

令和 2 年 6 月 25 日現在

機関番号：82626

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2019

課題番号：16K14909

研究課題名(和文)植物ウイルスの複製機構を利用した新規酵母タンパク質発現系の開発に関する研究

研究課題名(英文)Plant virus replication-mimicking expression vector for *Saccharomyces Cerevisiae*

研究代表者

西宮 佳志(Nishimiya, Yoshiyuki)

国立研究開発法人産業技術総合研究所・生命工学領域・主任研究員

研究者番号：00357716

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 1,700,000円

研究成果の概要(和文)：タバコモザイクウイルス(TMV)のゲノム構造を模倣し、TMVの5'非翻訳領域(UTR)、RNA依存性RNAポリメラーゼ(RdRp)のオープンリーディングフレーム、移行タンパク質(mp)と外被タンパク質(cp)それぞれのサブゲノムプロモーター(sgp)、TMVの3'UTRを導入した出芽酵母(*Saccharomyces Cerevisiae*)用発現ベクターを構築した。Mpのsgp(mp\_sgp)とcpのsgp(cp\_sgp)のそれぞれの下流にはクローニングサイトを設けた。Cp\_sgp下流にクローニングした標的タンパク質が*S. Cerevisiae*内で発現されるのが確認された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ゲノムRNAやサブゲノムRNAの複製を担うTMV由来のRdRpが発現されなくともcp\_sgp下にコードされたタンパク質が発現されるという予想外の結果がもたらされた。本来の宿主であるタバコのプロトプラストを使った研究では、RdRpの発現なしにはサブゲノムRNAが作られないことが報告されており、今回得られた結果が何に起因するかを解析することでウイルスが宿主の翻訳装置を乗っ取る仕組みに新たな知見をもたらすと期待される。

研究成果の概要(英文)：Tobacco mosaic virus (TMV) is a positive-strand plant RNA virus, and it is known that TMV is able to replicate in cytoplasm of *Saccharomyces Cerevisiae*. Here, I tried to construct TMV replication-mimicking expression vector for *S. Cerevisiae*, which contains 5'-leader sequence (omega leader), RNA-dependent RNA polymerase (RdRp)-encoding gene, subgenomic promoters (sgps) for movement and coat proteins, and 3'UTR of TMV. For target proteins, cloning sites (css) were introduced into downstream of the sgps. Interestingly, when encoding gene for target protein is under the control of cp\_sgp, the protein was expressed without expression of RdRp. Further analysis of this phenomenon might be helpful in understanding replication system of RNA viruses.

研究分野：蛋白質工学

キーワード：発現系 酵母

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

酵母発現系は、扱いが容易かつ安価であり、大腸菌と比較して活性型タンパク質の発現性に優れている。また、哺乳類細胞に類似の翻訳後修飾が可能であることから、外来タンパク質の発現システムとして広く利用されている。特に *Saccharomyces Cerevisiae* は、相同組換え (相同な配列をもつ DNA 間で起こる組換え) によるゲノム DNA の破壊や置換が容易で、代謝経路の編集による有用物質生産にも利用される。遺伝子マップの構築や詳細な分子生物学的解析など膨大な研究蓄積がある一方で、*S. Cerevisiae* の外来タンパク質発現レベルの低さは長年改善されず、また、破壊できない必須遺伝子の発現制御は困難なままであった。

### 2. 研究の目的

宿主細胞の細胞質でゲノム RNA を複製する RNA ウイルスの増殖機構を利用することで、核内での異常 RNA の分解機構を回避し、安定的、継続的に目的の RNA を複製することができると考えられる。そして安定的な RNA の複製は、そこにコードされるタンパク質の発現向上や遺伝子発現を制御する RNA の供給を可能にすると思われ。

そこで、出芽酵母 *S. Cerevisiae* 内でも複製・増殖することが知られているタバコモザイクウイルス (TMV) を利用した、酵母タンパク質発現系の開発を目的とした。

### 3. 研究の方法

#### (1) 発現ベクターの構築

TMV ゲノムを基に配列を設計した。設計配列を前後に 30 bp 以上の重複配列が含まれるように約 450 bp の断片に分け、overlap extension PCR と *S. Cerevisiae* の相同組換えを利用して連結およびベクターへのクローニングを行った (図 1)。

