

令和 6 年 4 月 11 日現在

機関番号：14603

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2022～2023

課題番号：22K19135

研究課題名（和文）酵母小胞体の形状およびサイズ変化による分泌蛋白質生産能の向上

研究課題名（英文）High protein secretion through artificial enlargement and enforcement of the endoplasmic reticulum in yeast cells

研究代表者

木俣 行雄 (Kimata, Yukio)

奈良先端科学技術大学院大学・先端科学技術研究科・准教授

研究者番号：60263448

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 5,000,000 円

研究成果の概要（和文）：小胞体は脂質や分泌タンパク質の生合成の場となるオルガネラである。小胞体の機能不全は小胞体ストレスと呼ばれ、真核生物細胞は総じて、小胞体ストレスに応じて、小胞体を構成するタンパク質の発現が転写レベルで誘導される。これが小胞体ストレス応答である。本研究では、小胞体ストレス応答を促す転写因子であるHac1を人為的かつ恒常的に発現させた酵母細胞において、その増殖遅延を回復する手法が見い出され、非ストレス時にも小胞体が伸展し、脂質や分泌タンパク質の産生量を増大することが可能となった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

酵母は安価かつ簡便に培養できる単細胞の真核生物であり、他の真核生物の遺伝子を導入することにより、本来は酵母が作らない物質を合成させることが可能となる。例えば、ヒトの遺伝子の導入により、抗体やインターフェロンなどヒト由来タンパク質を分泌生産させ、それらは医薬品として用いることができる。また、テルペノイドなど植物が作る脂質類を酵母に作らせる技術も開発されている。これらの有用物質は細胞の中で小胞体と呼ばれる部位で合成されており、本研究では、酵母の遺伝子操作にて、小胞体を伸展し、有用物質の産生量を向上することに成功した。

研究成果の概要（英文）：The endoplasmic reticulum (ER) is an organelle that serves as a site for the biosynthesis of lipids and secretory proteins. Dysfunction of the ER is known as ER stress. In almost all of the eukaryotic cells, the expression of proteins that constitute the ER is induced at the transcriptional level in response to ER stress. This is the ER stress response. In this study, we have developed a method to rescue the growth delay in yeast cells that artificially and constitutively expressed Hac1, a transcription factor that promotes the ER stress response. In such cells, the ER was highly extended even under non-stressed conditions, leading to an increase in the production of lipids and secretory proteins.

研究分野：応用微生物科学

キーワード：小胞体 酵母 小胞体ストレス応答 脂質生産 分泌タンパク質生産

※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。

1. 研究開始当初の背景

酵母類は単細胞微生物だが真核生物であり、バクテリアとは異なり、真核生物と共通する数多くの性状を有する。遺伝子操作や培養が迅速で容易な酵母種も多く、よって、酵母を用いて、動植物由来の有用物質を製造する試みが進められている。例えば、ヒト由来の分泌タンパク質、例えば抗体やインターフェロンの cDNA を酵母細胞に導入し、酵母細胞からそれらのタンパク質を分泌させると、バイオ医薬品として用いることができる。また、油脂（中性脂質）や医薬品・サプリメントとしての利用価値がある機能性脂質についても、近未来的には酵母から製造することが期待されている。

真核生物細胞では、細胞外に分泌されるタンパク質の高次構造形成は、小胞体にて行われる。また、脂質類の多くは小胞体膜上で生合成される。酵母における分泌タンパク質や脂質類の生産における問題点のひとつは、高い収量が得られない場合が多いことである。その原因として、酵母では小胞体が未発達であることが挙げられる。小胞体は、一重の生体膜（リン脂質 2 重層）で覆われた袋状のオルガネラであり、扁平、あるいは棒状の形態を取り、また、それが複雑に分岐や融合し、網目状の構造となっている場合が多い。動植物細胞では一般的に、小胞体は細胞質全体に広がっているのに対し、酵母細胞では、小胞体の占める体積や面積は小さい。

Saccharomyces cerevisiae は最も研究が進んだ酵母であり、図 1 では、*S. cerevisiae* の小胞体像を示す。内側に存在する一層の小胞体は、染色体 DNA を取り囲んで核を構成する核膜（外膜と内膜）である。また、細胞膜に沿って、もう一層の小胞体が存在する。

以上のような背景から、酵母において小胞体を伸展、および機能強化できれば、小胞体に関わる物質生産能が向上し、分泌タンパク質や脂質類の収量が増大すると期待し、そのような手法を確立すべく、本研究プロジェクトを遂行した。

