

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 5 日現在

機関番号：93901

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25660071

研究課題名(和文) 出芽酵母の高活性ターミネーターの作用原理の解明

研究課題名(英文) Elucidation of the molecular mechanism for highly active terminator regions in *Saccharomyces cerevisiae*

研究代表者

松山 崇 (Matsuyama, Takashi)

株式会社豊田中央研究所・先端研究センター バイオ研究室・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) 2,100,000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向上させる高活性ターミネーターのうち上位5種類の特性を調べたところ、プロモーター、上流ORF、培地の炭素源、生育時期、親株を替えても、標準ターミネーターPGK1tの2倍以上の活性を有することが判明した。DIT1ターミネーター(DIT1t)は、上位5種類のターミネーターの中で最も高い活性を示し、代謝工学に用いるのに最も適していることを明らかにした。

続いて、DIT1tの上流ORFのタンパク質蓄積を活性化する特異的な分子機構が存在し、これにDIT1tの特定のcis配列、NAB6、PAP1が関与することを遺伝学的に明らかにした。

研究成果の概要(英文)： In *Saccharomyces cerevisiae*, the activity of the top 5-ranked terminator regions to increase the protein accumulation of the upstream ORF conferred about twice the relative activity as the standard PGK1 terminator under two promoters and three upstream ORFs, under various mediums with a different carbon source, under various growth conditions, and in several yeast strains. Among the terminators in *S. cerevisiae*, the DIT1 terminator (DIT1t) had the highest activity and was the most versatile for metabolic engineering.

In addition, we discovered the molecular mechanism to increase the protein accumulation of the ORF upstream the DIT1t region, and found that NAB6 and PAP1 were genetically involved in this process via the specific cis element within the DIT1t region.

研究分野：応用微生物学

キーワード：遺伝子発現制御 ターミネーター 出芽酵母

1. 研究開始当初の背景

(1)代謝工学的な手法を用いて、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には、目的物質の代謝に関わる酵素遺伝子を導入し、強力に発現させることが求められる。そのための基本的な手段として、強力なプロモーターが探索・改良され、用いられてきた。

(2)プロモーターとターミネーターは相乗的に作用すると考えられるが、強力なプロモーターの探索が中心的に行われていたので、ターミネーターの探索や開発は進んでいない。研究代表者らは、GFP 遺伝子をレポーターとして用い、真核生物において初めて、タンパク質の生産量を増減させるターミネーター活性を網羅的に評価した。

2. 研究の目的

(1)網羅的に評価により同定された、標準ターミネーター *PGK1t* の 2 倍以上の活性を有する上位 5 種類の高活性ターミネーター (*RPL41Bt*, *RPL15At*, *DIT1t*, *RPL3t*, *IDP1t*) の特性を明らかにする。

(2)高活性ターミネーターの作用原理として、高活性ターミネーターの 3'-UTR 領域に含まれる *cis* 配列、及びこれに結合して作用する RNA 結合タンパク質 (*trans* 因子) が存在し、*cis-trans* の相互作用を通じた mRNA 分解の抑制や翻訳効率の向上が考えられる。そこで、*cis* 配列及び *trans* 因子を同定する。

3. 研究の方法

(1)5 種類の高活性ターミネーターについて、培地の炭素源、生育時期、親株等が上流に配置した導入遺伝子のタンパク質生産 (蛍光タンパク質及びセルラーゼ) に与える影響を調べる。

(2)最も活性の高いターミネーターについて、外側からデリベーション・クローンを作製し、活性向上に必要な十分なターミネーター領域を同定する。

(3)同定されたターミネーター領域を *TDH3* プロモーターと GFP 遺伝子の下流に組み込んだコンストラクトをゲノムに挿入した遺伝子組換え酵母を作製する。この株を親株として、出芽酵母ゲノムの 95% をカバーした Yeast genomic tiling collection を導入したライブラリーを作製し、GFP 蛍光を指標として、ターミネーター活性を向上させるゲノム領域を探索する。続いて、この領域から *trans* 因子候補遺伝子を同定する。

