

令和 5 年 6 月 6 日現在

機関番号：14501

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2022

課題番号：18K14374

研究課題名（和文）合成生物学ツールとしての酵母オペロン型遺伝子発現系の「再開発」

研究課題名（英文）Development of polycistronic gene expression system for yeast synthetic biology

研究代表者

富永 将大（Masahiro, Tominaga）

神戸大学・先端バイオ工学研究センター・特命助教

研究者番号：50761409

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、既知IRESの高活性化や、新規な高活性IRESの探索、あるいはIRES活性に影響する酵母内在・外来の因子をスクリーニングし、「オペロン型の遺伝子発現」が可能な酵母遺伝子発現系の開発をおこなった。汎用の遺伝子発現系としての確立にはさらなる検討が必要であるが、IRES活性の向上のための工学指針を得ることができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

遺伝子発現は生物機能の根幹であり、その制御系の充実は生物機能の工学自由度に直結する。その点で、1つのRNAから1つの遺伝子しか発現できない真核生物では、原核生物に比べ遺伝子発現系構築の自由度が低い。本研究の目的は、真核生物の酵母に、1つのRNAから複数遺伝子を発現できる「オペロン型の遺伝子発現系」を構築することであり、人工遺伝子発現ネットワークの構築や有価物質生産のための代謝経路構築などを加速すると期待される。

研究成果の概要（英文）：Gene expression tools are fundamental in any biotechnological project. In this project, we established a gene expression system using an internal ribosomal entry site (IRES) to realize efficient polycistronic gene expression in eukaryotic yeast. We developed a screening system for the evaluation of IRES-dependent translation efficiency in yeast. By using this screening system, we could find several requirements for the efficient IRES-dependent translation in yeast. Leveraging the findings, further engineering of the IRES-dependent translation can be performed in yeast.

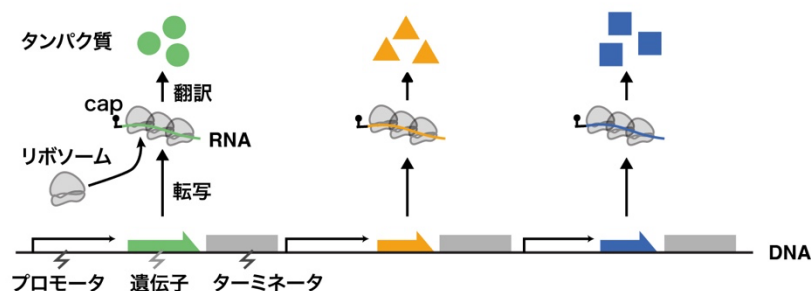
研究分野：合成生物学

キーワード：遺伝子発現システム 酵母 翻訳

1. 研究開始当初の背景

原核生物では、一つの RNA から複数の遺伝子が発現する「オペロン型の遺伝子発現」が可能であり、その工学スピードは早い。一方、真核生物である酵母では、RNA からタンパク質への効率のよい翻訳に RNA 末端の”cap 構造”が必要なため、一つの RNA から一つの遺伝子しか発現できず、遺伝子発現の制御ツールの不足がボトルネックになっていた (図 1a)。Internal ribosome entry site (IRES) と呼ばれる mRNA 配列上の高次構造へのリボソームの結合を介して二つ目以降の遺伝子の発現を促す方法もあるが、IRES を使用した遺伝子発現は通常のそれに比べ非常に弱いことが課題であった。もし高活性な IRES を多数創出できれば、酵母にもオペロン型の遺伝子発現系 (図 1b) が構築できると考え、本課題の着想に至った。

a. 酵母の遺伝子発現



b. IRESを用いたオペロン型の遺伝子発現

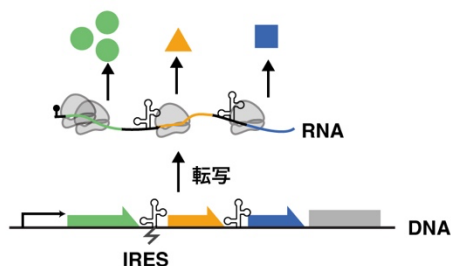


図 1. 酵母における IRES を用いたオペロン型遺伝子発現は発現量の向上が最大の課題. a. 酵母の遺伝子発現では通常、RNA 末端の cap 構造へのリボソームの結合を介してタンパク質への翻訳が開始されるため、遺伝子ごとに転写ユニットが必要である. b. IRES を利用したオペロン型の遺伝子発現系では、リボソームが RNA 上の IRES に結合できるため、cap がなくても遺伝子を翻訳できる。

