

## 高機能食品の開発を目指した難生産性蛋白質の効率的生産 Yeast extracellular expression system for "difficult-to-express" proteins

河原崎 泰昌

Yasuaki KAWARASAKI

生活健康科学研究科食品栄養科学専攻生物分子工学研究室 准教授

Associate Professor, Laboratory of Biomolecular Engineering, Division of Food and Nutritional Sciences, Graduate School of Nutritional and Environmental Sciences, University of Shizuoka



### Profile

2006年 静岡県立大学食品栄養科学部准教授  
2002- テキサス大学オースティン校 化学工学科  
2004年 博士研究員  
1998- 名古屋大学生命農学研究科助手  
2006年  
1997年 理化学研究所基礎科学特別研究員  
1997年 名古屋大学大学院農学研究科博士課程修了  
1992年 名古屋大学農学部卒業

2006 Associate Professor, School of Food and Nutritional Sciences, University of Shizuoka  
2002- Faculty Staff (Postdoctoral research fellow), Department of Chemical Engineering, University of Texas at Austin  
2004 Assistant Professor, Graduate School of Bio and Agricultural Sciences, Nagoya University  
1998- 2006 Special Post-doctoral Research fellow, Institute for Physical and Chemical Research (RIKEN)  
1997 Ph.D. Graduate School of Agricultural Sciences, Nagoya University  
1992 Graduate from School of Agricultural Sciences, Nagoya University

### Contact

T E L 054-264-5540  
+81-54-264-5540  
e-mail kawarsky@u-shizuoka-ken.ac.jp  
U R L http://sfns.u-shizuoka-ken.ac.jp/geneng

### 序論

組換え蛋白質の出芽酵母菌体外分泌発現系は、目的蛋白質の生産後の安定性が高く、しかも培地に含まれる挟難蛋白質が少ないことと相まって、一般的な細胞内発現系に対し圧倒的に高い精製コストパフォーマンスを發揮する。宿主である出芽酵母は一般に安全（GRAS）と見なされており、安価な天然培地で容易に大量培養することができる。従って、酵母菌体外分泌発現系は、特にモノクローナル抗体などジスルフィド結合を含有する各種有用蛋白質の商業的大量生産には最適の発現系といえる。しかしながら、分泌発現に用いられている接合因子やインバルターゼ由来の分泌シグナル配列はしばしば有効に機能せず、さらに時として宿主の生育が著しく阻害され、極端な低収量化をもたらす。この生育阻害は、passengerの小胞体内腔でのミスフォールディングによる小胞体ストレスを介したものであることが最近の研究で明らかになり、その分子メカニズムについて商業生産の観点からも関心が持たれている。

### 成果

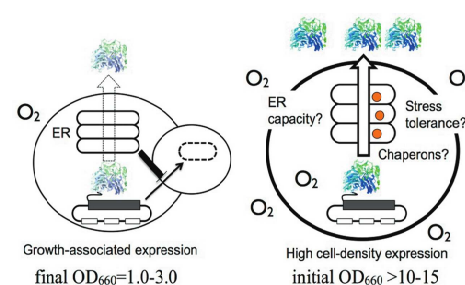
抗志賀毒素モノクローナル抗体（IgA）や同キメラ抗体（IgG4抗体）の生産性向上を最終目標として、難生産性である一本鎖抗体ならびに難生産性酵素をモデル分子として用い、組換え蛋白質の発現誘導にともなう宿主菌体の増殖遅延について解析した。その結果、目的蛋白質の分泌誘導に依存したプラスミド脱落が増殖遅延および目的蛋白質低収量化の原因であることを明らかにした。種々の検討の結果、分泌誘導時の菌体密度を高密度化することで、ある種の難生産性蛋白質の発現量を培地体積当たり数千倍に向上させることに成功した。この高密度菌体懸濁液を用いた外来蛋白質の分泌生産系は前例がなく、本研究が初めてとなる。この高密度系の発現特性を解析したところ、ラッカーゼやミラクリンなどの特定の外来蛋白質には有効であるが、大腸菌および糸状菌由来のβ-ガラクトシダーゼや、組換え一本鎖抗体の発現量を向上させるには至らなかった。静止期に特異的な、恐らく小胞体に局在する分子シャペロンがある種の難生産性蛋白質の発現量向上に寄与している可能性が示唆された。

### 展望

分泌発現に依存した宿主細胞の増殖阻害の原因の一つが、小胞体ストレスを介したプラスミド脱落にあることを見出し、その簡便な回避法（高密度系の利用）を確立した。これは、これまでに発現が困難であった多くの有用蛋白質の発現系への応用が非常に容易であり、組換え蛋白質の効率的生産において基盤技術となる可能性がある。活性型組換え抗体分子の発現を促進するシャペロンの同定と、それを利用した発現宿主株の構築が今後の課題である。

