

平成 30 年 6 月 15 日現在

機関番号：24402

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K14906

研究課題名(和文)酵母に唯一つの目的タンパク質のみを生産させる技術開発

研究課題名(英文)Development a novel method to produce a single protein in yeast

研究代表者

山口 良弘(Yamaguchi, Yoshihiro)

大阪市立大学・複合先端研究機構・特任准教授(テニュアトラック)

研究者番号：00737009

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文):本研究は、真核生物である酵母を用いた目的タンパク質のみの発現を可能にする yeast SPP system 確立のために(1)大腸菌の RNA 配列特異的分解酵素遺伝子を酵母で厳密に発現制御可能な発現ベクター(2)低温で目的タンパク質を高発現できる目的タンパク質発現ベクター、の2つの発現ベクターを構築し、yeast SPP のプロトタイプを確立することを目的としている。
上記(1)および(2)を構築し、プロトタイプの確立を行った。様々な培養、誘導条件などを調節し最適化を試みたが、安定した SPP system の確立には至らなかった。

研究成果の概要(英文):In this study, our goal is to develop SPP system in *Saccharomyces cerevisiae*. To archive it, I first construct two plasmids. One is to express sequence-specific endoribonuclease and another is to express target protein.
We constructed the two plasmids to express MazF or MqsR and a target protein, respectively. We tried may conditions however we could not develop yeast SPP system.

研究分野：応用微生物

キーワード：SPP system MqsR MazF yeast

1. 研究開始当初の背景

膜タンパク質は全タンパク質の 30-35% を占め、その構造決定は医薬品開発に不可欠である。一方で、現在まで 3 次構造が明らかとなった膜タンパク質は、構造解析された全タンパク質の 2% にすぎない。これは、膜タンパク質の発現および精製が非常に困難なためである。

申請者は、大腸菌で目的タンパク質のみを生産できる Single-Protein Production (SPP) system を開発した。これは、MazF が 1 本鎖 RNA の ACA 配列を特異的に認識する配列特異的 RNA 分解酵素であることを利用した技術である。低温下で MazF が誘導されると、ACA を含む 菌体内のほぼ全ての mRNA が分解され、大腸菌の増殖は停止する。しかし、菌体内で ATP、DNA、RNA は合成されており、リボソームや RNA polymerase も存在するため、タンパク質合成能は維持されている。そこでアミノ酸配列を変えずに ACA を除去した目的タンパク質遺伝子を MazF と共発現させると、目的タンパク質のみが高発現し他の ACA 配列を持つ遺伝子の発現は遮断される (図 1)。大腸菌 SPP system は膜タンパク質の過剰発現や、タンパク質構造解析に有効な技術であるが、一方で (1) 真核生物特有の翻訳後修飾は生じない (2) 原核生物に存在しない細胞小器官局在タンパク質の構造解析は不可能 (3) 真核生物型シャペロンは存在しないため目的タンパク質が正しく折りたたまれているのか不明など、真核生物のタンパク質構造解析に多くの問題が生じている。これらの問題を解決するためには真核生物での SPP system, Yeast SPP system の確立が必須であった。

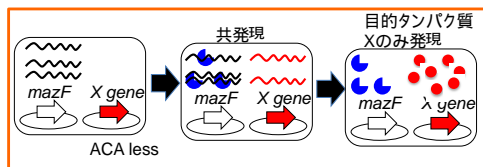


図 1 SPP system 概略。MazF は X 遺伝子の mRNA (ACA-less) は切断せず目的タンパク質 X のみが発現

2. 研究の目的

大腸菌 SPP system は目的とするタンパク質のみを生産させ、それ以外のタンパク質の発現を遮断できる画期的な方法である。しかし、大腸菌 SPP system は、宿主である大腸菌が原核生物であるがゆえに真核生物のタンパク質発現に多くの問題が生じている。本申請は、酵母を用いて他のタンパク質合成を遮断させ、目的タンパク質のみを高生産させる技術 yeast single protein production (yeast SPP) system を確立し、これまで困難であった真核生物の膜タンパク質構造解析およびエタノールのような宿主に毒性を示す物質生産の基盤技術開発を目的とした。これまでの

