

分裂酵母におけるプロテインジスルフィドイソメラーゼPdi1pを用いた 異種タンパク質分泌生産系の構築

富永 陽大*1 小谷 哲也*2 渡邊 真宏*3 竹川 薫*4

Construction of a Heterologous Protein Secretion System Using the Protein Disulfide Isomerase Pdi1p in *Schizosaccharomyces pombe*

Akihiro Tominaga, Tetsuya Kotani, Masahiro Watanabe and Kaoru Takegawa

分裂酵母 *Schizosaccharomyces pombe* は有用タンパク質の生産宿主として広く利用されており、精製の容易さや機能維持の観点から有用タンパク質を細胞外へ分泌させる手法が求められている。本研究では、過剰発現によって細胞外へ分泌するPdi1p（プロテインジスルフィドイソメラーゼ）を利用した高分泌系による有用タンパク質生産法の構築に取り組んだ。モデルタンパク質である緑色蛍光タンパク質EGFPをPdi1pと結合させた融合タンパク質を過剰発現させたところ、細胞外への分泌が確認された。さらに、Pdi1pのドメイン構造を部分的に欠損させると融合タンパク質の分泌量が向上した。詳細な解析の結果、この分泌促進にはPdi1pのxドメインが重要であることが示唆された。

1 はじめに

分裂酵母 *Schizosaccharomyces pombe*（以下、*S. pombe*という）は、分子遺伝学・細胞生物学の分野で詳細に研究されている、真核生物におけるモデル生物のひとつである。*S. pombe*は高等動物と多くの遺伝学・生物学上の共通点を有するため、高等動物の高発現プロモーターを利用した効率的な有用タンパク質生産が可能である。また、バイオ医薬品や機能性食品の原料となる複雑な構造のタンパク質であっても、機能を維持したまま生産できる利点がある。微生物によるタンパク質生産法には、細胞内に蓄積させた後に破砕・抽出を行う「細胞内生産法」と細胞外に分泌させる「細胞外分泌法」がある。細胞外分泌法は細胞内生産法よりも精製が容易であり、かつタンパク質の立体構造や機能を維持しやすいため、産業的に有用な手法とされている。

これまでの研究において、我々は分裂酵母のPdi1タンパク質（以下、Pdi1pという）を過剰発現するとPdi1p自体が細胞外へと分泌されることを見出している。そこで、本研究においては、Pdi1pと有用タンパク質を連結させ、Pdi1pを細胞外への分泌キャリアーとして利用する、効率的な有用タンパク質分泌生産系の構築を試みた。さらに、Pdi1pを構成している6つの

ドメイン（a, b, b', x, a', c）（図1）のドメイン構造を段階的に削除して、キャリアー部分を低分子化することによって分泌量がさらに向上すると考え、分泌に最適なドメイン構造の探索を行った。

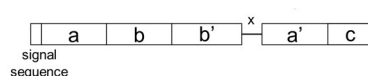


図1 *S. pombe* Pdi1pのドメイン構造

2 実験方法

2-1 菌株及び培地

宿主菌株は、細胞内外の8種のプロテアーゼ遺伝子を欠損させた *S. pombe* A8株を用いた。培地には、YPD培地（1 %酵母エキス、2 %ペプトン、2 %グルコース）を使用し、培養を行った。

2-2 ベクター

プロモーターに哺乳動物由来の高発現プロモーター（hCMV-p）を用いて、Pdi1p及びドメイン欠損型Pdi1pのC末端にモデルタンパク質として緑色蛍光タンパク質EGFP（Enhanced Green Fluorescence Protein）を連結し、融合タンパク質として発現するベクターを構築した。

2-3 トリクロロ酢酸添加によるサンプル調製

1/10量のトリクロロ酢酸を試料に添加し、氷上で15分間静置後、遠心分離（10,000×g, 15分）を行った。沈殿物を冷エタノールで2回洗浄して脱塩・乾燥させ、

*1 生物食品研究所 *2 AGC株式会社

*3 産業技術総合研究所 *4 九州大学

SDS-PAGE用バッファーに溶解した。5分間の熱変性後、SDS-PAGEに供した。

2-4 ウェスタンブロット解析

試料20 μ LをSDS-PAGEゲル（5-20 %グラジエント）に供し、PVDF膜に転写した。その後、Anti-GFP pAb-HRP-DirecT（1 : 2,000）による免疫検出を行い、シグナルを増強化学発光法により検出した。

