

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 2 日現在

機関番号：15501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26450505

研究課題名(和文) 合成生物学的手法による酵母及びヒトタンパク質分泌シグナル配列の厳密な定義と最適化

研究課題名(英文) Definition and optimization of secretion signal by using artificial model sequences in yeast and human cells

研究代表者

星田 尚司 (Hoshida, Hisashi)

山口大学・創成科学研究科・准教授

研究者番号：00314823

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：タンパク質を細胞外に分泌させる分泌シグナル配列の網羅的変異解析を出発点とし、その情報を基にした人工配列を設計することで、耐熱性酵母及びヒト培養細胞における分泌シグナルの詳細な解析を行った。その結果、酵母及びヒト細胞でのタンパク質分泌生産に適したシグナル配列のN末側、C末側、疎水性領域の配列の特徴を明らかにした。特に、酵母では、疎水性領域にメチオニンを含む連続配列が分泌に適していることが分かった。

研究成果の概要(英文)：A secretory signal sequence located at the N-terminus of a protein directs the protein to the extracellular environment. Signal sequences usually contain an N-terminal basic amino acid followed by a hydrophobic stretch, although no consensus signal sequence has been identified. In this study, mutagenesis and simple modeling of signal sequences was attempted to define optimum signal sequence. Mutagenesis revealed the importance of N-terminal basic residue, length of hydrophobic stretch and Glu following to the stretch in yeast. Hydrophobic stretch region can be substituted with artificial sequence consisting of a repeat of a single hydrophobic amino acid. Stretches consisting of Phe, Leu, Ile, or Met were effective for secretion but the number of residues affected secretory activity. A stretch containing methionine residues showed the highest activity. In human cultured cell, definition of secretion signal is similar but looser compared with the yeast.

研究分野：遺伝子工学

キーワード：分泌シグナル *Kluyveromyces marxianus* 網羅的変異解析 人工配列 ヒト培養細胞

1. 研究開始当初の背景

細胞内でのタンパク質のソーティングを決定するシグナル配列の概念が確立されてはいるものの、分泌経路にタンパク質を導入する分泌シグナルは、10~15の疎水性残基とその両端の正電荷残基と表現されるだけで、厳密には定義されていない。一方、組換え体での分泌性タンパク質の発現量は分泌シグナルに大きく影響されることも言われている。実際、様々な生物に由来するシグナル配列を用いて酵母でルシフェラーゼを分泌させるとその発現量は大きく異なっていた。従って、最適な分泌シグナルを決定できればタンパク質の分泌生産を向上させることができる。

これまでに耐熱性酵母 *Kluyveromyces marxianus* とヒト培養細胞の遺伝子操作系の開発を進め、PCR産物をそのまま用いた形質転換及び遺伝子導入法を開発し、これらを応用して網羅的変異解析をシステムティックに実施できる方法を構築した。これを用いればシグナル配列の置換、変異解析にとどまらず人工的な配列を用いた、配列の最適化および定義ができると考えた。

2. 研究の目的

酵母 *K. marxianus* とヒト培養細胞を用いて、分泌シグナル配列に様々な変異を導入、あるいは人工的な配列に置換してモデルタンパク質の分泌量を解析することで下記を明らかにする。

- (1) シグナル配列を厳密に定義する。
- (2) 両細胞で最も分泌能力が高まるように、分泌シグナル配列を最適化する。

3. 研究の方法

- (1) 非同相末端結合を利用した、耐熱性酵母 *K. marxianus* 及びヒト培養細胞に対する DNA 導入、組換え DNA 形成、遺伝子発現する方法を用いて、様々な配列の分泌シグナルを持つ分泌性ルシフェラーゼ GLuc (*yGluc* 遺伝子) を発現させ、培養液上清中に分泌生産されたルシフェラーゼの活性からシグナル配列の分泌能を評価した。それぞれ基本となるプラスミド DNA を構築し、細胞に導入するための DNA を得る PCR の時に、ルシフェラーゼ遺伝子の分泌シグナルに変異を導入、あるいは人工配列に置換した。最適化した分泌シグナルによる、酵母でのヒトタンパク質の分泌生産解析では、目的タンパク質の hLif にタグ配列を付加し、ウェスタンブロッティングにより分泌生産量を検出した。
- (2) 分泌経路の解析には酵母 *Saccharomyces cerevisiae* を用い、赤色蛍光タンパク質 yEmRFP (RFP) に分泌シグナル配列を付加し、細胞外への RFP の分泌及び、分泌経路内の蓄積を調べた。また、細胞内の局在を明確にするため種々の GFP 融合タ

