

Title	Saccharomyces cerevisiae のアルカリ性ホスファターゼ遺伝子に関する分子遺伝学的研究
Author(s)	金子, 嘉信
Citation	
Issue Date	
Text Version	ETD
URL	http://hdl.handle.net/11094/1077
DOI	
rights	
Note	

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

氏名・(本籍)	かね	こ	よし	のぶ
	金	子	嘉	信
学位の種類	工	学	博	士
学位記番号	第	9 2 9 2	号	
学位授与の日付	平成	2 年	8 月	3 日
学位授与の要件	学位規則第 5 条第 2 項該当			
学位論文題目	Saccharomyces cerevisiae のアルカリ性ホスファターゼ遺伝子に関する分子遺伝学的研究			
論文審査委員	(主査) 教授 大嶋 泰治			
	教授 今中 忠行	教授 高野 光男	教授 二井 将光	
	教授 山田 靖宙	教授 菅 健一	教授 吉田 敏臣	

論文内容の要旨

本論文は、遺伝子工学育種微生物による異種タンパク質生産において、効率のよい遺伝子発現技術を開発することを目標とし、*Saccharomyces cerevisiae* におけるアルカリ性ホスファターゼの生産制御機構の分子遺伝学的解析を行った成果をまとめたものであり、7章から成っている。

第1章では、本論文の研究の背景について要約し、適切な遺伝子発現調節機構の知見が、遺伝子工学育種微生物によるタンパク質の工業的生産において重要であることを述べている。

第2章では、温度感受性 *pho8* 突然変異体を分離し、その変異が抑制性アルカリ性ホスファターゼ (rALPase) の熱安定性の低下をもたらすこと、さらに酵素生産性が野生型遺伝子の供与量に比例することにより、*PHO8* 遺伝子が rALPase の構造遺伝子であることを明らかにしている。また、*pho8* 遺伝子座を第IV染色体右腕に決定している。

第3章では、新しい rALPase 生産欠損 *pho9* 突然変異体を分離し、*pho9* ホモ接合型二倍体細胞における孢子形成が、前減数分裂 DNA 合成あるいはそれ以前の段階で停止することを示している。さらに遺伝解析により、*PHO9* が液胞内加水分解酵素の前駆体を活性型に変換するプロテイナーゼ A の構造遺伝子 *PEP4* と同じであることを明らかにしている。

第4章では、酵母遺伝子ライブラリーを作成し、相補能により *PHO8* 遺伝子のクローニングを行っている。得られた *PHO8* DNA をプローブとしたノザンプロット解析を行うことにより、*PHO4* 産物と *PHO80* 産物が *PHO8* の転写を調節すること、また *PHO9* 産物は転写以後の発現過程で必要であることを示している。

第5章では、*PHO8* 遺伝子の DNA 塩基配列と転写開始位置を決定している。さらに塩基配列より推定

されるアミノ酸配列を用いて、大腸菌とヒトのアルカリ性ホスファターゼとの相同性を調べ、活性部位を推定している。

第6章では、特異的 *p*-ニトロフェニルホスファターゼの構造遺伝子 *PHO* /3 のクローニングを行い、DNA塩基配列を決定している。そのクローン化DNAを用いて *PHO* /3 遺伝子を破壊し、孢子形成能と細胞増殖には影響がみられないことを述べている。また、染色体分断法により、*PHO* /3 遺伝子座を第IV染色体左腕 *HO* 遺伝子座のテロメア側近接位置に決定している。

第7章では、以上の成果を総括し、*r*ALOase の生産調節機構について考察し、*PHO* 8 発現調節系の遺伝子工学的応用について述べている。

論文審査の結果の要旨

Saccharomyces cerevisiae のアルカリ性ホスファターゼには、無機リン酸によってその生産が抑制を受ける抑制性アルカリ性ホスファターゼと、構成的に生産される *p*-ニトロフェニルホスファターゼの2種が知られている。本論文は、これらのアルカリ性ホスファターゼ生産遺伝子について遺伝学的、分子生物学的解析を行った成果をまとめたものであり、次のような重要な結果を得ている。

- 1) 温度感受性 *PHO* 8 突然変異体を分離し、その変異が酵素タンパク質の熱安定性の低下をもたらし、酵素生産性が野生型遺伝子の供与量に比例することより、*PHO* 8 遺伝子がアルカリ性ホスファターゼの構造遺伝子であることを示し、その遺伝子座を第IV染色体右腕に決定している。
- 2) 新しい抑制性アルカリ性ホスファターゼ生産欠損突然変異 *PHO* 9 を分離し、その遺伝生化学的解析により、*PHO* 9 遺伝子が液胞内加水分解酵素の前駆体を活性型に変換するプロティナーゼAの構造遺伝子 *PEP* 4 と同一であることを明らかにしている。
- 3) *PHO* 8 遺伝子のクローニングを行い、そのDNA塩基配列を決定し、塩基配列より推定されるアミノ酸配列について、大腸菌とヒトのアルカリ性ホスファターゼとの相同性から、その活性部位を推定している。
- 4) クローン化 *PHO* 8 DNA をプローブとしたノーザン解析を行い、*PHO* 8 遺伝子の転写が抑制性酸性ホスファターゼと共通の調節を受けていることを明らかにし、さらにその転写開始位置を決定している。
- 5) *p*-ニトロフェニルホスファターゼの構造遺伝子 *PHO* /3 のクローニングを行い、その塩基配列を決定している。また、染色体分断法を応用してその遺伝子座を第IV染色体左腕 *HO* 遺伝子座のテロメア側近接位置に決定している。

以上のように、本論文は、*Saccharomyces cerevisiae* のアルカリ性ホスファターゼ遺伝子の構造と発現に関して重要な知見を与えており、遺伝子工学の発展に寄与するところが大きい。よって本論文は博士論文として価値あるものと認める。