

令和 2 年 6 月 23 日現在

機関番号：15501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K08198

研究課題名(和文) プロモーター域に配置したイントロンによる翻訳レベルのタンパク質発現増強機構の解析

研究課題名(英文) Analysis of enhanced protein production mediated by 5'-UTR intron

研究代表者

星田 尚司 (HOSHIDA, Hisashi)

山口大学・大学院創成科学研究科・准教授

研究者番号：00314823

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：イントロンによる遺伝子発現増強メカニズムを明らかにするために酵母 *Saccharomyces cerevisiae* とコドンが異なる2つのルシフェラーゼ遺伝子を用いて解析を行った。

発現増強をするためのイントロン配列には、スプライシングに必須の配列を有している必要があるものの、スプライシング自体はできなくても発現増強できることを明らかにした。発現増強を受ける遺伝子は、そのコーディング配列中の特定領域の配列に依存して発現が抑制されており、イントロンを与えることで増強を受けることがわかった。イントロンによる発現増強に必要な遺伝子、および、イントロンを持たない場合の発現抑制に関わる遺伝子を同定した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、発現増強にとって必ずしもスプライシングが必要ないことを明らかにした。また、発現増強機能の解明には関わる遺伝子を同定しそれら遺伝子の機能を明らかにすることが必要であり、本研究で発現増強および基本的な発現抑制に関与する遺伝子を同定したことで、IMEのメカニズムの一端が明らかになり、さらなる解明を進めることが可能になった。

現在、人工設計した合成遺伝子を用いた物質生産細胞の構築が盛んになってきている。遺伝子設計において、設計遺伝子が発現することは必須である。本研究で明らかにした発現抑制配列は、その完全な理解には至っていないものの、今後の遺伝子設計にとっての重要な知見である。

研究成果の概要(英文)：The essential sequence in an intron for, a sequence in a expressed gene related to, and genes involved in intron-mediated enhancement (IME) were analyzed in *Saccharomyces cerevisiae*.

Most of mutations in the sequences conserved among introns in *S. cerevisiae* lost IME. These conserved sequences are essential for splicing. However, a mutation in the 3' conserved sequence showed IME comparable to wild-type sequence. An RT-PCR analysis revealed that the 3' mutant was not spliced. In addition, other several deletions in a non-conserved region showed IME but were not spliced. These results indicated that splicing is not necessary for IME. The genes involved in IME including basal repression of gene expression were screened using a knockout strain collection of *S. cerevisiae*. As a result, several genes were identified. Some of the genes affected mRNA accumulation but the others did not, indicating that the genes function in different steps of gene expression process.

研究分野：分子細胞生物学

キーワード：イントロン IME スプライシング *Saccharomyces cerevisiae* ルシフェラーゼ 最適化コドン

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

真核生物ゲノムに存在するイントロンの機能は、進化における遺伝子の多様性への貢献と選択的スプライシングによる1遺伝子からの複数タンパク質の発現が最もよく知られている。これらに加え、動物や植物では遺伝子発現を増強することが知られており、**Intron-Mediated Enhancement (IME)** と呼ばれている。ところが、動植物と同じ真核生物でありながら、酵母のイントロンによる発現増強はほとんど扱われておらず、酵母でのイントロンの発現への関与、特に異種遺伝子に対しては **IME** の作用が明確ではなかった。私は酵母 *Saccharomyces cerevisiae* においてもイントロンが異種遺伝子の発現を増強することを明らかにした。同時に、5'-UTR にイントロンを持つプロモーターの発現能が高いこと、さらに既知の高発現プロモーターの3'末端と発現遺伝子の開始コドンの間にイントロンを挿入することで、分泌性ルシフェラーゼ **yCLuc** の発現を50倍にも増強できることを明らかにした(Hoshida et al., *Appl. Mol. Biotechnol.*, 2017)。一方で、関連する実験結果から3つの課題が浮かび上がった。

