

産業技術総合研究所における酵母を用いた研究の事例 —発現系・レポーターアッセイの実用化, 組換え体の安全管理—

扇谷 悟*・佐原 健彦・栃木 裕貴・佐藤なつ子・呉 純・近江谷克裕

出芽酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) はこれまでモデル生物として広く利用されてきた。本稿では、筆者らが開発した出芽酵母の新しいバイオテクノロジーツールを2つ紹介する。また、後半で産業技術総合研究所(産総研)における組換え体に関する安全管理について紹介する。

出芽酵母を用いた新規低温発現系の開発と実用化

タンパク質発現における低温の利用 組換えタンパク質を生産するために、これまでに大腸菌、酵母、昆虫、ほ乳類動物細胞などを宿主としたさまざまな発現系が開発されてきた。しかし、いずれの発現系についても、問題点も知られている。たとえば、繁用されている大腸菌発現系では、真核生物由来のcDNAは不溶性の封入体(inclusion body)を形成するケースが多く、あるいは発現しないケースもある。一方、出芽酵母は単細胞真核生物であり、ヒトなどのタンパク質発現に比較的適していると考えられるが、発現量は低いと一般に認識されている。日本はヒト完全長cDNAの大規模コレクションを有しており、これら大量のヒトcDNAを用いてそれぞれのタンパク質を発現させ、機能を解析することにより、新規創薬につながると期待されている。そのためには多様な発現系が必要であるということが、タンパク質研究における共通認識となっている。

一方、タンパク質発現における温度効果に目を向けると、大腸菌発現系において、低温下(16–30°C)で発現させることにより封入体形成を回避できるという効果が報告されている²⁾。筆者らは、この低温による可溶性発現の促進効果に着目し、低温下での発現系について検討した。その検討において、出芽酵母は大腸菌に比較して遙かに低い温度(0–4°C)でも高いviabilityを有していることから、低温下での発現という目的に合致している宿主であると考えた。そこで筆者らは、低温下において発現量が高く、タンパク質を可溶性として生産するために適した発現系を、出芽酵母を宿主として新規に構築することとした。

酵母の低温ストレス応答の網羅的解析 低温下での発現には、低温下でも高い転写能を有するプロモーターが必要である。さらに、効率的な発現系をデザインする

には、酵母の低温ストレス応答を解明することが重要であると考えた。これらの目的のために、酵母を低温に曝露し、発現解析を行った。当時、酵母の低温誘導性遺伝子は数種の遺伝子(*TIP1/SRP1* family, *NSRI*など)のみが報告されていたが、筆者らはcDNAマイクロアレイを用いることにより、低温に対する遺伝子発現の変化をゲノムレベルで俯瞰できると考え、10°C曝露後の酵母の遺伝子発現変化を網羅的かつ経時的に解析した。その結果、10°C低温曝露時点から8時間後までに2倍以上の発現量の変化を示す250種以上の低温誘導性遺伝子を新たに同定することができた。また、cDNAマイクロアレイによる遺伝子発現の経時的変化の階層的クラスタリングによる解析と、MIPSデータベースによる遺伝子産物の機能分類を統合して考察することにより、異なった機能を有する遺伝子セットが低温曝露後協調的に順次誘導されることを明らかにした³⁾。たとえば、リボソーム複合体に関わるタンパク質としては、低温曝露後30分以内にリボソームRNA合成に関わるタンパク質が増加し、低温曝露後2時間程度でリボソームタンパク質が協調的に誘導されていた。これは、低温で抑制される翻訳機構の補償のための応答であると考えた。

