

# 高分泌酵母突然変異体を用いた 蛋白質素材生産効率化システムについての研究

広島大学理学部 千葉県工業試験所 生命工学工業技術研究所  
鈴木 克周・岡 千寿・地神 芳文

Yeast supersecreting mutant strains were examined for their ability to produce lysozyme protein. The *ssII* mutant strains secreted 10-fold more lysozyme than the wild type parent strain. The efficiency was improved 10-folds by introduction of the lysozyme gene by multi-copy plasmids. About 10-fold improvement was also achieved by supplying casamino acids in culture media. New *ssII* host strains, which secreted 3-4 fold more lysozyme than the original *ssII* mutant strain, were obtained by crossing the original *ssII* mutant strain and a wild type strain. The new *ssII* transformant secreted 500-fold more lysozyme in synthetic media supplemented with casamino acids than the original *ssII* mutant did in synthetic media. These data indicate that the above factors help multiplicatively one another and yeast mutants can contribute to build up highly efficient system to produce protein resources.

## 1 緒言

生体の機能素子として多種多様な酵素蛋白質が報告されている。これらの中にはコスメトロジー素材として有効と考えられるものもあるが、適用例は少ない。この原因として蛋白質の固有の特徴である安定性や活性発現条件による制約もあるが、純度の良い酵素蛋白質を多量に得る上での問題点があげられる。天然の含有量が微量な有用蛋白質を微生物で遺伝子発現させて生産しようとする試みは組み換え遺伝子技術が確立された早い段階から行われている。組み換え遺伝子の発現のために遺伝子発現能力の高い大腸菌を宿主に用いることが多いが、バクテリアを溶解する活性を持つリゾチームの場合のように大腸菌を組み換え遺伝子の発現のための宿主とすることができない例や、大腸菌を用いて蛋白質を多量に作ることはできるが酵素としての高次構造を構築できず活性を発現で

きない例も多い。真核微生物であるパン酵母は、組み換え遺伝子宿主として大腸菌に近い扱い易さを持ち、バクテリア固有の障害を被らずに生産することができる特質を持っている。またパン酵母は、真核生物として蛋白質への糖鎖付加などのプロセッシング機能を持つだけでなく、突然変異を用いてこれらの機能を人為的に制御<sup>1)</sup>することができるという他の真核生物宿主では容易に行えない操作が可能である。このパン酵母での蛋白質分泌の高効率システムの構築原理を確立できれば、様々な有用蛋白質素材を生産する場合の指針となり

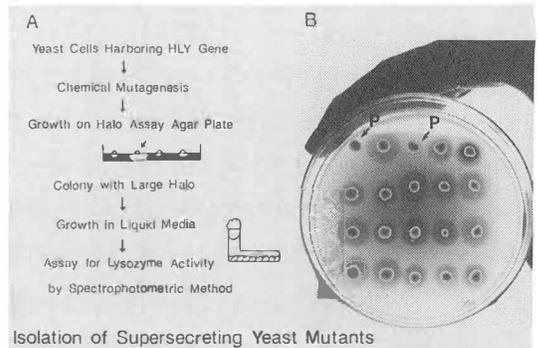


図1 リゾチーム高分泌突然変異体のスクリーニング  
突然変異処理及びスクリーニング法の概要 (A)、ならびに細菌含有寒天培地平板を用いた酵母菌コロニーのリゾチーム分泌能力検定 (B)。コロニー周縁の透明環はコロニーから分泌されるリゾチームにより寒天中のバクテリアが溶解されたため形成される。矢印(P)の先のコロニーは野生型親株なのでコロニー周縁に透明環は見えない。

Development of efficient system for production  
of protein resources by yeast super-  
secreting mutants



Katsunori Suzuki,  
Faculty of Science  
Hiroshima University

うると期待される。筆者等は先にリゾチーム遺伝子を染色体DNAに組み込んだパン酵母に突然変異を誘起して、分泌量が10倍以上高まった変異体を分離した<sup>2)</sup>(図1)。酵母宿主に限らず培養条件の改変や細胞・個体選抜による優良株の育成はこれまでに多数行われているが、どのような機構で効率が変わったのか明らかにされている例は少ない。この高分泌変異体中の一つ*ssl1*変異体では蛋白質のソーティング機構が変化しており(図2)、膜透過後輸送の過程が効率化されたものと考えられた。

