

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年5月11日現在

機関番号：15501
 研究種目：若手研究(B)
 研究期間：2009～2011
 課題番号：21780076
 研究課題名（和文） 分泌解析モデルタンパク質を用いた分泌活性ハプロ不全を示す必須遺伝子の網羅的解析
 研究課題名（英文） Genome-wide screening of essential genes showing haplo-insufficiency in secretory protein production in yeast
 研究代表者
 星田 尚司（HOSHIDA HISASHI）
 山口大学・大学院医学系研究科・准教授
 研究者番号：00314823

研究成果の概要（和文）：分泌性ルシフェラーゼ遺伝子を用いて、*Saccharomyces cerevisiae* の必須遺伝子ヘテロ破壊株において2～3倍分泌生産を高める遺伝子破壊株を7株同定した。これら7つの破壊株のうち6つがRNA関連遺伝子の破壊株であった。また、塩基配列は異なるが同一のアミノ酸配列をコードしている異なる2つのルシフェラーゼ遺伝子を用いた解析により、コーディング配列の一部が発現量を大きく変化させることが分かった。

研究成果の概要（英文）：To identify the genes affecting heterologous gene expression in *Saccharomyces cerevisiae*, heterozygous knockout strains of essential genes were used. As a result, 7 mutants that enhance expression of a secretory luciferase were identified. On the other hand none of knockout strain showed significantly lower expression except for weak-growth mutants. Six genes among the knockout strains were involved in RNA metabolism.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2010年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2011年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：遺伝子工学

科研費の分科・細目：農芸化学・応用微生物学

キーワード：分泌性タンパク質生産、必須遺伝子、ハプロ不全、*Saccharomyces cerevisiae*

1. 研究開始当初の背景

組換え体によるタンパク質生産では分泌生産が好まれるものの、高発現プロモーターを用いても分泌生産の困難なタンパク質があることがよく知られている。分泌生産量を低下させている原因を突き止めれば、宿主の遺伝子操作や目的タンパク質への変異導入により、分泌生産困難なタンパク質であっても大量に生産できるようになる。これまで、

酵母 *Saccharomyces cerevisiae* 非必須遺伝子破壊株を用いて異種タンパク質であるアミラーゼ、ラッカーゼなどの分泌生産を網羅的に解析したところ、分泌生産活性を変化させた破壊株は存在したものの、その変化は大きくないものがほとんどであったことから、分泌生産に大きく影響を及ぼしている遺伝子は必須遺伝子にあるという考えに至った。従って、組換え体によるタンパク質分泌生産

量の増大のためには、組換えタンパク質生産における必須遺伝子の効果を調べる必要がある。

2. 研究の目的

本研究では、*S. cerevisiae* 必須遺伝子ヘテロ破壊株において、タンパク質分泌生産に影響を及ぼす遺伝子を探索することで、分泌生産に必要な必須遺伝子を明らかにする。さらに、翻訳、構造形成、輸送、修飾、タンパク質品質管理など分泌生産経路解析でモデルとなる分泌タンパク質を作成し、それらを用いて分泌生産能力に影響を及ぼす必須遺伝子ヘテロ破壊株での発現を調べ、これら必須遺伝子の遺伝子機能を解明することを目的とした。

3. 研究の方法

必須遺伝子は生存に必須の遺伝子であるので完全な破壊株を利用することはできない。しかし、2倍体の必須遺伝子の一方を破壊しただけでも表現型が現れることが知られている。*S. cerevisiae* では遺伝子破壊株セットが構築されており、必須遺伝子についても2倍体を用いて一方の破壊株、つまりヘテロ破壊株を利用することができる。タンパク質の分泌生産に重要な遺伝子や細胞機能を明らかにするには全遺伝子を対象とした網羅的解析が有効である。そこで本研究では、約1100株からなる*S. cerevisiae* 必須遺伝子ヘテロ破壊株セットを用いて、タンパク質分泌生産に重要な必須遺伝子を探索することにした。

異種タンパク質として発現させる遺伝子には分泌性ルシフェラーゼ yCLuc を用いた。ルシフェラーゼアッセイ系は酵素活性のリニアリティーのある範囲が広く、活性測定も96ウェルプレートベースで行えるのでハイスループット実験に適している。yCLuc 遺伝子を *S. cerevisiae* の *TDH3* プロモーター下流に位置するように YCp タイプのプラスミドに挿入した。遺伝子を染色体上に組込んで発現させる場合には、*S. cerevisiae* BY4743 株の *ura3Δ10* に1コピー挿入した。