酵母低温発現系の構築 低温発現系を構築するためのツールとして、低温下で効率的にタンパク質を生産するための発現ベクターを作製した。上記の翻訳機構の補償応答を考慮し、発現ベクターに用いる低温誘導性プロモーターとしては、低温曝露後4時間以降に強く誘導されるプロモーターを採用した。レポータータンパク質としてenhanced green fluorescent protein (EGFP) cDNAを用いてモデル発現系を構築したところ、EGFPが低温処理により効率的に生産されることが確認された。さらに、宿主酵母菌株、低温誘導条件などの検討を行い、新規低温誘導発現系を構築した。本発現系を市販の酵母発現系と比較したところ、それらを凌駕する発現量が得られた⁴⁾。この要因としては、1) 他の多くのmRNAが低温で減少するのに対し、低温によって誘導されるプロモーターを利用することにより、目的タンパク質のmRNAの相対含量が増加すること、2) 低温によって翻訳機構関連分子が誘導され、低温による翻訳機能の低下

* 著者紹介 産業技術総合研究所北海道センター(所長代理) E-mail: s.ohgiya@aist.go.jp

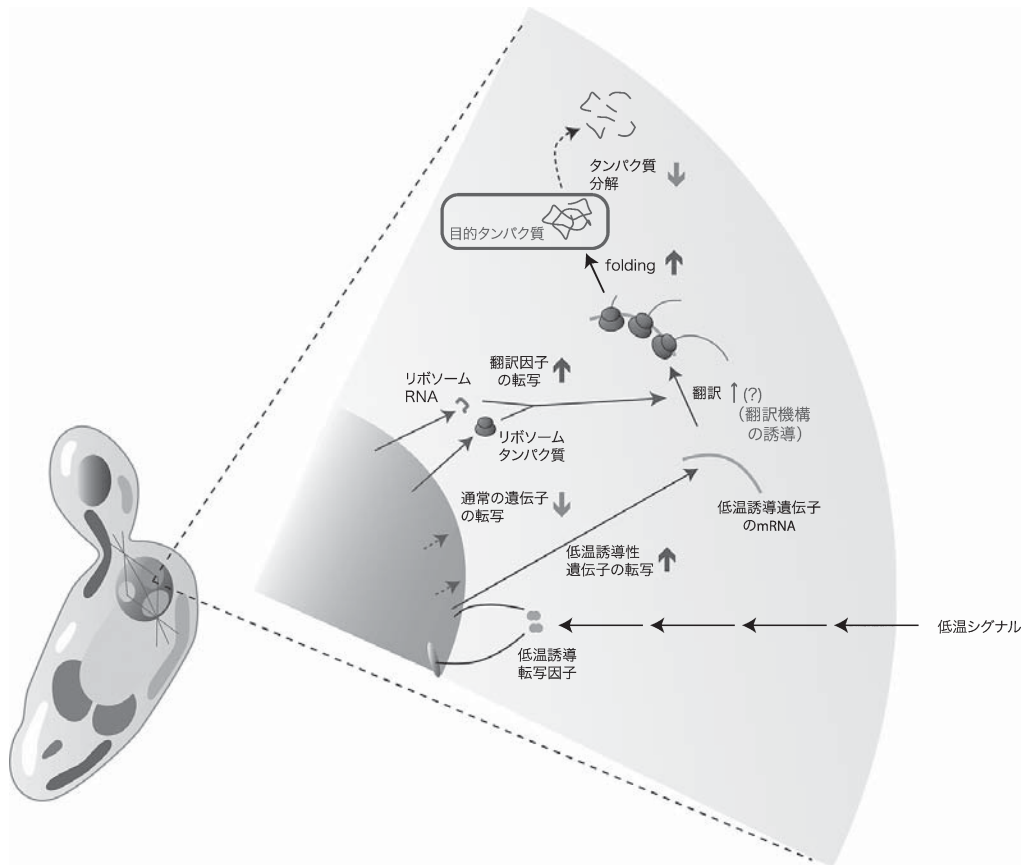


図1. 酵母発現系における低温の効果 (推定). 低温によって増加・改善される現象を上向き矢印で、抑制される現象を下向き矢印で示している.

を抑えていること, 3) 低温下においてタンパク質が可溶性で生産されやすいこと, 4) 低温下ではプロテアーゼなどの分解系が抑制されること, などのメカニズムを推定している (図1).

