

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 23 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2016

課題番号：25450126

研究課題名(和文) Pichia酵母での蛋白質細胞表面発現：ハイスループット発現系構築法の開発と応用

研究課題名(英文) Cell surface expression of proteins using Pichia yeast: Development and application of high-throughput construction of expression system

研究代表者

水谷 公彦 (Mizutani, Kimihiko)

京都大学・農学研究科・助教

研究者番号：40314281

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)：研究代表者が開発したPichia酵母で簡単かつ迅速に外来遺伝子によるタンパク質生産を行わせる方法を用い、Pichia酵母の細胞表面に緑色蛍光タンパク質と目的タンパク質を作らせることに成功した。アミラーゼを細胞表面に作ったPichia酵母はデンプンを分解することが出来た。
また、貝類のセルロース分解酵素をPichia酵母で生産し、巻貝の酵素について立体構造の決定、セルロース分解メカニズムの解析を行った。

研究成果の概要(英文)：Using High-throughput method constructing Pichia yeast protein expression system, cell surface expression of green fluorescence protein and the target protein using Pichia yeast has been achieved. Pichia yeast producing alpha-amylase on the cell surface had starch diesting activity.

Using Pichia yeast, cellulose digesting enzymes of molluscs were produced. For the enzyme of a snail, molecular structure and catalytic mechanism were analyzed.

研究分野：農芸化学

キーワード：タンパク質工学 Pichia pastoris 発現系構築 X線結晶構造解析

1. 研究開始当初の背景

酵母の細胞表面へタンパク質を発現する方法として、1. GPI アンカータンパク質 α -アグルチニンや Tip1p などを用いて N 末端に目的タンパク質を融合する方法、2. GPI アンカータンパク質 Flo1p の細胞壁吸着ドメインを用いて C 末端に目的タンパク質を融合する方法、3. GPI アンカータンパク質 α -アグルチニンのサブユニット Aga1p にジスルフィド結合で結合するサブユニット Aga2p の N 末端または C 末端に目的タンパク質を融合させる方法などが知られている。世界的には 3 の方法が広く用いられてきたが、Aga1p を共発現させる必要があるなど、やや煩雑になる。近年、酵母の細胞壁結合タンパク質 Pir1p、Pir2p、Pir3p の N 末端または C 末端に目的タンパク質を融合する方法が報告されている。本研究では、細胞壁の出芽痕に局在する Pir1p、Pir2p でなく、細胞壁全体に存在する Pir3p を用いる。

細胞表面でのタンパク質発現において、ホストとなる酵母はこれまで *Saccharomyces cerevisiae* が広く用いられてきたが、本研究ではメタノール資化性酵母 *Pichia pastoris* を用いる。*P. pastoris* は高密度で培養が可能なことや強力なプロモーターを持つことなどから、真核生物の分泌タンパク質の有用な発現ホストとして知られる。近年では膜タンパク質の発現ホストとしても用いられ(発表論文 5)、G タンパク質共役受容体 (GPCR) の発現・結晶構造解析などの成功例も報告されている。Pir3p は分泌経路を経て細胞壁に局在するため、*P. pastoris* は Pir3p の発現ホストとして適していると考えられる。最近、研究代表者は *P. pastoris* 細胞内での DNA の相同組換えを利用して、ハイスループットで分泌タンパク質、膜タンパク質の発現系を構築する方法を開発・発表した。

2. 研究の目的

メタノール資化性酵母 *Pichia pastoris* を用いて細胞表面にタンパク質を発現させる。アンカータンパク質として細胞壁に局在するタンパク質 Pir3p を用いる。本研究では、研究代表者が開発した *P. pastoris* 細胞内での DNA 間の相同組換えを利用する方法で迅速(ハイスループット)に発現系の構築を行う。さらに、両端にタンパク質を融合できる Pir3p の特徴を生かし N 末端側に蛍光タンパク質 GFP を融合することで迅速に発現量・位置の評価が出来る方法を開発する。

発現用のプラスミドは前述の分泌タンパク質、膜タンパク質用のプラスミドを改変して用いる。また発現系構築のテストとして、デンブ分解酵素 α -アミラーゼを用いて発現系の構築、発現量・位置の評価、酵素活性の測定を行う。さらに、巻貝のセルラーゼ、