また、1100株へ効率的に異種タンパク質発現ベクターを導入するために、ハイスループット形質転換法を用いた。この方法は96ウェルプレートで効率よく遺伝子導入できるので網羅的解析に有効な手段である。形質転換酵母は YPD 液体培地 (1%酵母エキス、2%ペプトン、2%グルコース) またはウラシル欠損合成培地 (プラスミド形質転換体の場合) で 28℃ で 24 時間培養し、培養上清を酵素活性の測定に用いた。

4. 研究成果

(1) 組換えタンパク質の分泌生産に関わる

必須遺伝子の探索

S. cerevisiae 必須遺伝子ヘテロ破壊株 1143 株に対してルシフェラーゼ発現プラスミドを形質転換し形質転換体をウラシル欠損培地で選択した。形質転換体が培養液中に生産したルシフェラーゼ活性をマイクロプレートリーダーを用いて定量化した。図1にその1例を示した。その結果、親株 BY4743 に比べて高い発現を示した59株と、発現の低かった70株を決定した。

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	3732	-	5018	2750	3423	2305	2408	2006	2375	3029	3214	2825
B	3052	3888	4938	6388	3461	3730	2438	3100	2653	3811	3224	1174
C	3347	5552	4614	4126	3442	2933	6016	3292	3933	3526	5277	2832
D	3018	3192	3713	4325	3743	2917	2195	4574	3441	2718	2827	3141
E	2582	2682	2859	3267	3227	1902	2922	3314	3661	3709	3720	7
F	2116	2692	2916	2822	8519	2805	4860	3336	3833	2451	4391	7
G	4367	3094	2714	3196	2917	3952	2728	2753	2576	3066	-	4501
H	3948	6175	3423	3377	-	2382	2778	2465	3064	4159	3609	12
	0-1999		2000-4999			5000-						

図1 必須遺伝子ヘテロ破壊株のルシフェラーゼ活性変化の例 (プレート番号1)

本研究で用いたヘテロ遺伝子破壊株は必須遺伝子の破壊株であるため、遺伝子破壊が細胞の増殖を大きく低下させる可能性が高い。従って、発現量の低い株には、細胞の増殖そのものが阻害されたことで発現が低下しているものも含まれていると考えられた。そこで発現量の低かった株の YPD 培地での増殖を調べたところ、22株はほとんど増殖しなかった。さらに残りの48株に対してもう一度形質転換を個別に行い、異なる3コロニーを用いて活性を測定しなおしたところ、BY4743 株と同程度の活性を示した。つまり、増殖に悪影響を与えるヘテロ遺伝子破壊を除いて、発現量の低下する株はないことが明らかになった。

これまでの、非必須遺伝子破壊株を用いた網羅的スクリーニングにおいて選択された発現量の高い遺伝子破壊株にはプラスミドの安定性またはコピー数の増加が発現量の増加の原因であると考えられる破壊株が存在した。本研究において発現量が増加したヘテロ破壊株の中にもプラスミドのコピー数増加が原因の株も存在する可能性が考えられた。そこで発現遺伝子コピー数が変化しないように、ルシフェラーゼ発現カセットを酵母の染色体上に組込んだ形質転換体を作成した。59株について少なくとも5つの形質転換体を得、これらのルシフェラーゼ分泌生産量を調べた (図2)。その結果、9株で BY4743 株よりも高い活性を示した。これらの9株を用いてもう一度ルシフェラーゼ活性を定量化したところ7株が2~3倍高い活性を示した。これら高い発現を示した遺伝子の