これまでに、従来の大腸菌発現系では不溶化したタンパク質を、本発現系において可溶性で発現させることに成功している⁴⁾。また、従来の酵母発現系ではきわめて少量しか発現しなかったタンパク質が、低温発現系を用いることによって生産量が大きく改善されたなどの結果も得られている (佐原, 未発表)。

本低温誘導発現系では酵母を対数増殖期中期ころまで30°Cで培養し、その時点で培養温度を10°Cあるいは4°Cに低下させて遺伝子発現を誘導させる。試験管やフラスコレベルの培養では、通常の30°Cの培養槽から低温にあらかじめセットした低温培養槽あるいは低温室に試験管やフラスコを移動させるだけでよい。さらにジャーファーマンターでは、ジャケットの循環水の温度セットを変更するだけでよいのもっと簡単であるが、筆者らは、濁度センサーと温度コントローラーを備えた

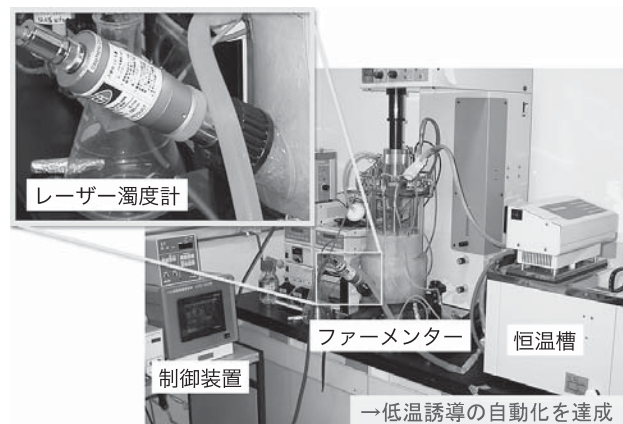


図2. 低温誘導の自動化システム

ジャーファーマンターを試作し、低温誘導の自動化システムも開発し、より簡便にタンパク質を生産できるようになった (図2)。

酵母低温発現系の実用化 従来の大腸菌発現系より

も高い可溶性での発現が期待でき、従来の酵母発現系に比べて高い発現量を得られる本発現系は、大腸菌で発現が困難なタンパク質の生産に適しており、東洋紡績(株)による受託事業として実用化された(2009年まで)。

**分泌型ルシフェラーゼを用いた
新規酵母レポーターアッセイの開発と実用化**

酵母レポーターアッセイ レポーターアッセイは、遺伝子の転写活性化を可視化する生化学・分子生物学研究の重要なツールである。出芽酵母においても、遺伝子の転写調節機構に関する基礎研究に用いられている他、タンパク質相互作用の解析に用いられている酵母ツーハイブリッドシステム⁵⁾や、内分泌攪乱物質の検出に用いられるYES (yeast estrogen screening) アッセイ⁶⁾などに利用されている。

レポーターアッセイにおいては、転写活性化をレポータータンパク質の生産量を酵素活性などとして測定する。したがって、個々のレポーターアッセイの特性は、レポータータンパク質の性質に大きく左右される。従来、酵母レポーターアッセイでは、おもにβ-ガラクトシダーゼがレポーター酵素として用いられ、発色基質を用いた比色法により定量されてきた⁷⁾。β-ガラクトシダーゼは細胞内酵素であり、酵素活性を測定するためには、浮遊している酵母細胞を遠心分離によって回収し、堅い細胞壁を破碎するためにガラスビーズなどと共に1時間程度激しく振とうし、さらに遠心分離によって細胞破碎液上清を分離するという煩雑な処理が必須であった。このため、β-ガラクトシダーゼを用いた酵母レポーターアッセイでは多数のサンプルを処理することは通常困難であった。

