博士（理　学）　小金澤　　望

学 位 論 文 題 名

The strategies in over-expression of heterologous protein in methylotrophic yeast *Pichia pastoris*: the selection of secretion signal and the high-density fermentation in lowered pH

（メタノール資化酵母 *Pichia pastoris* による異種タンパク質の大量発現における戦略的手法－分泌シグナルの選択，及び培養槽による低 pH での高密度培養）

学位論文内容の要旨

近年発達目覚ましい遺伝子工学は、タンパク質の物理化学的性質を研究する上でも非常に重要な役割を果たしており、構造生物学分野においては大量発現系の構築という形で威力を発揮する。例として、NMR、X 線結晶構造解析等には多量のサンプルが必要になるが、標的が非常に希少なタンパク質である場合、或いは部位特異的変異導入の必要性があるとき、更には NMR スペクトルの測定の為に ^{15}N-、^{13}C-ラベリングが必要な時に、遺伝子工学による大量発現系の構築が多大に貢献する。

発現系構築に多用される宿主は大腸菌、酵母、バキュロウィルス等多くあるが、酵母は特に十分な発現量と手法上の簡便性を兼ね備えた宿主として使用事例が増加しつつある。種にも依るが多くは菌体外への異種タンパク質の分泌が可能で、且つ微生物培養法において蓄積された知識・手法が流用可能である。

本研究では、近年注目を浴びつつある酵母 *Pichia pastoris* を宿主とした異種タンパク質の発現系の構築を行った。その発現・精製法を種々の目的タンパク質の性質に応じて最適化し、飛躍的な高効率での発現を目指すことを主目的とする。*P. pastoris* はメタノールを単一炭素源として代謝する能力を有する酵母で、この性質を外来異種タンパクの発現に有効利用する為に数々の改良を加えられている。メタノール代謝に関与するタンパク Alcohol oxidase をコードする *AOX1* gene はメタノールの添加によって高レベルに誘導され、その発現レベルは総可溶タンパクの 30%に及び、*AOX1* promoter は目的の外来タンパクを encode した遺伝子の発現における非常に効率的な promoter として利用されている。*P. pastoris* の発現系に於いて発現量を左右するファクターは多種多様だが、本研究では的確な分泌シグナルの選択と、培養槽を用いた高密度培養を駆使して、３種の外来タンパク質の分泌型大量発現に成功した。

【1】脊椎動物・無脊椎動物の c 型リゾチームの *P. pastoris* による発現 ～分泌シグナル選択による戦略

ヒトリゾチーム（分子量約 14000Da）に代表される脊椎動物由来 c 型リゾチームは、多岐に渡る研究分野のモデルタンパクとして研究例は極めて多い。対して昆虫を初めとする無脊椎動物のリゾチームに於ける研究例は非常に少ない。カイコガリゾチームは他の c 型リゾチームと

比してアミノ酸配列相同性が低く、10 残基程度の欠損がある。多くの研究例が報告されているヒトリゾチームとの比較によりカイコガリゾチームへの知見を蓄積することを目的とし、ヒト及びカイコガリゾチームの *P. pastoris* による発現系を構築した。

まず *P. pastoris* の発現系に於いて高効率で異種タンパク質の分泌を促進することで知られる、酵母由来フェロモンα-factor の leader 配列を分泌シグナルに選択した。この時ヒトリゾチームの発現量は 6.4mg/L であったが、カイコガリゾチームの発現量はこの 1/100 程度に留まった。また、双方のリゾチーム共に signal peptidase による消化が不十分である事が示唆された。

続いてα-factor の代わりにそれぞれのリゾチーム由来の分泌シグナル（native signal）配列を選択した。α-factor 選択時とは逆転して、このときカイコガリゾチームは 1.1mg/L、ヒトリゾチームはその 1/30 以下であり、SDS-PAGE 等の結果全て単一分子種であった。

後者の native signal による発現系を利用することで、得られた recombinant カイコガリゾチームを用い DSC による熱安定性考察、及び X 線結晶学による構造解析が可能になった。PNP-$(GlcNAc)_5$ を基質とした活性測定において、基質への結合部位がニワトリ卵白リゾチームと異なることが証明された。更に DSC により、カイコガリゾチームの熱安定性は多くの脊椎動物由来 c 型リゾチームと比較して例外的に低く、N 末端への余剰残基付加により更に低下する事が明らかになった。これらの結果から“カイコガリゾチームの熱安定性は N 末端へのα-factor leader 配列の付加により更に低くなり、分解されやすくなった”ことが上に述べた発現量の逆転の原因である可能性が示唆された。また、カイコガリゾチームの native signal を付加したヒトリゾチームの発現系において発現量の向上が見られなかったことは、カイコガリゾチーム native signal がリゾチームの発現量を増加させたのではないことを示しており、このことからも前述の仮定が支持された。

