

## 酵母 *Cryptococcus humicolus* UJ1 のアクチン遺伝子単離の検討

環境システム工学専攻 環境生物化学研究室 成田 俊介  
指導教官 山田 良平  
解良 芳夫  
高橋 祥司

### 背景と目的

アミノ酸はタンパク質の構成成分であり、生体内の代謝において重要な役割を持っている。アミノ酸にはD-体とL-体が存在しているが、そのうちD-アミノ酸は天然には存在せず、人工的に合成されたものであると考えられてきた。しかし近年、HPLCなどの微量分析機器の向上により、生体内にD-アミノ酸が存在していることが明らかになった。中でもD-アラニン、D-セリン、D-アスパラギン酸などが意外に多量に存在していることが明らかとなり、その生理機能の解明が行われている。

そこで当研究室ではD-アスパラギン酸の定量法としてD-アスパラギン酸酸化酵素を用いる方法を着想し、本酵素を多量に生産する酵母 *Cryptococcus humicolus* UJ1 株(UJ1)に着目した。UJ1はD-アスパラギン酸を唯一の窒素源としたときにD-アスパラギン酸を誘導合成する。しかし、UJ1における本酵素の発現機構は解明されていない。

この機構の解明には宿主-ベクター系の構築が必須である。現在までに栄養要求性の選択マーカーである *URA3* 遺伝子を用いた宿主-ベクター系を構築しているが、遺伝子の多重導入や多重破壊のためには他の選択マーカーが必要である。そこで私は薬剤耐性遺伝子を選択マーカーとした宿主-ベクター系を考えた。しかし、異種由来の薬剤耐性遺伝子を発現させるためには、導入細胞由来のプロモーター領域、ターミネーター領域が必要である。

その配列としてよく用いられるのが、アクチン遺伝子のプロモーター、ターミネーターである。アクチンは真核生物において最も多量に存在するタンパクであり、その遺伝子は構成的に発現する。

本研究ではアクチン遺伝子とそのプロモーター領域、ターミネーター領域のUJ1からの単離を検討した。

## 実験概要

### 1. アクチンの部分遺伝子断片の取得

UJ1 の染色体 DNA 上の、プロモーター領域とターミネーター領域を含むアクチン遺伝子は、UJ1 染色体 DNA を適当に断片化して ファージに組込んだファージライブラリから単離する。このためにファージクローンを、ブランクハイブリダイゼーション法を用いて単離する。

ブランクハイブリダイゼーション法に用いるアクチン遺伝子プローブを作成するため、まずは他種酵母のアクチン遺伝子の既知のアミノ酸配列とアライメントをとり、プライマーを設計し、DNA ポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) により、UJ1 のアクチンの部分遺伝子と推測される約 1 Kbp の DNA 断片を増幅した。

増幅した DNA 断片を pT7Blue T-vector (Novagen) へ組込み、*E. coli* XL1-Blue MRF ' へ導入し、VCSM13 ファージによって 1 本鎖 DNA を調製し、チェーンターミネーション法によって配列解析を行った。決定した塩基配列の推定アミノ酸配列は様々な真核生物のアクチン遺伝子のアミノ酸配列と 96% 以上の相同性があることが明らかとなり、得られた DNA 断片が UJ1 のアクチンの部分遺伝子断片であることが明らかになった。

例として *Absidia glauca* との相同解析を図 1 に示す。

Identities = 91/93 (97%), Positives = 92/93 (98%)