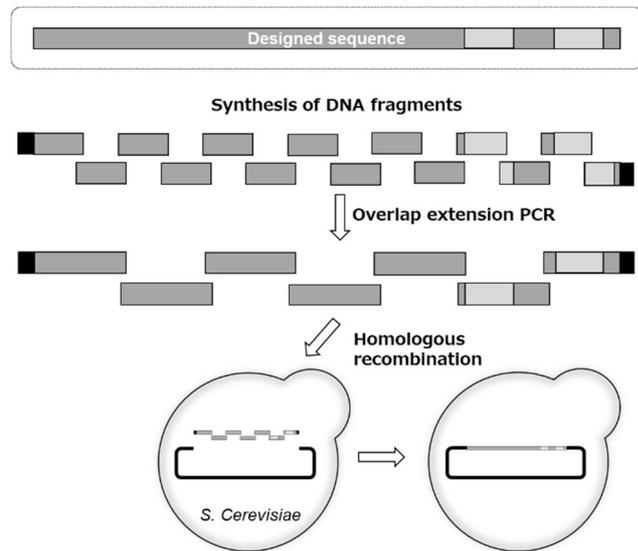


図 1. 発現ベクターの構築

#### (2) タンパク質発現の評価

標的タンパク質として栄養要求性マーカーを発現させた場合は、栄養要求性培地での生存能を指標に評価した。蛍光タンパク質の場合は、蛍光強度を指標に発現を評価した。また、ヒスチジンタグ (His<sub>6</sub>-tag) を融合発現させた場合は、ウエスタンブロッティングを行い、抗 His<sub>6</sub>-tag 抗体で検出した。

### 4. 研究成果

#### (1) TMV 様ゲノムの作製

文献やツールを用いて TMV ゲノム配列中の制限酵素サイト、5' 非翻訳領域 (5' UTR)、3' 非翻訳領域 (3' UTR)、オープンリーディングフレーム (ORF)、サブゲノムプロモーター (sgp) をマッピングした (図 2A)。RNA 依存性 RNA ポリメラーゼ (RdRp) をコードする配列の 3' 末端は移行タンパク質 (mp) の sgp と mp の ORF の 5' 末端側を内包していた。また、mp をコードする配列の 3' 末端側は外被タンパク質 (cp) の sgp の大部分を含んでいた。TMV ゲノムの 3' 末端配列はゲノム RNA の複製に重要であった<sup>1</sup>。これらの情報から、以下のように配列を設計した。ゲノムに含まれる制限酵素サイトのうちクローニ

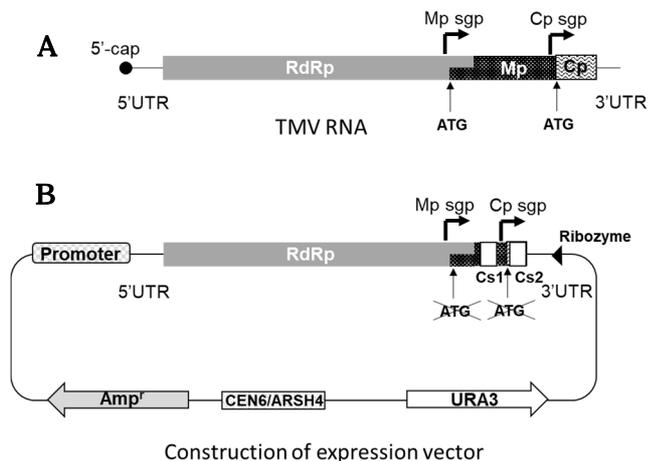


図 2. 発現ベクター

ングに利用するものを同義置換により削除、置換により mp の開始コドン欠損させ RdRp の終始コドン下流にクローニングサイト 1 (cs1) を導入、cs1 の下流に mp の 3' 末端配列を含む cp sgp 配列 (cp の開始コドン欠損させたもの) と cs2 を導入、3' 末端側で tRNA 様構造<sup>1</sup> を形成させるためリボザイム配列を連結。この TMV 様ゲノム DNA を *ura3* (Orotidine 5'-

phosphate decarboxylase) を欠損した *S. Cerevisiae* を利用して URA3 のコード配列を有するベクターにクローニングした (図 2B)。プロモーターは TDH3 を含む 5 種類を用意した。*S. Cerevisiae* からベクターを回収し, PCR あるいは大腸菌内で増幅してクローニングされた塩基配列を確認した。

