

担子菌酵母クリプトコッカスを用いた 異種タンパク質発現系

正木 和夫¹・家藤 治幸²

はじめに

今回は、微生物による異種タンパク質発現系についての特集を組むということで執筆依頼をいただいた。2016年の生物工学会誌の特集で、多様な酵母の可能性の一つとして、ここで紹介するクリプトコッカスの発現系を用いたペルオキシダーゼの発現について紹介させていただいている¹⁾。今回は、総論的な視点で、担子菌酵母クリプトコッカスを用いた異種タンパク質発現系について情報提供を行いたい。

1986年発行の文献に純度100%のインターフェロンが生産できれば、1gで300億円くらいになるという記事があり、筆者（正木）が大学生の頃、異種タンパク質生産の産業的な魅力を感じたことがある。それから30年ほど経ち、インターフェロンのみならず、いろいろなタンパク質が、異種タンパク質発現系を使って生産されてきた。その目的は、産業的に価値のあるタンパク質生産に限らず、タンパク質の配列と構造、機能の解析ツールとしても利用されている。筆者（正木）が大学院でタンパク質の構造安定性の研究を行っていた際に用いていた発現系は、当初は大腸菌であった。研究が進むにつれ、N末端につく開始コドン由来のメチオニンがそのターゲットとするタンパク質の構造安定性を大きく低下させることが判明した。タンパク質安定性に対して配列内部のアミノ酸置換の影響を調べたいのに、本来つくはずのないN末端のメチオニンのせいでタンパク質の安定性が下がり、解析に苦労した記憶がある。その後、メタノール資化酵母を用いた発現系でも、分泌タンパク質のN末端に、切断されるはずのプロ配列が一部残ったことで、安定性評価が難しくなるため、かなり厳密に精製を行い、N末端に4残基のみ余計についた分子種を取り除くことに難儀した記憶がある。タンパク質研究において、遺伝子工学的技術の適用が当たり前の現在において、異種タンパク質発現を行うと、時として思い通りにはならない現象に直面し、「DNA→RNA→タンパク質」のセントラルドグマの行間に潜む多彩な仕組みに、いつも感心させられるのである。

発現系の選び方

あるタンパク質を発現しようとして、どのようにして宿主を選ぶだろう。それぞれの研究者の経験から実績のある発現系を選択する。または、発現させたいタンパク質の本来の生産細胞に近い宿主を選択するという研究者もいるだろう。まずは、ツールの揃っている大腸菌から始める研究者もいるかもしれない。その一回目のトライで発現が見られない場合は、どうするか。宿主の株を変えたり、導入する遺伝子のコドンを変えたり、培地や培養条件を変えることもあるだろう。大腸菌がダメなら、枯草菌、酵母、カビといった宿主を変えていくことも可能である。現在では、無細胞系という選択肢もある。

そこで、気づくのは、同じ遺伝子を導入しても、発現量が宿主によって全然違う場合があるということである。その現象は、私としては、経験上十分承知しているが、それぞれに統一された理由があるわけではないことも学んできた。発現系をいくつか試して、そのうちのどれかで目的のタンパク質を必要量確保できれば、発現量の低かった発現系についてそれ以上考える必要はないので、そこを深追するよりは、得られたタンパク質についてより深く調べることに、さらに発現量を伸ばすことに時間を割くのが本来の時間の掛け方だろう。筆者らは、*Pichia pastoris*を宿主とした場合、分泌シグナルをいろいろ変えれば、発現量が変わることを調べていたこともあったが²⁾、その酵母にそれほど思い入れがあるわけではないので、それ以上の追及は行っていない。必要量のタンパク質が手に入れば良いのである。大腸菌でもペリプラズムに発現させれば、N末端のシグナル配列部分が切除されたポリペプチド鎖が得られることや、麹菌ではプロテアーゼの破壊株を用いると、生産されるタンパク質の分解が抑制され、生産量が向上することも経験している。どの微生物も、異種タンパク質発現宿主としての可能性を十分感じさせる。しかし、微生物には、とてつもない数の種類があり、どの微生物にどれほどの時間をかけて研究できるかの判断は、思いの強さとそれを許す環境なのかもしれない。

