

平成 30 年 6 月 20 日現在

機関番号：93901

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K07378

研究課題名(和文) 最高活性ターミネーターである酵母DIT1tの分子作用機序の解明とその応用

研究課題名(英文) Elucidation of the molecular mechanism of action of the yeast strongest DIT1 terminator and its application

研究代表者

松山 崇 (Matsuyama, Takashi)

株式会社豊田中央研究所・社会システム研究領域 健康創出プログラム・主任研究員

研究者番号：90394882

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：出芽酵母において、タンパク質の生産性を高める活性が最も強いDIT1ターミネーター(DIT1t)の活性化機構を解析し、DIT1t活性化のcis配列GUUCG/Uを同定した。変異の集積により、野生型の1.5倍の活性を有する人工DIT1tを構築した。

同じcis配列を有する細胞壁合成に関わる6種類の遺伝子のターミネーターもDIT1tと同様の制御を受けていた。一方、nab6破壊株は細胞壁の合成阻害剤casprofunginに対して耐性を示し、別の生育阻害剤congo redに対して感受性を示した。これらの結果から、Nab6p-Pap1p複合体をハブとした細胞壁合成の制御機構の存在が示唆された。

研究成果の概要(英文)：In budding yeast, we analyzed the activation mechanism of the DIT1 terminator (DIT1t) with the highest activity to increase protein production of its upstream ORF. The cis sequences GUUCG/U were identified. Due to accumulation of deletion mutations that enhance the activity of DIT1t activation, an artificial DIT1t with about 1.5 times the activity of the wild type DIT1t was constructed.

Terminator activity of six genes involved in cell wall synthesis with GUUCG/U in the 3'-UTR was increased by overexpression of NAB6 and PAP1 genes. On the other hand, the nab6-disrupted strain was resistant to a cell wall synthetic inhibitor, casprofungin, and was sensitive to the drug congo red, which binds to another cell wall component chitin and causes growth inhibition. Taken together, it was suggested that a global regulation system using Nab6p-Pap1p complex as a hub might control cell wall synthesis.

研究分野：応用微生物学

キーワード：転写後発現制御 ターミネーター 出芽酵母

1. 研究開始当初の背景

(1) 出芽酵母において、上流にコードされた cDNA のタンパク質の生産量を増大させるターミネーターのうち、最高活性を持つ *DIT1* ターミネーター (*DIT1t*) の活性を高める 2 種類の *trans* 因子、*NAB6* 遺伝子と *PAP1* 遺伝子が遺伝学的に同定されていた。

(2) *DIT1t* の 3'-UTR 部分のデリレーション・クローン解析によって、*NAB6* 及び *PAP1* 遺伝子の過剰発現による *DIT1t* 活性化作用が失われる *cis* 領域が存在することが明らかにされていた。

2. 研究の目的

DIT1t を介した目的タンパク質の生産を増大させる分子機序を解明することによって、野生型 *DIT1t* の性能を超える高活性な人工のターミネーターを創出する。この改良型 *DIT1t* を、バイオ樹脂原料やバイオ燃料を生産する遺伝子組換え酵母を開発する際に、目的物質の代謝に関わる酵素遺伝子 cDNA の下流に配置して、強力に発現させる。

3. 研究の方法

(1) *DIT1t* 活性化 *cis* 配列を含むと予想された近辺の配列を 3bp 欠損した 15 種類の変異型 *DIT1t* のデリレーション・クローンを作製し、*NAB6* 遺伝子と *PAP1* 遺伝子の過剰発現アッセイを行い、*cis* 配列領域を同定する。

(2) 同定された *cis* 配列を含む周辺配列の塩基配列を飽和点変異した 30 種類の変異型 *DIT1t* を作製し、同様の過剰発現アッセイを行い、*cis* 配列として機能する塩基配列を決定する。

(3) Nab6p タンパク質は細胞壁合成に関わる遺伝子の mRNA に結合することが以前に報告されていたため、細胞壁合成阻害剤である caspofungin と congo red が *nab6* 破壊株の生育に与える影響を調べる。