(1)イントロンによる発現増強は発現させる遺伝子に依存する。

赤色蛍光タンパク質 **yEmRFP** では発現増強効果が全くなかった。これはイントロンによる発現増強には、発現させる遺伝子側の配列も重要であることを示している。しかし、イントロンによる発現増強に必要な発現遺伝子側の配列要因は全く知られていない。

(2)増強に必要なイントロン側の配列因子はなにか。

増強は種々のイントロンで効果があった。これらのイントロンはスプライシングに必須の5'末端配列、ブランチポイント、3'末端配列がほぼ完全に保存されているが、それ以外の配列に保存性は無い。このことから、発現増強に真に重要な配列は何か、さらにそれがスプライシング必須配列と一致するののかという疑問が生じる。

(3)翻訳レベルで発現を増強する機構が存在する。

ガラクトース誘導性プロモーターの系では、**mRNA** 量を全く変化させないまま、タンパク質量が10倍に増加した。これは翻訳時には除去されているはずのイントロンが、翻訳効率を変化させることを示唆する。イントロンが翻訳効率を変える現象自体は、過去に植物や動物でいくつか報告があるが、その機構は全く解明されていない。

### 2. 研究の目的

- (1)発現増強に必要な発現遺伝子側の配列を決定し、増強のための遺伝子設計を可能にする。
- (2)発現増強に必須のイントロン中の配列を明らかにする。同時に発現増強にスプライシングが必須かどうかを決定する。
- (3)翻訳レベルで発現増強に関わるタンパク質の同定と翻訳レベルの増強機構を提案する。

### 3. 研究の方法

(1)発現増強に必要な発現遺伝子側配列の決定

分泌性ルシフェラーゼをコードする2つの異なる遺伝子配列を用いる。一つは酵母コドンに最適化した **yCLuc** 遺伝子で、もう一つは野生型の **CLuc** 遺伝子である。これら2つの遺伝子の塩基配列は異なるが、コードするアミノ酸配列は全く同じである。さらに、発現レベルとイントロンの効果が全く異なっており、**yCLuc** は **CLuc** に比べて発現が低いが、イントロンによる発現増強を受ける。これに対して **CLuc** は発現レベルが高いがイントロンによる増強は受けない。これら2つの遺伝子を組み合わせたキメラ遺伝子を構築し、その発現レベルとイントロンによる発現増強効果を評価した。これにより、発現の大小に関与する配列、および、イントロンによる増強に関与する配列を決定した。

(2)発現増強に必須のイントロン配列の決定と、スプライシングと発現増強の関係

①発現増強に必須のイントロン配列の決定

これまで発現増強に用いていたイントロン配列に変えて、短いイントロンに変えた時の増強効果を調べ、増強効果のあった短い配列からさらに削除した配列による **IME** の効果を評価し、発現増強に必要な、最短の配列を決定した。

