

研究経過報告書

1. 研究課題名：出芽酵母新規タンパク質発現系を応用した抗生剤生合成経路の樹立
2. 研究代表者氏名：松崎 哲郎
3. 研究発表（論文、著書、学会発表等があれば記載してください）

【発表論文】

Geyao Dong, Tsuyoshi Nakai, **Tetsuo Matsuzaki**. A novel plasmid-based experimental system in *Saccharomyces cerevisiae* that enables the introduction of 10 different plasmids into cells. *FEBS Open Bio online ahead of print*, 2024. doi: 10.1002/2211-5463.13893.

【著書】

松崎哲郎. AI と薬剤師業務. 日本病院薬剤師会雑誌, 60(6) 573–577, 2024.

【学会発表】

(1) **松崎 哲郎**, Geyao Dong, 中井 剛

最大 10 種類のプラスミドを保持できる新規出芽酵母遺伝学実験系の樹立

日本病院薬剤師会東海ブロック・日本薬学会東海支部合同学術大会 2023 愛知県名古屋市・2023 年 11 月
口頭発表

(2) **松崎 哲郎**, Geyao Dong, 中井 剛

最大 10 種類のプラスミドを保持できる新規出芽酵母遺伝学実験系の樹立

日本薬学会第 144 年会 神奈川県横浜市・2024 年 3 月 口頭発表

【知的財産】

(1) プラスミド, addgene (ID 222479–222494)

(2) プラスミド, NBRP 酵母 (BYP10498–10513)

(3) 出芽酵母菌株, NBRP 酵母 (BY29629–29633)

4. 研究実績 (必要であれば図を用いても構いません)

【出芽酵母新規タンパク質発現系を応用した抗生剤生合成経路の樹立】

申請者はまず、生物資源データプラットフォームより *Acremonium chrysogenum* (NBRC 108744)を購入し出芽酵母用寒天培地 YPAD で培養後、そのゲノムを回収した。なお、*Acremonium chrysogenum* の遺伝子はスプライシングを受けるため本来であれば RNA を回収し逆転写して得た cDNA をクローニングのテンプレートとするべきである。しかし、本真菌の RNA 回収に関するプロトコールについて情報が得られなかったためゲノムを出芽酵母同様の手順で回収し (破碎→除タンパク質操作→RNase 処理→アルコール沈澱)、これを PCR のテンプレートとして順次遺伝子を pESC プラスミドにクローニングしていった。

Acremonium chrysogenum の遺伝子配列のほとんどは National Center for Biotechnology (NCBI)や Ensembl genome database など汎用されるデータベースに収録されていないため文献から配列情報を得てクローニングを進めた。上記の通りスプライシングのため exon を PCR で増幅し In-Fusion 反応を用いて複数 exon を同時にプラスミドに assembly する方略をとった。現時点では pcbC (Uniprot P05189)のクローニングを完了している。他の遺伝子 (pcbAB, cdfD1, cefD2, cefEF, cefG)のクローニングは現在進行中である。

【新規出芽酵母発現系の構築および改良】

上記と合わせ新規出芽酵母発現系の validation および改良も行なった。

Validation については 10 種類のプラスミドを保持する $\Delta 10$ 細胞が実際に 20 種類の異なる遺伝子を発現できるかを検証した。Firefly luciferase (Fluc)および Renilla luciferase (Rluc)の全長あるいは切断フォームをモデルタンパク質とした。そしてこれらの C 末端にエピトープタグ (FLAG, MYC, V5, HA)を付加しそれぞれの抗エピトープタグ抗体を用いたウエスタンブロットにより合計 20 種類のタンパク質バンドが検出できるかを検討した (図 1)。

6 種類、14 種類、20 種類のタンパク質を発現しうる細胞を用意し、細胞内でのモデルタンパク質発現を調べた結果、一部のモデルタンパク質の発現が検出されなかったが最大で 17 種類の発現が確認された (図 2, $\Delta 10 + 20$ constructs)。一

部のタンパク質が発現しなかった原因は現時点で定かではないが PCR により細胞内でのプラスミド間の相同組換えが示唆されたため、相同組換えによるモデルタンパク質領域の喪失が原因と考えている (データ未掲載)。

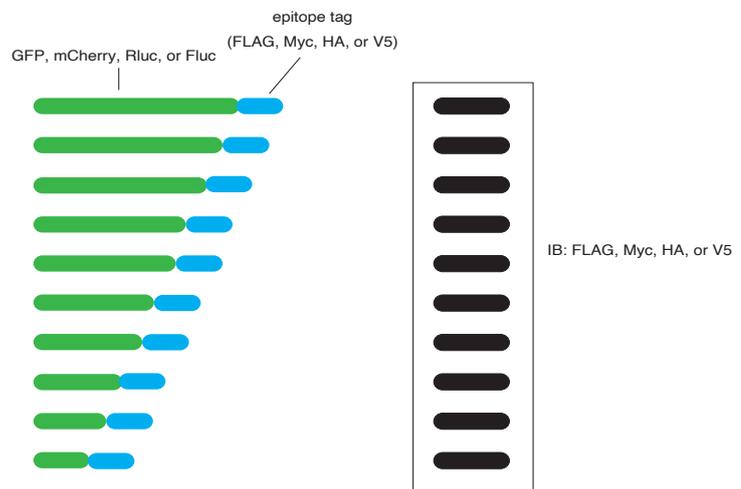


図 1.モデルタンパク質を用いた遺伝子発現の確認。
モデルタンパク質の種々の切断フォームにエピトープタグを連結した人工遺伝子をプラスミドにクローニングし、細胞に導入する。モデルタンパク質としては GFP, mCherry, Renilla luciferase (Rluc), または firefly luciferase (Fluc)を用いる。細胞破碎液に対しエピトープタグに対する抗体を用いたウエスタンブロットを行うと、ラダー上にバンドが見られる。これを利用して異なる遺伝子が発現しているか、検証した。