今回紹介するクリプトコッカス sp.S-2(以下S-2株)は、

著者紹介 ¹岐阜県産業技術センター（部長研究員） E-mail: masaki-kazuo@rd.pref.gifu.jp

²愛媛大学（客員教授）

オリジナルの新規酵母であり、当初は魅力的な酵素を生産する酵母として研究が始まった³⁾。その後、それら酵素を大量に用意するための宿主として、既存の異種タンパク質発現系をいくつか試したのち、本来の酵素生産のためには、その酵母、すなわちS-2株が宿主としてふさわしいのではとの視点から、宿主発現系としての可能性を試すに至った。その目論見は、うまくいき、高密度培養により1リットル当たり数グラムの生産が可能であった。その後、S-2株由来の酵素以外の異種タンパク質の発現についても検討し、GC含量の高い遺伝子を有するタンパク質の発現に効果がありそうなことなどが明らかとなってきた⁴⁾。現在では、目的タンパク質の遺伝子のコドン最適化し全合成することは難しくない。S-2株での発現のためには、コドンの最適化が有効であることは、これまでに分かっているが、その効果は、意外なことに、予想される翻訳効率の向上ではなく、mRNA中のタンパク質コード領域へのpolyA付加の抑制効果であった。詳細は、既報をご覧ください^{1,5)}。

S-2株による発現系の特徴

まずは、宿主であるS-2株の安全性については、これまでも記述してきたとおり病原性はなく、マウスを用いた急性毒性試験でも毒性はみられていない。37°Cの人間の体温付近では生育できず、通常は25°Cを基本に培養を行っている。培地については、一般的な最小合成培地から、半合成培地まで適応可能だが、YPD程度の富栄養な培地では生育が抑えられるようである。通常は、YM培地を用いているが、遺伝子導入時の形質転換体の選択には後述のマーカースに対応した最小培地を利用する。また、1リットルあたり数グラム以上の目的タンパク質を生産しようとする、高密度培養が必要となり、そのためには、炭素源と窒素源を連続的に供給する流加培養を行っている。その際は、*P. pastoris*の流加培養を参考に、培地組成を少し変更して利用している。高密度培養時は、ジャーファーマンターを用いる培養となり、炭素源の供給速度は溶存酸素量の数値を指標にコントロール (DO-stat) し、窒素源は通常はアンモニア水溶液を使用し、消費に伴うpHの低下を補う形でアンモニア水溶液を自動で供給している (pH-stat)。この方法で、菌体密度は、湿菌体で50%を超えることも可能であるが、菌体密度を上げ過ぎれば回収できる培養液中のタンパク質濃度は高くなる一方、回収できる培養液上清量が少なくなるため、双方の兼ね合いを見据えた密度設定が必要であろう。

次に、異種タンパク質の遺伝子導入について紹介す

る。基本的には、目的タンパク質の遺伝子は、S-2株の染色体に組み込まれる。プロモーター、ターミネーター、栄養要求性相補遺伝子を有する大腸菌用のプラスミドを構築しており、まず、目的遺伝子をこのプラスミドのプロモーター下流に組み込んだ後、数 μg のプラスミドを準備し、直鎖状に制限酵素で処理したのちに、エレクトロポレーションにてS-2株の栄養要求性株に導入する⁶⁾。プロモーターとしては、主にキシロースで誘導されるキシラナーゼプロモーターを利用している。S-2株は、キシロースを単一炭素源として生育可能であるので、高密度培養時の流加炭素源は高濃度キシロース水溶液であり、生育、誘導のどちらにも利用される。マルトースを炭素源にするとこのキシラナーゼは誘導されず、生でんぶん分解酵素 (アミラーゼ) が発現誘導され、油脂 (トリグリセリド) を炭素源とする場合はリパーゼ活性を示すクチナーゼ様酵素が発現誘導される。したがって、これらプロモーターも利用可能であるが、現在のところ、キシラナーゼプロモーターで良い結果を積み重ねている。また、恒常的発現のためのプロモーターとして、translation elongation factor 1aプロモーターが利用できることを確認しており、非誘導型の発現も可能である。上記のキシラナーゼ、アミラーゼ、クチナーゼ様酵素は、すべて分泌酵素であるが、各条件でのみ発現され、SDS-PAGEでは、それぞれ単一のタンパク質のみが分泌されているように見える。培養液中の夾雑タンパク質が少ないことも酵母の分泌発現系の特徴であり、異種タンパク質の分泌生産後の回収、精製が容易である点が利点である。

