を用い、AKL5 プロモーターおよび *S. cerevisiae* 由来の *CYC1* コアプロモーターからの転写を行わせる事に成功した。それぞれのプロモーターを単独で用いた系では誘導時・非誘導時の細胞抽出液で転写産物量に有意な差はなかったが、両方のプロモーターを同時

に加えた系では、グリセロール培養の抽出液では *CYC1* コアプロモーターからの転写しか確認できなかったのに対し、*n*-アルカン培養菌体からの抽出液では両方の転写産物を確認する事が出来た。このことから *n*-アルカン培養菌体の抽出液ではグリセロール培養の抽出液と比べて *ALK5* プロモーターの選択性が上昇していることが考えられる。単独のプロモーターを用いた系ではおそらく大量のプロモーター DNA を用いているためこの選択性の差が検出できなかったものと考えられる。

この *in vitro* 転写系に競合 DNA として *ALK5* の *cis* 配列を含む断片を加えても *ALK5* プロモーターからの転写を抑制することは出来なかった。これは *in vivo* での結果と同じであった。しかし *ALK5* プロモーターの *cis* 配列を固定化した DNA アフィニティーカラムで細胞抽出液を処理することによって、ゲルシフトのバンドの消失と呼応して *ALK5* プロモーターからの転写だけではなく、*CYC1* コアプロモーターからの転写も完全に消失する事が確認された。このアフィニティーカラムから高塩濃度のバッファーを用いて溶出した画分は *ARR5* をプローブとしたゲル移動度シフトアッセイにおいて元の細胞抽出液と同じシフトバンドを与えた。またこの画分を *in vitro* 転写系に加えることによってプロモーターの種類に関わらず転写産物量を約2倍に上昇させることが出来た。この *cis* 配列に結合すると考えられる転写因子は細胞抽出液中ですでに基本転写因子と複合体を形成していたものと考えられる。

*n*-アルカン培養菌体からの抽出液をヘパリンアガロースアフィニティーカラムによって分画することも試みた。ゲル移動度シフトアッセイを指標として酢酸カリウムのステップグラジェントにより抽出液を分画したところ、0.3M および 0.7M の2つの溶出画分で活性が確認された。これらの画分はゲルシフトの競合実験から、先に同定した *ARR5* に対するアフィニティーが異なる事が示され、*ALK5* の転写誘導に関して異なる活性を持つことが期待される。

#### 4 まとめ

以上のように *ALK5*、*ALK2* の2つの遺伝子を中心に *C. maltosa* の有する、*n*-アルカン応答性、ペルオキシソーム増殖剤応答性の機構に関して解析し、この誘導に関与するプロモーター上の機能領域を明らかに出来た。また転写因子の単離には至らなかったが、その特殊性・新奇性を示すことが出来た。最後に、本研究で構築した *in vitro* 転写による解析系は不完全菌であるため遺伝学的手法が充分活用できない本菌において、その特徴的な転写誘導現象を生化学的に解析していく上で有用であると考えられる。

