

**麹菌 *Aspergillus oryzae* RIB40由来のthiAリボスイッチの機能解析と応用に関する研究 [論文要旨及び審査の要旨]**

著者	山内 隆寛
発行年	2021-09-17
学位授与機関	関西大学
学位授与番号	34416乙第528号
URL	<a href="http://hdl.handle.net/10112/00025751">http://hdl.handle.net/10112/00025751</a>

[12]

氏名	やまうち たかひろ 山内 隆寛
博士の専攻分野の名称	博士（工学）
学位記番号	博第 528 号
学位授与の日付	2021 年 9 月 17 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 2 項該当
学位論文題目	麹菌 <i>Aspergillus oryzae</i> RIB40 由来の <i>thiA</i> リボ スイッチの機能解析と応用に関する研究
論文審査委員	主査教授 老川 典夫 副査教授 長谷川 喜衛 副査教授 松村 吉信

## 論文内容の要旨

### 《概要》

リボスイッチとは、ビタミンなどの小分子を直接認識して遺伝子発現を制御する mRNA で、バクテリアだけでなく、カビや植物などの真核生物にも存在する。リボスイッチは、小分子化合物の添加によって遺伝子発現を制御できることから、その応用が期待されており、リボスイッチの遺伝子制御メカニズムを利用して、天然のリボスイッチにはない新しい機能性のリボスイッチが開発されている。認識する小分子に応じて、様々なリボスイッチがバクテリアで発見されているが、真核生物で見つかっているのはチアミンピロリン酸 (TPP) を認識するリボスイッチのみである。麹菌 *Aspergillus oryzae* RIB40 の *thiA* 遺伝子は、チアミン合成系遺伝子の 1 つで、*thiA* の 5' -側非翻訳領域 (5' -UTR) のイントロン内に TPP 結合型リボスイッチ様配列が見いだされた。チアミン存在下で *A. oryzae* を培養すると *thiA* の発現が抑制され、その遺伝子発現制御にこのリボスイッチ様配列が関係していることが明らかとなっていたが、このリボスイッチ様配列にチアミンから変換された TPP が直接結合し、リボスイッチとして機能するかは明確ではなかった。また、リボスイッチを遺伝子制御ツールとして利用する場合、小分子の添加によって遺伝子発現を抑制するのではなく、促進するほうが応用の範囲も広がる。

そこで本研究では、*thiA* 遺伝子の 5' -UTR に存在するリボスイッチ様配列の RNA に直接 TPP が結合することを明らかにするとともに、*thiA* リボスイッチと TPP の結合には、 $Mg^{2+}$  が重要な役割を果たしていることを明らかにした。また、*thiA* リボスイッチによる選択的スプライシングのスプライシング部位を解明し、その結果を応用して野生型の *thiA* リボスイッチとは逆の制御をする人工リボスイッチの開発を試みた。さらに、*thiA* リボスイッチに

よる選択的スプライシングのメカニズムを解明し、それを応用して TPP が結合すると遺伝子発現を促進する人工リボスイッチの開発を試みた。

#### 《各章の要旨》

第1章では *Aspergillus oryzae* RIB40 由来の TPP 結合型リボスイッチ様配列に TPP が結合することを確認するとともに、TPP が結合する際に重要な  $Mg^{2+}$  の役割を解明にした。20°C における *thiA* リボスイッチに結合する TPP の結合定数は、 $Mg^{2+}$  の濃度を 0 から 1.0 mM に増やすと、 $1.2 \times 10^6$  から  $50 \times 10^6 M^{-1}$  になった。さらにさまざまな条件下での *thiA* リボスイッチの円二色性スペクトル (CD スペクトル) は、1.0 mM  $Mg^{2+}$  が *thiA* リボスイッチの局所的な構造変化を誘発することを明らかにし、これが TPP と *thiA* リボスイッチの結合に重要であることが考えられた。これらの結果から、*thiA* リボスイッチと TPP の結合を生理学的濃度の  $Mg^{2+}$  が制御していることが明らかとなった。

