

論文博士

2021年9月 関西大学審査学位論文

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

山内 隆寛

《論題》

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

《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ノピロリン酸 (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ペ

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* 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、 1.2×10^6 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。

以上

目次

序論	1
第1章 麴菌由来の <i>thiA</i> リボスイッチと TPP の結合における Mg^{2+} の役割の解明	5
1-1 緒言	5
1-2 方法	8
1-2-1 DNA の調製	8
1-2-2 RNA の調製	10
1-2-3 円二色性スペクトルを用いた滴定実験	10
1-2-4 ネイティブポリアクリルアミド電気泳動	11
1-2-5 紫外融解曲線	11
1-3 実験結果	13
1-3-1 TPP 結合型リボスイッチの構造と配列	13
1-3-2 <i>thiA</i> リボスイッチへの TPP 結合における Mg^{2+} の役割	15
1-3-3 <i>thiA</i> リボスイッチへの Mg^{2+} の結合	19
1-4 考察	24
第2章 <i>thiA</i> 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	27
2-1 緒言	27
2-2 方法	29
2-2-1 β -グルクロニダーゼ (GUS) レポータープラスミドの構築と形質転換	29

2-2-2 RT-PCR による解析	30
2-2-3 GUS レポーター試験	31
2-3 実験結果	35
2-3-1 <i>thiA</i> リボスイッチのスプライシング部位	35
2-3-2 <i>thiA</i> リボスイッチの選択的スプライシングを利用した ON リ ボスイッチの構築	37
2-4 考察	44
第 3 章 <i>thiA</i> 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	
3-1 緒言	47
3-2 方法	49
3-2-1 P1 変異リボスイッチの TPP 結合部位の調製	49
3-2-2 CD スペクトルを用いた滴定実験	49
3-2-3 GUS レポータープラスミドの構築と形質転換	50
3-2-4 GUS レポーター試験	51
3-2-5 RT-PCR による解析	51
3-3 実験結果	56
3-3-1 <i>thiA</i> リボスイッチの選択的スプライシングに必要な推定ヌク レオチド配列	56
3-3-2 <i>thiA</i> リボスイッチの選択的スプライシングメカニズム	57
3-3-3 <i>thiA</i> 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 した人工 ON リボスイッチ	64
3-4 考察	70

結論と総括	74
参考文献.....	79
本論文に関する報告	88
謝辞.....	91

序論

生物におけるタンパク質生合成の一般的な流れは、DNA から mRNA への転写と mRNA からタンパク質への翻訳である。翻訳では tRNA が mRNA の塩基配列に対応するアミノ酸を運び、リボソームがアミノ酸の結合を触媒してタンパク質を合成する。このアミノ酸の結合反応の中心的な役割を担っているのは、リボソームの構成成分である rRNA である。このように RNA は DNA にコードされる情報からタンパク質を合成するうえで非常に重要な役割を担っているが、あくまでも DNA とタンパク質の仲介役として働いていると考えられていた。しかし、1980 年代に、原生動物 *Tetrahymena* において、グアノシンと Mg^{2+} が存在すれば、酵素の非存在下でも RNA に転写されたイントロンが自動的に切り出されるリボザイムが発見された (Kruger et al., 1982)。その後、RNA を介した新たな遺伝子発現調節機構である RNA 干渉 (RNAi) が発見された。これは二本鎖 RNA を細胞に導入することにより、相同な塩基配列を持った mRNA に対合し、切断することで遺伝子の発現を抑制する現象である (Fire et al., 1998)。これらの RNA の新規機能は、さまざまな化学反応に対して見いだされていることから、生命の起源は RNA であるという「RNA ワールド」(Gilbert 1986) の概念が広く知られるようになった。

Escherichia coli の mRNA の一部が、ビタミンの一種であるチアミンピロリン酸 (TPP) を直接認識し、遺伝子発現を調節するという全く新しい遺伝子発現調節機構が 2002 年に発見された (Winkler et al., 2002a)。この特殊な RNA (リボ核酸) は遺伝子発現のスイッチを担っていることから「リボスイッチ」と呼ばれている。その後、TPP だけでなく、フラビンモノヌクレオチド (Winkler et al., 2002b)、S-アデノシルメチオニン (Winkler et al., 2003)、アデニン (Mandal et al., 2004a)、ビタミン B₁₂ (Nahvi et al., 2004)、グリシン (Mandal et al., 2004b)、グアニン (Serganov et al., 2004)、グルコサミン-6-リン酸 (Blount et al., 2006)、リジン (Blount et al., 2007) を認識する様々なリボスイッチが様々なバクテリアで発見された。さらに、真核生物であるカビや植物からも TPP 結合

型リボスイッチが発見された (Sudarsan et al., 2003)。興味深いことに、真核生物における天然のリボスイッチは TPP 結合型リボスイッチのみである (Wachter, 2010, Clingman et al., 2013, Breaker, 2018)。

チアミン (ビタミン B₁) はすべての生体系に不可欠であり、チアミンに 2 つのリン酸基が結合した TPP は、炭水化物及びアミノ酸代謝酵素の補因子である。TPP を合成する微生物は、チアゾール及びピリミジン部位を生合成し、それらを結合してチアミンモノリン酸を形成する

(Settembre et al., 2003)。真核生物である麹菌 *Aspergillus oryzae* RIB40 の *thiA* 遺伝子は、チアゾール部位である 5-(2-ヒドロキシエチル)-4-メチルチアゾールリン酸の生合成に関わっていると考えられている。真菌は転写及び転写後レベルでチアミン合成を調節することが知られ、*A. oryzae* の *thiA* 遺伝子は、チアミン生合成のフィードバックメカニズムとして機能する (Kubodera et al., 2003)。*thiA* の 5'-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たが (Kubodera et al., 2003)、このリボスイッチ様配列に 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。そこで、第 1 章では、*thiA* の 5'-UTR に存在する TPP 結合型リボスイッチ様配列への TPP の結合性を確認するとともに、TPP 結合型リボスイッチに対する Mg²⁺の影響を解明した。

遺伝子発現の調節や触媒活性を示す天然の機能性 RNA の例が発見されることで、それに触発された研究者たちは合成の RNA ベースの遺伝子制御システムを開発している (Isaacs et al., 2006)。また、天然の機能性 RNA の遺伝子制御メカニズムを利用して、天然の RNA にはない新しい機能性 RNA も開発されている。バクテリア由来の TPP 結合型リボスイッチの遺伝子制御メカニズムを Fig. 1 に示した。バクテリアのタンパク質翻訳は、mRNA 上のリボソーム結合部位である Shine-Dalgarno 配列 (SD 配列) にリボソームが結合することで始まる。しかし、TPP がリボスイッチに結合することで mRNA の構造が変化し、SD 配列にリボソームが結合で

きなくなり、翻訳が抑制される。Nomuraらは、このSD配列を含む mRNA の構造変化に着目して、*E. coli* 由来のリボスイッチとは逆の遺伝子制御をするリボスイッチを開発した (Nomura et al., 2007)。第1章で TPP が Mg^{2+} を介して結合することが確認された *thiA* リボスイッチは、真核微生物を宿主としてチアミンを培地に添加することによって遺伝子発現を制御できることから、その応用が期待できる。タンパク質を大量生産する際に、所望の有用タンパク質が宿主細胞の増殖を阻害する場合、そのタンパク質を大量生産することは困難である。この問題を解決する方法として、有用タンパク質の生産をリボスイッチで制御し、宿主微生物を増殖させる時はタンパク質の生産を抑え、宿主が十分に増殖した後にタンパク質を生産させることが挙げられる。しかし、*thiA* リボスイッチは、TPP の結合によって遺伝子発現を負に制御する OFF リボスイッチであり、制御のしやすさという面では TPP の結合によって遺伝子発現を正に制御する ON リボスイッチの方がより望ましい。また、*thiA* リボスイッチはイントロンに存在し、チアミンの有無によって mRNA の長さが変化したことから、*thiA* リボスイッチはイントロンのスプライシングを制御することが示唆されたが、その詳細は明らかになっていなかった (Kubodera et al., 2003)。そこで、第2章では、TPP が *thiA* リボスイッチに結合した時のスプライシング部位を特定し、さらに、そのスプライシング部位を利用して、野生型のリボスイッチとは逆の遺伝子制御をする人工 ON リボスイッチの開発について述べる。

第2章で述べた *thiA* リボスイッチのスプライシング部位を利用した ON リボスイッチは、タンパク質を生合成するための遺伝子制御ツールとして利用するには、遺伝子発現のレベルが低く、ON と OFF の遺伝子発現量の差も十分ではなかった。また、*thiA* リボスイッチの TPP 結合による選択的スプライシングのメカニズムの詳細についてはまだ不明な点が多かった。そこで、第3章では *thiA* リボスイッチの 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おいて重要な役割を果たすことを解明した。さらに、この配列を利用し、TPP

が結合することで遺伝子発現を促進する人工 ON リボスイッチの開発について述べる。

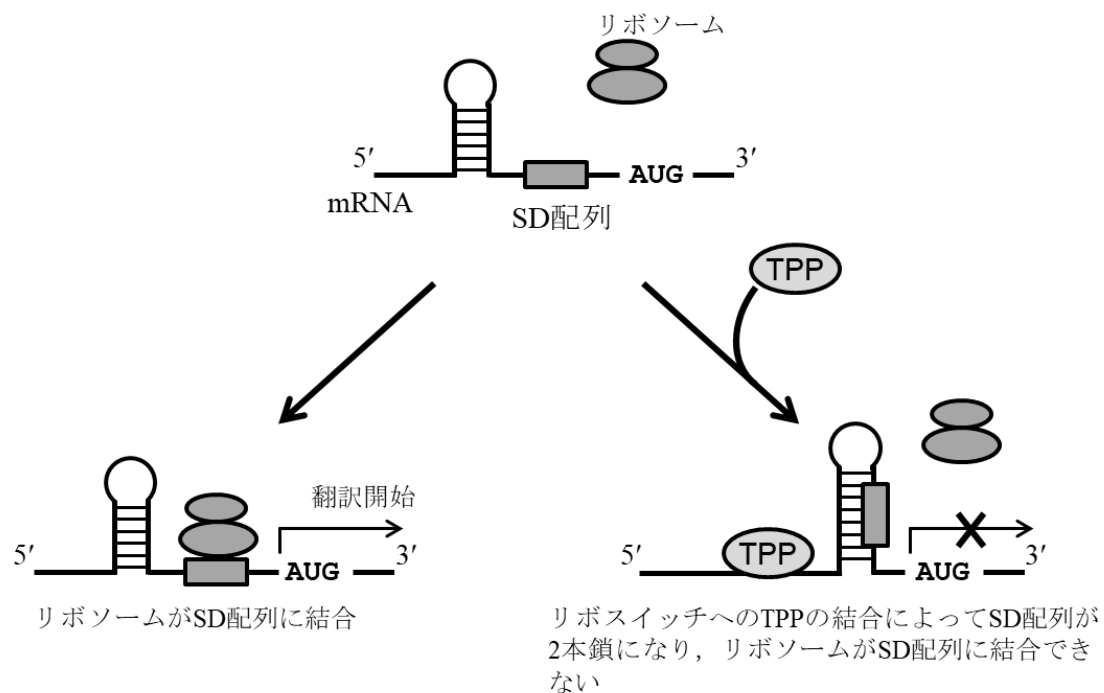


Fig. 1 バクテリア由来の TPP 結合型リボスイッチによる遺伝子制御メカニズムの概略

はしご付きの円は mRNA のループ構造を示した。

第 1 章

麹菌由来の *thiA* リボスイッチと TPP の結合における Mg^{2+} の役割の解明

要約

本研究では麹菌 *Aspergillus oryzae* 由来の *thiA* リボスイッチに対する TPP の結合性と Mg^{2+} の影響を解明した。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、 1.2×10^6 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示唆し、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。

1-1 緒言

RNA は DNA の遺伝情報からタンパク質を生成するための仲介役だけでなく、タンパク質と同様に様々な生物学的機能を担っていることが明らかとなっている。例えば、高度好熱菌で発見されたリボソーム RNA はペプチド結合形成の触媒に関与し (Noller et al., 1992)、トランスファー RNA の中には複製に関与するもの、イントロンの自己スプライシングに関与するもの、翻訳調節に関与するものが知られている (Giege et al., 1998)。また、メッセンジャー RNA (mRNA) は RNA の寿命を決定し (Spicher et al., 1998)、天然及び人工的に進化した触媒 RNA とリボザイムはさまざまな反応を触媒することができる (Breaker, 1997, Okumoto et al., 2002)。さらに、アプタマー (Lee et al., 2004) や RNAi (Elbashir et al., 2001) などの RNA は新しい機能性分子として知られている。RNA が多様な機能を持つ理由として、RNA が多様な高次構造を持つことが挙げられる (Ohmichi et al., 2002)。RNA を構成するヌクレオチドはリン酸骨格でつながっており、水溶液中では常に負に帯電した状態である。そのため、

RNA の高次構造の形成には、正電荷イオンの結合が必要であり、生体内ではカチオンが重要であることが知られている (Sugimoto et al., 1996)。特に、 Mg^{2+} は細胞内に最も多く存在する二価カチオンで、 Mg^{2+} が RNA の構造安定性と活性構造の形成を促進するために必要であることが実証されている (Bujalowski et al., 1986)。また、 Mg^{2+} はしばしば触媒作用に直接的な役割を果たすことも知られている (Koizumi et al., 1991)。したがって、RNA の構造における Mg^{2+} をはじめとするカチオンの役割の定量分析は、RNA の機能を理解するために重要である。

リボスイッチと呼ばれる機能性 RNA は、いくつかの原核生物の mRNA の 5'-非翻訳領域 (5'-UTR) に存在する遺伝子制御システムである (Winkler et al., 2002a, Lai et al., 2003)。他の多くの遺伝子制御システムと異なり、リボスイッチはタンパク質因子なしで標的代謝物と直接相互作用し、遺伝子発現の調節をもたらす。リボスイッチの特性の 1 つは、ビタミンなどの小分子が結合することで mRNA の構造を変化させて、遺伝子発現を調節することである (Winkler et al., 2002a, Lai et al., 2003, Sudarsan et al., 2003)。Winkler らは、*in vitro* 試験で算出されたリボスイッチとリガンドの相互作用の結合エネルギーは、細胞内の結合エネルギーとは異なる可能性があるとして指摘した (Winkler et al., 2002a)。これは、生理学的濃度の Mg^{2+} や他の生体内成分がリボスイッチの構造と機能に影響を与えることが予想されるからである。リボスイッチの機能はその構造変化によって調節されるので、その三次構造は、他の機能性 RNA に見られるように、生体内カチオンに依存する可能性がある。しかし、リボスイッチの構造に対する生理学的濃度の Mg^{2+} などのカチオンの影響は不明であった。

麹菌 *Aspergillus oryzae* RIB40 の推定チアゾール合成遺伝子である *thiA* の 5'-UTR のイントロン内に TPP 結合型リボスイッチ様配列が発見された (Kubodera et al., 2003)。また、チアミン存在下で *A. oryzae* を培養すると *thiA* の発現が抑制されることを見出した。チアミンは麹菌に取り込まれると TPP に変換されること、*thiA* の TPP 結合型リボスイッチ様配列の一部を欠失させると *thiA* の発現制御が解除されたことから、*thiA* 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たが (Kubodera et al., 2003)、このリボスイッチ様配列に TPP が結合してリボスイッチとして機能するかは明確ではなかった。そこで、本研究では、*thiA* の 5'-UTR に存在する TPP 結合型リボスイッチ様配列への TPP の結合性を確認するとともに、TPP の結合に対する Mg^{2+} をはじめとするカチオンの影響を解明した。

1-2 方法

1-2-1 DNA の調製

thiA の 5'-UTR 部位 (Fig. 1-1) の -233 から -61 に存在する TPP 結合型リボスイッチ様配列の推定 TPP 結合部位の転写用 DNA テンプレートの作製は、*thiA* の -729 から -1 の 5'-UTR を持つ pNGTH ベクター (Fig. 1-2)

(Kubodera et al., 2003) を鋳型にし、T7 プロモーター (太字) を付与したプライマー1 (5'-**TAATACGACTCACTATAGGCGTGGGCCGGTGTTCG**-3') とプライマー2 (5'-GGCATGATCCTTTTCGCTGG-3') を用いて Ex Taq (Takara) によってポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) を行った。PCR はサーマルサイクラー PC-801 (ASTEC) を用いた。50 μ L 反応液を 98°C で 3 分間インキュベートした後に、98°C で 10 秒、60°C で 30 秒、72°C で 60 秒の PCR を 30 回行い、72°C で 5 分間アニーリングを行った。増幅 DNA は 3% (w/v) の SeaKem GTG アガロースゲル (BMA Biomedicals) で電気泳動して精製し、QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN) を用いて DNA を抽出した。精製した DNA の塩基配列は、プライマー1 とプライマー2 を用いて ABI PRISM 310 Genetic analyzer (Applied Biosystems) を用いて確認した。

```

-737 GGGGATCTGACAGACGGGCAATTGATTACGGGATCCCATTGGTAACGAAA
-687 TGTA AAAAGCTAGGAGATCGTCCGCCGATGTCAGGATGATTTCACTTGTTT
-637 CTTGTCCGGCTCACCGGTCAAAGCTAAAGAGGAGCAAAAAGGAACGGATAG
-587 AATCGGGTGCCGCTGATCTATACGGTATAGTGCCCTTATCACGTTGACTC
-537 AACCCATGCTATTTAACTCAACCCCTCCTTCTGAACCCCACCATCTTCTT
-487 CCTTTTCCTCTCATCCCACACAATTCTCTATCTCAGATTTGAATTCCAAA
-437 AGTCCTCGGACGAAACTGAACAAGTCTTCCTCCCTTCGATAAACCTTTGG
-387 TGATTGGAATAACTGACCATCTTCTATAGTTCCCAAACCAACCGACAATG
-337 TAAATACACTCCTCGATTAGCCCTCTAGAGGGGCATACGATGGAAGTCATG
-287 GAATACTTTTGGCTGGACTCTCACAATGATCAAGGTATCTTAGGTAACGT
-237 CTTTGGCGTGGGCCGGTGTTCGTTCCCAGTCATCGATGCATTACATGCC
-187 CTCCCTAAGCTGGGCCCTAGACTCTAGGATCCTAGTCTAGAAGGACATGG
-137 CATCGATGGACTGGGTTCGTTCTGAGATTATACGGCTAAAAC TTGATCTG
-87 GATAATACCAGCGAAAAGGATCATGCCTTCTCTCGTTCTTCCTGTTGATG
-37 GAATGGCTAACAGATGATAGTCATTGCAACTTGA AAC

```

Fig. 1-1 *thiA* 遺伝子の 5'-UTR 部位

太文字は TPP 結合型リボスイッチ様配列の推定 TPP 結合部位。数字は翻訳開始部位を+1 とした時の塩基配列の場所を示した。

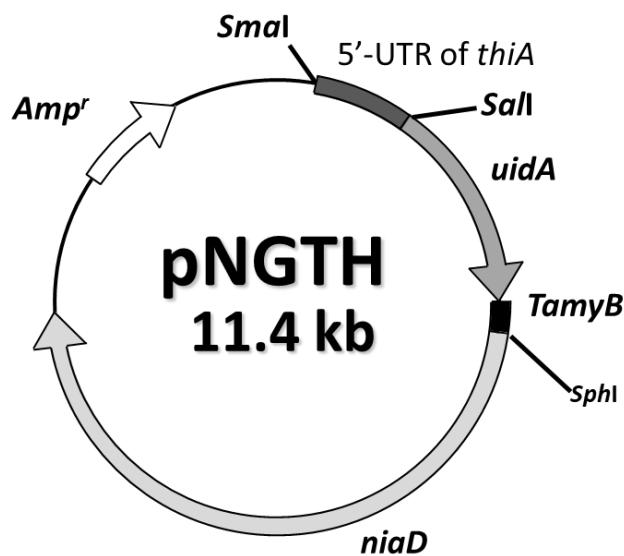


Fig. 1-2 pNGTH ベクター

E. coli 由来 GUS 遺伝子である *uidA* と *A. oryzae* 由来 *amyB* のターミネーターの融合遺伝子を持ち、*uidA* の上流にある *SmaI* サイトと *SalI* サイトに *thiA* の -729 から -1 の 5'-UTR を挿入した。選択マーカーとして *Amp^r* と *niaD* を持つ。

1-2-2 RNA の調製

TPP 結合型リボスイッチ様配列の推定 TPP 結合部位の RNA は、RiboMAX transcription kit (Promega) を用いて説明書に従って作製した。DNA テンプレートを含む 20 μ L 反応液を 37°C で 4 時間反応させてから、1 μ L DNase (Promega) で 37°C で 15 分間反応させて DNA テンプレートを除去した。21 μ L 反応液をフェノール：クロロホルム：イソアミルアルコール (25 : 24 : 1) で処理して約 20 μ L 水相を回収した後に、さらにクロロホルム：イソアミルアルコール (24 : 1) で処理をして水相を回収した。水相に含まれる RNA はイソプロパノール沈殿を行ってから、脱イオン水に溶解し、8% (w/v) 変性ポリアクリルアミドゲル電気泳動にて分離した後に、200 mM NaCl と 1 mM EDTA を含む 10 mM Tris-HCl (pH 7.5) を用いてゲルから目的の RNA を溶出した。RNA はエタノール沈殿を行ってから脱イオン水に溶解し、260 nm の吸光度を測定することによって RNA の濃度を決定した。

1-2-3 円二色性スペクトルを用いた滴定実験

円二色性 (CD) スペクトルは、Jasco J-820 spectropolarimeter (日本分光) を用い、1 cm 光路長のキュベットで、セル室を窒素置換して測定した。

0 から 3.0 μ M TPP に対する RNA の CD スペクトルの測定は、以下の通り行った。測定時の 1.5 mL サンプル溶液に対して、終濃度が 10、100、1,000 mM になるように NaCl あるいは KCl、終濃度が 50 mM になるように 500 mM Tris-HCl (pH 7.0)、終濃度が 0.2 μ M になるように RNA をキュベット内で混合し、50°C で 3 分間インキュベートしてから、20°C で 30 分間インキュベートした。そして、終濃度が 0、0.2、0.5、1.0、10 mM になるように 50 mM Tris-HCl (pH 7.0) に溶解した 100 mM MgCl₂、あるいは終濃度が 1.0 mM になるように 50 mM Tris-HCl (pH 7.0) に溶解した 100 mM CaCl₂ を加えた。滴定する TPP 溶液には、NaCl、KCl、MgCl₂、CaCl₂ をそれぞれの実験の濃度と一致するように 50 mM Tris-HCl (pH 7.0) に溶解し、10、100 μ M の TPP 溶液を調製した。終濃度が 0、0.05、

0.1、0.2 μM になるように、10 μM TPP 溶液を RNA 溶液に対して滴定し、続けて 0.5、0.75、1.0、1.5、3.0 μM になるように 100 μM TPP 溶液を滴定した。滴定ごとに 20°C で 30 分間インキュベートしてから、300 から 220 nm の RNA のモル楕円率 ($\text{deg cm}^2 \text{dmol}^{-1}$) を測定した。

0 から 1.0 mM MgCl_2 に対する RNA の CD スペクトルの測定は、以下の通り行った。測定時の 1.5 mL サンプル溶液に対して、終濃度が 10 mM になるように NaCl、終濃度が 50 mM になるように 500 mM Tris-HCl (pH 7.0)、終濃度が 0.2 μM になるように RNA をキュベット内で混合し、50°C で 3 分間インキュベートしてから、20°C で 30 分間インキュベートした。滴定する 100 mM MgCl_2 溶液は、10 mM NaCl を含む 50 mM Tris-HCl (pH 7.0) に MgCl_2 を加えて調製した。そして、終濃度が 0、0.05、0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.8、1.0 mM になるように MgCl_2 を RNA 溶液に滴定した。滴定ごとに 20°C で 30 分間インキュベートした後に、300 から 220 nm の RNA のモル楕円率 ($\text{deg cm}^2 \text{dmol}^{-1}$) を測定した。

1-2-4 ネイティブポリアクリルアミドゲル電気泳動

ネイティブポリアクリルアミドゲル電気泳動 (PAGE) 実施時の 20 μL サンプル溶液に対し、終濃度が 10 mM になるように NaCl、終濃度が 50 mM になるように 500 mM Tris-HCl (pH 7.0)、終濃度が 0.2 μM になるように RNA を混合して、50°C で 3 分間インキュベートしてから、20°C で 30 分間インキュベートした。その後、終濃度が 0 あるいは 1.0 mM になるように 50 mM Tris-HCl (pH 7.0) に溶解した 0 あるいは 10 mM MgCl_2 を加え、20°C で 30 分間インキュベートした。RNA サンプルの 8% (w/v) ネイティブ PAGE は、Tris / borate / EDTA (TBE) バッファー下で、5 V cm^{-1} にて 5°C で 10 時間行い、GelStar® Nucleic Acid Stain (Takara) で染色した。

1-2-5 紫外融解曲線

測定時の 120 μL サンプル溶液に対し、終濃度が 10 mM になるように NaCl、終濃度が 50 mM になるように 500 mM Tris-HCl (pH 7.0)、終濃度