ンパク質を作製し、RFP と同時に発現させた。

- (3) *K. marxianus* のイヌリナーゼ生産の解析においては、炭素源としてグルコース、キシロースやセロビースなどの糖を1種類含む培地を作製し、フラスコを用いて各培地で酵母を培養し、培養上清中の分泌タンパク質を SDS-PAGE で、イヌリナーゼの活性をスクラーゼ活性として評価した。また、イヌリナーゼ分泌生産への酸素濃度の影響を調べるためには、250 mL サイズのジャーファーマンターを用い、攪拌翼の回転数を変化させ、溶存酸素濃度をモニターしながら培養した。

4. 研究成果

- (1) 酵母 *K. marxianus* における分泌性ルシフェラーゼを用いた GLuc 分泌シグナルの網羅的解析

GLuc 野生型シグナル配列の網羅的削除解析

分泌シグナルを解析するにあたり、まず分泌に重要なアミノ酸残基を同定することを目的として、GLuc 配列の N 末端側の 39 アミノ酸配列 (図 1) の各 1 つの残基、あるいは隣接する数アミノ酸残基を削除して、ルシフェラーゼの分泌に与える影響を調べた。

1 10 20 30 39
 | | | | |
 MGVKVLFALICIAVAEAKPTENNEFDNIVAVASNFATTD

図 1 GLuc の N 末 39 アミノ酸残基

塩基性残基に下線、酸性残基を斜体、解析の結果明らかになった疎水性ストレッチ領域の残基を太字で示している。

2 番目のグリシンおよび 2 番目 3 番目のグリシンとバリンの削除では大きな変化はなかったにもかかわらず 4 番目のリジンまでの 3 残基の削除で活性が大きく低下した。このことは 4 番目のリジン残基が分泌に重要であることを示している。

5 番目のバリン残基以降を 1 残基ずつ削除した時には 15 番目のアラニン残基までほとんどの削除で活性が 10% 程度にまで低下した。これに対して、16 番目のグルタミン酸残基の削除では活性が 4.5 倍に増加した。この結果から 16 番目のグルタミン酸に着目し、ここをグルタミン酸以外の 19 アミノ酸それぞれに置換した。その結果ほとんどのアミノ酸残基で野生型と同程度かそれ以上の分泌活性があったが、アスパラギン酸とプロリンでは活性が低下した。活性を増加させたアミノ酸残基の上位は疎水性のアミノ酸であった。5 - 15 番目のアミノ酸残基と 16Glu に続くアラニンはすべて疎水性のアミノ酸である。これらの結果から GLuc 分泌シグナルの疎水性領域は 11 残基からなりこれが一つでも欠けると分泌シグナルとして機能しない最小の疎水性を持つと考えられた。さらに、

グルタミン酸の削除や疎水性のアミノ酸に置換した時の活性の増加を合わせると、16Gluの削除や疎水性アミノ酸への置換により、グルタミン酸に続くアラニンや置換した疎水性残基が加わり疎水性領域が長くなったことで分泌が促進されたと考えられた。このことは同時にグルタミン酸は疎水性領域を分断する、あるいは疎水性領域の終了位置を決定できる残基であると言える。さらに、アスパラギン酸、プロリンで分泌活性が低下したことから、これらのアミノ酸残基も同様の機能を持つと考えられる。

なお、これ以降のアミノ酸残基の削除では、ある程度の活性の増減は見られたものの、37-39番の各削除を除いて顕著な変化は見られなかった。37-39番の各削除は成熟ルシフェラーゼに影響を与えたものと考えられた。

