

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 6 年 6 月 13 日現在

機関番号：14501

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2023

課題番号：20K05229

研究課題名（和文）新規過剰発現ライブラリを用いた酵母のタンパク質分泌過程におけるボトルネックの解明

研究課題名（英文）Elucidation of the bottlenecks in the yeast protein secretion process using the novel gene-overexpression library

研究代表者

伊藤 洋一郎（ITO, YOICHIRO）

神戸大学・先端バイオ工学研究センター・特命准教授

研究者番号：50379153

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：酵母におけるタンパク質分泌経路に関わる研究は古くよりなされてきたが、その全貌は明らかになっていない。本研究では、独自に開発したピキア酵母の過剰発現ライブラリ及び遺伝子欠損ライブラリを用いることで、複数の抗体生産株からスクリーニングにより分泌発現過程に関わる因子群を探索、比較する総論的な研究を行った。得られた因子の中には、抗体生産性を2倍程度増加させるものも存在したが、飛躍的に増加させるボトルネック因子は存在しなかった。得られた因子を一つの酵母株へ集積させる戦略が抗体生産性の向上に有効であったことから、分泌経路の各段階に多様なボトルネックが存在することが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

酵母での遺伝子欠損ライブラリは古くより作製方法も含めていくつか報告例があるが、過剰発現ライブラリはツールとして利用できるものは少なかった。そのため、酵母における過剰発現ライブラリ作製法の開発に成功したことは学術的にも重要な成果である。また本研究の成果は、学術研究としてのタンパク質の分泌発現機構の理解だけでなく、産業上重要な難分泌タンパク質の生産性の高度化に繋げられる。

研究成果の概要（英文）：The process of the yeast protein secretion has been studied so far, however the detailed picture does not become clear. In this study, a general study was performed by exploration and comparison of secretion factors which were found from the screening of originally developed gene-overexpression library for antibody-producing yeast strains (*Komagataella phaffi*). In the secretion factors obtained from the screening, although there were some factors which increased protein productivity around 2 times, the bottlenecked factor to increase dramatically could not find. The accumulations of the secretion factors in one yeast strain were effective strategy for improving antibody productivity. Thus, it was suggested that some rate-limiting steps would exist in various process of the yeast protein secretion.

研究分野：進化学

キーワード：タンパク質分泌発現 酵母 ピキアパストリス 過剰発現ライブラリ 遺伝子欠損ライブラリ

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

酵母のタンパク質分泌発現においては、古くより様々な研究がなされており、非常に多くの遺伝子産物(タンパク質)が関わるタンパク質分泌経路(mRNA合成) 小胞体 輸送小胞 ゴルジ体 輸送小胞 細胞膜 (分泌))が見出されている。また近年、多くの酵母ゲノム配列が解読され、遺伝子のアノテーションがなされてきた。しかし酵母には、わずか 5,000 個程度の遺伝子しか存在しないにも関わらず、タンパク質の分泌過程に関わっている因子は 200 個程度しか同定されていない。最近の研究において、トランスクリプトーム解析により分泌過程に関わる複数の新規因子が同定されており、さらに数多くの因子が埋もれていると考えられる。このようにタンパク質の分泌発に直接的または間接的に関わる因子は、未だに出揃っていない。また近年のタンパク質分泌機構に関する研究においては、生産性向上のための工学的な各論研究が主流であり、総論的な研究は未報告であった。そこで研究代表者は、独自に開発した過剰発現ライブラリを用いることで、複数の抗体生産株からスクリーニングにより分泌過程に関わる新規因子群を探索、比較する総論的な研究を発想した。

2. 研究の目的

研究代表者は、近年ピキア酵母の全遺伝子を対象として、各遺伝子のプロモーター配列を高発現プロモーター配列に置き換えることで過剰発現ライブラリが作製できる手法を見出した。本研究では、その手法の確立とその応用例として、酵母の外来タンパク質分泌過程におけるボトルネック因子を全遺伝子探索により解明することを研究当初の目的とした。また過剰発現ライブラリ作製法を改変した遺伝子欠損ライブラリ作製法を開発し、上記の総論的研究に加える。本研究は学術研究としてのタンパク質の分泌機構の理解だけでなく、産業的に重要な、低分泌生産性外来タンパク質の生産性の高度化にも繋げられる。

3. 研究の方法

(1) 過剰発現ライブラリの「質」の検証

過剰発現ライブラリ作製法に従ってモデル遺伝子単体の過剰発現株を作製し、そのモデル遺伝子の mRNA 量を評価することで検証した。また過剰発現ライブラリ化した抗体生産ピキア酵母株を用いて、次世代シーケンスによる DNA 配列レベルでの検証を行った。

