

学 位 論 文 要 旨

(Summary of the Doctoral Dissertation)

学位論文題目 (Dissertation Title)	発現抑制を受ける遺伝子とその抑制解除に必要なイントロンの解析 (Analysis of the genes and introns in intron-mediated relief of gene repression)
氏 名 (Name)	菊田 浩希

DNA 上の遺伝情報である遺伝子の塩基配列が RNA に転写され、続いて、その RNA の塩基配列がアミノ酸配列に翻訳されることでタンパク質が合成される。しかし、真核生物の遺伝子には、タンパク質をコードしていないイントロンという配列が存在している。DNA から RNA に転写される際にはイントロンは存在しているが、転写後すぐにスプライシングによって RNA から削除される。イントロンは、削除される配列であるにも関わらず、高等生物の遺伝子のほとんどに存在していることから、生命機能にとって有利に働くと考えられている。しかし、このイントロンの機能やその役割に関しては、様々な報告や仮説があり、議論が複雑化している。

Intron-mediated enhancement (IME) もイントロンの機能の一つである。IME はイントロンが RNA の転写や翻訳等を効率化し、最終的に合成されるタンパク質の量を増加させる機能である。この IME は、酵母からヒトまで多くの真核生物に共通してみられ、ヒトや植物では細胞分化にも関与することが知られている。従って、IME を理解することは、イントロンの遺伝子発現に対する役割を明らかにする上で重要である。さらには、IME はタンパク質の大量生産にも役立つので、応用目的のためにもその理解が求められる。

これまでに、様々な生物の遺伝子に対する IME が報告されてきた、一方で、全ての遺伝子で一律に IME が起きるわけなく、タンパク質をコードする配列 (CDS) と、イントロン配列やその位置によって IME が起きる場合と起きない場合があることが明らかになっている。しかし、IME を起こすことに必要な CDS 内の配列は全く分かっていない。その理由は、CDS を改変して調べようとすると、コードするアミノ酸配列が変化してしまい、タンパク質構造に影響が出てしまうことで、IME への影響を調べることができなくなるからである。また、IME に必要なイントロン内の配列についてはいくつか報告はあるものの、使用するイントロンによって結果が矛盾しており、同定までは至っていない。その理由の一つには、使用したイントロンの、スプライシングに必須な配列が不明確であることが原因で、解析時に意図せずにスプライシングができなくなり、タンパク質発現に影響が出てしまうことが挙げられる。さらに、スプライシングに必須な配列が不明確であることは、スプライシングと IME の関係を明確に結論づけることができない原因にもなっている。このように、IME が起きる DNA 配列の共通性が分からないことが、IME の理解を妨げている。そこで、本研究では、IME を理解するために、IME に必要な CDS 内の配列とイントロン内の配列の同定、及びスプライシングと IME の関係性の解明を目指した。

第1章では、IME に必要な CDS 内の配列の解析についてまとめた。*S. cerevisiae* において、同じタンパク質を発現するが、塩基配列が異なる CDS では、IME が起きるかそうでないかが異なる例があることを発見した。同じタンパク質をコードする CDS であれば、タンパク質構造へ影響を与えずに組換えキメラ CDS を構築できる。これによって、IME に必要な CDS 内の塩基の同定が可能であると考えた。実際に、キメラ CDS を構築し、イントロンを持つときと持たないときの発現量

(和文 2,000 字程度 / 英文 800 語程度)

(about 800 words)

を比較した。その結果、興味深いことに、IMEにより増強された発現量は、IMEが起きないCDSのイントロンがないときの発現量と同程度であることが分かった。このことから、IMEが単なる増強ではなく、塩基配列依存的な発現抑制のイントロンによる解除であることを明らかにした。また、3種類のタンパク質をコードする様々なキメラCDS解析の結果として、プロモーター近位の4塩基のTCTT配列が発現抑制を引き起こしており、間接的にIMEに関与していることが分かった。

第2章では、IMEに必須なイントロン内の配列の解析とスプライシングとIMEの関係についてまとめた。*S. cerevisiae*のイントロンでは、スプライシングに必須な5'-スプライス部位(5'-SS)やBPS、3'-スプライス部位(3'-SS)が高度に保存されており、明確に区別ができる。従って、解析する対象の配列がスプライシングに必須かどうかを把握しながら解析ができると考えた。さらに、5'-UTRに存在するイントロンに対して解析を行うことで、スプライシングできないときのタンパク質構造への影響を排除した。その結果、5'-SSとBPSはIMEにとって必須であった。一方で、3'-SSのIMEに対する重要度は5'-SSやBPSと比較して低いことがわかった。さらに、BPSと3'-SSの間の配列も、3'-SSと同程度の影響が示された。また、5'-SSとBPSの間の配列を完全に削除したイントロンでは、IMEは起きたが、スプライシングは起きなかった。この結果は、スプライシング自体はIMEに必須ではないことを示していた。