GLucシグナル配列中のN末リジン残基の飽和 (Saturated) 変異解析

ルシフェラーゼN末端から4番目のリジン残基の役割を明らかにする目的でこのリジンを19個のアミノ酸残基に置換した。この時N末2,3番目のGlyとValは削除した。その結果、アルギニンが元配列の5倍の能力を示し、リジン、アスパラギン、トリプトファン、フェニルアラニンの時に野生型と同じか1.8倍高い分泌能を示した。一方、プロリン、アラニン、バリンなどのアミノ酸残基ではほとんど活性が検出されなかった。この結果から、これまでシグナル配列のN末端側に塩基性(正電荷)の残基が必要とされていたが、正電荷を持つリジン、アルギニンに加え、アスパラギン、トリプトファン、フェニルアラニンでもシグナル配列として機能させられることが分かった。さらに、正電荷を持つにもかかわらずヒスチジンは酵母では分泌に適していないことが明らかになった。

人工配列を用いた分泌シグナル疎水性領域のモデル化と最適化

先の結果から疎水性領域のアミノ酸にはある程度の長さが必要であることが分かった。しかし、配列が分泌能力にどのように影響しているかは不明である。疎水性アミノ酸は9個あり、これらをランダムに選んだ10個程度の配列を考えることは現実的ではない。そこで、人工的な配列を用いて単純化~モデル化~することで、疎水性領域の配列の意義を明らかにすることにした。

まず、ロイシン、メチオニン、トリプトファン、フェニルアラニン、イソロイシン、バリンの疎水性アミノ酸とこれらに加え、セリン、スレオニン、グルタミン、チロシンを選びこれらが8個連続した配列を疎水性領域として与えルシフェラーゼの分泌生産を調べた。すると、ロイシン、メチオニン、トリプトファン、フェニルアラニンではルシフェラーゼが分泌生産されたが、その他のアミノ酸では全く分泌されなかった。チロシンのよう

な比較的疎水的なものであっても親水性アミノ酸は全く分泌のための疎水性領域として機能できないことが分かった。さらに疎水性アミノ酸であるイソロイシン、アラニン、バリンの連続がシグナルとして機能しなかったことは予想外であった。いずれもGLucに限らず分泌シグナルの疎水性領域によくみられるアミノ酸である。使用した疎水性アミノ酸の疎水性を見てみると、アラニンは最も疎水性が低く、イソロイシンとバリンの疎水性は1位と3位であった。このことから、完全には一致しないものの、疎水性が高すぎる場合にはシグナルとして機能できないこと、アラニンのように疎水性の低いもの場合には8個の連続では疎水性領域として不十分であった可能性が考えられた。

モデルシグナル配列での分泌能の最適化を図るため、ロイシンを選び、連続させる数を7から17まで一つずつ変化させた時の分泌能力の変化を調べた。その結果、7残基、または15残基以上ではシグナル配列としての能力が大きく低下またはほとんどなく、分泌シグナルとして機能した中では11残基をピークとしてこれより少なくなるほど、多くなるほど段階的に分泌能が低下した。この結果から、分泌シグナルの長さ、あるいは領域としての疎水性の程度には最適値があることと、また、不足あるいは過剰な場合は分泌シグナルとして機能できないことが分かった。

この結果を踏まえ、イソロイシン、フェニルアラニン、メチオニンでも疎水性領域を構成するアミノ酸の数を変化させて分泌能を調べると、いずれのアミノ酸残基でもロイシンの場合と同様の傾向が見られた。中でもメチオニンは他のアミノ酸残基に比べ分泌能が高く、16個繰り返したMet-Lys-Metx16-Glu(MKM16E)は野生型配列の24倍高い活性を示した。このようなメチオニンの連続配列が分泌シグナルとして機能することは全く知られておらず非常に興味深い結果である。

続いてこれらのアミノ酸を複数種組合わせてさらに分泌能を高めることができるかどうか調べた。その結果メチオニンとフェニルアラニンの組合せを6回繰り返した時にMKM16Eの約3倍の活性を示した。メチオニンとフェニルアラニンを組合わせることの意味は不明であるが、より強いシグナル配列を得ることができた。

以上の結果から、分泌シグナルはN末にリジン、アルギニン、アスパラギン、トリプトファン、フェニルアラニンを持ち、アミノ酸配列に適した長さの疎水性領域を持ち、疎水性領域の終了を決めているのは、グルタミン酸、アスパラギン酸、プロリンであると定義できる。また、最適な疎水性配列は[Met-Phe]_{x6}であることが分かった。いくつかの生物種由来の分泌シグナル配列を用いてGLucを発現させたときの分泌生産活性をこの定義に当てはめるとよく一致していた。