ヘミセルラーゼ、鉄結合タンパク質トランスフェリンなどの発現と精製、結晶構造解析などへの応用を目指す。

3. 研究の方法

酵母 *P. pastoris* を用いて効率的に細胞表面へのタンパク質の発現を行うために、ハイスループットで発現系構築・評価が出来る新しいプラスミドを開発した。プラスミドは、*P. pastoris* の複製開始点 PARS1、蛍光タンパク質 GFP、アンカータンパク質 Pir3p などを含み、研究代表者がこれまでに開発した二つのプラスミドを組み合わせて作成した。発現系構築のテストを α -アミラーゼを用いて行い、蛍光を指標として発現量の評価、細胞内での発現位置の評価、およびデンブ分解活性の測定を行った。貝のセルラーゼ、ヘミセルラーゼなどの発現と精製、結晶構造解析について、研究代表者が開発した発現系構築法を応用した研究を行った。

アンカータンパク質 Pir3p の遺伝子は *S. cerevisiae* YPH499 株からクローニングした。さらに *S. cerevisiae* の発現用プラスミド pRS426-GAL1 のプロモーター下流に、GFP の分泌に適した合成分泌シグナル、GFP、Pir3p、FLAG タグ、Sma I 制限酵素サイトの順(signal-GFP-PIR3-FLAG-Sma I)で挿入したプラスミド pESPIR3FS を既に開発した。また、*P. pastoris* を用いてハイスループットで発現系を構築するためのプラスミド p9PrAS も既に開発した。本研究では、(メタノールで誘導されるプロモーター 5AOX1、*P. pastoris* の複製開始点 PARS1、選択マーカー HIS4 などを含む) p9PrAS をバックボーンに用い(図 1[A]) pESPIR3FS の signal-GFP-PIR3-FLAG-Sma I 部分(図 1[B])を挿入して、新しいプラスミド pPrAS-ESPIR3FS(図 1)を調製した。

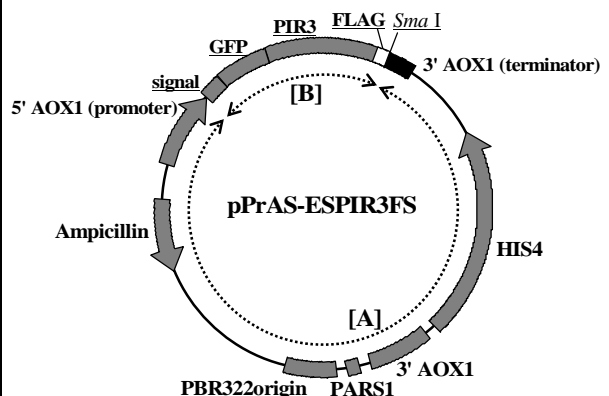


図 1. 本研究で開発、利用したプラスミド

開発したプラスミドのテストのために、pPrAS-ESPIR3FS を Sma I サイトで切断し直線化したもの(図 2[C])、メダカ α -アミラーゼ遺伝子の両端に Sma I サイトの両端部分と

同じ配列を PCR でつけたもの (図 2[D]) を調製した。両方の DNA を用いて通常の *P. pastoris* の形質転換操作を行うことで、細胞内で DNA 間の相同組換えが起こり発現プラスミドの構築と発現系の構築が同時に出来た (図 2、正確な位置に α -アミラーゼ遺伝子が相同組換えで挿入された)。

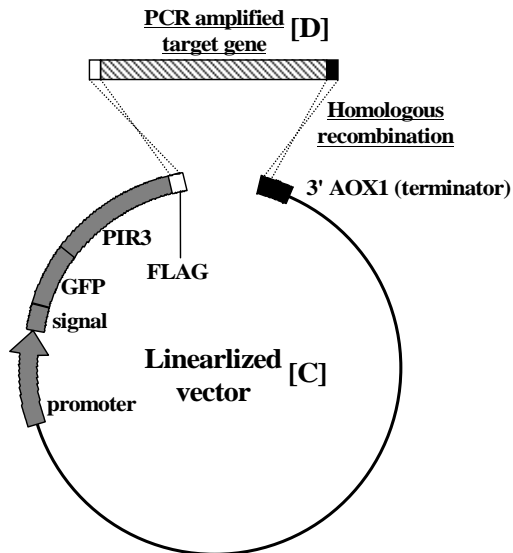


図 2. 相同組換えによる発現系の構築

形質転換株はヒスチジンを含まない寒天培地上で選択しコロニー PCR により α -アミラーゼ遺伝子の挿入を確認した。確認したコロニーについてグリセロールを含む液体培地で増殖し、メタノールを含む培地に移して GFP-Pir3p- α -アミラーゼ融合体の発現を誘導した。GFP の蛍光を指標に発現量の評価、細胞内での発現位置の評価を行った。また、デンプンを基質として菌体の α -アミラーゼ活性を DNS 法で測定した。