遺伝子導入の際の選択マーカースとしては、S-2株のウラシル要求性株に対して、それを相補するオロチジン酸ホスホリボシルトランスフェラーゼをコードする *URA5* 遺伝子を用いている。*Saccharomyces cerevisiae*では、このオロチン酸からオロチジン5リン酸の経路は二つの遺伝子が関与し、*S. cerevisiae*のウラシル要求性株はその次のステップを触媒するオロチジン5リン酸デカルボキシラーゼをコードする *URA3* 遺伝子の欠損株が用いられるが、S-2株ではおそらく前者の経路を触媒する酵素遺伝子は、*URA5* 遺伝子のみであると予想している。そのほか、アデニン要求性株と *ADE1* 遺伝子の組合せも可能である。栄養要求性株を利用しない場合でも、亜リン酸デヒドロゲナーゼ遺伝子を用いた形質転換も可能であることを確認している。複数マーカースの存在は、遺伝子破壊と、遺伝子導入を同時利用したい場合に必要となる技術となる。また、たとえば、遺伝子破壊により一度利用したマーカースの引き抜きに有効な pop out システムも有効に

機能することも明らかとなっている⁷⁾。

外部から導入されたタンパク質発現遺伝子カセットが導入される染色体上の位置は、多くの場合特定していないが、非相同末端結合 (non-homologous end joining: NHEJ) によるものと考えている。また、これまでの経験では、高発現株の多くは複数の遺伝子カセットの導入が確認され、タンデムに同じ染色体位置に導入されている場合が多いようである。一方、キシラナーゼプロモーター下流に目的タンパク質の遺伝子をつなげた発現カセットを用いた場合、染色体のキシラナーゼプロモーターの位置に導入される場合も観察されるが、その頻度は高くない。しかし、この位置に導入された場合は、キシラナーゼ自体の発現は行われなため、分泌タンパク質のほとんどは、目的の異種タンパク質であり、その後の精製には有効であろう。NHEJを解消するためには、関連する遺伝子を破壊することが有効であることが知られているが、本酵母でもku70ホモログ遺伝子を破壊することで、相同組換え効率が向上することがわかった。

S-2株によるタンパク質発現例と今後の課題

ここからは、これまでのタンパク質発現例の一部と今後の課題について記述したい。先に述べたように、S-2株は、ユニークな酵素のプロデューサーとして見いだされ、それら酵素の研究が行われていた。その中で、クチナーゼ様酵素 (cutinase like enzyme: CLE) は、エステル合成反応やポリエステル分解に有効であることが明らかとなり、その酵素の大量生産のための宿主として利用が始まった⁶⁾。最初の試みでは、キシラナーゼプロモーター下流にCLE遺伝子を配し、URA5遺伝子をマーカーとし、エレクトロポレーションにてこの遺伝子カセットを導入した。この酵素は菌体外に分泌生産されるが、その活性が高い形質転換株を選抜すると、複数の遺伝子が染色体に組み込まれている株であった。したがって、マルチコピーで目的遺伝子が組み込まれた株を選抜することが高生産株を構築するうえで重要であった。キシラ

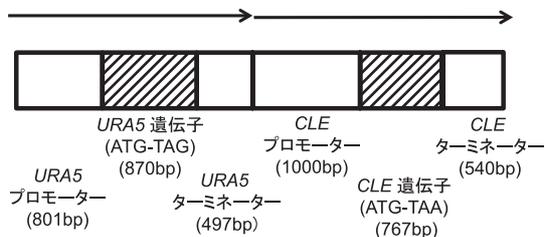


図1. CLE発現用遺伝子カセット (セルフクローニング)。外来遺伝子を含まない遺伝子カセットを、エレクトロポレーションにてS-2株へ導入。非特異的に染色体へ組み込まれる。

