

酵母 *Cryptococcus humicola* UJ1 の薬剤耐性遺伝子発現ベクターの構築

環境生物化学研究室 鶴巻絵理

指導教官 山田良平 解良芳夫 高橋祥司

1. 背景

D-アスパラギン酸酸化酵素 (DDO, EC1.4.3.1) は D-アスパラギン酸 (D-Asp) や D-グルタミン酸 (D-Glu) などの酸性 D-アミノ酸の酸化的脱アミノ反応を触媒する酵素であり、酵母からヒトに至る多くの真核生物に存在していることが知られている。現在までに、いくつかの生物種由来 DDO の酵素学的諸特性が詳細に解析され、哺乳動物においてその生理機能に関する研究が進行中である。しかし、真核微生物における DDO の生理機能に関する報告はない。

我々は DDO を多量に発現する酵母 *Cryptococcus humicola* UJ1 を自然界から単離し、本酵母の生産する D-アスパラギン酸酸化酵素 (ChDDO) の酵素学的諸特性を明らかにしてきた。その結果、本酵母は D-Asp を唯一の窒素源、炭素原としたときに ChDDO を多量に誘導合成し、L-Asp や L,D-グルタミン酸を窒素源、炭素原としたときには誘導しなかった。また、他の窒素源、炭素源の共存下でも ChDDO は誘導発現され、その発現は転写段階で制御されていた。このことから本酵母において D-Asp 特異的な遺伝子の誘導発現機構の存在が示唆された。

当研究室ではこの発現機構を解明するために必須となる宿主-ベクター系の構築を検討している。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。そこで本研究では薬剤耐性遺伝子を選択マーカーとした宿主-ベクター系を構築することを目的としている。薬剤耐性遺伝子を発現させるためには本酵母由来のプロモーター配列とターミネーター配列を必要とする。有用な配列として、他の生物においてよく用いられているのがアクチン遺伝子 (*ACT*) 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質であり、構成的に発現することが知られている。そこで本研究ではアクチン遺伝子プロモーターおよびターミネーター配列を用いたベクターの構築を試みている。

アクチン遺伝子とそのプロモーター、ターミネーター領域を取得するにあたり、すでにアクチン部分遺伝子断片を含むと推測される 2 種類のファージクローンが単離されている。また、これらのファージクローンに含まれているアクチン部分遺伝子断片は、それぞれプロモーターもしくはターミネーター領域が含まれていないことが示唆されている。本研究ではアクチン遺伝子プロモーター、ターミネーター領域の 2 種類のファージクローンからの単離を検討した。

2. *C. humicola* UJ1 アクチン遺伝子 (*ChACT*) の単離

単離されている 2 種類のファージクローン A9、A10 に含まれているアクチン部分遺伝子断片には、それぞれプロモーターもしくはターミネーター領域が含まれていないことが示唆されている。そこでアクチン遺伝子全長およびプロモーター、ターミネーターを得るために両方のファージクローンからアクチン部分遺伝子断片を単離した。Fig. 1 には 2 種類のファージクローンから単離したアクチン部分遺伝子断片の塩基配列解析結果を合わせて示した。*ChACT* 遺伝子は開始コドンから終止コドンまで 1,509 bp からなり、375 アミノ酸からなるポリペプチドをコードしていた。また、イントロンスプライシング配列 (橙色文字) とブランチ配列 (緑色文字) のコンセンサス配列がみられたことから、*ChACT* 遺伝子には 6 個のイントロンが存在することが示唆された。

解析した *ChACT* 遺伝子の 5' 非翻訳領域には TATA ボックスや CAAT ボックスはみられず、プロモーター領域の一部しか単離できなかったと考えられる。また、3' 非翻訳領域には典型的なポリ A 付加シグナルに類似した配列がみられ、ターミネーター全長を取得できたと考えられる。

Fig. 1 *ChACT* 遺伝子の塩基配列解析結果

3. ChACT のアライメントおよび分子系統解析

ChACT の推定アミノ酸配列と他種生物のアクチンアミノ酸配列とのアライメントを行った。推定アミノ酸配列は同属の *Cryptococcus neoformans* と最も高い相同性を示し 96.3 % だった。また他の担子菌のアクチンとも高い相同性を示し、*Phaffia rhodozyma*(96.0 %)、*Puccinia graminis*(94.9 %)、*Schizophyllum commune*(94.7 %) だった。推定アミノ酸配列からアミノ酸モチーフ検索を行った結果、アクチンに特徴的な配列が 2 箇所に見出された。

アミノ酸配列をもとに系統樹解析を行った結果、ChACT は同じ担子菌とクラスターを形成した。また、アクチンに対してやや低い相同性 (70 ~ 30 %) を示すが、アクチンと同じ祖先分子から進化したと予想されているアクチン関連たんぱく質とはクラスターを形成しなかった。

これらの結果から、単離した遺伝子がアクチン遺伝子であることが明らかとなった。

4. TAIL-PCR による ChACT 遺伝子のプロモーター領域の単離

ファージクローンから単離したアクチン遺伝子断片にはプロモーター領域が十分には含まれていなかった。そこで Thermal Asymmetric Interlaced (TAIL) -PCR により解析したアクチン遺伝子のさらに上流領域を単離した。

TAIL-PCR とは既知の遺伝子配列に隣接する未知 DNA 領域を特異的に増幅する方法である。この方法は既知の塩基配列由来特異的プライマーと様々な配列に結合できる任意配列プライマーを組み合わせる 3 段階の PCR 反応を行うことで特異的な DNA 断片を優先的に増幅させる。特異的配列プライマーは解析したアクチン遺伝子の塩基配列をもとに、1st PCR ~ 3rd PCR それぞれで使用する 3 種類のプライマーを設計した。設計したプライマーの結合位置を Fig. 1 に

