

令和 6 年 6 月 25 日現在

機関番号：23803

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K04795

研究課題名(和文) 難生産性組換え蛋白質の活性型発現に関わる諸因子の解明と新規発現系の構築

研究課題名(英文) Factors involved in difficult-to-express protein production and their characterization

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) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：「難生産性組換え蛋白質」の発現系を構築し、難生産性を効率的回避法を確立することを目的として研究を行った。難生産性蛋白質の生産を可能にする遺伝子としてYgr067C遺伝子を見出し、機能解析を行った。同遺伝子プロモーターは糖濃度低下に应答して活性化し、同遺伝子産物により抑制されるなどの新たな知見を見出した。最終的に、同遺伝子欠損株を宿主とし、同遺伝子のプロモーターを利用することで培養後期に難生産性蛋白質を生産できる効率的な発現系を構築できた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

活性型での発現が困難であるため解析が困難である蛋白質は多い。このような難生産性蛋白質に対し、今回、取り扱いが容易な出芽酵母を用いて効率的な発現系を構築することができた。遺伝子発現に際し、この系では誘導物質の濃度、添加時期などの最適化は不要であるため、難生産性が予想される蛋白質の発現系としてファーストチョイスになり得る、極めて簡便な発現系が構築できたと言える。特に多数のパラログがあり個別の遺伝子およびその遺伝子産物の評価が困難な、例えば菌類の酵素遺伝子群の機能解析を非常に容易にすることができた。

研究成果の概要(英文)：A novel yeast protein expression system for "difficult-to-express" proteins is established in this study. The system features a combination of a yeast host and a promoter sequence on the expression vector-- i.e., ygr067C-disrupted yeast and its promoter. The biological characteristics of the gene and its protein have also delineated in this study. The Ygr067C encodes uncharacterized transcription repressor. The expression of the gene is 1) late diauxic phase specific, 2) auto-regulative, and 3) transient in anaerobic condition. The translated protein of the gene has been unstable in the cell, and degraded in a single round of cell-cycle. The genes of which expression are regulated by the Ygr067C have also been analyzed. The promoter of the gene has also been characterized and the activation condition is optimized.

研究分野：生物学

キーワード：組換え蛋白質 遺伝子機能評価 酵母転写因子 出芽酵母発現系 難生産性蛋白質 プロモーター 遺伝子発現制御

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。

## 様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

発現による宿主細胞への毒性や、不十分な折りたたみにより、活性型で発現することが困難である蛋白質は多い。このような蛋白質は「難生産性組換え蛋白質」と呼ばれ、遺伝子産物の機能解析が著しく困難であり、さらに蛋白質工学、進化工学的機能改良を行うにも、そのスタートラインにすら立てないのが現状である。

### 2. 研究の目的

難生産性の効率的回避手段となる組換え蛋白質発現系を提案するのが本研究の目的である。

### 3. 研究の方法

これまでに「組換え酵母細胞を高密度に懸濁し、発現誘導を行う」という簡便な操作により、難生産性蛋白質の分泌生産量が飛躍的(菌体あたり千倍)に高まる現象を見出し、この「高密度発現系」の分子機構を基礎として研究を展開した。まず、この高密度発現系において顕著に遺伝子発現が増大する宿主遺伝子を調べ、この宿主遺伝子が高密度発現系において難生産性蛋白質の効率的発現を可能にしているであろう、との仮説を立て、この宿主遺伝子の役割、発現制御機構など、異種遺伝子発現系構築における基盤的な情報を取得することとした。

### 4. 研究成果

高密度発現系において発現量が増大する宿主遺伝子として Ygr067C 遺伝子を同定した。同遺伝子は機能未知の転写因子をコードしており、自身の発現を負に調節した。同遺伝子産物の推定アミノ酸配列は推定亜鉛フィンガーをタンデムにもつ非必須遺伝子であり、出芽酵母 (*S. cerevisiae*) およびそのごく近縁種にのみ存在した。醸造用酵母株では欠落しているものも複数みられた(図1)。

