

氏名	銚水 透 <small>やしみず とおる</small>
授与学位	博士(生命科学)
学位記番号	医博甲第1423号
学位授与年月日	平成27年4月15日
学位授与の要件	学位規則第4条1項
研究科, 専攻の名称	医学系研究科(博士後期課程)応用分子生命科学系専攻
学位論文題目	酵母 <i>Kluyveromyces marxianus</i> の遺伝子操作系を利用した分泌タンパク質の合成生物学的解析
論文審査委員	主査 山口大学 教授 赤田 倫治 山口大学 教授 山本 修一 山口大学 教授 佐伯 隆 山口大学 准教授 吉本 誠 山口大学 准教授 星田 尚司

【学位論文内容の要旨】

遺伝子組み換え生物を利用してタンパク質を効果的に生産するためには、宿主細胞に応じて改変された遺伝子配列を用いることで効率化が期待できる。しかし、従来の手法では遺伝子配列の大幅な改変は困難であり、有効な配列を示すデータも不足している。そこで、本論文では遺伝子を人工的に構築する合成生物学的な手法を利用するというアプローチを進めた。このためには大量の人工遺伝子を調べてデータを蓄積することが必要だと考え、効率的な遺伝子操作系の構築を第一に進め、これを合成生物学のツールとして利用した。

酵母 *Kluyveromyces marxianus* では、遺伝子断片の染色体上への挿入が高頻度で起こった。このことは、*K. marxianus* への遺伝子導入ではベクターを介する必要が無いことを示していた。これは、*K. marxianus* の高い非相同末端結合 (non-homologous end joining; NHEJ) の活性によるものであり、第一章ではこれを利用した効率的な遺伝子操作系の構築を進めた。そのために、遺伝子操作の基礎となる栄養要求性変異株の取得と同定を行った。*K. marxianus* のウラシル要求性に紫外線を照射し、選択培地での増殖を基準として、79株の栄養要求性株を選別し、それぞれの要求性を同定した。これらの変異株の遺伝子型を決定するために候補となる相補遺伝子を出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* 由来の染色体DNAからPCRで合成し、そのまま *K. marxianus* に導入した。これによって導入ベクター構築の手間を省くことができ、遺伝子型の決定をスムーズに進められた。以上の操作によって多様な二重栄養要求性株を取得したが、さらに三重、四重の栄養要求性株の取得を進めた。これは、接合と孢子形成から子孫を得ることで取得しようとした。代表的な酵母である *S. cerevisiae* では α 型とa型という二種類の異なる接合型を持つ株同士を掛け合わせる必要があったため、*K. marxianus* でも掛け合わせられる株の組み合わせを調べたが、意外なことに由来の同じ株同士でも接合が可能であった。これを利用して三重、四重の変異を持つ栄養要求性株の取得ができた。

第二章では人工的な遺伝子配列の合成法の開発を行った。遺伝子合成法の実態は、多数のオリゴヌクレオチドを繋げて一つの遺伝子配列を得ることである。これまでに多様な合成手法が報告されており確実な合成のための条件検討がされていたが、これらは体系づけられていなかった。そこで、*Gaussia princeps* 由来のルシフェラーゼ遺伝子(yGLuc)を対象とし、合成条件を最適化した。合成にはPCRを利用し、多様な条件下での合成を試験したが、最も高い頻度でも約5割程度の頻度でしか機能する遺伝子を得られなかった。従って、