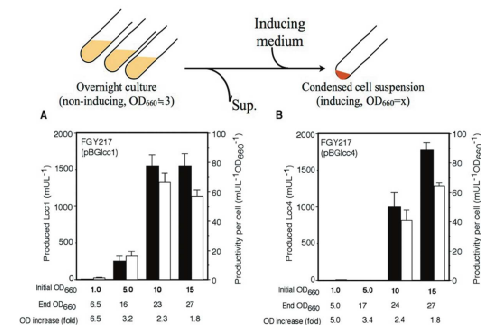
### Introduction

Using recombinant yeast in extracellular production of industrially useful proteins, including diagnostic antibodies or enzymes, simplifies the downstream purification process, because certain steps, including cell lysis and subsequent clarification of the extract, are not necessary. Moreover, purification of secreted protein from yeast culture medium is much simpler than that from clarified cell lysate, because the former contains fewer endogenous proteins. However, depending on the protein to be expressed, the host cells show impaired growth upon induction, resulting in poor production of the target protein.



【図1】本研究のまとめ：ある種の組換え蛋白質の分泌生産（一般的な増殖連動型生産）は、小胞体ストレスを介した何らかの分子機構によりプラスミド分配が阻害され、極端に低収量化する（左）。高密度菌体懸濁液を用いた系（右）ではプラスミドの脱落は起こらず、恐らく静止期特異的な小胞体シャペロンにより組換え蛋白質の折りたたみが促進され、活性型蛋白質の発現量が飛躍的に向上する。図中のO<sub>2</sub>は酸素要求量の増大を示す。

【Figure 1】Summary of this study  
Extracellular production of certain kinds of proteins causes serious growth retardation of host cells, which is occasionally accompanied with significant loss of the expression plasmid, probably due to ER stress upon induction (left panel). The right panel shows the high cell-density expression system that we established in this study. The recombinant yeast cells no longer proliferate in the dense suspension. Instead, the expression plasmids in the cells are stabilized, which results in increased production of the target protein. Some stationary phase-specific chaperons, and hence ER capacity, are also involved in efficient production.



【図2】発現誘導時の菌体を高密度化する（上）により、ある種の組換え蛋白質（下A、Lcc1；下B、Lcc4）の分泌発現量は、通常の誘導条件で行った場合の数倍になる。AおよびBのグラフは、初期菌体密度（initial OD）と生産された組換え蛋白質量（黒、培地体積あたり生産量；白、菌体当たり生産量）を示す。

【Figure 2】Upper panel: Experimental outline of the high cell-density expression system. Lower panels: Lcc1-expressing strain (FGY217/pBGlc1), panel A) and Lcc4-expressing strain (FGY217/pBGlc4), panel B) were suspended in the inducing medium to give the depicted cell concentrations. The turbidity increase (represented as End OD660) of the culture and liberated laccase activity (bars in black) were measured. The bars in white represent laccase production per cell, which is obtained by dividing laccase activity (mU·L<sup>-1</sup>) by the end OD<sub>660</sub> value.

### 代表的な発表論文と研究業績 / Major Publications and Achievements

1. K. Ito, S. Ito, T. Shimamura, S. Weyand, Y. Kawarasaki, T. Misaka, K. Abe, T. Kobayashi, A. Cameron, and S. Iwata: Crystal structure of glucanase from dental caries pathogen *Streptococcus mutans*. *J. Mol. Biol.*, 408, 177-186 (2011)
2. T. Kojima, N. Nagao, D. Ando, T. Ojima, Y. Kawarasaki, I. Kobayashi, M. Nakajima, H. Nakano: Emulsion culture: A miniaturized library screening system based on micro-droplets in an emulsified medium. *J. Biosci. Bioeng.*, 112, 299-303 (2011)
3. K. Kimata, M. Yamaguchi, Y. Saito, H. Hata, K. Miyake, T. Yamane, Y. Nakagawa, A. Yano, K. Ito, and Y. Kawarasaki: High cell-density expression system: A novel method for extracellular production of "difficult-to-express" proteins. *J. Biosci. Bioeng.* in press. (2011)
4. T. Kamiya, T. Ojima, K. Sugimoto, H. Nakano, Y. Kawarasaki: Quantitative Y2H screening: Cloning and signal peptide engineering of a fungal secretory LacA gene and its application to yeast two-hybrid system as a quantitative reporter. *J. Biotechnol.*, 146, 151-159, (2010)
5. A. Ikeuchi, T. Kamiya, T. Yamane, H. Nakano, Y. Kawarasaki: A method for reverse interactome analysis: High-resolution mapping of interdomain interaction network in Dam1 complex and its specific disorganization based on interaction domain expression. *Biotechnol. Progr.*, 26, 945-53 (2010)