4. 研究成果

(1) 5 種類の高活性ターミネーターは、全てプロモーター (*TDH3* promoter から *ADH1* promoter) や蛍光レポーター遺伝子 (GFP から

mKO2) を交換しても、標準の *PGK1t* よりも約 2 倍高い活性を有していた (図 1)。

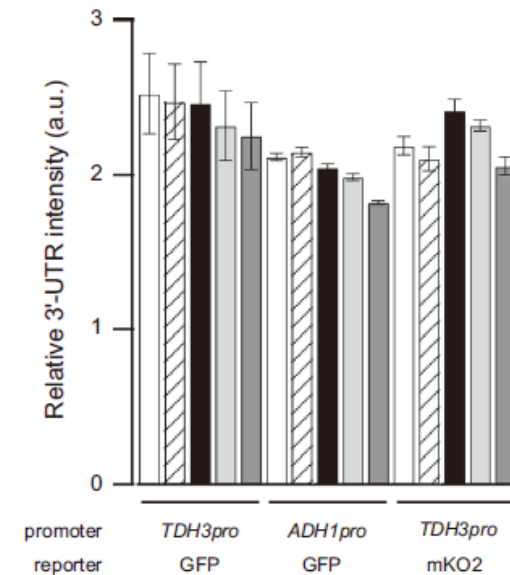


図 1 プロモーター及びレポーター蛍光遺伝子の交換がターミネーター活性に与える影響。白: *RPL41Bt*、斜め線: *RPL15At*、黒: *DIT1t*、薄い灰色: *RPL3t*、灰色: *IDP1t*。

また、培地の炭素をグルコースに替えて、酢酸、エタノール、ガラクトース、グリセロールを用いた場合でも約 2 倍高い活性を有していた。また、異なる 5 種類の親株においても、*PGK1t* に対して約 2 倍の活性を示した。

興味深いことに、対数増殖期から定常期へと移行する間に、*DIT1t* の活性のみ、2 倍以上高まることが発見された。この結果より、*DIT1t* 特異的にターミネーター活性をさらに高める遺伝子が存在する可能性が強く示唆された (図 2)。

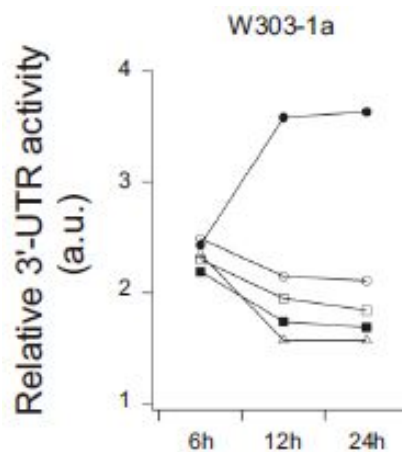


図 2 生育期によるターミネーター活性の変化。○: *DIT1t*、□: *RPL41Bt*、△: *RPL3t*、◇: *IDP1t*、▽: *RPL15At*。

蛍光レポーター遺伝子の替りに TrEG2 セルラーゼ遺伝子を用いて、ターミネーター活性を比較したところ、*DIT1t* が最も高い活性を示した。

(2) *DIT1t* に含まれる *cis* 配列を絞り込むために、デリション・クローンを作製し、250bp まで短くしても活性が変わらないことを明らかにした。

(3) 16 種類に分割したライブラリーの合計 1536 株について、GFP 蛍光を指標とし、*DIT1t* 活性を高めるゲノム領域の一次スクリーニングを行い、13 の候補領域を得た。再現性を確認し、8 種類の領域まで絞り込んだ。これら 8 種類のゲノム領域の末端の塩基配列を決定し、最終的に 4 種類のゲノム領域まで絞り込んだ。

それぞれのゲノム領域に含まれる遺伝子を、1 種類ずつ多コピー型プラスミドにクローニングした後、*DIT1t* 株に形質転換した。GFP 蛍光を指標として、*DIT1t* 活性を高める原因遺伝子を、それぞれの領域から独立に、合計 4 種類同定した。

(4) 4 種類の遺伝子の中に、作業仮説にある RNA 結合タンパク質として報告のある *NAB6* と *PAP1* を解析対象とした。*NAB6*(Nucleic acid binding protein 6)は、mRNA に結合する結合することが知られており、*PAP1*(Poly(A) RNA polymerase 1)は、mRNA に polyA を付加する酵素として同定されている。さらに、Nab6p と Pap1p が物理的に相互作用することも報告されている。

続いて、遺伝学的な解析を行うため、*nab6* 破壊株を作製した。*nab6* 破壊株においては、*PAP1* 過剰発現の効果が失われ、Nab6p と Pap1p が *DIT1t* 活性化に関して、同じ経路で働くことが示された。

(5) *DIT1t* の内部デリション・クローンを作製し、*DIT1t* を活性化する RNA 結合性タンパク質が結合する *cis* 領域の存在を明らかにした。