## 参考文献

- Aris J. P. & Blobel G. (1991) Isolation of Yeast Nuclei. *Methods in Enzymology*, **194**: 735-749
- Atomi H., Umemura K., Higashijima T., Kanai T., Yotsumoto Y., Teranishi Y., Ueda M. & Tanaka A. (1995) The upstream region of the isocitrate lyase gene (UPR-ICL) of *Candida tropicalis* induces gene expression in both *Saccharomyces cerevisiae* and *Escherichia coli* by acetate via two distinct promoters. *Arch Microbiol*, **163**: 322-328
- Auwerx J. (1992) [Review] Regulation of gene expression by fatty acids and fibric acid derivatives: an integrative role for peroxisome proliferator activated receptors. *Horm Res.*, **36**: 267-77
- Coda-Zabetta F. & Boam D. S. (1996) Distinct effects of ATP on transcription complex formation and initiation. *Biochimica et Biophysica Acta*, **1306**: 194-202
- Denison M. S James P. & Whitlock J. (1995) [Review] Xenobiotic-inducible Transcription of Cytochrome P450 Genes. *The Journal of Biological Chemistry*, **270**: 18175-18178
- Eggink G., Engel H., Meijer W. G., Otten J., Kingma J. & Witholt B. (1988) Alkane Utilization in *Pseudomonas oleovorans*. (structure and function of the regulator locus alkR) *The Journal of Biological Chemistry*, **263**: 13400-13405
- Einerhand A. W. C., Leij I. V. D., Kos W. T., Distel B. & Tabak H. F. (1992) Transcriptional regulation of gene encoding proteins involved in biogenesis of peroxisomes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Cell Biochemistry and Function*, **10**: 185-191
- Einerhand A. W. C., Kos W. T., Distel B. & Tabak H. F. (1993) Characterization of a transcriptional control element involved in proliferation of peroxisomes in yeast in response to oleate. *Eur. J. Biochem.*, **214**: 323-331
- English N., Hughes V. & Wolf C. R. (1994) Common pathways of cytochrome P450 gene regulation by peroxisome proliferators and barbiturates in *Bacillus megaterium* ATCC14581. *Journal of Biological Chemistry*, **269**: 26836-41
- Filipits M., Simon M. M., Rapatz W., Hamilton B. & Ruis H. (1993) A *Saccharomyces cerevisiae* upstream activating sequence mediates induction of peroxisome proliferation by fatty acids. *Gene*, **132**: 49-55
- Fonne-Pfister R., Simon A., Salaun J-P. & Durst F. (1987) Xenobiotic Metabolism in Higher Plants. Involvement of Microsomal Cytochrome P-450 in Aminopyrine N-Demethylation. *Plant Science*, **55**: 9-20
- Farooqui A. A. (1980) Purification of enzymes by Heparin-Sepharose affinity chromatography. *Journal of Chromatography*, **184**: 335-345
- Forman B. M., Tontonoz P., Chen J., Brun R. P., Spiegelman B. M. & Evans R. M. (1995) 15-Deoxy-D12,14-Prostaglandin J2 Is a Ligand for Adipocyte Determination Factor PPAR $\gamma$ . *Cell*, **83**: 803-812
- Gearing K. L., Göttlicher M., Widmark E., Banner C. D., Tollet P., Strömstedt, M. Rafter J. J., Berge R. K., Gustafsson J. A. (1994) [Review] Fatty acid activation of the peroxisome proliferator activated receptor, a member of the nuclear receptor gene superfamily. *J Nutr.*, **124**: 1284-1288