(4) 以前に報告されていた Nab6p タンパク質が結合する 18 種類の mRNA のターミネーター領域に対して *NAB6* 遺伝子と *PAP1* 遺伝子の過剰発現アッセイを行い、それぞれのターミネーター活性を活性化させるか否かを調べる。

(5) 上記で作製した変異型 *DIT1t* のうち、野生型 *DIT1t* よりも活性が高い変異型 *DIT1t* に含まれる変異を集積した変異型 *DIT1t* を作製し、より高い活性を有する人工 *DIT1t* の創出を試みる。

(6) 転写後レベルで Nab6p-Pap1p 複合体と *cis* 配列の結合をハブとする遺伝子発現制御ネットワークを解明するために、野生株、*NAB6* 遺伝子及び *PAP1* 遺伝子の過剰発現株などを用いて DNA マイクロアレイ解析を行う。

4. 研究成果

(1) 一連の 3bp 欠損した変異型 *DIT1t* のデリレーション・クローンの解析の結果、連続した 2 種類の変異型 *DIT1t* (d15, d16) において、*NAB6* と *PAP1* の過剰発現による *DIT1t* 活性化効果が失われた。これらの領域は、以前の 10bp 欠損により *DIT1t* 活性化効果が失われた d2 領域と重複していた (図 1)。

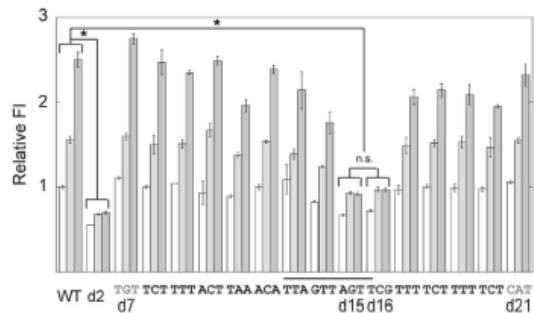


図 1. デリレーション・クローン解析による *cis* 配列の同定 (雑誌論文 参照)。

(2) 30 種類の点変異型 *DIT1t* を解析した結果、1 種類の変異型 *DIT1t* を除いて *DIT1t* 活性化が失われた (図 2)。(1)の結果と合わせて、GUUCG/U が *DIT1t* 活性化の *cis* 配列であることが判明した。

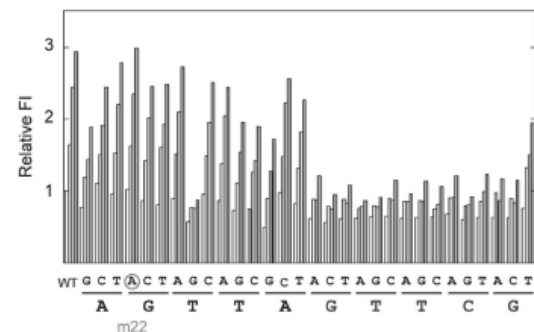


図 2. 点変異型 *DIT1t* の解析による *cis* 配列の決定 (雑誌論文 参照)。

(3) 性接合型のみ異なる実験室酵母 W303-1A, W303-1B において、野生株と *nab6* 単独破壊株の間で、薬剤なしの培地における生育に差は観察されなかった (図 3 左)。その一方、*nab6* 単独破壊株は、細胞壁の主成分 beta-1,3-glucan の合成を阻害する薬剤 caspofungin に対して耐性を示した (図 3 中)。また、別の細胞壁成分キチンと結合して生育阻害を惹起する薬剤 congo red に対して感受性を示した (図 3 右)。

Caspofungin 耐性の原因として、次の 2 つの可能性が考えられた。*nab6* 単独破壊株において、(1) beta-1,3-glucan 以外の細胞壁成分が補償的に生産される。(2) caspofungin により阻害を受けない beta-1,3-glucan 合成酵素のアイソザイムが機能する。