方法では (1) 真核生物特有の翻訳後修飾 (2) 細胞小器官局在タンパク質 (3) 真核生物型シャペロンによって正しく折りたたまれたタンパク質の解析が困難であったが、この方法が確立されれば可能となる。Yeast SPP system が確立されれば医薬品開発に不可欠なヒト膜タンパク質や細胞小器官局在タンパク質の構造解析が簡便になり、さらには、宿主に毒性を示す発酵生産にも応用可能で幅広い分野に貢献できることが期待された。

3. 研究の方法

MazF 発現ベクターの構築

MazF は非常に毒性の強いタンパク質であり、いかに発現を厳密に制御するかが SPP system 構築の鍵であり MazF の発現量を誘導剤の濃度依存的に制御可能であることが望ましい。そこで、テトラサイクリン誘導性プロモーターで MazF の発現が制御可能な pCM251-mazF (大腸菌 MazF-ec) を構築する。本ベクター pCM251 のテトラサイクリンによる発現制御は非常に厳密であり、濃度依存的に酵母内で発現量を調節できることが示されている (Belli *et. al. Nucleic Acids Res.* 1998)。MazF-ec は酵母での発現にコドンが最適化されたものを遺伝子合成によって合成し、pCM251 にクローニングする。

酵母 *Saccharomyces cerevisiae* での MazF 毒性の確認

構築した pCM251-mazF を用いて *S. cerevisiae* を形質転換し、MazF 誘導後の生育速度を解析する。MazF によって生育が阻害されることを確認するとともに、生育阻害に必要な最小誘導剤 (ドキシサイクリン) 濃度を決定する。さらに、MazF によってタンパク質合成が阻害されることを ³⁵S-メチオンを用いたパルスラベルで確認する。もし上記実験がうまくいかない場合はガラクトース誘導性プロモーターに切り替え上記実験を同様に行うとともに MazF 以外の RNA 配列特異的分解酵素である MqsR も検討する。

目的タンパク質高発現ベクターの構築

目的タンパク質を高発現するために、ガラクトース誘導性プロモーターを有する pYES2 (Invitrogen) を用いる。pYES2 ベクターにはプロモーター領域に 2 個、5'-UTR に 1 個、転写終結領域に 3 個の ACA が存在する。これらの ACA は、Primestar mutagenesis kit を用いて塩基置換を行い、ACA-less pYES2 (pYES2 sp) を構築する。その後、目的タンパク質としてヒトカルモジュリンおよび検出の容易な GFP をクローニングする。すべての遺伝子はアミノ酸配列の変更なしに ACA-less (MazF 耐性) にすることが可能である。これら目的タンパク質の遺伝子は酵母発現に最適化したコドンで ACA-less のもの

を合成(Genscript)したものを実験に用いる。

第一世代 yeast SPP system の確立・至適化システムの根幹と成る目的タンパク質の発現系を構築する。対数増殖期中期にドキシサイクリンを添加し低温下で MazF を 30 分発現させる。その後ガラクトースを含む培地に置換し、目的タンパク質を誘導し、誘導後のタンパク質合成パターンをパルスラベルにより解析する。ドキシサイクリンの濃度、培養温度、MazF の誘導時間などを調節し yeast SPP system を構築する。

もし、SPP system の構築に手間取った場合は、アポトーシスが誘導されていないか確認する。Mammalian cell では、MazF による RNA の分解によってアポトーシスが誘導される。そこで、酵母でも RNA 分解によってアポトーシスが誘導されるか確認する。MazF 誘導後アポトーシスの指標である DNA 断裂、細胞膜の反転などを測定する。もし、MazF がアポトーシスを誘導する場合、その経路を解析し関連遺伝子の欠損させることで、MazF によってアポトーシスが誘導されない酵母を作成する。

4. 研究成果

本研究は、真核生物である酵母を用いた目的タンパク質のみの発現を可能にする yeast SPP system 確立のために (1) 大腸菌の RNA 配列特異的分解酵素遺伝子を酵母で厳密に発現制御可能な発現ベクター (2) 低温で目的タンパク質を高発現できる目的タンパク質発現ベクター、の 2 つの発現ベクターを構築し、yeast SPP system のプロトタイプを確立することを目的としている。