ウミホタルルシフェラーゼ (CLuc) を用いた酵母レポーターアッセイの確立 中島らは、ウミホタル (*Cypridina noctiluca*)由来分泌型ルシフェラーゼ (CLuc) を用いた簡便な培養細胞レポーターアッセイを開発した⁸⁾。CLucは分泌型のルシフェラーゼであることが最大の特徴である。このため、CLucを酵母レポーターアッセイに用いた場合には、レポーター酵素であるCLucが酵母培養液中に分泌されるため、より簡便に酵素活性を測定できると期待された。

そこで筆者らは、CLucを用いて酵母ハイスループットレポーターアッセイの構築を試みた。最初に、CLucをコードするDNAを酵母レポーターアッセイ用に合成することとした。これは、ウミホタル由来CLuc cDNAの塩基配列を酵母の転写調節に関わる *cis* 因子のデータベース SCPD⁹⁾、Gene2 Promoter¹⁰⁾で検索したところ、多くの推定 *cis* 配列が見いだされたためである。すなわ

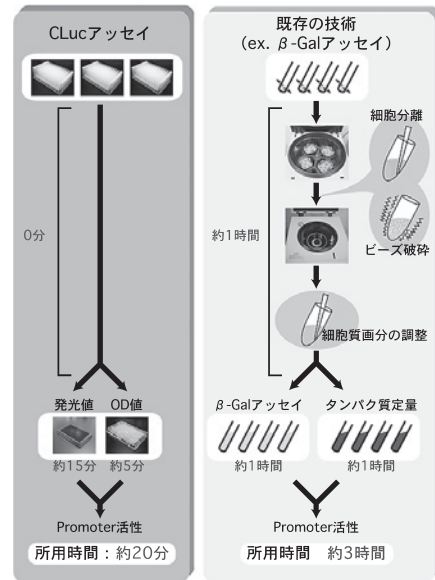


図3. CLuc レポーターアッセイと従来法の比較

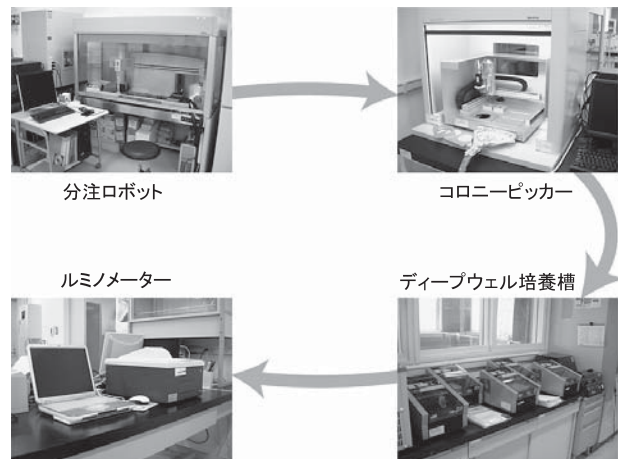


図4. ハイスループット解析のための機器

ち、ウミホタル由来CLuc cDNAをそのままレポーターアッセイ用プラスミドに用いた場合、ウミホタル由来CLuc cDNA内の推定 *cis* 配列がレポーターアッセイにおいて予期せぬ影響をもたらすことが考えられた。また、ウミホタルと出芽酵母では最適コドンが異なることも想定された。そこでまずCLucのアミノ酸配列を、酵母の最適コドン¹¹⁾を用いてDNA配列に変換し、ついで上記 *cis* 因子のデータベースを参照して見つかった推定 *cis* 配列について、コードするアミノ酸を変えないようにしながら塩基置換を行い、推定 *cis* 配列を除去した。このよ

うな最適化を繰り返し行い、最終的には推定 *cis* 配列が非常に少ない CLuc をコードする DNA がデザインされた¹²⁾。

この塩基配列を有する CLuc DNA を、合成 DNA を PCR 法によりつなぎ合わせることで作製した。得られた合成 CLuc DNA を用いてレポータープラスミドを作製し、酵母レポーターアッセイ法を確立した。CLuc を用いた酵母レポーターアッセイ法は、レポーター酵素である CLuc が培養液中に分泌され、さらに酵母培養液中の CLuc による発光は酵母細胞存在下でも測定可能であるため、酵母培養液の一部をそのまま測定に使用することができる。これにより、 β -ガラクトシダーゼに比べて大幅な簡便化と迅速化を図ることが可能となった(図3)。