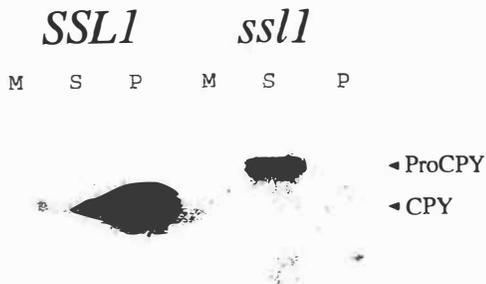


図2 蛋白質輸送過程に変化のある高分泌変異体  
培養液上清(M)、細胞壁画分(S)、及びプロトプラスト画分(P)の蛋白質をアクリルアミドゲル電気泳動した後、抗CPY抗体を用いてCPY蛋白質を検出した。CPYは野生型細胞(*SSL1*)ではプロトプラスト分に検出されるが、変異体(*ssl1*)では細胞壁画分以前駆体として検出される。

ヒトリゾチームはフレミングにより当初鼻水から発見され、涙液に含有量が高いものわずかしが得られない<sup>3)</sup>。この酵素は細菌細胞壁を溶解して細菌を殺菌するという人体防御作用を持つ一方で炎症を低下防止するという安定化作用を合わせ持つ蛋白質である。リゾチームは蛋白質としては低分子量のものであり、立体構造も明らかにされている。酵母組み換え体のリゾチーム分泌の量をコロニーの段階で検出する手法も開発できたので(図1B)、制限要因を順次明らかにしてゆくのに好適な素材と考えられる。

本研究は宿主の設計上重要な点であり、また高分泌変異体*ssl1*においてさらに制限要因を明らかにしてゆく上の基礎知見、即ち、交配・遺伝子量効果・培地の改変などの基本操作で分泌効率を相乗的に操作できるかどうかを知ることを第一の目的としている。

## 2 実験

### 2.1 培養

主にイーストニトロゲンベース0.67%とグルコース2%(SD培地)、およびイーストニトロゲンベース0.67%とガラクトース2%(SG培地)を基本培地として30°Cで振とう培養した。YPD寒天培地(1%イーストエキス、2%ポリペプトン、2%グルコース)は主に交配や単細胞分離後の培養に用いた。

### 2.2 宿主とプラスミド

高分泌株I69(*ssl1*)野生型株KS45-3DとKS51-3C、脱抑制変異体株KK4、ならびに、これらを交配後に減数分裂させ顕微操作<sup>4)</sup>により四分子解離して菌株を作成して使用した。プラスミドとして、リゾチーム遺伝子(*HLY*)を持つマルチコピー型ベクターYE<sub>p</sub>HLYSIG<sup>5)</sup>およびpESH<sup>6)</sup>を用いた。YE<sub>p</sub>HLYSIGは*HLY*のプロモーターとして*GAP10p*を持ち、pESHでは*ENO1p*を保持している。

### 2.3 活性測定

細胞から培養液中へ分泌されるリゾチームの活性測定は細菌を基質とする濁度減少法を用いて行った。*Micrococcus* 乾燥菌体懸濁液{50mMリン酸緩衝液(pH6.4)中0.1mg/ml} 0.8mlに試料液0.2mlを加えて経時的に吸光度をフォトメーターを用いて測定した。450nmの吸光度が1分間に0.001減少するとき、1ユニット活性とした。培養液の遠心上清を上記緩衝液で希釈して試料液とした。四分子解離して得た菌株での高分泌変異は細菌含有平板で細菌溶解環を大きく形成するものとして判定した他に、カルボキシペプチターゼY活性が欠損しているかどうかを検出して判定<sup>2)</sup>した。その他の変異は酵母遺伝学の一般的判定法<sup>4)</sup>に従って確認した。

