

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 9 日現在

機関番号：82626

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26450111

研究課題名(和文) *O. minuta* 酵母の基礎生物学を進めるための遺伝学的基盤解析系の確立研究課題名(英文) Molecular breeding of the yeast *Ogataea minuta* to which genetical methods are applicable

研究代表者

横尾 岳彦 (YOKO-O, Takehiko)

国立研究開発法人産業技術総合研究所・創薬基盤研究部門・主任研究員

研究者番号：60358306

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：異種タンパク質生産に適したメタノール資化性酵母 *Ogataea minuta* において、自在な遺伝学的解析を可能とする系の構築を試みた。接合型を決定する MAT 遺伝子座位の解析を行ったところ、MAT 遺伝子座の外側に一組の逆向き反復配列が存在し、この反復配列に挟まれた DNA 領域が反転することにより接合型変換が生じることを明らかにした。また、本種が二倍体として栄養増殖できることを明らかにした。さらに、*O. minuta* の自律複製配列の候補となる DNA 断片を 12 種類取得することに成功した。

研究成果の概要(英文)：*Ogataea minuta* is a methylotrophic yeast species. As the structure of glycans in *O. minuta* is similar to that in *Saccharomyces cerevisiae*, we have chosen this yeast species as a host for the production of therapeutic glycoproteins. To refine the production system, we are investigating mechanisms of mating and sporulation in *O. minuta*, which enable genetical analysis in this species, and developing plasmids propagated in *O. minuta* cells. We determined DNA sequence around MAT locus in *O. minuta*, and found that two MAT loci were surrounded by a couple of inverted repeat sequences, as reported in *Ogataea (Hansenula) polymorpha*. We clarified that the mating type is switched by inversion of the chromosomal region between two MAT loci. To identify autonomous replicating sequence (ARS) in *O. minuta*, we constructed plasmid library from *O. minuta* genomic DNA and looked for plasmids that were retained without integrating into genomic DNA. As a result, we isolated 12 candidate sequences for ARS.

研究分野：遺伝学、分子生物学

キーワード：*Ogataea minuta* メタノール資化性酵母 接合 胞子形成 自律複製配列 プラスミド GPI アンカー

1. 研究開始当初の背景

メタノールを唯一の炭素源として利用できるメタノール資化性酵母は、メタノール代謝、ペルオキシソームの生成と分解、窒素同化等の生命現象を理解するための、良いモデル系の一つとして用いられてきた。加えて、異種タンパク質生産の宿主として、応用面においても重要な地位を占めている。大腸菌や哺乳類の培養細胞と比較して、メタノール資化性酵母で異種タンパク質生産を行わせる利点としては、(1)メタノール存在下で発現誘導されるきわめて強力なプロモータが存在すること、(2)高密度培養が可能なこと、(3)培地が安価であること、(4)(大腸菌との比較で)糖タンパク質の生産が可能であること、等が挙げられる。これらの利点により、抗体医薬等のバイオ医薬品を生産させるための宿主としても、十分なポテンシャルを有している。

申請者らの研究室では、メタノール資化性酵母の一種である *Ogataea minuta* を用いて、異種タンパク質生産系の開発を試みてきた。異種タンパク質生産のためのメタノール酵母としては、*Pichia pastoris* が有名であるが、*O. minuta* は *P. pastoris* と比較して、出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* により近縁で、*S. cerevisiae* における膨大に蓄積された研究基盤や基礎生物学的知見が援用可能である。申請者らの研究室ではこれまでに、*O. minuta* に栄養要求性マーカを付与し、また、プロテアーゼ遺伝子の破壊株や、酵母型の糖鎖付加を抑制した株を分子育種することにより、ヒト抗体やヘキソサミニダーゼをモデルとした異種タンパク質生産の有用性を報告してきた (Kuroda *et al.*, 2006, 2007, 2008; Akeboshi *et al.*, 2007, 2009)。

しかし、*O. minuta* における異種タンパク質生産系の開発を進めているうちに、問題点も見えてきた。メタノールで異種タンパク質遺伝子の発現誘導を行うと、おそらくメタノールによるストレスにより、異種タンパク質の生産性が低下するケースが出てきた。このメカニズムを知り、解決に導くには、*O. minuta* という酵母種の基礎生物学的知見を着実に集積することが必須と考えられた。具体的には、タンパク質の品質管理、輸送および分泌メカニズム、小胞体ストレス応答等についてである。すなわち、研究開始時点において、応用研究から基礎研究へと立ち返ることがきわめて重要な状況であった。