Query: 1 NWDDMEKIWHHTFYNELRVAPEEHPVLLTEAPLNPKQNREKMTQIMFETFNAPAFYVSIQ 60

\*\*\*\*\*

Sbjct: 80 NWDDMEKIWHHTFYNELRVAPEEHPVLLTEAPLNPKSNREKMTQIMFETFNAPAFYVSIQ 139

Query: 61 AVLSLYASGRTTGIVLDSGDGVTHTVPIYEGFS 93

\*\*\*\*\* \*

Sbjct: 140 AVLSLYASGRTTGIVLDSGDGVTHTVPIYEGYS 172

Query: *Cryptococcus humicolus* UJ1 のアクチンの部分推定アミノ酸配列

Sbjct: *Absidia glauca* のアクチンタンパク質のアミノ酸配列

\*印はアミノ酸残基が一致する部分を表す

図 1 得られたアクチンの部分遺伝子断片の、*Absidia glauca* のアクチンタンパク質との相同性

## 2. *Cryptococcus humicolus* UJ1 染色体 DNA のサザン解析

UJ1 染色体 DNA を図 2 左に示す制限酵素で切断し、アガロース電気泳動し、メンブレンに DNA 断片を転写、固定化した。次にメンブレン上の DNA を、アクチンの部分遺伝子断片をプローブにして検出した (図 2 右)。

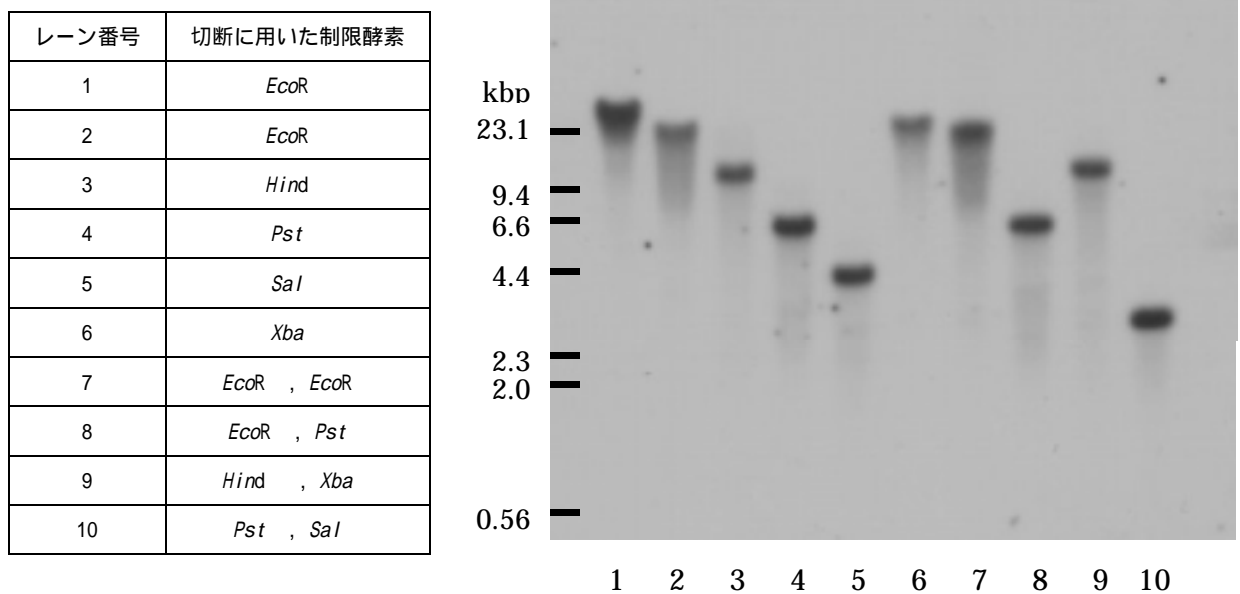


図 2. アクチンの部分遺伝子断片をプローブに用いた UJ 1 染色体 DNA のサザン解析

このサザン解析の結果、いずれのレーンでも単一のバンドが検出されたことから、UJ1 染色体 DNA 上のアクチン遺伝子のコピー数が 1 つであることが明らかになった。