さらに、貝のセルラーゼ、鉄結合タンパク質トランスフェリンの発現を行った。セルラーゼは、二枚貝シジミ、巻貝 *Ampullaria crosseana* の GH45 ファミリーに属する分子量 2 万程度なコンパクトなエンドグルカナーゼ (CjCel45A および EG27II) を採用した。発現効率を上げるためにコドン最適化した人工遺伝子 DNA を購入し、発現系を構築した。両セルラーゼのセルロース分解活性を DNS 法などで確認し、結晶化を行った。また、トランスフェリンについても、発現生産したトランスフェリン N 半分子の結晶化条件の検討を行った。

4. 研究成果

開発した pPRAS-ESPIR3FS プラスミドを *P. pastoris* KM71 株、GS115 株に導入して GFP-Pir3p 融合体の発現量、位置の確認を行った。その結果、GS115 株を用いてメタノ

ールで誘導をかけた増殖させた場合に、GFP-Pir3p 融合体の細胞表層への良好な発現が見られた (図 3)。

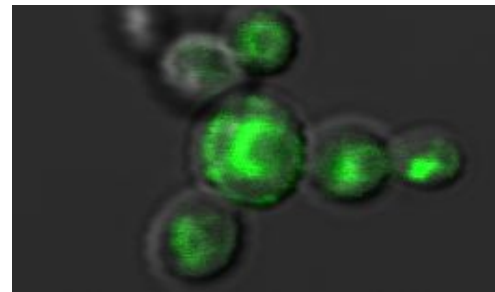


図 3. GS115 株の細胞表層に発現した GFP

さらに、同プラスミドを用いて、GFP-PIR3p-メダカ α -アミラーゼ融合体の発現系を *P. pastoris* GS115 株で構築した (図 4)。その結果、同様にメタノールで誘導をかけた増殖させた場合に、GFP-PIR3p-メダカ α -アミラーゼ融合体の細胞表層への良好な発現が見られた。さらに、GFP-PIR3p-メダカ α -アミラーゼ融合体を発現した菌体がデンプンを分解することを確認した。(*P. pastoris* はデンプン分解酵素を持たないため、デンプンは発現した GFP-PIR3p-メダカ α -アミラーゼ融合体によって分解された。)

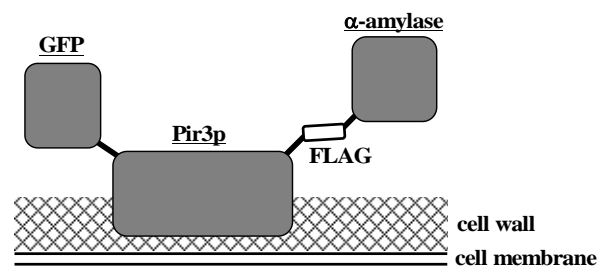


図 4. 細胞表層での アミラーゼの発現

二枚貝シジミ、巻貝 *Ampullaria crosseana* の GH45 ファミリーに属するエンドグルカナーゼ (それぞれ CjCel45A, EG27II) の発現系をハイスループット法で構築した。カルボキシメチルセルロースを含有する寒天培地上に培養液をのせ、コンゴレッドによる染色で分解活性が確認された (図 5)。

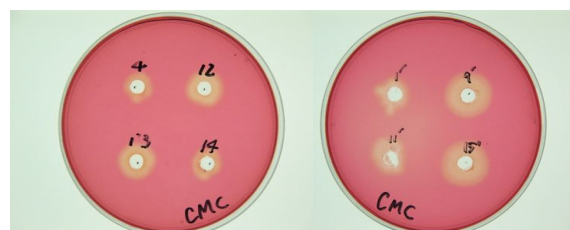


図 5. 組換株のセルロース分解活性の確認 (左:CjCel45A、右:EG27II)

図 5 で酵素活性が高かった CjCel45A の組換え株 12、EG27II の組換え株 15^{*}について大量培養を行い、ニッケルカラムで精製した両タンパク質について、ソモギネルソン法で詳細なカルボキシメチルセルロース活性を測定し、最適 pH (どちらも pH5 から 6 であった)、 K_m 、 k_{cat} 値などを決定した。(DNS 法では感度が十分でなく、ソモギネルソン法を採用した。) さらに精製した両タンパク質の結晶化を試みたところ、EG27II について結晶化に成功し、結晶化条件の最適化を行った。その結果、アポ体について 0.95 Å、セロピオースをソーキングした複合体について 1.04 Å の高分解能で構造解析に成功した (図 6)。