また、*O. minuta* をメタノール存在下で培養すると、細胞表面に局在するグリコシルホスファチジルイノシトール (GPI) アンカー型タンパク質をコードする遺伝子群の発現が上昇することがトランスクリプトーム解析によって判明したが、基礎生物学的知見の不足により、その生理的意義も不明のままであった。

2. 研究の目的

基礎生物学的知見を充実させるには、株同士を掛け合わせてその子孫を得たり、細胞内にプラスミドを導入したりするような、遺伝学的手法がきわめて有効かつ不可欠であることは、出芽酵母における華々しい研究成果を見ても明らかである。しかしながら、現在研究に用いている *O. minuta* 株における接合・胞子形成が可能な生理的条件は不明であり、順(古典)遺伝学的解析の手法は確立されていなかった。また、染色体上に組み込まずとも使えるようなプラスミドベクターも存在しなかった。したがって、遺伝学的手法を駆使した研究は、研究開始時点では困難であった。

基礎に立ち返り、*O. minuta* の生物学を着実に進めるためには、遺伝学的解析を行うための各種ツールの拡充がきわめて重要な状況であった。本研究の目的は、*O. minuta* において基礎生物学を進めるための遺伝学的基盤解析系を確立することである。

3. 研究の方法

(1) 有性生殖が可能な *O. minuta* 株の確立

現在用いている *O. minuta* NBRC 10746 株を炭素源あるいは窒素源飢餓環境下に置き、接合・胞子形成が起こるかどうかを観察する。接合した場合、そのまま減数分裂することなしに二倍体として増殖が可能であるかどうかを調べる。

(2) 自律複製型プラスミドの構築

O. minuta NBRC 10746 株のゲノム DNA よりプラスミドライブラリを作製し、*O. minuta* 細胞内で、染色体上に組み込まれることなく自律的に複製可能なプラスミドを検索する。

(3) 株やプラスミドの有用性の検証

O. minuta NBRC 10746 株の GPI 生合成系を題材として、項目(1)(2)で取得された株やプラスミドの有用性を検証する。具体的には、これまで遺伝子破壊株が得られなかった、GPI の脂質リモデリングに関与する遺伝子 *PER1* の破壊株取得を試み、その表現型のプラスミドによる相補が可能か等について検討する。

4. 研究成果

(1) 有性生殖が可能な *O. minuta* 株の確立

まず、*O. minuta* NBRC 10746 株が a 型もしくは b 型のどちらの接合型であるかを、RT-PCR 法により調べた。その結果、本株では *MATa1* 遺伝子が発現しており、a 型であることがわかった。いっぽう、NBRC 10746 株を改変して作製した YR11 株では、*MATa1*、*MAT 1*、*MAT 2* のすべてが発現しているという、一見矛盾した結果が得られた(図 1)。近縁種 *Ogataea polymorpha* における接合型変換に関する情報をもとに、これらの株の *MAT* 遺伝子座付近の塩基配列を詳細に検討

したところ、*O. polymorpha* と同様、*O. minuta* では *MAT* 遺伝子座を挟むように逆向き反復配列が存在し、この箇所逆位を生じることにより接合型の相互変換が起こることが明らかになった。RT-PCR の鋳型となる DNA を単離するための培養時に、YRI1 株では接合型変換が生じた集団が出現した結果、先述の結果になったと考えられる。

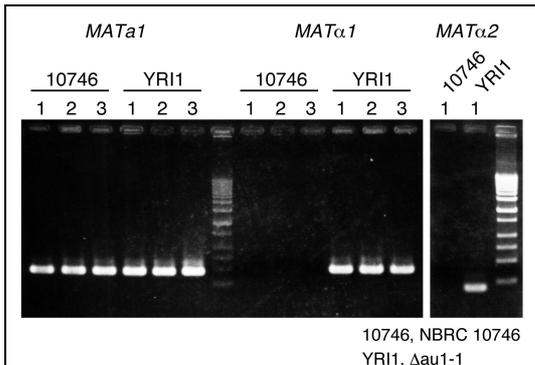


図 1 NBRC 10746 株および YRI1 株 (*ura3 ade1*) における *MATa1*、*MAT α1*、*MAT α2* の発現状況。RT-PCR により増幅された DNA 断片をアガロースゲル電気泳動により解析した結果を示す。

