

学 位 論 文 題 名

Study on methods for improvement of
protein expression in *Saccharomyces cerevisiae*

(出芽酵母においてタンパク質発現を向上させる方法に関する研究)

学位論文内容の要旨

研究や医療・工業生産の舞台で多種多様なタンパク質の生産が必要となっている。医薬品タンパク質については、翻訳後修飾などの点から培養細胞による組換え生産系が主であるが、化成品用等のタンパク質では培養スケールやコストの観点から微生物による組換え生産系が主体となっている。現在大腸菌を宿主として発現されているケースが多いものの、真核生物由来タンパク質の発現において封入体を生じるなどの問題も知られている。

出芽酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)を用いたタンパク質発現系も古くから利用されており、大腸菌では封入体を形成するタンパク質でも可溶性タンパクとして発現できることが多いという利点が知られている。しかしながら、出芽酵母のタンパク質発現系ではタンパク質の発現量が少ないという問題点も知られている。すなわち、出芽酵母のタンパク質発現系において、発現量の向上が重大な課題である。そこで本研究では、出芽酵母におけるタンパク質の発現量を向上させる方法の開発を目指して研究を行った。従来、タンパク質の発現量の向上には、より強力なプロモーターやプロテアーゼ欠損株の利用が試みられてきた。そこで、これらの従来の手法と組み合わせることによってさらに発現量を向上させることが可能となることを考慮して、新しいアプローチによるタンパク質の発現量の向上を試みた。

第一章では、出芽酵母でタンパク質の発現量を増加させる開始コドン上流の配列を探索した。タンパク質の発現量を定める要因としては非翻訳領域(UTR)が重要な因子の一つである。例えば植物に感染するタバコモザイクウイルスは 5' UTR に Ω 配列と呼ばれる翻訳活性化シス配列を有しており、感染した宿主細胞で優先的に 3' 下流の遺伝子を発現させていることが報告されている。しかし、出芽酵母ではこれまでに既知遺伝子中のコンセンサス配列の

統計的解析の報告はあるものの、そのような配列を広範に探索した例は報告はされていない。そこで、レポーター遺伝子として抗生物質ゼオシン耐性タンパク質遺伝子を用い、弱いプロモーターの下で高濃度ゼオシンによる段階的選抜を行うスクリーニング系を新たに構築し、およそ 100 万クローンに相当する形質転換酵母の中から、高濃度ゼオシン耐性の形質転換酵母を獲得することによって、20 種類のゼオシン耐性タンパク質の発現量を向上する配列を決定した。得られた配列より、最終的に、3 アミノ酸が付加されているという共通性が見出された。このタンパク質 N 末端への少数のアミノ酸付加による発現量向上の効果について、アミノ酸数の影響、mRNA 量の測定、他のプロモーターや他のタンパク質における効果など詳細を検討した。その結果、得られた配列を付加する方法は、全てのケースではないものの、タンパク質の発現量向上に有効であることが示された。

第二章では、複数のタンパク質の同時発現およびタンパク質発現量向上のための技術として出芽酵母における multi-cistronic な発現系の開発を試みた。出芽酵母のタンパク質の発現は、通常 mono-cistronic であるが、IRES(internal ribosome entry site) によって連結された 2 つのコード領域の dicistronic な発現や FMDV(foot-and-mouth disease virus)の 2A region によって連結された 1 つの融合コード領域からの 2 つのタンパク質の生産（偽 dicistronic な発現）が報告されている。そこで、3 種類のルシフェラーゼをモデルとして用い、dicistronic な発現を検討した。その結果、FMDV 2A region を用いた場合に 2 番目のコード領域の発現効率が IRES を用いた場合に比べ高いことが示された。さらに、FMDV 2A よりも効率的であることが認められた 2A-like TaV を用いて RLuc と 7 種類のタンパク質との di-cistronic な発現を検討した。その結果、2A-like TaV を利用した di-cistronic な発現系がいろいろなタンパク質に適用可能であることを証明した。さらに、2 種のタンパク質では発現量が向上した。次に、2A-like TaV を利用して、同一のタンパク質の複数同時発現を検討した。ウミシイタケルシフェラーゼおよび xylulose kinase をモデルタンパク質として、2 コピーあるいは 3 コピーのコード領域による偽 multicistronic な発現を試みたところ、コピー数以上の発現量の向上が得られた。