### (2) 標的タンパク質の発現

上記で構築したベクターをベースとして cs1 に緑色蛍光タンパク質である EGFP を導入したベクターと cs2 に赤色蛍光タンパク質である DsRED monomer を導入したベクターを構築した。それぞれのベクターで *S. Cerevisiae* を形質転換したが, どちらの場合も蛍光は観察されなかった。そのためバックボーンのベクターをシングルコピー型 (CEN6/ARSH4) からマルチコピー型 (2 $\mu$ ) に変更した。しかし, 蛍光は観察されなかった。そこで, 蛍光タンパク質に替え栄養要求性マーカーである HIS3

(Imidazoleglycerol-phosphate dehydratase) のコード配列を cs1 または cs2 に導入した (図 3A)。これらのベクターで *ura3* と *his3* を欠損した *S. Cerevisiae* を形質転換し, ウラシル欠損寒天培地 (SD-Ura) に播いた。形成されたコロニーをヒスチジン欠損寒天培地 (SD-His) に打ち換えたところ, cp sgp 下に HIS3 コード配列を導入した場合に SD-His でコロニーが形成され, HIS3 の発現が示唆された。一方, mp sgp 下に導入してもコロニーは形成されなかった (図 3B)。そこで, mp sgp の転写開始点上流の特定 6 か所にランダムな塩基, 2 か所にプリン塩基 (A または G), 1 か所にピリミジン塩基 (T または C) を導入したライブラリーを構築し, ヒスチジン欠損寒天培地でセクションを行った。Mp sgp は RdRp の ORF に含まれるため, 変異によって RdRp にアミノ酸置換が起こらないよう配慮した。寒天培地上に形成された複数のコロニーからベクターを回収して mp sgp の配列を解析したところ, 全てのコロニーで同一の変異が導入されていることが明らかとなった。

Cp sgp 下で HIS3 の発現が確認されたため, 再度蛍光タンパク質の発現を試みた。その際, *S. Cerevisiae* での発現に適するよう改良された yEmcherry (赤色) のコード配列<sup>2</sup>を用い, その C 末端には His<sub>6</sub>-tag を付加した。Cp sgp 下に yEmcherry を導入したベクターで *S. Cerevisiae* を形質転換し, 形成されたコロニーを別の SD-Ura プレートに打ち換えた。このプレートに励起光を照射し蛍光を観察した (図 4A)。また, 蛍光が観察された複数のクローンを培養し細胞内総タンパク質を回収した。これらのサンプルをポリアクリルアミドゲル電気泳動に供し, ウエスタンブロッティングにより yEmcherry の検出を試みた (図 4B)。その結果, yEmcherry が発現されていることが確認された。

### (3) RdRp の発現確認

次に RdRp の発現状況を検討した。RdRp のコード配列からは, メチルトランスフェラーゼ様ドメイン (Met) とヘリカーゼ様ドメイン (Hel) が連結された 126 kDa のタンパク質と Met-Hel とポリメラーゼ様ドメイン (Pol) が連結された 183 kDa のリードスルー産物が翻訳されることが知られている<sup>3</sup>。そこで RdRp の N 末端に His<sub>6</sub>-tag を付与し, ウエスタンブロッティングを行ったが, 126 kDa と 183 kDa のどちらのタンパク質も検出することはできなかった。発現量が非常に少ない可能性があるため, RdRp にある *S. Cerevisiae* のレアコドンにメジャーコドンに同義置換する, N-結合型グリコシル化のコンセンサス配列 (Asn-Xaa-Ser/Thr) を置換 (Ala-Xaa-Ser/Thr) により削除することを試みた。しかし, ウエスタンブロッティングで RdRp の発現を確認することはできなかった。

Cp sgp 下流の標的タンパク質の発現に RdRp が寄与しているのかを確認するために RdRp の Met 内部に終始コドンを導入した変異体 (MT-stop), Hel 内部に終始コドンを導入した変異体 (Hel-stop), Hel と Pol の間にあるリードスルー終始コドンを TAC (Tyr) に変更した変異体 (Pol-Tyr) を作製した。これらを野生型 RdRp と置換し

