

担子菌酵母 *Cryptococcus* sp. S-2 による 西洋ワサビペルオキシダーゼの異種組換え発現

歌島 悠*・正木 和夫

はじめに

東洋紡株式会社では臨床検査に使用する酵素原料を製造販売しており、世界でもトップクラスのシェアを有している。臨床検査に使用される酵素は、ヒトの体内に入ることではなく、遺伝子組換え技術の利用が可能であるため、さまざまな酵素が遺伝子組換え技術を用いて製造されている。酵素の生産宿主にはさまざまな微生物が使用されるが、酵母は酵素を分泌生産でき、目的酵素以外のタンパク質の分泌量が少ないことから異種タンパク質生産の宿主として有利である。

2009年より独立行政法人酒類総合研究所と共同で担子菌酵母 *Cryptococcus* sp. S-2 を用いた酵素の組換え発現方法について検討を行ってきた。今回はその中で植物由来の西洋ワサビペルオキシダーゼの組換え発現を達成した例を紹介したい。

担子菌酵母 *Cryptococcus* sp. S-2

Cryptococcus sp. S-2 は1994年に国税庁醸造研究所(現：独立行政法人酒類総合研究所)において、家藤により単離された酵母である¹⁾。*Cryptococcus* sp. S-2 は生デンプンを分解する酸性アミラーゼを生産することから、元々は排水処理に用いる酵母として選抜されてきた。その後の研究で本菌ではキシロースの添加によってキシラナーゼの発現が誘導されること、生分解性プラスチックを分解するクチナーゼが生産されることが確認されており、本菌の酵素生産能力の高さを利用するため、ウラシル要求性を用いた宿主ベクター系、キシラナーゼプロモーターを用いた高発現ベクターが構築されている²⁾。また、本菌は属名が *Cryptococcus* ということ、日和見感染菌である *Cryptococcus neoformans* と同属名であるが、本菌に感染能力はなく、30°C以上では生育することができないため、病原性はなく安全な微生物である。後にマウスを用いた急性毒性試験も行ったが毒性は確認されていない。本菌の異種タンパク質生産能力に注目し、臨床検査用酵素の生産宿主として適用可能であると考え研究を開始した。

臨床検査に使用される酵素

臨床検査は、超音波や画像診断、心電図などの身体のなかの様子やその動きをみる「生体検査」と、尿や便、

血液の成分の測定や、取り出した組織の状態を観察する「検体検査」に分類される。特に検体検査においては、検体中の成分を分析するために、臨床検査薬が利用される。「検体検査」では、酵素や色素などの化学反応によって検査を行う「生化学検査」や抗原抗体法により検査を行う「免疫学的検査」、血液中の成分を分析する「血液学的検査」のほかに、「細菌検査」や「遺伝子検査」などがある。「生化学検査」では、検体由来成分を酵素化学的若しくは、化学的に反応させ、分光光学的に分析を行う方法が主流であり、検査薬には酵素が広く利用されている。

臨床検査薬には、グルコースデヒドロゲナーゼ (GDH)、コレステロールオキシダーゼ、ペルオキシダーゼなどさまざまな酵素が利用される。また、これらの臨床検査用酵素には、誤診断を防ぐために高い基質への特異性と高い反応性が求められ、さらに、臨床検査薬の長期間の保存に耐えるため、高い安定性が求められる。また、副反応を防ぐために、高い精製純度が求められる。

これらの臨床検査用酵素は、植物や動物組織、微生物から抽出、精製される。遺伝子組換え技術の進歩により、これらの酵素遺伝子を微生物に組み込み、組換え発現させることで、目的の酵素を大量に発現させ、安価に酵素を精製することが可能となってきた。しかし、植物や真菌などの真核生物由来の酵素は発現量やフォールディングの問題、糖鎖修飾などの問題から大腸菌による組換え発現が困難な場合があり、植物体からの抽出や微生物の野生株の培養によって製造されている。