- Greenspan M. D. & Germershausen J. I. (1973) Effect of halofenate and clofibrate on growth and lipid synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.*, **113**: 847-55
- Guarente L. & Ptashne M. (1981) Fusion of *Escherichia coli lacZ* to the cytochrome c gene of *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **78**: 2199-2203
- He J-S. & Fulco A. J. (1991) A Barbiturate-regulated Protein Binding to a Common Sequence in the Cytochrome P450 Genes of Rodents and Bacteria. *The Journal of Biological Chemistry*, **266**: 7864-7869
- Henry K., O'Brien M. L., Clevenger W., Jow L. & Noonan D. J. (1995) Peroxisome proliferator-activated receptor response specificities as defined in yeast and mammalian cell transcription assays. *Toxicol Appl Pharmacol*, **132**: 317-24
- Issemann I. & Green S. (1990) Actuation of a member of steroid hormone receptor superfamily by peroxisome proliferators. *Nature*, **347**: 645-650
- Kalinich J. F. & Douglas M. G. (1989) *in vitro* Translocation through the Yeast Nuclear Envelope. *Journal of Biological Chemistry*, **264**: 17979-17989
- Kawai S., Hikiji T., Takagi M. & Yano K. (1991) Isolation and Sequencing of a Gene, C-ADE1, and Its Use for a Host-Vector System in *Candida maltosa* with Two Genetic Markers. *Agricultural and Biological Chemistry*, **55**: 59-65
- Lane D., Prentki P. & Chandler M. (1992) [Review] Use of Gel Retardation To Analyze Protein-Nucleic Acid Interaction. *Microbiological Reviews*, **56**: 509-528
- Lehmann J. M., Moore L. B., Willson T. M. & Kliever S. A. (1995) An Antidiabetic Thiazolidinedione Is a High Affinity Ligand for Peroxisome Proliferator-activated Receptor  $\gamma$  (PPAR $\gamma$ ). *The Journal of Biological Chemistry*, **270**: 12953-12956
- Lohr D. (1988) Isolation of Yeast Nuclei and Chromatin for Studies of Transcription - Related Processes. *Yeast - a practical approach*, 125-146
- Lue N. F., Flanagan P. M., Raymond J. K. III, Edwards A. M. & Kornberg R. D. (1991) RNA Polymerase II Transcription *in vitro*. *Methods in Enzymology*: **194**: 545-550.
- Marcus S. L., Miyata K. S., Rachubinski R. A. & Capone J. P. (1995) Transactivation by PPAR/RXR heterodimers in yeast is potentiated by exogenous fatty acid via a pathway requiring intact peroxisomes. *Gene Expr*, **4**: 227-39
- Marmostein R., Carey M., Ptashne M. & Harrison S. C. (1992) DNA recognition by GAL4 structure of a protein-DNA complex *Nature*, **356**: 408-414
- Marmostein R. & Harrison S. C. (1994) Crystal structure of a PPR1-DNA complex: DNA recognition by proteins containing a Zn<sub>2</sub>Cys<sub>6</sub> binuclear cluster *Genes and Development*, **8**: 2504-2512
- Motojima K. (1993) [Review] Peroxisome Proliferator-Activated Receptor (PPAR): Structure, Mechanisms of Activation and Diverse Functions. *Cell structure and Function*, **18**: 267-277
- Ohkuma M., Hikiji T., Tanimoto T., Schunck W-H., Müller H-G., Yano K. & Takagi M. (1991a) Evidence That More Than One Gene Encodes *n*-Alkane-inducible Cytochrome P-450s in *Candida maltosa*, Found by Two-Step Gene Disruption. *Agric. Biol Chem.*, **55**: 1757-1764

