

令和元年6月13日現在

機関番号：13901

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K18297

研究課題名(和文)合成生物学を指向したプロモーターデザイン技術のプラットフォーム

研究課題名(英文)Platform of Promoter Design Technology for Synthetic Biology

研究代表者

児島 孝明(Kojima, Takaaki)

名古屋大学・生命農学研究科・講師

研究者番号：40509080

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、タンパク質の発現システムのキープレイヤーであるプロモーターデザインを目的とした技術開発を試みた。この研究過程で、麹菌における転写制御機構の解析を行い、転写因子の結合部位の網羅的同定に成功した。さらに、プロモーター配列中の転写因子結合部位が下流遺伝子の転写活性に与える影響を数理的に示した。また、転写因子を利用した分子ツールの評価を行い、種々の酵素解析に応用できることを示した。なお、これらの内容を含む研究成果は、英文研究論文3本、ならびに日本語総説1本に発表済みである。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本遂行研究により、麹菌における転写制御機構の核心の一端に迫ることに成功した。麹菌の転写制御機構の全貌は、様々な有用物質の高効率生産のための情報基盤になることから、その意義は非常に大きいと言える。また、転写因子分子ツールであるscCrolは酵素の機能解析に大きな力を発揮することが示された。この分子ツールを駆使することで酵素の機能改変など様々な応用展開が期待できる。

研究成果の概要(英文)：In this study, I attempted to develop a technology for the purpose of promoter design, which is a key player in protein expression systems. In this research process, I analyzed the transcriptional regulatory mechanism in *Aspergillus oryzae* and succeeded in comprehensive identification of the binding site of some transcription factors. Furthermore, the influence of transcription factor binding sites in the promoter sequence on the transcriptional activity of downstream genes was shown mathematically. I also evaluated molecular tools using transcription factors and showed that it can be applied to various enzymatic analyses. The research findings including these results have been published in three English research papers and one Japanese review.

研究分野：分子生物学

キーワード：転写因子 トランスクリプトーム バイオインフォマティクス プロモーター 酵素 スクリーニング
麹菌 大腸菌

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

エネルギー資源を海外輸入に頼らざるを得ない現状打破の鍵として、微生物を用いて安全安価に資源を生産する戦略が挙げられる。例えば、日本古来からの工業微生物 *Aspergillus oryzae* (麹菌) は、高い安全性、固形炭素源の高い資化能力、培養の容易さ等の観点から食品、醸造分野以外での利用の潜在能力を秘めている。

一方、高速シークエンサーの登場とゲノム改変技術の発展によりゲノム操作が容易となった。これに伴い、微生物に新たな代謝パスウェイを導入して有用物質を生産させる合成生物学的アプローチが本研究申請当時より盛んに行われている。しかし、微生物に産業的なレベルの物質生産効率を求めることは現在でもなかなか容易ではない。麹菌のような糸状菌は高い分泌活性を保有し、酵素の大量生産などへの産業利用が期待されているものの、麹菌の高度な利活用のためには麹菌遺伝子発現制御系を網羅的に調べ、プロモーター領域を特定しその特徴をカタログ化する必要がある。さらに DNA 結合タンパク質 (転写因子) に依存する転写制御機構の詳細が未知であり、産業目的を満たす機能を糸状菌に付与する為にはこの転写制御機構の包括的な理解が必要とされる。

これらの状況に対し申請者らは核酸リガンドの *in vitro* スクリーニング法 Systematic Evolution of Ligands by EXponential enrichment (SELEX) を糸状菌ゲノムに対して応用し、高速 DNA シークエンサー解析によって糸状菌転写因子 AmyR の制御遺伝子を網羅的に解析する手法 gSELEX-Seq を利用した転写因子結合部位解析システムを構築していた。

2. 研究の目的

申請者らが確立したビーズディスプレイ法と Genomic SELEX-Seq 法を駆使して大腸菌 RNA 合成酵素とそのプロモーターの共進化法の確立及び糸状菌におけるプロモーター領域の解析を試みる。これらによって得られた技術、知見を用いて機能性タンパク質生産に特化した改変株を獲得し、合成生物学の基盤技術構築を試みる。

