

担子菌における成熟 mRNA 合成制御機構の解明

本田 与一

京都大学大学院 農学研究科

研究の目的

担子菌類は、食用としての利用の他に多様な生理活性物質やレクチン、薬剤の合成中間体、発酵食品等の製造プロセスへの利用、リグノセルロース資源の糖化発酵や環境修復といった産業分野への応用が期待されている。また、子囊菌類や動植物などと異なり、ゴルジ体における糖鎖修飾系がほぼ欠損していることから、我々は最近、糖鎖工学と併せることでヒト型の糖鎖を持つ各種の医療用糖タンパク質をヒラタケ宿主系により生産し、安価で安心な新しいバイオ医薬品生産のプラットフォームとして利用する技術の開発を進めている。

従来、真核微生物を用いた組換えタンパク質発現については、酵母や麹菌等の子囊菌類を用いた研究が主であったが、子囊菌と担子菌間では遺伝子発現ベクターの互換性はなく、また担子菌由来のプロモーターを用い、コドン最適化をした場合でも、異種生物由来のタンパク質が発現しない例が多い。担子菌を産業用微生物として広く利用していくためには、本菌における遺伝子発現を司る基盤的なメカニズムの解明が必要である。本研究は、担子菌類において、多様な組換えタンパク質の発現をより効率の良い確かな技術とすることを目的として、転写開始から成熟 mRNA が合成される過程における、担子菌システムの独自性について解明することを目的としている。

方法

独自に開発してきた担子菌プロトプラストのトランスフェクションによる「一過性の組換え遺伝子発現」は、安定形質転換体を用いた従来の研究では染色体への組込状態のバラツキのため困難だった、個々の遺伝子発現を制御するシステムを正確に評価することが可能である。我々のグループはこれまでに、この系を用いてプロモーターの構造解析を進め、担子菌において fundamental な転写開始に必要な配列等について明らかにしてきた（投稿準備中）。本研究では、転写開始以降の成熟 mRNA 形成に至る過程が、担子菌における組換え遺伝子の発現調節においてどのような役割を果たしているかについて以下の様な実験を行って成果を得た。

結果

① イントロンの必要性と機能

スエヒロタケ安定形質転換体を用いた研究では、組換え遺伝子の発現にはイント

ロンが必須であると報告され¹⁾、この考え方が担子菌類における定説とされている。本研究では、担子菌 *Ceriporiopsis subvermispora* のトランスフェクション系を用いて、一過性の組換え遺伝子発現におけるイントロンの必要性について解析を行った。その結果、イントロンの有無による遺伝子発現に有意差は確認されず、イントロンが存在していなくても効率よい組換え遺伝子の発現が可能であることが明らかとなった。

② 転写ターミネーターの評価

mRNA プロセッシングは転写中に始まるとされるが、転写終結シグナルの重要性については、担子菌ではこれまであまり注目されてこなかった。組換え遺伝子発現を行うとき、いわばおざなりにされてきた転写ターミネーターの影響について、上記トランスフェクション系を用いて解析を行い、ターミネーター配列が存在しないと発現が極めて低くなること、また配列の種類 (*gpd* もしくは *β-tubulin* 遺伝子の *ter* 配列) によって発現効率が著しく異なることが示された (Fig. 1)。

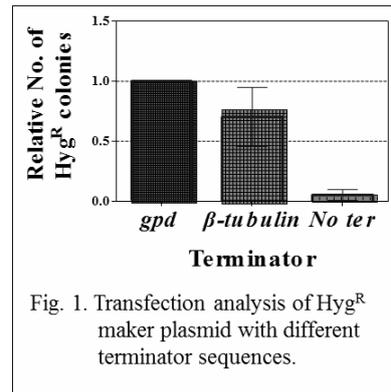


Fig. 1. Transfection analysis of Hyg^R maker plasmid with different terminator sequences.

③ PolyA 付加シグナルの同定

糸状菌における polyA 付加シグナルの配列については、五味らによる麴菌を用いた解析例では、ほ乳類等の厳密なコンセンサスと異なる、AT に富む一定の配列が機能しうることが報告されている²⁾。担子菌における異種遺伝子の発現を目指す際に、polyA 付加シグナルの配列特異性が緩い場合には、コード領域の途中から polyA 鎖が付加され mRNA が中断されることが懸念される。polyA 付加シグナルの配列特異性は、全長の成熟 mRNA ができるかどうかの鍵を握っているという点で重要である。担子菌における polyA 付加シグナルの解析例はこれまでなく、今回は 1) 安定形質転換体を用いた 3' RACE による polyA 鎖付加位置の解析、2) polyA 付加シグナルと予想される配列に変異を入れて、トランスフェクションの系を用いて発現量に与える影響の評価を併せて行い、担子菌における polyA 付加シグナルの構造が遺伝子発現に与える影響について解析を行った。結果としては、他の真核生物でも保存されているコンセンサス配列を欠損すると発現の効率は落ちるものの、これを相補するような弱い活性をもつ配列が他にも存在している事が示唆された (Fig. 2)。

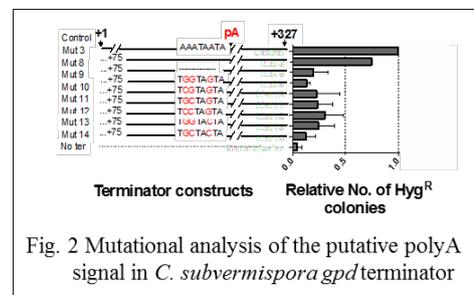


Fig. 2 Mutational analysis of the putative polyA signal in *C. subvermispora gpd* terminator

結論

プロトプラストのトランスフェクションによる一過性の遺伝子発現アッセイ系を用いて、担子菌における効果的な組換え遺伝子発現には、定説とは異なりイントロンは必ずしも必要では無いこと、転写ターミネーターは重要な役割を果たしており、polyA 付加シグナルは他の真核生物のコンセンサス配列に近い配列によるものが優性であるが、他にも緩い活性を持つものが存在している事が明らかになった。

本研究の成果は、今後様々な組換え遺伝子を安定して効率よく発現させ、担子菌類の産業利用をさらに進めていくための基礎となる成果である。なお、本研究成果の一部については、2018年2月イスラエルにて開催された欧州菌類遺伝学会議にて報告され³⁾、ベストポスター賞を受賞した。

文献

- 1) Lugones L.G., Scholtmeijer K., Klootwijk R., and Wessels J.G. (1999) Introns are necessary for mRNA accumulation in *Schizophyllum commune*. *Mol Microbiol.* **32**: 681-689.
- 2) Tanaka M., Sakai Y., Yamada O., Shintani T., and Gomi K. (2011) In silico analysis of 3'-end-processing signals in *Aspergillus oryzae* using expressed sequence tags and genomic sequencing data. *DNA Res.***18**,189-200.
- 3) Honda Y., Nguyen D.X., Nishisaka E., Sakaguchi T., Nakazawa T., and Sakamoto M. (2018) Functional analysis of gene expression signals in basidiomycetous fungi using transfection, and random or targeted integration on the chromosome.: European Conference on Fungal Genetics, Haifa, Israel