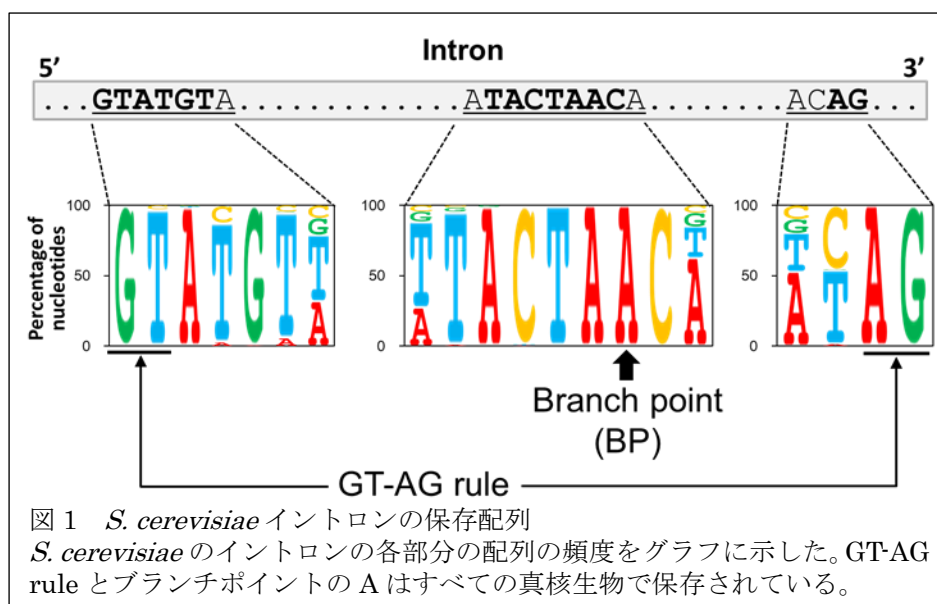
②スプライシングと発現増強の関係

イントロンの5'末端2塩基、ブランチポイントのA、3'末端2塩基は真核生物で完全に保存されており、スプライシングに必須の配列である。さらに、酵母 *S. cerevisiae* ではイントロンの5'末端6塩基、ブランチポイントを含む周辺8塩基、3'末端3塩基の保存性も非常に高い(図1)。これらの配列に変異を入れた時の増強のレベルを測定し、スプライシング必須配列が発現増強に必要なかどうかを明らかにした。

(3) 翻訳レベルで発現増強に関わるタンパク質の同定と翻訳レベルの増強機構を提案

**IME** 全般の機構自体もよくわかっていないが、翻訳レベルでの発現増強機構は全く未解明である。そこで、**IME** に必要な遺伝子群を探索し、これら遺伝子の産物であるタンパク質が転写レベルで影響しているか転写後のステップで影響しているかを調べた。遺伝子の探索には酵母遺伝子破壊株セットとこれに対する網羅的形質転換法(Hoshida et al., *Appl. Mol. Biotechnol.*, 2013)を用いた。さらに、これらのタンパク質について既に知られている機

能から、翻訳レベルの増強メカニズムを推定した。



#### 4. 研究成果

##### (1) 発現増強に必要な発現遺伝子側配列の決定

酵母コドン最適化 yCLuc 遺伝子と CLuc のキメラ遺伝子を作製し、これらをイントロンのある場合とない場合の2つの系で発現させ、分泌性ルシフェラーゼの活性としてそれぞれのルシフェラーゼ遺伝子の発現、および IME の効果を調べた。まずは、両遺伝子を組換える位置を大きく変化させ、活性評価の後、さらに領域を絞っていった。その結果、以下のことが明らかとなった。

- ① yCLuc が通常は発現抑制を受けており、イントロンによってその抑制が解除される。
- ② yCLuc の N 末端側に存在する 50 bp 程度の領域が抑制を起こしている。
- ③ その 50 bp の抑制配列の一部でも、活性低下がみられ、CLuc と比べ異なる塩基が多くなるほど抑制の程度が大きくなる。

これまでから、IME を受ける遺伝子とそうでない遺伝子があることは知られていたものの、同じタンパク質をコードしている遺伝子では知られておらず、キメラ遺伝子を利用した解析はできなかった。本研究で同じルシフェラーゼをコードする2つの遺伝子で IME が異なったことにより、IME を引き起こす配列がその遺伝子の一部であることが明らかになった。また、IME は、通常は発現抑制を受けている遺伝子の発現を増強していることが明らかとなった。

##### (2) 発現増強に必須のイントロン配列の決定と、スプライシングと発現増強の関係

###### ① 発現増強に必須のイントロン配列の決定

発現増強に必須のイントロン配列を決定するために、イントロンの削除解析を行った。まず、*S. cerevisiae* が持つイントロンから 100 bp より短いイントロンを集め、これらを 5'-UTR に配置した時の発現増強効果を調べた。その結果いずれのイントロンでも増強効果が見られた。これらのイントロンから *QCR10* 遺伝子のイントロン (63 bp) を選び、削除解析を行った。その結果、26 bp が IME を引き起こす最小のイントロン配列であることが分かった。