2-5 タンパク質の立体構造解析

Pdi1pの立体構造解析はColabFoldを用いて行い、図はPyMol 2.4 softwareを用いて作成した。

3 結果と考察

3-1 Pdi1p全長及びドメイン欠損型Pdi1pを用いた融合タンパク質の細胞外分泌

Pdi1p全長及びドメイン欠損型Pdi1p-EGFP融合タンパク質発現ベクターを*S. pombe* A8株に導入した。形質転換体を48時間振とう培養し、培養上清のウェスタンブロット解析を行った結果、Pdi1p-EGFPが検出されたことから、Pdi1pが細胞外分泌を促進するキャリアーとして機能することが確認された（図2A）。また、a'ドメイン及びcドメインの削除によるキャリアーの低分子化は融合タンパク質の分泌量増加に寄与した一方で（図2A）、さらにxドメインを削除すると分泌量が減少した（図2B）。以上の結果から、xドメインはPdi1pの分泌キャリアーとしての機能に重要であることが示唆された。

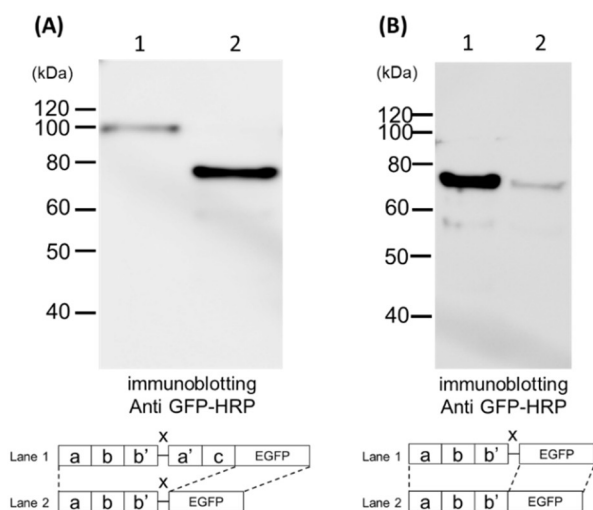


図2 Pdi1p全長及びドメイン欠損型Pdi1pとEGFPを連結させた融合タンパク質のウェスタンブロット解析

(A) 1 : Pdi1p全長-EGFP 2 : Pdi1p Δ a'c-EGFP

(B) 1 : Pdi1p Δ a'c-EGFP 2 : Pdi1p Δ a'c Δ x-EGFP

3-2 Pdi1p及び融合タンパク質の立体構造解析

15アミノ酸から構成されるxドメインは、ドメイン間の“ヒンジ”として機能し、細胞外分泌に適した立体構造の維持に寄与しているものと推測した。そこで、Pdi1p単体、Pdi1p全長-EGFP、Pdi1p Δ a'c-EGFP及びPdi1p Δ xa'c-EGFPについて立体構造解析を行った（図3）。Pdi1p全長-EGFPとPdi1p Δ a'c-EGFPを比較すると、xループの存在によって構造的自由度が高まっていることが示唆された。対照的に、xループが存在しないPdi1p Δ xa'c-EGFPではb'ドメインが分子間相互作用を通じてEGFPを固定化している様子が確認された。以上の結果から、xドメインによる分泌促進メカニズムの詳細には依然として不明な点はあるが、xループの存在とそれに伴う構造的自由度が細胞外分泌の向上に重要な影響を及ぼしていることが示唆された。

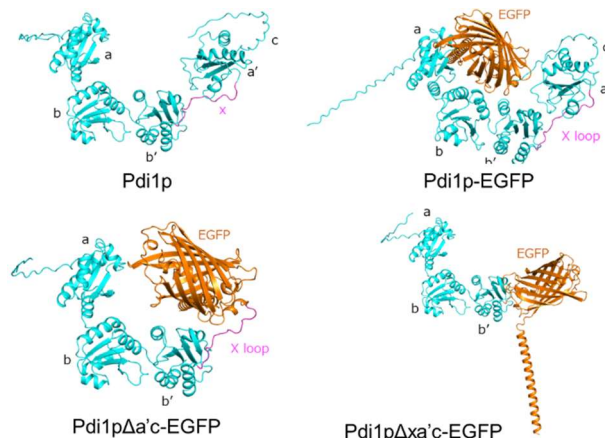


図3 Pdi1p及び融合タンパク質の立体構造モデル

4 まとめ

本研究により、分裂酵母Pdi1pを分泌キャリアーとして利用した有用タンパク質分泌生産系について、ドメイン欠損型Pdi1pの解析を通じてキャリアーの低分子化が分泌量向上に有効であることが明らかになった。さらに、xドメインが細胞外分泌に重要な役割を果たしていることが示唆された。将来的に、本研究で得られた知見と分泌メカニズムの更なる解析を組み合わせることで、高機能タンパク質分泌生産システムの産業化に貢献したいと考えている。

5 掲載論文

Journal of Bioscience and Bioengineering, Vol. 140 (4), pp. 237-243 (2025)