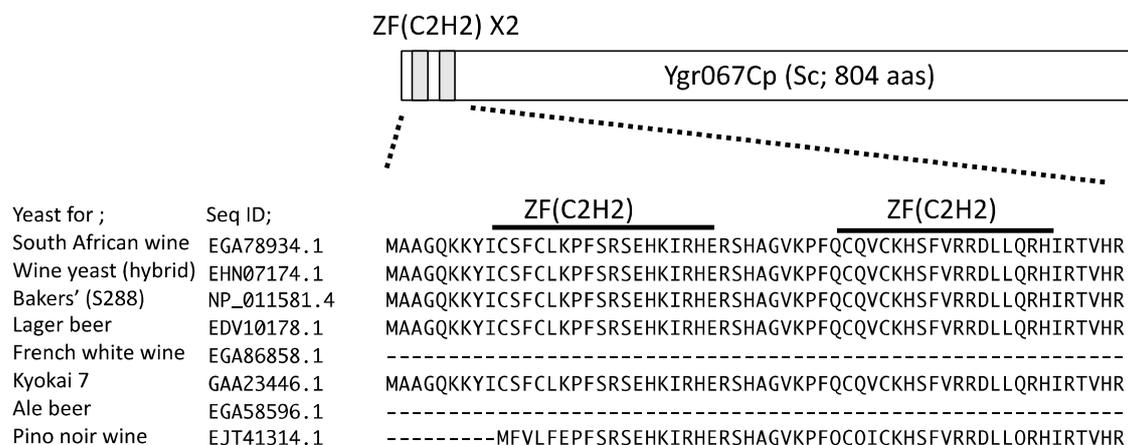
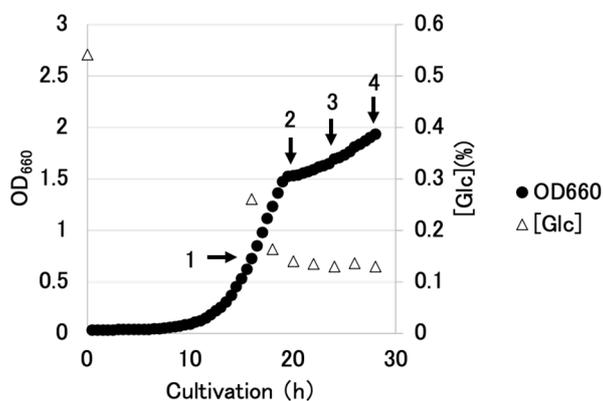


図1 本研究で見出された Ygr067Cp 蛋白質の推定アミノ酸配列と近縁酵母種の蛋白質のアミノ酸配列の比較 (N 末端領域のみ)

その後の解析により、培地中の糖濃度の低下に应答して同遺伝子プロモーターが活性化することが示された(図2)。

A



B

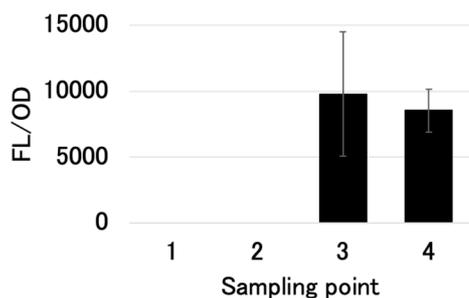


図2(A) 増殖曲線と培地中グルコース濃度の変化、(B) *Ygr067C* プロモーターが活性化するタイミングの比較

A 黒丸( )はグルコース濃度 0.5%培地 ( $SD_{0.5-U}$ ) で培養した酵母 (BY4742 (pDex2-GFP<sub>401</sub>)) の増殖曲線を示す。白三角( )は培地上清中のグルコース濃度を示す。左の縦軸は菌体濁度 ( $OD_{660}$ )、右の縦軸はグルコース濃度 (%)、横軸は培養時間 (h) を示す。増殖曲線上の 1~4 はサンプリングを行った時点を示す。

B 上図 1~4 にサンプリングした培養液の菌体あたり蛍光強度 (FL/OD) を示す。測定は 3 連で行い、平均値をグラフ上に示した。エラーバーは標準偏差を示す。

同遺伝子産物は、多くのミトコンドリア蛋白質をコードする遺伝子の発現を調節すること、無酸素条件下で細胞を G1 期で停止させること、発現した転写因子は細胞周期に依存して急速に分解されることなどを明らかにした。野生型株および同遺伝子欠損株を用いた培養後期におけるトランスクリプトーム解析結果を以下に示す ( 図 3 )

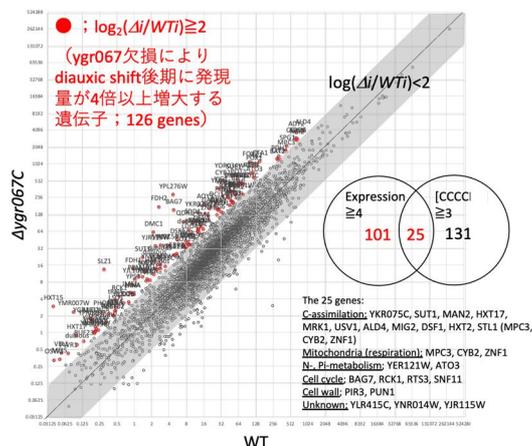
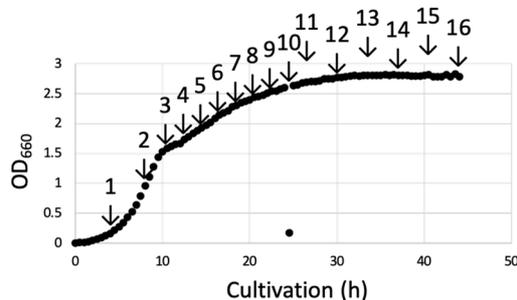