また、酵母 CLuc レポーターアッセイ法で測定した転写活性と従来の β -ガラクトシダーゼを用いたアッセイ法で測定した転写活性には高い相関が得られ¹²⁾、CLuc を用いたレポーターアッセイ法は従来法から容易に移行可能であることが示された。

CLuc を用いた酵母ハイスルーブットレポーターアッセイの確立と応用 1 回の CLuc 活性測定に必要な酵母培養液は少量 (220 μ l) であるため、酵母培養液も少量 (1 ml) で済む。このため、96 穴ディープウェルプレートで酵母の培養を行うことが可能となり、ハイスルーブット解析を行う上で必須であるラボオートメーションシステムを用いた半自動化が可能となった(図4)。

CLuc を利用した酵母ハイスルーブットレポーターアッセイ法の応用として、まず出芽酵母の 500 以上の遺伝子の 1 kb プロモーター断片 (開始コドン上流 1 kb 領域) の転写能の解析を行った。酵母ゲノム DNA から PCR によって 500 以上の 1 kb プロモーター断片を調製し、酵母 *in vivo* 組換え能を利用してライブラリを作製した。これらの組換え体をディープウェルプレートで培養した。PCR からアッセイまで、すべて 96 穴フォーマットを用い、ラボオートメーションシステムを用いた半自動システムによってアッセイを行った。その結果、ほとんどがこれまで転写活性について知見がない、およそ 500 のプロモーターについて転写活性を測定することができた¹²⁾。

ヒト由来分泌タンパク質・膜タンパク質の多くは創薬研究において注目されており、これらのタンパク質の機能・構造解析や産業応用のため、高効率な発現系が求められている。一方、これらのタンパク質は一般に発現が困難であることもよく知られている。発現量の改善のため、本来のシグナルペプチドを宿主由来のシグナルペプチドに置換する方法が従来試みられているが、酵母発現系でこれまでに用いられているシグナルペプチドはわず

かな種類しかない。そこで、CLuc を利用した酵母ハイスルーブットレポーターアッセイ法の応用として、出芽酵母ゲノム中にコードされている 400 を超えるシグナルペプチドについて評価を行った。上記の実験と同様に、酵母ゲノム DNA から PCR によって 400 以上のシグナルペプチドをコードする DNA を調製し、CLuc のシグナルペプチドをコードする領域と置換することによってライブラリを作製した。その結果、優れた分泌能力を有する新規シグナルペプチドを 51 種類同定した (佐原ら、未発表)。シグナルペプチドと成熟タンパク質には適切な組み合わせ (相性) があるとされている。そこで、これらの新規シグナルペプチドの出芽酵母発現系における汎用性について検討するため、複数のヒト由来分泌タンパク質・膜タンパク質を用いて、発現量に対するシグナルペプチドの評価を行った。これまでに、複数のヒト由来分泌タンパク質に対して汎用的に発現量を向上させる効果がある新規の酵母シグナルペプチドを見いだしている。

CLuc を用いた酵母ハイスルーブットレポーターアッセイの実用化 酵母レポーターアッセイでは、分泌型酸性ホスファターゼ (*PHO5*)¹³⁾ を用いた方法なども提案されているが、培養細胞と酵母のどちらでも利用可能で、高感度な発光反応で検出できる分泌型酵素としては初めての例である。CLuc の酵母レポーターアッセイキットおよび基質 (CLuc ルシフェリン) は、日本ではアトー(株)より販売されている。また、CLuc の培養細胞用レポーターアッセイキットはアトー(株)が販売しているほか、New England Biolab 社のキットにも CLuc が用いられている。