### 2.4 蛋白質の検出

培養液中へ分泌されたリゾチームはHPLC及び電気泳動分析した。電気泳動には培養液遠心上清に、

SDSとメルカプトエタノールを含むサンプル緩衝液を加えて、煮沸したものを試料とした。アクリルアミドゲルで泳動の後、銀染色で全蛋白質を染色して確認した他、PVD膜へ転写した蛋白質を抗リゾチーム抗体を用いるWestern Blot法で検出した。

### 3 結果

#### 3.1 遺伝子量効果

先に筆者らが分離した *ss11* 変異体は、野生型親株に比べて10倍高い効率を示すものの純粋に遺伝生化学的見地から解析するために分離したもので、遺伝子発現も低い形態で設計されていたため、分泌量は低いレベルにとどまっていた。そこで、リゾチームのmRNA量を増すために、多コピー数プラスミドベクターでリゾチーム遺伝子を *ss11* 変異体と親株に導入したところ、*ss11* 変異体と親株の形質転換体は、共に10倍多いリゾチームを培養液中へ分泌した。性質の異なる2種のプロモーターを用いた場合で同様な結果が得られた (図 3)。

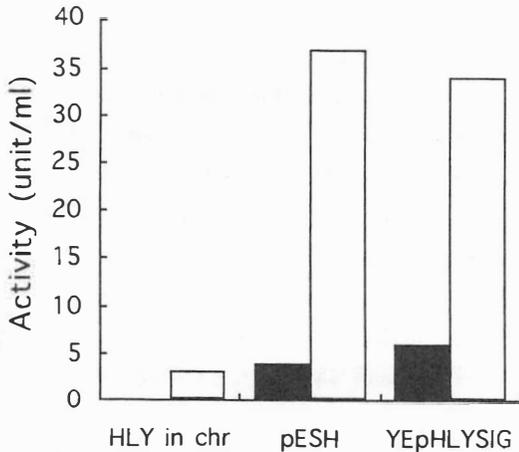


図 3 遺伝子量のリゾチーム分泌に及ぼす効果

染色体DNA上に1コピー挿入したリゾチーム遺伝子 (*HLY in chr*) 及び多コピー数プラスミドベクターに導入されたリゾチーム遺伝子 (*YEphLYSIG*, *pESH*) を持つ細胞を比較した。SDC培地 (*HLY in chr*, *pESH*) 及びSGC培地 (*YEphLYSIG*) を用いて培養した。宿主として野生型親株KS45-3D (■) 及び突然変異体I69 (□) を用いた。培養液上清中のリゾチーム活性を示す。

このことは、*ss11* 変異の効果と遺伝子量効果が相乗的に作用していることを示している。

#### 3.2 栄養の効果

培養液の成分を変更することによって分泌量が変動した。合成培地へ添加するアミノ酸をカザミノ酸に置き換えると、10倍高い活性がみられた。野生型親株と *ss11* 変異体で同様に変動しているの、*ss11* 変異の効果とカザミノ酸の効果は相乗的に作用していると考えられた (表 1、図 4)。

表 1 YPDによる抑圧作用

菌株	培地	リゾチーム活性 (unit)	
		2日後	5日後
KS45-3D	YPD	-	0
KS45-3D	SD+CAS	0	1
I69	YPD	2	0
I69	SD+CAS	18	27
I85	YPD	2	0
I85	SD+CAS	46	56

2日及び5日間培養後の培養上清液中の活性を測定した。(-; 測定せず)

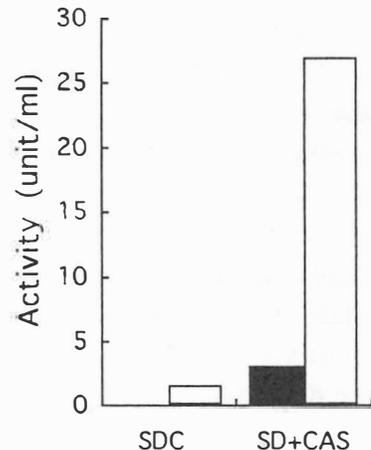


図 4 培地のリゾチーム分泌に及ぼす効果

SDC培地及びSD+CAS培地を用いて染色体DNA上に1コピー挿入したリゾチーム遺伝子を持つ野生型親株KS45-3D (■) 及び突然変異体I69 (□) を培養した。培養液上清中のリゾチーム活性を示す。

