

|              |   |
|--------------|---|
| Title        | Expression of the human salivary $\alpha$ -amylase gene in yeast and characterization of the secreted protein.  |
| Author(s)    | 佐藤, 孝明  |
| Citation     | 大阪大学, 1990, 博士論文  |
| Version Type |   |
| URL          | <a href="https://hdl.handle.net/11094/36901">https://hdl.handle.net/11094/36901</a>   |
| 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、 <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉</a> 大阪大学の博士論文について <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">〈/a〉</a> をご参照ください。 |

***Osaka University Knowledge Archive : OUKA***

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

Osaka University

|         |  |       |    |       |
|---------|--|-------|----|-------|
| 氏名・(本籍) | さ  | とう    | たか | あき    |
| 学位の種類   | 佐  | 藤     | 孝  | 明     |
| 学位記番号   | 医  | 学     | 博  | 士     |
| 学位授与の日付 | 第  | 9008  |    | 号     |
| 学位授与の要件 | 平成2年3月5日   |       |    |       |
| 学位論文題目  | 学位規則第5条第2項該当   |       |    |       |
|         | Expression of the human salivary $\alpha$ -amylase gene in yeast and characterization of the secreted protein.<br>(ヒト唾液腺 $\alpha$ -アミラーゼ遺伝子の酵母における発現とその分泌蛋白質の性質) |       |    |       |
| 論文審査委員  | (主査)<br>教授   | 松原 謙一 |    |       |
|         | (副査)<br>教授   | 吉川 寛  | 教授 | 谷口 維紹 |

## 論文内容の要旨

### 〔目的〕

動物細胞における分泌蛋白質のプロセッシングを解明することは、蛋白質の膜透過や糖鎖合成を含めた分泌機構を理解する上で非常に重要である。

本研究の目的は酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) をモデル系として用い、分泌酵素であるヒト唾液腺  $\alpha$ -アミラーゼ遺伝子の酵母での発現を試み、その分泌された  $\alpha$ -アミラーゼのシグナルペプチド切断部位ならびに生化学的性質を動物細胞の場合と比較しながら詳細に調べることにある。

### 〔方法ならびに結果〕

#### 1. $\alpha$ -アミラーゼの酵母での発現

ヒト唾液腺  $\alpha$ -アミラーゼ (以下 Amy) は、511 アミノ酸からなる分泌蛋白質である。この遺伝子を酵母酸性フォスファターゼ (PHO5) プロモーターの下流に連結したプラスミド pAMHS を構築し、宿主である酵母 AH22 (*leu*<sup>-</sup>) を形質転換した。宿主の *leu*<sup>-</sup> を相補する形質転換株をリン酸制御下の Burkholder の合成培地中で培養し、PHO5 プロモーターの誘導発現を試みた。

その結果、Amy は効率よく (約  $1.0 \times 10^6$  molecules/cell) 培地中に分泌され、その比活性および抗原性は天然のヒト Amy と同じであった。更に、分泌された Amy 蛋白質は糖鎖付加の違いによって、3種類の分子種 (55kDa, 58kDa, 60kDa) が見られた。また、分泌に対する糖鎖付加の影響を調べるために、ツニカマイシン存在下で Amy を発現させた。その結果、糖鎖の付加がなくても、Amy は効率よく培地中に分泌された。

## 2. N, C末端アミノ酸配列の決定

Amyのシグナルペプチド切断部位を知るために、酵母で分泌されたAmyのN末端アミノ酸配列の決定をエドマン分解法により行った。その結果、AmyはそのN末端がブロックされていることが判明した。

次に、Amyをキモトリプシンで部分消化することによって、ブロックされたN末端ペプチドをHPLCにより精製し、そのアミノ酸分析を行った結果、N末端がグルタミンかグルタミン酸であることが判り、更に、ブロックされたN末端を含むペプチドをピログルタメイトアミノペプチダーゼで処理することで、酵母で分泌されたAmy蛋白質のN末端はピログルタミン酸でブロックされていることが明らかになった。従って、Amyのシグナルペプチドは15アミノ酸からなることが判った。

また、C末端は、ヒドラジン分解等により、アミラーゼ遺伝子配列より予想される最後の511番目のLeuであった。

以上のことより、酵母で分泌発現されたAmy蛋白質はほ乳類の場合と同様に、N末端がピログルタミン酸でブロックされ、しかも、C末端のプロセッシングはないことが明らかになった。

## 3. シグナルペプチドの除去

次に、酵母で発現されたAmyが15アミノ酸からなるシグナルペプチドを使って培地中に分泌されることを確かめるために、シグナルペプチドを制限酵素BanIIにより除去した。更に、T4 DNAポリメラーゼでBanII切断部位を平滑にした後、翻訳開始コドンATGを含むClaIリンカーを連結させ、PHO5プロモーターをもつ酵母-大腸菌シャトルベクターpAM82に導入した。このシグナルペプチドを失ったAmy遺伝子をもつ酵母形質転換株をリン酸制御下で誘導したところ、Amyは培地中に分泌されずに菌体内に蓄積され、しかもその発現量は約1/1000に低下した。菌体内のAmyは糖鎖の付加がないことから、Amyのシグナルペプチドは、Amyが酵母の分泌過程を通過し、糖鎖付加をうけるために必須であることが判った。

### 〔総括〕

酵母で発現されたヒト唾液腺 $\alpha$ -アミラーゼは酵母の分泌システムによって正確に15アミノ酸からなるシグナルペプチドを切断され、ほ乳類の場合と同様にそのN末端がピログルタミン酸でブロックされていることが発見された。また、分泌されたAmy蛋白質はヒトの場合と同じ比活性と抗原性をもち、糖鎖が付加されていた。

このように、酵母における異種蛋白質の分泌機構の研究は、動物細胞の分泌機構を解明する上で、非常に重要なモデル系になると考えられる。

## 論文の審査結果の要旨

動物細胞における分泌蛋白質のプロセッシング機構の解明にはまだ未知の部分が多い。本研究は、真核生物である酵母をモデル系として用い、ヒト唾液腺 $\alpha$ -アミラーゼ遺伝子を酵母内で分泌発現させ、その生化学的諸性質を詳細に調べた。その結果、非常に興味深い事に、酵母が動物細胞のシグナルペプチドを正確に認識し、プロセッシングを行い、菌体外に活性のある $\alpha$ -アミラーゼを分泌させることが判明した。更に、そのN末端が、動物細胞と同様に酵母でも修飾をうけ、ピログルタミン酸でブロックされていることが証明された。

これらの事実は、酵母が動物細胞の分泌機構を分子生物学的観点から理解する上で非常に重要なモデル系になることを示唆している点で意義は大きい。

以上により、本論文は学位の授与に値すると認める。