###### ② スプライシングと発現増強の関係

スプライシングと発現増強の関係を調べるために、*QCR10* イントロン中の真核生物での保存配列及び *S. cerevisiae* での保存配列に変異を入れた時の IME を解析した (図 2)。その結果、5'-GT、ブランチポイントの A、3'-AG のどの変異においても IME が見られなくなったことから、IME にとってスプライシングは必須であるように思われた。なお、これらの変異を導入した時に、*QCR10* イントロンのスプライシングができていないことも逆転写 PCR で確認した。また、*S. cerevisiae* で保存されている 5'配列に変異を入れた場合にも IME が起こらなくなった。

一方で、先に決定した最小のイントロン配列において、保存配列に変異を導入したところ、5'-GT、ブランチポイントの A、*S. cerevisiae* で保存されている 5'配列の変異では IME はほとんど起こらなくなった。これに対して、3'-GT に変異を入れた場合には、IME を示す配列が存在した。そこで、この変異配列のスプライシングを調べてみると、スプライシングされていないことが分かった。この配列の他にもスプライシングを受けずに IME を起こす配列を得ており、IME にとってスプライシングは必ずしも必要ではないことが明らかになった。5'-UTR にイントロンを配置したことでスプライシングが生じなくても、ルシフェラーゼを

発現させられることで、スプライシングできない配列による IME の効果を明らかにできた。

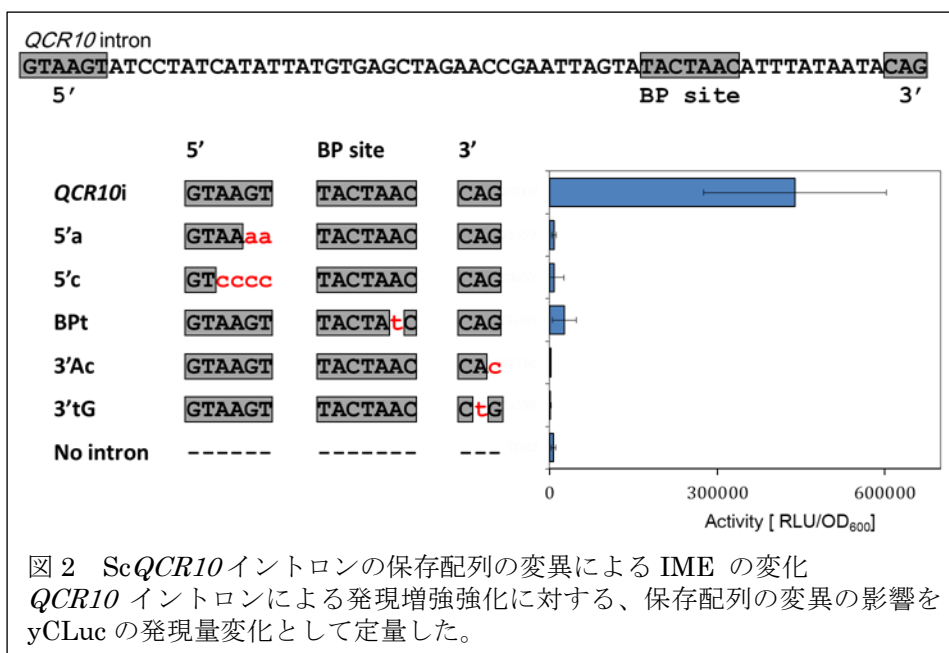


図 2 ScQCR10イントロンの保存配列の変異による IME の変化  
 QCR10 イントロンによる発現増強強化に対する、保存配列の変異の影響を  
 yCLuc の発現量変化として定量した。

