



Title	Saccharomyces cerevisiae におけるホスファターゼ生産 調節正因子遺伝子PH04の構造と機能
Author(s)	小川, 暢男
Citation	大阪大学, 1990, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/37276
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)	小川暢男
学位の種類	工学博士
学位記番号	第 9316 号
学位授与の日付	平成 2 年 8 月 10 日
学位授与の要件	工学研究科醸酵工学専攻 学位規則第 5 条第 1 項該当
学位論文題目	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> におけるホスファターゼ生産 調節正因子遺伝子 <i>PHO4</i> の構造と機能
論文審査委員	(主査) 教授 大嶋 泰治 教授 高野 光男 教授 今中 忠行 教授 菅 健一 教授 二井 将光 教授 山田 靖宙 教授 吉田 敏臣

論文内容の要旨

本論文は、酵母 *Saccharomyces cerevisiae* の抑制性酸性ホスファターゼ(rAPase)遺伝子発現制御機構に関する遺伝学モデルの分子生物学的検証を行った成果をまとめたものであり、緒論と本文3章および総合考察からなっている。

緒論では、遺伝学モデルの概要と本研究の目的を述べている。rAPase 構造遺伝子のひとつ *PHO5* の発現は、培地中の無機リン酸濃度により、転写段階で抑制的に制御されているが、本研究においてこの *PHO5* 転写に必要な正因子遺伝子 *PHO4* を対象に解析を行うことの意義を示している。

第1章では、まず、*PHO4*遺伝子領域を 1.5 kbp DNA断片内に限定し、その塩基配列から 936 bp の翻訳可能領域(ORF)を認めている。次に、*PHO4*の転写は、ORFの 36~17 bp 上流の 6ヶ所から始まり、ORFの約 830 bp 下流で停止することを明らかにしている。さらに、ノザン解析と *PHO4*-*lacZ* 融合遺伝子を用いた解析により、*PHO4*は構成的に低レベルの発現を行っていることを示している。

第2章では、*PHO4*^C、*pho4*⁻変異株およびリンカー挿入変異DNAに対して、*PHO4*タンパク質上の変異部位を決めている。

第3章では、これまでの知見を基に、欠失変異DNAを構築して、それら機能領域の確認を行っている。まず、大腸菌で生産した β -galactosidase::*PHO4*融合タンパクの *PHO5*プロモーターDNAへの結合活性を調べ、312アミノ酸からなる *PHO4*タンパクのC末端85アミノ酸残基内にその活性を認めている。この領域は、DNA結合タンパク質における共通構造のひとつ、両親媒性 halix-loop-halix 構造との相同性を有している。第2に、ORF内に欠失をもつ *PHO4*DNA断片の *4PHO4*変異に対する相補能により、N末端より 109アミノ酸残基までの領域に転写活性化機能が示唆され、その領域内に、転写活性化

機能構造として提唱されている、負電荷を帯びた両親媒性 α -helix 構造を認めていた。第3に、4種の $PHO4^C$ 変異、1ヶの挿入変異DNA、および6ヶの欠失変異DNAの解析により、中央領域(163番から202番アミノ酸残基)に負因子タンパクとの相互作用領域が存在することを示している。第4に、プラスミド上の種々の欠失 $PHO4$ DNA断片による宿主 $PHO4^C$ 活性阻害を調べることにより、多量体形成に必要な領域が、203番から227番アミノ酸残基に存在することを示唆している。

総合考察では、推定された $PHO4$ タンパク機能領域地図の知見から、転写因子の人为的改良による、クローニング遺伝子の効果的発現システムの開発について考察している。

論文審査の結果の要旨

これまでの遺伝子工学を利用したタンパク質生産システムにおいては、プロモーターDNAの塩基配列を改変することは行われているが、発現制御因子側の改良についての研究は少ない。本論文の研究は、酵母におけるホスファターゼ発現調節系をモデルとし、その転写正因子遺伝子 $PHO4$ の構造と機能についての解析を行ったものであり、その成果を要約すれば次の通りである。

- 1) $PHO4$ 遺伝子DNAのクローニングと塩基配列の決定を行い、936 bp からなるタンパクコード部を見いだし、それに対応するmRNAの存在と転写範囲を明らかにしている。
- 2) $PHO4$ 遺伝子の発現様式が、負の調節因子遺伝子 $PHO80$ と同じく、転写および翻訳段階で一定であることを明らかにし、ホスファターゼ発現制御機構が正因子 $PHO4$ タンパクと負因子 $PHO80$ との相互作用によることを支持する結果を得ている。
- 3) $PHO4$ タンパクを4種の機能領域に分離することを成功し、C末端にDNA結合領域が存在することを明らかにし、N末端部に転写活性化機能、中央部に負因子との相互作用機能、中央C末端に多量体形成機能があることを示唆している。
- 4) 他の転写正因子タンパクとの比較により、上記の機能領域内のアミノ酸配列について、それぞれの機能に特徴的な配列と立体構造について考察している。

以上のように、本論文は、酵母ホスファターゼ発現調節機構の分子生物学的理解を深め、その転写正因子 $PHO4$ タンパクがいくつかの機能領域に分離できることを示している。これらの成果は、基礎生物学的に重要であるばかりでなく、工学的にも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。