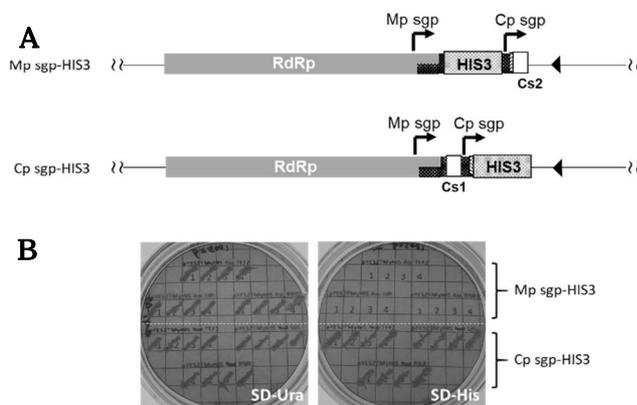


図 3. HIS3 の発現

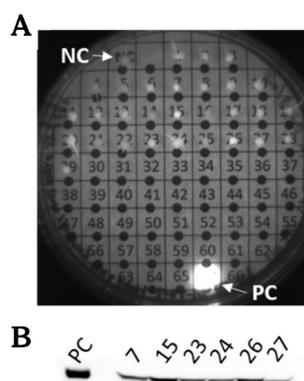


図 4. yEmcherry の検出



図 5. yEmcherry の検出

てベクターに組み込み, cp sgp 下の yEmcherry の発現を確認した。その結果, 野生型 RdRp の時と同程度 yEmcherry が発現されることが分かった(図 5)。このことから, RdRp の発現に関係なく cp sgp 下の ORF が翻訳されていることが示唆された。

#### (4) In vitro 転写 RNA の導入

上述の通り, RdRp が機能せず想定していた細胞質での RNA 複製が起こっていないことが示唆された。そのため, 構築した TMV 様ゲノムを in vitro で転写し 5' -cap 構造を付与した後, エレクトロポレーションで *S. Cerevisiae* に導入することを試みた。T7 プロモーター配列を付加したフォワードプライマーと TMV ゲノムの 3' 末端配列に相補的なリバースプライマーで TMV 様ゲノムを増幅し, これを鋳型に T7RNA ポリメラーゼで転写した。この際, 5' -cap アナログを共転写した。鋳型とした PCR 産物を DNase で分解し, カートリッジカラムで RNA を精製した。エレクトロポレーションの条件は文献 4 に従った。エレクトロポレーション後, 30℃ でインキュベーションし, 1 時間および 21 時間後に YPDS 寒天プレートに播いた。形成されたコロニーをいくつかピックアップし, オーバーナイトで液体培養して yEmcherry の発現を確認した。図 6 に示す通り yEmcherry が検出されたが, 初期に発現し蓄積した yEmcherry であるのか, TMV 様ゲノム RNA が安定なため, あるいは RdRp が機能し TMV 様ゲノム RNA が複製されているため yEmcherry が発現されているのかは現時点では不明である。

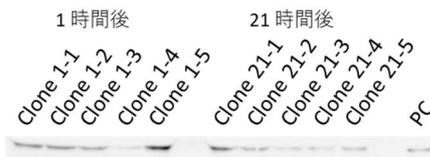


図 6. yEmcherry の検出

#### (5) まとめ

本研究で構築したベクターは TMV 由来の RdRp が発現されなくとも cp の sgp 下にコードされたタンパク質が発現されるという予想外の結果をもたらした。本来の宿主であるタバコのプロトプラストを使った研究では, RdRp の発現なしにはサブゲノム RNA が作られないことが報告されている<sup>5</sup>。今回の結果が cp sgp 上流にある約 4800 nts の RdRp コード配列をリボソームがスキャンニングしスルーしたためなのか, cp sgp 周辺配列が *S. Cerevisiae* にプロモーターあるいは Internal ribosome entry site (IRES) として認識されたためなのか, クローニングサイトを導入するために sgp に施した僅かな塩基置換によるものなのか, まったく別の理由からなのか, 今後詳細に解析を進める必要がある。このような解析はウイルスが宿主の翻訳装置を乗っ取る仕組みに新たな知見をもたらすと期待される。

#### < 引用文献 >

- Osman, T. A. M., et al., *J. Virol.*, **74**, 11671-11680 (2000)
- Sabine K.-R., et al., *Genetics*, **179**, 705-710 (2008)
- Chujo, T., et al., *Virus Res.*, **206**, 82-89 (2015)
- Searfoss, A. M., et al., *Methods Enzymol.*, **351**, 631-639 (2002)
- Lewandowski, D. J., and Dawson, W. O., *Virology*, **251**, 427-437 (1998)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----