(2) 過剰発現ライブラリを用いた分泌因子の探索

過剰発現ライブラリからの探索には、大量の株のスクリーニングが必要である。まずタンパク質分泌生産性を指標とした 96 ウェルプレートでのハイスループットスクリーニング法を開発した。その手法を用いて、3種類の抗体生産ピキア酵母株の過剰発現ライブラリからタンパク質分泌発現に関わる因子(過剰発現型分泌因子)を探索した。

(3) 遺伝子欠損ライブラリ作製手法の開発と遺伝子欠損型分泌因子の探索

過剰発現ライブラリ作製法を改変して、遺伝子欠損ライブラリを作製し、タンパク質分泌発現に関わる因子(遺伝子欠損型分泌因子)を探索した。

(4) 高生産因子のリスト化と比較評価

各外来タンパク質生産株に対して分泌発現に寄与した因子のリストを作製し、俯瞰することで共通する機能性やそのつながりを抽出し、外来タンパク質分泌過程におけるボトルネックを検討した。

(5) 分泌因子の集積による外来タンパク質高生産ピキア酵母株の創生

過剰発現ライブラリからのスクリーニングにより得られた分泌因子群を低分子抗体生産酵母株に順次導入し、分泌因子の集積に対する外来タンパク質の生産性を評価した。

4. 研究成果

(1) 過剰発現株ライブラリの「質」の評価：

2種類のモデル遺伝子を選び、過剰発現ライブラリ作製方法を用いて作製したピキア酵母株内の、それぞれの mRNA 量を評価した。過剰発現のコントロールとして、ライブラリ作製用と同じ高発現プロモーター配列の下流にそれぞれのモデル遺伝子を載せたピキア酵母株を新たに作成し、それぞれの mRNA 量を比較評価した。それぞれの株に対してモデル遺伝子 mRNA 量を測定した結果、過剰発現ライブラリ作製法を用いて作製した株では、共に高発現コントロール株と同等の高い mRNA 発現量を示した。

次に、抗体分泌生産ピキア酵母株の過剰発現ライブラリを作製し、次世代シーケンサーを用いて、酵母ゲノムにおいて目的の DNA 配列群の存在を確認した。その結果、外注で作製した一本鎖 DNA 合成時のエラー由来による挿入・欠損変異が多くみられたものの、各遺伝子のプロモーター配列が高発現プロモーター配列に置き換わっている細胞の存在が確認できた。またライブラリ作製過程の DNA 断片レベル及びプラスミドレベルにおいても、目的とするすべての DNA 配列群が次世代シーケンスにより確認できた。

以上より、本手法により作成されたライブラリは、過剰発現ライブラリとして機能することが確認できた。

(2) ピキア酵母過剰発現ライブラリからのスクリーニング

ピキア酵母での分泌生産性が異なる 3 種類の低分子抗体発現ピキア酵母株を用いて過剰発現株ライブラリを作製した（多様性：約 5,000）。各ライブラリに関して、96 ウェルプレート 200 枚より（約 19,000 株）独自に開発したハイスループットスクリーニングを用いて高抗体生産株の選択、そして得られた酵母株での過剰発現遺伝子の同定を行った。同定された遺伝子の過剰発現が抗体の高生産性に関与しているかを確認するため、同定された遺伝子の過剰発現株をフレッシュな抗体生産株に新たに導入し、その効果を確認した。その結果、親株よりも高い抗体生産性を示した過剰発現型分泌因子（過剰発現により外来タンパク質の分泌生産性を増加させるピキア酵母遺伝子）が計 35 遺伝子同定できた。そのうちの多くの遺伝子は未報告の新規因子であった。この成功により、本手法にて作製したライブラリが、過剰発現ライブラリとして機能したことを実証した。

(3) ピキア酵母遺伝子欠損ライブラリ作製法の開発とスクリーニング

過剰発現ライブラリ作製に使用した「高発現型プロモーター」配列を「ターミネーター」配列に置き換えることで遺伝子欠損ライブラリの作製法を開発した。本手法を用いてモデル遺伝子の遺伝子欠損を行った。遺伝子欠損株のモデル遺伝子の mRNA 量を測定したところ、モデル遺伝子の mRNA 量の低下が確認できた。

この手法を用いて、1 種類の抗体生産ピキア酵母株に対して遺伝子欠損ライブラリを作製した。そのライブラリに対し、抗体分泌生産性を指標としたハイスループットスクリーニングを実施したところ、親株と比較して高い抗体生産株が多数取得できた。得られた分泌因子候補株からそれぞれ遺伝子欠損された遺伝子を同定後、同遺伝子を特異的に欠損させた抗体分泌発現株を新たに作製し、改めて抗体の分泌生産性を評価したところ、分泌生産性の向上が確認できた。最終的には、多数の新規因子を含む、17 種類の遺伝子欠損型分泌因子（遺伝子欠損により外来タンパク質の分泌生産性が増加するピキア酵母遺伝子）を得ることに成功した。以上の結果より、遺伝子欠損ライブラリ作製法の確立に成功した。