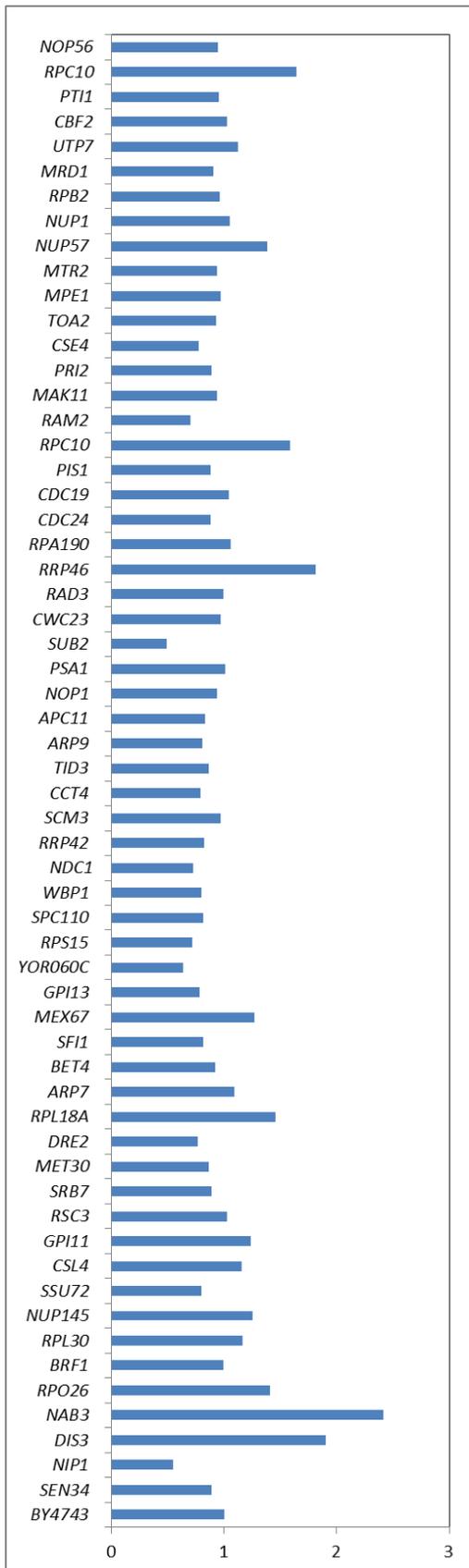


図2 染色体上へ発現カセットを導入したヘテロ破壊株のルシフェラーゼ活性 (BY4743の活性を1として示した。) 機能を Saccharomyces Genome Database で調べると表1の通りであった。

表1 破壊遺伝子の機能

遺伝子	機能
<i>DIS3</i>	エキソソームコア複合体サブユニットタンパク質
<i>MEX67</i>	mRNA の核外輸送に関わるポリ A RNA 結合タンパク質
<i>NAB3</i>	一本鎖 RNA 結合タンパク質
<i>NUP57</i>	核孔複合体の必須サブユニットタンパク質
<i>RPC10</i>	RNA ポリメラーゼサブユニットタンパク質
<i>RPL18A</i>	リボソームラージサブユニット構成タンパク質
<i>RRP46</i>	エキソソーム非触媒活性サブユニットタンパク質

この結果から、*S. cerevisiae* におけるルシフェラーゼの発現においては RNA の代謝機構が抑制的に働いていると考えられた。一方で、分泌経路に必要な遺伝子はスクリーニングされなかった。分泌経路は細胞の膜構造の形成とも大きくかかわっている。細胞の膜構造は生物にとって非常に重要であるのでここに異常を及ぼす株は増殖に大きな問題を起こす可能性があり、スクリーニングされにくいことが考えられた。これまでに、非必須遺伝子破壊株に対して耐熱性アミラーゼ AmyL を用いて行ったスクリーニングでは、糖鎖修飾関連遺伝子が同定された。糖鎖修飾遺伝子は必須遺伝子にも存在するが今回のスクリーニングでは得られなかった。また、解析用に構築した糖鎖修飾配列欠損型ルシフェラーゼの発現量は野生型と比べ大きな変化はなかった。つまり、糖鎖修飾の分泌生産への影響は対象となる遺伝子に依存していると言える。

これらの株で見られた yCLuc の発現増強が、他の遺伝子の発現にも影響するのか、つまり一般的か、あるいは配列特異的であるかを調べるために、これらの株で非分泌型のルシフェラーゼ Luc2 を発現させた。その結果、発現が顕著に増加する株は存在せず、反対に3株ではほとんど活性が見られなかった。この結果から *S. cerevisiae* は遺伝子配列、おそらく mRNA の配列を識別して、その安定性や翻訳効率を変化させていることが考えられた。yCLuc は *S. cerevisiae* にとって必要ないと判断される配列を持っていると考えられる。つまり、組換えタンパク質の生産においては mRNA の安定化や翻訳の効率化を妨げる配列が何であるかを特定し、目的タンパク質の遺伝子中にこのような配列を含まない設計が重要であると考えられる。