[H 28 年度]

当初の計画通りに、テトラサイクリン誘導性プロモーターで MazF の発現が制御可能な pCM251-mazF (大腸菌 MazF-ec) を構築した。構築した pCM251-mazF を用いて *S. cerevisiae* を形質転換し、MazF 誘導後の生育を解析した。MazF によって生育が阻害されることを確認するとともに、生育阻害に必要な最小誘導剤 (ドキシサイクリン) 濃度を寒天培地を用いて決定した。

次に、ガラクトース誘導性プロモーターを有する pYES2 (Invitrogen) を用いて目的タンパク質を高発現するベクターの構築を行った。pYES2 ベクターにはプロモーター領域に 2 個、5'-UTR に 1 個、転写終結領域に 3 個の ACA が存在する。これらの ACA を、Primestar mutagenesis kit (Takara Bio) を用いて塩基置換を行い、ACA-less pYES2 (pYES2 sp) を構築した。その後、目的タンパク質としてヒトカルモジュリン (CaM) をクローニングした。すべての遺伝子はアミノ酸配列の変更なしに ACA-less (MazF 耐性) にすることが可能である。CaM 遺伝子は酵母発現に最適

化したコドンで ACA-less のものを合成 (Genscript) し実験に用いた。MazF と目的タンパク質を低温化で共発現させた結果、MazF 発現後でも酵母の生育を完全に停止できなかった。そこで、MazF を用いて酵母が代謝はアクティブだが生育は停止している SPP 状態になることが可能なのか解析した。その結果、MazF の生育阻害活性は酵母を SPP 状態にするためには十分ではないことが明らかとなった。

[H 29 年度]

そこで、MqsR に着目した。MqsR は大腸菌で発見された GCU、GCC および GCA 配列を特異的に切断する RNA 分解酵素である。そこで、酵母の実験に MqsR を用いる前に、まず初めに MqsR で SPP 状態を作り出すことができるかどうかを大腸菌を用いて確認した。MazF を用いた大腸菌 SPP system と同様に IPTG 誘導性プロモーターを有する pACYC プラスミドに MqsR をクローニングした。目的タンパク質の発現には pCold プラスミドを使用し、目的タンパク質として eotaxin を選択・クローニングした。

その結果、MazF と同様に MqsR を用いても大腸菌 SPP system は機能することが示された。さらに、MazF を用いた SPP system は 72 時間後を超えたあたりから徐々に大腸菌が生育を再開してしまうという問題点があった。しかし、MqsR を用いた大腸菌 SPP system では 72 時間を超えても生育は再開せず、最大 120 時間後でも SPP 状態が維持されていた [学会発表 1]。このように MqsR を用いても SPP 状態を誘導できることが確認できたため、MazF と同様に MqsR の発現ベクターおよびプロモーターおよび転写終結領域から MqsR 切断配列を除いたプラスミドの構築を行い、MqsR を用いた yeast SPP system の構築を行うことにした。CaM の遺伝子からは MqsR の切断配列をアミノ酸配列を変えずに除くことが不可能であったため、eotaxin を目的タンパク質とした。GCH free (MqsR 耐性) eotaxin を pYES2 にクローニングし、その後プロモーター領域および転写終結領域から MqsR 切断配列を inverse PCR を用いて除いた。また、MqsR 発現プラスミドのプロモーター領域および転写終結領域からも同様に MqsR 切断配列を取り除いた。MqsR 発現後の酵母の生育を調べた結果、MazF よりも強く生育が阻害された。よって、MqsR は MazF よりも yeast SPP system 構築に適していることが示された。次にこれらの構築したプラスミドを用いて酵母での SPP system に最適な温度および誘導時期を検討し、最適と思われる条件を決定した。本条件を用いて酵母での目的タンパク質のみの発現を用いて試みた。その結果、酵母でのパルスラベルに問題があることが判明した。さらにパルスラベルの条件などを検討したが、yeast SPP system を構築することはできなかった。