3. 研究の方法

1) *A. oryzae* 次世代型育種法の構築

糖代謝に関与する転写因子の一つ、AoXlnR を用いた gSELEX を 3 ラウンド実施した。高速 DNA シークエンサーによって各選択プールの配列データを取得し、バイオインフォマティクスによる各種解析を実施した。さらに、先行研究より得られた AoXlnR 高発現株を用いたマイクロアレイ解析データと照合を行うことで、AoXlnR によって直接的に発現制御をうける遺伝子の同定ならびにデータ・マイニングを実施した。

さらに、*A. oryzae* における Zn2Cys6 型転写因子、A0090009000520 (trsA, 菌核形成に関与)、A0090010000784 (trsB, 菌核形成に関与)、ならびに KojR (コウジ酸合成に関与) についても同様に gSELEX を実施した。

2) 転写因子型分子ツール scCro の応用とビーズディスプレイを用いたプロモーター・RNA ポリメラーゼ共進化技術の開発

scCro ならびにその変異体 scCroM を DNA 結合タグとして用いて BLI 法 (BioLayer Interferometry) によって評価した。さらに、これらをトランスグルタミナーゼ、およびその基質と融合し、結合 DNA を介してマイクロビーズ上に配置し、*in situ* での酵素活性を解析した。

さらに、この scCro タグを西洋ワサビ由来ペルオキシダーゼ (HRP) に付加することで活性型 HRP を大腸菌を用いて調製した。この融合タンパク質を BLI 法におけるセンサーチップに固定化し、その活性をリアルタイムで検出する新たな HRP 解析法を開発した。

また、T7RNA ポリメラーゼおよびその変異体発現用コンストラクトを作製し、マイクロビーズ上での *in vitro* 転写翻訳・ライゲーション共役反応を行い、フローサイトメトリーによってその反応系の評価を行った。

4. 研究成果

1) *A. oryzae* 次世代型育種法の構築

1-1) データマイニングを駆使した AoXlnR による制御機構の解析

麹菌ゲノムライブラリーに対して AoXlnR を用いた gSELEX-Seq を実施し、AoXlnR に *in vitro* で特異的に結合し、選択された配列データの解析を行ったところ、AoXlnR の既知の結合モチーフが抽出された (図 1)。また、AoXlnR 結合活性を示すプロモーターを保有する遺伝子をリストアップし、この候補制御遺伝子リストとマイクロアレイによって同定された既知の発現変動遺伝子 (DEGs) 72 種類と照合したところ、AoXlnR 結合が既知の遺伝子 8 種を含む 51 遺伝子において重複が確認された (図 2)。これらの遺伝子は AoXlnR によって直接的に発現制御される遺伝子であると推定された。さらに、上記 DEG のプロモーターにおける AoXlnR 結合モチーフ数と発現変動レベルとの相関解析を行ったところ、AoXlnR 結合モチーフ 5'-GGCTGA-3'、5'-GGCTAA-3' の個数が下流の遺伝子の発現変動と有意に相関すること、プロモーター中に

	Round 1	Round 2	Round 3
Motif			
E-value	3.2e-58	2.4e-78	2.2e-88

図1. 検出されたAoXlnR結合DNAモチーフ

引用文献 (1)より一部改変

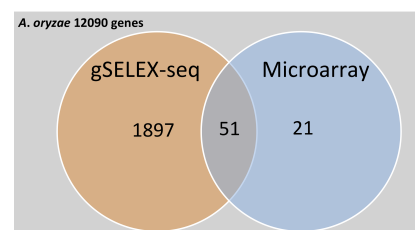


図2. gSELEX-Seqとマイクロアレイ解析より得られたデータの比較照合によるAoXlnRに直接制御される遺伝子の同定

引用文献 (1)より一部改変

5'-GGCTAA-3'、5'-GGCTGA-3'が共存することで、下流遺伝子の発現が AoXlnR 高発現依存的に促進されることをそれぞれ数理的に示した(図3)。