以上、本研究で得られた出芽酵母における発現量を向上させる方法を従来法と組み合わせることでタンパク質を発現させることにより、従来では発現量の少なかったタンパク質においても、より発現量の向上が期待できる。また、これらの方法は、大量発現によく用いられてい

るメタノール資化性酵母 *Pichia pastoris* などの発現系でも同様に発現系改善効果があるので
はと期待している。

学位論文審査の要旨

主 査	客員教授	扇 谷	悟
副 査	客員教授	津 田	栄
副 査	准教授	相 澤	智 康
副 査	教 授	出 村	誠 (生命科学院)

学 位 論 文 題 名

Study on methods for improvement of protein expression in *Saccharomyces cerevisiae*

(出芽酵母においてタンパク質発現を向上させる方法に関する研究)

研究や医療・工業生産の場で多種多様なタンパク質の生産が必要となっている。現在タンパク質発現系としては大腸菌を宿主とした発現系が主であるが、真核生物由来タンパク質の発現において封入体を生じるなどの問題も知られている。一方、出芽酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)を用いたタンパク質発現系も古くから利用されており、大腸菌では封入体を形成するタンパク質でも可溶性タンパクとして発現できることが多いという利点が知られている。しかしながら、出芽酵母のタンパク質発現系ではタンパク質の発現量が少ないという点が大きな問題となっている。

本論文では、強力なプロモーターやプロテアーゼ欠損株の利用などの従来の発現系改善法と組み合わせることが可能な、タンパク質の発現量の向上させる新規技術を開発した。

まず、レポーター遺伝子として抗生物質ゼオシン耐性タンパク質遺伝子を用いたアッセイ系を新規に構築し、およそ 100 万種類のランダム配列から、ゼオシン耐性タンパク質の発現量を向上する配列 20 種類を得た。さらに、得られた配列の共通性を精査し、3 アミノ酸が N 末端に付加されているという共通性を見出した。このタンパク質 N 末端への少数のアミノ酸付加による発現量向上の効果について、アミノ酸数の影響、mRNA 量の測定、他のプロモーターや他のタンパク質における効果など詳細を検討した。その結果、本法は、全てのケースではないものの、試みたタンパク質の多くで発現量向上に有効であることが示された。

次に本論文では、複数のタンパク質の同時発現およびタンパク質発現量向上のための技術として、出芽酵母における multicistronic な発現系の開発を行った。まず、3 種類のルシフェラーゼをモデルとして用いて dicistronic (様) な発現を検討し、FMDV 2A region を用いた場合に 2 番目に相当するコード領域の発現効率が高いことを示した。さらに、2A-like TaV を利用した dicistronic 様発現がいろいろなタンパク質に適用可能であることを証明した。最後に、2A-like TaV を利用して、同一のタンパク質の dicistronic および tricistronic 様発現を試み、コピー数以上の発現量の向上が得られることを確認した。

以上、本論文に記述された研究は、出芽酵母における発現量を向上させる方法として、従来とは異なる技術であるばかりでなく、従来の発現系改善の技術と組み合わせることによってよ

り高い発現量向上が期待される方法であることが示された。

また、タンパク質のN末端への少数のアミノ酸付加によるタンパク質の安定化は、そのメカニズムが将来解明されることにより、より高い効果を得られる方法の開発が期待でき、また元のタンパク質の修飾が最小限で済むという利点も大きいことから、構造解析のためのタンパク質発現などへの波及効果も高いと期待できる。

現在、バイオテクノロジーの利用による、省エネルギーかつ地球環境への負荷の少ないプロセスへの転換に多大な期待が寄せられている。タンパク質の生産性向上はそのプロセス改善への重要なステップであり、本論文の成果が大きく寄与できると期待される。

以上のように重要な成果を挙げた著者は、北海道大学博士（理学）の学位を授与される資格あるものと認める。