真核生物の遺伝子組換え発現宿主としては、メタノール資化性酵母である *Pichia pastoris* や出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae*、麹菌 *Aspergillus oryzae* などの真菌や、タバコ培養細胞、CHO細胞などの動物細胞や、昆虫ではカイコなども利用されているが、発現量の低さ、培養の困難さ、高額な産業利用ライセンスが必要であるなど、真核生物の遺伝子組換え宿主としての産業利用にはさまざまな課題がある。

Cryptococcus sp. S-2 はキシロースを炭素源として培養することで強力に誘導されるキシラナーゼプロモーターが取得されており、酵母菌体外に酵素を分泌生産することが可能であることから、酵素の産業生産の宿主として非常に扱いやすい。その上、菌体外に生産される夾雑タンパク質も少なく精製が容易であることから臨床検

* 著者紹介 東洋紡株式会社敦賀バイオ研究所 E-mail: utashi.yu@gmail.com

査用酵素の生産宿主として好適と考えられる。

西洋ワサビペルオキシダーゼ (HRP)

西洋ワサビペルオキシダーゼ (horseradish peroxidase: HRP) は過酸化水素 (H_2O_2) と色素などのメディエーターとの酸化反応を触媒する酵素であり、臨床検査において二次反応によく用いられる。たとえば、悪玉コレステロールと呼ばれる LDL-C の分析においては、LDL コレステロールをコレステロールエステラーゼ、コレステロールオキシダーゼの反応によって生成された過酸化水素と色素からペルオキシダーゼの反応によりキノン色素を生成することにより、分光光学的分析を可能にしている。

HRP は市販されているもののほとんどが西洋ワサビから抽出、精製されたものである。また、西洋ワサビは HRP の複数のアイソザイムを生産するため、可能な限りアイソザイムを分離、除去する必要があるが、その分離は非常に困難である³⁾。アイソザイムを含まない高純度の HRP を生産するため、HRP の組換え発現の検討がこれまでも試みられてきた (表1)。

HRP の組換え発現に関する報告は、1990 年頃からあるが、大腸菌や酵母を用いた場合、その発現量は非常に低いことが確認されている。大腸菌で発現させた場合は封入体を形成するためリフォールディングが必要であり、生産量は 0.34 mg/L とされている⁴⁾。酵母 *Saccharomyces cerevisiae*、*Pichia pastoris* を宿主とした場合には、活性型で細胞外に HRP が分泌生産されるものの、発現量はそれぞれ 0.07 mg/L、1.3 mg/L であることが報告されている^{5,6)}。西洋ワサビと同じ植物であるタバコ培養細胞を用いた場合でもその生産量は 3 mg/L とされている⁷⁾。昆虫細胞を用いた発現では 41.3 mg/L の生産量が報告されているが、細胞組織培養を使用していることから産業生産への適用は困難である⁸⁾。

以上のように HRP の異種タンパク質組換え生産は生産量が非常に低く、産業的な HRP の組換え生産は非常に困難であった。そこで我々は、宿主として *Cryptococcus* sp. S-2 を用い、HRP の組換え生産を可能とするため各種検討を行った。

表1. HRP の組換え生産に関する報告

宿主	生産量 (mg/L)	文献
<i>Escherichia coli</i>	0.34	(4)
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	0.07	(5)
<i>Pichia pastoris</i>	1.3	(6)
<i>Nicotiana tabacum</i>	3	(7)
<i>Spodoptera frugiperda</i>	41.3	(8)

