

平成 30 年 6 月 19 日現在

機関番号：23803

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K06585

研究課題名(和文) 難生産性蛋白質分泌発現系のリバースエンジニアリング

研究課題名(英文) Molecular mechanisms behind the expression of difficult-to-express proteins

研究代表者

河原崎 泰昌 (Kawarasaki, Yasuaki)

静岡県立大学・食品栄養科学部・准教授

研究者番号：80303585

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：難生産性蛋白質の活性型発現に関わる遺伝子群の同定・解析・応用を目的として研究を行った。遺伝子の調節因子としてAdr1、Ygr067Cを同定した。両者は非常に類似したDNA結合領域をもち、同一の標的遺伝子群を競合的に発現調節している可能性が示唆された。両遺伝子欠損株を作製し、下流遺伝子の発現に与える影響を定量的に調べた。また発現蛋白質の過剰糖鎖付加に着目し、予想糖鎖付加部位の多重置換体を作製した。これらの結果、Ygr067Cが難生産性蛋白質の生産に関係していた。一方、アミノ酸置換を伴わない、低使用頻度コドンへのサイレント変異が蛋白質の発現量を増大させることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Our novel expression system, namely high cell-density expression, have achieved successful expression of a certain range of “difficult-to-express” secretory protein while the molecular mechanisms behind it was remained to be studied. In this project, we identified two transcription factors, Adr1 and Ygr067C, as a potential host factor that is responsible for the cell-density-specific transcriptome change, where certain mRNAs of which transcriptional promoter shared typical Adr1p binding sequence. In fact, the yeast strain lacking Ygr067c showed a significant reduction in the cell-density dependent protein expression. The factor that directly allows the host to produce the difficult-to-express protein under the transcription factor is to be sought.

In parallel, we successfully find certain types of rare codons in recombinant gene help co-translational folding of synthesized protein, resulting in increased amount of recombinant protein in active form.

研究分野：生物工学

キーワード：protein expression Recombinant protein yeast expression system protein synthesis molecular biotechnology bimolecular engineering

1. 研究開始当初の背景

学術・産業・医療上の潜在的価値が有りながら、組換え発現による調製・生産が困難なために解析や開発・応用研究が滞る蛋白質や酵素は多い。応募者は、「組換え酵母細胞を高密度に懸濁し、発現誘導する」という単純な操作により、難生産性蛋白質の分泌生産量が飛躍的(菌体あたり千倍)に高まる現象を複数の事例で確認してきた。この発現法の安定性と有効性をさらに高め、公表し、未利用遺伝子資源の開拓研究を広く促進したいと考えた。

2. 研究の目的

本課題では、組換え分泌蛋白質による分泌ストレスの発生機構(ゲスト因子)と、菌体高密度化による緩和機構(ホスト因子)の解明を目的とし、さらに遺伝学および遺伝子工学的手法を用いて高発現型宿主株の育種を行うことを目指した。

3. 研究の方法

高密度系でのみ生産が可能なラッカーゼをモデル組換え酵素として用い、種々の解析および工学的検討を行う。高密度系におけるホスト因子候補を網羅的転写産物解析により絞り込み、候補遺伝子を欠失した宿主株を作製し解析する(計画1)。これと並行し、個々の候補遺伝子の発現変動を定量的PCRで解析する(計画2)。ゲスト因子同定のため、モデル酵素遺伝子にランダム変異を導入し、分泌ストレス低減型変異体を取得、解析を行う(計画3)。同定されたホスト因子、またはAdr1の恒常発現株を作成し、モデル酵素の発現特性を解析する(計画4)。野生型酵母株を変異原処理し、モデル酵素を生育連動的に発現する変異株を取得する(計画5)。取得できた菌株を用い、組換え酵素生産プロセスの最適化を行う(計画6)。

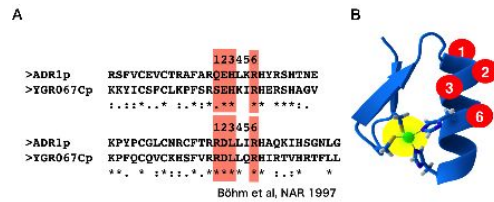
4. 研究成果

4.1 宿主因子探索

白色腐朽菌ラッカーゼを難生産性モデル蛋白質とし、組換え出芽酵母を用いた分泌発現系における難生産性発生機構を解析した(既報)。この過程で、菌体を回収し、少量の誘導培地に懸濁して高密度化するという簡便な操作で難生産性を回避できることを見出し、新規な高効率難生産性蛋白質生産法(以下、高密度発現法)を確立するに至った(既報)。この高密度発現法は、ラッカーゼ以外の難生産性蛋白質、例えばミラクリンや酵母およびヒトペプチドトランスポーター、ヒト細胞表面ジペプチダーゼ等の発現においても有効であり、これらの蛋白質の性質決定、機能評価を可能にできた。

高密度発現法におけるホスト因子候補を網羅的転写産物解析により絞り込み、広域転写因子Adr1pの結合部位を共通してもつ多数の候補遺伝子を同定した。また、Adr1pとは

