



Title	酵母のプロモーター検索ベクターの構築と遺伝子発現制御機構解析への応用
Author(s)	黄, 龍逸
Citation	大阪大学, 1989, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/36451
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

氏名・（本籍）	黄 ^{ふあん}	龍 ^{よん}	逸 ^{いる}
学位の種類	工	学	博 士
学位記番号	第	8 6 4 7	号
学位授与の日付	平成元年3月24日		
学位授与の要件	工学研究科醗酵工学専攻 学位規則第5条第1項該当		
学位論文題目	酵母のプロモーター検索ベクターの構築と遺伝子発現制御 機構解析への応用		
論文審査委員	(主査) 教授 大嶋 泰治		
	教授 山田 靖宙	教授 高野 光男	教授 岡田 弘輔
	教授 菅 健一	教授 吉田 敏臣	教授 二井 将光

論文内容の要旨

本論文は、酵母の遺伝子工育種株による物質生産の生産性向上を目的に、遺伝子のプロモーター領域検索ベクターの構築とその応用による遺伝子発現制御機構の解明を行なった成果をまとめたもので、以下の5章から構成されている。

第1章は緒論であり、本研究の背景と目的および概要についてまとめている。

第2章では、酵母の抑制性酸性ホスファターゼ構造遺伝子 *PHO5* のタンパク質コード部と、大腸菌ベクターの pUC9 および酵母の染色体 DNA 断片を材料として、酵母宿主内で低コピーで安定なプロモーター検索ベクター pVC 701 の構築について述べている。このベクターのクローニング部位にプロモーター機能をもつ DNA 断片が挿入されると、抑制性酸性ホスファターゼが生産され、平板培地上でコロニー染色法により簡単にその発現活性が測定できる。このことを酵母のヒスチジン合成遺伝子 *HIS5* のプロモーター領域を用いて確かめている。さらに、このベクターを用いて、酵母の染色体より、プロモーター活性をもつ DNA 断片を分離し、多くの構成的発現を示す断片と、ガラクトースにより誘導発現を行う断片を得ている。

第3章では、クローニング部位として *EcoRI* 切断点1カ所しかもたない pVC 701 に対し、利用性を高めた改良型ベクターの構築について述べている。まず、*EcoRI* クローニング点にポリリンカーを挿入して、多様な制限酵素切断断片についてもクローニング可能なベクターに改良し、さらに、挿入したプロモーターによっては、クローニング点と *PHO5* 遺伝子の翻訳開始点の間に存在する3個の ATG 配列により翻訳阻害が起ることを見出し、この部分を削除した改良型のベクター pVC 727 (ATG 直前に翻訳共通塩基配列をもつ) と pVC 728 (ATG コドンより 33 bp 上流にポリリンカー部をもつ) を構築して

いる。これらのプロモーター検索ベクターとしての機能は、酵母のグリセルアルデヒド3リン酸脱水素酵素遺伝子のプロモーターを用いて確認している。さらにこれらのプロモーター検索ベクターを利用して、*HIS5* 遺伝子の発現に関係する2種の調節遺伝子突然変異株の分離に成功している。

第4章では、pVC728に結合した酵母のヒスチジン合成遺伝子 *HIS5* プロモーター部に欠失変異を導入し、宿主細胞の酸性ホスファターゼ活性を検定することにより、*HIS5* の5'上流部に存在する5個のGCN4タンパク認識配列の全てが、*HIS5* 遺伝子の脱抑制に必要なであることを明らかにしている。さらに、*HIS5* 遺伝子の基礎発現レベルの維持に必要な部位が-399 bpから-352 bpの間に存在することを検出している。

第5章では、本研究の結果を総括し、酵母における遺伝子発現制御機構について考察を行っている。

論文の審査結果の要旨

本論文は、遺伝子工学育種株における生産性向上に資することを目標に、酵母の各酵素構造遺伝子の5'上流部位に存在するプロモーター領域の分離と解析のために、プロモーター検索ベクターの構築とその応用について行った研究をまとめたものである。その主な成果を要約すると以下の通りである。

- (1) 従来より使用されていた大腸菌由来の β -galactosidase遺伝子に代えて、酵母宿主に対して同質な酵母由来の酸性ホスファターゼ遺伝子を指標遺伝子として用いることにより、遺伝子発現活性をより微細に検出可能なプロモーター検索ベクターを構築し、ガラクトースにより誘導可能なものを含む、多くのプロモーター活性を示すDNA断片を効率よく分離することに成功している。
- (2) 構築したプロモーター検索ベクターに、活性検定が困難なアミノ酸合成酵素の構造遺伝子のプロモーター部を結合することにより、酸性ホスファターゼ活性を指標として、それらの遺伝子の発現を制御する調節遺伝子突然変異を分離する道を開いている。
- (3) 構築したプロモーター検索ベクターに、プロモーターDNAを結合し、その構造と機能の関係を、酸性ホスファターゼ活性を指標として、解析することに成功している。

以上のように、本論文はプロモーター検索ベクターの構築のみでなく、そのベクターを利用して、遺伝子発現制御に関する様々な解析を行う道を開いている。これらの成果は、酵母の遺伝子工学育種における材料としてのプロモーターDNAを供給するのみでなく、遺伝子発現制御機構の研究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。