図 3 出芽酵母野生株 (BY4742) および ygr067C 欠損株のトランスクリプトーム解析

同遺伝子欠損株は、無酸素条件下における細胞周期の停止が明確ではなく (データ非掲載)、定常期における蛋白質合成速度が増大していた ( 図 4 )

A



B

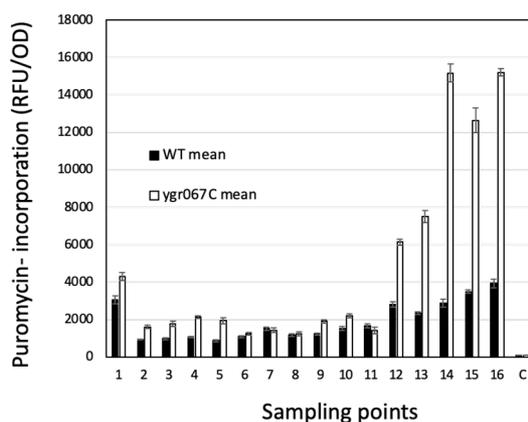


図 4 Ygr067C の欠損が蛋白質合成速度に与える影響

BY4742 (WT) および ygr067C 欠損株を SD<sub>0.5</sub>-U 培地で培養した (A)。図に示す 1 から 16 に相当する時点でそれぞれ培養液から菌体を回収し、細胞の蛋白質合成量を Protein synthesis assay kit (Cayman chemical) を用いて測定した。細胞あたりの蛋白質合成速度 (RFU/OD) を算出した (B)。

同遺伝子のプロモーター領域を難生産性蛋白質である糸状菌分泌性  $\beta$ -ガラクトシダーゼをコードする遺伝子 (lacA および lacA3) に連結し、ygr067C 遺伝子欠損株にて発現させたところ、発現に伴う毒性が緩和され、活性型の  $\beta$ -ガラクトシダーゼを培地中に放出した (図 5)。

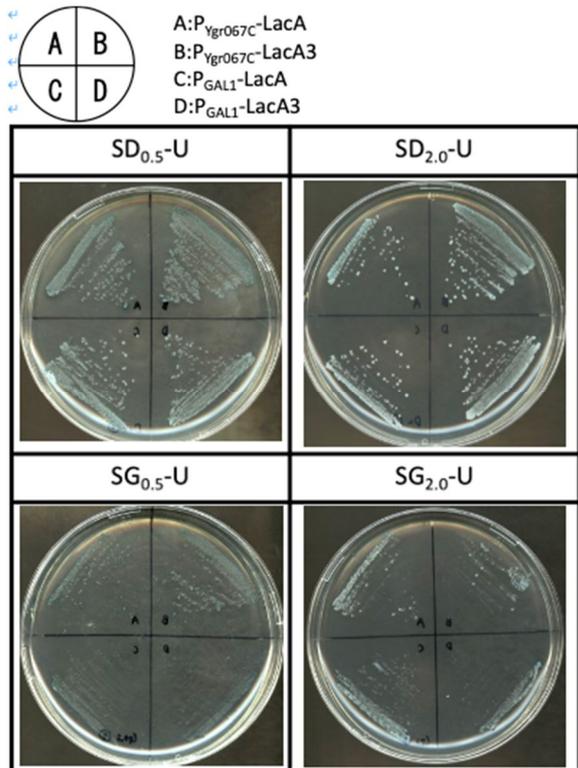


図 5 各プロモーターによる組換え糸状菌  $\beta$ -ガラクトシダーゼの分泌発現  
 PYgr067C-LacA (A)、PYgr067C-LacA3 (B)、PGAL1-LacA (C)、PGAL1-LacA3 (D)  
 発現株の菌体懸濁液を各種寒天培地にストリークし、30℃で48時間培養した後、得られた  
 イメージをスキャナーで取り込んだ。