また, MKM16E を用いて Lif を発現させたところ, Lif の野生型分泌シグナルでは全く分泌されなかったが, MKM16E を付加することで分泌生産することができた。

酵母最適化分泌シグナルを付加した RFP の細胞内挙動

分泌能の低い分泌シグナルの問題点を明らかにするために, RFP に分泌シグナルを付加して *K. marxianus* で発現させた。比較のため MKM6E を付加した RFP も構築した。その結果, MKM6E を付加しても培地中に RFP は分泌されなかった。この細胞を蛍光観察すると, RFP が小胞体にとどまっていることが明らかとなった。この結果は分泌シグナルにより分泌経路(小胞体)に入ってもそのまま細胞外には分泌されず, 小胞体等に留まるタンパク質が存在することを示している。分泌シグナルとしては同じものを使用しているにもかかわらず, GLuc の分泌は増強され, RFP は小胞体にとどまったことから, 目的タンパク質の性質が分泌経路に入った後の挙動を決めていると考えられる。

(2) ヒト培養細胞でのシグナル配列解析

酵母 *K. marxianus* で決めたシグナル配列の定義が培養細胞でも通じるかどうかを明らかにするために, 分泌性 GLuc のシグナル配列を種々に変更し, HEK293 細胞に導入して, 培養上清中に分泌生産されたルシフェラーゼ活性を測定し, 分泌能を評価した。

原核生物, 真核微生物, ヒトなどいくつかの生物種に由来する分泌タンパク質のシグナル配列を用いた場合, 基本的に *K. marxianus* と同じ傾向が見られたものの, 発現する配列としない配列での発現量の差が大きく, 言い換えると中間的な活性を示すものは少なく, *K. marxianus* のように段階的な変化ではなかった。分泌能の有無で考えるとヒト培養細胞と酵母での差異は無かった。また, 野生型のシグナル配列を大きく超える能力を持つものも無かった。

N 末のリジン残基の改変では, アスパラギン, トリプトファン, フェニルアラニンで活性が高いところは共通していたが, その他にも同等の活性を示しアミノ酸が多く存在しさらに, 最も活性の低いグリシンやアスパラギン酸でも野生株の 40% 程度の活性を示したことから, ヒト培養細胞では N 末端のアミノ酸残基の重要性は低いことが分かった。

疎水性領域を人工的な単一の疎水性残基の連続に変えた場合では, *K. marxianus* と同様, ロイシン, メチオニン, フェニルアラニンで活性が見られたのに加え, 10 個のイソロイシンでも分泌した。ロイシンとメチオニンの数を変えて分泌量を調べると, メチオニンは酵母と同様の傾向を示したものの, ロイシンの場合には, 10~16 個でほとんど同じ活性を示したことから, 酵母よりも長い疎水性領域も許容し, また長さによる影響を受けにく

いことが分かった。これに加え, 人工配列は野生型 GLuc シグナルと同程度の活性で大きく超えるものは存在しなかった。

ヒト培養細胞と酵母での分泌シグナルの特徴をまとめたものが表 1 である。この様にヒト培養細胞の場合は *K. marxianus* と異なり, シグナル配列の認識が緩く, また, 配列の違いは分泌能にそれほど大きな影響を与えないことが明らかになった。

表 1 酵母とヒトの分泌シグナルの比較

	酵母 (<i>K. marxianus</i>)	ヒト (HEK293 細胞)
シグナル N 末	Lys, Arg, Asn, Trp, Phe	限定性は緩い
シグナル C 末	Glu, Asp, Pro	-
疎水性領域	長さ・配列により分泌能が様々なに変化 単一の連続疎水性アミノ酸に置換可能	分泌できるかできないかの傾向が強い 単一の連続疎水性アミノ酸に置換可能
最適配列	MK[MF]x6E	多くの配列が強い分泌能を持つ