本研究の成果は、IMEが起きるDNA配列の特徴を同定しただけでなく、IMEが単なる増強ではなく抑制の解除であるという新たな考え方に到達したことと、IMEとスプライシングがそれぞれ独立したイントロンの機能であることを明らかにしたことにある。これらを基礎としてIME研究を推進することで、IME機構の解明やイントロンの存在意義の理解が進むであろう。さらに、CDSに依存した発現抑制を解除できるイントロンは、未だに発現が困難なタンパク質を発現させる有効な手段となりうる、応用面でも大きな価値がある。

学 位 論 文 要 旨

(Summary of the Doctoral Dissertation)

学位論文題目

(Dissertation Title)

Analysis of the genes and introns in intron-mediated relief of gene repression

(発現抑制を受ける遺伝子とその抑制解除に必要なイントロンの解析)

氏 名(Name)

KIKUTA Hiroki

The genetic information encoded in nucleotide sequences of genes is transcribed into RNA (transcription), and the RNA nucleotide sequences are translated into amino acid sequences to synthesize proteins. However, eukaryotic genes contain the regions which are excised from RNA before translation. The regions are called intron. Introns do not contain the information for proteins but the number of introns per gene increases with evolution. This suggests that intron may have advantages in biological functions. However, the functions of introns is not fully understood.

One of the functions of introns to increase the amounts of proteins encoded by the genes with introns, which is called Intron-mediated enhancement (IME). IME is conserved in many eukaryotic organisms, from yeast to humans indicating that IME has important role in gene expression in eukaryotes. For example, in mammalian and plant cells, IME was reported to be involved in cell differentiation. In addition, application of IME for mass production of proteins is a promising way to expand the use of recombinant proteins in industrial and medical fields.

IME has been analyzed in various genes and organisms, and reported that the enhanced levels were affected by protein coding sequences (CDS) and intron sequences. Therefore, expression of not all genes are enhanced by introns. However, analysis of CDSs affecting IME levels have not been conducted, because deletions and mutations of CDSs will disrupt protein structures. Analysis of the intron sequences essential for IME were performed using some introns in plants. However, the results were inconsistent, and intron sequences essential for IME have not yet been identified. These difficulties might be due to unclear branch point site (BPS) in plant introns. In this study, enhanced expression of some CDSs were analyzed in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. to identify essential sequences within CDSs and introns for IME

In chapter 1, the essential sequences for IME in CDSs were analyzed. In *S. cerevisiae*, we found special pairs of CDSs. In each pair, two CDSs encode a same amino acid sequence but the nucleotide sequences were different, and IME was observed in one CDS (IME-sensitive CDS) but not in the other CDS (IME-insensitive CDS). Therefore, we could analyze the essential sequence by constructing chimera genes consisting of the CDSs in a pair. As a result, in most cases, the expression levels enhanced by an intron were similar to that of the IME-insensitive CDSs without intron. In other words, IME is not simple enhancement but relief of nucleotide sequence-dependent repression by the presence of introns. In additions, detailed chimeric-gene analysis revealed that promoter-proximal 4-nucleotides sequences (TCTT) cause the repression and it leads to IME.

In chapter 2, the essential sequences in introns for IME were analyzed. In addition, the relationship between splicing and IME was investigated. Among the introns in *S. cerevisiae*, the sequences of 5'-

(和文 2,000 字程度 / 英文 800 語程度)

(about 800 words)

splice site (5'-SS), BPS, and 3'-SS, which are essential for splicing, are highly conserved, and can be clearly distinguished in the intron sequences. Therefore, mutagenesis to determine the sequence essential for IME could be conducted without unintended mutations that prevent splicing. We analyzed the effects of mutations and deletions using an intron located in the 5'-untranslated region for luciferase expression. As a result, we revealed that 5'-SS and BPS were essential for IME. In contrast, the role of 3'-SS in IME was minor compared to 5'-SS and BPS. In addition, the sequence between BPS and 3'-SS also had minor effect on IME. Furthermore, when the sequence between 5'-SS and BPS was completely deleted, IME was observed but was not spliced, indicating that splicing is not essential for IME.

In this study, not only to identify the essential DNA sequences for IME but also proposed the new hypothesis that IME is not simple enhancement but the relief of the repression and revealed that IME and splicing are independent functions. These finding may be basis for future IME study to understand the mechanism and one of the reasons for the presence of introns in eukaryotes. Furthermore, the finding that TCTT is a repression sequence and intron can relieve the repression will be apply to gene design to express target proteins in *S. cerevisiae*

学位論文審査の結果及び最終試験の結果報告書

山口大学大学院創成科学研究科

氏 名	菊田 浩希
審 査 委 員	主 査：星田 尚司
	副 査：赤田 倫治
	副 査：吉本 誠
	副 査：吉本 則子
	副 査：寺内 裕貴
論 文 題 目	発現抑制を受ける遺伝子とその抑制解除に必要なイントロンの解析 (Analysis of the genes and introns in intron-mediated relief of gene repression)