2. 研究の目的

本研究では、既知 IRES の高活性化や、新規な高活性 IRES の探索、あるいは IRES 活性に影響する酵母内在・外来の因子をスクリーニングすることにある。得た知見を集積し、酵母工学の最重要課題の一つである「オペロン型の遺伝子発現」を実現することを目的とした。

3. 研究の方法

"T7 フェージ由来の遺伝子発現系"を利用した IRES 活性評価法

T7 フェージの RNA ポリメラーゼ (T7 RNAP) とそのプロモータ (*T7p*) を用いた T7 ベースの遺伝子発現系は, T7 RNAP が *T7p* 下流から転写する RNA は IRES 配列がなければ全く翻訳されないため, T7 ベースの遺伝子の発現量は IRES の機能をそのまま反映する (図 2)。また, T7 RNAP 不在時に起こる遺伝子発現があれば,それは IRES 機能と無関係である。このように, IRES の「活性」を, T7 RNAP 発現の有無に応答して ON/OFF する遺伝子発現の変化量として直接評価できる評価系を確立し, 本手法を用いて IRES 活性に影響する因子を探索した。

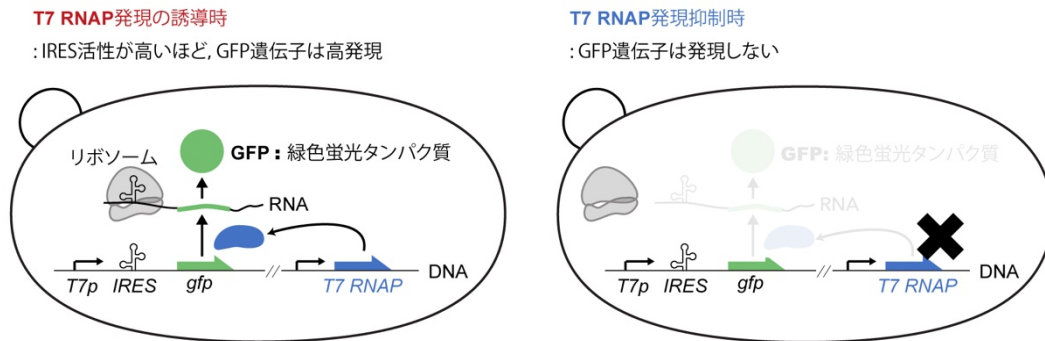


図 2. T7 RNAP に依存した遺伝子発現の量は IRES 活性を反映する

4. 研究成果

(1) 酵母内 IRES 活性のスクリーニング

酵母 *Saccharomyces cerevisiae* での機能が知られている 7 種の IRES の酵母内活性について, 図 2 に示す IRES 活性評価系を用いて評価した。予想通り IRES の活性は低く, 7 種のうち 1 種のみで活性が検出された。活性のみられなかった IRES のいくつかはその転写量自体が低いことが明らかになったが, 転写量に差が見られないにも関わらず活性が検出できない IRES も見られた。

(2) IRESへのランダム変異導入

IRES配列の繰り返しの使用は, 相同組み換えを誘発するため, 異なる配列の高活性IRESを多数取り揃えることは, 遺伝子発現ベクターの設計自由度に影響する重要な要素の一つである。IRESの配列多様化を狙い, 酵母で活性を示したIRESの配列全体にランダム変異を導入し, 作製したライブラリを導入した酵母ライブラリについて, IRES活性を示す変異体を探索した。活性が野生型よりも高い変異体は単離できなかったものの, 野生型の39-93%の活性を保持する変異体を複数単離できた。配列解析を実施したところ, 塩基対形成部位の変異がいくつかの変異体で観察された。このような塩基対形成のペアを変える変異を繰り返し導入することで, 活性を維持したままIRESの配列を多様化し, IRES同士の配列相同性を低減できる可能性が示唆された。