第2章では、*thiA* リボスイッチによる選択的スプライシング部位を決定し、その結果を基に人工リボスイッチの構築を試みた。*thiA* リボスイッチは、TPP 非結合時はイントロンが完全に切り出されるが、TPP 結合時は 85 塩基のイントロンが残る。この残ったイントロンには潜在的な翻訳開始コドンが 3 ヶ所存在し、遺伝子発現抑制することが考えられた。この遺伝子制御メカニズムに基づいて、遺伝子発現を抑制するイントロン配列をあらかじめ除去し、TPP 結合時にスプライシングが行われる ON リボスイッチの設計をさらに試みた。ON リボスイッチによって制御したレポーター遺伝子アッセイの結果から、TPP 非結合時はスプライシングが起これば遺伝子発現が抑制されるが、TPP が ON リボスイッチに結合すると、スプライシングが起これば、遺伝子発現を正に制御することが明らかとなった。

第3章では、*thiA* リボスイッチの遺伝子制御メカニズムの解明とその応用を検討した。*thiA* リボスイッチは、TPP とリボスイッチの結合を介して mRNA の選択的スプライシングを制御し、タンパク質産生を低下させる。TPP 結合部位の 3' -側に存在する特定の配列と塩基対を形成する配列を 5' -スプライシング部位の近傍に見出し、この配列が、*thiA* リボスイッチの選択的スプライシングに重要な役割を果たすことを解明した。さらに、*thiA* リボスイッチによって制御される選択的スプライシングのメカニズムに基づいて、野生型 *thiA* リボスイッチのように TPP がリボスイッチに結合すると遺伝子発現を抑制するのではなく、逆に遺伝子発現を促進する TPP 結合型 ON リボスイッチを構築した。この ON リボスイッチによって制御される標的遺伝子は、*A. oryzae* *niaD300* で実用的なレベルで発現することが明らかとなった。

## 論文審査結果の要旨

論文提出者は、本博士論文において、論文提出者が麹菌 *Aspergillus oryzae* RIB40 に見出した TPP 結合型 *thiA* リボスイッチについて、(1) *thiA* リボスイッチと TPP の結合における  $Mg^{2+}$  の役割の解明、(2) *thiA* リボスイッチの選択的スプライシング部位を応用した遺伝子発現を促進するリボスイッチの開発、(3) *thiA* リボスイッチの選択的スプライシングメカニズムを応用した遺伝子発現を促進するリボスイッチの開発について研究を行い、真核生物において報告例の希少なまた麹菌としては初めてとなる TPP 結合型 *thiA* リボスイッチの基礎及び応用面について解明した。特に本 *thiA* リボスイッチは、バクテリア型のリボスイッチとは異なり、mRNA のイントロン内に TPP 結合部位が存在しており、その遺伝子制御機構は不明であったが、このイントロンのスプライシングに関与することを初めて明らかにし、スプライシングの結果生成する未成熟 mRNA 中に存在する 3 つの開始コドンが、その下流に存在する遺伝子のコード領域のフレームシフトを引き起こし、正常なタンパク質が発現しなくなることを解明した点は、大きな成果の一つであると判断される。また、このリボスイッチは、TPP 結合によって発現が抑制されるいわば「OFF リボスイッチ」であるが、これを遺伝子工学的に機能改変し最適化することによって、TPP 結合によって発現が促進されるいわば「ON リボスイッチ」の開発に成功した。この「ON リボスイッチ」を用いることによって、TPP を誘導物質とする麹菌を宿主としたさまざまなタンパク質の生産が可能となり、産業利用上も有用である。さらに、論文提出者が開発した、本「ON リボスイッチ」の TPP 結合部位を、S-アデノシル-L-メチオニン (SAM) リボスイッチ、リシンリボスイッチ、グアニンリボスイッチ、アデニンリボスイッチなどの他のリボスイッチの化合物結合部位と置換することにより、新規なリボスイッチの構築も可能となり、今後麹菌だけでなく、さまざまな真核生物の遺伝子をさまざまな化合物で制御することが可能になることが期待される。

またこれらの研究成果は、国際的ジャーナルとして名高い FEBS Letters、ChemBioChem 及び Journal of Bioscience and Bioengineering に印刷・公表されている。

以上の結果から、麹菌 *Aspergillus oryzae* RIB40 由来の TPP 結合型 *thiA* リボスイッチの機能が初めて明らかとなった。またこのリボスイッチを遺伝子工学的に改変した「ON リボスイッチ」が開発された。本論文の知見は、基礎面では麹菌 *Aspergillus oryzae* のリボスイッチの研究分野に新しい局面をもたらすとともに、応用面では今後新たな「人工リボスイッチ」の開発に貢献するものと考えられる。

よって、本論文は博士論文として価値あるものと認める。