これらの一連の結果は、バイオインフォマティクスを用いることで、麴菌における AoXlnR を介した転写制御機構の核心により迫ったことを示す。本知見と今回確立したノウハウをもとに今後、DNA 配列より得られる構造などの諸パラメーターを組み込み、転写制御機構の論理的解析をより進めていく予定である。

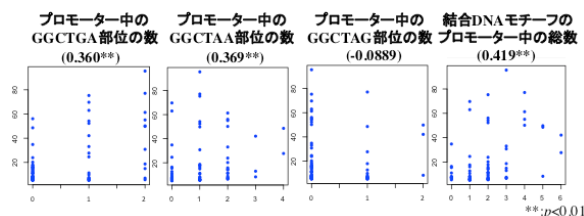


図3. AoXlnR結合DNAモチーフとAoXlnR依存的発現変動レベルの相関散布図
引用文献 (1)より一部改変

1-2) gSELEX-Seq を用いた麴菌転写因子の結合部位の網羅的同定

上記 AoXlnR に加え、転写因子 TrsA、TrsB、ならびに KojR を用いた gSELEX を実施し、それぞれの結合部位の網羅的同定を試みた。TrsB を用いた gSELEX-Seq により、その結合 DNA モチーフの同定ならびにゲノム上の結合部位の網羅的同定を行った(日本生物工学会 2018 年大会において発表)。TrsA を用いた場合、結合 DNA 配列の有意な濃縮が確認できなかったため、タンパク質の二量体化を促進する GST をタグとして TrsA に融合し、この融合型 TrsA を用いた gSELEX を実施した(日本農芸化学会 2019 年大会において発表)。現在高速 DNA シークエンス解析を行っている。また、KojR についても gSELEX を実施済みであり、得られた選択 DNA プールを順次高速 DNA シークエンス解析に供する予定である。

これら一連の結果は gSELEX-Seq の汎用性を示すものであり、今後、他の転写因子を用いた解析も行っていく。これにより、麴菌の代謝プロセスデザインに必要な基盤知見が整備されることが期待できる。

また今後、KojR 欠損株を用いた RNA-Seq を行い、得られたデータをもとに代謝プロセスデザインを行い、コウジ酸高生産株の構築を試みる。

2) 転写因子型分子ツール scCro の応用とビーズディスプレイを用いたプロモーター・RNA ポリメラーゼ共進化技術の開発

2-1) scCro を用いたタンパク質の空間配置技術の構築

ビーズディスプレイを利用したプロモーター・RNA ポリメラーゼ共進化技術の際に分子ツールとして用いる scCro タグの機能評価および本タグとビーズディスプレイを用いた酵素アッセイ・スクリーニングへの応用を試みた。scCro およびそれと異なる DNA 配列に選択的に結合する変異体 scCroM を作製し、BLI 法によって種々の DNA 配列に対する親和性の評価を行った。また、scCro および scCroM の結合配列をタンデムに配置した場合、それぞれの DNA 結合タグが各標的配列に選択的に配置されることを示した(図4)。さらに、この scCro タグ、scCroM タグをそれぞれペプチド基質およびトランスグルタミナーゼとそれぞれ融合した上でビーズ上の空間的近傍に配置することで、ビーズを用いた *in situ* トランスグルタミナーゼアッセイを構築した。本成果に伴って構築された基盤技術は、ビーズディスプレイを用いたプロモーター・RNA ポリメラーゼや、トランスグルタミナーゼ・基質の共スクリーニングへの応用が期待できる。

