様　式　Ｃ－１９、Ｆ－１９－１、Ｚ－１９　（共通）

科研費 KAKENHI

科学研究費助成事業　　研究成果報告書

令和　２年　５月２４日現在

機関番号：３３９１９
研究種目：挑戦的研究（萌芽）
研究期間：2018～2019
課題番号：１８Ｋ１９１８７

研究課題名（和文）タンパク質発現可能化ルールの解明

研究課題名（英文）Clarification of rules for allowing protein expression

研究代表者
田村　廣人（Tamura, Hiroto）

名城大学・農学部・教授

研究者番号：９０２６７９７２

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費）　　4,900,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、あらゆる発現系において目的タンパク質を簡単に発現可能なルールを見出すため、計約50種類の生物種（細菌、酵母、糸状菌、植物、昆虫、哺乳動物）のリボソームサブユニットタンパク質の塩基配列を独自にデータベース化した。次に、細菌と真核生物のwhole cell画分を質量分析計MALDI-TOF MSにて解析した。その結果、特異的なリボソームサブユニットタンパク質の検出シグナルが高く、それらのN末端の傾向はAla、Lys、Ser、Val、Thrの偏りが強いというルールが明らかとなった。各生物種で生産されやすいタンパク質の指標として新生鎖のアミノ酸を利用できる可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義
現在、どの発現系を用いれば目的タンパク質を自由自在に組換え生産できるかのルールが無く、経験と運に頼らざるをえない。
そのルールを見出すため、質量分析計で検出可能なリボソームタンパク質と、そのN末端付近のアミノ酸配列に着目し、より検出シグナルの高いものとその配列を解析した。その結果、N末端の傾向は、Ala、Lys、Ser、Val、Thrの偏りが強いことが判明し、各生物種で生産されやすいタンパク質の指標として新生鎖のアミノ酸を利用できる可能性が示唆され、目的タンパク質の発現ルールが存在する可能性を見出すことできた。本成果の発展は、自由自在な目的タンパク質の生産に貢献でき、社会的インパクトが大きい。

研究成果の概要（英文）：There are no general rule about which is the best platform for each protein of interest. Therefore ‘How we can regulate protein expression at any expression platform?’ is the one of the biggest issues that no one can answer.
The purpose of this research project is to find out a rule that can easily express the target protein in any expression system. In this research, we constructed original database focused on the N-terminal sequences of ribosomal subunits protein in various species.First, database of theoretical m/z of ribosomal subunits protein in a total of about 50 types of various species were constructed. Next, the whole cell fraction was subjected to MALDI-TOF MS analysis.
As a result, specific amino acid residue, Ala, Lys, Ser, Val, and Thr, in their N-terminal amino acid frequency was high. The same tendency was observed in the other strains analyzed. This suggests that the nascent amino acids may be used as an indicator of proteins that are highly produced in each species.

研究分野：農芸化学

キーワード：リボソームタンパク質　発現量　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、研究者個人に帰属されます。

１．研究開始当初の背景

酵素・抗体・ホルモンなどの機能を有するタンパク質はライフサイエンス研究・産業を支える分子であり、そのようなタンパク質の生産には、大腸菌・酵母・枯草菌・植物・昆虫・動物細胞などを用いた発現系が汎用されている。しかしながら、どの発現系を用い、どの条件で発現させれば目的タンパク質が生産されやすいかのルールが存在しないため、殆ど研究者らの独自の好みにより選択されている。さらに、タンパク質の種類によっては発現量が少ない場合や、活性体として生産されない場合が多い。その原因としてコドンバイアスや mRNA の二次構造など、諸説囁かれているが未だ明確にはわかっていない。そのため、目的タンパク質の発現量が少ない場合は、アウトプットされる研究成果の影でコドン最適化、培地の変更、他のタンパク質との融合発現、発現系の見直し、シャペロンとの共発現、といった手間と時間のかかる検討を重ね、少しでも発現量を上げるための条件を絞り込んでいくのが一般的である。一発で最も単純とされる大腸菌発現系で可溶性に活性体として得られた場合、「運がよかった」という非科学的な言葉で片付けられている。

２．研究の目的

そこで、本研究では、あらゆる発現系において目的タンパク質を簡単に発現させることのできるルールを見出すために、質量分析計で検出可能なリボソームタンパク質と、その N 末端付近のアミノ酸配列に着目し、タンパク質の異種発現系への応用を目指した。

３．研究の方法

1) 既知のゲノム配列情報を基に、異種発現系に用いられる生物種（大腸菌・酵母・糸状菌・枯草菌・植物・昆虫・ヒト・マウス・ウサギ）のリボソームタンパク質サブユニットに着目したデータベースを作成する。データベース作成に必要な情報は、米国国立生物工学情報センターより入手する。