(3) キシロース培養条件下での *K. marxianus* のイヌリナーゼの高分泌生産

(1) の結果を踏まえると, 分泌シグナルによる発現調整を解析するためには, 分泌経路内で留まることのないタンパク質を用いる必要がある。そのようなタンパク質を探索する目的で, 糖の種類を変えた培地で *K. marxianus* を培養し, 培養上清中に大量に分泌されるタンパク質を探した。その結果, キシロース培地でイヌリナーゼが大量に分泌生産されることが明らかになった。イヌリン及びスクロースから単糖を遊離させる活性を持つイヌリナーゼとキシロースの生理学的なつながりは無く, 興味深い現象であると考えられたので, 目的を変え, キシロース条件下でのイヌリナーゼ大量分泌生産に着目して研究を進めた。

キシロース濃度の変化やキシロース添加, 他の糖との組み合わせ, pH はイヌリナーゼ生産に影響を与えなかったが, フラスコ培養時の培地量を変えて培養した時に, 培地量が少ない条件でイヌリナーゼ生産が大きく向上した。グルコース培地を用いた場合にはこの効果は見られなかった。キシロース条件下での培地量の違いが酸素供給(その結果としての溶存酸素濃度)に変化を生じさせており, これがイヌリナーゼ生産に影響を及ぼしていると考えた。そこで, ジャーファーマンターを用いて攪拌速度を変えて培養し, 溶存酸素濃度をモニターしながら培養して培養上清中に生産されたイヌリナーゼ量及び活性を調べた。その結果, 攪拌が激しい条件になればなるほどイヌリナーゼ生産量が増加し, 最も攪拌の強い 1200rpm では 5 日間の培養を

通じて溶存酸素が 0 になることは無かった。これに対して分泌生産量の低かった 400 rpm, 600 rpm では培養を通じて溶存酸素濃度はほぼ 0 であった。1200 rpm と 600 rpm の最終の細胞濃度は同程度であったことから、溶存酸素濃度の高いことがイヌリナーゼ分泌生産に要求されることが明らかになった。

(4) まとめ

GLuc 分泌シグナルの網羅的変異解析および人工配列によるモデル化から酵母での分泌シグナルの最適化と定義ができた。またヒトの場合には酵母に比べ分泌シグナルの定義が寛容であるとともに、配列による発現量の差は小さいことが明らかになった。また、タンパク質の大量分泌にはターゲットタンパク質の配列や構造、また、酸素供給条件が重要であることが明らかになった。

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 1 件)

Yarimizu, T., Nakamura, M., Hoshida, H., Akada R., Synthetic signal sequences that enable efficient secretory protein production in the yeast *Kluyveromyces marxianus*, 査読有, Microbial. Cell Fact., 14:20, 2015
DOI: 10.1186/s12934-015-0203-y

[学会発表](計 4 件)

星田尚司, 木寺研太, 瀧下竜太, 藤岡経久, 深川泰紀, 赤田倫治, 酵母 *Kluyveromyces marxianus* によるキシロース条件下でのタンパク質分泌生産, 第 68 回日本生物工学会大会, ANA クラウンプラザホテル富山(富山県富山市), 2016 年 9 月 30 日

深川泰紀, 星田尚司, 赤田倫治, 酵母 *Kluyveromyces marxianus* におけるイヌリナーゼ分泌生産の解析, 第 33 回 YEAST WORKSHOP, せとうち児島ホテル(岡山県倉敷市), 2015 年 11 月 13 日

Hoshida, H., Yarimizu, T., Akada, R., A synthetic model of secretion signal sequence in the yeast *Kluyveromyces marxianus*, 27th International Conference on Yeast Genetics and Molecular Biology, PalaLevico (Levico Terme, Italy), 2015 年 9 月 11 日

緒方梨衣, 鎗水透, 星田尚司, 赤田倫治, 酵母における人工分泌シグナル配列の解析, 第 32 回 YEAST WORKSHOP, ビューポートくれ(広島県呉市), 2014 年 11 月 14 日

6. 研究組織

(1) 研究代表者

星田 尚司 (Hoshida Hisashi)
山口大学・大学院創成科学研究科・准教授

研究者番号: 00314823

(2) 研究分担者

なし ()

研究者番号:

(3) 連携研究者

なし ()

研究者番号:

(4) 研究協力者

なし ()