コドン最適化の効果

Cryptococcus sp. S-2 は酵母の中でも担子菌系の酵母に属しており、DNA の G+C 含量比率は 67% と比較的 G+C 含量比率が高い酵母である。これまでに、*Cryptococcus* sp. S-2 を用いた各種ラッカーゼの組換え発現検討において、*Trametes versicolor* や *Gaeumannomyces graminis* 由来のラッカーゼが *Pichia pastoris* よりも *Cryptococcus* sp. S-2 での発現量が高いことが示されている⁹⁾。*T. versicolor* と *G. graminis* 由来のラッカーゼ遺伝子の G+C 含量はいずれも 60% 以上であることから、*Cryptococcus* sp. S-2 においては G+C 含量が高い配列が発現しやすい可能性が示唆されている。一方で、西洋ワサビペルオキシダーゼのアイソザイムの一つである HRP-C1a の遺伝子配列の G+C 含量は 43.7% と比較的 G+C 含量が低く発現が困難であると予測された。そこで、*Cryptococcus* sp. S-2 で強力に発現することが確認されているキシラーゼ、アミラーゼ、クチナーゼのコドン使用頻度を参考にコドン最適化 HRP-C1a 遺伝子を全合成し、発現検討に用いた。コドン最適化 HRP 遺伝子 ((HRP+CTP)/opt) の G+C 含量は 63.9% であり、G+C 含量は *Cryptococcus* sp. S-2 の G+C 含量とほぼ同等とした。

野生型 HRP-C1a 遺伝子 ((HRP+CTP)/ntv) とコドン最適化 HRP-C1a 遺伝子 ((HRP+CTP)/opt) を *Cryptococcus* sp. S-2 の発現ベクター pCsUX2 のキシナーゼプロモーターの下流に挿入し、ウラシル要求性変異株である U-5 株を形質転換した。得られた形質転換体それぞれ 8 株を培養し、HRP の生産量を評価した。その結果、野生型 HRP-C1a 遺伝子を導入した形質転換体からは HRP 活性が検出されず、コドン最適化 HRP-C1a 遺伝子を導入した 8 株すべてで HRP 活性が検出された (図 1a)。続いて、コドン最適化による HRP 発現量の劇的な向上の原因について調べた。

まず、24 時間培養した菌体から mRNA を抽出し、HRP-C1a の ORF 内の、5' 側および 3' 側をターゲットとして RT-PCR を行った。RT-PCR の結果、(HRP+CTP)/opt 導入株では 5' および 3' 側で高い転写量が確認されたのに対し、(HRP+CTP)/ntv 導入株では 5' 側の転写量は (HRP+CTP)/opt に比べて約 9700 分の 1 程度と非常に低く、3' 側はほとんど転写されていないことが明らかとなった (図 1b)。本結果から、mRNA の転写量がコドン最適化によって大幅に改善されていることが示唆された。

次に、3'RACE によって poly(A) の付加部位を調べたところ、得られた 16 クローンすべてで (HRP+CTP)/opt 導入株ではキシナーゼターミネーターで poly(A) が付加された、完全長の mRNA が合成されているのに対し、(HRP+CTP)/ntv 導入株では 16 クローンすべてでストップコドンより上流の ORF 内部に poly(A) が付

加され、ORFが途中で切断された不完全なmRNAが合成されていることが確認された(図2)。

コドン最適化は一般的に転写後の翻訳効率を向上させることが目的とされているが、元来、遺伝子のGC含量の高い*Cryptococcus* sp. S-2に連続したATを有する外来遺伝子を導入した場合にはpoly(A)付加が起りやすく、異種タンパク質発現を困難にしていると考えられる。Poly(A)付加のメカニズムは酵母、植物、哺乳類

