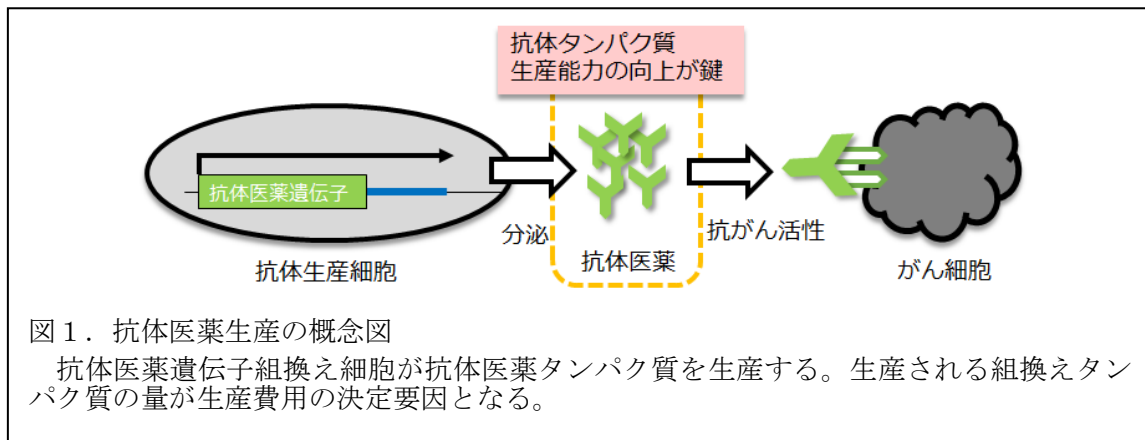


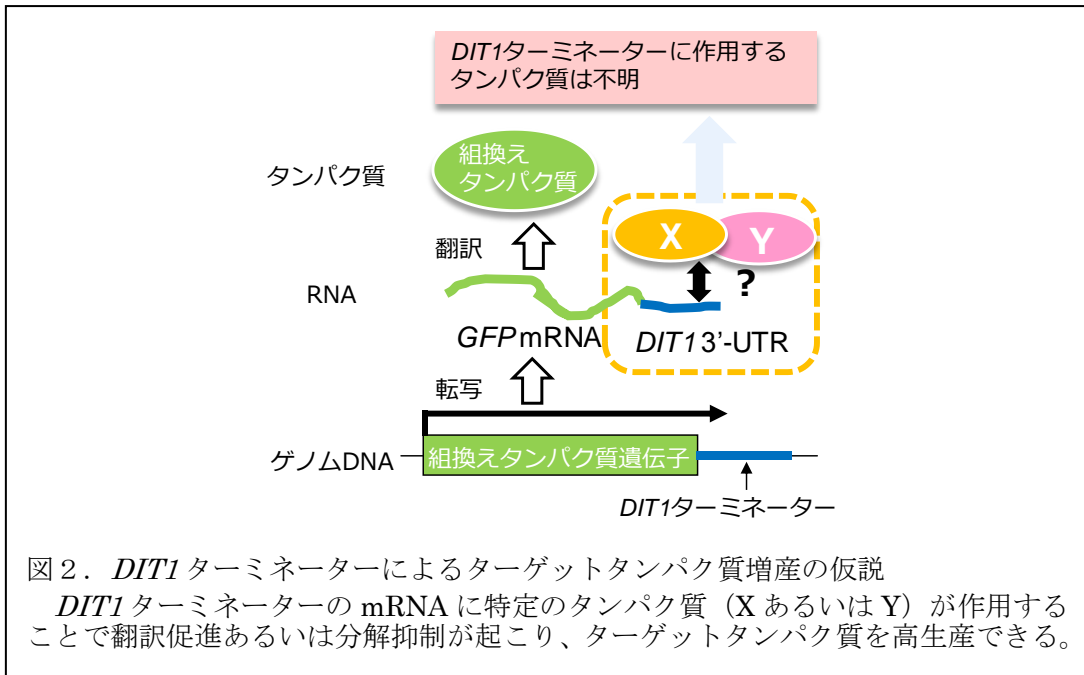
## 【研究の背景】

急速に普及し始めたオプシーボなどの抗がん作用を持つ抗体医薬は、従来の薬剤と比べ優れた薬効を持ちます。しかしながら、組換えタンパク質を主成分とする抗体医薬は、化学合成された薬剤と比較して生産費用がかさむので、薬価が非常に高額です。そのため、将来国の財政を圧迫する恐れさえ議論されています。組換えタンパク質の生産効率を向上させることができれば、大幅に薬価を低減できる可能性があります（図1）。



そのためには遺伝子発現をコントロールする必要があります。従来、組換えタンパク質の生産量を増やすためには、強力な遺伝子発現プロモーターを用いたり、遺伝子のコピー数を増加させたりする方法が用いられてきました。これら従来法の遺伝子発現制御は転写レベルで行われており、転写後調節レベルの制御は着目されていませんでした。転写後調節レベルの制御が可能になれば、抗体生産細胞は導入した組み換えタンパク質の mRNA 代謝に関わるエネルギーを大幅に低減できるため、生産効率の大幅な向上が期待できます。