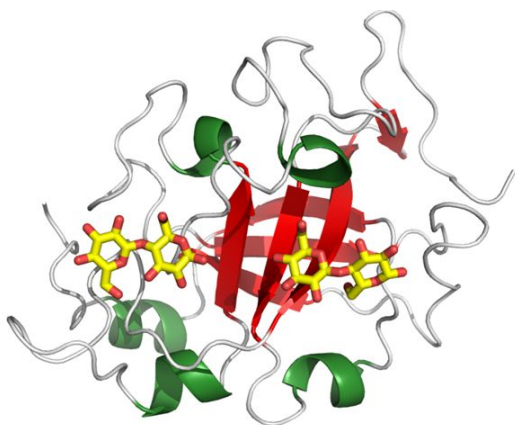


図 6. EG27II の全体構造

結晶構造解析で触媒残基と推定された、Asp137、Asp27、Asn112 (図 7) についてハイスループット発現系構築法で変異体を作成し活性測定を行った結果、酸触媒残基が Asp137、塩基触媒残基が Asn112 であることが示唆された。

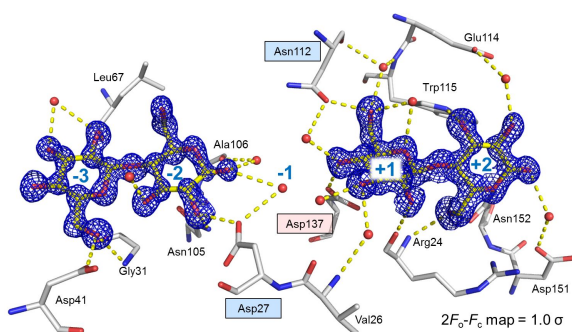


図 7. EG27II の触媒部位の構造

また、*P. pastoris* で発現したオボトランスフェリン N 半分子について幅広い pH で結晶が生成する新しい結晶化条件を発見したため、pH による構造の変化について検討を行った。しかし、本研究での解析では pH による大きな構造変化は見られなかった (図 8)。

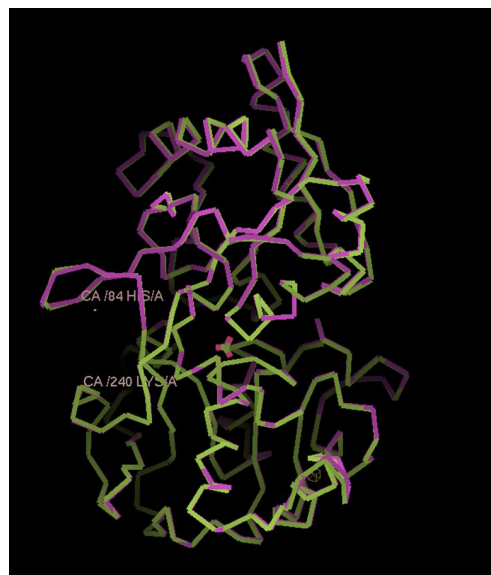


図 8. N-OVT の立体構造比較
(赤:pH7.5、緑:pH4.02)

本研究では、*Pichia* 酵母でのタンパク質細胞表面発現系をハイスループットで構築する方法を開発することに成功した。また、合成遺伝子を用いてハイスループットで発現系を構築し、発現の確認を行うなどの応用にも着手し、貝類セルラーゼの結晶構造解析などの重要な成果を得た。

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)
該当なし

〔学会発表〕(計 2 件)
水谷公彦、「酵母発現系を用いたハイスループット構造生物学」
日本農芸化学会関西支部例会、2013 年 7 月 6 日、大阪府立大学

野村泰介、水谷公彦、岩瀬久夢、高橋延行、三上文三、「貝類由来セルラーゼ EG27II の X 線結晶構造解析および機能解析」
日本農芸化学会 2017 年度大会、2017 年 3 月 19 日、京都女子大学

〔図書〕(計 0 件)
該当なし

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)
該当なし

○取得状況 (計 0 件)
該当なし

〔その他〕
該当なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

水谷公彦 (MIZUTANI, Kimihiko)
京都大学・大学院農学研究科・助教
研究者番号： 40314281

(2)研究分担者

該当なし

(3)連携研究者

該当なし

(4)研究協力者

該当なし