以上より、難生産性蛋白質の効率的生産系を構築するという本研究の当初目的は概ね達成された。難生産性蛋白質の適用例として、現在までに糸状菌  $\beta$ -ガラクトシダーゼ、シイタケラッカーゼ (*LeIcc1*)、マイタケプロテアーゼ群などで成功している。さらに多くの適用例を追加すべく、引き続き研究を行っている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2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<br>Kawarasaki Y., Ohashi S., Watabe R., Tanaka M., Kurose T., Ito K.  | 4. 巻<br>2406          |
| 2. 論文標題<br>High Cell-Density Expression System: Yeast Cells in a Phalanx Efficiently Produce a Certain Range of "Difficult-to-Express" Secretory Recombinant Proteins. | 5. 発行年<br>2022年       |
| 3. 雑誌名<br>Methods in Molecular Biology   | 6. 最初と最後の頁<br>269-279 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子）<br>10.1007/978-1-0716-1859-2_16  | 査読の有無<br>有            |
| オープンアクセス<br>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<br>-             |

|   |                         |
|---|-------------------------|
| 1. 著者名<br>Kawarasaki Yasuaki, Kurose Takeshi, Ohashi Sayaka, Watabe Runa, Tanaka Mizuki, Ito Keisuke  | 4. 巻<br>-               |
| 2. 論文標題<br>High Cell-Density Expression System: Yeast Cells in a Phalanx Efficiently Produce a Certain Range of "Difficult-to-Express" Secretory Recombinant Proteins | 5. 発行年<br>2022年         |
| 3. 雑誌名<br>Methods in Molecular Biology  | 6. 最初と最後の頁<br>269 ~ 279 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子）<br>10.1007/978-1-0716-1859-2_16   | 査読の有無<br>有              |
| オープンアクセス<br>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<br>-               |

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 0件／うち国際学会 0件）

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>長嶋優芽、栗田涼子、田中瑞己、河原崎泰昌  |
| 2. 発表標題<br>マイタケ ( <i>Grifola frondosa</i> ) 子実体で発現するプロテアーゼ遺伝子群の同定と異種発現系による性質決定 |
| 3. 学会等名<br>日本生物工学会令和5年度大会（名古屋大学東山キャンパス・名古屋）                                    |
| 4. 発表年<br>2023年  |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>田中 瑞己、藤田 翔貴、河原崎 泰昌、山形 洋平   |
| 2. 発表標題<br>麹菌においてカーボンカタボライト抑制を制御する脱ユビキチン化酵素CreB はユビキチンリガーゼアダプターCreD の転写誘導とタンパク質安定性を制御する |
| 3. 学会等名<br>日本農芸化学会令和4年度大会（京都・オンライン）   |
| 4. 発表年<br>2022年   |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>栗田 涼子, 河原崎 泰昌, 田中 瑞己           |
| 2. 発表標題<br>出芽酵母機能未知転写因子 Ygr067C の標的遺伝子の同定 |
| 3. 学会等名<br>日本生物工学会令和4年度大会 (オンライン)         |
| 4. 発表年<br>2022年                           |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>長嶋優芽、栗田涼子、田中瑞己、河原崎泰昌  |
| 2. 発表標題<br>マイタケ ( <i>Grifola frondosa</i> ) 子実体で発現するプロテアーゼ遺伝子群の同定と異種発現系による性質決定 |
| 3. 学会等名<br>日本生物工学会 令和5年度大会   |
| 4. 発表年<br>2023年  |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>宮本 萌衣、河原崎 泰昌、田中 瑞己          |
| 2. 発表標題<br>T7ファージによる蛋白質の折りたたみ改善配列の自律探索 |
| 3. 学会等名<br>日本生物工学会令和3年度大会              |
| 4. 発表年<br>2021年                        |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>栗田涼子、長嶋美乃里、田中瑞己、河原崎泰昌               |
| 2. 発表標題<br>出芽酵母Ygr067Cプロモーターを利用した難生産性組換え蛋白質発現系 |
| 3. 学会等名<br>日本生物工学会令和3年度大会                      |
| 4. 発表年<br>2021年                                |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>田中 瑞己, 藤田 翔貴, 河原崎 泰昌, 山形 洋平  |
| 2. 発表標題<br>麹菌においてカーボンカタボライト抑制を制御する脱ユビキチン化酵素CreB はユビキチンリガーゼアダプターCreD の転写誘導とタンパク質安定性を制御する |
| 3. 学会等名<br>日本農芸化学会令和4年度大会   |
| 4. 発表年<br>2021年～2022年   |

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

|       | 氏名<br>(ローマ字氏名)<br>(研究者番号)                      | 所属研究機関・部局・職<br>(機関番号)                            | 備考 |
|-------|--|--|----|
| 研究分担者 | 田中 瑞己<br><br>(Tanaka Mizuki)<br><br>(70803344) | 東京農工大学・(連合)農学研究科(研究院)・准教授<br><br><br><br>(12605) |    |

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 |
|---------|---------|