次にサザン解析をもとに各制限酵素で切断したアクチンを含む DNA 断片の長さを求め、アクチン遺伝子近傍の制限酵素地図を作成した (図 3)。

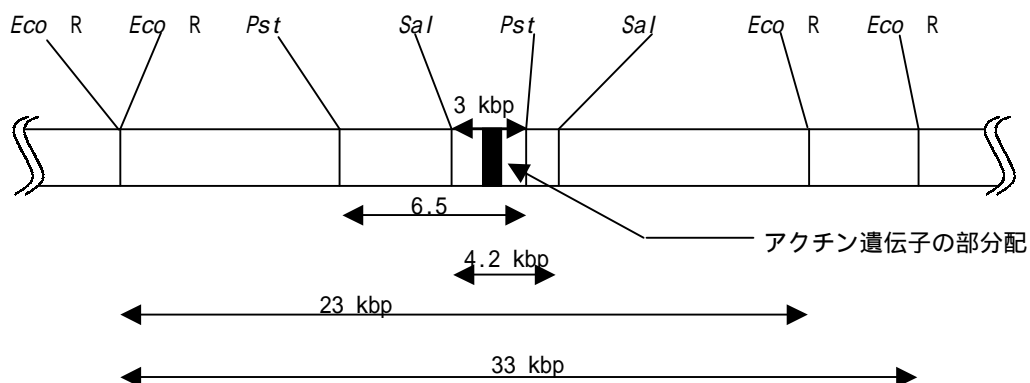


図 3 アクチン遺伝子の *EcoR* , *EcoR* , *Pst* , *Sal* の制限酵素部位

### 3. プラークハイブリダイゼーション法によるアクチン遺伝子を保有するファージの単離

UJ1 の染色体 DNA はサイズが大きいいため、そこから直接アクチン遺伝子を単離するのは困難である。そこで UJ1 染色体 DNA を適当な大きさに切断してファージに組み込んだライブラリからアクチン遺伝子が組み込まれているファージ DNA を単離する。

9~23 kbp のサイズに切断した UJ1 染色体 DNA をファージベクターに組込んで作成された UJ1 の染色体 DNA ファージライブラリを宿主 *E. coli* XL1-Blue MRA(P2) に感染させてプレートイングし、プラークを形成させた。次にプラークをメンブレンに転写し、アルカリ溶液でファージのキャップシドを壊すと共にファージ DNA を変性させ、メンブレンに固定化した。次にメンブレン上のファージ DNA を、アクチンの部分遺伝子断片をプローブにして検出した (図 4)

このプラークハイブリダイゼーション法によって、形成した合計約 15 万 5 千個のプラークから 10 個のファージクローンを単離した。

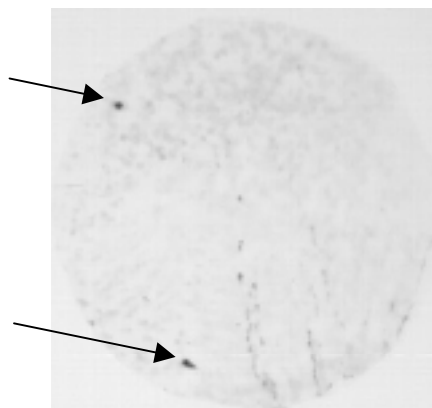


図 4 アクチン遺伝子の部分遺伝子をプローブにして検出された、アクチン遺伝子を有していると推測されるプラーク

### 4. 単離したアクチンを有するファージ DNA のサザン解析

単離した 10 個のファージを大量に増幅し、DNA を抽出精製した。調製したファージ DNA を図 5 の左に示す制限酵素切断し、UJ1 染色体 DNA と同様にサザン解析した。単離した 10 個のファージのうち、9 個が同じ解析パターンを示し (図 5 中央)、1 個が他の 9 個と違う解析パターンを示した (図 5 右)。このことから、アクチン遺伝子の組込ま