ナーゼプロモーターとキシロース水溶液の流加培養の組み合わせでは、1リットルあたり数グラムのCLEの生産が可能であったが、ある時点で急激に培養液中のCLE活性が低下する現象が見られ、細胞外のプロテアーゼの影響が予想された。今のところ、このCLEの分解に寄与しているプロテアーゼは明らかではないが、その探索過程において、S-2株は、ユニークな配列を有するアスパラギン酸プロテアーゼを生産することが明らかとなった⁸⁾。このプロテアーゼの発現誘導についての詳細な検討は行っていないが、構成的に発現されているわけではなく、バッチ培養では、比較的培養初期に発現しているようである。

さらに、CLEを生産する場合、すべての遺伝子資源がすべてS-2株由来なので、セルフクローニング株の作製も可能である。URA5遺伝子、CLE遺伝子 (プロモーター、ターミネーターを含む) を直列につないだ遺伝子カセット (図1) を作製し、エレクトロポレーションによる遺伝子導入と高発現株の選択を行ったのち、先に述べたDO-stat, pH-statによる流加培養を行うと、図2のような結果が得られた。最終的に得られた培養液上清のCLE濃度は、約20 g/Lであった。この検討では、かなり長期の流加培養を行っているが、途中、培養液中のCLE活性の急激な減少は見られず、安定的に目的タンパク質が蓄積されている。

次に、もう一つ、S-2株のプロテアーゼに関する検討を紹介する。S-2株は、本菌が保有するセルラーゼをキシラナーゼプロモーター制御下で組換え発現させることにより、約7 g/Lのセルラーゼを生産することができる⁹⁾。そこで、このセルラーゼの高機能化を目指し、C末端に

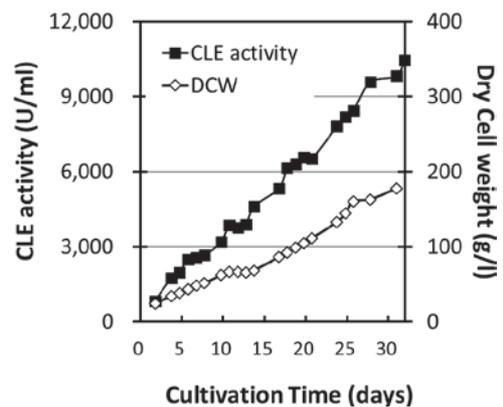


図2. CLE高発現セルフクローニング株の流加培養。3L容量ジャーファーマンターでの培養。初発培地量1.5 L。pH; 5.5 ± 0.1 (14% NH₃にて制御)。トリオレインの連続的供給により菌体生育とCLEの誘導発現を行う。培養温度25℃。空気供給量3 L/min。

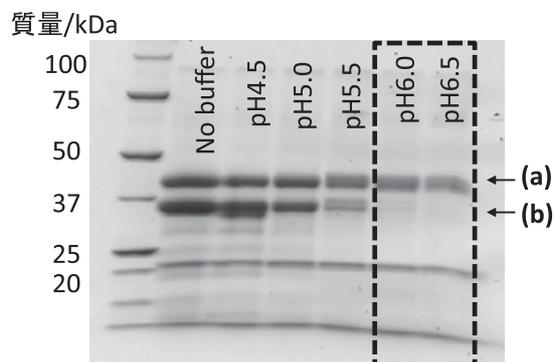


図3. セルロース結合ドメイン (CBD) 融合セルラーゼを発現する組換えS-2株培養液のSDS-PAGE. 1レーンあたり10 μ Lの培養液上清を使用. (a) CBD融合セルラーゼ, (b) CBDの一部が切断されたセルラーゼ. 緩衝液により, 培地pHを制御した結果, pH 6.0, pH 6.5では, 切断が抑制される.