でそれぞれよく研究されており、酵母*Saccharomyces cerevisiae*においては、ターミネーター領域に存在するUA-rich enhancer element (EE) とA-rich positioning element (PE) が、Hrp1p, Rna15, cleavage factor Iによって認識され、PEの10-30塩基下流に位置するpoly(A) siteにpoly(A)が付加されている^{10,11}。酵母におけるこれらの配列は、EEがUAUUAUA, PEがAAUAAAもしくはAAAAAA, poly(A) siteでは(C/T)(A)nが高頻度で出現するモチーフとされている。Poly(A)付加シグナルの認識機構は哺乳類、植物でも存在しているが、認識配列はそれぞれ異なっている。*Cryptococcus* sp. S-2のキシラーゼターミネーター配列中には酵母と同じpoly(A)-site配列(CAAA)が存在し、コドン最適化HRP-C1a遺伝子導入株ではほとんどのmRNAがこのpoly(A)-siteでpoly(A)付加されていた。さらにpoly(A)-siteの50塩基上流にEE様配列(UAUGUA)が確認された。野生型HRP-C1a遺伝子導入株のpoly(A)付加部位に特定の認識配列を見いだすことができなかったが、(HRP+CTP)/ntvのG+C含量は43.7%と比較的AT-richであり、ORF内部にも連続したAT-rich配列が存在している。酵母においてpoly(A)付加はUA-rich, A-rich配列を認識して開始させることから、*Cryptococcus* sp. S-2においては外来のAT-rich配列をpoly(A)付加シグナルとして誤認識し、poly(A)付加が起こってしまう可能性が考えられる。一方で、植物中でのHRP-C1aのmRNAの発現については、完全長のmRNAの発現が認められていることから、poly(A)付加といった、生物共通のシステムにおいて、生物間、さらには酵母間でも異なるルールがあることを示している¹²。

