

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 8 日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26660061

研究課題名(和文)メタノール酵母のレドックス制御に基づくサイトゾル内新規タンパク質生産系の構築

研究課題名(英文)Construction of a novel cytosolic protein expression system based on redox regulation in methylotrophic yeast

研究代表者

阪井 康能 (Sakai, Yasuyoshi)

京都大学・(連合)農学研究科(研究院)・教授

研究者番号：60202082

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：メタノール資化性酵母は強力なメタノール誘導性プロモーターを持ち、有用タンパク質生産の異種遺伝子発現宿主として広く利用されている。しかし、異種タンパク質の分泌発現では、酵母内で付加された糖鎖のヒトに対する高い抗原性や小胞体ストレス惹起による発現低下が問題となる。本研究では、糖鎖付加や小胞体ストレスの惹起を避けるため、サイトゾルにおいて異種タンパク質合成を行う新規発現系を構築し、異種タンパク質の活性発現に成功した。

研究成果の概要(英文)：Methylotrophic yeasts with strong methanol-inducible promoters have widely been utilized as hosts of heterologous gene expression of useful proteins. However, heterologous gene expression system using methylotrophic yeasts has two problems, highly immunogenicity of yeast glycosylation in human and decrease of expression level of heterologous proteins due to induction of ER stress in. In this study, we have developed the novel expression system in which heterologous proteins are produced in cytosol to avoid yeast glycosylation and ER stress induction and succeeded in expression of heterologous proteins with native activity.

研究分野：応用微生物学

キーワード：レドックス制御 タンパク質生産 メタノール酵母

1. 研究開始当初の背景

(1) メタノール資化性酵母(C1 酵母)は、メタノールを培養炭素源として用いることでコストを抑えられる、メタノール誘導性のプロモーターが強力にかつ厳密な制御を受ける、メタノールは非発酵性の炭素源であるためエタノール生産による生育阻害が生じず高密度培養が可能である、といった優れた性質を備えており、工業レベルでの有用タンパク質生産(有用酵素、抗体、生理活性タンパク質)のための異種遺伝子発現宿主として、世界中で利用されている。しかし、このような異種タンパク質の分泌生産では、ヒトとは異なる構造の糖鎖付加による生産タンパク質の抗原性の高さや折りたたみと成熟の場である小胞体における異種タンパク質過剰発現に伴う小胞体ストレス惹起による発現量の低下が問題となる。

(2) 我々の研究室では、1969年にC1酵母を世界で初めて発見して以来、*Candida boidinii*、*Pichia pastoris*を用い、C1代謝とその調節機構、ペルオキシソーム合成と分解に関わるPEXならびにATG遺伝子の同定と機能解析、毒性の高い有用酵素のオルガネラ内高生産系の確立など、この分野において世界をリードする研究成果を挙げてきた。その一方、酵母転写因子Yap1pのレドックスセンシング領域を利用したレドックス可視化センサーRedoxfluorを開発し、レドックス代謝の解析を進めている。

(3) 有用タンパク質の多くは構造形成及び機能発現のために分子内や分子間にジスルフィド結合形成を必要とする。その分泌生産において、これらの有用タンパク質が折りたたまれ、成熟される場である小胞体は、ジスルフィド結合の形成に適した酸化的な環境にある。事実、大腸菌でジスルフィド結合を有するタンパク質の折りたたみを促進する変異株として知られるorigami株はグルタチオン還元酵素とチオレドキシ還元酵素の二重変異株で、細胞内は酸化的である。一方、酵母当該二重変異株は致死であるために利用できないが、我々は、自ら開発したRedoxfluorや細胞内グルタチオン酸化還元比を測定することにより、メタノール培養時やグルタチオン還元酵素遺伝子を欠損した*glr1Δ*株では、サイトゾルのレドックス状態が酸化的であることを見出した。このことからC1酵母のサイトゾルにおいてジスルフィド結合を有するタンパク質を効率よくフォールディングできる可能性が示唆された。

2. 研究の目的

本研究では、メタノール資化性酵母を利用した異種タンパク質の発現における糖鎖付加や小胞体ストレスの惹起を避けるため、酸化的にしたサイトゾルにおいて異種タンパク質合成を行う新規生産系を確立すること

を目的とした。

3. 研究の方法

本研究では、異種有用タンパク質であるトロンボモジュリン機能ドメイン(TM)を基質とし、C1酵母である*Pichia pastoris*を用いて発現させた。

トロンボモジュリンは血管内皮細胞表面に存在する糖タンパク質であり、トロンピンとの結合、さらにはトロンピン-トロンボモジュリン複合体によるプロテインCの活性化を通じて血液抗凝固活性を発揮する。5種類のTMがあり、様々な生理活性を有している。例えば、レクチン様ドメイン(TMD1)は抗炎症作用、6個のEGF様構造(TME1~TME6)の繰り返しから成るEGF様ドメイン(TMD2)は血液抗凝固作用を有している。またその一部は、炎症性サイトカインやカルシニューリン阻害剤による細胞障害から血管内皮細胞を保護する新規な作用を持つことが明らかになっている。