- Ohkuma M., Tanimoto T., Yano K. & Takagi M. (1991b) CYP52 (cytochrome P450alk) multigene family in *Candida maltosa*: molecular cloning and nucleotide sequence of the two tandemly arranged genes. *DNA Cell Biol*, **10**: 271-282
- Ohkuma M., Muraoka S., Hwang C. W., Ohta A. & Takagi M. (1993) Cloning of the C-URA3 gene and construction of a triple auxotroph (*his5, ade1, ura3*) as a useful host for the genetic engineering of *Candida maltosa*. *Curr Genet*, **23**: 205-210
- Ohkuma M., Masuda Y., Park S. M., Ohtomo R., Ohta A. & Takagi M. (1995a) Evidence that the expression of the gene for NADPH-cytochrome P-450 reductase is *n*-alkane-inducible in *Candida maltosa*. *Biosci Biotechnol Biochem*, **59**: 1328-30
- Ohkuma M., Muraoka S., Tanimoto T., Fujii M., Ohta A. & Takagi M. (1995b) CYP52 (cytochrome P450alk) multigene family in *Candida maltosa*; identification and characterization of eight members. *DNA and Cell Biology*, **14**: 163-73
- Ohkuma M., Park S. M., Zimmer T., Menzel R., Vogel F., Scunk W.-H., Ohta A. & Takagi M. (1995c) Proliferation of intercellular membrane structures upon homologous overexpression of cytochrome P-450 in *Candida maltosa*. *Biochimica et Biophysica Acta* **1236**: 163-169
- Patturajan M., Chatterji D & Rao GR (1994) Accurate transcription initiation by RNA polymerase II from *Candida utilis*. *Biochemistry & Molecular Biology International*, **33**: 901-907
- Philippens P., Strotz A. & Scherf C. (1991) DNA of *Saccharomyces cerevisiae*. *Methods in Enzymology* **194**: 169-182
- Radwan S. S. & Sorkhoh N. A. (1993) [Review] Lipids of *n*-Alkane Utilizing Microorganisms and Their Application Potential. *Advances in Applied Microbiology*, **39**: 29-90
- Reichhart D., Salaün J-P., Benveniste I. & Durst F. (1980) Time Course of Induction of Cytochrom P-450, NADPH-Cytochrom c Reductase, and Cinnamic Acid Hydroxylase by Phenobarbital, Ethanol, Herbicides, and Manganase in Higer Plany Microsomes. *Plant Physiology*, **66**: 600-604
- Rottensteiner H., Kal A. J., Filipits M., Binder M., Hamilton B., Tabak H. F. & Ruis H. (1996) Pip2p: a transcriptional regulator of peroxisome proliferation in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *The EMBO Journal*, **15**: 2924-2934
- Ruan Y. & Straney D. C. (1994) PCR-based construction of promoter/G-free templates for *in vitro*. *Gene*, **146**: 227-32.
- Salaün J-P., Simon A. & Drust F. (1986) Specific Induction of Lauric Acid  $\omega$ -Hydroxylase by Clofibrate, diethylhexyl-phthalate and 2,4-Dichlorophenoxyacetic Acid in Higher Plants. *LIPIDS*, **21**: 776-779
- Schiestl R. H. & Reddy J. K. (1990) Effect of peroxisome proliferators on intrachromosomal and interchromosomal recombination in yeast. *Carcinogenesis*, **11**: 173-176
- Schlenstedt G., Hurt E., Doye V. & Silver P. A. (1993) Reconstitution of Nuclear Protein Transport with Semi-Intact Yeast Cells. *Journal of Cell Biology*, **123**: 785-798
- Schmitt M. E., Brown T. A. & Trumpower B. L. (1990) A rapid and simple method for preration of RNA from *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Research*, **18**: 3091-3092
- Shaw G-C. & Fulco A. J. (1992) Barbiturate-mediated Regulation of Expression of the

Cytochrome P450BM-3 Gene of *Bacillus megaterium* by Bm3R1 Protein. *The Journal of Biological Chemistry*, 267: 5515-5526

Shaw G-C. & Fulco A. J. (1993) Inhibition by Barbiturates of the Binding of Bm3R1 Repressor to Its Operator Site on the Barbiturate-inducible Cytochrome P450BM-3 Gene of *Bacillus megaterium*. *The Journal of Biological Chemistry*, 268: 2997-3004

Sudbery P. E. (1994) [Review] The Non-*Saccharomyces* Yeasts. *Yeast*, 10: 1707-1726

Sugiyama H, Ohkuma M, Masuda Y, Park SM, Ohta A & Takagi M (1995) *In vivo* evidence for non-universal usage of the codon CUG in *Candida maltosa*. *Yeast*, 11: 43-52

Swadogo M. & Roeder R. G. (1985) Factors involved in specific transcription by human RNA polymerase II: analysis by a rapid and quantitative *in vitro* assay. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 82: 4394-4398

Umemura K., Atomi H., Kanai T., Teranishi Y., Ueda M. & Tanaka A. (1995) A novel promoter, derived from the isocitrate lyase gene of *Candida tropicalis*, inducible with acetate in *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 43:489-492

Virolle M-J. & Gangnat J. (1994) Sequence involved in growth-phase-dependent expression and glucose repression of *Streptomyces* a-amylase gene. *Microbiology*, 140: 1059-1067

Wintersberger U., Smith P. & Lehtnansky K. (1973) *European Journal of Biochemistry*, 33: 123.