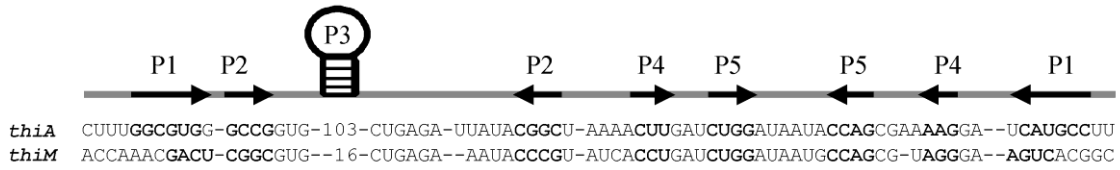
が 0.2 μM になるように RNA を混合して、50°C で 3 分間インキュベートしてから、20°C で 30 分間インキュベートした。その後、終濃度が 0 あるいは 1.0 mM になるように 50 mM Tris-HCl (pH 7.0) に溶解した 0 あるいは 10 mM MgCl_2 を加え、0°C で 30 分間インキュベートした。紫外 (UV) 吸収の測定は Shimazu UV-1700 を用い、サンプルを 1.0 cm 光路長のキュベットに入れ、0 から 90°C に 0.5°C min^{-1} の割合で加熱した時の 260 nm での測定値から、UV 融解曲線を作成した。

1-3 実験結果

1-3-1 TPP 結合型リボスイッチの構造と配列

麴菌の *thiA* 遺伝子に存在するリボスイッチ様配列の推定 TPP 結合部位を *thiM* リボスイッチの TPP 結合部位と比較したものを Fig. 1-3A に示した。チアミン存在下で麴菌を培養すると、*thiA* 遺伝子の発現が抑制される。*thiA* 遺伝子の 5'-UTR のイントロン内に存在する TPP 結合型リボスイッチ様配列の推定 TPP 結合部位の一部を欠失させることで、*thiA* 遺伝子の発現制御が解除されることが報告されている (Kubodera et al., 2003)。しかし、この *thiA* 遺伝子の推定 TPP 結合部位に TPP が結合することは報告されておらず、TPP が結合することが確認できれば、*thiA* 遺伝子が TPP 結合型リボスイッチによって制御されていると言える。一方、*thiM* リボスイッチは TPP によってチアミン合成系を制御するリボスイッチとして *Escherichia coli* で発見された (Winkler et al., 2002a、Mironov et al., 2002)。原核生物と真核生物は遺伝子発現メカニズムが異なっているにも関わらず、麴菌の *thiA* 遺伝子に存在する推定 TPP 結合部位と *thiM* リボスイッチの TPP 結合部位の配列は、高度に保存されていた。*thiA* 遺伝子に存在するリボスイッチ様配列の推定 TPP 結合部位を m-fold (Zuker, 2003) で計算し、その予測二次構造を Fig 1-3B に示した。この二次構造も *thiM* リボスイッチと非常によく似ていたが (Winkler et al., 2002a)、これら 2 つの配列の P3 領域の長さは異なった。Winkler らは P3 領域の長さは遺伝子発現制御には重要ではないことを示しており、真核生物由来の *thiA* リボスイッチ様配列での一価及び二価カチオンの影響を調べることで、原核生物由来の *thiM* リボスイッチのこれらカチオンの影響も反映できると考えた。

A



B

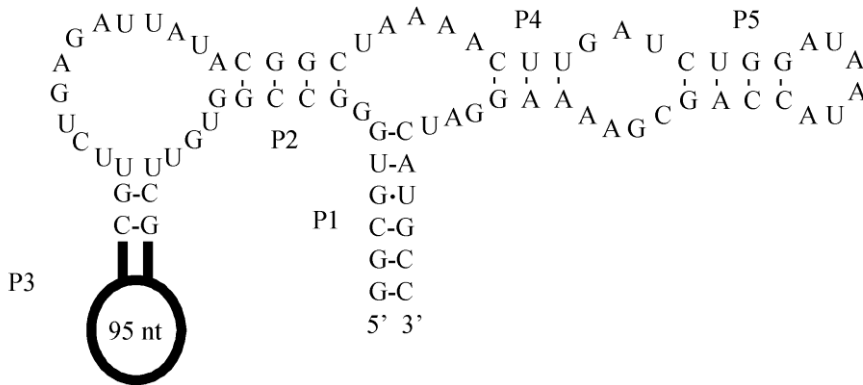


Fig. 1-3 麴菌由来 *thiA* 遺伝子の推定 TPP 結合部位

(A) 麴菌由来 *thiA* 遺伝子の TPP 結合型リボスイッチ様配列と大腸菌由来 *thiM* リボスイッチの TPP 結合部位の配列アラインメント。矢印はステム構造を表し、はしご付きの円はループ構造を表したものである。ステムを形成するシーケンスは、P1、P2、P4、P5 というラベルの付いた太字で示した。P3 領域は長い (95 ヌクレオチド) ため、配列は省略した。(B) *thiA* 遺伝子に存在するリボスイッチ様配列の推定 TPP 結合部位の予測二次構造。

1-3-2 *thiA* リボスイッチへの TPP 結合における Mg^{2+} の役割

10 mM NaCl、50 mM Tris-HCl (pH 7.0)、1.0 mM $MgCl_2$ を含む溶液中での 0.2 μM *thiA* リボスイッチ様 RNA に TPP を滴定した時の CD スペクトルを Fig. 1-4A に示した。CD スペクトルは、265 nm 付近に大きな正のコットンバンドを、240 nm 付近に小さな負のコットンバンドを有しており、この一本鎖 RNA が、鎖内で水素結合による塩基対を形成した A 型ヘリックス構造をとっていることが確認できた (Saenger, 1984)。TPP の滴定により、265 nm 付近のコットンバンドがシフトすることなく強度が弱くなっていた。そこで、265 nm のモル楕円率から *thiA* リボスイッチ様 RNA に対する TPP の平衡パラメーターを推定できると考えた。Fig. 1-4B に 0 もしくは 1.0 mM Mg^{2+} 及び TPP 存在下での *thiA* リボスイッチ様 RNA の 265 nm におけるモル楕円率の変化を示した。TPP 滴定によって引き起こされるモル楕円率の変化は、1.0 mM Mg^{2+} の非存在下よりも存在下で 4 倍大きく、 Mg^{2+} が TPP 結合によって誘導されるリボスイッチの構造変化に重要であることが明らかとなった。TPP 滴定中のモル楕円率の変化は、0.2 μM TPP までは直線的な変化で、この直線と飽和に達したモル楕円率との交点は 0.26 μM だった。このことから、0.2 μM の RNA と TPP は 1:1 で結合したと考えられた。そこで、結合部位が 1 つであると仮定した時の平衡パラメーターを推定する下記のモデル式を用いて TPP と *thiA* リボスイッチ様 RNA の結合定数を算出した (Rippe, 1997)。

$$\theta = \frac{a(K_a[RNA] + K_a[TPP] + 1) - ((K_a[RNA] + K_a[TPP] + 1)^2 - 4K_a^2[RNA][TPP])^{1/2}}{2K_a[RNA] + b}$$

a : 基準化因子、 b : 初期のモル楕円率、 $[RNA]$: RNA のモル濃度、 $[TPP]$: TPP のモル濃度、 K_a : TPP と RNA の結合に対する見かけの結合定数

1.0 mM Mg^{2+} での K_a 値は 20°C で $(50 \pm 34) \times 10^6 M^{-1}$ であり、TPP が *thiA* リボスイッチ様 RNA に直接結合したことが明らかとなった。つまり、麴菌

で発見されたバクテリアの TPP 結合型リボスイッチとの類似配列が TPP 結合型リボスイッチ (*thiA* リボスイッチ) として作用することが明確となった。興味深いことに、*thiA* リボスイッチと TPP との K_a 値は、 Mg^{2+} の非存在下で $(1.2 \pm 0.6) \times 10^6 M^{-1}$ に減少することが見出され、TPP と *thiA* リボスイッチの結合は、 Mg^{2+} に依存的であった。さらに TPP と *thiA* リボスイッチの結合に対する Mg^{2+} 濃度への依存性を調べた結果を Table 1-1 に示した。TPP と *thiA* リボスイッチの K_a 値は Mg^{2+} 濃度の増加と共に増加し、1.0 mM Mg^{2+} でほぼ飽和した。この結果から、生理学的濃度の Mg^{2+} (≤ 1 mM) が TPP の *thiA* リボスイッチへの結合に十分であることを実証した。

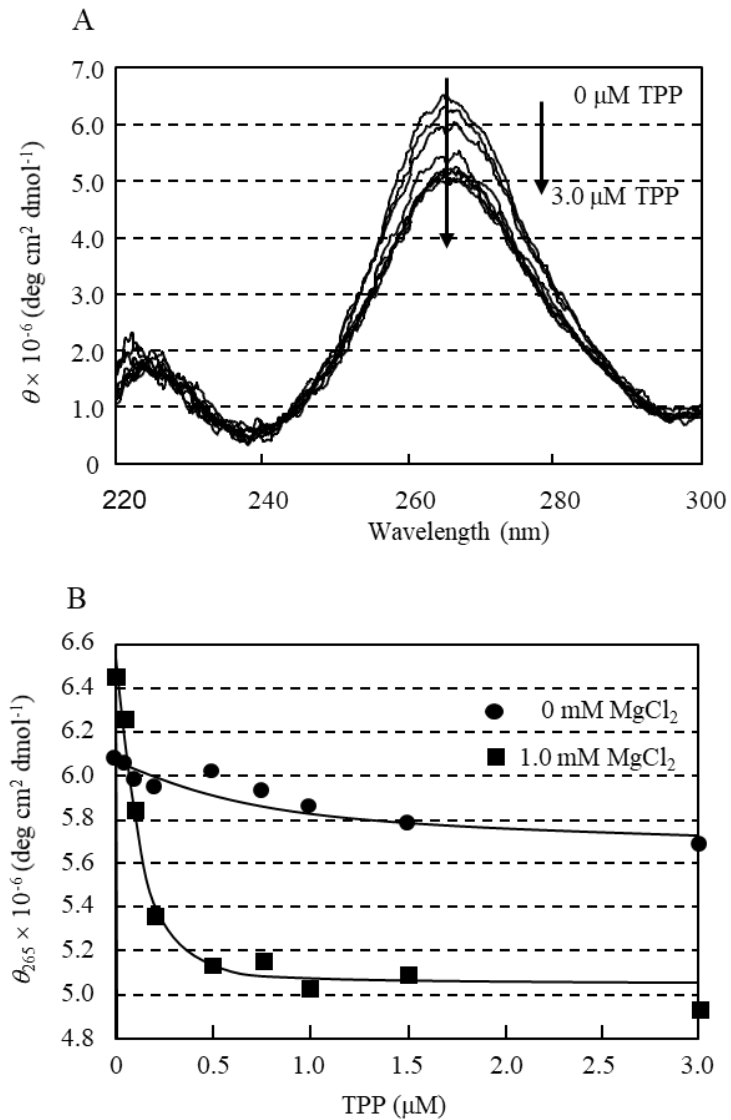


Fig. 1-4 *thiA* リボスイッチ様 RNA に TPP を滴定した時の CD スペクトル

(A) 20°C での 10 mM NaCl、1.0 mM Mg^{2+} と 0 から 3 μM TPP (265 nm で上から下) を含む 50 mM Tris-HCl (pH 7.0) 中の 0.2 μM *thiA* リボスイッチの CD スペクトル。(B) 20°C での 10 mM NaCl 及び、0 から 3.0 μM TPP を含む 50 mM Tris-HCl (pH 7.0) 中の 265 nm での 0.2 μM *thiA* リボスイッチのモル楕円率。■ は 1.0 mM MgCl_2 の存在下で、● は MgCl_2 の非存在下でのモル楕円率を示した。

Table 1-1 さまざまな濃度の Mg^{2+} を使用した $20^{\circ}C$ での *thiA* リボスイッチへの TPP 結合の結合定数 ($K_a \times 10^{-6} M^{-1}$)

Mg^{2+} (mM)	$K_a \times 10^{-6} (M^{-1})$
0	1.2 ± 0.6
0.2	5.0 ± 1.7
0.5	28 ± 6.2
1.0	50 ± 34
10	50 ± 16

すべての実験は、50 mM Tris-HCl バッファー (pH 7.0) で行った。

Na^+ だけでも RNA の特定のサブドメインを安定化させ、RNA の活性を誘導できることがあるため (Downs et al., 1996、Murray et al., 1998)、*thiA* リボスイッチへの TPP 結合に対する高濃度の Na^+ の影響を調べた。 Mg^{2+} の非存在下で 10、100、1,000 mM NaCl を含む 50 mM Tris-HCl (pH 7.0) での *thiA* リボスイッチへの $20^{\circ}C$ での TPP の結合に対する K_a 値は、それぞれ $(1.2 \pm 0.6) \times 10^6$ 、 $(3.7 \pm 1.4) \times 10^6$ 、 $(2.2 \pm 2.0) \times 10^6 M^{-1}$ であった (Table 1-2)。この範囲の Na^+ 濃度は、TPP 結合に影響を与えなかったことから、高 Na^+ 濃度でも、TPP 結合に必要な *thiA* リボスイッチのアクティブな構造を誘導できないことが考えられた。1.0 mM Mg^{2+} の存在下での 10、100、1,000 mM Na^+ における TPP の結合に対する K_a 値は、エラー範囲内ではほぼ同じであり (Table 1-2)、リボスイッチへの Mg^{2+} 結合によって誘導される TPP 結合が高濃度の Na^+ によって大きく阻害されなかった。さらに RNA の三次構造に Ca^{2+} と K^+ が影響を与える可能性があるため (Shiman et al., 2000、Willick et al., 1973)、*thiA* リボスイッチへの TPP 結合に対するこれらのイオンの影響を調べて、TPP 結合に対する Mg^{2+} の重要性を確認した。50 mM Tris-HCl (pH 7.0) と 1.0 mM Ca^{2+} を含む 10 mM NaCl での TPP 結合の K_a 値は、 $20^{\circ}C$ で $(1.7 \pm 0.6) \times 10^6 M^{-1}$ であり、これは二価イオンが非存在下の場合と同様だった。1.0 mM Mg^{2+} (Table 1-1) とは異なり、1.0 mM Ca^{2+} は、TPP の結合に必要な *thiA* リボスイッチの活性構造を誘導できないと考えられた。さらに、 $20^{\circ}C$ で 10、100、1,000

mM KCl を含む 50 mM Tris-HCl (pH 7.0) での *thiA* リボスイッチへの TPP の結合に対する K_a 値はそれぞれ、 $(3.2 \pm 1.6) \times 10^6$ 、 $(1.3 \pm 0.6) \times 10^6$ 、 $(1.7 \pm 0.7) \times 10^6$ で、 Na^+ と同様に高濃度の K^+ では、*thiA* リボスイッチの活性構造を誘導できないと考えられた。これらの結果から、*thiA* リボスイッチへの TPP の結合に Mg^{2+} の存在が極めて重要であることが明らかとなった。

Table 1-20 または 1.0 mM Mg^{2+} 及び 10、100、1,000 mM Na^+ 存在下における 20°C での *thiA* リボスイッチへの TPP 結合の結合定数 ($K_a \times 10^{-6} \text{ M}^{-1}$)

	Mg^{2+} 濃度 (mM)	
	0	1.0
10 mM Na^+	1.2 ± 0.6	50 ± 34
100 mM Na^+	3.7 ± 1.4	51 ± 41
1,000 mM Na^+	2.2 ± 2.0	29 ± 13

すべての実験は、50 mM Tris-HCl (pH 7.0) バッファーで行った。

1-3-3 *thiA* リボスイッチへの Mg^{2+} の結合

thiA リボスイッチへの TPP の結合に Mg^{2+} が必要であることが明らかとなったので、リボスイッチへの Mg^{2+} の結合定数を算出した。10 mM NaCl とさまざまな濃度の MgCl_2 を含む 50 mM Tris-HCl (pH 7.0)中の 0.2 μM *thiA* リボスイッチの 20°C での CD スペクトルを Fig. 1-5A に示した。265 nm 付近の大きな正のコットンバンドは、どの Mg^{2+} 濃度でもシフトしなかったため、265 nm でのモル楕円率からリボスイッチに結合する Mg^{2+} の平衡パラメーターを推定できると考えた。Fig. 1-5B に、20°C で 10 mM NaCl と 0 から 1.0 mM Mg^{2+} を含む 50 mM Tris-HCl (pH 7.0)中の *thiA* リボスイッチの 265 nm でのモル楕円率を示した。 Mg^{2+} の結合パラメーターを推定するために、データは、協同的 Mg^{2+} 結合を仮定する下記のモデル式を用いて解析した (Rippe, 1997)。

$$\theta = aK_a^\alpha[\text{Mg}^{2+}]^\alpha / (1 + K_a^\alpha[\text{Mg}^{2+}]^\alpha) + b$$

a : 基準化因子、 b : 初期のモル楕円率、 α : Hill 係数、 $[\text{Mg}^{2+}]$: Mg^{2+} のモル濃度、 K_a : *thiA* リボスイッチに対する Mg^{2+} の見かけの結合定数

このモデル式を用いて算出された推定 K_a 値は $(6.1 \pm 1.7) \times 10^3 \text{ M}^{-1}$ で、Hill 係数は 1.3 ± 0.4 であった。Hill 係数の結果から、*thiA* リボスイッチが少なくとも 1 つの Mg^{2+} の結合部位を有すること、複数の Mg^{2+} 結合部位が存在しても Mg^{2+} の結合はそれぞれ独立していることが明らかとなった。長鎖の RNA 分子には多くの Mg^{2+} 結合部位が存在している可能性があり、算出された推定 K_a 値は、*thiA* リボスイッチ中のいくつかの Mg^{2+} 結合部位に対する Mg^{2+} の親和性の平均値を表すと考えられた。

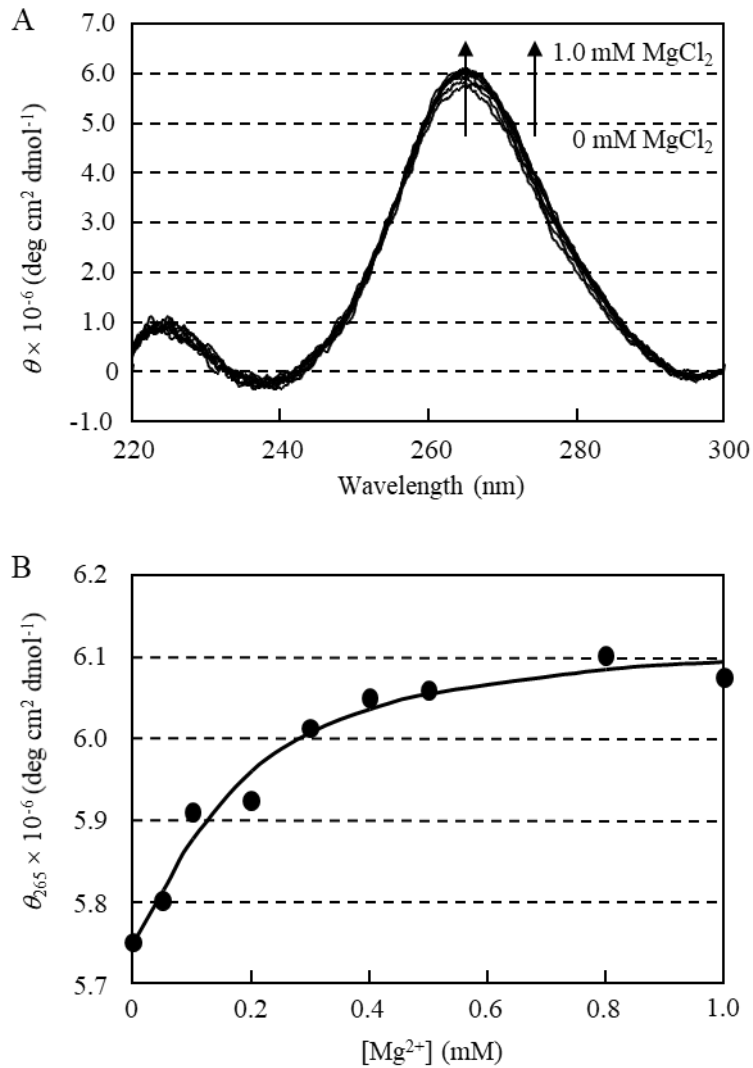


Fig. 1-5 *thiA* リボスイッチに Mg²⁺を添加した時の CD スペクトル

(A) 20°Cでの 10 mM NaCl 及び 0 から 1.0 mM MgCl₂ (265 nm で下から上) を含む 50 mM Tris-HCl (pH 7.0) 中の 0.2 μM *thiA* リボスイッチの CD スペクトル。(B) 10 mM NaCl 及び 0 から 1.0 mM MgCl₂ を含む 50 mM Tris-HCl (pH 7.0) 中の 265 nm での 0.2 μM *thiA* リボスイッチのモル楕円率 (20°C)。

thiA リボスイッチの構造に対する Mg^{2+} の影響を調べるため、ネイティブ PAGE を行った。Fig. 1-6A は、10 mM NaCl、0 または 1.0 mM $MgCl_2$ を含む 50 mM Tris-HCl (pH 7.0) での *thiA* リボスイッチの 4°C におけるネイティブ PAGE を示したものである。*thiA* リボスイッチは 0 及び 1.0 mM Mg^{2+} でほぼ同じように移動し、 Mg^{2+} がリボスイッチの全体的な構造に影響を与えないことが確認できた。これらの結果は、*thiA* リボスイッチが Mg^{2+} の有無にかかわらず A 型ヘリックスを形成していた CD スペクトルの結果と一致していた。さらに、*thiA* リボスイッチの構造の熱安定性に対する Mg^{2+} の影響を調べた。Fig. 1-6B は、260nm における 0 または 1.0 mM $MgCl_2$ 、10 mM NaCl を含む 50 mM Tris-HCl (pH 7.0) 中の 0.2 μ M *thiA* リボスイッチの UV 融解曲線を示したものである。UV 融解曲線の結果から、1.0 mM Mg^{2+} によって *thiA* リボスイッチの構造の明確な遷移と安定化を示す一方で、*thiA* リボスイッチが Mg^{2+} に関係なく特定の構造を形成することが明らかとなった。Serganov らは、グアニン結合型リボスイッチとグアニンの複合体が Mg^{2+} なしで形成され、2.0 mM Mg^{2+} が完全な複合体形成をもたらすことを NMR で示しており、 Mg^{2+} に関係なくリボスイッチが適切に折りたたまれることが示唆された (Serganov et al., 2004)。したがって、 Mg^{2+} は *thiA* リボスイッチの局所的なコンフォメーション変化を誘発すると考えられた。

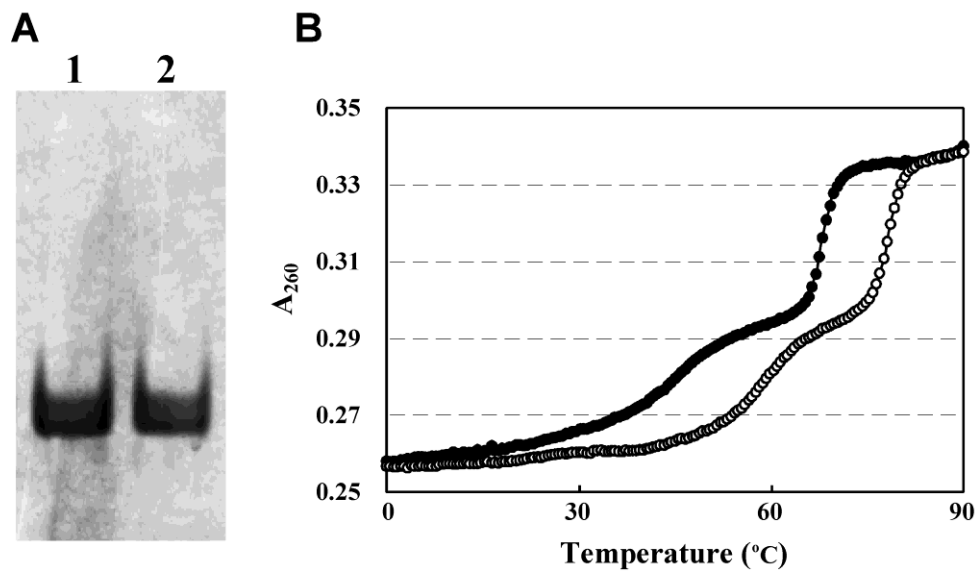


Fig. 1-6 *thiA* リボスイッチのネイティブ PAGE と UV 融解曲線

(A) 10 mM NaCl (レーン 1) または 10 mM NaCl と 1.0 mM $MgCl_2$ (レーン 2) を含む 50 mM Tris-HCl (pH 7.0) 中の 0.2 μ M *thiA* リボスイッチのネイティブ PAGE。(B) 0 mM $MgCl_2$ (●) あるいは 1.0 mM $MgCl_2$ (○)、10 mM NaCl を含む 50 mM Tris-HCl (pH 7.0) 中の 0.2 μ M *thiA* リボスイッチの UV 融解曲線。UV 融解曲線は、260nm での吸光度によって記録した。