で示した。任意配列プライマーは TAIL-PCR に関する報告の中で共通して利用されていた 3 種類のプライマーを用いた。

これらのプライマーを用いて TAIL-PCR を行い、得られた PCR 増幅産物をアガロースゲル電気泳動した。2nd PCR と 3rd PCR で用いたプライマー ChACT1p と ChACT2p の結合位置の間は 162 bp ある。したがって ChACT 遺伝子上流領域が増幅していれば、3rd PCR 産物は 2nd PCR 産物より 162 bp 短くなっていると考えられる。そこで電気泳動の結果、アクチン遺伝子上流領域と思われる約 1,300 bp の DNA 断片を単離して解析した。

5. 単離した DNA 断片の塩基配列解析

単離した DNA 断片が ChACT 遺伝子上流領域か確認するために、塩基配列を解析して ChACT 遺伝子とのアライメントを行った。その結果、単離した DNA 断片の 250 bp () が既知配列と一致した (Fig. 2)。このことから、単離した DNA 断片は ChACT 遺伝子の 5' 非翻訳領域であることが示された。

この遺伝子断片により 1,291 bp の ChACT 遺伝子 5' 非翻訳領域が解析できた。5' 非翻訳領域には六箇所 () に CAAT ボックスがみられた。また、本酵母と同属の *Cryptococcus neoformans* をはじめ、他種酵母のアクチン遺伝子では開始コドンより上流 850 bp もしくはそれよりも短い領域でプロモーターとして機能していることが報告されている。以上のことから、今回単離した遺伝子断片によりアクチン遺伝子のプロモーター領域全長が得られたと考えられる。

```

gatttcatcaccgcgcggaattgctcaacacaggggacggacgcaacaatggac -1232
ctgggtcccacagccactgcagtcactgaaccggcgttgcgcacgatctgaccaaggccca -1172
atgtcgatgacaaggttgatggatgatggacaaagagaaactcactgaacgggacgacta -1112
ttggtcgggggaacgcgctccatgctcccgctccttgctggccttcttcttgaagatggcc -1052
attgtcgcatgcatggagtacgggtggatggctcaatcacaatagaactgcgcgcgtt -992
atgggcacggcggtacggcgacggagtcgagacgcgcgcgaaagtgtggtggcttcct -932
tccgagctacgacgcgtagaggggtcgctgctggcagcggcgttgatgggggtgcaatcaa -872
caggagcggggccctagtcgtgttcatgaactggctcgctggctgtgggtgcgtgggtgggtg -812
tttgatacacgcgtgatagggaaacgctgggttgagaaagagacgggtgggtgggtgggtg -752
tggagtgggtgggtcgctcgctgaactgctgctccgtctgtgtgccggtcggtcggtgggtc -692
gtcgcgccggcgagcagcggcaggggcagcaggacacagttgggggtgcgtgcacgtcg -632
agcgcgtgtttgggcgtcgctcacgggtcaaaagagaagagtgtgtgtgtgtatgtgacaaa -572
agcgggcttgtgcgcgcgcgggcaaagagtatggggagaagatggattatggatgcaaac -512
actgggcgcgtcgctgtgcacaaggggcgaagaagagcaaaggggaggcgaaccggcct -452
tgcacaccccgcatactcgtaagtcttcaagcctagagctgcatgcgttttcggagctcg -392
gaaacagcctaccattactacattccccactccccctatcatgacgtgtcagaagagcc -332
tcttttcatctacggccattcttgacctgccaacggtccaaggacacctggaacgcgtcg -272
gacgagcacagaccgtctaggcagtgscgctctgcgtaccaggggtcgctcggcgacgg -212
atgcgactccctccacgtcgacagacagccctctgtcatgtgggccgaagggggaacag -152
catcccgacgccccgcatgaaagccaccatccagacgcatcgatgcgtccttatccc -92
tctccccaccacgacgaccttagcgccgcacgatccatgaatgtcagcgctgaccactctg -32
ctttgactttaacagatagacacttttacaATgtgagtaaaaacgacgacgcccagacac 29

```

M

```

ggctcgagcaatccgcccgggtgatga 56

```

Fig. 2 *ChACT* 遺伝子 5'非翻訳領域の塩基配列解析結果

6. 総括

1. 酵母 *Cryptococcus humicola* UJ1 のアクチン遺伝子は開始コドンから終止コドンまで 1,509 bp からなり、375 アミノ酸からなるポリペプチドをコードしていた。また、オープンリーディングフレームは 6 つのイントロンで分断されていた。
2. 解析できたアクチン遺伝子の 5'非翻訳領域 193 bp には TATA ボックスや CAAT ボックスはみられなかったが、3'非翻訳領域 634 bp には典型的なポリ A 付加シグナルに類似した配列が見られた。
3. *C. humicola* UJ1 アクチンの推定アミノ酸配列は *Cryptococcus neoformans* のアクチンと最も高い相同性を示した。また、他の担子菌のアクチンとも高い相同性を示した。
4. 分子系統解析の結果、*C. humicola* UJ1 のアクチンは同じ担子菌のアクチンとクラスターを形成し、アクチン関連タンパク質とはクラスターを形成しなかった。このことから単離した遺伝子がアクチン遺伝子であることが示された。
5. 単離したアクチン遺伝子の配列から設計したプライマーを用い、*C. humicola* UJ1 ゲノム DNA を鋳型とした TAIL-PCR により、アクチン遺伝子の 5'非翻訳領域上流 1,291 bp をさらに単離した。また、5'非翻訳領域には六箇所に CAAT ボックスがみられた。