

染色体工学技術を利用した分裂酵母の有用物質生産システムの構築

竹川 薫^{1*}・佐々木真弓²・東田 英毅²

分裂酵母は高等動物の遺伝子機能をよく相補し、特にヒト由来のタンパク質生産に利用することができる有用な異種タンパク質生産宿主の一つである。安価な培地で生育速度が速く、高密度培養が可能な分裂酵母ではあるが、より効率的に異種タンパク質を生産するために、分子生物学的手法を用いた分裂酵母高生産宿主のさらなる開発が必要である。そこで筆者らは、異種タンパク質生産に不要な分裂酵母染色体領域を削除することで、より高い生産性を有する分裂酵母への改良を試みた。

生物はさまざまな環境に対応するために、特殊な条件下のみで発現される多数の遺伝子を有している。これらの遺伝子群は栄養十分で生育環境の整った条件においては不要であり、逆に無駄なエネルギーを消費していることが予想される。さまざまな機能を導入するための宿主細胞として、物質生産に不要な代謝エネルギーの浪費を抑えたシンプルな細胞の構築が望まれている。近年、微生物のゲノムをダイナミックに改変して有用な細胞を創り上げる合成生物学が脚光を浴び始めている。最小ゲノムを持った細胞を構築する方法の一つとして、遺伝情報を司る染色体DNAを短いDNA断片から酵母の相同組換えなどを用いて合成した人工マイコプラズマのニュースが世間を賑わせた¹⁾。合成生物学的手法を用いた物質生産用宿主細胞の開発は大変興味深い。倫理的問題をはじめ、まだ実用化には多くの課題が存在する。一方、既存の細胞を出発材料にして、物質生産に不要な染色体領域を削除して宿主を創製する試みも行われている。染色体を大規模に削除した効果として、これまでに原核生物の大腸菌でL-トレオニン生産量の増加²⁾、エレクトロポレーション効率の向上や不安定なプラスミドの安定化³⁾、枯草菌ではセルラーゼやプロテアーゼの分泌生産効率の向上⁴⁾、さらに真核生物の出芽酵母ではエタノールやグリセロールの生産性の向上⁵⁾などが報告されている。

筆者らは分裂酵母を宿主として異種タンパク質生産を効率的に行う目的で、細胞内の無駄なエネルギー消費をできるだけ抑えるため、通常の培養条件下では生育に影響のない遺伝子を可能な限り削除して、異種タンパク質生産に特化した分裂酵母株を作れないかと考えた。本稿では、筆者らがこれまで行ってきた研究成果について紹介したい。

分裂酵母大規模遺伝子削除の試み

分裂酵母は約4900個の遺伝子を持ち、その約26.1%が必須遺伝子であることが最近報告された⁶⁾。これらの必須遺伝子は、3本の染色体上にまんべんなく散在しているが、第1、第2染色体末端付近には比較的広い非必須遺伝子領域が存在している(図1)。筆者らはまず、分裂酵母染色体上から複数の遺伝子を一度に削除する方法の開発を試み、新しい分裂酵母遺伝子削除方法を報告した⁷⁾。本法はまず破壊したい特定の領域を選び、片方にマーカー *ura4+* 遺伝子と削除したい領域のもう片方の遺伝子の一部をPCRにより増幅して貼り付ける。目的の領域に張り付いたコロニーを、5-フルオロオロチン酸(FOA)含有培地に生育させることで相同組換えが起こり、この領域内のすべての遺伝子がすべて削除される。Latour法と名付けた今回の方法は1)FOAで *ura4+* 遺伝子が除去されると、削除された領域の周りに遺伝子操作の「痕」がまったく残らない、2)FOA処理により、*ura4+* 遺伝子が完全に除去されるので再びウラルシル要求性を用いたセレクションが可能であり、同一株での多重遺伝子削除が可能である、3)一度遺伝子を貼り付けてからFOAによる削除を行うために、削除できない場合にはこの領域に必須遺伝子が存在することが推定可能である、などの利点を持っている。この方法を用いて必須遺伝子の中で最も染色体末端にある遺伝子は、第1染色体左腕(ALT)