一方、パン酵母を栄養増殖する目的で使用される培地YPDを用いた場合は、一過的に低い活性が *ss11* 変異体で観察されその後消滅した (表 1)。培養液中へ分泌されたリゾチームが分解を受けている可能性を示す興味深い基礎的知見である。

### 3・3 交配の効果

パン酵母は菌株ごとに性質が少しずつ異なるので、*ss11* 変異体を他の菌株と交配して子孫を調べれば、分泌量が増大したものが得られる可能性がある。そこで生育の良い野生型細胞と交配して2倍体を作成した。この2倍体は表現型として高分泌ではなかった。*ss11* 変異が野生型対立遺伝子に対して劣性の性質を持っていると解釈される。2倍体細胞を減数分裂させ1倍体細胞を顕微操作により選別してから培養すると、表2に示すようにリゾチームを多く分泌する子孫 (*ss11*) と、少ししか分泌しない子孫 (*SSL1*) が2対2の割合で得られる。これらの中には元の変異体よりも3~4倍多い分泌量を示すものがあつた。高効率な2株の培養液上清をイオン交換HPLCで分析したところ、表2に活性の値でみられたのと同様に天然のリゾチーム蛋白質と同じ性質の蛋白質が著量存在していることがわかつた。

表 2 交配体から得られた1倍体菌株の分泌量

菌株	活性	菌株	活性
	(unit)		(unit)
KS58-1A	1	KS58-2A	1
-1B	43	-2B	108
-1C	99	-2C	0
-1D	1	-2D	127
KS58-3A	64	KS58-4A	47
-3B	3	-4B	1
-3C	14	-4C	0
-3D	7	-4D	54
-----			
Wild type & <i>ss11</i> strains			
used for the diploid construction			
KS51-3C	1		
I69	30		

### 3・4 *ss11* 変異、カザミノ酸、遺伝子量の相乗作用

前項までの3つの改善効果は互いに組み合わせると相乗的に効果が現れて分泌量を増やせるのか、それとも、組み合わせによってはそれほど付加的な効果が現れてこなくなるかということは、リゾチーム生産の課題にとどまらずに宿主の設計上重要な課題である。そこで前節で得られた *ss11* 株にプラスミドを導入し合成培地及びカザミノ酸

表 3 新規宿主、遺伝子量効果、カザミノ酸間の相乗効果

Strain	YE $\phi$ HLYSIG		pESH	
	SGC	SG+CAS	SDC	SD+CAS
	リゾチーム活性 (unit)			
KS58-2B	300	1920	100	860
KS58-2D	280	2180	40 <sub>0</sub>	1180

添加培地で培養して分泌量を測定した。図3と表3を比べるとプラスミドの導入とカザミノ酸添加培地により新規 *ss11* 宿主での分泌量は、元の *ss11* 宿主を合成培地で培養した場合に比べて500倍に高まっており、相乗的に作用したと判断される。この培養液上清中の蛋白質をSDSゲル電気泳動で分離分析すると全構成蛋白質中で最も主要なバンドとしてリゾチーム蛋白質を検出できた (図 5)。

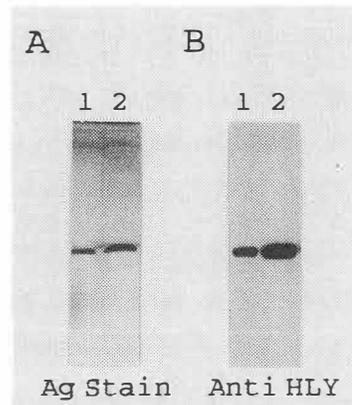


図 5 分泌されたリゾチーム蛋白質の分析  
KS58-2D (YE $\phi$ HLYSIG) をカザミノ酸添加培地を用いて培養した。培養液上清 (1; 10ul, 2; 20ul) 中の全蛋白質をアクリルアミドゲル電気泳動した後、銀染色 (A) 及び抗ヒトリゾチーム抗体 (B) を用いて全蛋白質ならびにリゾチームをそれぞれ検出した。