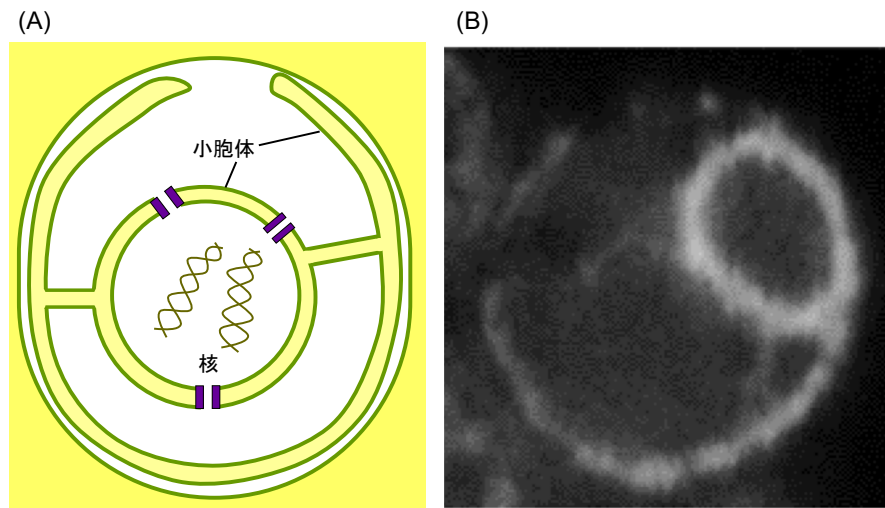


図 1 *S. cerevisiae* 細胞の小胞体

A: 細胞の図示。緑線は生体膜を示す。B: 野生型細胞 BY4742 に小胞体局在型 GFP 発現プラスミドを導入し、蛍光顕微鏡観察した。

2. 研究の目的

小胞体の機能不全は小胞体ストレスと呼ばれ、真核生物細胞全般は、小胞体ストレスに応じて小胞体構成タンパク質の発現が転写レベルで誘導し、小胞体のサイズや機能を増大させる。この防衛応答を小胞体ストレス応答と呼ぶ。*S. cerevisiae* を含む子囊菌類では、小胞体ストレス応答を担うのは *Hac1* と呼ばれる転写因子タンパク質であり、これは小胞体ストレスに応じて発現し、小胞体構成タンパク質などの遺伝子プロモーターに作用し、転写を活性化する。

ハウスキーピング遺伝子プロモーターを用いて *Hac1* を恒常的に発現させれば、非ストレス時においても小胞体ストレス応答が惹起され、小胞体構成タンパク質は高い発現を示す。そのような *S. cerevisiae* 細胞はタンパク質分泌が亢進していることは以前から知られていたが、増殖が極めて遅く、実用的ではないことが問題であった。なお、増殖が遅延しない程度に *Hac1* を発現させても、小胞体ストレス応答は弱くしか起こらず、タンパク質分泌促進効果はほとんど認められない。

そこで本研究では、*Hac1* を大量に発現し、強く小胞体ストレス応答を起こしている状態においても、増殖遅延を引き起こさない（あるいは、増殖遅延の程度が弱い）ような *S. cerevisiae* 株を取得し、タンパク質分泌や脂質生産における有用性を実証することを目指した。

3. 研究の方法

本研究では、*S. cerevisiae* 実験室標準ハプロイド菌株 BY4742 を用い、染色体ゲノム上の *HAC1* 遺伝子に改変を加えることにより、Hac1 の発現を妨害する *HAC1* イントロン配列を除去した。その遺伝子操作によって得られた株は、恒常的に Hac1 を発現しており、非ストレス時においても強い小胞体ストレス応答（小胞体構成タンパク質遺伝群の高発現）を示し、以下、Hac1 株と呼ぶ。本研究は、Hac1 株にさらに遺伝子改変を加えることにより、高い小胞体ストレス応答を示しながらも早い増殖を示す株を得るというアプローチを進め、さらに、そのような株の特性を精査した。

異種性の機能性脂質（カロテノイド）を *S. cerevisiae* に産生させるためには、赤色酵母 *Xanthophyllomyces dendrorhous* の有するカロテノイド生合成経路遺伝子群が *S. cerevisiae* ハウスキーピング遺伝子プロモーターの制御下で発現するように構築された遺伝子コンストラクトをプラスミドとして導入した。また、異種性分泌タンパク質についても、その cDNA が *S. cerevisiae* ハウスキーピング遺伝子プロモーターの制御下で発現するように構築された遺伝子コンストラクトをプラスミドとして *S. cerevisiae* 株に導入した。