まとめと今後の展望

酵母内で活性を示すIRESやその変異体を見出した。今後は本課題で構築したIRES活性の評価系 (図2) を用いて, IRES活性を高める因子を探索し, 汎用の遺伝子発現系としての確立を目指す。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Tominaga Masahiro, Nozaki Kenta, Umeno Daisuke, Ishii Jun, Kondo Akihiko	4. 巻 12
2. 論文標題 Robust and flexible platform for directed evolution of yeast genetic switches	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 1846
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41467-021-22134-y	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Isogai Shota, Tominaga Masahiro, Kondo Akihiko, Ishii Jun	4. 巻 4
2. 論文標題 Plant Flavonoid Production in Bacteria and Yeasts	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Frontiers in Chemical Engineering	6. 最初と最後の頁 880694
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fceng.2022.880694	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Tominaga Masahiro, Miyazaki Keita, Hataya Shoko, Mitsui Yasumasa, Kuroda Shuji, Kondo Akihiko, Ishii Jun	4. 巻 134
2. 論文標題 Enhanced squalene production by modulation of pathways consuming squalene and its precursor	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Bioscience and Bioengineering	6. 最初と最後の頁 1~6
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jbiosc.2022.04.004	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Tominaga Masahiro, Kondo Akihiko, Ishii Jun	4. 巻 12
2. 論文標題 Engineering of Synthetic Transcriptional Switches in Yeast	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Life	6. 最初と最後の頁 557~557
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/life12040557	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 能崎 健太, 富永 将大, 梅野 太輔, 近藤 昭彦, 石井 純
2. 発表標題 陽性/陰性選択マーカーと蛍光タンパク質から成る3機能性新規融合タンパク質を用いた酵母遺伝子スイッチの開発
3. 学会等名 第71回日本生物工学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 能崎 健太, 富永 将大, 梅野 太輔, 近藤 昭彦, 石井 純
2. 発表標題 新規な3機能性融合マーカーを用いた酵母遺伝子スイッチの組織的開発
3. 学会等名 日本農芸化学会 関西支部 第511回 講演会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 富永 将大, 小川 ひろ, 能崎 健太, 近藤 昭彦, 石井 純
2. 発表標題 進化デザインによる新規テルペノイドセンサの開発
3. 学会等名 日本農芸化学会 関西支部 第511回講演会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 川上 和真, 富永 将大, 小川 ひろ, 能崎 健太, 近藤 昭彦, 石井 純
2. 発表標題 バクテリア転写因子CamRを用いたボルネオール生産酵母のスクリーニング系の構築
3. 学会等名 日本農芸化学会 関西支部 第523回講演会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 宮崎 敬太, 三井 靖雅, 旗谷 章子, 富永 将大, 近藤 昭彦, 石井 純
2. 発表標題 酵母におけるスクアレン生合成経路の改変および下流モノオキシゲナーゼの発現調節
3. 学会等名 日本農芸化学会 関西支部 第513回講演会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計3件

産業財産権の名称 HIGH-EXPRESSION AND HIGHLY-CONTROLLABLE GENE SWITCH	発明者 富永 将大, 石井 純, 伊藤 洋一郎, 能崎 健太, 近藤 昭彦	権利者 国立大学法人神戸大学
産業財産権の種類、番号 特許、W02022118972	出願年 2021年	国内・外国の別 外国

産業財産権の名称 遺伝子スイッチ	発明者 富永 将大, 石井 純, 能崎 健太, 近藤 昭彦	権利者 国立大学法人神戸大学
産業財産権の種類、番号 特許、特開2022-089660	出願年 2020年	国内・外国の別 国内

産業財産権の名称 METHOD FOR SELECTING GENE SWITCH	発明者 富永 将大, 石井 純, 能崎 健太, 近藤 昭彦	権利者 国立大学法人神戸大学
産業財産権の種類、番号 特許、W02022118973	出願年 2021年	国内・外国の別 外国

〔取得〕 計0件

〔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

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関