1-4 考察

これまで、麹菌 *Aspergillus oryzae* RIB40 の *thiA* 遺伝子の 5'-UTR のイントロン内に TPP 結合型リボスイッチ様配列が発見された (Kubodera et al., 2003)。また、チアミン存在下で *A. oryzae* を培養すると *thiA* の発現が抑制されることを見出した。さらに、このリボスイッチ様配列の一部を欠失させることで、*thiA* 遺伝子の発現制御が解除されることが明らかとなっていた。チアミンは麹菌に取り込まれると TPP に変換されることから、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示唆されたが (Kubodera et al., 2003)、このリボスイッチ様配列に TPP が結合してリボスイッチとして機能するかは明確ではなかった。この配列を m-fold (Zuker, 2003) で推定二次構造を算出したところ、*E. coli* 由来の *thiM* リボスイッチの TPP 結合部位と非常によく似ていた (Winkler et al., 2002a)。また、*thiA* リボスイッチ様 RNA に対する TPP の K_a 値は 20°C、1.0 mM Mg^{2+} 存在下で $(50 \pm 34) \times 10^6 M^{-1}$ であり、TPP が *thiA* リボスイッチ様 RNA に直接結合した。つまり、*thiA* リボスイッチ様 RNA は TPP 結合型リボスイッチとして機能することが明らかとなった。興味深いことに、*thiA* リボスイッチと TPP との K_a 値は、 Mg^{2+} の非存在下で $(1.2 \pm 0.6) \times 10^6 M^{-1}$ に減少することが見出され、TPP と *thiA* リボスイッチの結合は、 Mg^{2+} に依存的であることが認められた。さらに、RNA の三次構造には一価や二価カチオンが重要な役割を果たすことが知られているが (Shiman et al., 2000、Willick et al., 1973)、*thiA* リボスイッチと TPP の結合において、 Na^+ 、 K^+ 、 Ca^{2+} には Mg^{2+} の代替の機能はなかった。一般に、RNA への Mg^{2+} の結合は、RNA の構造安定性に必要であり、活性構造の形成を促進する (Misra et al., 1998)。さらに、グアニン依存性リボスイッチに結合する代謝物の結合定数は、 Mg^{2+} 濃度の増加とともに増加することが知られている (Batey et al., 2004)。これらの結果と本研究で決定された定量的パラメーターから、 Mg^{2+} がリボスイッチへの代謝物の結合を制御できることが明確となった。また、 Mg^{2+} の濃度変化に対する *thiA* リボスイッチのモル楕円率 (Fig. 1-5B) と TPP 結合の推定 K_a 値の両方が、1.0 mM

Mg²⁺の存在下で最大に達した (Table 1-1)。Mg²⁺の生理的イオン濃度が 0.2 から 1 mM 付近であるため (Batey et al., 2004)、これらの結果は、さまざまな RNA と同様に、生理的条件下で *thiA* リボスイッチの構造変化を制御するために Mg²⁺の結合が不可欠であることが明確となった。

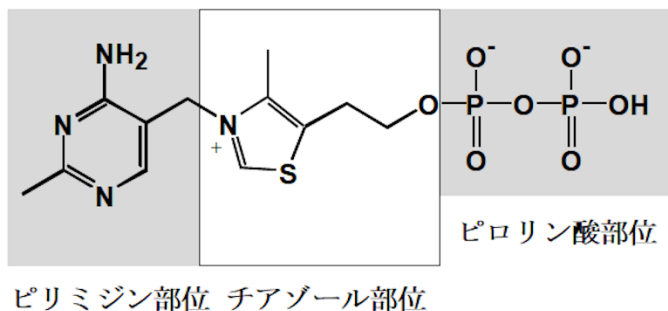
Serganov らは、*E. coli* 由来の *thiM* リボスイッチの TPP 結合部位の結晶構造解析を行った (Serganov et al., 2006)。TPP はピリミジン部位とチアゾール部位とピロリン酸部位からなり (Fig. 1-7A)、TPP のピリミジン部位は、*thiM* リボスイッチの P2 と P3 の間にあるバルジグループと相互作用し、ピロリン酸部位が P4 と P5 の間にあるバルジグループと相互作用することが明らかとなった。興味深いことに、ピロリン酸部位は 2 つの Mg²⁺ を介して、バルジグループと相互作用していた。Thore らは、真核生物である *Arabidopsis thaliana* 由来の TPP 結合型 *thiC* リボスイッチの TPP 結合部位の結晶構造解析を行った (Thore et al., 2006)。このリボスイッチも *thiM* リボスイッチと同様の立体構造を取り、TPP のピリミジン部位は、P2 と P3 の間にあるバルジグループと相互作用し、ピロリン酸部位が P4 と P5 の間にあるバルジグループと相互作用していた。一方、ピロリン酸部位は 1 つの Mg²⁺ を介して、バルジグループと相互作用していた点は、*thiM* リボスイッチと異なっていた。*thiA* リボスイッチへの Mg²⁺ 結合部位の位置や数は不明であるが、*E. coli* 由来の *thiM* リボスイッチや *A. thaliana* 由来の *thiC* リボスイッチの報告を参考に、*thiA* リボスイッチへの TPP 結合における Mg²⁺ の役割を Fig. 1-7B に示した。このスキームでは、リボスイッチの TPP と結合できる構造と結合できない構造の 2 つの構造状態間を生理学的濃度の Mg²⁺ が制御することで、TPP センサーになることを示した。

今回の発見から、*thiA* 遺伝子の 5'-UTR のイントロン内に存在する TPP 結合型リボスイッチ様配列に TPP が直接結合し、遺伝子発現を制御することが明らかとなるとともに、真核生物の *thiA* リボスイッチにおける Mg²⁺ の 2 つの注目すべき役割が明確となった。まず、高濃度の一価カチオンでは誘導されない *thiA* リボスイッチのアクティブな三次構造は、1.0 mM Mg²⁺ で十分に安定化できる。また、*thiA* リボスイッチに結合する

Mg²⁺は、*thiA* リボスイッチと TPP の間の相互作用を制御することができる。したがって、リボスイッチの機能は代謝物だけでなく、生理学的条件下での濃度の Mg²⁺によっても制御できると言える。

A

チアミンピロリン酸 (TPP)



B

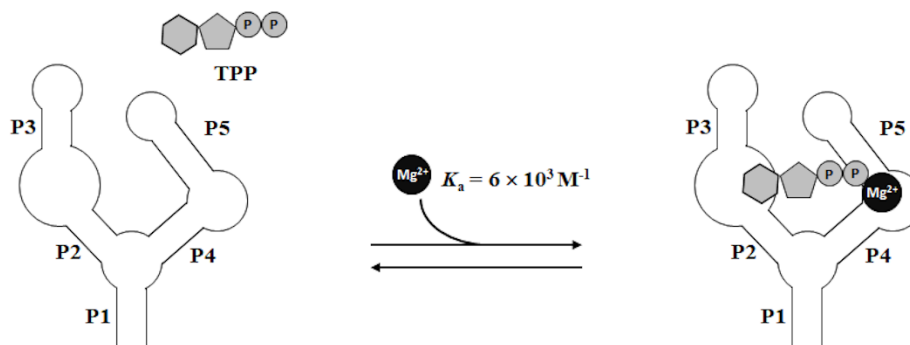


Fig. 1-7 チアミンピロリン酸 (TPP) の化学構造と *thiA* リボスイッチの TPP と Mg²⁺ の関係

(A) TPP の化学構造。(B) Mg²⁺ によって誘導される *thiA* リボスイッチへの TPP の結合の概略図。

第 2 章

thiA リボスイッチの選択的スプライシング部位を利用した遺伝子発現を促進するリボスイッチの開発

要約

本研究では、麴菌 *A. oryzae* 由来の *thiA* リボスイッチによる選択的スプライシング部位を明らかにし、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、遺伝子発現を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 非存在時はスプライシングが起らず、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り、遺伝子発現を正に制御することに成功した。

2-1 緒言

バクテリアで機能する天然のリボスイッチには結合するリガンドにより、さまざまな種類が存在するが (Breaker, 2011, Breaker, 2012, Serganov et al., 2012, Serganov et al., 2013)、真核生物における天然のリボスイッチは TPP 結合型リボスイッチだけである (Wachter, 2010, Clingman et al., 2013, Breaker, 2018)。TPP 結合型リボスイッチのみバクテリアと真核生物で発見され (Winkler et al., 2002a, Sudarsan et al., 2003)、*Bacillus anthracis* (Welz et al., 2007)、*E. coli* (Lang et al., 2007, Edwards et al., 2006, Serganov et al., 2006)、*Arabidopsis thaliana* (Thore et al., 2006)、*Neurospora crassa* (Cheah et al., 2007) 由来の TPP 結合型リボスイッチの構造や遺伝子調節のメカニズムが詳細に研究されている。バクテリア由来の TPP 結合型リボスイッチは、TPP がリボスイッチに結合することで

mRNA の構造が変化し、SD 配列にリボソームが結合できなくなり翻訳が抑制される (Fig. 1)。一方、真核生物で報告されている TPP 結合型リボスイッチの遺伝子制御メカニズムはバクテリアとは異なる。Cheah らは、糸状菌 *N. crassa* 由来 *NMT1* 遺伝子の 5'-UTR に存在する TPP 結合型リボスイッチが TPP の有無で選択的スプライシングを制御することで、翻訳を制御することを明らかにした (Cheah et al., 2007)。*A. oryzae* 由来の *thiA* リボスイッチの TPP 結合部位も *thiA* 遺伝子の 5'-UTR のイントロン内に存在する。最小培地へのチアミン添加の有無によって、麴菌の *thiA* の 5'-UTR の mRNA の長さが変化したことから、*thiA* リボスイッチが選択的スプライシングを制御することが考えられていたが、スプライシング部位は特定されていなかった (Kubodera et al., 2003)。

A. oryzae は優れたタンパク質生産能力を持つことが知られており、有用なタンパク質を大量に生産するための宿主として有用な微生物である (Ichishima, 2016)。タンパク質を大量生産する際に注意すべき点は、宿主に対する目的タンパク質の毒性が挙げられる。特に、所望の有用タンパク質が宿主細胞の増殖を阻害する場合、そのタンパク質を大量生産することは困難である。この問題を解決する方法として、有用タンパク質の生産を抑制しながら宿主微生物を増殖させ、宿主が十分に増殖した後にタンパク質を生産させることが挙げられる (Studier et al., 1990)。つまり、タンパク質生産のための「スイッチ」を人工的に使用して、いつでもタンパク質生産を開始できることが望ましい。*thiA* リボスイッチを遺伝子制御スイッチとして使用する場合、あらゆる有用なタンパク質の産生を *A. oryzae* によって制御することができる (Shoji et al., 2005)。しかし、*thiA* リボスイッチは、TPP 結合によって遺伝子発現を負に制御する「OFF リボスイッチ」であり、制御のしやすさという面では TPP の結合によって遺伝子発現を正に制御する「ON リボスイッチ」の方がより望ましい。

そこで、本研究では、*thiA* リボスイッチのスプライシング部位を明らかにするとともに、その選択的スプライシングを応用して、TPP に応答して遺伝子発現を正に制御することができる「ON リボスイッチ」の設計を試みた。

2-2 方法

2-2-1 β -グルクロニダーゼレポータープラスミドの構築と形質転換

PCR はサーマルサイクラー PC-801 (ASTEC) を用いた。すべてのプライマーの配列は Table 2-1 に示した。 *thiA* の -729 から -1 の範囲の 5'-UTR は、 *A. oryzae* RIB40 のゲノム DNA を鋳型にしてプライマー THIA-F と THIA-R を使用して PCR で増幅した。PCR は KOD-Plus (Toyobo) を使用し、50 μ L 反応液は 94°C で 2 分間インキュベートした後に、94°C で 15 秒、55°C で 30 秒、68°C で 60 秒の PCR を 30 回行い、68°C で 5 分間アニーリングを行った。増幅した DNA 産物を TaKaRa BKL Kit (Takara) でリン酸化し、 β -グルクロニダーゼ (GUS) レポータープラスミド pNG1 (Kubodera et al., 2003) (Fig. 2-1) の *Sma*I 部位に挿入して、pNG*thiA* を得た。E1 リボスイッチは pNG*thiA* を鋳型にして構築した。E1 リボスイッチの 5'-部位はプライマー THIA-F と E1-R を使用して PCR によって増幅し、3'-部位はプライマー E1-F と THIA-R を使用した PCR によって増幅した。次に、増幅した 5'-及び 3'-部位を混合し、プライマー THIA-F と THIA-R を使用した PCR によって 5' 及び 3'-部位を結合して、増幅した。PCR は、KOD-Plus (Toyobo) を使用して実施し、50 μ L 反応液は 94°C で 2 分間インキュベートした後、94°C で 15 秒間、55°C で 30 秒間、68°C で 60 秒間の PCR を 20 回行い、68°C で 5 分間アニーリングした。リボスイッチ E2、E3、E4 は、E1 リボスイッチと同じ方法で構築した。各 5'-及び 3'-部位の増幅に使用した PCR プライマーは以下の通りである。E2 リボスイッチの 5'-部位は THIA-F と E2-R で、3'-部位は E2-F と THIA-R を使用した。E3 リボスイッチの 5'-部位は THIA-F と E3-R で、3'-部位は E3-F と THIA-R を使用した。E4 リボスイッチの 5'-部位は THIA-F と E4-R で、3'-部位は E4-F と THIA-R を使用した。増幅した 5' 及び 3'-部位を混合し、プライマー THIA-F と THIA-R を使用した PCR によって 5' 及び 3'-部位を結合して、増幅した。増幅した E1、E2、E3、E4 リボスイッチの DNA 産物は TaKaRa BKL Kit (Takara) を使用してリン酸化し、pNG1 の *Sma*I サイトに挿入して、それぞれ pNGE1、pNGE2、pNGE3、pNGE4 を得た。すべての PCR 産物の塩基配列は、ABI PRISM 310 Genetic

analyzer (Applied Biosystems) を用いてプライマー RT-R と M13RV で確認した。プラスミドの操作中には宿主として *E. coli* DH5a を使用し、*A. oryzae* niaD300 (*niaD*) の形質転換は、Gomi (Gomi et al., 1987) らが報告した方法に準じて行った。*A. oryzae* niaD300 (*niaD*) を 100 mL デキストリン-ペプトン培地 (20 g/L デキストリン、10 g/L ポリペプトン、5 g/L KH_2PO_4 、1 g/L NaNO_3 、0.5 g/L $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、pH 6.5) で 30°C、145 rpm、20 時間回転振とう培養後、得られた菌体を滅菌水で洗浄した。この菌体を 10 mL プロトプラスト化緩衝液 (10 mM リン酸ナトリウム緩衝液 pH6.0、0.8 M NaCl、0.5 mg/mL Yatalase (Takara)) に懸濁し、30°C、2 時間、穏やかに振とうすることによりプロトプラスト化した。得られたプロトプラストを乾熱滅菌した 3G-3 グラスフィルターでろ過して残存する菌体を除去した後、20 mL の 0.8 M NaCl 溶液で 2 回洗浄した。次にこのプロトプラストを TF1 液 (0.8 M NaCl、10 mM CaCl_2 、10 mM トリシュー塩酸緩衝液、pH 8.0) に 2×10^8 個/mL となるように懸濁後、0.2 容量の TF2 液 (40% (w/v) PEG4000、50 mM CaCl_2 、50 mM トリシュー塩酸緩衝液、pH 8.0) を加えコンピテントセルを調製した。0.2 mL コンピテントセル液に導入する各プラスミドを 50 mg 加え、氷上で 30 分静置後、1 mL TF2 液を加えて 15 分間静置した。これに 8.5 mL TF1 液を添加後、1800 rpm、5 分間遠心分離してプロトプラストを回収し、再度 0.2 mL TF1 液に懸濁した。このプロトプラスト懸濁液を再生用下層最小平板培地 (20 g/L Glucose、6 g/L NaNO_3 、1.52 g/L KH_2PO_4 、0.52 g/L KCl、0.52 g/L $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、0.8 M NaCl、20 g/L agar、pH 6.5) 上へのせ、さらに、あらかじめ 45°C に保温しておいた再生用上層最小培地 (下層培地の agar 濃度を 5 g/L にしたもの) 5 mL を重層してプロトプラストを包埋した。30°C、10 日間培養後、生育してきた形質転換体を釣菌した。

2-2-2 RT-PCR による解析

約 5×10^7 個の *A. oryzae* 形質転換体の分生子胞子を 100 mL の Czapeck Dox 最小培地 (20 g/L glucose、6 g/L NaNO_3 、1.52 g/L KH_2PO_4 、0.52 g/L KCl、0.52 g/L $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、pH 6.5) に接種し、10 μM チアミン添加試験区と非添加試験区を設けて、180 rpm で 48 時間振とうしながら 30°C でイ

ンキュベートした。菌体は 3G-1 ガラスフィルターを使用して培養液から濾過し、滅菌水で 3 回洗浄して 2 枚の濾紙で挟んで脱水し、液体窒素で凍結してから乳鉢で粉碎した。

リボスイッチの RNA の調製と、サーマルサイクラー PC-801 (ASTEC) を用いた逆転写ポリメラーゼ連鎖反応 (RT-PCR) による解析は、次の通り行った。粉碎菌体からの全 RNA は、ISOGEN (Nippon gene) を用いて、製造元の説明書に従って調製した。次に、Takara One Step RNA PCR キット (AMV) (Takara) を製造元の説明書に従って用い、1 μ g のトータル RNA を逆転写及び増幅した。PCR プライマーは RT-F と RT-R を使用し、50 μ L 反応液を 50°C で 30 分間インキュベート後に 94°C で 2 分間インキュベートし、94°C で 30 秒間、60°C で 30 秒間、72°C で 2 分間の PCR を 30 回行った。増幅産物は、1 \times TBE バッファー中の非変性 5% (w/v) アクリルアミドゲル電気泳動 (ネイティブ PAGE) によって分離し、Gelstar[®] Nucleic Acid Stain (Takara) で染色した。増幅産物の塩基配列の確認をするため、ゲルから各増幅産物を切り出して滅菌水で抽出後、プライマー RT-F と RT-R を用いてサーマルサイクラー PC-801 (ASTEC) にて PCR を行った。PCR は 50 μ L 反応液で、Ex Taq (Takara) を使用し、94°C で 2 分間インキュベートした後、94°C で 30 秒間、55°C で 30 秒間、72°C で 60 秒間の PCR を 30 回行い、72°C で 5 分間アニーリングした。各 PCR 産物は DNA Ligation Kit Ver.2.1 (Takara) を用いて、製造元の説明書に従い T-Vector pMD20 (Takara) に TA クローニングした。*E. coli* DH5 α を用いて増幅したプラスミドを QIAprep Spin Miniprep Kit (QIAGEN) を用いて製造元の説明書に従って抽出し、プライマー M13RV と M13M4 を用いて ABI PRISM 310 Genetic analyzer (Applied Biosystems) で塩基配列を確認した。

2-2-3 GUS レポーター試験

約 5×10^7 個の *A. oryzae* 形質転換体の分生子胞子を 100 mL の Czapeck Dox 最小培地に接種し、10 μ M チアミン添加試験区と非添加試験区を設けて、180 rpm で 48 時間振とうしながら 30°C でインキュベートした。菌糸

体からの無細胞抽出物は Kubodera らの方法に従って調製し (Kubodera et al., 2000)、Jefferson らの方法に従って、基質として *p*-ニトロフェニル- β -D-グルクロニドを使用して GUS 活性を分光的に測定した (Jefferson et al., 1986)。詳細は以下の通りである。細胞は 3G-1 ガラスフィルターを使用して培養液から濾過し、滅菌水で 3 回洗浄して 2 枚の濾紙で挟んで脱水し、液体窒素で凍結してから乳鉢で粉碎した。次に、破壊した細胞 0.5 g を、5 mL の抽出バッファー (50 mM NaH₂PO₄-2H₂O、10 mM 2-メルカプトエタノール、0.1% (w/v) Triton X-100、10 mM エチレンジアミン四酢酸 (EDTA)-Na、0.1% (w/v) *N*-ラウロイルサルコシン、pH 7.0) に懸濁し、室温で 1 分間ボルテックスした。懸濁液を 15,000 rpm で 10 分間遠心分離し、0.05 mL の上清を粗酵素溶液として、0.45 mL の GUS 反応溶液 (50 mM NaH₂PO₄-H₂O、10 mM 2-メルカプトエタノール、0.1% (w/v) Triton X-100、1 mM *p*-ニトロフェニル- β -D-グルクロニド、pH7.0) に加えた。37°C で 30 分間反応させた後、反応停止溶液として 0.2 mL の 2.5 M 2-アミノ-2-メチル-1,3-プロパンジオールを混合した。遊離 *p*-ニトロフェノールの量を測定するために、波長 415 nm での反応溶液の吸光度を測定した。また、ウシ血清アルブミン (BSA) を標準としてタンパク質アッセイキット (Bio-Rad) を使用して、粗酵素溶液のタンパク質量を定量した。GUS 活性は基質 *p*-ニトロフェニル- β -D-グルクロニドから 1 分間に遊離する 1 nmol の *p*-ニトロフェノールを 1 U とした。

Table 2-1 PCR プライマーの配列

プライマー	配列
THIA-F	5'-GGCCCGGGGACAGACGGGCAATTGATTACG-3'
THIA-R	5'-CCGTCGACGTTTCAAGTTGCAATGAC-3'
E1-R	5'-GACGTTACCTAAGATACATTGTCGGTTGGTTTGG-3'
E1-F	5'-CCAAACCAACCGACAATGTATCTTAGGTAACGTC-3'
E2-R	5'-CCAAAGACGTAAGATACATTGTCGGTTGGTTTGG-3'
E2-F	5'-CCAAACCAACCGACAATGTATCTTACGTCTTTGG-3'
E3-R	5'-CACGCCAAAGACGTTACATTGTCGGTTGGTTTGG-3'
E3-F	5'-CCAAACCAACCGACAATGT-AACGTCTTTGGCGTG-3'
E4-R	5'-GGCCACGCCAAAGTACATTGTCGGTTGGTTTGG-3'
E4-F	5'-CCAAACCAACCGACAATGTACTTTGGCGTGGGCC-3'
RT-F	5'-TTCCCAAACCAACCGACAAT-3'
RT-R	5'-TGATCAATTCCACAGTTTTC-3'
M13RV	5'-CAGGAAACAGCTATGAC-3'
M13M4	5'-GTTTTCCAGTCACGAC-3'

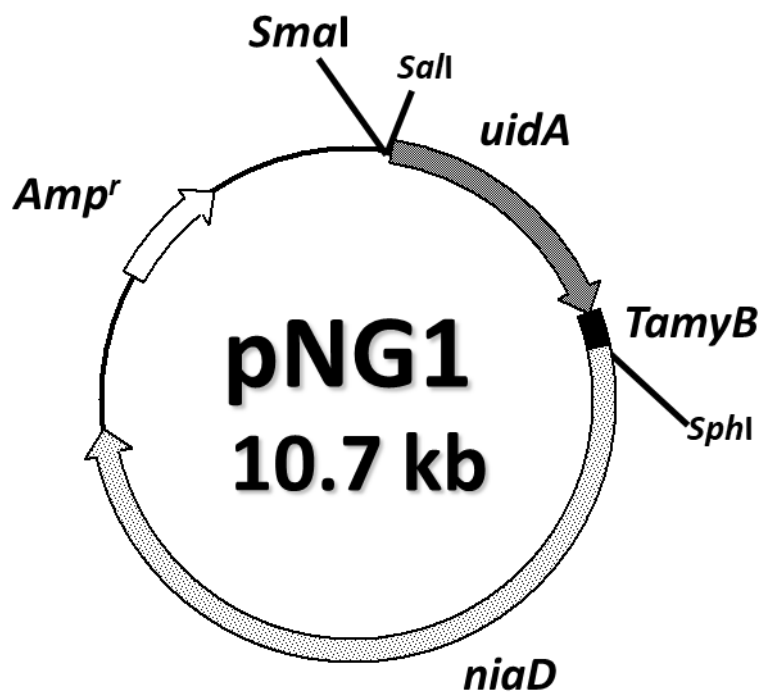


Fig. 2-1. GUS レポータープラスミド pNG1

E. coli 由来 GUS 遺伝子である *uidA* と *A. oryzae* 由来 *amyB* のターミネーターの融合遺伝子を持ち、選択マーカーとして *Amp^r* と *niaD* を持つ。

2-3 実験結果

2-3-1 *thiA* リボスイッチのスプライシング部位

まず、RT-PCR と DNA シークエンシングによってイントロンのスプライシング部位を特定した。*thiA* の 5'-UTR を含むプロモーター-GUS レポーター遺伝子プラスミド (pNG*thiA*) を構築した。このプラスミドを使用して *A. oryzae* を形質転換し、形質転換細胞を 10 μ M チアミン存在下もしくは非存在下で培養した。細胞はチアミンを取り込み、それを自発的に TPP に変換するので (Kubodera et al., 2003)、外部刺激としてチアミンを適用することにより、TPP 結合型リボスイッチの機能を確認できる。全 RNA を細胞から抽出し、Fig. 2-2A に示すように、プライマー RT-F と RT-R を用いて RT-PCR で pre-mRNA とスプライシングされた成熟 mRNA を増幅した。RT-PCR 産物を 5% (w/v) アクリルアミドの非変性ゲルで分離して、それぞれのバンドの塩基配列を確認したところ (Fig. 2-2B)、チアミン非存在下で培養した時は、pre-mRNA、イントロンの一部が残った未成熟 mRNA、イントロンが完全に抜けた成熟 mRNA の 3 種類の mRNA であった。一方、チアミン存在下で培養した時は、pre-mRNA、イントロンの一部が残った未成熟 mRNA の 2 種類の mRNA が主に確認でき、成熟 mRNA もわずかに存在していた。特に未成熟 mRNA のバンドがチアミン非存在下に比べて濃くなっていた。チアミン非存在下で生じた成熟 mRNA は、5'-スプライシング部位が翻訳開始部位 (+1) に対して -338 の位置であることが分かった (Fig. 2-1C)。チアミン存在下でも僅かに成熟 mRNA が見られたことは、チアミン存在下でもタンパク質が発現し、GUS 活性が僅かに残存した結果と一致していた。さらに、チアミン存在下で増加した未成熟 mRNA は、5'-スプライシング部位が -253 の位置でスプライシングが起こり、結果的に 85 塩基のイントロンが残ることが分かった。この残存したイントロンには、-262、-290、-299 の位置に 3 つの潜在的な翻訳開始コドンが存在した (Fig. 2-2C)。 *N. crassa* OR74A の TPP 結合型 *NMT1* リボスイッチも TPP 結合時にイントロンが残り、その中にある潜在的な翻訳開始コドンがタンパク質発現を低下させる可能性があると報告されて