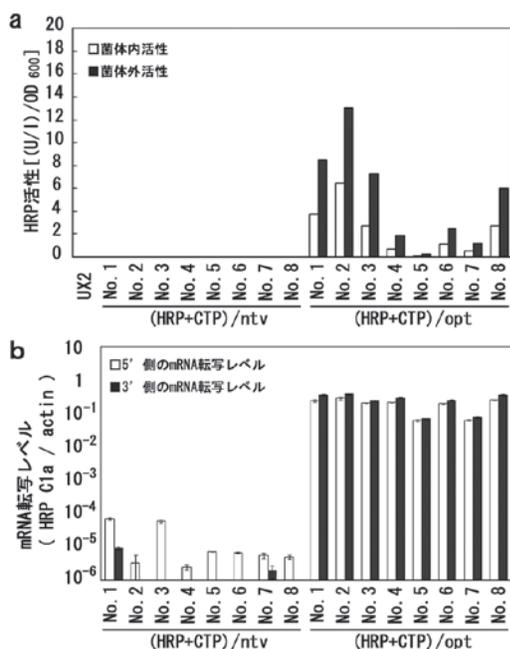


図1. HRP発現におけるコドン最適化の効果。(a) 培養液のHRP生産量。(b) mRNAの転写レベル。

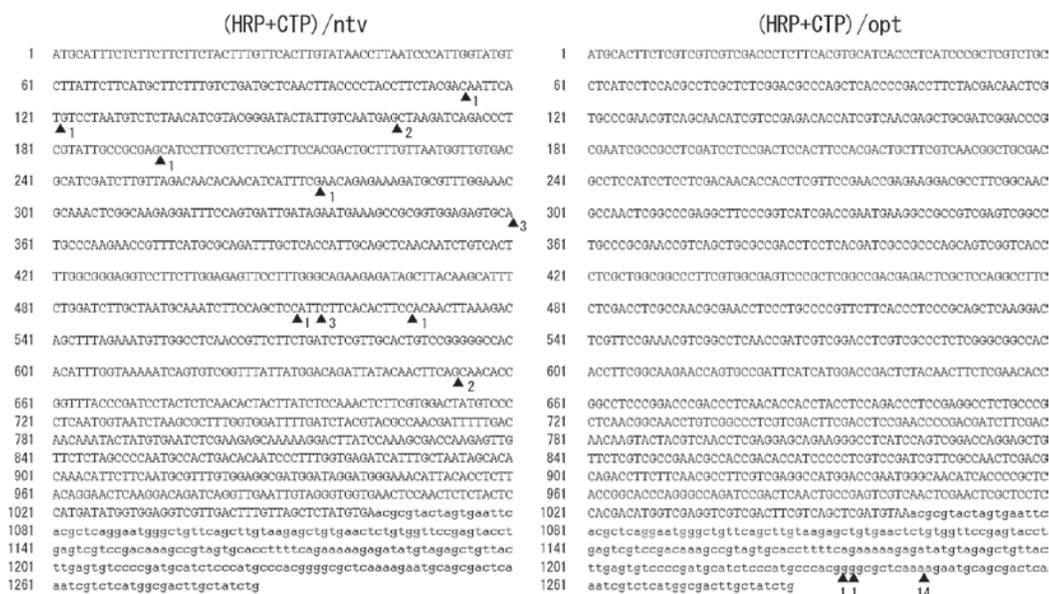


図2. Poly(A)付加部位の解析。▲はpoly(A)が付加されていた位置を示し、数字はその位置でpoly(A)が付加されていたクローン数を示す。

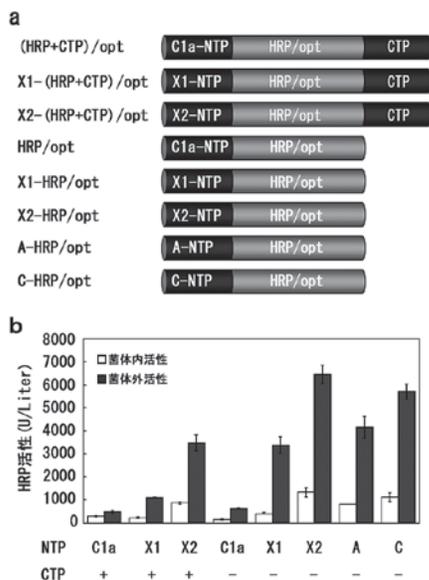


図3. シグナル配列の最適化。(a) 作製したシグナル配列置換コンストラクト、(b) 各コンストラクト導入株のHRP生産量。

poly(A)付加に関与する認識配列は生物種によって異なっており、*Cryptococcus* sp. S-2では植物とは大きく異なるpoly(A)付加配列が存在していると考えられる。これらの結果は、新たな酵母を異種タンパク質発現のホストとする場合に、この違いを考慮する必要があることを示している。

分泌シグナルの置換と流加培養

HRPの生産量をさらに向上させるため、分泌シグナルの最適化を行った。HRPにはN末端に分泌シグナル(NTP)が、C末端には液胞滞留シグナル(CTP)がそれぞれ存在することが報告されている^{7,13}。NTPについては*Cryptococcus* sp. S-2由来のシグナルへの置換を検討した。使用した分泌シグナルは、*Cryptococcus* sp. S-2が生産するキシラーゼ由来NTP(X1-NTP, X2-NTP)、クチナーゼ由来NTP(C-NTP)、アミラーゼ由来NTP(A-NTP)をそれぞれ検討に用いた。

キシラーゼ由来のNTPについては、シグナル配列の切断部位が2か所予測されたため、開始メチオニンから23アミノ酸の配列までを用いたものをX1-NTP、17アミノ酸の配列を用いたものをX2-NTPとした。C末端に存在する液胞滞留シグナルは分泌生産の障害となる可能性が考えられたため除去を検討した。合計で8種類の遺伝子コンストラクトを作製し、各形質転換体8株について評価を行った(図3a)。

Cryptococcus sp. S-2の組換えは染色体相同組換えで行われるため、遺伝子の挿入箇所によって発現量に変化する。そこで、形質転換体8株の内、もっとも生産性が高い株を1株選抜して比較を行った。評価の結果、NTP