O. minuta NBRC 10746 株が接合・胞子形成を行う条件を探するため、ゲノム上の *TDH1* 遺伝子座にハイグロマイシン B 耐性遺伝子を挿入した株と、ゲノム上の *AOX1* 遺伝子座にゼオシン耐性遺伝子を挿入した株を作製した。これらの株を様々な培地の上で混合し、いくつかの温度条件下に置いた後、ハイグロマイシン B かつゼオシン耐性の株が得られるかを調べたところ、2% モルトエキス培地上に 25℃ で置いた場合に両薬剤に耐性の細胞が得られ、この条件を用いれば効率的に接合・胞子形成を起こすことができることを明らかにした。

NBRC 10746 株と同一バックグラウンドで型の株を取得することを試みた。種々の条件を試した結果、胞子形成条件においた細胞を 50℃ で 10 分処理することにより、α 型株を取得することに成功し、NBRC 10746α と命名した。熱を加えることにより、栄養細胞が死滅し、高温耐性である胞子が濃縮されたためと考えられる。

O. minuta NBRC 10746α 株と、ゼオシンおよびハイグロマイシン B の二重薬剤耐性を利用することにより、NBRC 10746 株における二倍体を取得することに成功した。この株は、*TDH1* 遺伝子座に異なる薬剤耐性遺伝子を挿入した場合に得ることができた (図 2)。

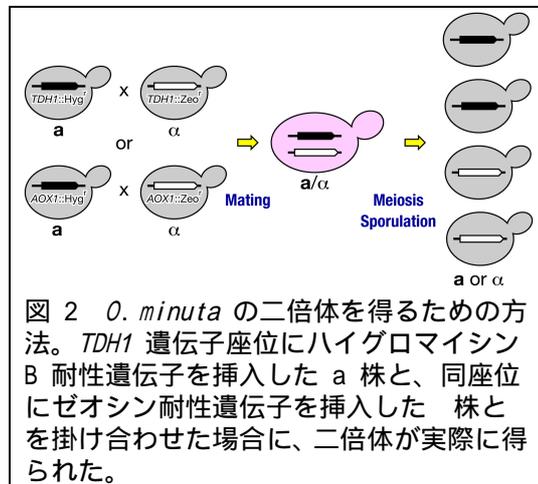


図 2 *O. minuta* の二倍体を得るための方法。*TDH1* 遺伝子座にハイグロマイシン B 耐性遺伝子を挿入した a 株と、同座位にゼオシン耐性遺伝子を挿入した α 株とを掛け合わせた場合に、二倍体実際に得られた。

二倍体株は一倍体に比較して約 1.3 倍の大きさであり、倍增時間や形態は一倍体株とほぼ同一であった。具体的には、YPD 培地、30℃ における倍增時間は約 120 分、扁平率は約 90% であった。また、この二倍体株が効率よく胞子形成を行わせる条件を見出し (図 3)、マイクロマニピュレータによる胞子の四分子解析に成功した。これより、*O. minuta* においても遺伝学的解析手法が適用可能であることを明らかにした。

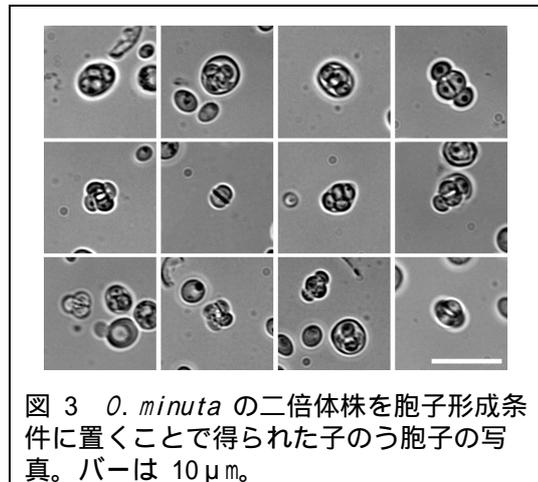


図 3 *O. minuta* の二倍体株を胞子形成条件に置くことで得られた子の胞子の写真。バーは 10 μm。

(2) 自律複製型プラスミドの構築

O. minuta ゲノム上の自律複製配列 (ARS) をプラスミドに挿入することにより、染色体上に組み込まれることなしに酵母細胞内で複製可能なプラスミドを構築することができる。これを実現するため、*O. minuta* のゲノム DNA を染色体組み込み型プラスミドに挿入したライブラリを作製した。具体的には、*O. minuta* NBRC 10746 株からゲノム DNA を調製し、これを制限酵素 BamHI で部分分解し、分解した DNA 断片のうち、3~4 kb に渡る長さのものを染色体組み込み型プラスミド pRS306 (*O. minuta* でも機能する、*S. cerevisiae* 由来の *URA3* マーカを持つ) に挿入することにより、プラスミドライブラリを作製した。このライブラリを、*ura3* 変異を持つ *O. minuta* 株に導入し、プラスミド