このように、残念ながら yeast SPP system を期間内に構築することはできなかった。しかし、今回明らかとなった事実を基に研究を進めることができれば、近い将来に yeast SPP system を確立することは可能であると考えられる。また、yeast SPP system が確立できない理由として RNA 分解によってアポトーシスが誘導されている可能性がある。今回は時間の都合で行うことができなかったが、Mammalian cell では、MazF による RNA の分解によってアポトーシスが誘導されることが明らかとなっている。MazF または MqsR 誘導後にアポトーシスの指標である DNA 断裂、細胞膜の反転などを測定し、もし、MazF がアポトーシスを誘導する場合、その経路を解析し関連遺伝子の欠損させることで、MazF によってアポトーシスが誘導されない酵母を作成することで yeast SPP system の構築が可能となるだけでなく、これまで明確にされていない酵母のアポトーシス経路に新たな光をあてることができるかもしれない。

また、今回構築できなかった別の理由として、tRNA に存在する切断配列の影響があるのかもしれない。大腸菌 SPP system では、一本鎖 RNA の ACA 配列を特異的に切断する大腸菌の MazF を使用して目的タンパク質 (ACA-less) のみを発現させ、その他のタンパク質の発現を遮断する。これは、大腸菌の tRNAs の一本鎖領域に ACA が存在しないことが大きく寄与している。おそらく長い進化の過程で大腸菌が自身の MazF に適応した結果と考えられる。しかし、酵母では、33 もの tRNAs に ACA が存在することから、大腸菌 MazF を用いた Yeast SPP system の構築は容易ではないのかもしれない。今後、この問題点を克服するためには、酵母の ACA または GCH を有する tRNAs を全て ACA- or GCH-less にすることで問題が解決するかもしれない。酵母の遺伝子操作は非常に容易であり、染色体上の遺伝子置換は大腸菌よりも容易に行うことができる。この特性を利用して tRNAs から ACA または GCH を取り除き大腸菌 MazF または MqsR を用いた Yeast SPP system の構築が可能になると考えている。

これらの問題点を克服して yeast SPP system を構築できれば、これまで停滞している真核生物膜タンパク質の構造解析に強い力を発揮できる。SPP system は膜タンパク質の発現系として有用であると共に目的タンパク質のみを合成し安定同位体で標識できる。よって得られたタンパク質は精製せず生きた細胞内で直接構造を解析 (in-cell NMR) できる。Yeast SPP system の確立は、人の健康に重要な膜タンパク質構造決定の深刻で重要なボトルネックを解決できる。また、修飾タンパク質および細胞小器官に局在するタンパク質の構造解析にも有用であろう。Yeast SPP system は、これまで不可能であったミトコンドリアや液胞など真核生物特有の細胞小器官に局在する

膜タンパク質の生細胞内での構造解析も可能にする。Yeast SPP system は、人の健康に重要な膜タンパク質のみならず、細胞小器官局在タンパク質の構造および動態解析にも応用可能な基盤技術で、医薬品開発へ大きく寄与できる。さらに、酵母は発酵食品を始め物質生産に非常に優れている。エタノール等の宿主に毒性を示す物質の酵母を用いた生産にも SPP system 応用可能である。SPP 状態の菌は、ATP、アミノ酸、RNA 合成などの代謝活性は保持しているが、生育は停止しているため、ストレスに対して強い耐性を示すと考えられる。Yeast SPP system は、毒性の高い物質 (エタノール、アミノ酸類似体など) の微生物生産を可能にする新規技術であり、医薬品、食品、工業などの幅広い分野へ貢献できる基盤技術になりうる。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 0 件)

[学会発表](計 1 件)

MqsR を介した目的タンパク質のみを生産可能な発現系の構築、
釋 真緒、井上 正順、山口 良弘、
日本農芸化学会 2017 年度大会、京都女子大学、平成 29 年 3 月 17-20 日、査読無し

[図書](計 0 件)

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山口 良弘 (YAMAGUCHI, Yoshihiro)

大阪市立大学・複合先端研究機構・

特任准教授 (テニュアトラック)

研究者番号 : 00737009