(4) ライブラリスクリーニングにより高生産性が確認された因子の比較評価

上記の結果より、過剰発現型分泌因子では計 35 遺伝子、遺伝子欠損型分泌因子では 17 遺伝子の同定に成功した。しかし親株と比較して、目的抗体の生産性を 2 倍程度増加させる分泌因子は存在したものの、飛躍的に抗体生産性を増加させるボトルネック因子は存在しないことが示唆された。また同定された過剰発現型及び遺伝子欠損型分泌因子の中には、アノテーションされていない機能性未知の因子が、共に多く存在した。その他の因子においても、遺伝子がアノテーションされているにも関わらず、分泌過程に関わる機能が想定されるものは少なかった。

(5) 分泌因子を集積による高抗体生産ピキア酵母株の創生

更なる高分泌生産性の獲得に向けて、過剰発現型分泌因子から 4 遺伝子を選び、抗体分泌生産ピキア酵母株へ導入した。分泌因子を順に導入した酵母株の抗体生産性を評価したところ、分泌因子の導入されるたびに、抗体生産性は増加していた(図 1)。すなわち分泌因子を一つの酵母株に集積する戦略は、難分泌生産性外来タンパク質の生産性向上に有効であり、さらに分泌過程の様々な段階に多様なボトルネックが存在することを示唆した。

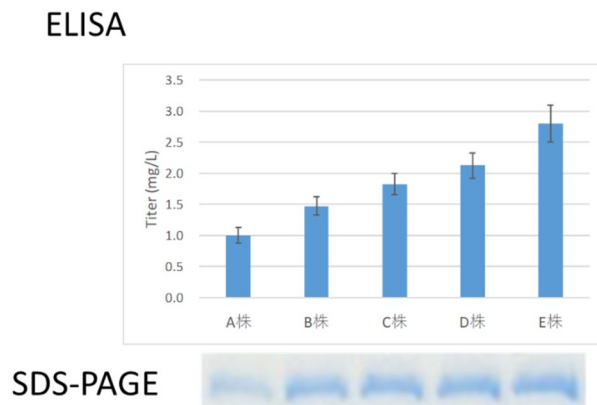


図 1 分泌因子を集積による低分子抗体生産ピキア酵母株の抗体生産性評価

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Ito Yoichiro, Ishigami Misa, Terai Goro, Nakamura Yasuyuki, Hashiba Noriko, Nishi Teruyuki, Nakazawa Hikaru, Hasunuma Tomohisa, Asai Kiyoshi, Umetsu Mitsuo, Ishii Jun, Kondo Akihiko	4. 巻 5
2. 論文標題 A streamlined strain engineering workflow with genome-wide screening detects enhanced protein secretion in <i>Komagataella phaffii</i>	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Communications Biology	6. 最初と最後の頁 1~12
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s42003-022-03475-w	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Ito Yoichiro, Ishigami Misa, Hashiba Noriko, Nakamura Yasuyuki, Terai Goro, Hasunuma Tomohisa, Ishii Jun, Kondo Akihiko	4. 巻 15
2. 論文標題 Avoiding entry into intracellular protein degradation pathways by signal mutations increases protein secretion in <i>Pichia pastoris</i>	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Microbial Biotechnology	6. 最初と最後の頁 2364~2378
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/1751-7915.14061	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 伊藤洋一郎, 石井純, 近藤昭彦	4. 巻 81
2. 論文標題 ピキア酵母の多重遺伝子欠損による難発現抗体タンパク質の生産性向上	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 B&Iバイオサイエンスとインダストリー	6. 最初と最後の頁 234-236
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 1件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 伊藤洋一郎, 石上美佐, 寺井悟朗, 中村泰之, 橋場倫子, 西輝之, 中澤光, 蓮沼誠久, 浅井潔, 梅津光央, 石井 純, 近藤 昭彦
2. 発表標題 有用タンパク質の高生産化に向けた新たなピキア酵母株の開発方針
3. 学会等名 日本生物工学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 伊藤洋一郎
2. 発表標題 酵母のタンパク質分泌経路におけるボトルネックの解明に向けて
3. 学会等名 日本農芸化学会（招待講演）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 伊藤 洋一郎, 寺井 悟朗, 石上 美佐, 橋場 倫子, 中村 泰之, 番場 崇弘, 雲北 涼太, 蓮沼 誠久, 浅井 潔, 石井 純, 近藤 昭彦
2. 発表標題 ピキア酵母におけるターミネーター置換での遺伝子発現量制御
3. 学会等名 第75回 日本生物工学会大会
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------