Woonter M. & Jaehning J. A. (1990) Accurate Initiation by RNA Polymerase II in a Whole Cell Extract from *Saccharomyces cerevisiae*. *The Journal of Biological Chemistry*, 265: 8979-8982

Woonter M., Wade P. A., Bonner J. & Jaehning J. A. (1991) Transcriptional Activation in an Improved Whole-Cell Extract from *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and Cellular Biology*, 11: 4555-4560

Zimmer T., Ohkuma M., Ohta A., Takagi M. & Schunk W-H. (1996) The CYP52 Multigene Family of *Candida maltosa* Encodes Functionally Diverse *n*-Alkane-Inducible Cytochrome P450. *Biochemical and Biophysical Research Communication*, 224: 784-789

Zinser E. & Daum G. (1995) [Review] Isolation and Biochemical Characterization of Organelles from the Yeast, *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, 11: 493-536

村岡真一郎, 大熊盛也, 高木正道 (1994) 酵母を用いた疎水性物質による転写制御研究の現状. *蛋白質 核酸 酵素*, 39: 521.

梅園和彦 (1995) 核内レセプターを介するホルモン/ビタミンシグナルの伝達機構. *蛋白質 核酸 酵素*, 41: 1265.

## 成書など

Ausubel F. M., Brent R., Kingston R. E., Moore D. D., Seidman J. G., Smith J. A. & Struhl K. (1994) "CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY".

Kneale G. G. (1994) "DNA-Protein Interactions" Principles and Protocols. *Methods in Molecular Biology*, 30

Ohmura T., Ishiyama Y. & Fujii-kuriyama Y. (1993) "Cytochrom P-450" Second Edition. In: (Eds.), Kodansya, Tokyo,

Sambrook J., Fritsch E. F. & Maniatis T. (1989) "Molecular Cloning". Cold Spring Harbor Laboratory Press

Singh H. (1993) Specific recognition Site Probes for Isolating Genes Encoding DNA-Binding Proteins. *Methods in Enzymology*, **218**

Wolf K. (1995) "Nonconventional Yeasts in Biotechnology".

Hames D. & Higgins S. J. (堀越正美訳)(1996) "遺伝子発現と転写因子" (Gene Transcription - A Practical Approach), *メディカル・サイエンス・インターナショナル*

堀尾武一, 山下仁平 (1981) "蛋白質・酵素の基礎実験法", 南江堂

村松正實, 岡山博人, 山本雅 (1996) "新 遺伝子工学ハンドブック", 実験医学別冊,

大熊盛也 博士論文.

太田美智男 (1996) "新 遺伝子操作の基礎技術"