Congo red 感受性の原因として、*nab6* 単独破壊株では、キチン合成が促進されて細胞壁

中のキチン成分が増加に伴って congo red の結合量が増加し、生育が阻害されたのではないかと考えられた。

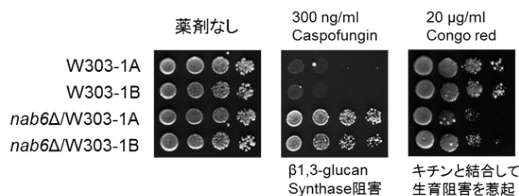


図 3. 細胞壁合成阻害剤に対する野生株と nab6 単独破壊株の耐性試験。与えた薬剤に対して、耐性が高ければ培地上に生育し、逆に感受性が高ければ培地上で生育が阻害される。

(4) 18 種類の mRNA のターミネーター領域の中で 11 種類のターミネーター領域において、NAB6 と PAP1 の過剰発現による活性化が確認された (表 1)。11 種類のうち、6 種類が細胞壁に関わる遺伝子であり、DIT1 も胞子の細胞壁合成に関わる遺伝子であることから、仮説においた Nab6p-Pap1p 複合体は、細胞壁のグローバルな調節因子である可能性が示唆された。

表 1. 18 種類のターミネーター領域の NAB6 と PAP1 の過剰発現アッセイ (雑誌論文 参照)。

Gene	Activation by NAB6 + PAP1 (-fold) ^a	Candidate for cis-elements	Score ^b	Terminator activity ^c
ASP3*	1.3	GTTCA	9.1	2.28
PIR1*	1.5	GTTCA	7.0	0.26
FMP52	1.6	GTTTCG	5.2	1.92
MFA1	1.9	GTTTCG	4.5	0.49
SCW4*	1.6	GTTTCG	4.4	2.30
TIR2*	1.6	GTTTCG	4.3	1.85
YDR133C	1.5	GTTTCG	4.3	--
RPL26B	-	--	3.8	1.30
RPL26A	-	GTTTCG	3.7	0.95
HSP150*	1.5	GTTCA	3.7	0.33
		GTTTCG		
YLR285C-A	-	--	3.6	0.09
SUC2	-	--	3.5	1.04
GPB1	1.3	GTTTCG	3.4	0.17
YGP1*	1.6	GTTTCG	3.2	0.99
SUT1	-	--	3.1	1.73
YDL159W-A	-	--	2.9	0.11
DDR2	1.6	GTTTCG	2.7	0.34
YPR053C	-	--	2.6	--
DIT1	2.9	GTTTCG	--	2.22

(5) DIT1t 活性を向上させる 3 種類の変異 d7、d21、m22 を集積した変異集積型 DIT1t を 5 種類構築した。野生型 DIT1t 及びこれら 5 種類の変異型 DIT1t の活性を比較した。対数増殖期から定常期までの活性の変化を調べたところ、培養時期に関わらず、d22 が最も高い活性を示し、最大で定常期において野生型の 1.5 倍の活性を示した。

(6) NAB6 遺伝子の過剰発現により発現量が 2 倍以上増加する遺伝子は 16 種類、PAP1 遺伝

子の過剰発現により発現量が増加する遺伝子は 14 種類、それぞれ検出された。また、両条件において、共通して発現量が増加する遺伝子は 7 種類検出された (図 4)。

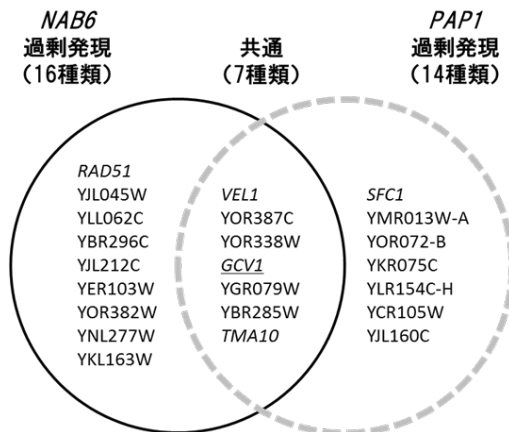


図 4. DNA マイクロアレイ実験結果のまとめ。

この結果は、Nab6-Pap1 複合体を介した遺伝子発現制御ネットワークの存在を支持すると考えられた。共通して発現が増加した遺伝子のうち GCV1 遺伝子のみ機能が判明しており、ミトコンドリア glycine decarboxylase の T サブユニットをコードしていた。