いる (Cheah et al., 2007)。 *thiA* リボスイッチも同様に、3つの潜在的な開始コドンがコドンのフレームシフトを誘発し、タンパク質の不活性化につながったと推察された。以上の結果から、 *thiA* リボスイッチが TPP の結合によって 5'-スプライシング部位を変化させる選択的スプライシングによって、翻訳を制御していることが明らかとなった。

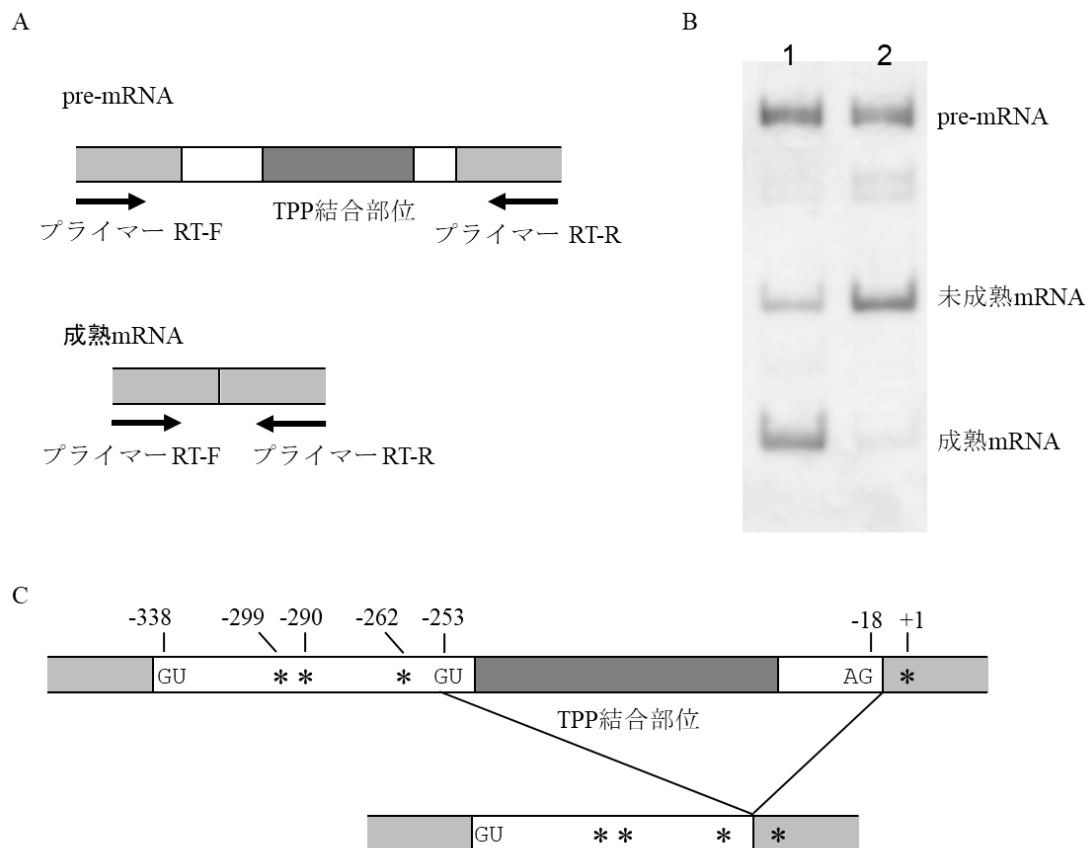


Fig. 2-2 *thiA* リボスイッチのスプライシング部位

(A) プライマー RT-F と RT-R を用いて RT-PCR で pre-mRNA とスプライシングされた成熟 mRNA を増幅した。薄い灰色箇所はエクソン、白い箇所はイントロン、濃い灰色は TPP 結合部位を示した。(B) RT-PCR 産物は 5% (w/v) アクリルアミドの非変性ゲルで分離した。レーン 1 と 2 は、それぞれチアミン非存在下と存在下での RT-PCR 産物。(C) *thiA* の 5'-UTR における pre-mRNA と未成熟 mRNA 産物を示した。アスタリスクは翻訳開始コドンを、数字は翻訳開始部位を +1 とした時の塩基配列の場所を示した。

2-3-2 *thiA* リボスイッチの選択的スプライシングを利用した ON リボスイッチの構築

thiA リボスイッチの TPP 結合による選択的スプライシング部位に基づいて、チアミンに応答して遺伝子発現を正に制御できる ON リボスイッチの設計を試みた。チアミンの存在下でのスプライシングによって生成されるイントロンの 85 塩基に焦点を当て、このイントロン配列を除去することで、チアミンの存在下で不適切なスプライシングが進行するのを防ぐことができると考えた (Fig. 2-3A)。そこで、*thiA* リボスイッチのイントロンの 5'-スプライシング部位から 85 塩基を除去した E1 リボスイッチを設計した。E1 リボスイッチを含むプロモーター-GUS レポーター遺伝子プラスミドを構築して *A. oryzae* niaD300 (*niaD*) を形質転換した。チアミンの非存在下及び存在下で形質転換 *A. oryzae* を培養して GUS 活性を測定した (Fig. 2-3B)。チアミンの非存在下でのリボスイッチの GUS 活性を 1.0 に標準化し、実際の GUS 活性 (U · mg⁻¹ protein) は、各棒グラフの上部に示した。野生型 *thiA* リボスイッチの GUS 活性は、チアミン非存在下で 3708 ± 15 U · mg⁻¹ protein、チアミン存在下では 106 ± 1.3 U · mg⁻¹ protein であった。この結果から、外因性チアミンが細胞内に取り込まれて TPP に変換され、野生型 *thiA* リボスイッチに TPP が結合し、遺伝子発現が負に制御されたことが確認できた。一方、E1 リボスイッチの GUS 活性は、チアミン非存在下で 357 ± 6.2、チアミン存在下では 450 ± 12 U · mg⁻¹ protein だった。外因性チアミンへの応答は逆になったが、E1 リボスイッチの GUS 活性の差は、遺伝子制御という点では不十分であった (Fig. 2-3B)。

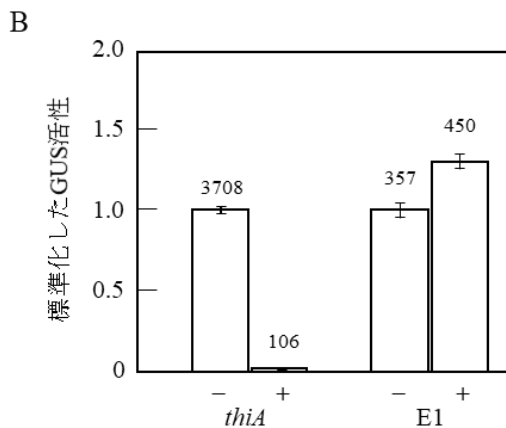
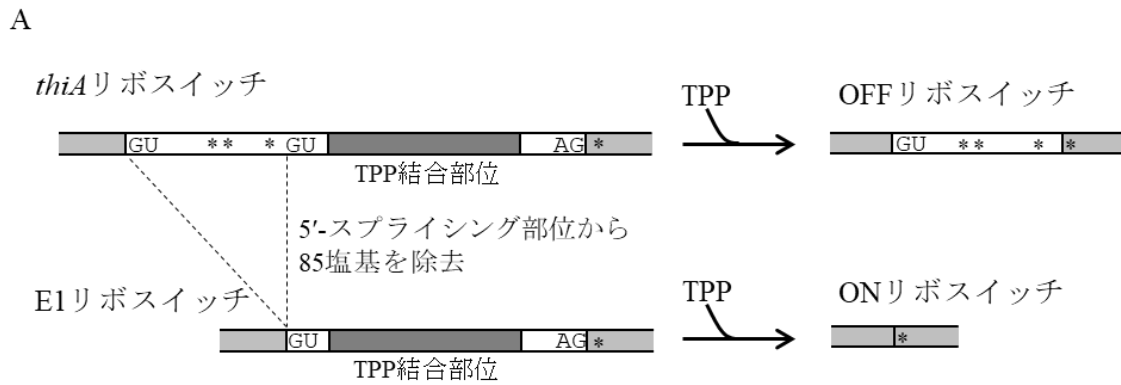


Fig. 2-3 人工 ON リボスイッチ (E1) の設計と GUS 活性

(A) 人工 ON リボスイッチ (E1) は、*thiA* リボスイッチを基にして設計した。灰色、白色、濃い灰色の長方形はそれぞれ、エキソン、イントロン、TPP 結合部位を、アスタリスクは翻訳開始コドンを示した。(B) チアミン非存在下 (-) と存在下 (+) での各リボスイッチの GUS 活性。チアミンの非存在下でのリボスイッチの GUS 活性を 1.0 に標準化した。実際の GUS 活性 (U-mg⁻¹ protein) は、各バーの上部に示した。

次に、TPP の有無による ON リボスイッチの正と負の遺伝子制御差を改善することを試みた。pre-mRNA のスプライシング反応は 2 つの化学的ステップからなる (Beggs, 2002)。最初のステップでは、イントロンの 5'-スプライシング部位の 5'-リン酸基が、分枝部位のアデニン (A) の 2'-OH 基からの求核攻撃によって切断されて、分枝部位の 2'-OH 基と 5'-スプライシング部位の 5'-リン酸基との間で 2', 5'-ホスホジエステル結合が形成される (ラリアット構造)。次のステップでは、5'-エキソンの 3'-OH 基が 3'-スプライシング部位の 5'-リン酸を攻撃し、2 つのエキソンのライゲーションとイントロンの切除をもたらす。真菌の場合、イントロンの全長と

5'-スプライシング部位から分枝部位の A までの長さの間には非常に高い相関関係があることが知られている (Kupfer et al., 2004)。 *thiA* リボスイッチの TPP 結合部位は 5'-スプライシング部位と分枝部位の間に存在しており、5'-スプライシング部位と TPP 結合部位の間の長さはスプライシング反応にとって重要である可能性が考えられた。そこで、5'-スプライシング部位と E1 リボスイッチの TPP 結合部位の間の配列を切り詰めて、5'-スプライシング部位と TPP 結合部位の間に長さが異なる E2、E3、E4 リボスイッチを合成した (Fig. 2-4A)。これらのリボスイッチをプロモーター-GUS レポーター遺伝子プラスミドに挿入し、*A. oryzae* を形質転換して E1 リボスイッチと同様に GUS 活性を測定した (Fig. 2-4B)。チアミンの非存在下でのリボスイッチの GUS 活性を 1.0 に標準化し、実際の GUS 活性 ($\text{U} \cdot \text{mg}^{-1} \text{ protein}$) は、各棒グラフの上部に示した。5'-スプライシング部位と E1 リボスイッチの TPP 結合部位の間を切り詰めたリボスイッチの GUS 活性は、E1 リボスイッチよりも低く、13 塩基を削除した E4 リボスイッチは GUS 活性が失われた。しかし、チアミン存在下での E2 と E3 リボスイッチの GUS 活性は、チアミンの非存在下での活性よりもそれぞれ 4.7 倍、4.3 倍高くなった。チアミン存在下における E2 リボスイッチの GUS 活性と *thiA* リボスイッチの GUS 活性が同等であり、*thiA* リボスイッチは遺伝子発現抑制時にも GUS 活性が見られた。前述の通り、*thiA* リボスイッチでは、チアミン存在下でも僅かに成熟 mRNA が確認でき (Fig. 2-2B)、TPP 存在下においてもタンパク質が発現していることが考えられた。一方で、E2、E3 リボスイッチにおける GUS 活性の低下は、転写反応かスプライシング反応に問題があることが考えられた。

次に、RT-PCR を実施して、人工リボスイッチのスプライシング産物の配列を確認した。スプライシングされた mRNA と pre-mRNA は、野生型 *thiA* リボスイッチと同様にプライマー RT-F と RT-R を使用した RT-PCR によって検出し、PCR 産物は非変性 5% (w/v) PAGE で分離した (Fig. 2-4C)。バンド 1、2、3 は、それぞれ pre-mRNA、未成熟 mRNA、成熟 mRNA を示す。バンドをゲルから抽出して、塩基配列を確認したところ、E1 リボスイッチの 5'-スプライシング部位は予想されるスプライシング部

位の 9 塩基下流にあり、イントロンが 9 塩基多く残ることから E1 リボスイッチによって生成される成熟 mRNA 由来のバンドは *thiA* リボスイッチによって生成されるスプライシング産物よりもゆっくりと移動していた。スプライシング部位が 9 塩基下流になった理由は不明であるが、E1 リボスイッチのスプライシング産物の mRNA のバンド強度は、チアミンの存在下と非存在下で同じであり、チアミンによる効果がなかったことが明らかとなった。また、*thiA* リボスイッチに比べ、E2、E3 リボスイッチでは pre-mRNA のバンド強度は強く、成熟 mRNA のバンド強度は弱かった。このことから、E2、E3 リボスイッチの GUS 活性の低下は、転写反応ではなく、スプライシング反応が *thiA* リボスイッチよりも低下したと考えられた。E4 リボスイッチでのスプライシング産物は、RT-PCR では検出されなかった点もスプライシング反応の問題によるものと考えられた。しかし、チアミンの存在下での E2、E3 リボスイッチのスプライシング産物は予想通りの配列であり、そのシグナル強度は、チアミンの非存在下でのシグナルよりも強く、mRNA がチアミンの存在下で非存在下よりも効率的にスプライシングしたことが確認できた。これらの RT-PCR の結果には定量性はないものの、E2 と E3 リボスイッチの DNA シーケンスと GUS 活性の結果も含め、チアミンによって活性化される「ON リボスイッチ」の作製に成功したと言える。

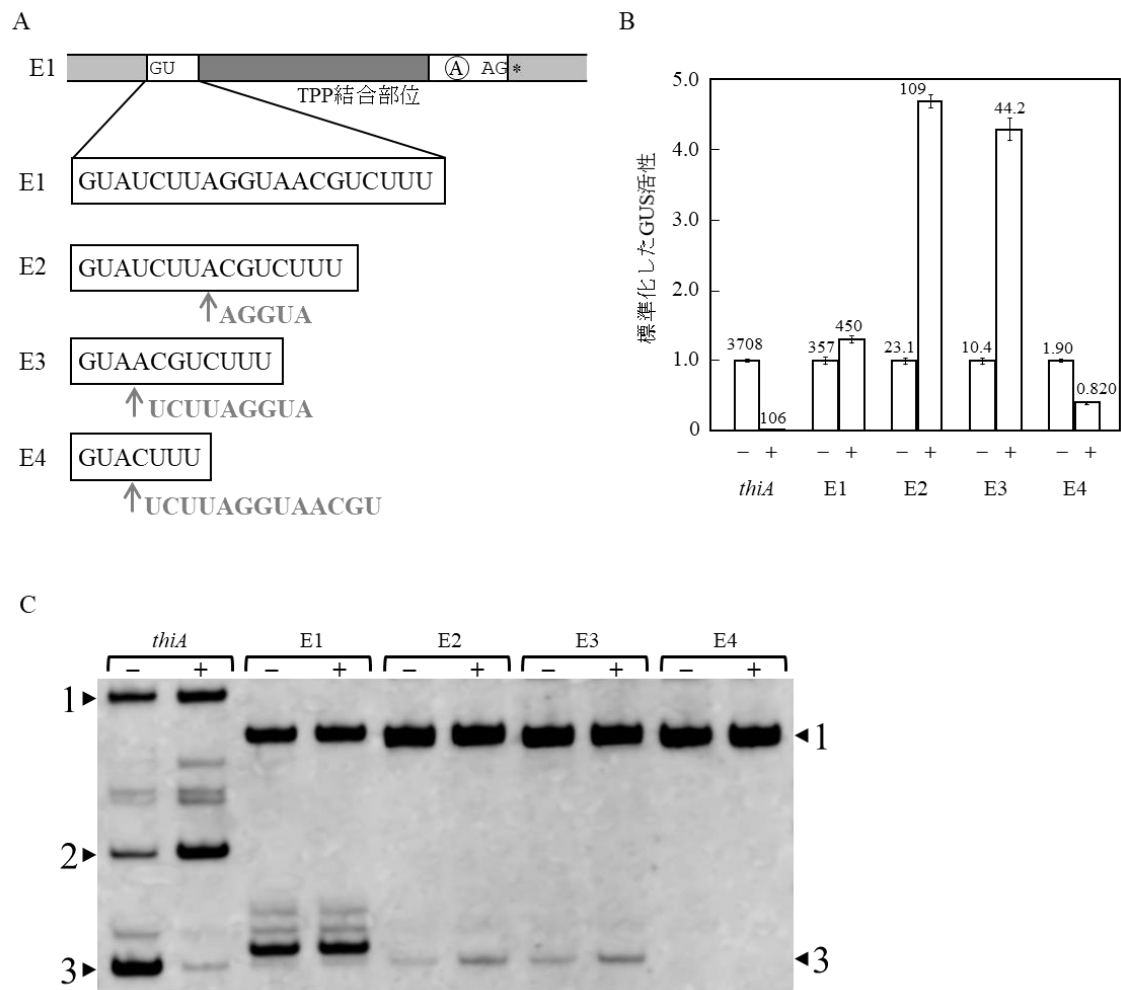


Fig. 2-4 ON リボスイッチの設計と機能解析

(A) E2-E4 リボスイッチの設計。E1 リボスイッチの 5'-側イントロンを削った。灰色のシーケンスと矢印は、それぞれ取り除いた配列と位置を示しており、丸で囲まれた A はスプライシングの分枝部位、アスタリスクは翻訳開始コドンを示した。(B) チアミン非存在下 (-) と存在下 (+) での各リボスイッチの GUS 活性。チアミンの非存在下でのリボスイッチの GUS 活性を 1.0 に標準化した。実際の GUS 活性 (U·mg⁻¹ protein) は、各バーの上部に示した。(C) チアミン非存在下 (-) または存在下 (+) の各リボスイッチのスプライシング産物。スプライシングされた mRNA と pre-mRNA はプライマー RT-F と RT-R を使用した RT-PCR によって検出し、PCR 産物は非変性 5% (w/v) アクリルアミドゲルで分離した。バンド 1、2、3 は、それぞれ pre-mRNA、未成熟 mRNA、成熟 mRNA を示した。

TPP の結合による人工リボスイッチの遺伝子制御を裏付けるには、細胞内でチアミンから生成する TPP に対する人工リボスイッチの結合親和性を *thiA* リボスイッチと比較することが重要である。さまざまな濃度のチアミン存在下での *thiA* と E2 リボスイッチの GUS 活性の最大値を 1 に正規化した結果を Fig. 2-5 に示した。第 1 章で示したように、TPP と *thiA* リボスイッチが 1 : 1 で結合すると考えられたため、また、細胞内でチアミンから生成した遊離の TPP が細胞内のすべての TPP とほぼ同量であると考えられたため、*thiA* と E2 リボスイッチの各データに対し、単一結合部位を仮定するモデルに基づいて平衡パラメーターを推定する以下の式 (Rippe, 1997) に当てはめた。

$$\theta = aK_a [\text{thiamine}] / (1 + K_a [\text{thiamine}]) + b$$

θ : 正規化された GUS 活性、 K_a : チアミン結合の見かけの結合定数、 $[\text{thiamine}]$: チアミンのモル濃度、 a : 基準化因子、 b : 初期 θ 値

30°C でのこれらのリボスイッチへのチアミンの結合の見かけの結合定数は、それぞれ $(3.2 \pm 1.1) \times 10^6$ 、 $(3.5 \pm 0.6) \times 10^6 \text{ M}^{-1}$ であった。チアミンに対するこれら 2 つのリボスイッチの親和性は同一であり、人工リボスイッチが通常の TPP 結合能を有していることが明確となった。

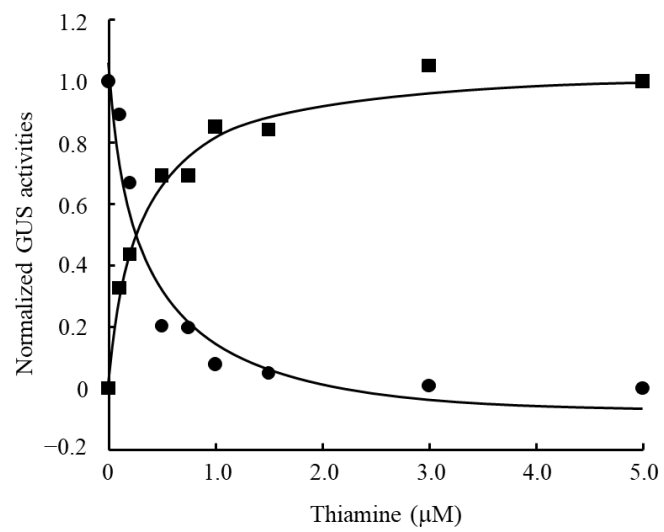


Fig. 2-5 各チアミン濃度での *thiA* (●) 及び E2 (■) リボスイッチの GUS 活性

2-4 考察

本研究では、*thiA* リボスイッチの選択的スプライシングによって生成した mRNA 産物から、スプライシング部位を特定し、そのスプライシング部位を利用して野生型のリボスイッチと逆の遺伝子制御機能を持つ ON リボスイッチの構築を試みた。チアミン添加での *thiA* リボスイッチのスプライシングで残存するイントロンには、3つの潜在的な翻訳開始コドンが存在する (Fig. 2-1C)。 *N. crassa* OR74A の TPP 結合型 *NMT1* リボスイッチは、TPP 結合時でのスプライシングで残存するイントロン内に、翻訳開始コドンが複数存在する。これらの翻訳開始コドンの AUG をすべて AAG に変換したところ、タンパク質発現が回復したことを報告している

(Cheah et al., 2007)。これと同様に、TPP 結合時の *thiA* リボスイッチのスプライシングでは、残存するイントロンに存在するコドンによってフレームシフトが誘発され、タンパク質の不活性化につながったと考えられた。TPP 結合時でのスプライシングで残存するイントロンを取り除いた E1 リボスイッチは、チアミン添加時において野生型 *thiA* リボスイッチよりも GUS 活性が約 4 倍高く、翻訳開始コドンを含むイントロンを除去した効果が認められた。E1 リボスイッチの遺伝子制御の差が約 1.3 倍であったのに対し、E1 リボスイッチよりも 5'-スプライシング部位と TPP 結合部位の長さを短くした E2、E3 リボスイッチの遺伝子制御の差は 4~5 倍であった。真菌におけるイントロンの全長と、5'-スプライシング部位から分枝部位の A までの長さの間には、非常に高い相関関係があると報告されており (Kupfer et al., 2004)、TPP 結合部位と 5'-スプライシング部位の間の長さがリボスイッチの TPP 結合時のスプライシング反応に重要であることが考えられた。Fig. 2-6 に、本研究で作製した ON リボスイッチの TPP 有無におけるスプライシングの制御メカニズムの予想図を示した。TPP 非結合時における ON リボスイッチでは、野生型 *thiA* リボスイッチと同じ位置に 5'-スプライシング部位が存在せず、分枝部位の A が攻撃することができない。一方、TPP 結合時における 5'-スプライシング部位は存在することから、スプライシング反応が進むと考えられる。TPP がリボスイッチに結合していないときは、スプライシング反応が起こらず

イントロンが残ったままであった。この中には潜在的な翻訳開始コドンが-202、-192、-141、-132、-65、-40、-35、-24の位置に存在することから、スプライシング反応が起こらない時はコドンのフレームシフトが誘発され、タンパク質の不活性化につながっていると考えられた。TPP結合部位と5'-スプライシング部位の長さを短くすることでONリボスイッチが構築できたものの、GUS活性が低下した。イントロンの長さを短くすることによってリボスイッチ全体の構造が変化し、TPP結合性が低下した可能性が疑われたが、野生型の*thiA*リボスイッチと比較して、E2リボスイッチのTPP結合性は損なわれていなかった。したがって、GUS活性の低下は、5'-スプライシング部位と分枝部位のAとの距離が近くなったことで、スプライシング反応の最初のステップであるラリアット構造の形成効率が低下したことが考えられた。5'-スプライシング部位とリボスイッチのTPP結合部位の間の長さはさらに最適化する必要がある。