## 4 考 察

微生物を宿主にして蛋白質を作成すると、製品に混入する宿主由来の物質が副作用となることが問題となると指摘されている。効率の高い生産システムを作ることは、単に経済的な効果をもたらすだけでなく、副作用を低下する点でも役立つと期待されている。本研究では *ssII* 変異、交配、カザミノ酸添加、遺伝子量効果の各作用で分泌量を増加させられることと、これらの要素の組み合わせが相乗的な改善効果があることを示すことができた。蛋白質の分泌は遺伝子発現、蛋白質合成、膜透過、輸送、分解など細胞内の多数の要素が組み合って行われる過程であるので、様々な制限要因を想定できる。筆者等は先に *ssII* 変異が転写には影響せず蛋白質分配機構に変化をもたらしていることを明らかにした。この変異体において本研究で試みた操作がすべて分泌量を増加させ得たことは制限要因がまだ多いことを示唆している。言い換えれば、パン酵母での分泌効率は遺伝的改変あるいは遺伝子工学的操作を用いてさらに高められよう。例えば、YPD培地を用いた場合のようにいったん培養液中に検出された酵素活性が消失してゆく現象が見られた(表1)。この現象に関与する因子の遺伝子を破壊すればさらに効率の高い安定した宿主を構築できるものと考えられる。

酵母を分泌宿主に用いると活性を持った蛋白質を分泌生産できるという報告例が多いものの、生産効率は高くないのが一般的である<sup>7)</sup>。一見、回り道のようにも見えるが、パン酵母でリゾチームを分泌するシステムを用いて遺伝子発現から酵素の集積までの素過程を総合的にかつ遺伝生化学的に解明してゆくことと、関与している遺伝因子を改変してゆくことは、真に望ましい高効率なシステム作りに寄与できると考えている。

## 総 括

コスモロジー有用素材と考えられる蛋白質リゾチームの生産を突然変異を有するパン酵母宿主

を用いて効率化する方法を検討した。遺伝子量効果によるmRNAの加重、栄養成分の添加による生育条件の効果を分析した。リゾチーム高分泌 *ssII* 変異体は、野生型親株に比べて10倍高い分泌効率を示す。mRNAを増すために、多コピー数で複製するプラスミドベクターとしてリゾチーム遺伝子を *ssII* 変異体に導入することによって10倍効率が上昇した。合成培地の成分について検討しカザミノ酸の添加によって10倍近く効率上昇した。 *ssII* 変異体と生育の良好な菌株との交配により3~4倍効率の高い新規 *ssII* 宿主を得た。新規 *ssII* 宿主は、これまでの宿主と同様に天然型と同じ性質のリゾチーム蛋白質を多量に分泌していることを生化学的に確認した。新規 *ssII* 宿主の利用・プラスミドの導入・カザミノ酸添加培地での培養は相乗的に作用し得た。新規 *ssII* 宿主が天然型と同じ性質のリゾチーム蛋白質を培養液中に著量分泌していることを生化学的に確認した。以上の知見は本変異体を基にさらに効率の高い変異体の分離や他の変異との組み合わせによる柔軟なシステム作りにも役立つと考えられる。

## 引用文献

- 1) T. Nagasu, Y. Shimma, Y. Nakanishi, J. Kuromitsu, K. Iwama, K. Suzuki, Y. Jigami *Yeast.*, 8 535-547 (1992)
- 2) K. Suzuki, K. Ichikawa, Y. Jigami *Mol. Gen. Genet.*, 219 58-64 (1989)
- 3) A Fleming *Proc. soc. Lond.*, [B] 93 306-317 (1922)
- 4) K. Suzuki, N. Yanagishima *Cut. Genet.*, 10 353-357 (1986)
- 5) Y. Jigami, M. Muraki, N. Harada, H. Tanaka *Gene.*, 43 273-279 (1986)
- 6) K. Ichikawa, K. Komiya, K. Suzuki, T. Nakahara, Y. Jigami, *Agric. Biol. Chem.*, 53 2687-2694 (1989)
- 7) D. T. Moir, L. S. Davidow *Meth. Enzymol.*, 194 491-5075 (1991)