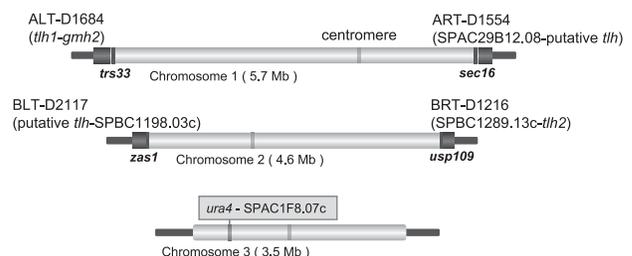


図1. 分裂酵母染色体マップ。分裂酵母染色体を模式的に示した。第1、第2染色体末端の上部に削除領域、下部に最末端必須遺伝子を示している。ALT削除領域に含まれるSPAC1F8.07cは、削除すると増殖速度が著しく低下するため、第3染色体の *ura4* 座に移した。各染色体末端の細い棒状の領域は、テロメア、サブテロメア領域を示す。

* 著者紹介 ¹九州大学大学院農学研究院生命機能科学部門(教授) E-mail: takegawa@agr.kyushu-u.ac.jp
²旭硝子株式会社ASPEX事業部

では *trs33*, 第1染色体右腕 (ART) では *sec16*, 第2染色体左腕 (BLT) では *zas1*, 第2染色体右腕 (BRT) では *usp109*であることを明らかにした⁸⁾. Kimら⁹⁾によって発表された分裂酵母のゲノムワイドな一遺伝子破壊解析では, 上記で述べた必須遺伝子より各染色体末端側にある SPAC1F8.07c, SPBC1348.06c, *alr2*, *dea2*も必須遺伝子であると報告されていた. 筆者らの実験結果から SPAC1F8.07cを欠失すると著しい生育遅延を生じるが生育可能であり, また他の2つの遺伝子欠失はほとんど生育に影響しなかった. この違いは実験に用いた親株の問題かもしれないが原因については不明である. 第2染色体末端には, 推定約22 kbの塩基配列が含まれるギャップが存在していたが, 筆者らはギャップ内の塩基配列を明らかにし, ギャップにも必須遺伝子が含まれていないことを確認した⁸⁾.

筆者らの目的である, 増殖効率を低下させることなく物質生産宿主としての細胞機能の安定性も確保するため, 慎重に削除領域の検討を行い, 染色体大規模削除のターゲット領域の具体的な削除サイズは, ALT 168.4 kb, ART 155.4 kb, BLT 211.7 kb, BRT 121.6 kbとなった(図1). なお, 染色体の安定性を保つため, テロメアおよびサブテロメアは削除領域に含まれていない. また, 第3染色体については, 第1, 第2染色体と末端構造が異なるため, 現時点では削除を行っていない.

さらに染色体大規模削除領域をさまざまな組合せで統合し, 合計15種類の染色体大規模削除株が揃った. 最大染色体削除株は第1, 第2染色体両末端の4領域削除を削除したIGF742株で, その染色体削除サイズは657.3 kb (全ゲノムの約4.7%), 遺伝子削除数は216遺伝子である.

IGF742株は, 最大比増殖速度が親株の約80%, 細胞形態は若干小さくなる傾向を示すが, 最終到達濁度は野生株とほぼ同等で, 核も正常に分配されている. 削除領域である染色体末端はヘテロクロマチンを形成するタンパク質が結合する領域であるため, テロメアへの影響も懸念されたが, 栄養培地で100世代細胞分裂を行ってもテロメア長に異常は観察されなかった. 以上の結果から, IGF742株の生育特性に関しては, ほぼ野生株と同等の安定性を維持し, 物質生産用宿主として使用可能であると判断した.