尚、構築されたカイコガリゾチームの発現系に於いて、培養槽を用いた連続培養を適用し、さらなる高発現を得た。連続培養の概要及びその利点については次の section で詳しく述べる。

【2】 昆虫由来サイトカイン Growth blocking peptide (GBP) の大量発現系の構築 ～高密度培養と pH 調整による戦略

Growth blocking peptide (GBP)はアワヨトウ蛾に由来する 25 残基より成る幼若ホルモン分解酵素活性阻害ペプチドであり、寄生後に宿主体内でその濃度が上昇して宿主の成長及び蛹化を妨げる。数 nM の GBP を昆虫体内に inject することで宿主の成長を妨げることが確認されている。ごく最近、低濃度（数 pM 程）の GBP は、その本来の活性に反して昆虫培養細胞(Sf9)・ヒト培養細胞双方に対して細胞増殖活性があり、上皮増殖因子(EGF)の一部と似た立体構造を持ちヒト EGF レセプターに結合すること、及び血球細胞活性化活性（PSP 活性）、麻痺活性等があることが解明された。これより GBP は多機能の新規サイトカインであると言える。*P. pastoris* により細胞生物学・医学・薬学分野と広い分野に於いて非常に興味深いこの GBP の発現を試みた。

分泌シグナルにα-factor を用い、当初 shaking flask による培養を行った。50mL の菌液上清を濃縮後、逆相 HPLC で精製した。発現量は、ELISA の結果によれば極めて微少であり、更に GBP は極めて幅広い fraction に渡ってブロードに溶出しており、高収率での回収は困難であった。分子量 2783Da と比較的低分子である GBP は、培養中に酵母の副産物である neutral protease 等で分解された可能性が考えられる。

発現量向上のため、続いては培養槽を用いる発現を試みた。培養槽は前述のカイコガリゾチームの発現に於いても用いた方法であり、その主な利点は連続的な培地の投入と高効率の airing pump を用いることで shaking flask 使用時では不可能な極めて高い菌体濃度を実現・維持できる事、系の pH を一定値に保てる事にある。本実験では、更に漕内 pH を 3.0 と酸性側に保ち、且つ誘導開始後 48 時間で全量を回収する事等、GBP の分解を防ぐ為の様々な改良を加えた。

Shaking flask の培養時と同様に逆層 HPLC で精製を行った。2 回の逆層 HPLC で溶出された

メインピークは一見シングルピークだが、マススペクトルにより分子量 2783Da、及び 2671Da の混合物であることが確認された。2783Da の分子種は wild type と同等のものであると考えられる。この 2 種の分子種を分離するために、メインピークを更に 3 回目の逆相 HPLC に通した。3 回の HPLC は全て異なるカラムを用い、最終的に 2 種のピークの分離に成功した。

最終的に分離した 2 本のピークのマススペクトルによる解析を行った。それぞれの分子量は 2784Da, 及び 2671Da であり 2 種の分子種の完全な分離を確認した。2783Da の分子種に関しては N 末端解析及び PSP 活性測定を行い、正しい立体構造を持つ GBP であることが確認された。

尚、本実験における GBP の最終収率は、逆相 HPLC の elution pattern よりおよそ 50mg/L と計算された。25 残基程度のごく小さいペプチドの *P. pastoris* による発現はこれまでに殆ど例がない。これにより、低 pH 下で行う高密度 fermentation は低分子ペプチドの発現に非常に有効であると言える。

学位論文審査の要旨

主　査　　教　授　　新　田　勝　利

副　査　　教　授　　西　村　紳一郎

副　査　　助教授　　出　村　　誠

副　査　　講　師　　高　田　泰　弘

学 位 論 文 題 名

The strategies in over-expression of heterologous protein in methylotrophic yeast *Pichia pastoris*: the selection of secretion signal and the high-density fermentation in lowered pH

（メタノール資化酵母 *Pichia pastoris* による異種タンパク質の大量発現における戦略的手法－分泌シグナルの選択，及び培養槽による低 pH での高密度培養）