結論として、TPP結合時ではOFFリボスイッチである*thiA*リボスイッチの選択的スプライシングを利用して、人工的なONリボスイッチを設計することに成功した。しかし、このONリボスイッチによって制御される遺伝子発現レベルは低く、タンパク質の生合成を制御するための遺伝子制御ツールとしての実用化には、さらなる検討が必要である。

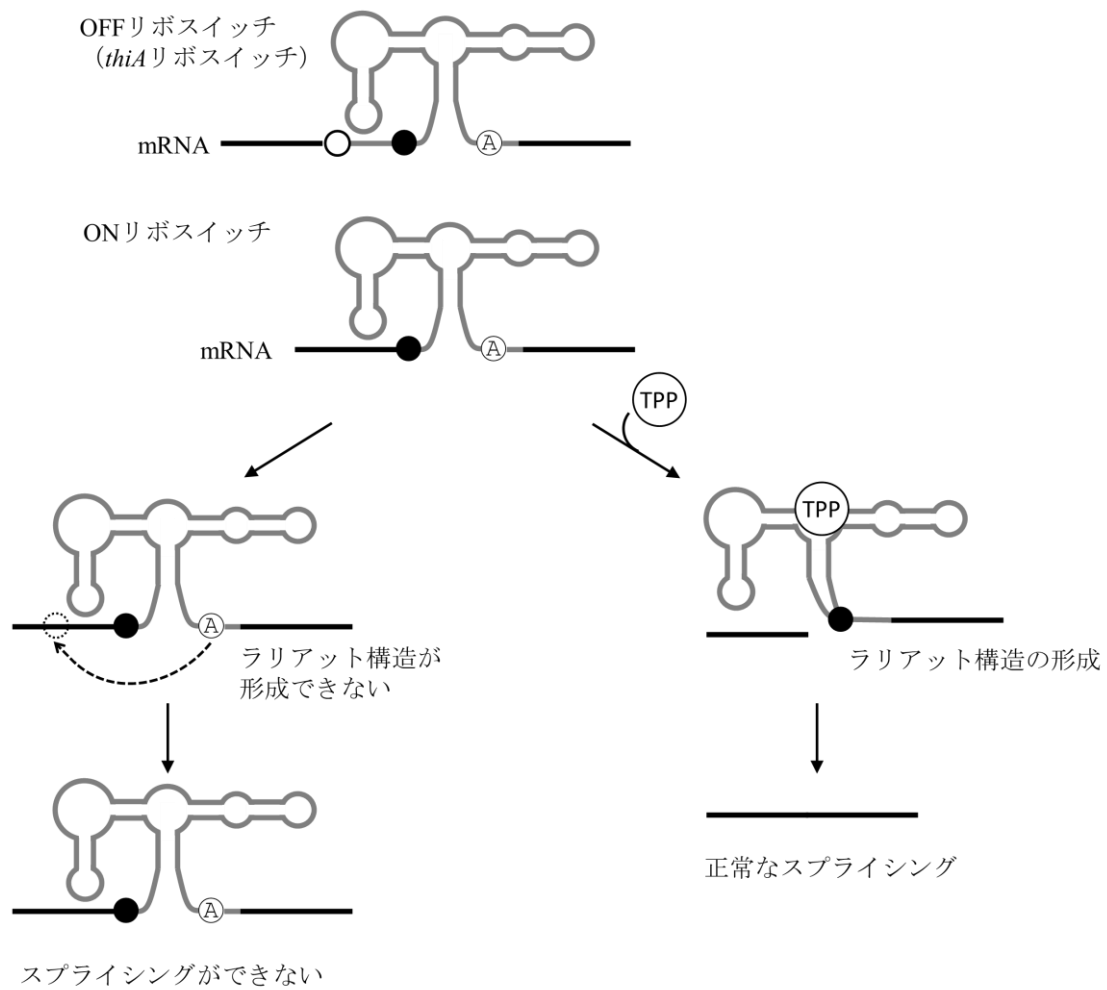


Fig. 2-6 ON リボスイッチの推定遺伝子制御メカニズムの概略図

黒線、灰色線、丸に囲まれた A はそれぞれ、エキソン、イントロン、分枝部位を示した。白丸は *thiA* リボスイッチにおける TPP 非結合時のスプライシング部位、黒丸は TPP 結合時のスプライシング部位を示した。

第 3 章

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

要約

A. oryzae RIB40 由来の *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、タンパク質の生産を抑制する。*thiA* リボスイッチの選択的スプライシングで重要な役割を果たすと考えられる配列を見出し、本配列が TPP 結合部位に存在する特定の配列と塩基対を形成することが選択的スプライシングに重要であることを解明した。*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* で実用的なレベルで発現することが分かった。

3-1 緒言

第 2 章において、*thiA* リボスイッチの選択的スプライシング部位を利用し、チアミンを培地に添加することで遺伝子発現を促進できる ON リボスイッチを構築した。この ON リボスイッチは、*thiA* リボスイッチに TPP が結合することによって残るイントロンを除去し、さらに 5'-スプライシング部位の長さを短くして作製した。しかし、この ON リボスイッチによって制御される遺伝子発現の ON と OFF の差は十分ではなく、ON の時のタンパク質発現レベルも低かった。これは、5'-スプライシング部位と分枝部位の A との距離が近くなったことで、スプライシング反応におけるラリアット構造の形成効率が低下した可能性が考えられた。ON リボスイッチを遺伝子制御ツールとして実用化するためには、チアミンを培地に添加しない時は遺伝子発現をできる限り抑制し、TPP を添加した時は、遺伝子発現レベルが既知のプロモーターによる制御と比較して同レベル以上で

あることが望ましい。スプライシング効率の低下を防ぐには、野生型リボスイッチの 5'-スプライシング部位と分枝部位との距離を変えることなく、野生型リボスイッチの選択的スプライシングメカニズムを利用することが重要であると考えた。

第 3 章では、*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と考えられる配列を見出し、*thiA* リボスイッチの選択的スプライシングのメカニズムを解明した。さらにこの配列と TPP 結合部位の一部が塩基対を形成する際の安定性を利用して、TPP が結合することで遺伝子発現を促進する人工 ON リボスイッチの構築を試みた。

3-2 方法

3-2-1 P1 変異リボスイッチの TPP 結合部位の調製

P1 変異 (MP1) リボスイッチの TPP 結合部位の転写テンプレートは、第 2 章で調製した pNG*thiA* から合成した。サーマルサイクラー PC-801 (ASTEC) を用いて、プライマー AMP1 と AMP2 (Table 3-1) を使用した PCR により、*thiA* の -233 から -61 の範囲の TPP 結合部位を鋳型にした。50 μ L の反応液に対し、KOD-Plus (Toyobo) を用いて、94°C で 3 分間反応させ、生成物を、94°C で 15 秒、55°C で 30 秒、68°C で 60 秒からなる 30 回の PCR サイクルの後に 68°C で 5 分間アニーリングした。増幅した DNA 産物は、3% (w/v) SeaKem GTG アガロースゲル (BMA Biomedicals) を使用したゲル電気泳動にて精製し、QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen) にて製造元の説明書に従って転写テンプレートである目的 DNA を抽出した。精製した DNA の塩基配列は、プライマー AMP1 と AMP2 にて ABI PRISM 310 Genetic analyzer (Applied Biosystems) を用いて確認した。RNA の合成は、第 1 章に記載した方法と同様に、RiboMAX transcription kit (Promega) を使用して *in vitro* 転写テンプレートから RNA を調製した。

3-2-2 CD スペクトルを用いた滴定実験

MP1 リボスイッチの TPP 結合部位の CD スペクトルは、第 1 章に記載した通り、Jasco J-820 spectropolarimeter (日本分光) を用い、1 cm 光路長のキュベットで、セル室を窒素置換して測定した。

0 から 10 μ M TPP に対する RNA の CD スペクトルの測定は、以下の通り行った。測定時の 1.5 mL サンプル溶液に対して、終濃度が 10 mM になるように NaCl、終濃度が 50 mM になるように 500 mM Tris-HCl (pH 7.0)、終濃度が 0.2 μ M になるように RNA をキュベットで混合し、50°C で 3 分間インキュベートしてから、20°C で 30 分間インキュベートした。そして、終濃度が 1.0 mM になるように MgCl₂ を加えた。滴定する TPP 溶液は、10 mM NaCl を含む 50 mM Tris-HCl (pH 7.0) に対し、10、100、500 μ M になるように TPP を調製した。終濃度が 0、0.05、0.1、0.2 μ M に

なるように、10 μM TPP 溶液を滴定し、0.5、0.75、1.0、1.5、3.0 μM になるように 100 μM TPP 溶液を滴定し、5.0、10 μM になるように 500 μM TPP 溶液を滴定した。それぞれ滴定後は、20°C で 30 分間インキュベートしてから、300 から 220 nm の RNA のモル楕円率 ($\text{deg cm}^2 \text{dmol}^{-1}$) を測定した。

3-2-3 GUS レポータープラスミドの構築と形質転換

実験で使用したすべてのリボスイッチの構築は、Table 3-1 に示したプライマーを用いて、PCR で調製した。KOD-Plus (Toyobo) を使用した PCR と増幅された DNA 産物の精製方法は、PCR サイクルが 20 回である点と 1% (w/v) SeaKemGTG アガロースゲル (BMA Biomedicals) を使用した点を除いて、MP1 リボスイッチの TPP 結合部位の調製に記載した方法で行った。詳細は以下の通りである。

thiA の 5'-UTR の -729 から -1 の範囲を挿入した GUS レポータープラスミド pNG*thiA* は、第 2 章で示した方法で取得した。

MP1 リボスイッチは pNG*thiA* を鋳型にした。-338 から -18 の範囲の MP1 リボスイッチ配列を Fig3-1A に示した。-729 から -218 の範囲の MP1 リボスイッチの 5'-部位はプライマー THIA-F と MP1-5R で増幅し、-243 から -51 の範囲の MP1 リボスイッチの TPP 結合部位はプライマー MP1-5F と MP1-3R で増幅し、-76 から -1 の範囲の MP1 リボスイッチの 3'-部位は、プライマー MP1-3F と THIA-R で増幅した。次に増幅した 5'-部位、TPP 結合部位、3'-部位を混合し、プライマー THIA-F と THIA-R で増幅した。

α 配列に変異がある M α リボスイッチは pNG*thiA* を鋳型にした。-338 から -18 の範囲の M α リボスイッチ配列を Fig3-1A に示した。-729 から -284 の範囲の M α リボスイッチの 5'-部位はプライマー THIA-F と M α R で増幅し、-305 から -1 の範囲の M α リボスイッチの 3'-部位はプライマー M α F と THIA-R で増幅した。増幅した 5'-部位と 3'-部位を混合し、プライマー THIA-F と THIA-R で増幅した。

ON1 リボスイッチは pNG*thiA* を鋳型にした。-338 から -18 の範囲の ON1 リボスイッチ配列を Fig3-1B に示した。-729 から -336 の範囲の ON1 リボ

スイッチの 5'-部位はプライマー THIA-F と ON1-5'R で増幅し、-355 から -272 の範囲のフラグメント 2 はプライマー ON1-5'F と ON1-3'R で増幅し、-288 から -1 の範囲の ON1 リボスイッチの 3'-部位は、プライマー ON1-3'F と THIA-R で増幅した。増幅した 5'-部位、フラグメント 2 と 3'-部位を混合し、プライマー THIA-F と THIA-R で増幅した。

ON2 及び ON3 リボスイッチは、M α リボスイッチと同じ方法で、ON1 リボスイッチを持つ pNGON1 を鋳型にした。-338 から -18 の範囲の ON2 と ON3 リボスイッチ配列を Fig3-1B に示した。PCR プライマーは次の通りである。-729 から -272 の範囲の ON2 リボスイッチの 5'-部位の増幅は THIA-F と ON2R を用いた。-288 から -1 の範囲の ON2 リボスイッチの 3'-部位の増幅は ON2F と THIA-R を用いた。-729 から -303 の範囲の ON3 リボスイッチの 5'-部位は THIA-F と ON3R を用いた。-318 から -1 の範囲の ON3 リボスイッチの 3'-部位は ON3F と THIA-R を用いた。

精製した DNA 産物を TaKaRaBKL Kit (Takara) を使用してリン酸化し、pNG1 の *Sma*I サイトに挿入して、それぞれ pNGMP1、pNGM α 、pNGON1、pNGON2、pNGON3 を取得した。pNGMP1 と pNGM α に挿入した PCR 産物の塩基配列は、プライマー RT-R と M13RV を用いて ABI PRISM 310 Genetic analyzer (Applied Biosystems) で確認し、pNGON1、pNGON2、pNGON3 に挿入した PCR 産物の塩基配列は、プライマー RT-R と M13RV を用いて、ユーロフィンジェノミクス社の DNA シークエンスサービスにて確認した。プラスミド操作の宿主に大腸菌 DH5 α を使用し、*A. oryzae niaD300* (*niaD*) の形質転換は、第 2 章と同様に、Gomi らが報告した方法 (Gomi et al., 1987) に従って行った。

3-2-4 GUS レポーター試験

GUS レポーター試験は、第 2 章に記載した方法で行った。

3-2-5 RT-PCR による解析

約 5×10^7 個の *A. oryzae* 形質転換体の分生子胞子を 100 mL の Czapeck Dox 最小培地 (20 g/L glucose、6 g/L NaNO₃、1.52 g/L KH₂PO₄、0.52 g/L KCl、

0.52 g/L MgSO₄·7H₂O、pH 6.5) に接種し、10 μM チアミン添加試験区と非添加試験区を設けて、180 rpm で 48 時間振とうしながら 30°C でインキュベートした。細胞は 3G-1 ガラスフィルターを使用して培養液から濾過し、滅菌水で 3 回洗浄して 2 枚の濾紙で挟んで脱水し、液体窒素で凍結してから乳鉢で粉砕した。

MP1 と Mα リボスイッチの RNA の調製と RT-PCR による解析はサーマルサイクラー PC-801 (ASTEC) を用い、下記の通り行った。粉砕菌体からの全 RNA は ISOGEN (Nippon gene) を用いて、製造元の説明書に従って調製した。Takara One Step RNA PCR キット (AMV) (Takara) を製造元の説明書に従って、1 μg のトータル RNA を逆転写後に増幅した。PCR プライマーは RT-F と RT-R を使用し、50 μL 反応液を 50°C で 30 分間インキュベート後に 94°C で 2 分間インキュベートし、94°C で 30 秒間、60°C で 30 秒間、72°C で 2 分間の PCR を 30 回行った。増幅産物は、1 × TBE バッファー中の 5% (w/v) ネイティブ PAGE によって分離し、Gelstar® Nucleic Acid Stain (Takara) で染色した。増幅産物の塩基配列を確認するため、ゲルから各増幅産物を切り出して滅菌水で抽出後、プライマー RT-F と RT-R を用いてサーマルサイクラー PC-801 (ASTEC) にて PCR を行った。PCR は 50 μL 反応液で、Ex Taq (Takara) を使用し、94°C で 2 分間インキュベートした後、94°C で 30 秒間、55°C で 30 秒間、72°C で 60 秒間の PCR を 30 回行い、72°C で 5 分間アニーリングした。各 PCR 産物は DNA Ligation Kit Ver.2.1 (Takara) を用いて製造元の説明書に従い、T-Vector pMD20 (Takara) に TA クローニングした。E. coli DH5α を用いて増幅したプラスミドを QIAprep Spin Miniprep Kit (QIAGEN) を用いて製造元の説明書に従って抽出して、プライマー M13RV と M13M4 を用いて ABI PRISM 310 Genetic analyzer (Applied Biosystems) で塩基配列を確認した。

ON1、ON2、ON3 リボスイッチの RNA の調製と RT-PCR の解析はサーマルサイクラー Gene Atlas G02 (ASTEC) を用い、下記の通り行った。粉砕菌体からの RNA の調製は、NucleoSpin RNA (Takara) を用いて、製造元の説明書に従って実施した。次に Takara One Step RNA PCR キット (AMV) (Takara) を製造元の説明書に従って、1 μg のトータル RNA を逆転写後に

増幅した。PCRプライマーは RT-F と RT-R を使用し、MP1 と M α リボスイッチの時と同条件で RT-PCR を行った。ポリアクリルアミドゲル EHR-T15L (ATTO) を用いて、1×TBE バッファー中で電気泳動を行って増幅産物を分離し、臭化エチジウムを使用して染色した。増幅産物の塩基配列の確認をするため、ゲルから各増幅産物を切り出して滅菌水で抽出後、プライマー RT-F と RT-R を用いてサーマルサイクラー Gene Atlas G02 (ASTECH) にて PCR を行った。PCR は 50 μ L 反応液で、Ex Taq (Takara) を使用し、94°C で 2 分間インキュベートした後、94°C で 30 秒間、55°C で 30 秒間、72°C で 60 秒間の PCR を 30 回行い、72°C で 5 分間アニーリングした。各 PCR 産物は DNA Ligation Kit Ver.2.1 (Takara) を用いて製造元の説明書に従い、T-Vector pMD20 (Takara) に TA クローニングした。*E. coli* DH5 α を用いて増幅したプラスミドを抽出して、プライマー M13RV と M13M4 を用いて、ユーロフィンジェノミクス社の DNA シーケンスサービスにて塩基配列を確認した。

Table 3-1 PCR プライマーの配列

プライマー	配列
AMP1	5'-TAATACGACTCACTATAGGCCGTACGGCCGGTGTTCGTTCCC-3'
AMP2	5'-CCGCACATCCTTTTCGCTGGTATT-3'
THIA-F	5'-GGCCCGGGGACAGACGGGCAATTGATTACG-3'
MP1-5R	5'-AACACCGGCCGTACGGAAAGACGTTACCTAAGA-3'
MP1-5F	5'-TAACGTCTTTCCGTACGGCCGGTGTTCGTTCCC-3'
MP1-3R	5'-AACGAGAGAACCGCACATCCTTTTCGCTGGTAT-3'
MP1-3F	5'-CGAAAAGGATGTGCGGTTCTCTCGTTCTTCCTG-3'
THIA-R	5'-CCGTGACGTTTCAAGTTGCAATGAC-3'
M α R	5'-ATTCCTTGACTACCATGGTATG-3'
M α F	5'-CATACCATGGTAGTCAAGGAAT-3'
ON1-5'R	5'-TAGATTGTCGGTTGGTTTGG-3'
ON1-5'F	5'-CCAAACCAACCGACAATCTAAATACAC-3'
ON1-3'R	5'-CCAGCCAAAAGTATTCCTTGACTTCCTTCGTATGC-3'
ON1-3'F	5'-GGAATACTTTTGGCTGGACTCTCACAAAGATCAAG-3'
ON2R	5'-CCAGCCAAAAGTATTTCTTGCCTTCCTTCGTATGC-3'
ON2F	5'-GAAATACTTTTGGCTGGACTCTCACAAAGATCAAG-3'
ON3R	5'-TCTTCCTGTTGATGGATAATCGAGGAGTGTATTTAG-3'
ON3F	5'-TCCATCAACAGGAAGAACGAAGGAAGGCAAGA-3'
RT-F	5'-TTCCCAAACCAACCGACAAT-3'
RT-R	5'-TGATCAATTCCACAGTTTTC-3'
M13RV	5'-CAGGAAACAGCTATGAC-3'
M13M4	5'-GTTTTCCCAGTCACGAC-3'

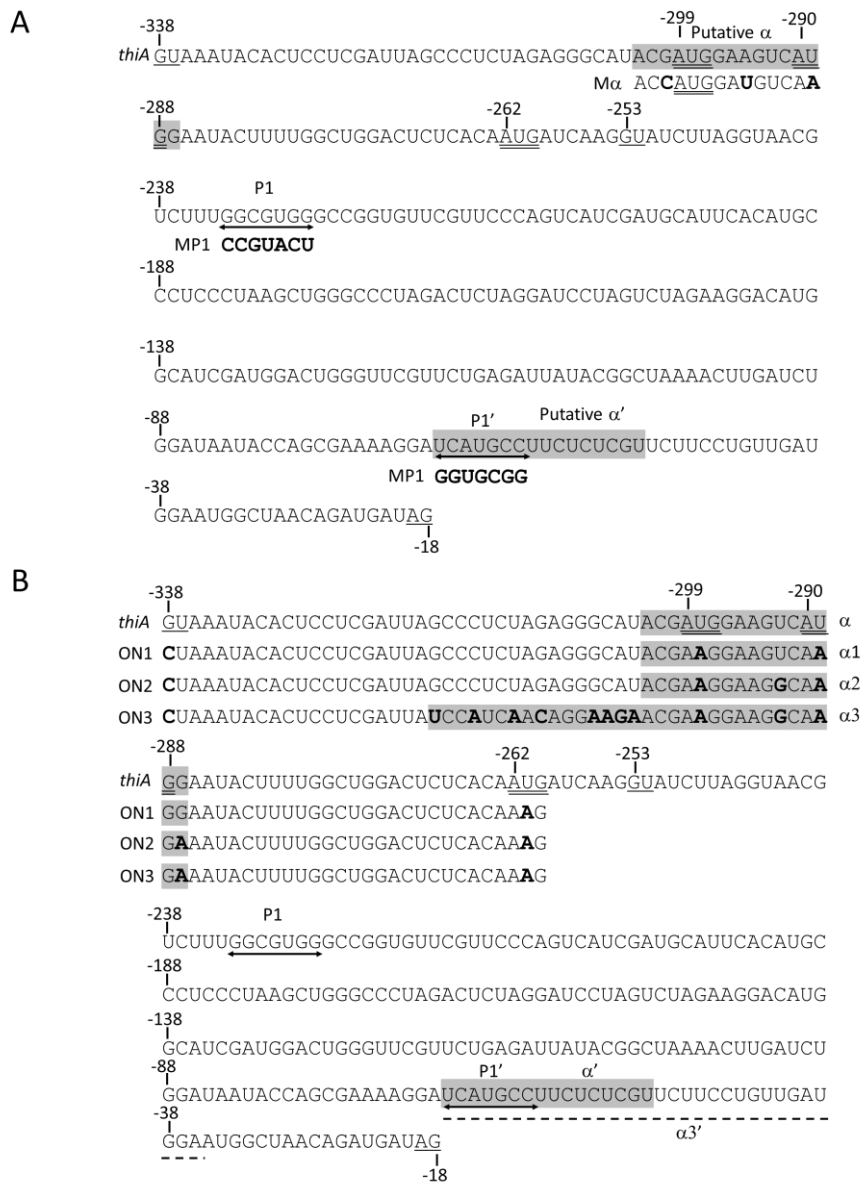


Fig.3-1 設計したリボスイッチの塩基配列

(A) *thiA*、MP1、Mαリボスイッチの塩基配列。MP1とMαリボスイッチは、変異のある重要な配列のみ示した。太字の塩基は*thiA*リボスイッチからの置換を、数字は翻訳開始部位(+1)に対する相対的な位置を示した。灰色でマークされた塩基は推定αとα'配列を、両矢印はP1とP1'を示した。イントロンのスプライシング部位を下線、3つの潜在的な翻訳開始コドンに二重下線で示した。(B) *thiA*、ON1、ON2、ON3リボスイッチの配列。ON1、ON2、ON3リボスイッチは、変異のある重要な配列のみを示した。太字の塩基は*thiA*リボスイッチからの置換を、数字は翻訳開始部位(+1)に対する相対的な位置を示した。灰色のマークはα、α1、α2、α3とα'を示し、点線はα3'を示し、両矢印はP1とP1'を示した。イントロンのスプライシング部位を下線、3つの潜在的な翻訳開始コドンに二重下線で示した。

3-3 実験結果

3-3-1 *thiA* リボスイッチの選択的スプライシングに必要な推定ヌクレオチド配列

第2章では、*thiA* リボスイッチの選択的スプライシングの部位を明らかにした。TPPが結合していない場合、*thiA* リボスイッチの5'-スプライシング部位は-338位にあり、成熟したmRNAを生成した。一方、TPPがリボスイッチに結合すると、5'-スプライシング部位は-253位にあり、未成熟なmRNAには85塩基の残存イントロンが含まれていた。*thiA* リボスイッチへのTPPの結合の際、P1とP1'部位の塩基対形成により、3'-側のスプライシング部位と-253位のスプライシング部位が-338位のスプライシング部位よりも近くなり、-253位でスプライシングが起こると仮定すると、-338位でスプライシングする際は、同様にTPP結合部位のP1'と-338位の近傍で塩基対形成することが考えられた (Fig3-2A)。P1'と塩基対を形成できる可能性のある配列を調べたところ、-287位から-302位に見出した (Fig3-2B)。Liらは、*N. crassa* OR74AのTPP結合型リボスイッチ (NCU01977リボスイッチ) にTPPが結合していない場合、TPP結合部位の3'-配列「 α' 」は、5'-スプライス部位の近くにある保存配列「 α 」と塩基対 (長距離塩基対) を形成し、選択的スプライシングを制御することを見出した (Li et al., 2013)。*thiA* リボスイッチもNCU01977リボスイッチと同様のメカニズムで選択的スプライシングを制御している可能性が高いと考えられ、*thiA* リボスイッチの選択的スプライシングメカニズムの仮説を検証するため、*thiA* リボスイッチの-287位から-302位に存在する推定 α 配列とTPP結合部位のP1'配列を含む推定 α' 配列との塩基対形成を確認した。