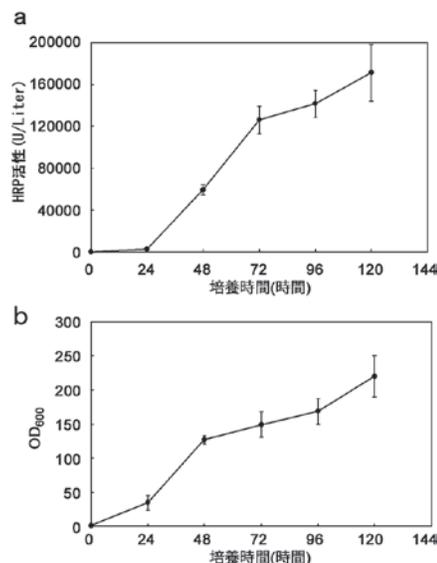


図4. 流加培養によるHRPの生産。(a)は培養液上清のHRP活性、(b)は菌体量(OD₆₀₀)をそれぞれ示す。

をXyalanse由来のX2-NTPに置換し、CTPを除去したコンストラクトを導入した形質転換体もっとも高い生産性を示し、HRPの発現量は13.2倍に向上した(図3b)。また、mRNAの転写量はすべてのコンストラクトでほぼ同等であった。以上の結果から、遺伝子のコンストラクトを改変することで、転写後翻訳、分泌の経路が効率化したものと考えられる。

続いて、ジャーファメンターを用いて、キシロースを連続的に添加する流加培養について検討を行った。培養の結果、培養120時間で菌体濃度は220(OD₆₀₀)に達し、培養液上清のHRP活性は171,000 U/Lに達した(図4)。

この時のHRPの生産量は精製酵素の比活性から計算して約110 mg/Lの生産量であった。

この生産量は、これまでに論文などで報告されたレベルよりはるかに高いレベルであり、*Cryptococcus* sp. S-2はタンパク質の異種発現宿主として非常に優れていることを確認した。また、本研究によって*Cryptococcus* sp. S-2による異種タンパク質の組換え発現において、コドンの最適化、分泌シグナル配列の最適化、キシロース連続添加による高密度培養が有効であることを確認した。

組換えHRPの評価

Cryptococcus sp. S-2で組換え生産されたHRPを、限外ろ過、疎水性相互作用クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィーによって精製し、精製酵素標品を取得した。得られた精製酵素について市販のHRP2種と特性比較を行った。市販のHRPにはSIGMA社から販売されているType XIIと、東洋紡から販売されているPEO-131を使用した。

酵素特性として比活性、 K_m 、 V_{max} と、ヘム含量の指

標となるRZ (Reinheitszahl) 値 (A_{403}/A_{275}) を算出したところ、比活性、 K_m 、 V_{max} はPEO-131とはほぼ一致した(表2)。RZ値については、市販品が3.1~3.3であるのに対し、組換えHRPは2.7とわずかに低い値となった。酵素の特性としては、ほぼ市販品と同等であると考えられる。

SDS-PAGEを行ったところ、市販品のHRPの分子量は40,000~45,000程度であるが、組換えPEOの分子量は45,000~55,000となり、やや分子量が大きい結果となった(図5)。また、N型糖鎖をEndo Hによって消化したところ、組換えHRPの分子量は約37,000程度まで低下したことから、組換えHRPにはハイマンノース型の糖鎖が結合していることが示唆された。

以上の結果から、*Cryptococcus* sp. S-2によって組換え生産されたHRPは市販のHRPと比較して糖鎖組成の違いにより分子量に差が認められるが、ほぼ同等の特性を有していることが確認された。

おわりに

Cryptococcus sp. S-2によるHRPの組換え発現の事例において、コドン最適化による非特異的poly(A)付加の抑制が、異種組換え発現達成のための最大のブレークスルーであった。HRPの*Cryptococcus* sp. S-2による異種タンパク質発現においては、セントラルドグマのもっとも初期段階の転写において、その発現が抑制されていたことになる。

表2. HRPの特性比較

HRP	U/mg-protein	RZ	K_m (H_2O_2)	V_{max} (U/mg)
PEO-131	1664	3.3	153	2102
Type XII	1314	3.1	111	1368
Recombinant	1569	2.7	155	2111