確実な遺伝子合成のためには反応条件の最適化のみでは不十分であると考えた。そこで非活性株の遺伝子配列を解析した所、これらの遺伝子には合成のエラーが生じていた。そのほとんどがヌクレオチドの欠失であり、ランダムな箇所が生じていた。この傾向から、合成遺伝子の下流にマーカー遺伝子を in-frame に融合させ、マーカー遺伝子の機能から合成遺伝子の選別を行う手法をエラー除去の手法として考案した。これに *K. marxianus* の NHEJ を介した遺伝子組換え操作法を応用することで、よりシンプルな操作で正しい合成遺伝子を選択できた。これにより、約 8 割の頻度で活性遺伝子を得られるようになった。以上の系は yGLuc を対象としたが、より実践的な試みとして *Rhizopus oryzae* 由来のグルコアミラーゼ遺伝子の合成を行った。第三章では合成生物学的な手法による、タンパク質の解析を行った。このために、分泌タンパク質の N 末端の分泌シグナル配列に注目した。リボソームによって翻訳された直後の分泌タンパク質は、分泌シグナルをシグナル認識粒子によって認識され、小胞体膜を通過する。分泌シグナルの配列は疎水性に富んだ配列であることは知られているが、配列中にはコンセンサスが見られず、構造の詳細な解析が進んでいなかった。分泌シグナルの構造を、yGLuc をレポーターとして調べた。本稿では約 300 の変異 yGLuc を構築してこれらの活性を比べたが、*K. marxianus* の遺伝子操作系を利用することでこれらを短期間で取得できた。解析の結果、分泌シグナル配列をリジンとグルタミン酸に挟まれた一定の長さの疎水性アミノ酸配列として定義することができた。さらに、疎水性のアミノ酸として最も効果的だったのは、以外にも通常ほとんどシグナル配列に見られないメチオニンの連続配列だった。この人工配列は野生型の数十倍もの分泌能力を示した。

以上の結果から、人工的な配列で自然にあるものを超える機能を持つものを構築できる可能性が示唆された。本研究により、あらゆるタンパク質配列の人工的な設計が期待できるようになった。

【論文審査結果の要旨】

伝統的に酵母菌を利用したパンや酒の製造が行われており、微生物を利用した産業は古来より人類の生活を支えてきた。また、有用な能力を持つ微生物の発見は技術革新をもたらし、微生物が生産する抗生物質は医療を大きく変化させ、わが国においてはアミノ酸を分泌生産する細菌の発見がアミノ酸発酵産業を興した。今後も、より有用な性質を持つ微生物の利用が期待されている。その中でも 1970 年代における遺伝子組換え技術の開発は、生物間での遺伝子の交換ができるという新しい方法を確立した。動物、植物、微生物などの様々な生物に対して、有用遺伝子を導入することで新たな能力を賦与することができるようになった。この遺伝子組換えを利用したタンパク質生産という技術革新により 1980 年代にはヒトインスリンを生産する大腸菌が構築され、バイオ医薬品として利用されるようになった。

このようにバイオ医薬品や遺伝子組換え植物などの開発が進められているが、既存の遺伝子組換え技術には限界も見え始めてきた。新たな有用タンパク質や有用生物を構築することが可能となったが、いずれの場合も基本的には生物由来の遺伝子を利用するか、一部を変異させた遺伝子を利用している。もし全く新しい遺伝子やタンパク質を人工的に設計し、その機能を役立てることができれば、産業利用へのポテンシャルは大きく、オーダーメイドされた生物による新たな技術革新になると期待されている。この方向での生物学を合成生物学と呼ぶ。

近年、細菌の全ゲノムが人工的に合成されたり、酵母の染色体が化学合成されたりしているが、現状の合成生物学では、既存の生物の DNA 配列を合成しているだけなので生命現象の再現に留まっており、理想的な機能を持つ人工的な機能設計を行っているわけではない。高機能化した遺伝子の設計は経験的に行われているのが現状である。一方で、ランダムな遺伝子配列を人工的に合成し、従来よりも優れた機能を示すものを選択することを考えた場合、莫大な配列を取り扱わなければならない。無数の配列を作ることも、それから有用な配列を見つけることも至難の業となっている。

そこで本論文の第一章では、現行の遺伝子組換え技術が非効率的であり、一つの遺伝子を調べるだけでも手間がかかるという問題を解決するために、まず、酵母 *Kluyveromyces marxianus* の新しい遺伝子操作系の開発を行った。*K. marxianus* の高い非相同末端結合 (NHEJ) の活性に注目し、遺伝子操作の基礎となる栄養要求性変異株の取得と同定を行った。NHEJ を介した遺伝子操作による簡便な遺伝子同定、さらには、接合と胞子形成による遺伝学的手法を確立した。