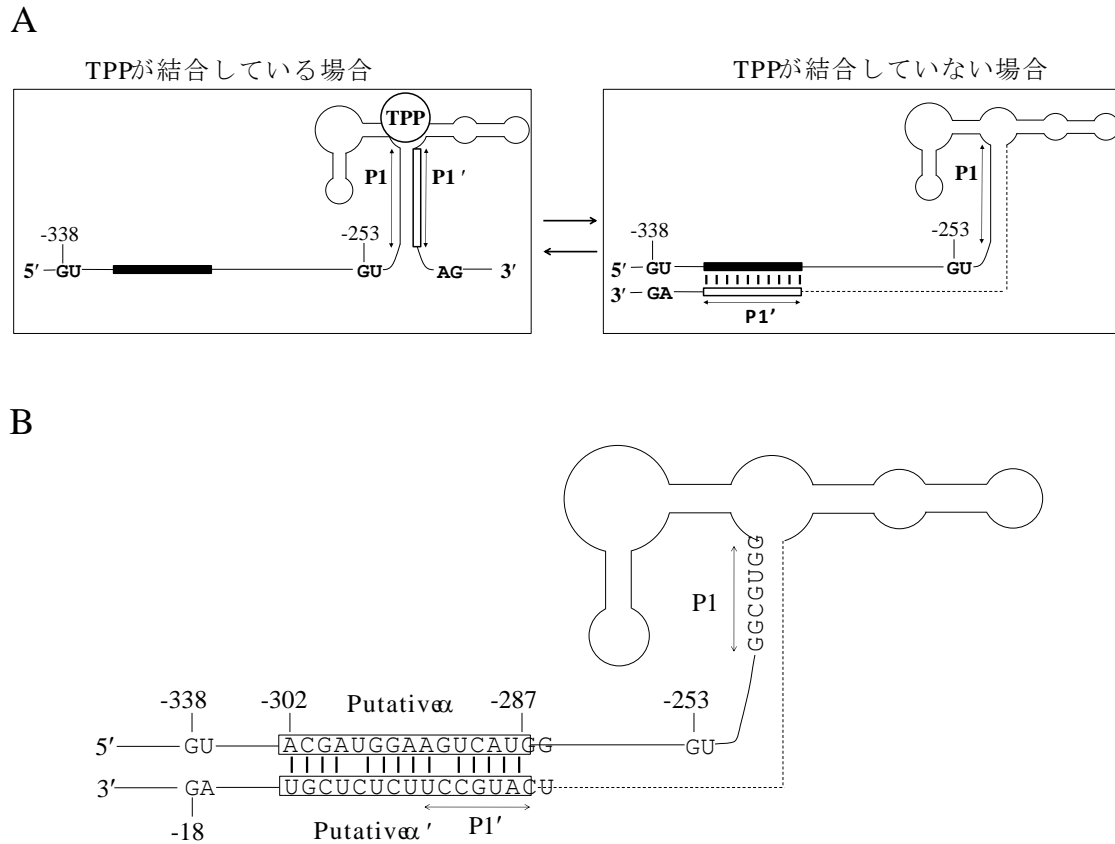


Fig. 3-2 *thiA* リボスイッチによる推定遺伝子制御メカニズムの仮説

(A) 白い長方形は P1'、黒い長方形は P1'と塩基対形成をする配列を示した。TPP が結合すると、P1 と P1'は塩基対を形成し、3'-側のスプライシング部位と-253 位のスプライシング部位が近くなる。一方、TPP が結合していない場合、TPP 結合部位の P1'と-338 位の近傍で塩基対形成すると 3'-側のスプライシング部位と-338 位のスプライシング部位が近くなる。

(B) -287 位から-302 位に P1'と塩基対を形成できる可能性のある配列を見出した。

3-3-2 *thiA* リボスイッチの選択的スプライシングメカニズム

thiA リボスイッチの 5'-側で見つかった推定 α が選択的スプライシングに関与するかを確認するため、*thiA* リボスイッチの TPP 結合部位の P1 と P1'に焦点をあてた。推定 α' には P1'が含まれているため、P1 と P1'を入れ替えると、P1 を含む変異 α' は推定 α に結合できなくなると考えた。そこで、P1 と P1'ステムを交換してリボスイッチを構築した (Fig. 3-3)。仮説に基づき、この P1 と P1'ステムを交換したリボスイッチ (MP1 リボスイ

ッチ)に TPP は結合できるが、TPP が結合しない場合は推定 α と変異 α' の間の塩基対形成が阻害され、TPP 結合の有無に関わらず遺伝子発現は抑制されると予測した。

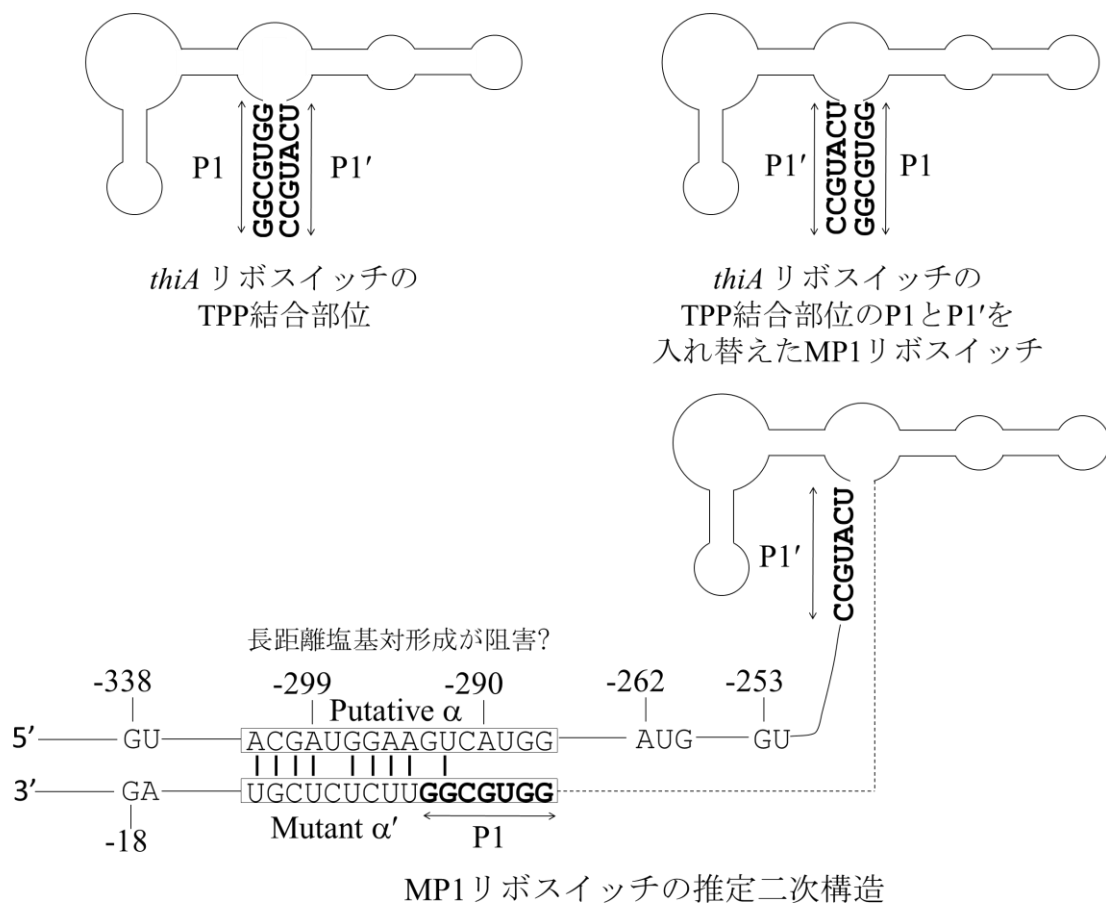


Fig. 3-3 *thiA* リボスイッチと MP1 リボスイッチの TPP 結合部位と MP1 リボスイッチの推定制御メカニズム

thiA リボスイッチの TPP 結合部位の P1 と P1' ステムを入れ替えた MP1 リボスイッチの推定二次構造を示した。MP1 リボスイッチでは、推定 α と変異 α' の塩基対形成が阻害されることが考えられた。

Fig3-4A は、10 mM NaCl、1.0 mM MgCl₂ 及び、さまざまな濃度の TPP を含む 50 mM Tris-HCl (pH 7.0) 中の 0.2 μM MP1 リボスイッチの TPP 結合部位の 20°C での CD スペクトルを示した。TPP 結合部位に結合する TPP の平衡パラメーターは、265 nm でのモル楕円率の変化から評価できるので (Fig3-4B)、第 1 章と同様に、*thiA* リボスイッチの TPP 結合部位が 1 つであると仮定したときの平衡パラメーターを推定するモデル式を用いて、TPP と MP1 リボスイッチの TPP 結合部位の結合定数を算出した (Rippe, 1997)。MP1 リボスイッチの TPP 結合部位に結合する TPP の見かけの K_a 値は、20°C で $(5.0 \pm 1.5) \times 10^6 \text{ M}^{-1}$ だった。第 1 章の研究では、1.0 mM Mg²⁺ での *thiA* リボスイッチの TPP 結合部位の TPP 結合の K_a 値は 20°C で $(50 \pm 34) \times 10^6 \text{ M}^{-1}$ であり、P1 と P1' の交換によって、TPP と MP1 リボスイッチの結合の親和性は TPP と *thiA* リボスイッチよりも低くなった。結合親和性は元の値と比較して低下しているが、MP1 リボスイッチへの TPP の結合の K_a 値は、細菌の TPP 結合型 *thiC* リボスイッチの K_a 値 (25°C で $1.7 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$) と類似していた (Winkler et al., 2002a)。このことから、MP1 リボスイッチの TPP 結合部位が、天然に存在する *thiC* リボスイッチと同等の TPP 結合性を有することが考えられた。

MP1 リボスイッチの機能を検証するために、*thiA* の 5'-UTR と MP1 リボスイッチの TPP 結合部位を含む GUS レポーター遺伝子プラスミド pNGMP1 を構築した。*A. oryzae* niaD300 を pNGMP1 で形質転換し、形質転換した細胞を 10 μM チアミンの添加あるいは非添加の条件で 30°C で培養した。*A. oryzae* はチアミンを取り込み、自発的に TPP に変換するので、外因性チアミンの添加を介して TPP 結合型リボスイッチの活性化を可能にする。チアミンの存在下と非存在下での *thiA* リボスイッチの GUS 活性は、それぞれ 112 ± 5 、 $2585 \pm 13 \text{ U-mg}^{-1} \text{ protein}$ で、MP1 リボスイッチの GUS 活性は、それぞれ 22 ± 0.1 、 $68 \pm 2 \text{ U-mg}^{-1} \text{ protein}$ だった (Fig. 3-4C)。*thiA* リボスイッチと異なり、チアミンの非存在下において、MP1 リボスイッチの GUS 活性は低下したことが確認できた。

次に、MP1 リボスイッチの機能によって生成したスプライシング産物の配列を確認するために、RT-PCR 解析を行った。Fig. 3-4D は、転写産物に由来する増幅 DNA のネイティブ PAGE の結果を示したものである。ゲルからバンドを抽出してシーケンスを行ったところ、チアミンの存在下では、*thiA* リボスイッチの 5'-スプライシング部位は-253 位にあり、MP1 リボスイッチでも同様に-253 位でスプライシングが起こった。しかし、チアミンの非存在下では、*thiA* リボスイッチの 5'-スプライシング部位は-338 だったのに対し、MP1 リボスイッチの 5'-スプライシング部位は-253 位であり、MP1 リボスイッチでは成熟 mRNA を産生するスプライシングが阻害された。TPP の非存在下で MP1 リボスイッチのタンパク質翻訳阻害による GUS 活性の低下が確認されたが、推定 α と P1 を含む変異 α' の間の塩基対形成が阻害されたためと推察した (Fig. 3-3)。以上の結果から、*thiA* リボスイッチの P1 と P1' が選択的スプライシングにおいて重要な役割を果たしていることが確認できた。

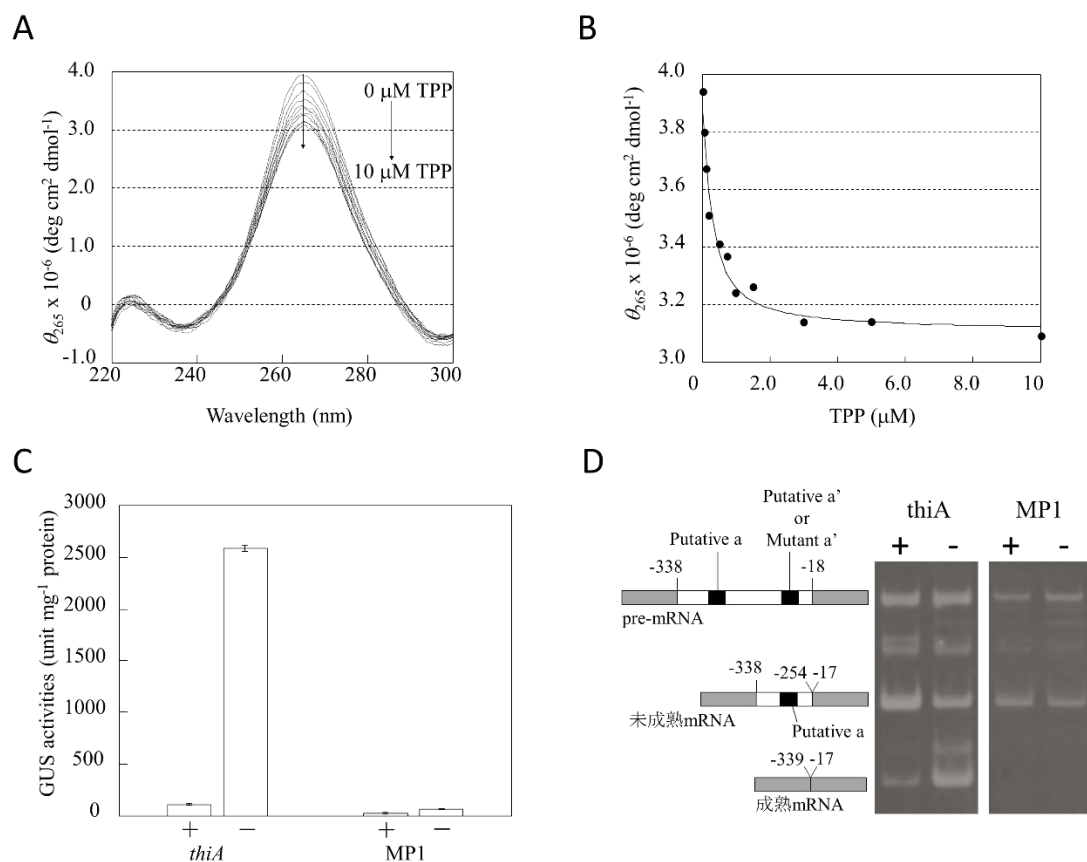


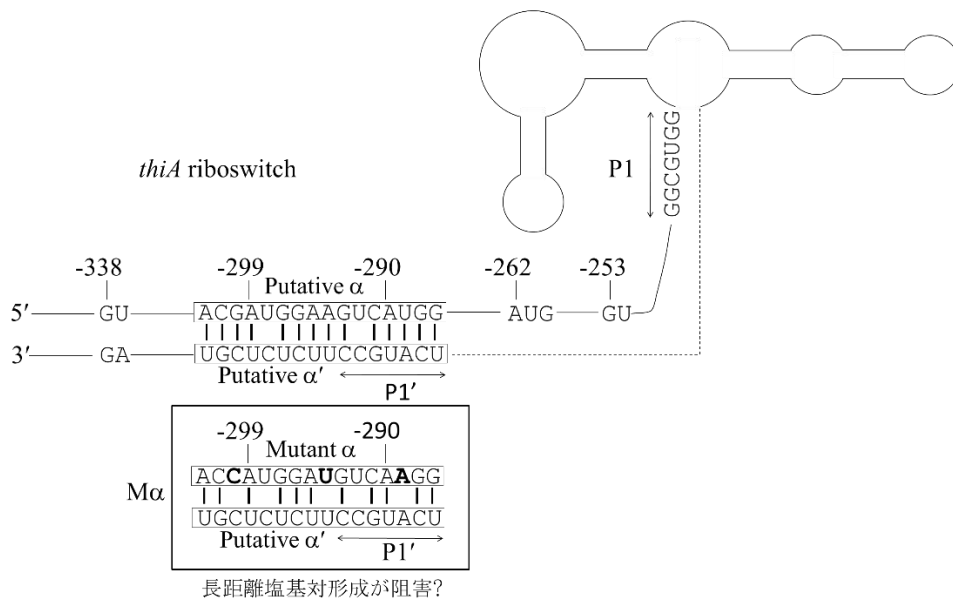
Fig. 3-4 MP1 リボスイッチの機能解析

(A) 20°C での 10 mM NaCl、1.0 mM MgCl₂、及び 0–10 μ M TPP (265 nm で上から下へ) を含む 50 mM Tris-HCl (pH 7.0) 中の 0.2 μ M MP1 リボスイッチの CD スペクトル。(B) 20 °C で 10 mM NaCl、1.0 mM MgCl₂、及び 0–10 μ M TPP を含む 50 mM Tris-HCl (pH 7.0) 中の 265 nm での 0.2 μ M MP1 リボスイッチのモル楕円率。(C) チアミンの存在下 (+) と非存在下 (-) での *thiA* と MP1 リボスイッチの GUS 活性。(D) チアミンの存在下 (+) と非存在下 (-) での *thiA* 及び MP1 リボスイッチからの RT-PCR 産物を、5% (w/v) ネイティブ PAGE によって分離した。リボスイッチの pre-mRNA とスプライシングされた mRNA は、RT-PCR を使用して増幅した。灰色と白の長方形はそれぞれエクソンとイントロンを、黒の長方形はそれぞれ推定 α 、推定 α' (*thiA*)、または変異 α' (MP1) を示した。

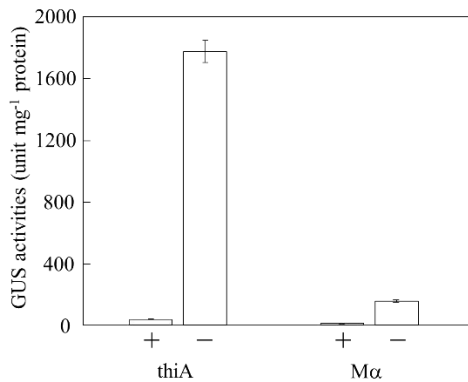
変異 α' は *thiA* リボスイッチの機能を阻害することが明らかとなったので、 α 配列のうち-300位の G を C に、-294位の A を U に、-289位の U を A に置き換えた α 変異リボスイッチ ($M\alpha$ リボスイッチ) を作製し、 α' と変異 α が塩基対形成を阻害するか確認した (Fig. 3-5A)。 *thiA* リボスイッチの推定 α 及び α' と、 $M\alpha$ リボスイッチの変異 α 及び α' の塩基対形成の最小自由エネルギー変化は、RNAsoft (Andronescu et al., 2003) によって、30°C でそれぞれ-14.5、-4.1 kcal mol⁻¹ と計算された。変異 α を用いて *thiA* の 5'-UTR を含む GUS レポーター遺伝子プラスミド pNGM α を構築し、*A. oryzae* niaD300 (*niaD*) を pNGM α で形質転換後に形質転換細胞を 10 μ M チアミンの存在下もしくは非存在下にて 30°C で培養した。チアミンの存在下と非存在下での *thiA* リボスイッチの GUS 活性は、それぞれ 39 \pm 2、1766 \pm 72 U-mg⁻¹ protein だった (Fig. 3-5B)。一方、チアミンの存在下と非存在下での $M\alpha$ リボスイッチの GUS 活性は、それぞれ 12 \pm 0.5、155 \pm 6 U-mg⁻¹ protein で、*thiA* リボスイッチと異なり、チアミン非存在下における $M\alpha$ リボスイッチの GUS 活性は低下した。

次に、 $M\alpha$ リボスイッチの機能により生成したスプライシング産物の配列を確認するために、RT-PCR 解析を行った。転写産物に由来する増幅 DNA のネイティブ PAGE 結果を Fig. 3-5C に示した。ゲルからバンドを抽出し、各バンドの塩基配列を確認した。チアミンの存在下または非存在下で、 $M\alpha$ リボスイッチの 5'-スプライシング部位は-253位にあり、成熟 mRNA を産生するスプライシングパターンの阻害を示していた。これらの結果から、*thiA* リボスイッチに見られる推定 α が *thiA* リボスイッチによって誘導される遺伝子制御に重要であることが明確となった。チアミン存在下での $M\alpha$ リボスイッチは、*thiA* リボスイッチと同じように作用したと考えられたが、チアミン非存在下での $M\alpha$ リボスイッチは、タンパク質の翻訳阻害による GUS 活性の低下が確認され、 α' と変異 α との塩基対形成の阻害によるものと考えられた。TPP 濃度に応じた MP1 と $M\alpha$ リボスイッチの挙動に基づいて、*thiA* リボスイッチに見られる推定 α と α' は、選択的スプライシングに関与していることが明らかとなった。

A



B



C

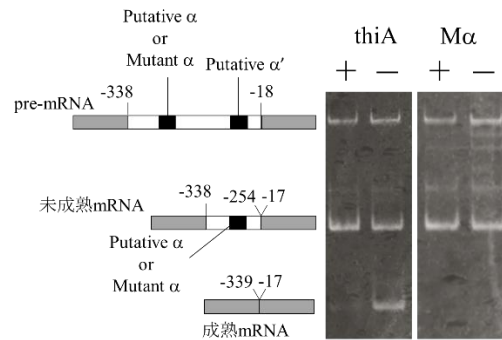


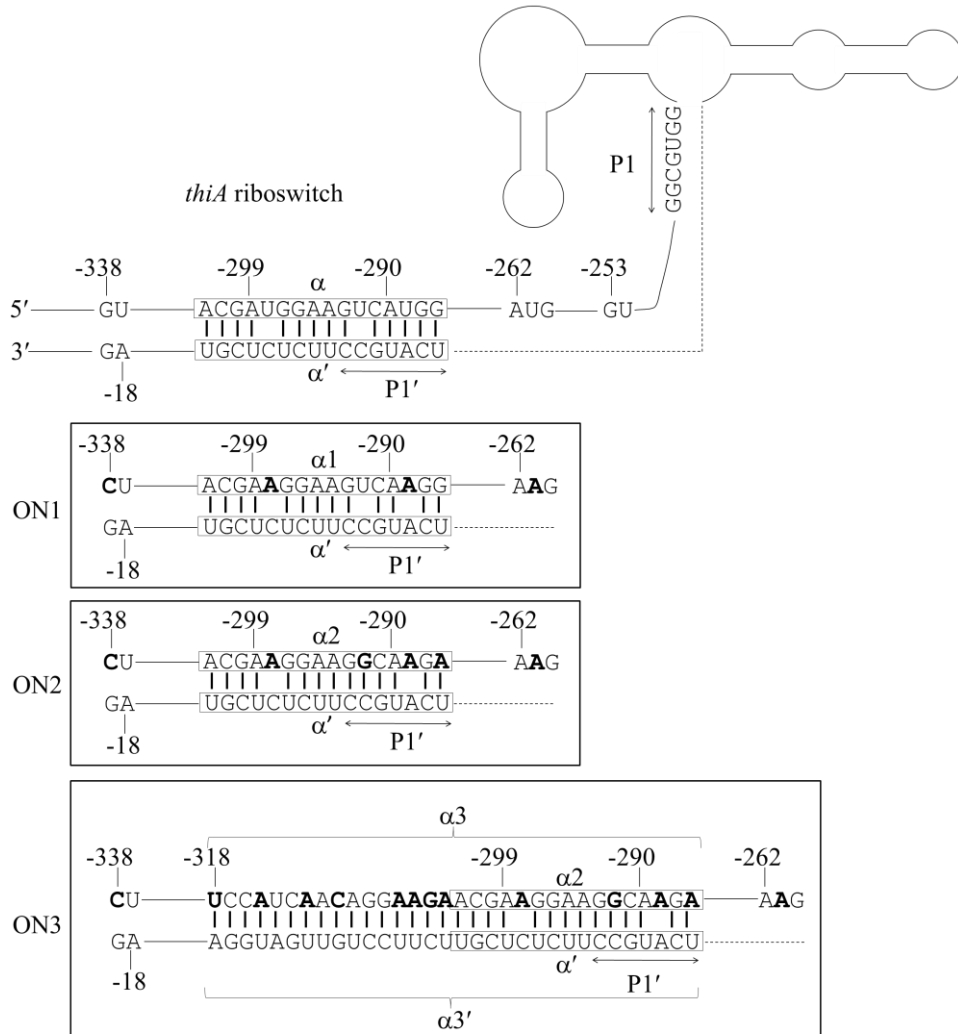
Fig. 3-5 M α リボスイッチの設計とその機能解析

(A) *thiA* と M α リボスイッチの推定二次構造。太字の塩基は、野生型 *thiA* リボスイッチからの置換を示した。(B) チアミンの存在下 (+) と非存在下 (-) での *thiA* と M α リボスイッチの GUS 活性。(C) チアミンの存在下 (+) と非存在下 (-) での *thiA* と M α リボスイッチの RT-PCR 産物を、5% (w/v) ネイティブ PAGE を使用して分離した。灰色と白の長方形は、それぞれエキソンとイントロンを示し、黒の長方形は推定 α (*thiA*)、変異 α (M α)、推定 α' を示した。