4. 研究成果

図 2 に示すように、変異が導入されていない野生型 BY4742 株と比べて、Hac1 株は著しい増殖遅延を示した。一方、それに小胞体局在型 GFP 発現プラスミドを導入すると、増殖遅延はある程度回復した（図 2）。小胞体局在型 GFP（の一部）が折り畳み不全タンパク質として小胞体内在性分子シャペロン（BiP など）に認識され、それが過剰に発現した小胞体分子シャペロンをマスクするという効果を有するものであると推測される。N 結合型糖鎖の付加を阻害し、小胞体内腔に大量の構造異常タンパク質を蓄積せしめることが知られる抗生物質であるツニカマイシンも、Hac1 株増殖を加速する効果を発揮した。

図 3 では、小胞体局在型 GFP 発現プラスミドを導入し、小胞体の形状を GFP 蛍光により可視化した Hac1 株細胞の蛍光顕微鏡観察を行った。図 1 に示

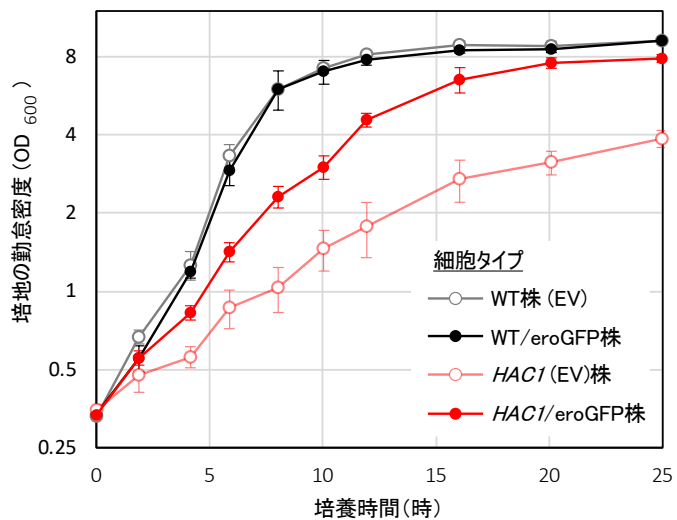


図2 *S. cerevisiae* Hac1 株の増殖曲線

野生型細胞(WT; BY4742)および Hac1 株(*HAC1*)に空ベクター (Empty vector; EV)あるいは小胞体局在型 GFP(eroGFP)発現プラスミドを導入し、SC 培地 30°Cでの増殖をモニターした。

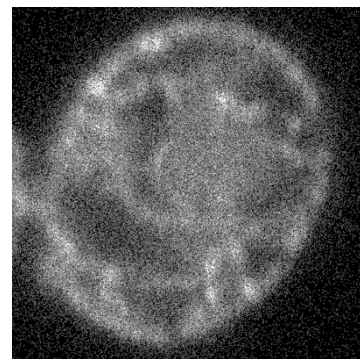
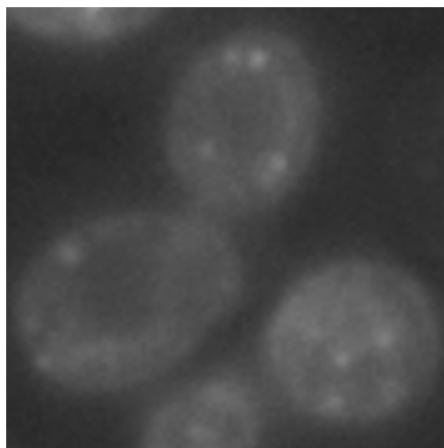


図3 *S. cerevisiae* Hac1 株における小胞体の伸展

Hac1 細胞に小胞体局在型 GFP 発現プラスミドを導入し、蛍光顕微鏡観察した。

野生型(BY4742)株



Hac1株(小胞体局在GFP発現プラスミド導入)