分裂酵母大規模遺伝子削除株による物質生産

一連の操作で得られた各種染色体大規模削除株を宿主として, モデルタンパク質を用いた物質生産評価を実施した. モデルタンパク質として, 緑色蛍光タンパク質 (EGFP) は細胞内におけるタンパク質合成効率, 一方, ヒト成長ホルモン (hGH) とヒトトランスフェリン (hTF) にはN末端にシグナル配列を付加し, タンパク質合成効率に加えて分泌効率も評価した. 合成培地 (EMM) におけるEGFPタンパク質合成効率は, ART削除株を中心に削除サイズを増やすごとに高くなり, 最終的にIGF742株は野生株の約1.7倍生産量が高まることがわかった. また栄養培地 (YPD) を用いたhGHとhTFの分泌発現解析では3領域削除の統合株で分泌発現効率が最も高い値を示した(図2). 以上の結果, 染色体の不要な領域を削除することで, これら3つのモデルタンパク質に対する生産性の向上が確認された(図2). たとえばEGFPの生産については, 染色体末端領域の削除に伴って生産量が増加しており, 削除した特定の1つの遺伝子が影響し

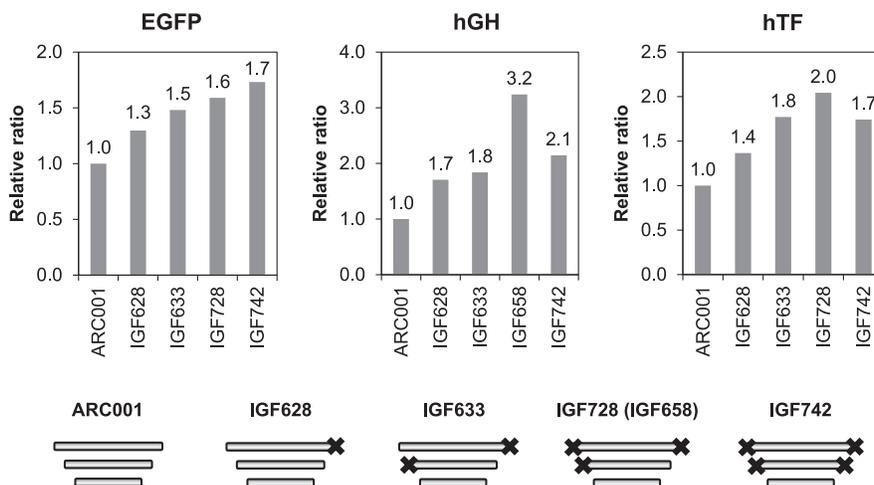


図2. 染色体大規模削除株における物質生産効率. 緑色蛍光タンパク質 (EGFP), ヒト成長ホルモン (hGH), ヒトトランスフェリン (hTF) を用いた物質生産効率を相対値で示した. ARC001は染色体を削除していない野生株, IGF番号を付けた株は染色体削除株である. グラフの下には染色体削除領域を模式図で示した. 模式図中の×印の領域は, 遺伝子を削除している領域である.

ているのではなく、100 kb以上の染色体領域の削除により生産性が向上するという興味深い結果が得られた。

大規模遺伝子削除株の細胞内では何が起きているのか？

本研究は、染色体を縮小することによって無駄なエネルギー消費を抑制し、物質生産効率を向上させるというコンセプトをもとに進められてきた⁹⁾。それでは実際に異種タンパク質生産性が向上した染色体大規模削除株 IGF742株の細胞内では、どのような現象が生じているのだろうか。まず筆者らは、EGFPを菌体内生産する IGF742株を培養してトランスクリプトーム解析を行った。その結果、IGF742株の特徴として、一部の窒素飢餓で誘導される遺伝子の発現が上昇しており、アンモニアトランスポーターなどの発現量も上昇していた。さらに、取り込んだアンモニアを利用して、グルタミン酸やグルタミンを生合成する遺伝子の発現量が増加していた。グルタミン酸は、さまざまなアミノ酸生合成過程においてアミノ基供与体として機能している。これは IGF742株では各種アミノ酸生合成過程が亢進しているため、グルタミン酸合成遺伝子の発現量が増加している可能性が示唆された。ただしメタボローム解析結果から、IGF742株ではアミノ酸生合成系の最終産物となる各種アミノ酸の量が全体的に増加しているというわけではなく、増加を示したアミノ酸はシステインのみで、逆にアラニン、セリン、グルタミン酸、ヒスチジン、イソロイシン、アルギニン、メチオニンなどは減少していた。また、エネルギー通貨となるATP量が増加していることから、アミノ酸生合成を含む細胞内の代謝活性が上がっていることが示唆された。さらに、GTP量も増加していることから、GTPを必要とするリボソームによるタンパク質の生合成も亢進しており、それに伴いIGF742株では異種タンパク質EGFP合成量が増加していることが予想された。