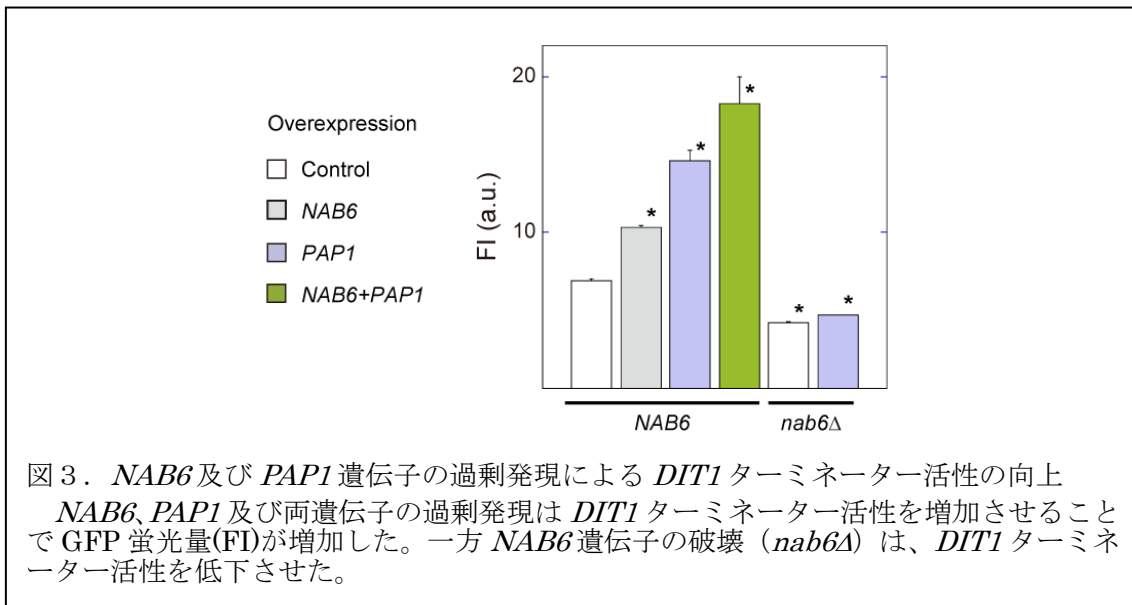
私たちは、遺伝子 mRNA の 3'側の非翻訳領域（3'-UTR）が転写後調節に関与することに着目し、3'-UTR 上流に配置した組換えタンパク質の生産を向上させる汎用的な手法の開発を目指して研究を実施しました。以前の研究において、モデル生物である出芽酵母を利用して、3'-UTR をコードするターミネーター領域が上流に配置した組換えタンパク質の生産量を調節する活性（ターミネーター活性）を網羅的に測定しました。その結果、最もターミネーター活性の強いものとして *DIT1* 遺伝子のターミネーター（以下、*DIT1* ターミネーター）を同定することに成功しました（参考論文1）。この遺伝子のターミネーターは培養条件などに依存せず強力な活性を示すことから、*DIT1* ターミネーターが汎用的な組換えタンパク質の増産システムに適していることも明らかにしました（参考論文2）。しかし、なぜ *DIT1* ターミネーターが強力な活性を示すのかは不明でした（図2）。