2) 上記データベースを基に、申請者がタンパク質発現量制御に重要であると考えている開始コドン付近 DNA 配列および対応するアミノ酸配列情報を抽出する。そこで、各アミノ酸および塩基の出現頻度と 出現位置を「タンパク質の発現しやすさ」の指標をもとにルール化する。後のアルゴリズム構築を単純化するために、ここでのルール化は必要最低限のアミノ酸数とする必要がある。

3) 得られたルールを基に、異種発現系で目的タンパク質が大量に発現可能なタンパク質 N 末端配列を in silico で算出できるアルゴリズムを構築する。なお、「発現しやすさ」は、細胞内で特に存在量の多いリボソームタンパク質を網羅的に検出可能な質量分析計 MALDI-TOF MS を用い測定し、独自に数値化する。

４．研究成果

(1) 様々な生物種におけるリボソームタンパク質サブユニットの N 末端配列を抽出するために、実際に入手可能な細菌、酵母、糸状菌、枯草菌、植物細胞、昆虫細胞、動物細胞等の計約 50 種類のリボソームタンパク質サブユニット配列を独自にデータベース化した。

(2) 一般的な分譲機関から入手可能な様々な細菌、真核生物をピックアップし、*Cyanobacteria sp.* 、*H. salinarum*、*R. oryzae*、*U. maydis*、*C. cinereus*、*S. pombe*、*Y. lipolytica*、*Bacillus sp.*, *E. coli* 等の菌株を入手し、それぞれの標準的な液体培地で培養した菌株を回収し whole cell 画分を質量分析計 MALDI-TOF MS 分析に供した。

(3) MALDI-TOF MS 解析で検出シグナルが高いことは、定性的ではあるものの、そのタンパク質発現量が高いことを意味すると考えられる。

そこで、上記の MALDI-TOF MS の結果をもとに、*m/z* 3,000～20,000 程度のリボソームタンパク質サブユニットのうち、質量分析系でより検出シグナルの高いものとその N 末端配列を解析した。

その結果、例えば、*Y. lipolytica* JCM 2304 においては、リボソームのサブユニット L39、S30、S26、L29、S29、L37、L22、L31、L36 のサブユニット検出シグナルが高いことがわかり、それらの N 末端のアミノ酸出現頻度を解析したところ、Ala、Lys、Ser、Val、Thr の偏りが強いことが明らかとなった（図 1）。

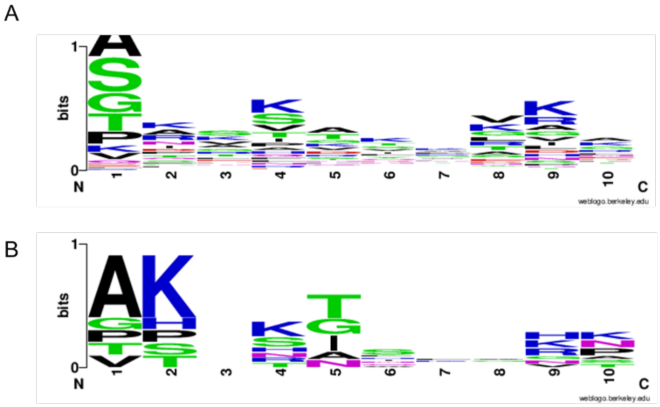

図1. リボソームタンパク質のN末端アミノ酸のLogo plot解析結果
Y. lipolyticaの解析結果を示す。
A. すべてのサブユニット
B. 質量分析計による解析で高強度で検出されたサブユニット

また、その他の分析菌株についても同様の傾向が認められた（図 2）。以上より、各生物

種で生産されやすいタンパク質の指標として新生鎖のアミノ酸を利用できる可能性が示唆された

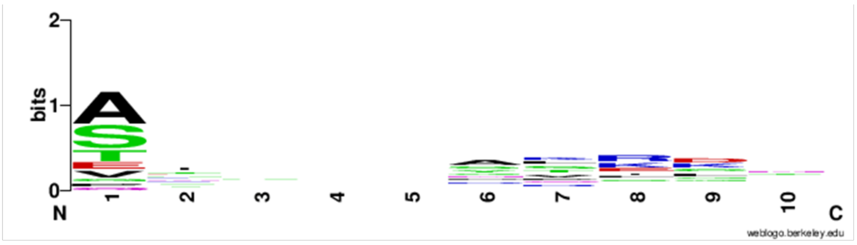

図2. 好塩細菌Halobacterium salinarum JCM9409の質量分析計による解析で高強度で検出されたリボソームタンパク質サブユニットのN末端アミノ酸Logo plot解析結果

５．主な発表論文等

〔雑誌論文〕　計0件

〔学会発表〕　計0件

〔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
研究分担者	加藤　晃代 (Kato Teruyo) (40727640)	名古屋大学・生命農学研究科・招へい教員 (13901)	