培養細胞を用いたレポーターアッセイの一部は、「ダイオキシン類対策特別措置法施行規則第 2 条第 1 項第 4 号の規定に基づき環境大臣が定める方法」として、ダイオキシン検出のための公定法として認証されている。酵母を用いたレポーターアッセイ法も将来的に応用範囲が広がることを期待している。

産総研における組換え体の安全管理

産総研は、施設整備・環境保全・労働衛生・安全管理・情報基盤を所掌する研究環境安全本部を有している。同本部内の環境安全管理部ライフサイエンス実験管理室は、産総研のすべての研究ユニットにおける組換え DNA 実験、微生物実験、動物実験などのライフサイエンス実験の安全管理を担当している。以下、ライフサイエンス実験管理室における組換え体の安全管理に関して紹介する。

組換え体などの購入における管理 産総研におい

て、試薬類の購入依頼（調達請求）は会計システムへの入力により行っているが、薬品類は環境安全管理部による確認を経て、調達部署に届くようになっている。ライフサイエンス実験管理室では、微生物や組換え体などの確認を担当している。市販あるいは頒布している微生物には、明示されていないもの実は組換え体であるものがあり、研究者が組換え体と知らないまま購入手続きをすることがある。また、タンパク質として販売されている製品にも、その製造過程において用いられている組換えウィルスの混入があるために、組換え体として扱わなければならないものがある。ライフサイエンス実験管理室では、このような情報を収集すると共に職員に周知することによって、組換え体の購入における安全管理を担っている。

組換え体を扱う実験室の立ち入り検査 ライフサイエンス実験管理室では、すべての組換えDNA実験計画について実験室の立ち入り検査を年1回行っている。実際に実験室に入って組換え体の管理状況を確認すると共に、日常的な作業手順、消毒方法などを研究者に確認することによって組換え体管理の適正化に役立っている。研究者としても、管理上の疑問点などを気軽に聞いたりできるなど、自主管理の一助となっている。

組換えDNA実験に関する教育訓練 組換えDNA実験は生化学、分子生物学において日常的な実験手法となった。このような「慣れ」による不適切な組換え体の取り扱いを防止するために、ライフサイエンス実験管理室では全研究者に年1回の組換えDNA実験に関する教

育訓練の受講を義務づけている。組換えDNA実験を行う研究者は非常に多く、全員に受講の機会を提供することに従来苦勞してきたが、昨年よりイントラネット配信を利用したe-ラーニングシステムを構築し、研究者が自室でいつでも教育訓練を受講できるようになり、利便性が格段に向上した。

本論文のうち酵母に関する研究は、東洋紡績株式会社ならびにアトー株式会社との共同研究によるものです。ここに深く感謝申し上げます。本研究の一部は、NEDO技術開発機構・平成16年度産業技術研究助成事業として行われました。

文 献

- 1) Yin, J. *et al.*: *J. Biotechnol.*, **127**, 335 (2007).
- 2) Vera, A. *et al.*: *Biotechnol. Bioeng.*, **96**, 1101 (2006).
- 3) Sahara, T. *et al.*: *J. Biol. Chem.*, **227**, 50015 (2002).
- 4) 佐原健彦, 扇谷 悟: バイオサイエンスとインダストリー, **65**, 130 (2007).
- 5) Fields, S. and Song, O.: *Nature*, **340**, 245 (1989).
- 6) Routledge, E. J. and Sumpter, J. P.: *Environ. Toxicol. Chem.*, **15**, 241 (1996).
- 7) Rupp, S.: *Methods Enzymol.*, **350**, 112 (2002).
- 8) Nakajima, Y. *et al.*: *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **68**, 565 (2004).
- 9) <http://rulai.cshl.org/dbsd/index.html>
- 10) <http://www.genomatix.de/index.html>
- 11) Akashi, H.: *Genetics*, **164**, 1291 (2003).
- 12) Tochigi, Y. *et al.*: *Anal. Chem.*, **82**, 5768 (2010).
- 13) Harashima, S. and Kaneko, Y.: *J. Biosci. Bioeng.*, **91**, 325 (2001).