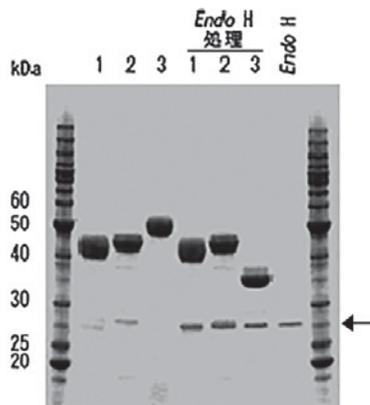


図5. 組換えHRPの分子量と糖鎖分解。1は東洋紡社製PEO-131、2はSIGMA社製Type XII (いずれも植物由来)、3は組換えHRP。矢印はN型糖鎖除去に用いたEndo Hのバンドを示す。

麹菌*Aspergillus oryzae*におけるダニアレグエン (Del f7) の組換え発現の検討においても、野生型の遺伝子を導入した場合、ORF内部でpoly(A)付加が起こり完全長のmRNAが合成されないことが徳岡らによって報告されている¹⁴⁾。また、コドン最適化が非特異的なpoly(A)付加を抑制し、麹菌でのDel f7の発現量を向上させることが同論文で報告されており、異種タンパク質発現において完全長のmRNAが転写されるようにDNAを設計する必要がある。

外来のDNAを発現させる場合には、DNAの転写、翻訳だけでなく、その後のフォールディングや補酵素の結合、輸送などのプロセスがすべて達成される必要がある。異種タンパク質発現が達成されることは非常に稀なケースと考える。コドン最適化によって発現の可能性は向上するが、どんなタンパク質でも発現可能な完璧な宿主はなく、発現させるタンパク質に適した宿主を選択する必要がある。

Cryptococcus sp. S-2は担子菌系の酵母に属しており、*Pichia pastoris*や*Saccharomyces cerevisiae*などの子囊菌系の酵母とはG+C含量や糖鎖組成などの特性が大きく異なる。そのため、子囊菌系酵母とは異なる、新たな異種タンパク質発現宿主として*Cryptococcus* sp. S-2利用の可能性があると考える。

Cryptococcus sp. S-2の研究がさらに進み、本菌が異種タンパク質発現の宿主として広く利用されることを期待したい。

謝 辞

本研究を進めるにあたり終始ご助言とご指導いただきました家藤治幸先生に感謝いたします。また、研究の推進に協力いただきました東洋紡株式会社の関係各位に厚くお礼申し上げます。

文 献

- 1) Iefuji, H. *et al.*: *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **58**, 2261 (1994).
- 2) Masaki, K. *et al.*: *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **93**, 1627 (2012).
- 3) Shannon, L. M. *et al.*: *J. Biol. Chem.*, **241**, 2166 (1966).
- 4) Smith, A. T. *et al.*: *J. Biol. Chem.*, **265**, 13335 (1990).
- 5) Morawski, B. *et al.*: *Protein. Eng.*, **13**, 377 (2000).
- 6) Morawski, B. *et al.*: *Biotechnol. Bioeng.*, **76**, 99 (2001).
- 7) Matsui, T. *et al.*: *J. Biosci. Bioeng.*, **102**, 102 (2006).
- 8) Hartmann, C. *et al.*: *Arch. Biochem. Biophys.*, **297**, 61 (1992).
- 9) Nishibori, N. *et al.*: *J. Biosci. Bioeng.*, **115**, 394 (2013).
- 10) Leeper, T. C. *et al.*: *J. Mol. Biol.*, **401**, 334 (2010).
- 11) Chan, S. *et al.*: *Wiley. Interdiscip. Rev. RNA*, **2**, 321 (2011).
- 12) Fujiyama, K. *et al.*: *Eur. J. Biochem.*, **173**, 681 (1988).
- 13) Matsui, T. *et al.*: *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **62**, 517 (2003).
- 14) Tokuoaka, M. *et al.*: *Appl. Environ. Microbiol.*, **74**, 6538 (2008).