次に、第二章では、第一章での新規な遺伝子操作法を応用し、遺伝子全合成法の開発を試み、正確な遺伝子合成産物が選択できる方法を開発した。今までの化学的な合成法では高頻度にエラーが生じていたが、*K. marxianus* の NHEJ を利用することでエラーを除去する方法を開発した。この手法により正確な遺伝子合成ができるようになった。

第三章では、開発した遺伝子操作法を利用して、分泌タンパク質の N 末に位置する分泌シグナルペプチドの合成生物学的な解析を行った。分泌シグナル配列は、細胞外へ分泌されるタンパク質に共通してみられる配列であり、疎水性アミノ酸を多く含むペプチド配列であるが、共通するコンセンサス配列はなく、配列内のアミノ酸の役割についても明確にはわかっていなかった。そこで、*K. marxianus* を利用し、様々な変異配列を大量に構築することで、各アミノ酸の役割を明らかにし、さらには、分泌シグナル配列を特定の連続したアミノ酸の長さで定義することができた。この定義は、酵母における分泌シグナル配列の分泌能力と比例していた。さらに、通常の分泌シグナル配列には見られないメチオニンの連続配列が高い分泌能力を示すことが判明し、既存の配列を越える人工分泌シグナル配列を提案することになった。

以上のように、本研究において、新しい遺伝子操作法を開発し、その方法を利用し正確な配列を合成できる遺伝子合成法へと展開した。さらに、新規遺伝子操作法を利用することで、分泌シグナル配列をモデル化し、全く新しい人工配列が高い機能を持つことを示した。今後、人工遺伝子や人工ペプチド配列を開発することで、医薬や工業分野に応用することが期待できる。

公聴会には、多数の参加があり、活発な質疑がなされた。公聴会における主な質問は以下の通りである。

- ・ UV による変異体は安定な形質を示すのか。
- ・ 本研究の酵母の接合や胞子形成の培地はどのような培地か。既存の酵母と同じか、異なるのか。
- ・ *URA3* 遺伝子を融合させた遺伝子合成では GLuc タンパク質は分泌されるのか。
- ・ 遺伝子全合成のエラーには削除型変異が多いが、その理由は何か。
- ・ 人工分泌シグナル配列による分泌効率の向上は、転写や翻訳に影響している可能性はあるのか。
- ・ 人工分泌シグナル配列は、他の酵母や生物でも同じような効果を示すのか。

これらの質問に対して、発表者より、具体的で明確な回答がなされた。また、本学位論文の新しい遺伝子操作技術の応用性や、人工分泌シグナル配列の酵母や他の生物での有効利用に関して議論された。

以上より、本論文は独創性、信頼性、有効性、実用性ともに非常に優れており、博士としての学位論文に十分に値するものと判断した。

論文内容および、審査会、公聴会での質疑に対する応答などから、最終試験は、合格とした。

なお、関連論文 3 編の発表状況は下記の通りである。

1. T. Yarimizu, S. Nonklang, J. Nakamura, S. Tokuda, T. Nakagawa, S. Lorreungsil, S. Sutthikhumpha, C. Pukahuta,

- T. Kitagawa, M. Nakamura, K. Cha-aim, S. Limtong, H. Hoshida, R. Akada: Identification of auxotrophic mutants of the yeast *Kluyveromyces marxianus* by non-homologous end joining-mediated integrative transformation with genes from *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 30, 485-500 (2013)
2. T. Yarimizu, M. Nakamura, H. Hoshida, R. Akada: Screening of accurate clones for gene synthesis in yeast. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 119, 251-259 (2014)
3. T. Yarimizu, M. Nakamura, H. Hoshida, R. Akada: Synthetic signal sequences that enable efficient secretory protein production in the yeast *Kluyveromyces marxianus*. *Microbial Cell Factories* 14:20 (2015) DOI 10.1186/s12934-015-0203-y