ほぼ同じDNA結合配列を有する(下図)未知転写因子Ygr067Cを同定した。



これらの転写因子に発現が調節されると考えられた種々の遺伝子の菌体密度応答性を種々の培養条件で定量的に解析した。また、Ygr067CやAdr1の欠損株における各種遺伝子産物の定量的解析を行った。発現機序としては、Ygr067C欠損株において大幅なモデル蛋白質生産量の低下が見られたが、これに対し直接的宿主因子候補として考えられたIme1-Ime2遺伝子の発現量の変動は顕著ではなかった。Ime1プロモーター下流にレポーター遺伝子を連結した系を構築し、菌体密度に応答したレポーター遺伝子産物の蓄積をモニターしているが、Ime1がYgr067Cの直接支配を受けているかについては、さらなる検討が必要である。

4.2 ゲスト因子探索

一方、高密度系でのみ発現が可能となる各種組換え蛋白質の解析結果より、過剰糖鎖修飾(ポリペプチド鎖分子量と同量以上)の影響が示唆されたため、モデル組み換え酵素(ラッカーゼ)のN型糖鎖付加部位を予測し、各種アミノ酸置換体を作製した。多重置換体を作製したところ、糖鎖付加の程度はごくわずかに減少し、生育連動型生産の際の菌体生育遅延は緩和された。しかしながら、モデル組み換え酵素の生育連動型生産の大幅な向上は観察されなかった。完全に糖鎖付加がなされないモデル蛋白質変異体の作製はこれまでに成功しておらず、アプローチの変更が必要な状況である。

4.3 翻訳共役蛋白質折りたたみが組換え蛋白質生産量に与える影響

ミスフォールドしにくく、活性型蛋白質として発現しやすい蛋白質変異体(アミノ酸置換体)を進化工学的手法を用いて作製し、解析した。その結果、大腸菌および出芽酵母の双方の発現系において有効にはたらくアミノ酸置換はほぼ同一であり、宿主非依存性を示した。しかしながら、大腸菌と出芽酵母のそれぞれの発現系に固有の宿主に依存したコドン同義置換がみられ、いずれもそれぞれの生物種において高使用頻度コドンから低使用頻度コドン(レアコドン)に変化する置換であった。これは、ミスフォールドしやすい蛋白質の発現系においては、mRNA上のレアコドンが翻訳途上の蛋白質の折りたたみを助けることを意味しており、発現宿主の生物種を越えて翻訳共役型蛋白質フォールディングが重要であることを示唆するものであ

った。ある特定のコドンを読アコドンに置換することにより、組換え蛋白質の活性型発現量は4倍にも増大し、この発現量増大は出芽酵母のコドン使用頻度に逆相関した。これらのデータを取りまとめ、投稿論文を準備している。

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 2 件)

1. *Kawarasaki Y., Kurose T., Ito K.: High cell-density expression system: Yeast cells in a phalanx efficiently produce a certain range of "difficult-to-express" secretory recombinant proteins, Method. Mol. Biol. 1258, 169-178 "Insoluble Proteins: Methods and Protocols" Part 9, ed. by Elena Garcia-Fruitos, Humana Press (2015)
2. 河原崎泰昌、伊藤圭祐: 難生産性蛋白質の生産法、化学と生物、11号 (2015)

[学会発表](計 5 件)

1. 河原崎泰昌、田中翔大、田中瑞己、中野祥吾、伊藤創平、伊藤圭祐 「比較進化工学: 組換え蛋白質高発現に影響を与える宿主因子」 第69回日本生物工学回大会(平成29年度大会) 2017年9月11日~9月14日(東京・早稲田大学)
2. 河原崎泰昌「出芽酵母を用いた組換え蛋白質生産」平成29年度 日本生物工学会中部支部例会 2017年9月1日、2日(名古屋・名古屋大学)
3. 河原崎泰昌、田中翔大、中野祥吾、伊藤創平、伊藤圭祐 「活性型組換え蛋白質収量を増大させる読アコドンへの同義置換」日本農芸化学会平成29年度大会、2017年3月17-20日(京都)
4. 河原崎泰昌、坂上稔典、伊藤圭祐「酵

素/蛋白質の進化工学的改良における宿主の影響」日本農芸化学会平成28年度大会、2016年3月28-30日(札幌)

5. 鈴木理沙、黒瀬猛、伊藤圭祐、河原崎泰昌「難生産性蛋白質の生産を可能にする遺伝子群の解析」日本生物工学会平成27年度大会、2015年10月26-29日(鹿児島)

[図書](計 1 件)

1. 「新版 生物反応工学」山根恒夫、中野秀雄、加藤雅士、岩崎雄吾、河原崎泰昌、志水元亨、産業図書(2016) ISBN978-4-7828-2617-1 C3058

[産業財産権]なし

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

河原崎泰昌 (KAWARASAKI, Yasuaki)
静岡県立大学・食品栄養科学部・准教授
研究者番号: 80303585

(2) 研究分担者

()

研究者番号:

(3) 連携研究者

伊藤 圭祐 (ITO, Keisuke)
静岡県立大学・食品栄養科学部・准教授
研究者番号：40580460

(4)研究協力者
()