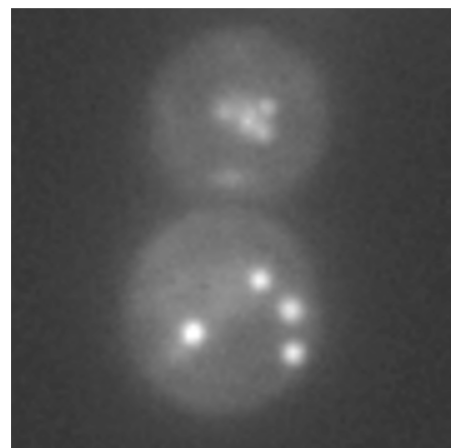


図4 *S. cerevisiae* Hac1 株における脂肪滴の増大

表記の細胞を NileRed 染色後、蛍光顕微鏡観察に供した。

した野生型 BY4742 株の小胞体像と異なり、Hac1 株では、小胞体が細胞質全体に広がり、複雑に分岐や融合していることが分かる。

次いで、野生型 BY4742 株と Hac1 株との脂質産生量の比較を行った。なお、増殖遅延を抑えるため、Hac1 株には小胞体局在型 GFP 発現プラスミドが導入されている。図 4 では、脂肪滴染色蛍光色素 NileRed を用いて細胞を染色後、蛍光顕微鏡観察を行った。野生型 BY4742 細胞に比べ、小胞体局在型 GFP 発現プラスミド導入 Hac1 細胞では、脂肪滴が明確に確認でき、また、その数も多く、油脂（中性脂質）が増産されていることが示唆された。また、*X. dendrorhous* 由来カロテノイド合成遺伝子群発現プラスミドを導入したところ、野生型 BY4742 株に比べ、小胞体局在型 GFP 発現プラスミド導入 Hac1 株は 7 倍以上のカロテノイドを細胞内に蓄積することが分かった。

さらに、本研究においては、Hac1 株の自然突然変異によって、増殖が速い変異体を得ることができた。その中の 3 株の寒天培地上での増殖を図 5 に示す。変異体 a、変異体 b はツニカマイシンが添加された寒天培地で増殖が出来ず、小胞体ストレス応答能を失っていることが分かった。一方、変異体 c では、ツニカマイシン添加寒天培地でも増殖でき、小胞体ストレス応答能を保持していると考えられる。なお、変異体 a と変異体 b は Hac1 遺伝子にミスセンス変異が入っており、Hac1 が失活（あるいは機能低下）により、Hac1 の恒常的発現による増殖遅延が抑えられているのであろう。変異体 c では、Hac1 遺伝子に変異は変異が無く、他の遺伝子に変異が入っている

と推察される。そして、タカアミラーゼ A 遺伝子を変異体 c に導入すると、野生型 BY4742 株に比べて、4 倍程度の分泌量を示すことが分かった。

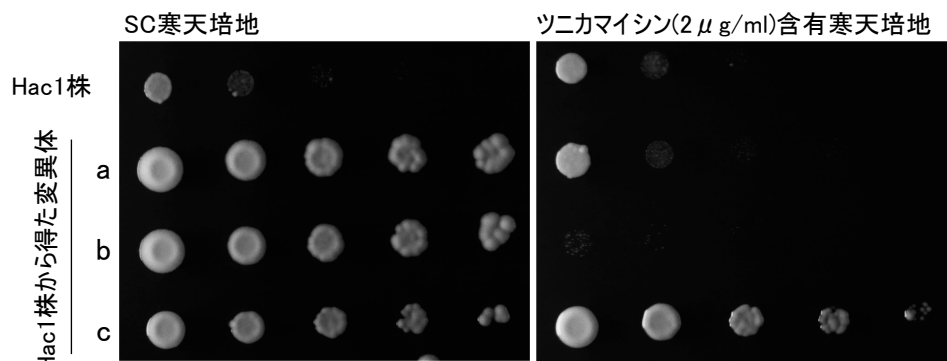


図 5 *S. cerevisiae* Hac1 株から得られた増殖が早い自然変異株

Hac1 株、および、そこから得られた自然変異株 a、b、c の細胞懸濁液を段階希釈(各 10 倍)後、表記の寒天培地にスポットし、30℃で培養した。

5. 主な発表論文等

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

1. 著者名 Nguyen Phuong Thi Mai, Ishiwata-Kimata Yuki, Kimata Yukio	4. 巻 88
2. 論文標題 Fast-Growing <i>Saccharomyces cerevisiae</i> Cells with a Constitutive Unfolded Protein Response and Their Potential for Lipidic Molecule Production	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Applied and Environmental Microbiology	6. 最初と最後の頁 e01083-22
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1128/aem.01083-22	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 —

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件／うち国際学会 0件）

1. 発表者名 木俣行雄
2. 発表標題 恒常的UPR活性型酵母の性状と応用
3. 学会等名 小胞体ストレス研究会
4. 発表年 2022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
---------	---------