【論文審査の結果及び最終試験の結果】

真核生物の遺伝子に存在するイントロンは、遺伝子からタンパク質が合成される過程で除去されるものの、タンパク質の発現・生産を増強する機能 (Intron-Mediated Enhancement: IME) がある。従って、工業的なタンパク質の大量生産に有用と考えられる。一方で、発現させる遺伝子や使用するイントロンによって発現増強のレベルが異なることが知られていたものの、これらの原因は理解されていなかった。

本研究では、遺伝子配列は異なるが同じアミノ酸配列をコードしている異なる 2 つの遺伝子を利用して、遺伝子ごとに増強レベルが異なる原因を明らかにするとともに、モデル真核生物である酵母ではイントロン配列の保存性が高いことに着目して、発現増強に必要なイントロン配列も明らかにした。

第 1 章では IME に関して、真核生物での共通性、現在提案されている分子機構、また、それらの分子機構では説明できない現象などこれまでの知見と課題についてまとめ、それらを踏まえた本研究の目的を述べている。

第 2 章では IME を引き起こす遺伝子内の配列を同定した結果を述べている。DNA 配列が異なるが同じタンパク質を発現する 2 つのルシフェラーゼ遺伝子の発現レベルと、これらにイントロンを与えた時の発現増強レベルを比較することで、IME が単なる発現増強ではなく、発現抑制を受ける遺伝子にイントロンを与えることで、抑制が解除される現象であるという仮説に至った。この 2 つの遺伝子の獲得により、発現遺伝子ごとに IME の増強レベルが異なる原因を解析することが初めて可能になった。解析を進めた結果、IME に必要な配列、言い換えると抑制を引き起こしている 50 塩基からなる配列領域を明らかにした。より正確な配列を決定するために、別の遺伝子に対して IME レベルの異なる配列を人工的に創り出し解析を進めた。その結果、抑制配列が 4 塩基からなる TCTT であることを明らかにした。また、遺伝子に TCTT 配列を与えると抑制が引き起こされ、この抑制がイン

トロンで解除されることは、解析した遺伝子群で共通していることを示した。これらの結果から、IME は塩基配列に依存して引き起こされる発現抑制の解除であり、抑制の程度が発現増強効果を決める原因であると結論付けた。

第 3 章では IME に必要なイントロン配列を明らかにするために、イントロンを非翻訳領域に配置することで、タンパク質合成への影響を排除して解析することを提案した。イントロンは 5'側から、5'スプライシング配列、第 1 介在配列、ブランチポイント配列、第 2 介在配列、3'スプライシング配列の 5 つの領域で構成される。モデル真核生物の酵母では、これら 5 つの領域を明確に区別できることを利用し、領域ごとに IME への効果を評価した。その結果、第 1 介在配列は不要で、5'スプライシング配列 6 塩基とブランチポイント配列 7 塩基が発現増強に必須の配列であることを明らかにした。一方でイントロンの削除に重要な 3'スプライシング配列 2 塩基は必ずしも保存配列でなくても IME が生じることを明らかにした。さらに、タンパク質合成過程でのイントロンの除去は発現増強には必要ではないことも明確に示した。

第 4 章では各章の結論から論文全体を総括し、IME の分子機構、進化的な意義、工業的利用などについて考察した。

公聴会には、本学の教員、学生に加え、学外の大学、企業の研究者、計 33 名の参加があり多くの質問があった。主な質問には、TCTT 配列に結合する DNA 結合タンパク質との結合様式やその DNA 結合タンパク質を欠損させた解析は可能か、コドン最適化により TCTT 配列ができやすくなるのか、データのばらつきの原因は何か、進化に伴い遺伝子あたりのイントロン数が増えたこととの関係はあるか、5'スプライシング配列、ブランチポイント配列と 3'スプライシング配列の並びは増強に影響するかなどがあった。

いずれの質問に対しても発表者からの確かな回答がなされた。

以上より本研究は独創性、信頼性、有効性、実用性ともに優れ、博士（生命科学）の論文に十分値するものと判断した。

論文内容及び審査会、公聴会での質問に対する応答などから、最終試験は合格とした。

なお、関連論文の発表状況は下記のとおりである。（関連論文 計 3 編、参考論文 0 編）

1. Hiroki Kikuta, Satoshi Goto, Masaki Kondo, Rinji Akada, Hisashi Hoshida, Identification of essential intron sequences that enhance gene expression independently of splicing in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*, *Biochimica et Biophysica Acta - Gene Regulatory Mechanisms*, 1865, No. 1, 194784 (2022)
2. Mikiko Nakamura, Hiroki Kikuta, Yukie Misumi, Ayako Suzuki, Hisashi Hoshida, Rinji Akada, Triple gene expressions in yeast, *Escherichia coli*, and mammalian cells by transferring DNA fragments amplified from a mother yeast expression plasmid, *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 133, No. 6, 587-595 (2022)
3. Hiroki Kikuta, Takahiro Aramaki, Shingo Mabu, Rinji Akada, Hisashi Hoshida, The presence of an intron relieves gene repression caused by promoter-proximal four-bp specific sequences in yeast, *Biochimica et Biophysica Acta - Gene Regulatory Mechanisms*, 1866, No. 4, 194982 (2023)