



Title	異種遺伝子発現系への応用を目指した酵母 <i>Pichia pastoris</i> の遺伝子工学的研究
Author(s)	大井, 英之
Citation	大阪大学, 1998, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/41167
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、 https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed 大阪大学の博士論文について

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

氏 名	大 井 英 之
博士の専攻分野の名称	博 士 (理 学)
学 位 記 番 号	第 1 4 1 9 9 号
学 位 授 与 年 月 日	平 成 10 年 11 月 25 日
学 位 授 与 の 要 件	学位規則第 4 条第 2 項該当
学 位 論 文 名	異種遺伝子発現系への応用を目指した酵母 <i>Pichia pastoris</i> の遺伝子工学的研究
論 文 審 査 委 員	(主査) 教 授 葛 西 道 生 (副査) 教 授 村 上 富 士 夫 教 授 田 谷 正 仁 助 教 授 中 岡 保 夫

論 文 内 容 の 要 旨

本論文は、異種遺伝子発現系の有用な宿主として用いられているメタノール資化酵母 *Pichia pastoris* の分子生物学的・遺伝子工学的な研究を行い、医薬品として開発が期待される蛋白質をより効率良く産生するシステム創製への応用を目指したものである。*

まず、メタノール資化酵素であるアルコールオキシダーゼをコードする *AOX2* 遺伝子のプロモーター領域の転写調節機構に関して研究を行い、3種の転写調節領域を明らかにした。転写活性化領域である *AOX2-UAS* はメタノールによる転写誘導に必須であった。化学合成した *AOX2-UAS* 配列をプロモーター上流に付加することにより転写活性は上昇した。一方、転写抑制化領域である *AOX2-URS1* 及び *AOX2-URS2* は両者が存在する場合に *AOX2-UAS* の機能をほぼ完全に阻害し、プロモーターの転写活性を抑制した。

次に、*P. pastoris* の培養液よりプロテアーゼを精製し、これをコードする *PRC1* 遺伝子をクローニングした。*PRC1* 遺伝子の open reading frame は 1569 bp で、523 アミノ酸から成るカルボキシペプチダーゼ Y (CPY) をコードしていた。蛋白は 20 アミノ酸のプレ配列、87 アミノ酸のプロ配列及び 416 アミノ酸の成熟蛋白配列から成り、N 型糖鎖付加部位は 4 か所存在した。糖鎖を除いた分子量は全体で 59.44 kDa、成熟蛋白で 47.35 kDa と計算された。*PRC1* 遺伝子を破壊した *P. pastoris* は CPY 活性が消失した。また、*PRC1* 遺伝子を過剰発現させると、大量の活性型 CPY が細胞内へ蓄積した。

最後に、パルスフィールドゲル電気泳動を用いて 4 株の *P. pastoris* から染色体を分離し解析を行った。その結果、*P. pastoris* はすべての株で 1.7 Mb から 3.5 Mb のサイズの 4 本の染色体を有し、全サイズは 9.5 Mb から 9.8 Mb であった。株間で染色体長多型が存在した。さらに、ヒト血清アルブミンを分泌産生する遺伝子組換え体を非選択的な条件で 83 世代まで継代培養を行い、染色体の安定性を評価した結果、染色体長に変化は見られず、また特定染色体領域上に組込まれた発現構成体は安定に保持され、産生量の変化は認められなかった。

論文審査の結果の要旨

近年の遺伝子工学の進歩によって、多くの有用な蛋白質の遺伝子が単離されそれらの機能も解明されつつある。その中でその様な有用な遺伝子の産物を大量に、且つ純粋に産生させる系の確立が一つの大きな課題である。

本論文は、異種遺伝子発現系の有用な宿主として用いられているメタノール資化酵母 *Pichia pastoris* の分子生物学的・遺伝子工学的な研究を行い、医薬品として開発が期待される蛋白質をより効率良く産生するシステム創製への応用を目指したものである。

まず、メタノール資化酵素であるアルコールオキシダーゼをコードする遺伝子のプロモーター領域の転写調節機構に関して研究を行い、3種の転写調節領域を明らかにした。メタノールによる転写誘導に必須である転写調節領域を明らかにし、化学合成した配列をプロモーター上流に付加することにより転写活性が上昇する系を作った。次に、*Pichia pastoris* の培養液よりプロテアーゼを精製し、これをコードする遺伝子 PRC1 をクローニングした。この遺伝子は523アミノ酸から成るカルボキシペプチデーゼY (CPY) であることを示した。この遺伝子を破壊した酵母では CPY 活性が消失し、過剰発現させると、大量の活性型 CPY が細胞内へ蓄積することを明らかにした。

最後に、パルスフィールドゲル電気泳動を用いて4株の *Pichia pastoris* から染色体を分離し解析を行った。その結果、*Pichia pastoris* はすべての株で1.7 Mb から3.5 Mb のサイズの4本の染色体を有し、株間で染色体長多型が存在することを示した。さらに、ヒト血清アルアミンを分泌産生する遺伝子組換え体を非選択的な条件で83世代まで継体培養を行い、染色体の安定性を評価した結果、染色体長に変化は見られず、また特定染色体領域上に組込まれた発現構成体は安定に保持され、産生量の変化は認められないことを示した。

以上のように、本論文は酵母 *Pichia pastoris* の分子生物学的・遺伝子工学的な研究を行い、医薬品として開発が期待される蛋白質をより効率良く産生するシステム確立とその応用を目指したものであり、博士（理学）の学位論文として価値のあるものと認める。