3-3-3 *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人工 ON リボスイッチ

TPP 非結合時では、*thiA* リボスイッチの α と α' の長距離塩基対形成により-338位の5'-スプライス部位と-18位の3'-スプライス部位が近接し、スプライシングに有利になる (Fig. 3-6A)。一方、TPP が結合すると、*thiA* リボスイッチの P1 システムの形成によって α と α' が分離して、-253位の5'-スプライス部位と-18位の3'-スプライス部位が近接し、選択的スプライシングに有利になる。*thiA* リボスイッチによる選択的スプライシング制御のメカニズムに基づいて、TPP に応答して遺伝子発現をアップレギュレートできる ON リボスイッチの構築を試みた。-262、-290、-299位の3つの潜在的な翻訳開始コドンと-338位の5'-スプライス部位を別の塩基で置換して機能を失わせ、*thiA* リボスイッチ ON1 を設計した (Fig. 3-6A)。ON1 リボスイッチの α_1 と α' の塩基対形成の最小自由エネルギー変化は、30°Cで-11.1 kcal mol⁻¹と算出されたが、*thiA* リボスイッチの α と α' の最小自由エネルギー変化は-14.5 kcal mol⁻¹と算出された。ON1 リボスイッチの変異 α_1 と α' の間の塩基対の安定性は、*thiA* リボスイッチのそれと比較して十分ではない可能性が考えられた。そこで、 α_1 と α' の塩基対の安定性を改善するために、 α_1 に変異を追加した ON2 リボスイッチを構築した (Fig. 3-6A)。ON2 リボスイッチの α_2 と α' の塩基対形成の最小自由エネルギー変化は、30°Cで-18.9 kcal/molと算出された。TPP が結合した場合、-262、-290、-299位の3つの潜在的な翻訳開始コドンが除去されているため、ON1 と ON2 リボスイッチは-253位でスプライシングが起こっても翻訳が開始できる。一方、TPP が結合しない場合では、ON1 と ON2 リボスイッチは α_1 と α' 、 α_2 と α' の間でそれぞれ塩基対を形成するが、-338位の5'-スプライス部位が除去されているため、スプライシングが阻害されると考えた (Fig. 3-6B)。

A



B

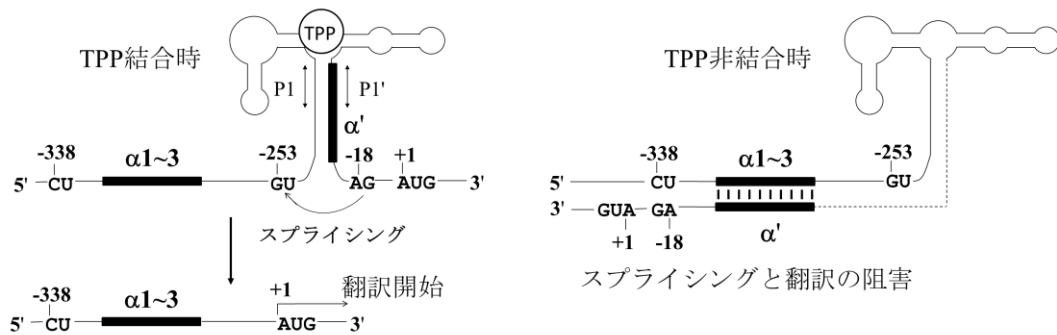
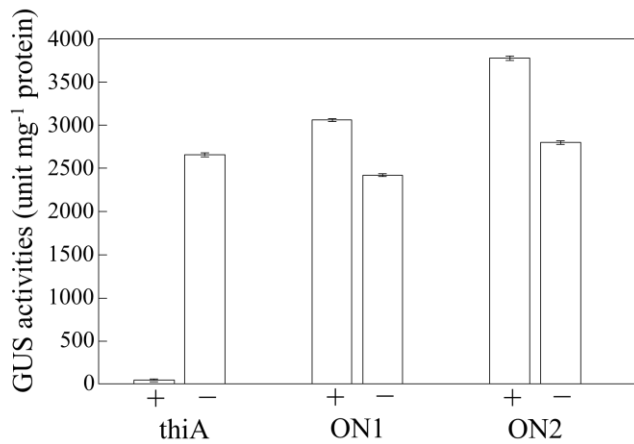


Fig. 3-6 人工 ON リボスイッチの設計

(A) *thiA*、ON1、ON2、ON3 リボスイッチの推定二次構造。太字の塩基は、野生型 *thiA* リボスイッチからの置換を示した。(B) TPP の結合時と非結合時での人工 ON リボスイッチの予想される遺伝子制御。

ON1 と ON2 リボスイッチを含むプロモーター-GUS レポーター遺伝子プラスミドを構築し、形質転換 *A. oryzae* を作製した。チアミンの存在下と非存在下での ON1 リボスイッチの GUS 活性は、それぞれ 2983 ± 10 、 2352 ± 2 U-mg⁻¹ protein であり、チアミン存在下と非存在下での ON2 リボスイッチの GUS 活性はそれぞれ、 3676 ± 20 、 2724 ± 22 U-mg⁻¹ protein だった (Fig. 3-7A)。ON1 と ON2 リボスイッチのタンパク質発現レベルは十分に高く、元のリボスイッチ (2591 ± 21 U-mg⁻¹ protein) と同等レベルだったが、チアミンの存在下と非存在下でのタンパク質発現は大きく変化しなかった。つまり、ON1 と ON2 リボスイッチは、チアミン非結合時では、遺伝子発現を抑制しなかった。ON1 と ON2 リボスイッチの TPP 非依存性は、TPP 非結合時での ON1 と ON2 リボスイッチの $\alpha 1$ と α' 、 $\alpha 2$ と α' のそれぞれの塩基対形成において、十分な熱安定性がなかった可能性が考えられた。次に ON1 と ON2 リボスイッチによって生成したスプライシング産物の配列を確認するために RT-PCR 解析を実施した。転写産物に由来する DNA のネイティブ PAGE の結果を Fig. 3-7B に示した。各バンドをゲルから抽出して塩基配列を確認した。チアミン存在下と非存在下での ON1、ON2 リボスイッチの未成熟 mRNA は、チアミン存在下での *thiA* リボスイッチと同様に -253 位でのスプライシング産物であり (Fig. 3-7B)、ON1 と ON2 のリボスイッチが設計された位置でスプライシングしていることを確認した。したがって、ON1 と ON2 リボスイッチは、長距離塩基対形成の安定性が不十分な点を除いて、スプライシング部位は問題がないと考えられた。

A



B

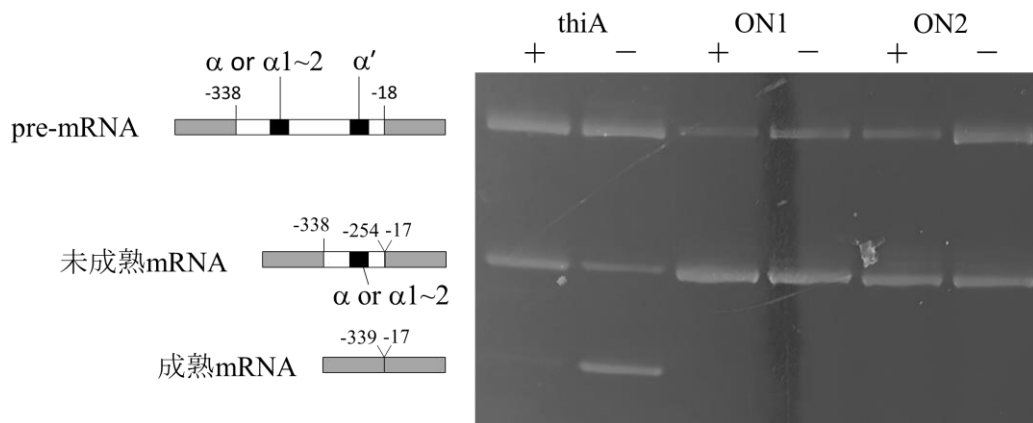


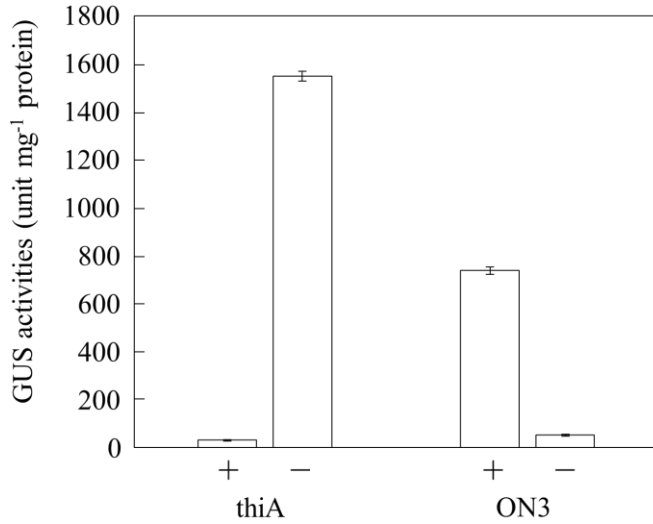
Fig. 3-7 ON1 と ON2 リボスイッチの機能解析

(A) チアミンの存在下 (+) と非存在下 (-) での *thiA*、ON1、ON2 リボスイッチの GUS 活性。(B) チアミンの存在下 (+) と非存在下 (-) での *thiA*、ON1、ON2 リボスイッチからの RT-PCR 産物を、15% (w/v) アクリルアミドゲルでのネイティブ PAGE を使用して分離した。リボスイッチの pre-mRNA とスプライシングされた mRNA は、RT-PCR を使用して増幅した。灰色と白の長方形はそれぞれエキソンとイントロンを、黒の長方形はそれぞれ α 、 $\alpha 1$ 、 $\alpha 2$ 、 α' を示した。

ON1 と ON2 リボスイッチの GUS 活性は、チアミン非存在下よりも存在下でそれぞれ 1.27、1.35 倍高かった。 $\alpha 1$ 、 $\alpha 2$ は 16 塩基長で、 $\alpha 1$ と α' 、 $\alpha 2$ と α' の長距離塩基対形成の最小自由エネルギー変化は 30°C においてそれぞれ -11.1、-18.9 kcal mol⁻¹ だった。このことから、チアミン存在下と非存在下での ON リボスイッチの GUS 活性の差は、塩基対相互作用の安定化を通じて増加すると考えられた。人工 ON リボスイッチにおいてチアミン（細胞内では TPP）非存在下でのスプライシングの阻害を誘発するためには（Fig. 3-6B）、 $\alpha 2$ と α' の塩基対よりも大幅に安定した塩基対が必要であると考えた。この仮定に基づき、 $\alpha 2$ の 2 倍の長さになるように $\alpha 2$ から上流に 16 塩基の追加の相補的塩基（ $\alpha 3$ ）を持つ ON3 リボスイッチを構築した（Fig. 3-6A）。

ON3 リボスイッチの $\alpha 3$ と $\alpha 3'$ の塩基対の最小自由エネルギー変化は、30°C で -51.4 kcal mol⁻¹ と算出された。チアミン存在下と非存在下での *thiA* リボスイッチの GUS 活性を測定したところ、それぞれ 32 ± 1、1545 ± 21 U·mg⁻¹ protein で、ON3 リボスイッチの GUS 活性は、それぞれ 737 ± 16、53 ± 0.3 U·mg⁻¹ protein だった（Fig. 3-8A）。つまり、ON3 リボスイッチの GUS 活性は、チアミン非存在下よりも存在下で 14 倍高かった。転写産物に由来する DNA のネイティブ PAGE の結果を Fig. 3-8B に示した。ON1 と ON2 リボスイッチと同様に、ON3 リボスイッチはスプライシング部位の問題はないことが確認できた。チアミン非存在下で、ON3 リボスイッチの未成熟 mRNA に対応するバンドが検出されたが、チアミンの非存在下でわずかな GUS 活性が観察されたので、わずかに存在した未成熟 mRNA を RT-PCR で検出したと考えられた。RT-PCR の結果に定量性はないが、チアミンの非存在下での未成熟 mRNA のバンド強度は、チアミンの存在下と比較して弱く、RT-PCR の結果が GUS 活性の結果と一致していた。これらの結果から、ON3 リボスイッチが TPP 結合時にタンパク質発現を誘導することが明らかとなり、野生型 *thiA* リボスイッチの α と α' の間の長距離塩基対形成を利用することによって、ON リボスイッチの開発に成功した。

A



B

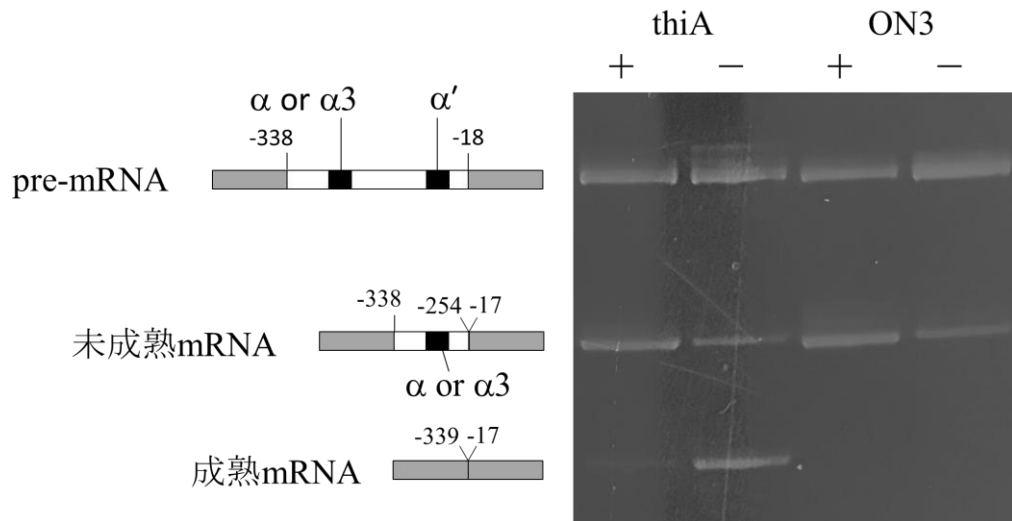


Fig. 3-8 ON3 リボスイッチの機能解析

(A) チアミンの存在下 (+) と非存在下 (-) での *thiA*、ON3 リボスイッチの GUS 活性。(B) チアミンの存在下 (+) と非存在下 (-) での *thiA*、ON3 リボスイッチからの RT-PCR 産物を、15% (w/v) アクリルアミドゲルでのネイティブ PAGE を使用して分離した。灰色と白の長方形はそれぞれエキソンとイントロンを、黒の長方形はそれぞれ α 、 $\alpha3$ 、 α' を示した。

3-4 考察

本研究では、まず、*thiA* リボスイッチの選択的スプライシングのメカニズム解明を試みた。*thiA* リボスイッチに TPP が結合すると TPP 結合部位の P1 と P1' 部位の塩基対形成により、3'-側のスプライシング部位と -253 位のスプライシング部位が -338 位のスプライシング部位よりも近くなり、-253 位でスプライシングが起これると仮定すると、-338 位でスプライシングする際は、同様に TPP 結合部位の P1' と -338 位の近傍で塩基対形成することが考えられた。P1' と塩基対を形成できる可能性のある配列を調べたところ、-287 位から -302 位に見出した。Li らは、*N. crassa* OR74A の *NCU01977* リボスイッチに TPP が結合していない場合、TPP 結合部位の 3'-側配列「 α' 」は、5'-スプライス部位の近くにある保存配列「 α 」と塩基対（長距離塩基対）を形成し、選択的スプライシングを制御することを見出した (Li et al., 2013)。そこで、*thiA* リボスイッチの -287 位から -302 位に存在する推定 α 配列と TPP 結合部位の P1' を含む推定 α' 配列との塩基対形成を確認した。チアミンの非存在下では、*thiA* リボスイッチは高い GUS 活性を示したが、*thiA* リボスイッチの推定 α' と推定 α の変異によって設計された MP1、M α リボスイッチの GUS 活性は低下した。RT-PCR による解析で、チアミンの非存在下では、*thiA* リボスイッチのスプライシング部位が -338 位に対し、MP1 と M α リボスイッチのスプライシング部位は -253 位であることが明らかとなった。*thiA* リボスイッチの推定 α と推定 α' のハイブリダイゼーションの自由エネルギー変化は、30°C で -14.5 kcal mol⁻¹ で、MP1 リボスイッチの推定 α と変異 α' 、及び M α リボスイッチの変異 α と推定 α' の塩基対形成の自由エネルギー変化は、30°C でそれぞれ -9.8 と -4.1 kcal mol⁻¹ だった。これらの熱力学的パラメーター、及び GUS 活性と RT-PCR 解析の結果から、MP1 リボスイッチの推定 α と変異 α' 間と、M α リボスイッチの変異 α と推定 α' 間で、それぞれ塩基対形成が阻害され、-338 位でのスプライシングが起これなかったことが確認された。つまり、*thiA* リボスイッチの選択的スプライシングには α と α' の長距離塩基対形成の熱力学的安定性が重要であることが明らかとなった。*thiA* リボスイッチの選択的スプライシングメカニズムの詳細を理解するためには、この塩基

対形成の自由エネルギー変化だけでなく、TPP 結合時と非結合時での *thiA* リボスイッチ全体の熱力学的安定性に関するさらなる研究も必要である。

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 リボスイッチの構築を検討した。ON3 リボスイッチの GUS 活性は、チアミン非存在下よりも存在下で 14 倍高かった。Nomura らは、大腸菌の TPP 結合型 *thiM* リボスイッチを改変し、チアミン非存在下よりも存在下において約 13 倍遺伝子発現量が高くなる ON リボスイッチを構築した (Nomura et al., 2007)。つまり、ON3 リボスイッチによる遺伝子発現レベルの ON と OFF の差は、バクテリアで開発された ON リボスイッチの遺伝子発現の差と同レベルであった。ON3 リボスイッチの遺伝子発現が促進された際の GUS 活性は、*thiA* リボスイッチでの遺伝子発現が促進された際の GUS 活性の約半分であった。窪寺らは、*thiA* リボスイッチを含む *thiA* プロモーターの遺伝子発現量をアミラーゼ遺伝子の *amyB* プロモーターやグルコアミラーゼ遺伝子の *glaA* プロモーターと比較したところ、それぞれ、2.5 倍、5.5 倍高かった (窪寺ら, 2003)。つまり、ON3 の制御下での遺伝子発現量は、*A. oryzae* の一般的なプロモーターと比較して遜色ないことが明らかとなった。第 2 章では、*thiA* リボスイッチのスプライシング部位に基づいて ON リボスイッチである E2、E3 リボスイッチを構築した。E2 と E3 リボスイッチの GUS 活性は、チアミンの非存在下よりも存在下で、それぞれ 4.7 倍、4.3 倍高かったが、GUS 活性が低いという問題があった。E2 と E3 リボスイッチは、*thiA* リボスイッチにおいて TPP 結合時に残るイントロンを除去した ON リボスイッチで、選択的スプライシングのメカニズムを利用していなかった。ON3 リボスイッチでは、選択的スプライシングに重要な配列 α に焦点を当て、*thiA* リボスイッチの選択的スプライシングメカニズムを利用して人工リボスイッチを構築した。さらに、ON1、ON2、ON3 リボスイッチの結果から、TPP 結合部位における P1 ステム形成と α と α' の塩基対形成の安定性が、リボスイッチが TPP 結合型 ON リボスイッチとして機能するために重要である

ことが明らかとなった。ON リボスイッチにおける P1 ステム形成と α と α' の塩基対の安定性を最適化するには、ON リボスイッチの高次構造を知ることが重要である。また、最適化された ON リボスイッチを構築するには、ON リボスイッチの細胞内における熱力学的安定性を知ることが重要である (Nakano et al., 2014)。

結論として、*thiA* リボスイッチの選択的スプライシングメカニズムを解明し、そのメカニズムを利用して人工 ON リボスイッチの作製に成功した。小さな化合物によって標的遺伝子の発現を誘導するリボスイッチは、目的タンパク質の発現を制御するための実用的なツールとしての可能性を秘めている。今回作製した TPP 結合型 ON リボスイッチは、培地にチアミンを添加すると遺伝子発現を促進できるため、タンパク質の生産はいつでも開始できる。*A. oryzae* は日本を代表する微生物として「国菌」と呼ばれており (松島, 2014)、歴史的に食品として安全に食べられてきたことから米国食品医薬品局 (FDA) でも **Generally Recognized As Safe (GRAS)** のリストに掲載され、安全性が認められている (柏木, 2010)。したがって、有用なタンパク質を生産する宿主微生物として安全性が高いといえる。*A. oryzae* はバクテリアや酵母で用いる液体培養だけでなく、固体培養も可能である。固体培養は細胞を液体培養よりも高密度で培養できるという利点があり (秦, 2002)、*A. oryzae* はタンパク質の生産においてバクテリアや酵母よりも高い効率を有する (Ichishima, 2016)。有用なタンパク質を生産するために、宿主細胞を工場と見なす「細胞工場」という概念がある。また、増殖に必要な最小単位のゲノムを持つ微生物が開発され (Hutchison et al., 2016)、このような微生物は増殖と目的タンパク質の生産のみに特化した「細胞工場」として利用できる可能性がある。最小のゲノムを持つ *A. oryzae* を開発できれば、究極の細胞工場として利用することができる。リボスイッチと *A. oryzae* のそれぞれの研究が発展することで、リボスイッチと *A. oryzae* は有用なタンパク質生産のための有効な組み合わせとなると考えられる。さらに、設計した ON リボスイッチはイントロンのスプライシングを制御することから、他の真核生物で機能す

る可能性があり、これらのリボスイッチの用途は哺乳類の遺伝子制御にまで拡大されることが期待できる。

総括と結論

麹菌 *A. oryzae* RIB40 の推定チアゾール合成遺伝子である *thiA* の 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、チアミン存在下で *A. oryzae* を培養すると *thiA* の発現が抑制された (Kubodera et al., 2003)。チアミンは *A. oryzae* に取り込まれると TPP に変換されること、*thiA* の TPP 結合型リボスイッチ様配列の一部を欠失させると *thiA* の遺伝子制御が解除されたことから、*thiA* 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示唆された (Kubodera et al., 2003)。しかし、このリボスイッチ様配列に TPP が直接結合してリボスイッチとして機能するかは明確にはなっていなかった。

第 1 章では、*thiA* の 5'-UTR に存在する TPP 結合型リボスイッチ様配列の推定 TPP 結合部位の RNA を合成し、TPP との結合性を定量化した。1.0 mM と 0 mM Mg^{2+} の条件下での合成 RNA の TPP の結合性を CD スペクトルデータから算出したところ、1.0 mM Mg^{2+} 存在下での合成 RNA に対する TPP の K_a 値は $(50 \pm 34) \times 10^6 M^{-1}$ であり、TPP が *thiA* リボスイッチ様 RNA に直接結合したことが確認できた。つまり、*A. oryzae* で発見されたバクテリアの TPP 結合型リボスイッチとの類似配列が TPP 結合型リボスイッチとして機能することが明確となった。興味深いことに、*thiA* リボスイッチと TPP との K_a 値は、 Mg^{2+} の非存在下で $(1.2 \pm 0.6) \times 10^6 M^{-1}$ に減少することが見出され、TPP と *thiA* リボスイッチの結合は、 Mg^{2+} に依存的であることが明らかとなった。さらに TPP と *thiA* リボスイッチの結合に対する Mg^{2+} 濃度への依存性を調べたところ、TPP と *thiA* リボスイッチの K_a 値は Mg^{2+} 濃度の増加と共に増加し、1.0 mM Mg^{2+} でほぼ飽和した。これは、生理学的濃度の Mg^{2+} (≤ 1 mM) が TPP のリボスイッチへの結合に十分であることを実証していた。さらに、RNA の三次構造には一価や二価カチオンが重要な役割を果たすことが知られているが、*thiA* リボスイッチと TPP の結合において、 Na^+ 、 K^+ 、 Ca^{2+} には Mg^{2+} の代替の機能はないことが明らかとなった。

thiA リボスイッチの構造に対する Mg^{2+} の影響を調べるため、ネイティブ PAGE を行ったところ、0 及び 1.0 mM Mg^{2+} でほぼ同じように移動し、 Mg^{2+} がリボスイッチの全体的な構造に影響を与えないことが明確となった。さらに、*thiA* リボスイッチの構造安定性に対する Mg^{2+} の影響を確認するため、*thiA* リボスイッチの UV 融解曲線を調べたところ、1.0 mM Mg^{2+} によって誘導される *thiA* リボスイッチの構造の明らかな遷移と安定化を示す一方で、*thiA* リボスイッチが Mg^{2+} に関係なく特定の構造を形成することが明らかとなった。