(2) 配列の異なる2種のルシフェラーゼ遺

伝子の発現

遺伝子配列が発現に与える影響を正確に解析するためには、塩基配列は異なるがコードするアミノ酸配列が同じ遺伝子、つまりコドンを変化させた遺伝子を比較することが有効であると考えられる。そこで、yCLuc とはコドンの異なる CLuc 配列を用意した。この CLuc をもちいて yCLuc と同様の発現カセットを構築し、*S. cerevisiae* の染色体上に導入し分泌生産活性を調べた。すると、驚いたことに、CLuc は yCLuc に比べ約 50 倍高い活性を示した (図 3)。これら 2 つの遺伝子はアミノ酸配列は同じであるのでルシフェラーゼの比活性に差はないと考えられる。従ってこの 50 倍の差は発現量の差であると言える。さらに、遺伝子配列の影響は翻訳完了後には影響しないと考えられるので、転写または翻訳に大きな影響を与えていることが考えられる。そこで、mRNA 量を調べるためにそれぞれの株から RNA を取出し、定量的 PCR を行った。その結果、CLuc の mRNA は yCLuc の 7 倍多く存在していた。必須遺伝子のゲノムワイド解析の結果から mRNA の代謝が yCLuc の発現を抑制していたこととこの結果を合わせて考えると、yCLuc は *S. cerevisiae* 細胞内で非常に不安定であると考えられる。一方、コドン、つまり塩基配列の異なる CLuc は安定に翻訳に至ることが可能でこれが発現量の差に表れていると考えられる。両者の差は塩基配列によるものである。頻出コドンの考え方を適用すると開始コドンからストップコドンまで全体で発現に影響を及ぼしていると考えられる。そこで yCLuc と CLuc のキメラ遺伝子を作成し、これらの発現を調べた。*S. cerevisiae* におけるコドン使用頻度の問題であれば、yCLuc 遺伝子に対する CLuc 遺伝子の割合に一致して活性が高くなると考えられた。

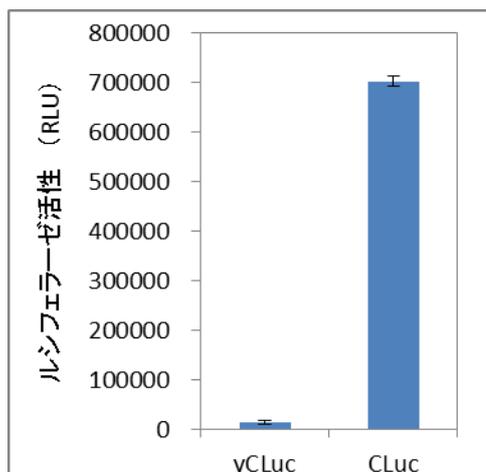


図 3 コドンの異なるルシフェラーゼの発現

しかし、いくつかのキメラ遺伝子の発現量を調べてみると、7割程度の yCLuc 遺伝子配列を持つキメラ遺伝子であっても hCLuc と同等の高い活性を示すものがあり、反対に 7割程度の CLuc 遺伝子配列を持つキメラ遺伝子であっても yCLuc と同等つまり非常に活性の低いものもあった。つまり、両遺伝子の発現の差は頻出コドンでは説明できないことが明らかとなった。

そこで、ルシフェラーゼタンパク質の発現を大きく変化させる配列領域を決定するために計 52 種のキメラルシフェラーゼ遺伝子を構築しそれぞれの遺伝子の *S. cerevisiae* での発現量を調べた。その結果、ルシフェラーゼをコードする 1662 塩基のうち 140 塩基が両遺伝子の発現に差を与えていることが明らかとなった。

以上の結果から、遺伝子発現において特定領域の塩基配列が mRNA の安定性あるいは転写効率を大きく変化させることが分かった。しかし、この発現を抑制する配列の特徴や抑制機構は明らかになっていない。これを明らかにすることで有用タンパク質を安定に生産するための遺伝子設計が可能となる期待できる。

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)

[学会発表] (計 2 件)

①小林隆文、矢村寿啓、星田尚司、赤田倫治、酵母 *Saccharomyces cerevisiae* *snt309* 破壊株での組換えタンパク質高発現、第 63 回日本生物工学会、2011 年 9 月 26 日、小金井市、東京農工大学小金井キャンパス

②平川雄基、星田尚司、赤田倫治、開始コドン上流と ORF 中の配列が発現に与える影響、第 43 回酵母遺伝学フォーラム、2010 年 9 月 9-11 日、奈良市、ならまちセンター

6. 研究組織

(1) 研究代表者

星田 尚司 (HOSHIDA HISASHI)

山口大学・大学院医学系研究科・准教授

研究者番号：00314823