

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年 6月 5日現在

機関番号：13901

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011 ～ 2012

課題番号：23656522

研究課題名（和文）

汎用的シグナルペプチド配列最適化法の開発

研究課題名（英文）

Development of Signal Peptide Optimization Tool

研究代表者

中野 秀雄 (NAKANO HIDEO)

名古屋大学・生命農学研究科・教授

研究者番号：00237348

研究成果の概要（和文）：

組換え微生物中の外来タンパク質の分泌レベルは、シグナルペプチド（SP の）と標的タンパク質との組合せに強く依存し、各標的タンパク質に対する SP 配列の最適化は、原核生物と真核生物の両方で、異種発現の分泌タンパク質の生産性を最大化するために重要なステップである。

本研究では、宿主ゲノムに由来するシグナルペプチドライブラリーを利用して、容易に標的タンパク質に融合 SP のライブラリーを作ることができる、新規なシグナルペプチド最適化ツール（SPOT）の開発を行った。本手法ではリモートカッター制限酵素と相同組換えを利用することで、通常必要な特定の介在配列を含まずに、ライブラリーを構築することができる。*Aspergillus oryzae* 由来の β -ガラクトシダーゼを標的蛋白とし、が *Saccharomyces cerevisiae*, 典型的な真核生物発現宿主からの分泌を検討したところ、比較的少数 SP ライブラリーから、効率よく優れた SP 配列をスクリーニングすることができた。さらに、それぞれの SP を SignalP ソフトウェアで分析した D スコアと、分泌効率の相関を調べたところ、D スコアが極端に低いものの分泌効率は低かった。このことは本ソフトウェアの使用することで、SP ライブラリーの品質を高めることができることをしめしている。本研究で開発した方法は、様々な宿主細胞中のタンパク質のさまざまな目的で使用することができ、タンパク質の異種分泌発現の向上に寄与できる。

研究成果の概要（英文）：

The secretion level of foreign protein in recombinant microbe is strongly dependent on the combination of signal peptides (SPs) and the target protein; therefore optimization of SP sequence to each target protein is a crucial step to maximize the productivity of the secreted protein in heterogenous expression both in prokaryote and eukaryote.

In this research, we have developed a novel method to adjust SP for each target protein utilizing the library of endogenous signal peptides of host cells, named signal peptide optimization tool (SPOT), which can easily make a library of SP fused to a target protein without any interfacial sequence. As a model system, beta-galactosidase from *Aspergillus oryzae* was used as a target protein for the secretion from *Saccharomyces cerevisiae*, a typical eukaryotic expression host, and demonstrated that several SPs giving a larger amount of secreted protein from the recombinant yeast were found by the screening of relatively a small number of independent clones. In addition, a correlation between the secretion efficiency and the D-score of each signal peptide analyzed by Signal P software was found, suggesting the use of the software would be helpful to increase the quality of the library. The developed method can be used for variety of proteins in a variety of host cells.

交付決定額

(金額単位：円)

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|-------|-----------|---------|-----------|
| 交付決定額 | 3,000,000 | 900,000 | 3,900,000 |

研究分野：工学

科研費の分科・細目：プロセス工学, 生物機能・バイオプロセス

キーワード：生物機能工学

1. 研究開始当初の背景

多くのグラム陽性細菌や糸状菌では、特定の蛋白質を大量に分泌生産することが知られている。培養条件を検討すれば、時には1L培養液当たり、数十グラムにもなる。しかしながら異種蛋白質をこれらの微生物で生産を試みても、多くの場合このレベルには達しない。これまで合成量を高めるため、高効率プロモーターの検索、菌体外プロテアーゼ欠損株の作製などが行われてきた。また異種発現の場合、これまで主にその宿主で良く分泌される蛋白質の分泌シグナルを用いることが多かったが、最近の研究では、異種タンパク質の分泌生産においては、それぞれの蛋白質に応じたシグナルペプチド (SP) 配列を選択することが重要であることが報告されている。例えば Brockmeier らは *Bacillus subtilis* の SP 配列をライブラリー化して、その中から最適な SP をスクリーニングするシステムを報告している (Brockmeier et al. *J. Mol. Bio.* **362**, 393, 2006)。また産総研の佐原らは、酵母のゲノム配列から、シグナルペプチド予測ソフトを用いて候補配列を 440 個選び出し、ルシフェラーゼに融合し、効率良く分泌させる配列として数種類の配列を選び出している (特許公開 2007-167062)。

しかしながら、蛋白質の成熟部分に、直接 SP 配列のライブラリーを融合することは、困難である。制限酵素サイトで入れるためには、少なくとも最初の 2 アミノ酸は固定されてしまうことになる。これまでの実験では、いずれもレポーターとして用いる蛋白質の