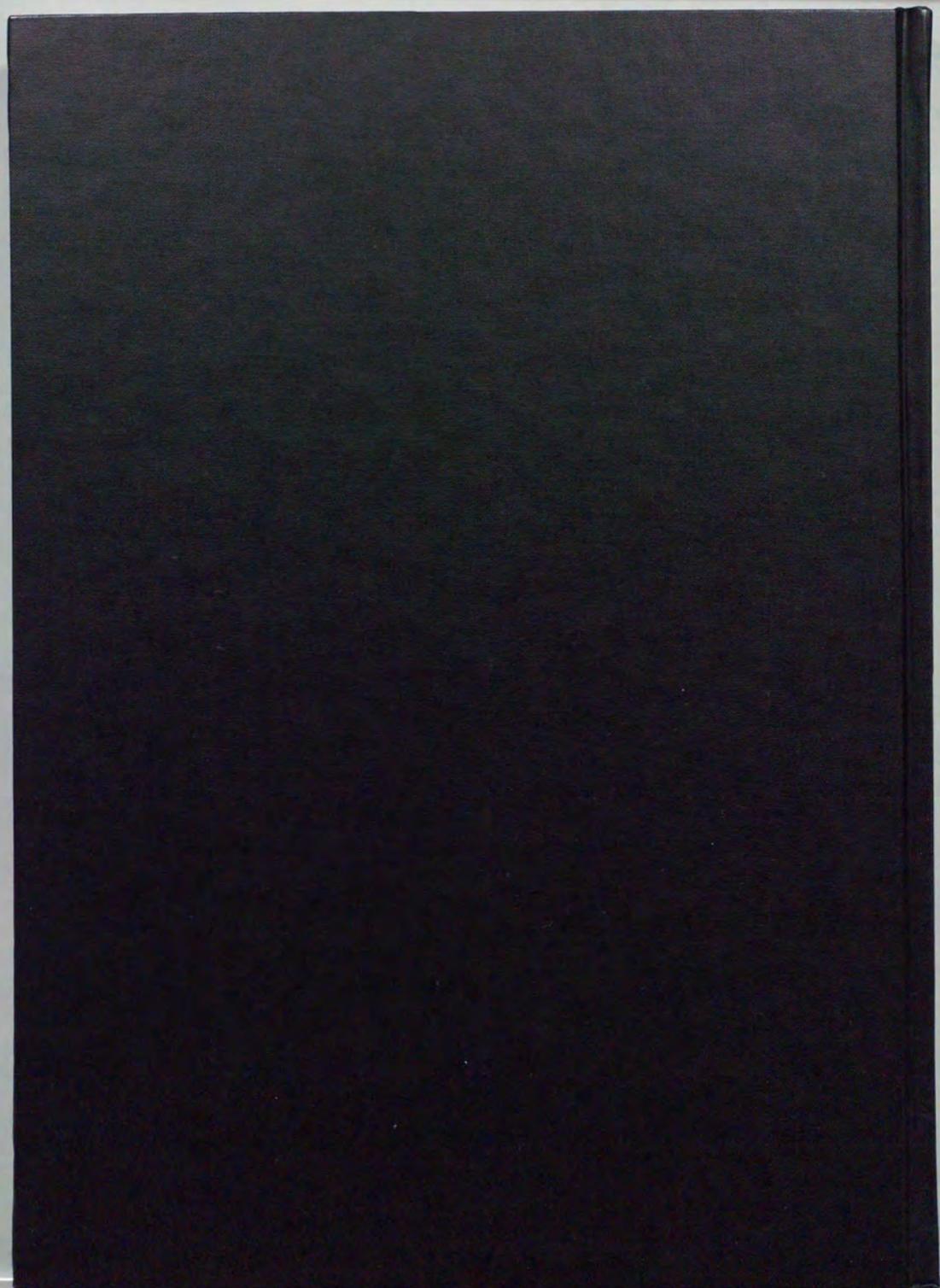
田村隆明編 (1993) "転写因子研究法". *バイオマニュアルシリーズ*

## 謝辞

本研究を行う場を提供して下さり、折に触れご指導、ご教示下さいました高木正道教授に心より感謝申し上げます。また、多くの貴重なご指導、ご助言を頂きました太田明德助教授、堀内裕之先生、永田裕二先生に感謝申し上げます。

本研究の先行研究者であり、多くのご助言を頂きました大熊盛也博士、村岡真一郎氏に感謝申し上げます。核内レセプターファミリーについてご教示いただき、マウスPPAR $\alpha$  cDNA を供与していただきました加藤茂明博士に感謝申し上げます。

本研究は東京大学農学部細胞遺伝学研究室で行われたものであり、研究室の皆様にご支援、ご協力を頂きました。折に触れ叱咤激励してくれた武藤英俊氏、*Yarrowia lipolytica* の取り扱いについてご助言いただいた飯田敏也氏、本研究の共同研究者として論文作成に多大なご協力を頂きました矢野淳子女史を始めとした本研究室の皆様にご心より感謝申し上げます。ありがとうございました。



inches  
1 2 3 4 5 6 7 8  
cm  
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19

### Kodak Color Control Patches

© Kodak, 2007 TM: Kodak

Blue	Cyan	Green	Yellow	Red	Magenta	White	3/Color	Black

### Kodak Gray Scale



© Kodak, 2007 TM: Kodak

A 1 2 3 4 5 6 M 8 9 10 11 12 13 14 15 B 17 18 19