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 2 件)

Ito Y, Kitagawa T, Yamanishi M, Katahira S, Izawa S, Irie K, Furutani-Seiki M and Matsuyama T, Enhancement of protein production via the strong DIT1 terminator and two RNA-binding proteins in *Saccharomyces cerevisiae*, **Scientific Reports**, 査読有、6、2016、36997

DOI:10.1038/srep36997

Ito Y, Yamanishi M, Ikeuchi A, Imamura C and Matsuyama T, Combinatorial screening for transgenic yeasts with high cellulase activities in combination with a tunable expression system, **Plos One**, 査読有、10、2015、e0144870

DOI:10.1371/journal.pone.0144870

[学会発表](計 5 件、国際学会 2 件、国内学会 3 件)

国際学会 2 件

松山 崇, Enhancement of protein production via the strong terminator and two RNA-binding proteins in *Saccharomyces cerevisiae*, The 33rd international specialized symposium on

yeasts (ISSY33)、2017/6/26-29、
University College Cork (Ireland・Cork)

松山崇、Combinatorial screening for
transgenic yeasts with high cellulase
activities in combination with a highly
tunable expression system、14th
International congress on yeasts)
(ICY14)、2016/9/11-14、淡路島夢舞台(兵
庫県・淡路市)

国内学会 3 件

松山崇、伊藤洋一郎、北川孝雄、山西守、
片平悟史、井沢真吾、入江賢児、清木誠、
*DIT1*ターミネーターと2つのRNA結合タン
パク質による目的タンパク質の増産技術、
日本農芸化学会2018年度大会、2018/3/15、
名城大学(愛知県・天白区)

松山崇、伊藤洋一郎、北川孝雄、山西守、
片平悟史、井沢真吾、入江賢児、清木誠、
*DIT1*ターミネーターと2つのRNA結合タン
パク質による目的タンパク質の増産技術、
日本生物工学会第69回大会、2017/9/12、
早稲田大学(東京都・新宿区)

松山崇、北川孝雄、入江賢児、細胞壁合成
阻害剤を用いた *NAB6* 遺伝子の機能解析、
日本農芸化学会2016年度大会、2016/3/29、
札幌コンベンションセンター(北海道・札
幌市)

〔図書〕(計1件)

松山崇、シーエムシー出版、「酵母菌・麹
菌・乳酸菌の産業応用展開」
(ISBN978-4-7813-1317-7)第四章 酵母
による高活性ターミネーターを利用した
タンパク質高生産

〔産業財産権〕

出願状況(計2件)

名称：酵母ターミネーター及びその利用
発明者：松山崇
権利者：株式会社豊田中央研究所
種類：特許
番号：特願 2016-3052
出願年月日：2016年1月8日
国内外の別：国内

名称：酵母ターミネーター及びその利用
発明者：松山崇
権利者：株式会社豊田中央研究所
種類：特許
番号：15/393788
出願年月日：2016年12月29日
国内外の別：国外

取得状況(計1件)

名称：酵母ターミネーター及びその利用
発明者：松山崇

権利者：株式会社豊田中央研究所

種類：特許

番号：特許第6260627号

取得年月日：2017年12月22日

国内外の別：国内

〔その他〕

ホームページ等

(1)論文 について、山口大学ホームペー
ジにて紹介

http://www.yamaguchi-u.ac.jp/weeklynews/2016/_5595.html

(2)論文 について、京都工芸繊維大学ホ
ムページにて紹介

https://www.kit.ac.jp/2016/11/161117_releasenews/

6. 研究組織

(1)研究代表者

松山 崇 (MATSUYAMA, Takashi)

株式会社豊田中央研究所・社会システム研
究領域・健康創出プログラム・主任研究員
研究者番号：90394882

(2)研究分担者

北川 孝雄 (KITAGAWA, Takao)

山口大学・医学研究科・助教(特命)
研究者番号：20614928

井沢 真吾 (IZAWA, Shingo)

京都工芸繊維大学・応用生物学系・准教授
研究者番号：10273517

(3)連携研究者

入江 賢児 (IRIE, Kenji)

筑波大学・医学医療系・教授
研究者番号：90232628