E. coli と *A. thaliana* 由来の TPP 結合型リボスイッチの結晶構造解析の結果、TPP のピリミジン部位は、TPP 結合部位の P2 と P3 の間にあるバルジグループと相互作用し、ピロリン酸部位が P4 と P5 の間にあるバルジグループと Mg^{2+} を介して相互作用することが明らかとなった (Serganov et al., 2006, Thore et al., 2006)。この結晶構造解析の結果と本研究結果から、*thiA* リボスイッチも同様に TPP のピロリン酸部位が Mg^{2+} を介して、P4 と P5 の間にあるバルジグループと相互作用している可能性が考えられ、生理学的濃度の Mg^{2+} が、*thiA* リボスイッチと TPP の結合を制御していることが解明された。

thiA リボスイッチの TPP 結合性について定量化できたため、第 2 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について検討した。*thiA* リボスイッチの TPP 結合部位は、*thiA* の 5'-UTR のイントロン内に存在する。最小培地で *A. oryzae* を培養する際のチアミン添加の有無によって、*thiA* の 5-UTR の mRNA の長さが増加したことから、*thiA* リボスイッチが選択的スプライシングを制御することが考えられていたが、スプライシング部位は特定されていなかった (Kubodera et al., 2003)。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いる。タンパク質を大量生産する際に、所望の有用タンパク質が宿主細胞の増殖を阻害する場合、そのタンパク質を大量生産することは困難である。この問題を解決する方法として、有用タンパク質の生産をリボスイッチで制御し、宿主微生物を増殖さ

せる時はタンパク質の生産を抑え、宿主が十分に増殖した後にタンパク質を生産させることが挙げられる。しかし、*thiA* リボスイッチは、TPP 結合によって遺伝子発現を負に制御する「OFF リボスイッチ」であり、制御のしやすさという面では TPP の結合によって遺伝子発現を正に制御する「ON リボスイッチ」の方がより望ましい。そこで、*thiA* リボスイッチのスプライシング部位を明らかにするとともに、その選択的スプライシングを利用して、TPP に応答して遺伝子発現を正に制御できる「ON リボスイッチ」の設計を試みた。

thiA の 5'-UTR を含むプロモーター-GUS レポーター遺伝子プラスミド (pNG*thiA*) を構築し、形質転換した *A. oryzae* niaD300 (*niaD*) を 10 μ M チアミン存在下もしくは非存在下の最小培地で培養した。そこから mRNA を抽出してスプライシング部位を確認したところ、チアミン非存在下で生じた成熟 mRNA は、5'-スプライシング部位が翻訳開始部位 (+1) に対して -338 の位置であることが確認できた。さらに、チアミン存在下で増加した未成熟 mRNA は、5'-スプライシング部位が -253 の位置で起こり、結果的に 85 塩基のイントロンが残っていることが明らかとなった。この残存したイントロンには、-262、-290、-299 の位置に 3 つの潜在的な翻訳開始コドンが存在した。Cheah らは、*N. crassa* OR74A の TPP 結合型 *NMT1* リボスイッチで観察された潜在的な翻訳開始コドンがタンパク質発現を低下させる可能性があるとして報告しており (Cheah et al., 2007)、*thiA* リボスイッチも同様にコドンのフレームシフトを誘発し、タンパク質の不活性化につながっていると推察された。以上の結果から、*thiA* リボスイッチは TPP の結合によって 5'-スプライシング部位を変化させて、翻訳を制御していることが明らかとなった。

thiA リボスイッチの TPP 結合による選択的スプライシング部位に基づいて、チアミンに応答して遺伝子発現を正に制御できる「ON リボスイッチ」の設計を試みた。特に、TPP が *thiA* リボスイッチに結合した際の選択的スプライシングによって生成されるイントロンの 85 塩基に焦点を当て、このイントロン配列を除去することで、チアミンの存在下で不適切なスプライシングが進行するのを防ぐことができると考えた。そこで、*thiA*

リボスイッチのイントロンの 5'-スプライシング部位から 85 塩基を除去するとともに、5'-スプライシング部位と TPP 結合部位の間の長さを調整した ON リボスイッチを作製した。E2 と E3 リボスイッチの制御下において、チアミン存在下の GUS 活性は、チアミンの非存在下での活性よりもそれぞれ 4~5 倍高くなり、ON リボスイッチの作製に成功した。しかし、ON リボスイッチによる遺伝子発現が ON の状態での GUS 活性は、野生型 *thiA* リボスイッチによる ON の状態に比較して低く、遺伝子制御ツールとしての実用化にはさらなる改良が必要であることが確認できた。イントロンの長さを短くすることによってリボスイッチ全体の構造が変化し、TPP 結合性が低下した可能性が疑われたが、*thiA* リボスイッチと比較して、ON リボスイッチの TPP 結合性は損なわれていなかった。したがって、GUS 活性の低下は、5'-スプライシング部位と分枝部位の A との距離が近くなったことで、スプライシング反応の最初のステップであるラリアット構造の形成効率が低下したことが推察された。

スプライシング部位に基づいた ON リボスイッチの構築を試みたが、実用化にはさらなる検討が必要であったため、第 3 章では、*thiA* リボスイッチの選択的スプライシングメカニズムを利用して ON リボスイッチの構築を試みた。TPP が *thiA* リボスイッチに結合していない場合、TPP 結合部位の 3'-側に存在する P1'部位を含む α' が、5'-スプライス部位の近傍にある α と塩基対を形成することが明らかとなった。つまり、TPP 非結合時では、*thiA* リボスイッチの α と α' の塩基対形成により -338 位の 5'-スプライス部位と -18 位の 3'-スプライス部位が近接し、-338 位でスプライシングが起こった。一方、TPP の結合時では、*thiA* リボスイッチの P1 スタムの形成によって α と α' が分離して、-253 位の 5'-スプライス部位と -18 位の 3'-スプライス部位が近接し、-253 位でスプライシングが起こった。この *thiA* リボスイッチによる選択的スプライシング制御のメカニズムに基づいて、ON リボスイッチの構築を試みた。-262、-290、-299 位の 3 つの潜在的な翻訳開始コドンと -338 位の 5'-スプライス部位の塩基を置換してその機能を失わせるとともに、 α と α' の塩基対形成の安定性を調整した。TPP 結合

部位における P1 ステム形成と α と α' の塩基対形成の安定性が、リボスイッチが TPP 結合型 ON リボスイッチとして機能するために重要であることが明らかとなり、開発した ON3 リボスイッチの GUS 活性は、チアミン非存在下よりも存在下で 14 倍高くなった。また、遺伝子発現が ON の状態での ON3 リボスイッチで制御した GUS 活性の結果から、*A. oryzae* の一般的なプロモーターと比較して遜色なかった。以上の結果から、*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することで、実用レベルで遺伝子制御可能な TPP 結合型の ON リボスイッチの作製に成功した。

小さな化合物によって標的遺伝子の発現を誘導するリボスイッチは、目的のタンパク質の発現を制御するための実用的なツールとしての可能性を秘めている。今回作製した TPP 結合型の ON リボスイッチは、培地にチアミンを添加すると遺伝子発現を促進するように制御できるため、タンパク質の生産はいつでも開始できる。*A. oryzae* は、優れたタンパク質生産能力を持つことから、日本では伝統的に醸造微生物として利用されてきた。つまり、*A. oryzae* はタンパク質生産に適した宿主であり、ON リボスイッチと *A. oryzae* は、目的タンパク質の大量生産に効果的な組み合わせであると期待できる。さらに、設計した ON リボスイッチはイントロンのスプライシングを制御することから、他の真核生物で機能する可能性があり、これらのリボスイッチの用途は哺乳類の遺伝子調節にまで拡大されることが期待できる。

参考文献

- Andronescu M, Aguirre-Hernández R, Condon A, Hoos HH. (2003) RNAsoft: a suite of RNA secondary structure prediction and design software tools. *Nucleic Acids Res.* 31(13): 3416-3422.
- Batey RT, Gilbert SD, Montange RK. (2004) Structure of a natural guanine-responsive riboswitch complexed with the metabolite hypoxanthine. *Nature.* 432(7015): 411–415.
- Beggs JD. (2001) Pre-mRNA splicing. *Encyclopedia of genetics.* Academic press. 1536-1539.
- Blount K, Puskarz I, Penchovsky R, Breaker RR. (2006) Development and application of a high-throughput assay for glmS riboswitch activators. *RNA Biol.* 3(2):77-81.
- Blount KF, Wang JX, Lim J, Sudarsan N, Breaker RR. (2007) Antibacterial lysine analogs that target lysine riboswitches. *Nat Chem Biol.* 3(1):44-49.
- Breaker RR. (1997) In vitro selection of catalytic polynucleotides. *Chem. Rev.* 97(2): 371–390.
- Breaker RR. (2011) Prospects for Riboswitch Discovery and Analysis. *Mol Cell.* 43(6): 867–879.
- Breaker RR. (2012) Riboswitches and the RNAWorld. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 4(2): a003566

Breaker RR. (2018) Riboswitches and Translation Control. Cold Spring Harb Perspect Biol. 10(11): a032797.

Bujalowski W, Graeser E, McLaughlin LW, Porschke D. (1986) Anticodon loop of tRNAPhe: structure, dynamics, and Mg²⁺ binding. Biochemistry 25(21): 6365–6371.

Cheah MT, Wachter A, Sudarsan N, Breaker RR. (2007) Control of alternative RNA splicing and gene expression by eukaryotic riboswitches. Nature. 447(7143): 497-500.

Clingman CC, Ryder SP. (2013) Metabolite sensing in eukaryotic mRNA biology. Wiley Interdiscip Rev RNA. 4(4): 387–396.

Downs WD, Cech TR. (1996) Kinetic pathway for folding of the Tetrahymena ribozyme revealed by three UV-inducible crosslinks. RNA 2(7): 718–732.

Edwards TE, Ferré-D'Amaré AR. (2006) Crystal structures of the thi-box riboswitch bound to thiamine pyrophosphate analogs reveal adaptive RNA-small molecule recognition. Structure. 14(9): 1459-1468.

Elbashir SM, Martinez J, Patkaniowska A, Lendeckel W, Tuschl T. (2001) Functional anatomy of siRNAs for mediating efficient RNAi in *Drosophila melanogaster* embryo lysate. EMBO J. 20(23): 6877–6888.

Fire A, Xu S, Montgomery M, Kostas S, Driver S, Mello C. (1998) Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. Nature 391(6669): 806–811.

Giege R, Frugier M, Rudinger J. (1998) tRNA mimics. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 8(3): 286–293.

Gilbert W. (1986) Origin of life: The RNA world. *Nature* 319: 618–618.

Gomi K, Iimura Y, Hara S. (1987) Integrative transformation of *Aspergillus oryzae* with a plasmid containing the *Aspergillus nidulans* *argB* gene. *Agric. Biol. Chem.* 51(9): 2549-2555.

Hutchison CA 3rd, Chuang RY, Noskov VN, Assad-Garcia N, Deerinck TJ, Ellisman MH, Gill J, Kannan K, Karas BJ, Ma L, Pelletier JF, Qi ZQ, Richter RA, Strychalski EA, Sun L, Suzuki Y, Tsvetanova B, Wise KS, Smith HO, Glass JI, Merryman C, Gibson DG, Venter JC. (2016) Design and synthesis of a minimal bacterial genome. *Science.* 351(6280): aad6253.

Ichishima E. (2016) Development of enzyme technology for *Aspergillus oryzae*, *A. sojae*, and *A. luchuensis*, the national microorganisms of Japan. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 80(9): 1681-1692.

Isaacs FJ, Dwyer DJ, Collins JJ. (2006) RNA synthetic biology. *Nat Biotechnol.* 24(5): 545-554.

Jefferson RA, Burgess SM, Hirsh D. (1986) beta-Glucuronidase from *Escherichia coli* as a gene-fusion marker. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 83(22): 8447-8451.

Koizumi M, Ohtsuka E. (1991) Effects of phosphorothioate and 2-amino groups in hammerhead ribozymes on cleavage rates and Mg²⁺ binding. *Biochemistry* 30(21): 5145–5150.

Kruger K, Grabowski PJ, Zaug AJ, Sands J, Gottschling DE, Cech TR. (1982) Self-splicing RNA: autoexcision and autocyclization of the ribosomal RNA intervening sequence of *Tetrahymena*. *Cell*. 31(1): 147–157.

Kubodera T, Yamashita N, Nishimura A. (2000) Pyrithiamine resistance gene (*ptrA*) of *Aspergillus oryzae*: cloning, characterization and application as a dominant selectable marker for transformation. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 64(7): 1416–1421.

Kubodera T, Watanabe M, Yoshiuchi K, Yamashita N, Nishimura A, Nakai S, Gomi K, Hanamoto H. (2003) Thiamine-regulated gene expression of *Aspergillus oryzae thiA* requires splicing of the intron containing a riboswitch-like domain in the 5'-UTR. *FEBS Letters*, 555(3): 516-520.

Kupfer DM, Drabenstot SD, Buchanan KL, Lai H, Zhu H, Dyer DW, Roe BA, Murphy JW. (2004) Introns and splicing elements of five diverse fungi. *Eukaryot Cell*. 3(5):1088-1100.

Lai EC. (2003) RNA sensors and riboswitches: self-regulating messages. *Curr. Biol.* 13(7): 285–291.

Lang K, Rieder R, Micura R. (2007) Ligand-induced folding of the *thiM* TPP riboswitch investigated by a structure-based fluorescence spectroscopic approach. *Nucleic Acids Res.* 35(16): 5370-5378.

Lee JF, Hesselberth JR, Meyers, L.A. and Ellington, A.D. (2004) Aptamer database. *Nucleic Acids Res.* 32: D95–D100.

- Li S, Breaker RR. (2013) Eukaryotic TPP riboswitch regulation of alternative splicing involving long-distance base pairing. *Nucleic Acids Res.* 41(5): 3022-3031.
- Mandal M, Breaker RR. (2004a) Adenine riboswitches and gene activation by disruption of a transcription terminator. *Nat Struct Mol Biol.* 11(1):29-35
- Mandal M, Lee M, Barrick JE, Weinberg Z, Emilsson GM, Ruzzo WL, Breaker RR. (2004b) A glycine-dependent riboswitch that uses cooperative binding to control gene expression. *Science.* 306(5694):275-279.
- Mironov AS, Gusarov I, Rafikov R, Lopez LE, Shatalin K, Kreneva RA, Perumov DA, Nudler E. (2002) Sensing small molecules by nascent RNA: a mechanism to control transcription in bacteria. *Cell* 111(5): 747–756.
- Misra VK, Draper DE. (1998) On the role of magnesium ions in RNA stability. *Biopolymers* 48(2-3): 113–135.
- Murray JB, Seyhan AA, Walter NG, Burke JM, Scott WG. (1998) The hammerhead, hairpin and VS ribozymes are catalytically proficient in monovalent cations alone. *Chem. Biol.* 5(10): 587–595.
- Nahvi A, Barrick JE, Breaker RR. (2004) Coenzyme B12 riboswitches are widespread genetic control elements in prokaryotes. *Nucleic Acids Res.* 32(1): 143-150.
- Nakano S, Miyoshi D, Sugimoto N. (2014) Effects of molecular crowding on the structures, interactions, and functions of nucleic acids. *Chem. Rev.* 114(5): 2733-2758.

- Noller HF, Hoffarth V, Zimniak L. (1992) Unusual resistance of peptidyl transferase to protein extraction procedures. *Science* 256(5062): 1416–1419.
- Nomura Y, Yokobayashi Y. (2007) Reengineering a Natural Riboswitch by Dual Genetic Selection. *J. American Chemical society* 129(45): 13814-13815.
- Ohmichi T, Nakano S, Miyoshi D, Sugimoto N. (2002) Long RNA dangling end has large energetic contribution to duplex stability. *J. Am. Chem. Soc.* 124(35): 10367–10372.
- Okumoto Y, Ohmichi T, Sugimoto N. (2002) Immobilized small deoxyribozyme to distinguish RNA secondary structures. *Biochemistry* 41(8): 2769–2773.
- Rippe K. (1997) Analysis of protein–DNA binding at equilibrium. *B. I. F. Futura* 12: 20–26.
- Saenger W. (1984) Different hydration states associated with A-, B-, and C-DNA. *Principles of Nucleic Acid Structure*. Springer-Verlag, NY.: 370–372.
- Serganov A, Yuan YR, Pikovskaya O, Polonskaia A, Malinina L, Phan AT, Hobartner C, Micura R, Breaker RR, Patel DJ. (2004) Structural basis for discriminative regulation of gene expression by adenine- and guanine-sensing mRNAs. *Chem Biol.* 11(12):1729-1741.
- Serganov A, Polonskaia A, Phan AT, Breaker RR, Patel DJ. (2006) Structural basis for gene regulation by a thiamine pyrophosphate-sensing riboswitch. *Nature*, 441(7097): 1167-1171
- Serganov A, Patel DJ. (2012) Molecular Recognition and Function of Riboswitches. *Curr Opin Struct Biol.* 22(3): 279–286.

Serganov A, Nudler E. (2013) A Decade of Riboswitches. *Cell*. 152(1-2): 17-24.

Settembre E, Begley TP, Ealick SE. (2003) Structural biology of enzymes of the thiamin biosynthesis pathway. *Curr Opin Struct Biol*. 13(6): 739-747.

Shiman R, Draper DE. (2000) Stabilization of RNA tertiary structure by monovalent cations. *J. Mol. Biol*. 302(1): 79–91.

Shoji JY, Maruyama J, Arioka M, Kitamoto K. (2005) Development of *Aspergillus oryzae thiA* promoter as a tool for molecular biological studies. *FEMS Microbiol Lett*. 244(1): 41-46.

Spicher A, Guicherit OM, Duret L, Aslanian A, Sanjines EM, Denko NC, Giaccia AJ, Blau HM. (1998) Highly conserved RNA sequences that are sensors of environmental stress. *Mol. Cell. Biol*. 18(12): 7371–7382.

Studier FW, Rosenberg AH, Dunn JJ, Dubendorff JW. (1990) Use of T7 RNA polymerase to direct expression of cloned genes. *Methods Enzymol*. 185: 60-89.

Sudarsan N, Barrick JE, Breaker RR. (2003) Metabolite-binding RNA domains are present in the genes of eukaryotes. *RNA* 9(6): 644–647.

Sugimoto N, Ohmichi T. (1996) Site-specific cleavage reaction catalyzed by leadzyme is enhanced by combined effect of lead and rare earth ions. *FEBS Lett*. 393(1): 97–100.

Thore S, Leibundgu M, Ban N. (2006) Structure of the eukaryotic thiamine pyrophosphate riboswitch with its regulatory ligand. *Science*, 312(5777): 1208-1211.

- Wachter A. (2010) Riboswitch-mediated control of gene expression in eukaryotes. *RNA Biology*. 7(1): 67-76.
- Welz R, Breaker RR. (2007) Ligand binding and gene control characteristics of tandem riboswitches in *Bacillus anthracis*. *RNA*. 13(4): 573-582.
- Willick G, Oikawa K, Kay CM. (1973) Circular dichroism studies on the conformation of transfer ribonucleic acid in the presence of different divalent cations. *Biochemistry* 12(5): 899-904.
- Winkler W, Nahvi A, Breaker RR. (2002a) Thiamine derivatives bind messenger RNAs directly to regulate bacterial gene expression. *Nature* 419(6910): 952-956.
- Winkler WC, Cohen-Chalamish S, Breaker RR. (2002b) An mRNA structure that controls gene expression by binding FMN. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 99(25): 15908-15913.
- Winkler WC, Nahvi A, Sudarsan N, Barrick JE, Breaker RR. (2003) An mRNA structure that controls gene expression by binding S-adenosylmethionine. *Nat Struct Biol*. 10(9):701-707.
- Zuker M. (2003) Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction. *Nucleic Acids Res*. 31(13): 3406-3415.
- 柏木豊. (2010) 麹菌の遺伝子資源・遺伝子解析－外国の遺伝子資源とゲノム解析－. *日本醸造協会誌*. 105(7): 455-462.

窪寺隆文、吉内くみ、山下伸雄、渡辺睦、西村顕 アスペルギルス・オリ
ゼー由来の高転写活性プロモーター. 特願 2003-52266 (2003)

秦洋二. (2002) 麹菌の固体培養での遺伝子発現特性. 日本農芸化学会誌.
76(8): 715-718.

松島健一朗. (2014) しょうゆづくりと麹菌の利用-今までとこれから. 日本
醸造協会誌. 109(9): 643-650.

本論文に関する報告

1. 研究論文

- 1) Takahiro Yamauchi, Daisuke Miyoshi, Takafumi Kubodera, Akira Nishimura, Susumu Nakai, Naoki Sugimoto.
Roles of Mg²⁺ in TPP-dependent riboswitch.
FEBS Lett. 579(12):2583-2588 (2005). 第 1 章

- 2) Takahiro Yamauchi, Daisuke Miyoshi, Takafumi Kubodera, Mitsuhiro Ban, Akira Nishimura, Naoki Sugimoto.
Riboswitches for enhancing target gene expression in eukaryotes.
Chembiochem. 9(7):1040-1043 (2008). 第 2 章

- 3) Takahiro Yamauchi, Takafumi Kubodera, Daisuke Miyoshi, Naoki Sugimoto, Shuji Hirohata.
Artificial turn-on riboswitch to control target gene expression using a wild-type riboswitch splicing mechanism.
J Biosci Bioeng. 131(2):115-123 (2021). 第 3 章

2. 解説・総説

1) 山内隆寛

生命活動を制御する RNA のスイッチ
生物工学会誌, 86, 443 (2008) 第 2 章

2) 山内隆寛、杉本直己

麴菌をタンパク質工場にする化学 いつでも好きなだけタンパク質をつくれるスイッチ RNA
化学、63、36-40 (2008) 第 1 章、第 2 章

3) 山内隆寛、杉本直己

RNA スイッチを用いた微生物のタンパク質合成技術の開発と応用
バイオインダストリー 26、66-72 (2009) 第 1 章、第 2 章

4) Takahiro Yamauchi and Naoki Sugimoto

Development and Application of a Highly Efficient Protein Synthesis Technique Using Riboswitches in Microorganisms.
Applied RNA Bioscience, Springer, 33-46, (2018). 第 1 章、第 2 章

5) 山内隆寛

酒と核酸
核酸科学ハンドブック 297-306 (2020) 第 1 章、第 2 章

3. 特許

1) 山内隆寛、窪寺隆文、伴光博、西村顕、三好大輔、杉本直己

遺伝子発現制御ポリヌクレオチド
特開 2007-259787 第 2 章

4. 国内での発表

山内隆寛、三好大輔、窪寺隆文、西村顕、中井進、杉本直己
ChemBIT(35) リボスイッチの機能発現における Mg^{2+} の役割
日本化学会第 85 春季年会 横浜 (2005 年 3 月) 第 1 章

山内隆寛、三好大輔、窪寺隆文、伴光博、西村顕、杉本直己
チアミンピロリン酸結合型リボスイッチの機能解析
日本生物工学会第 57 回大会 茨城 (2005 年 11 月) 第 1 章

山内隆寛、三好大輔、窪寺隆文、伴光博、西村顕、杉本直己
TPP 結合型リボスイッチの機能改変
日本生物工学会第 58 回大会 大阪 (2006 年 9 月) 第 2 章

山内隆寛、三好大輔、窪寺隆文、伴光博、西村顕、杉本直己
TPP の結合により遺伝子発現を誘起する新規人工リボスイッチの開発
日本化学会第 87 春季年会 大阪 (2007 年 3 月) 第 2 章

山内隆寛、三好大輔、窪寺隆文、神谷久弥、渡辺睦、花本秀生、杉本直己
スプライシングを制御するリボスイッチの機能改変
第 22 回生体機能関連化学シンポジウム 宮城 (2007 年 9 月) 第 2 章

山内隆寛

麹菌由来のリボスイッチの機能改変
兵庫県バイオ技術研究会 産学官地域研究交流会 兵庫 (2014 年 1 月)
第 1 章、第 2 章

謝辞

本研究をまとめるにあたり、終始ご懇篤なご指導とご高配を賜りました関西大学 化学生命工学部 生命・生物工学科 老川典夫教授に謹んで深甚なる謝意を表します。

本論文全般に関して終始有益なご助言を賜りました関西大学 化学生命工学部 生命・生物工学科 長谷川喜衛教授、松村吉信教授に心より御礼申し上げます。

本研究を遂行するにあたり、ご指導、ご助言を頂戴した甲南大学 先端生命工学研究所 杉本直巳教授、甲南大学 フロンティアサイエンス学部 三好大輔教授に厚く御礼申し上げます。

本研究の機会を与えて下さり、また研究の遂行に際して常にご配慮して頂きました、白鶴酒造株式会社 嘉納健二代表取締役社長、西村顕経営企画室長、櫻井一雅生産本部長、広畑修二研究室長、明石貴裕品質保証部次長に謹んで御礼申し上げます。

最後に本研究の全般にわたりご丁寧なご指導をいただき、多大なご協力をいただきました白鶴酒造株式会社研究室 窪寺隆文課長をはじめ、様々なご協力をいただきました研究室の現室員、OBの皆様に厚く感謝申し上げます。