### (3) 翻訳レベルで発現増強に関わるタンパク質の同定と翻訳レベルの増強機構の提案

IME の機構解析, 特に翻訳レベルでの機構解析に向けて, 酵母遺伝子破壊株セットにイントロンを持つ yCLuc 発現プラスミドを形質転換し, ルシフェラーゼ活性が低下する株を探索した。活性が低下した株の破壊遺伝子が IME を引き起こしている可能性が考えられる。その結果, 4464 株の形質転換体を得られ, 再活性測定, 再形質転換, および破壊遺伝子の相補実験を行った結果, ルシフェラーゼ活性が約半分に低下した株を得た。この株でイントロンを持たない yCLuc を発現させた場合には活性にほとんど変化がなかったことから, この遺伝子が IME に関与していることが明らかになった。

また, このスクリーニング過程で, 予想に反して活性が高まる株もいくつか得られた。これらの破壊株でイントロンを持たない yCLuc を発現させると, イントロンを与えていないにもかかわらず活性が大きく上昇し, 野生株でイントロンを与えた場合と同レベルの 60 倍程度にまで活性を高める破壊株も存在した。これらの遺伝子は, yCLuc の発現抑制に関与していると考えられたことから, ほかの発現抑制にかかわる遺伝子を得るために, イントロンを持たない yCLuc 発現ベクターを遺伝子破壊株セットに導入し, 得られた形質転換体のルシフェラーゼ活性の上昇を調べた。スクリーニング後, 同様に再形質転換等を行い最終的に, yCLuc の発現を高める 14 株を得ることができた。

これら計 15 株での mRNA 量を測定した結果, IME に関与する 1 遺伝子では, 破壊株において mRNA 量が低下しておらず, むしろ 1.5 倍程度に増加していた。つまり, この遺伝子は翻訳レベルで IME に関与していると考えられる。しかし, この遺伝子の既知の機能は転写に関与するものであったことから, 未知の機能を有している可能性が示唆された。さらに, yCLuc の発現抑制に関与する 14 株中, 6 株では mRNA 量にほとんど増加がみられなかった。つまり, これらの遺伝子も翻訳レベルで yCLuc の発現を抑制していると考えられる。既知の遺伝子機能を調べてみるとリボソーム関連タンパク質, RNA 輸送, タンパク質分解の機能を持つタンパク質が含まれていたことから, yCLuc の発現抑制が, 転写以降で引き起こされていることが考えられた。つまり, イントロンはこれらの遺伝子による抑制を解除していることになるので, 翻訳レベルで IME が機能していると推定される。これらの遺伝子の機能を詳細に解析することで, 配列依存的な遺伝子発現の抑制機構及び IME の機構を明らかにすることができる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Hisashi Hoshida, Satoshi Goto, Masaki Kondo, Rinji Akada
2. 発表標題 Mutational analysis of 5' -UTR intron revealed that splicing is not necessary for intron-mediated expression enhancement in <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .
3. 学会等名 Yeast Genetics Meeting (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 後藤聡志, 近藤真樹, 星田尚司, 赤田倫治
2. 発表標題 酵母 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> においてタンパク質発現を増強させるイントロン配列の解析
3. 学会等名 日本農芸化学会2018年度大会, 3A08a02, 3月17日, 名古屋市
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 菊田浩希, 星田尚司, 赤田倫治
2. 発表標題 イントロンによる発現増強を受けるルシフェラーゼコーディング領域内配列の解析
3. 学会等名 第71回日本生物工学会, 2019年9月18日
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 菊田浩希, 星田尚司, 赤田倫治
2. 発表標題 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> におけるイントロンによるタンパク質発現増強に関する遺伝子のゲノムワイドスクリーニング
3. 学会等名 日本農芸化学会2020年度福岡大会, 2020年3月5日
4. 発表年 2020年

〔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
--	---------------------------	-----------------------	----