セルロース結合ドメイン (CBD) を融合した組換えタンパク質を設計し, 同様に発現させたところ, プロテアーゼの影響と思われる現象が確認された. 培養液上清のSDS-PAGEおよびN末端配列解析を行うと, 図3 (No bufferのレーン) に示すように, 発現した組換えセルラーゼの一部 (約半分量) のC末端領域が切断されていることが明らかとなった. 培地に緩衝液を加え, 培養中のpHを4.5~6.5の範囲で制御した場合, pH 6.0および6.5において, その切断は抑制された (図3). ジャーフアーメンターでpH 5.0または6.5に制御した場合, pH 6.5で制御した場合のみ切断は確認されなかった. それに関わるプロテアーゼの実体については, 現在のところ明らかではないが, 酵母菌体を取り除いた培養液上清を各温度で保存しても切断が進まないことから, この切断は細胞外に分泌された後ではなく, 細胞内での分泌過程で生じる現象であると予想している. また, 発現したすべてのセルラーゼではなく約半分量のみが分解されている. このことについては, 発現量と分泌までの細胞内トラフィックの空間的, 時間的な関係について, 興味を持たれるところである. 細胞外のpHの影響が細胞内のプロテアーゼの発現にどう影響を与えているのかも今のところ明らかではないが, 目的タンパク質の発現の際, 培養液のpHコントロールも重要な条件であるようだ.

その他, 培養中に生産される非タンパク質性の副産物の低減変異株が目的タンパク質の生産や精製プロセスに有効であることも明らかとなっている. この発現系のさ

らなるブラッシュアップに向けて, 特定遺伝子の破壊も可能となってきた. 上記のプロテアーゼの破壊は今後の本発現系の開発のターゲットとなるだろう. しかし, プロテアーゼ破壊の効果は, 基質特異性の関係から, 限定的かもしれない. 安価でシンプルな培地で働く遺伝子群の解析も, 産業利用には重要な情報となるだろう. 一方, 変異処理とスクリーニングを組み合わせた古典的な手法によるタンパク質の高発現に向けた変異株の取得については, S-2株に対して応用の余地もあるように思う.

おわりに

本発現系の歴史は新しく, 上記のような未解決の課題もいくつか存在している. これらについては, 遺伝子工学的なツールも揃ってきたので, 近い将来に解決可能だと考えている. 新たな発現系が, 既知の発現系よりも大量に生産することが可能なタンパク質も存在している. 目的タンパク質と発現系の相性は, 予想することが難しく, 現在のところ, すべてのタンパク質の発現生産に有効な万能な発現系は存在しない. 酵母の異種タンパク質発現系は, 遺伝子操作や培養など取り扱いが容易で, 分泌生産では比較的夾雑タンパク質が少ない魅力的な発現系だと思う. 異種タンパク質発現系は, 発現させる魅力的なタンパク質があって初めてその価値が評価される. そういう意味では, いろいろなタンパク質の発現をトライしながら, 個別の課題解決を繰り返すことで, この発現系はさらに進化できると思う. 魅力的なタンパク質リソースをお持ちの方々に, 選択肢の一つとして本発現系をご検討いただきたいと思います.

文 献

- 1) 歌島 悠, 正木和夫: 生物工学, **94**, 247 (2016).
- 2) 特許5769142号「ピヒア属酵母において異種タンパク質を高分泌させる方法」
- 3) 田村學造ら: 酵母からのチャレンジ【応用酵母学】, p. 57, 技報堂出版 (1997).
- 4) Nishibori, N. *et al.*: *J. Biosci. Bioeng.*, **115**, 394 (2013).
- 5) Utashima, Y. *et al.*: *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **98**, 7893 (2014).
- 6) Masaki, K. *et al.*: *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **93**, 1627 (2012).
- 7) 特開2015-100327「クリプトコッカス属のウラシル要求性の菌株の遺伝子を破壊する方法」
- 8) Rao, S. *et al.*: *J. Biosci. Bioeng.*, **112**, 441 (2011).
- 9) 正木和夫: *Cellulose Commun.*, **17**, 167 (2010).