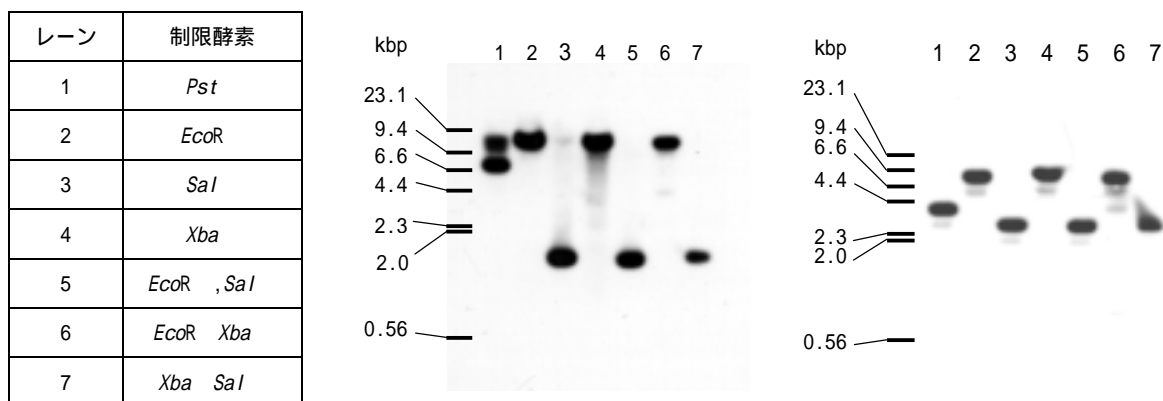


図 5 単離したファージから抽出した DNA のサザン解析

れ方の異なる 2 種類のファージを得たことが確認された。

次にサザン解析をもとに各制限酵素で切断したアクチンを含む DNA 断片の長さを求め、ファージベクターに組込まれた、アクチン遺伝子を含む UJ1 染色体 DNA の制限酵素地図を作成した (図 6)。

UJ1 のアクチン遺伝子を有する 2 種類のファージは、それぞれアクチン遺伝子の異なる領域を組込んでいる。しかし、どちらのファージクローンも、アクチンの部分遺伝子断片に一致する配列がファージアームのマルチクロニングサイト付近に存在することから、どちらのファージクローンも、プロモーター領域、もしくはターミネーター領