を染色体に組み込むことなしに保持している株をスクリーニングした。得られた転換体から重複しているものを除いたところ、最終的に、ARS の候補となる DNA 断片を 12 種類得ることができた (図 4)。

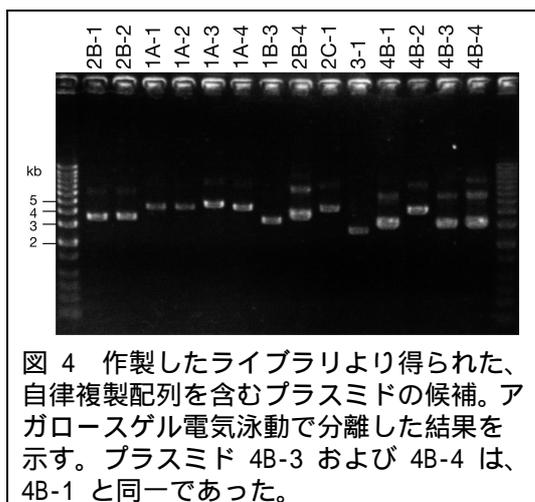


図 4 作製したライブラリより得られた、自律複製配列を含むプラスミドの候補。アガロースゲル電気泳動で分離した結果を示す。プラスミド 4B-3 および 4B-4 は、4B-1 と同一であった。

取得した自律複製配列 (ARS) の候補を含むプラスミドの保持率を測定した。多くのプラスミドは 24 時間培養すると保持率は 5% 程度にまで低下したが、ときおり 100% 近い保持率となる場合があることを見出した。環状プラスミドであってもゲノム上にに取り込まれるイベントが生じ、このときに保持率がほぼ 100% を示すと考えられる。また、1 細胞あたりのプラスミドのコピー数を調べたところ、ARS の種類にもよるが、おおむね 1~3 コピー程度であることが明らかになった。

(3) 株やプラスミドの有用性の検証

取得した ARS 保有プラスミドの有効性を調べるため、GPI の脂質リモデリングに關与する *PER1* 遺伝子の破壊を試みた。その結果、*O. minuta* において *per1* 遺伝子破壊株は重篤な増殖遅延を示すことを明らかにした。この増殖遅延の表現型は、*O. minuta* の ARS および *PER1* 遺伝子 (*S. cerevisiae* および *O. minuta* 由来) が挿入されたプラスミドを導入することにより、相補されることを見出した (図 5)。これにより、ARS を含むプラスミドが *O. minuta* において実用可能であることが明らかとなった。*per1* 遺伝子破壊株の増殖遅延は、培地に 0.7 M ソルビトールを加えて浸透圧保護効果を図ることにより回復した。このことより、*per1* 破壊株では、*S. cerevisiae* の *per1* 破壊株と同様、細胞壁が脆弱になっていることが示唆された。



図 5 *S. cerevisiae* および *O. minuta* の *PER1* 遺伝子導入による、*O. minuta* *per1* 破壊株の表現型の相補。プレートの下半分が *PER1* 遺伝子導入株 (左から順に、*O. minuta* *PER1*、*S. cerevisiae* *PER1*-3HA タグ、*S. cerevisiae* *PER1* を導入した株) である。右上がプラスミドを導入していない *per1* 破壊株 (30 °C では増殖できない)。

O. minuta NBRC 10746 株には、細胞壁の主要構成物質であるグルカンの架け替えに關与する GPI アンカー型タンパク質をコードする *GAS1* 遺伝子が、ゲノム上に 2 コピー存在することを見出し、これらを *GAS1A*、*GAS1B* と命名した。*GAS1A* および *GAS1B* は両方とも栄養増殖期に発現しているが、*per1* 破壊株においては *Gas1A* および *Gas1B* タンパク質はともに細胞膜に正しく局在できず、しかも、*Gas1A* と *Gas1B* は *per1* 破壊株においてそれぞれ異なるパターンの誤局在を示すことを見出した。すなわち、*Gas1A* タンパク質は培地中に漏出する一方、*Gas1B* タンパク質は液胞にミスソートされた。これらの結果より、*per1* 破壊株において細胞壁が脆弱になる原因は、*Gas1p* を始めとする GPI アンカー型タンパク質が正しく局在できないためと推察された。

引用文献

- Akeboshi *et al.*, 2007, *Appl. Environ. Microbiol.* 73, 4805-12.
- Akeboshi *et al.*, 2009, *Glycobiology* 19, 1002-9.
- Kuroda *et al.*, 2006, *FEMS Yeast Res.* 6, 1052-62.
- Kuroda *et al.*, 2007, *FEMS Yeast Res.* 7, 1307-16.
- Kuroda *et al.*, 2008, *Appl. Environ. Microbiol.* 74, 446-53.