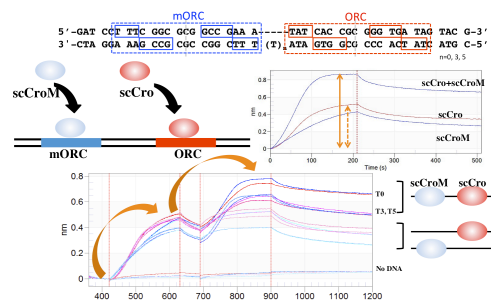


図4. BLI法によるDNA結合タグの選択的配置の評価
引用文献 (2)より一部改変

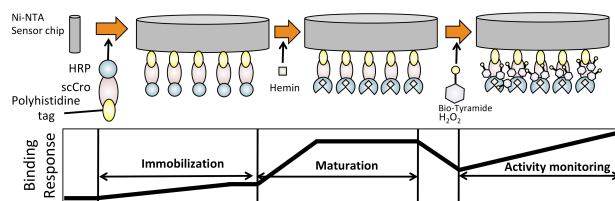


図5. BLI法を用いたHRP活性のリアルタイム解析
引用文献 (3)より一部改変

2-2) scCro タグと BLI 法を用いた新規ペルオキシダーゼ活性リアルタイム測定法の開発

大腸菌による異種タンパク質発現で調製した HRP やマンガンペルオキシダーゼ (MnP) のより簡便かつ経時的に解析、機能評価するため、scCro タグと BLI 法を組み合わせたペルオキシダーゼ活性測定法を構築した(図5)。

なおこの手法の開発は、申請当初は予定していなかったものの、上記研究成果にみられるように、scCro タグの分子ツールとしての機能が予想以上に多用途であったこと、また BLI 法のノウハウを組み合わせることで、本申請研究における獲得変異体の機能評価に応用展開できることを期待し、本手法を着想した。本手法の流れは以下の通りである。scCro タグを付加することで難発現性の HRP を、大腸菌を用いて活性型として調製し、この融合タンパク質を BLI センサーチップ上に固定化する。ついでペルオキシダーゼの活性により近傍のチロシンなどの芳香族アミノ酸に共有結合する基質、チラミドの結合による構造変化を BLI によって検出することで、HRP の活性をリアルタイムで解析できる。また、この手法は一般的な HRP アッセイに比べ、低濃度の H₂O₂ への応答性が高く、より高感度に HRP の活性が検出できることが示された。本手法と上記の空間配置技術を組み合わせることで多様なペルオキシダーゼや H₂O₂ を反応生成物として放出するオキシダーゼの機能解析への応用が期待できる。今後これらの技術を用いて MnP や種々のオキシダーゼのスクリーニング系の構築へと展開していく予定である。

2-3) ビーズディスプレイを用いたプロモーター・RNA ポリメラーゼ創出技術

T7RNAポリメラーゼとT7プロモーターをモデルクローンとしてアッセイ用DNAコンストラクトを調製し、これを鋳型としてビーズ上での *in vitro* タンパク質合成/*in vitro* 転写・ライゲーション系の確立を試みたものの、このモデル系の構築には至らなかった。要因として、系の複雑に加え、*in vitro* タンパク質合成における活性型T7RNAポリメラーゼの発現効率の低さが考えられた。今後も引き続き検討を重ねていくことで、本系の確立を目指す予定である。

<引用文献>

- 1) Oka, H., et al. (2019) BMC Genomics 20, 16.
- 2) Kojima, T. et al. (2018) Biosci. Biotechnol. Biochem. 82, 1911-1921.
- 3) Kojima, T. et al. Biosci. Biotechnol. Biochem. in press.

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計3件)

- 1) Kojima, T., Nakane, A. Zhu, B., Alfi, A., and Nakano, H. A simple, real-time assay of horseradish peroxidase using biolayer interferometry. Biosci. Biotechnol. Biochem. DOI: 10.1080/09168451.2019.1621156 (査読有)
- 2) Oka, H., Kojima, T., Ihara, K., Kobayashi, T., and Nakano, H. (2019) Comprehensive investigation of the gene expression system regulated by an *Aspergillus oryzae* transcription factor XlnR using integrated mining of gSELEX-Seq and microarray data. BMC Genomics 20, 16. DOI: 10.1186/s12864-018-5375-5 (査読有)
- 3) Kojima, T., Hata, J., Oka, H., Hayashi, K., Hitomi, K., and Nakano, H. (2018) Spatial arrangement of proteins using scCro-tag: application for an in situ enzymatic microbead assay. Biosci. Biotechnol. Biochem. 82, 1911-1921. DOI:10.1080/09168451.2018.1501265 (査読有)