遺伝子削除—どの遺伝子が不要でどの遺伝子が必要か？

真核微生物である分裂酵母は、原核生物の大腸菌や枯草菌とは異なり、必須遺伝子が染色体上にほぼ均等間隔で存在しており、大規模に染色体を削除する試みはきわめて困難であった。しかしながら、分裂酵母の染色体を縮小化することで、異種タンパク質の生産性を向上することも可能であることがわかった。IGF742株で削除された216遺伝子の中には機能が明らかにされている遺伝子も存在するが、興味深いのは、なぜ野生株よりもEGFPの菌体内生産量が増加するかを説明できる遺伝子

を特定することは現時点では難しいことである。つまり IGF742株の細胞内代謝系の変化は、特定の遺伝子を削除した効果より、むしろ染色体を大規模に削除したことによる影響ではないかと考えている。もし単純に遺伝子の発現数が減少した分裂酵母株を作製したいのであれば、染色体領域を削除するのではなく、種々の遺伝子発現に重要な各種転写因子遺伝子を削除してやれば可能である。筆者らは分裂酵母の種々の転写因子を破壊した株についても、異種タンパク質生産性について検討を行っている。今後はこれらの株と比較を行うことで、大規模遺伝子削除株の物質生産能が向上する理由について、さらに解析を進めていきたい。

分裂酵母を物質生産宿主として利用するためには、合成されたタンパク質が分裂酵母自身の持つプロテアーゼにより分解されることを防ぐ必要がある。筆者らは、分裂酵母の多重プロテアーゼ遺伝子削除による異種タンパク質の分解を抑制する技術¹⁰⁾やシャペロンの過剰発現により異種タンパク質の分泌効率を上げる技術¹¹⁾を有しており、これらの機能を大規模遺伝子削除株と適切に統合することで、さらに分泌タンパク質の生産性を上げることができると期待している。また、原核生物ではなく、分裂酵母で異種タンパク質生産を行う利点の一つとして、異種タンパク質へ糖鎖付加などの翻訳後修飾が可能であることが挙げられる。しかし、ヒト由来の糖タンパク質を分裂酵母により生産する場合、付加する糖鎖のタイプも分裂酵母型からヒト型へ改変する必要がある。今回構築した染色体大規模削除株について、異種タンパク質分解抑制、分泌効率、糖鎖構造についても改良を行うことで、さらに優れた物質生産宿主細胞を作り出したい。

本研究はNEDOプロジェクトの一環として実施された。

文 献

- 1) Gibson, D. G. *et al.*: *Science*, **329**, 52 (2010).
- 2) Mizoguchi, H. *et al.*: *DNA Res.*, **15**, 277 (2008).
- 3) Posfai, G. *et al.*: *Science*, **312**, 1044 (2006).
- 4) Morimoto, T. *et al.*: *DNA Res.*, **15**, 73 (2008).
- 5) Murakami, K. *et al.*: *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **75**, 589 (2007).
- 6) Kim, D. U. *et al.*: *Nature Biotechnol.*, **28**, 617 (2010).
- 7) Hirashima, K. *et al.*: *Nucleic Acids Res.*, **34**, e11 (2006).
- 8) Sasaki, M. *et al.*: *Yeast*, **25**, 673 (2008).
- 9) Giga-Hama, Y. *et al.*: *Biotechnol. Appl. Biochem.*, **46**, 147 (2007).
- 10) Idiris, A. *et al.*: *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **73**, 404 (2006).
- 11) Mukaiyama, H. *et al.*: *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **86**, 1135 (2010).