5. 主な発表論文等
(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 1 件)

横尾岳彦、GPI アンカー生合成系における新規バイパス経路、化学と生物、査読有、52 巻、2014、pp. 283-284
DOI: 10.1271/kagakutoseibutsu.52.283

〔学会発表〕(計 10 件)

小松崎亜紀子、吉原瑛梨奈、千葉靖典、横尾岳彦、酵母 *Ogataea minuta* におけるプラスミドおよび二倍体細胞作出の試み、第 16 回産総研・産技連 LS-BT 合同研究発表会、2017 年 1 月 31 日、産業技術総合研究所 (茨城県つくば市)

横尾岳彦、酵母 *Ogataea minuta* における遺伝学的基盤解析系の確立、寄附講座成果報告シンポジウム「メタノール資化性酵母研究の展望」(招待講演)、2017 年 1 月 27 日、大阪大学銀杏会館 (大阪府吹田市)

小松崎亜紀子、吉原瑛梨奈、千葉靖典、横尾岳彦、酵母 *Ogataea minuta* におけるプラスミドおよび二倍体細胞作出の試み、第 39 回日本分子生物学会年会、2016 年 12 月 2 日、パシフィコ横浜 (神奈川県横浜市)

小松崎亜紀子、千葉靖典、横尾岳彦、Mating-type switching in the methylotrophic yeast *Ogataea minuta*, 14th International Congress on Yeasts (国際学会)、2016 年 9 月 12 日、淡路夢舞台国際会議場 (兵庫県淡路市)

横尾岳彦、Glycosylation mechanisms in yeasts, Glycobiology Forum(招待講演)、2016 年 1 月 13 日、無錫 (中国)

小松崎亜紀子、千葉靖典、横尾岳彦、遺伝学的解析が可能な *Ogataea minuta* 細胞株構築の試み、BMB2015、2015 年 12 月 1 日、神戸ポートアイランド (兵庫県神戸市)

小松崎亜紀子、千葉靖典、横尾岳彦、遺伝学的解析が可能な *Ogataea minuta* 細胞株構築の試み、酵母遺伝学フォーラム第 48 回研究報告会、2015 年 9 月 1 日、広島大学 (広島県東広島市)

横尾岳彦、酵母と糖鎖の話、第 2 回未来生物学研究会 (招待講演)、2015 年 6 月 14 日、東京理科大学森戸記念館 (東京都新宿区)

伊藤理恵、鈴木健之、津田将志、市川公久、野中浩一、横尾岳彦、千葉靖典、メタノール資化性酵母 *Ogataea minuta* でのタンパク質発現における各種ペプトンの効果、日本農芸化学会 2015 年度大会、2015 年 3 月 28 日、岡山大学津島キャンパス (岡山県岡山市)

横尾岳彦、小松崎亜紀子、千葉靖典、遺伝学的解析が可能な *Ogataea minuta* 細胞株構築の試み、第 14 回産総研・産技連 LS-BT 合同研究発表会、2015 年 2 月 3 日、産業技術総合研究所 (茨城県つくば市)

〔図書〕(計 1 件)

成松久、鈴木芳典、木下フローラ聖子、鹿内俊秀、藤田典昭、佐藤隆、榎谷内晶、横尾岳彦、安形清彦、久保田智巳、野呂絵里花、Springer International Publishing, A practical guide to using glycomics databases、2017、pp. 163-175

〔産業財産権〕

出願状況 (計 1 件)

名称: メタノール資化性酵母の自律複製型プラスミド
発明者: 横尾岳彦、小松崎亜紀子、千葉靖典、野中浩一、馬場悟史
権利者: 同上
種類: 特許
番号: 特願 2017-013666
出願年月日: 2017 年 1 月 27 日
国内外の別: 国内

6. 研究組織

(1) 研究代表者

横尾 岳彦 (YOKO-O, Takehiko)
国立研究開発法人産業技術総合研究所・創薬基盤研究部門・主任研究員
研究者番号: 60358306

(2) 研究分担者

千葉 靖典 (CHIBA, Yasunori)
国立研究開発法人産業技術総合研究所・創薬基盤研究部門・上級主任研究員
研究者番号: 00357500