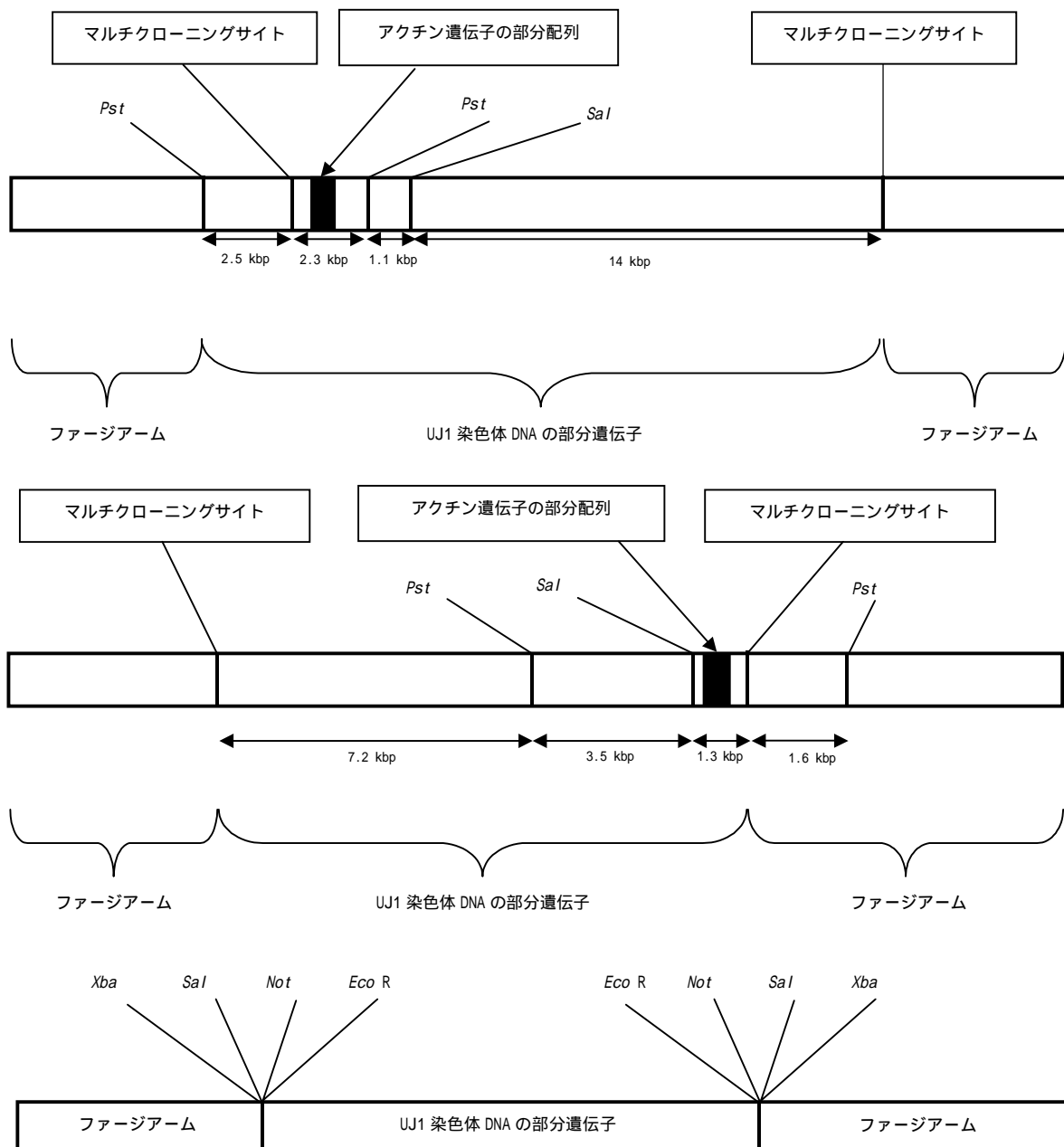


図 6 単離したファージ DNA の制限酵素地図

域が欠けていることが示唆される。

アクチン遺伝子のプロモーター領域とターミネーター領域を得るためには、アクチン遺伝子とその両端 1 kbp ずつの領域を含む、あわせて 3 kbp の領域を取得しなくてはならない。ゆえに、本実験ではアクチン遺伝子とそのプロモーター領域、ターミネーター領域のいずれをも有するファージクローンを単離することはできなかった。

しかし、UJ1 の染色体 DNA のサザン解析から推測される *Pst* サイトと *Sal* サイトの位置関係と、ファージ DNA のサザン解析結果から、一方のファージクローンがプロモーター領域を有していれば、他方のファージクローンはターミネーター領域を有することが明らかとなった。したがって、単離した 2 種類のファージクローンからはアクチン遺伝子、アクチン遺伝子のプロモーター領域、ターミネーター領域が単離できることが明らかとなった。

## 総括

1. 酵母 *Cryptococcus humicolus* Uj1 株の染色体 DNA を調製し、これを鋳型にして他の真核生物のアクチンタンパク質のアミノ酸配列から設計した縮重プライマーを用いて、UJ アクチンの部分遺伝子断片を得た。
2. アクチンの部分遺伝子断片をプローブにした UJ1 の染色体 DNA のサザン解析によって、UJ1 染色体 DNA 上のアクチン遺伝子のコピー数が 1 つであることが明らかとなった。また、アクチン遺伝子とその周辺の制限酵素の位置関係が明らかになった。
3. プラークハイブリダイゼーション法によって、UJ1 の染色体 DNA ライブラリで形成した 155,000 個のプラークから、アクチン遺伝子を有するファージクローンを 9 個単離した。
4. ファージ DNA のサザン解析によって、アクチン遺伝子の組込まれ方の異なる 2 種類のファージクローンが得られたことがわかったが、アクチン遺伝子全長とそのプロモーター領域とターミネーター領域を有するファージクローンを単離することはできなかった。しかし、得られた 2 種類のファージクローンをあわせるとアクチン遺伝子の全長とそのプロモーター領域とターミネーター領域が得られることが明らかになった。