遺伝子工学による外来タンパク質の大量発現系の構築は、蛋白質構造生物学分野及び産業生産の分野においては必要不可欠の手法である。前者の例として、NMR、X 線結晶構造解析等において標的が非常に希少なタンパク質及びその変異体である場合、更には NMR スペクトルの測定の為に ^{15}N-、^{13}C-標識が必要な際にこの手法は多大に貢献する。また、標的の生理活性が医療・薬学的に興味深いものである場合、医薬品としての利用等を考慮すると、将来性のある大量発現系の構築は非常に意義がある。外来タンパクの大量発現系の構築はこのように非常に重要なファクターでありながら、その課程には様々なパラメータが絡み、確固たる大量発現のための指針を指し示すことは現在でも非常に困難である。

発現系構築に多用される宿主は大腸菌、酵母、バキュロウィルス等多くあるが、申請者は、近年注目を浴びつつあるメタノール代謝酵母 *Pichia pastoris* を宿主とし、分泌系にて異種タンパク質の発現系の構築を行い、標的となるタンパク質の発現・精製法を種々の目的タンパク質の性質に応じて最適化し、飛躍的な高効率での発現を目指すことを主目的として研究を行った。*P. pastoris* の発現系に於いては発現量

を左右するファクターは多種多様だが、申請者は的確な分泌シグナルの選択と培養槽を用いた高密度培養を駆使して、3種の外来タンパク質の分泌型大量発現に成功した。

申請者はこれまでに最も研究例が多くその知見が蓄積されているタンパク質のひとつであるc型リゾチームの中から、脊椎動物・無脊椎動物から一例ずつ代表してヒト及びカイコガリゾチームを標的として選択し、これらの*P. pastoris*による発現を行い、さらに分泌シグナルを選択することにより発現量の最適化を行った。大量発現例の極めて多い酵母由来フェロモンα-factor の前駆体及びこれら自身の分泌シグナル配列に関して個々の発現系を構築してこれを比較した。その結果、他のc型リゾチームと比して熱安定性の低いカイコガリゾチームの発現においてα-factor 前駆体はその分泌経路における安定性を著しく阻害し、これにより発現量が低下するという可能性が示された。また、自身の分泌シグナル配列を用いることでこの問題を解決した。自身の分泌シグナル配列を用いた際のカイコガリゾチームの発現量は1.1mg/L、培養槽による連続培養を適用することで50mg/Lにまで拡大されることを示し、これにより分泌シグナル配列の選択が*P. pastoris*における大量発現系の構築に非常に有効であるという事例が示されたといえる。

申請者は引き続き、昆虫由来サイトカインGrowth blocking peptide (GBP) の大量発現系の構築を*P. pastoris*を宿主として構築し、高密度培養とpH調整によって極めて効率の良い発現系の構築に成功した。成長阻害因子(Growth blocking peptide, GBP)はアワヨトウ蛾由来の25残基より成る幼若ホルモン分解酵素活性阻害ペプチドであるが、細胞増殖活性があり、血球細胞活性化活性、麻痺活性等を有す新規サイトカインである。通常の振盪培養においては発現量が微少であり、この原因が低分子であるGBPが 中性蛋白分解酵素等で分解されたことによるものである可能性を示した。この結果を受け、発現量向上のため培養槽による高密度培養を導入し、連続的な培地の投入とコンプレッサーによる空気の圧入により極めて高い菌体濃度の実現・維持に成功した。さらに槽内pHを3.0と酸性側に保ち、中性蛋白分解酵素の作用を抑制する戦略を導入したことにより、活性を有した状態でのGBPの発現・回収に成功した。またこの高密度培養により凡そ50mg/Lの大量発現を実現し、多機能サイトカインであるGBPの商業利用の可能性を開いた。同時にこれまで例のない小さいペプチドの*P. pastoris*による発現に成功し、このような事例に酸性領域における高密度培養が非常に有効である可能性を示した。

学位論文の公開発表の質疑応答では、申請者は自ら行った実験の結果や過去の論

文の内容を引用し、豊富な知識に基づいて質問に明快に回答した。

以上のように申請者は、酵母による大量発現系についていくつかの重要な知見を加えた。審査員一同はこれらの成果を高く評価し、申請者が北海道大学博士（理学）の学位を授与される資格が充分にあるものと認定した。