[学会発表] (計11件)

- 1) 兒島 孝明, 中野 秀雄. 高速 DNA シークエンシングとバイオインフォマティクスを駆使した転写制御ネットワーク解析。第68回日本生物工学会大会, 平成28年9月, 富山
- 2) 兒島 孝明, 中野 秀雄. BLI法によるDNA結合タグを用いたタンパク質の精密空間配置の評価とその応用。ForteBio User Meeting2017, 平成29年5月, 東京
- 3) 岡 大椰, 兒島 孝明, 井原 邦夫, 小林 哲夫, 中野 秀雄. 麹菌転写因子XlnR結合部位のゲノムワイドと制御遺伝子の網羅的同定。生物工学若手研究者の集い(若手会)夏のセミナー2017, 平成29年7月, 福山
- 4) 岡 大椰, 兒島 孝明, 井原 邦夫, 小林 哲夫, 中野 秀雄. *Aspergillus oryzae* 由来転写因子XlnR制御遺伝子の網羅的同定。日本農芸化学会中部支部 第180回例会, 平成29年10月, 名古屋
- 5) 岡 大椰, 兒島 孝明, 井原 邦夫, 小林 哲夫, 中野 秀雄. *A. oryzae* 由来代謝制御転写因子XlnR制御遺伝子の網羅的解析とデータマイニング。日本農芸化学会2018年度大会, 平成30年3月, 名古屋
- 6) 兒島 孝明, 中野 秀雄. 新規機能性分子スクリーニングを指向したDNA結合タグによる標的タンパク質の精密空間配置。日本農芸化学会2018年度大会, 平成30年3月, 名古屋
- 7) 岡 大椰, 兒島 孝明, 井原 邦夫, 小林 哲夫, 中野 秀雄: データマイニングを駆使した *Aspergillus oryzae* 由来転写因子AoXlnR制御遺伝子の網羅的解析。生物工学若手研究者の集い(若手会)夏のセミナー2018, 平成30年7月, 北見
- 8) 岡 大椰, 兒島 孝明, 井原 邦夫, 小林 哲夫, 中野 秀雄: *Aspergillus oryzae* 由来転写因子XlnRによる遺伝子発現制御システムの網羅的解析。第70回日本生物工学会, 平成30年9月, 大阪
- 9) 兒島 孝明, 中野 秀雄: バイオインフォマティクスに憧れて-高速DNAシークエンシングを駆使した転写制御機構の解析-。生物工学会中部支部 第7回CHUBU懇話会, 平成30年9月, 本巢
- 10) 岡 大椰, 兒島 孝明, 井原 邦夫, 小林 哲夫, 中野 秀雄: データマイニングを用いた *Aspergillus oryzae* 由来転写因子XlnRによる遺伝子発現制御機構の網羅的解析。2018年度日本生物工学会 中部支部例会 2018, 平成30年11月, 名古屋
- 11) Hiroya Oka, Takaaki Kojima, Kunio Ihara, Testsuo Kobayashi, Hideo Nakano: Integrative mining for comprehensive analysis of the gene expression system regulated by a transcription factor, AoXlnR in *Aspergillus oryzae*. 2019 Sakura-Bio Meeting, March 30-31, 2019, Nagoya.

[図書] (計1件)

- 1) バイオインフォマティクス技術を駆使した糸状菌トランスクリプトーム解析 生物工学会誌 第97巻 第5号 265-268 (査読無)

[産業財産権]

該当なし

〔その他〕
該当なし

6. 研究組織

(1) 研究分担者
該当なし

(2) 研究協力者
研究協力者氏名：中野 秀雄
ローマ字氏名：Hideo Nakano

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。