成熟 N 末端に、任意の 2 アミノ酸を付加するか、あるいはタグ配列などを付加し、N 末配列を固定して行っている。

しかしこれらの研究で明らかになってきたように、異種蛋白質生産においては、目的とする蛋白質にそれぞれマッチしたシグナル配列が必要であることが示されてきたことを考えると、成熟 N 末部分の配列が固定されてしまうのは、重大な点を見落としてしまう可能性がある。実際に成熟 N 末配列が、タンパク質生産に大きな影響を与えることが報告されている (Li et al. *PNAS* **85**, 7685, 1988)。また蛋白質によっては末端配列が重要な意味を持つものも多い。

従って、どのような蛋白質の配列に対しても、介在配列無しに SP のライブラリーを融合し、その中から最も効率の良いものを選び出すことが必要である。

2. 研究の目的

インフォマティクス技術を用いて、ゲノム配列中からシグナルペプチドの候補配列を選択し、ライブラリー化を行う。次に分泌生産させる異種蛋白質と、介在配列無しでその成熟配列と直接結合したライブラリーを構築し、目的タンパク質を最も効率良く分泌生産するシグナル配列を検索する汎用的ツール (Signal Peptide Optimization Tool:SPOT) を構築する。対象とする宿主は酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) とし、シグナルペプチドの汎用的最適化ツールとして確立する。

3. 研究の方法

産総研の佐原らより提供された酵母 SP ライブラリー(440 種類)に、リモートカッター制限酵素の認識配列を PCR により付加する。このとき SP の DNA 配列に応じ、内部で切断しないように 3 種類の制限酵素を分けて用いる。レポーターとして活性測定が容易な糸状菌由来 beta-galactosidase(LacA) (Kamiya et al. J Biotechnol. 146, 151 2010) を用いる。この成熟 N 末配列を含む 15 塩基を DNA 合成し、2 塩基突出した部位でリガーゼによる結合させる。PCR で融合 DNA 断片を増幅後、In fusion クローニング (Takara) で、レポーター配列全長とシグナル配列の融合物を酵母-大腸菌シャトルベクターに組み込み、大腸菌に導入してコロニーを形成させた。作製された組み換えプラスミドの一部についてシーケンス解析を行い、ライブラリーが設計通り作製されているか調べた。

次に大腸菌コロニーを十分な数かき集め、DNA を抽出後、*S. cerevisiae* の実験株に導入する。X-Gal を含む培地で培養し、コロニー及びその周辺の色にて分泌量を推定し、次に液体培養を行って、分泌量を測定し、合わせて DNA 配列を調べた。また SignalP を用いて、各シグナルペプチド配列の *in silico* 解析を行い、各種パラメーターと分泌効率について考察した。

更に得られた SP 配列を用いて、一本鎖 Fv の *S. cerevisiae* からの分泌生産に応用したし、その分泌量をこれまでに知られている alfa-prepro 配列と比較した。

4. 研究成果

SPOT 法については、各種実験条件を最適化することで、組換え酵母の約 2/3 に組換え SP が設計通り挿入されたライブラリーが構築できる実験系を開発した。

酵母シグナル配列ライブラリーとして、主

に菌体外へ分泌あるいは細胞表層に局在化されるタンパク質を選び、限定的なライブラリーから得られたライブラリーから分泌量を調べ、酵母シグナルペプチドライブラリーから LacA の最適シグナル配列を見いだすことができた。更に分泌タンパク質を精製しおの N 末端配列を調べたところ、Kex プロテアーゼ m によるプロセッシングを受けていることが推測された。

次に酵母に scFv を分泌発現させるため、LacA で効率的な分泌を実現できた SP との融合タンパク質の発現ベクターを構築し、その *S. cerevisiae* での分泌を検討した。その結果代表的な分泌シグナル配列である alfa-prepro 配列と同等以上の分泌量が得られた。

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 2 件)

- 1) 原翔一、菅原知宏、佐原健彦、扇谷悟、河原崎泰昌、兒島孝明、中野秀雄: 酵母シグナルペプチドライブラリーを用いたシグナルペプチド最適化ツールの開発。日本農芸化学会 2012 大会、2012 年 3 月、京都
- 2) 原翔一、菅原知宏、佐原健彦、扇谷悟、河原崎泰昌、兒島孝明、中野秀雄: 酵母シグナルペプチド最適化ツールの開発に関する研究。日本農芸化学会中部支部第 165 回例会、平成 24 年 10 月、名古屋

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称 :

発明者 :

権利者 :

種類 :

番号 :

出願年月日 :

国内外の別 :

○取得状況 (計 0 件)

名称 :

発明者 :

権利者 :

種類 :

番号 :

取得年月日 :

国内外の別 :

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

中野 秀雄 (NAKANO HIDEO)

名古屋大学・生命農学研究科・教授

研究者番号 : 00237348

(2)研究分担者 なし

()

研究者番号 :

(3)連携研究者 なし

()

研究者番号 :