TM分泌発現ベクターから α ファクター由来の分泌シグナルを除くことで、サイトゾルにおける糖鎖修飾を受けないTMを発現させた。TMの糖鎖付加はその生理活性に必要なことが知られている。*P. pastoris*のレドックス変異株を用いることで酸化的なサイトゾル環境を構築した。

4. 研究成果

グルタチオンは細胞内の主要なレドックス因子の一つで細胞内のレドックスバランスの維持に寄与している。サイトゾルでは、グルタチオンは還元型が優勢であり、これには酸化型のグルタチオンを還元型へと変換するグルタチオンレダクターゼが寄与している。そのため、グルタチオンレダクターゼ欠損株では、通常還元的な環境にあるサイトゾルが酸化的となっている。

グルタチオンレダクターゼ欠損株である*Ppgr1Δ*株でTMをサイトゾルに発現させたところ、分泌発現させたTMをEndo Hにより脱糖鎖した際と同じ分子量に泳動され、また、Endo H処理してもその分子量は変わらなかった。したがって、我々は発現糖鎖を持たないTMを発現させるに成功した。さらに、Hisタグを利用してアフィニティ精製したところ、本発現系により得られたTMは生理活性を有していることも明らかとなった。

今後、*Ppgr1Δ*株をはじめとする、酸化的なサイトゾルを有する各種レドックス変異株を用い、サイトゾルでのレドックス状態をRedoxfluorによりモニタリングしつつ、サイトゾルでの折りたたみ効率の高い条件を探索し、本研究における酸化的なサイトゾルにおける異種タンパク質発現系を発展させることが可能である。小胞体におけるフォールディングに関わるPDI(ジスルフィド結合の掛け替え酵素)やEro1L(PDI酸化酵素)といったほ乳類のレドックスシャペロンの過剰発

現によるフォールディングの効率化により発現系をさらに改良することが可能であり、これにより産業用酵素・抗体等有用タンパク質生産のための生命科学技術基盤の確立への貢献が期待できる。

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 0 件)

[学会発表](計 8 件)

発表者：阪井康能、「遺伝子発現から薬効薬理評価～最新リアルタイムイメージング～」、「異種タンパク質生産の TPO を考える：フォールディングとレドックス」、OYC パイオシンポジウム 2014、2014 年 7 月 4 日、日本工業倶楽部会館（東京都）(招待講演)

発表者：阪井康能、異種タンパク質生産について C1 酵母を使って考える、新産業酵母研究会、2014 年 10 月 17 日、産総研：臨海副都心センター（東京都）(招待講演)

発表者：中村啓悟、由里本博也、池添隆之、西岡千恵、本田剛一、阪井康能、メタノール資化性酵母を用いたトロンボモジュリン各領域の生産と解析、日本農芸化学会 2015 年大会、2015 年 3 月 26 日 - 3 月 29 日、岡山大学、(岡山市、岡山県)

発表者：阪井康能、「合成生物学」から再考するメタノール遺伝子発現系、日本農芸化学会 2015 年大会シンポジウム「合成生物学的なアプローチが次世代の農芸化学をどう変えるか」、2015 年 3 月 26 日 - 3 月 29 日、岡山大学、(岡山市、岡山県)(招待講演)

発表者：阪井康能、奥 公秀、竇関淳、「Workshop」Visualization of Local Redox State in Cells: Its Application to Biology and Drug Screening、15th International Conference on Oxidative Stress Reduction, Redox Homeostasis and Antioxidants 2015、2015 年 6 月 22 日 - 6 月 24 日、Paris (France)(招待講演)

発表者：阪井康能、Symposium "How can we evaluate "physiological" redox state?", 15th International Conference on Oxidative Stress Reduction, Redox Homeostasis and Antioxidants 2015、2015 年 6 月 22 日 - 6 月 24 日、Paris (France) (招待講演)

発表者：阪井康能、Round Table Discussion "What are the Best & Adequate Methods to Evaluate Oxidative Stress & Antioxidants in vitro vs in vivo & in Human?", 15th International Conference on Oxidative Stress Reduction,

Redox Homeostasis and Antioxidants 2015、2015 年 6 月 22 日 - 6 月 24 日、Paris (France)(招待講演)

発表者：阪井康能、蛍光可視化で探るオルガネラホメオスタシスの生理機能と障害、2015 年 9 月 8 日、日本生化学会北海道支部共催講演会、北海道大学地球環境科学研究所（札幌市、北海道）(招待講演)

発表者：阪井康能、細胞内の可視化を通して「わかったこと」「役立てること」、2016 年 1 月 13 日、第 10 回中部大学ライフサイエンスフォーラム、中部大学不言実行館アクティブホール（春日井市、愛知県）(招待講演)

[図書](計 0 件)

[産業財産権]
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]
研究室ホームページ
<http://www.seigyo.kais.kyoto-u.ac.jp>

6. 研究組織

(1) 研究代表者
阪井 康能 (SAKAI, Yasuyoshi)
京都大学・大学院農学研究科・教授
研究者番号： 60202082

(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：