【研究内容】

① *DIT1* ターミネーターの活性に関与する遺伝子の同定

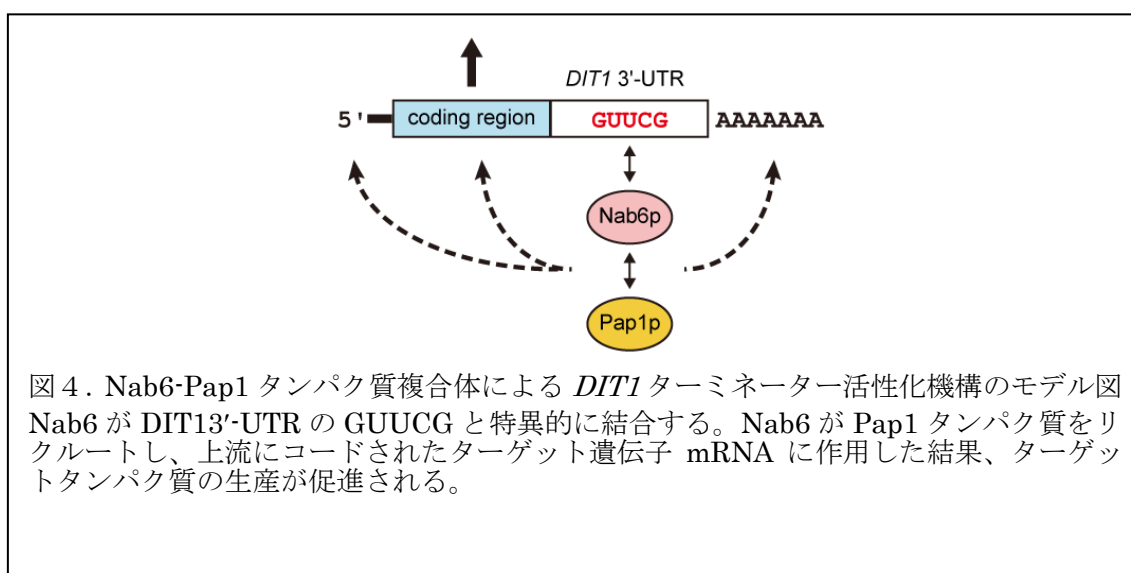
*DIT1* ターミネーターが強力な活性を示す原因遺伝子の同定のために、出芽酵母のゲノムを切断したゲノムライブラリーを導入し、*DIT1* ターミネーター活性をさらに向上させる遺伝子の探索を行いました。ゲノムライブラリーは出芽酵母のゲノム DNA を制限酵素処理し、その断片をベクターDNA へクローニングしたものです。ライブラリーを使った高活性を示す遺伝子探索の結果、2つの遺伝子 *PAP1* と *NAB6* 遺伝子が *DIT1* ターミネーターの活性を向上させるのに重要な遺伝子であることを突き止めました (図3)。



*PAP1* 及び *NAB6* の高発現は *DIT1* ターミネーター活性をそれぞれ、1.5 倍、2 倍向上させることができました。また *PAP1* 及び *NAB6* の共発現は 2.5 倍 *DIT1* ターミネーター活性を向上させることに成功しました。さらに *NAB6* 遺伝子を破壊した株 (*nab6Δ*) では、*DIT1* ターミネーター活性が大きく低下しました。さらに *nab6Δ* 株では *PAP1* の高発現による *DIT1* ターミネーター活性の向上が見られませんでした。このことから *NAB6* と *PAP1* は協調して *DIT1* ターミネーター活性を制御することが分かりました。

## ② Nab6 タンパク質結合配列の同定

Nab6 タンパク質は 4 つの推定 RNA 結合モチーフを持つタンパク質です。転写された遺伝子の下流に存在する *DIT1* ターミネーターの非翻訳 RNA の部位に Nab6 の RNA 結合モチーフが結合するのであれば、*DIT1* ターミネーター中に Nab6 が結合する配列が存在するはずですが。*DIT1* ターミネーターの 10 塩基欠損及び 1 塩基置換解析により、*DIT1* ターミネーターの活性に必要なシス配列 GUUCG を同定しました (図 4)。



更なる組換えタンパク質発現のために同定した *DIT1* ターミネーターに変異を導入し、*NAB6* と *PAP1* を高発現しているときにさらに高活性となる変異配列を同定しました。同定した *DIT1* ターミネーターの変異配列は培養の時期 (増殖期から定常期) で変わらず高活性を維持することが分かりました。

*DIT1* ターミネーター活性を上げる *NAB6* 及び *PAP1* の効果は、組換えタンパク質を誘導するプロモーター或いは組換えタンパク質の種類に関係なく機能しました。また、出芽酵母の別の系統株においても再現性を得ることができました。

以上の結果より、私たちは出芽酵母のタンパク質生産を向上させる遺伝子として *NAB6* 及び *PAP1* を同定することに成功しました。これらの遺伝子は *DIT1* ターミネーターの特徴的な配列 GUUCG を目印に機能することが分かりました。私たちが発見したこれらのシステムをヒト培養細胞系へ展開することができれば、より高効率で抗体医薬生産が可能となる可能性があります。

#### 【原著論文情報】

Yoichiro Ito, Takao Kitagawa, Mamoru Yamanishi, Satoshi Katahira, Shingo Izawa, Kenji Irie, Makoto Furutani-Seiki & Takashi Matsuyama, Enhancement of protein production via the strong DIT1 terminator and two RNA-binding proteins in *Saccharomyces cerevisiae*, *Scientific Reports* | 6:36997 | DOI: 10.1038/srep36997

#### 【参考論文】

1. Yamanishi M, Ito Y, Kintaka R, Imamura C, Katahira S, Ikeuchi A, Moriya H, Matsuyama T., A genome-wide activity assessment of terminator regions in *Saccharomyces cerevisiae* provides a "terminatome" toolbox., *ACS Synth Biol.* 2013, 2(6):337-347.
2. Ito Y, Yamanishi M, Ikeuchi A, Imamura C, Tokuhiko K, Kitagawa T, Matsuyama T., Characterization of five terminator regions that increase the protein yield of a transgene in *Saccharomyces cerevisiae*., *J Biotechnol.* 2013, 168(4):486-492.