次に $\Delta 10$ 細胞の改良を行なった。 $\Delta 10$ 細胞は一般的に用いられる実験用出芽酵母株 BY4741/BY4742 に遺伝子欠損を加えることで構築したが、元株 BY4741/BY4742 より明らかに増殖が悪い (図 3)。そこで BY4741/BY4742 に導入した遺伝子欠損 (Ade2 欠損, Trp1 欠損, Tyr1 欠損, Arg1 欠損, Thr1 欠損)のうちどれが増殖遅延の原因となっているか検証した。具体的には $\Delta 10$ にこれら遺伝子を再導入し、その増殖を調べた。検証の結果、Thr1 欠損を回復した細胞ではほぼ元株の BY4742 と同等の増殖まで回復した (図 4)。この Thr1 欠損を回復した細胞は 9 種類の遺伝子欠損と 9 種類の栄養要求性を示すので $\Delta 9$ と命名した。 $\Delta 9$ は 9 種類のプラスミドを保持できることも確認した (図 5)。 $\Delta 9$ は明らかに $\Delta 10$ より増殖が良いことから 10 種類のプラスミドの導入が必要でない限り、原則 $\Delta 9$ を使用することが望ましいと考える。

なお上記 $\Delta 10$ と $\Delta 9$ 、およびプラスミドは NBRP 酵母および addgene に提供し、広く研究者が使用できるようにした (研究発表の項を参照)。



図 3. $\Delta 10$ の増殖速度。BY4742 ($\Delta 10$ の元株)と $\Delta 10$ の希釈系列を作成し、それぞれを YPAD 培地に滴下して 30°C で 1 日培養した。

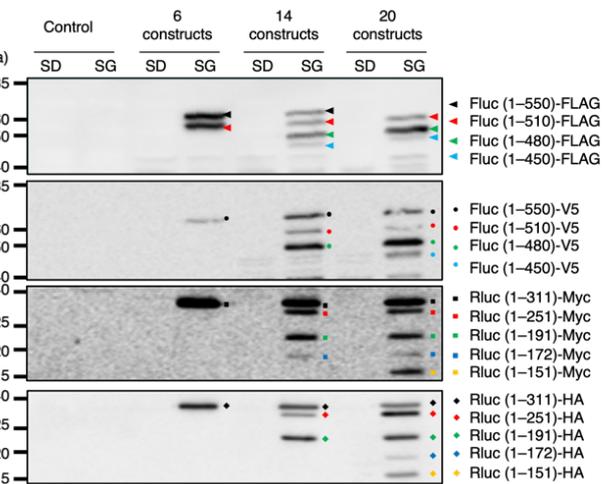


図 2. $\Delta 10$ を用いた同時遺伝子発現の確認 (図 1 も参照)。Firefly luciferase (Fluc), Renilla luciferase (Rluc) の種々の切断フォームに C 末端に epitope tag (FLAG, V5, Myc, または HA) を連結したコンストラクトを用意したプラスミドにクローニングし、順次 $\Delta 10$ に導入しコンストラクトを 0 種 (control), 6 種 (6 constructs), 14 種 (14 constructs), 20 種 (20 constructs) 発現する細胞を構築した。その後、各細胞を発現抑制条件 (SD) あるいは発現誘導条件 (SG) で培養し、細胞破砕液を調整した。破砕液に対し抗エピトプタグ抗体を用いたウエスタンブロットを行い、理論通りの数のバンドが検出できるか検証した。

図 4. $\Delta 10$ 遺伝子再導入株の増殖速度。BY4742、 $\Delta 10$ 、および記載の遺伝子を再導入した細胞 ($\Delta 10$ 再導入) の希釈系列を作成し、それぞれを YPAD 培地に滴下して 30°C で 1 日培養した。

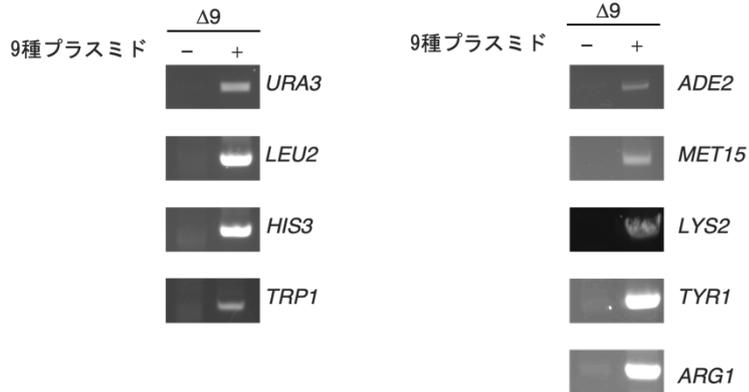
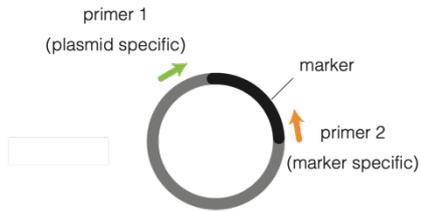


図 5. $\Delta 9$ が 9 種類のプラスミドを同時に保持できることの確認。
 $\Delta 9$ に順次プラスミドを導入し、細胞から DNA を回収し PCR を行なった。PCR ではマーカー特異的配列およびプラスミド特異的配列にそれぞれアニールするプライマーを用いた。-: $\Delta 9$; +: $\Delta 9$ に 9 種類のプラスミドを導入した細胞。