まず、250bp の *DIT1t* 領域のうち、20bp おきに 10bp 欠損した 6 種類の変異 *DIT1t* (d1 ~ d6) を設計した。続いて、これらの変異 *DIT1t* を *TDH3* プロモーターと GFP 遺伝子の下流に組み込んだコンストラクトをゲノムに挿入した変異 *DIT1t* 株を作製した。これらの変異 *DIT1t* 株において *NAB6* 及び *PAP1* の過剰発現株をそれぞれ作製し、*DIT1t* 活性化作用を野生型 *DIT1t* と比較したところ、d2 株においてのみ、*NAB6* 及び *PAP1* による *DIT1t* 活性化作用が両方とも失われていた。これらの結果より、d2 領域近傍に *cis* 配列が存在する可能性が高いと考えられた。

<引用文献>

Yamanishi M, Ito Y, Kintaka R, Imamura C, Katahira S, Ikeuchi A, Moriya H*, Matsuyama T*, A genome-wide activity assessment of terminator regions in *Saccharomyces cerevisiae* provides a "terminatome" toolbox. *ACS Synth Biol*,

2, 337-347, 2013

Saccharomyces genome database(SGD)

<http://www.yeastgenome.org/>

Ezeokkonkwo C, Ghazy MA, Zhelkovsky A, Yeh PC, Moore C, Novel interactions at the essential N-terminus of poly(A) polymerase that could regulate poly(A) addition in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett*, 586, 1173-1178, 2012

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)

Ito Y, Yamanishi M, Ikeuchi A, Imamura C, Tokuhiko K, Kitagawa T, Matsuyama T*, Characterization of five terminator regions that increase the protein yield of a transgene in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biotechnol*, 査読有, 168, 2013, 486-492
DOI:10.1016/j.biotech.2013.09.024

[学会発表](計8件)うち招待講演(計4件)

松山崇、合成生物学的手法を用いた出芽酵母の導入遺伝子発現制御、JBA 新資源生物変換研究会シンポジウム「モノづくりバイオの新展開 合成生物学の行く道」(招待講演) 2013/6/10、神戸大学百年記念館(六甲ホール)(兵庫県・神戸市)

松山崇、酵母発現系の改良(ターミネーターを中心として)、JBA バイオセミナー“未来へのバイオ技術”勉強会(招待講演) 2013/7/18、(一財)バイオインダストリー協会(東京都・中央区)

松山崇、伊藤洋一郎、山西守、酵母の高活性ターミネーターの特性評価、酵母遺伝学フォーラム第46回研究報告会、2013/9/10、東北学院大学土樋キャンパス(宮城県・仙台市)

伊藤洋一郎、松山崇、ターミネーター領域を用いた出芽酵母における蛋白質発現量の制御～網羅的解析より～、酵母細胞研究会第185回例会(招待講演) 2013/11/22、東京農業大学世田谷キャンパス(東京都・世田谷区)

松山崇、伊藤洋一郎、山西守、池内暁紀、今村千絵、徳弘健郎、北川孝雄、出芽酵母のタンパク質発現量を2倍以上高める *DIT1* ターミネーター、日本農芸化学会2014年度大会、2014/3/29、明治大学生田キャンパス(神奈川県・川崎市)

伊藤洋一郎、山西守、池内暁紀、松山崇、出芽酵母における多数の外来遺伝子の発現調節システムの構築、酵母遺伝学フォーラム第47回研究報告会、2014/9/3、東京大学弥生講堂(東京都・文京区)

北川孝雄、伊藤洋一郎、片平悟史、倉満保

宏、中村和行、松山崇、出芽酵母の高活性ターミネーター-DIT1t を活性化する遺伝子の同定、酵母遺伝学フォーラム第 47 回研究報告会、2014/9/3、東京大学弥生講堂（東京都・文京区）

松山崇、出芽酵母の最高活性 DIT1 ターミネーターの発見と応用に必要な作用機序の解明、酵母研究会第 79 回講演会（招待講演）2015/3/9、西宮神社会館（兵庫県・西宮市）

〔産業財産権〕

出願状況（計 1 件）

名称：酵母における目的遺伝子の発現システム及びその利用

発明者：松山崇、伊藤洋一郎、片平悟史、中村和行、北川孝雄

権利者：豊田中央研究所、山口大学

種類：特許

番号：特願 2014-7964

出願年月日：2014 年 01 月 20 日

国内外の別：国内

6. 研究組織

(1) 研究代表者

松山 崇 (MATSUYAMA, Takashi)

(株) 豊田中央研究所・先端研究センター
バイオ研究室・主任研究員

研究者番号：9 0 3 9 4 8 8 2

(2) 研究分担者

北川 孝雄 (KITAGAWA, Takao)

山口大学・医学研究科・助教

研究者番号：2 0 6 1 4 9 2 8