

学 位 論 文 要 旨

氏 名	永吉ちづる
題 目	<p style="text-align: center;">中度好塩菌における遺伝子発現と異種タンパク質生産に関する研究 (Studies of gene expression and production of heterologous proteins in moderately halophilic bacteria)</p>
<p>組換えタンパク質を得るための重要なツールである微生物発現系は、生育が速く、安価で大量に目的タンパク質を得ることができるという点で他の発現系にはない利点を有している。しかし一方で、高発現により、封入体の形成や不活性状態での発現などの弊害が生じる。利点を活かし、弊害を抑えるための改善点は、性質を変えることなく目的タンパク質の可溶性や安定性を上げることである。その目的のために今回着目したのが、優れた塩適応機構を有する中度好塩菌である。中度好塩菌は、外界の浸透圧に対抗して、塩ではなくアミノ酸や糖類、ポリオール類などといった適合溶質を細胞内に蓄積する「salt-out 戦略」をとり、非好塩菌に共通する浸透圧調節機構により細胞を維持しているが、外界の幅広い塩濃度変化に依存して細胞内塩濃度が大きく変動する。このことから、中度好塩菌は、細胞外塩濃度を変化させることで細胞内塩濃度の調節が可能であると考えられ、好塩菌由来や塩を要求するタンパク質の発現系として注目されてきた。しかしながら、近年、適合溶質の生体分子や細胞に対する保護効果が理解され、塩とタンパク質分子間の相互作用についての見識も深まるなかで、限定されたタンパク質のための発現系の枠を取り払い、より広範囲な異種タンパク質発現系という新たな視点から中度好塩菌発現系を確立したいと考えた。発現系において必要なプロモーターを、新たに中度好塩菌から単離し、そのプロモーター活性を中度好塩菌由来β-ラクタマーゼをレポーターとして使用し、評価した。単離されたポリンとシャペロニンのプロモーター推定領域は、中度好塩菌-大腸菌シャトルベクターpHS15プラスミド上に導入され、発現系に使用可能なレベルの転写活性を示した。さらに、広範囲の異種タンパク質に利用可能な中度好塩菌発現系の確立というテーマに則り、ヒト由来のセリンラセマーゼをターゲットとした中度好塩菌発現系を構築した。ヒト由来セリンラセマーゼは、一般的に汎用されている大腸菌においても発現系を構築し、大腸菌では不活性の封入体として得られる難発現性の酵素であることを確認した。中度好塩菌発現系の確立に先立ち、大腸菌発現系で得られた組換えタンパク質をリフォールディングさせ、活性型で得ることに成功したが、生化学的な研究を行っていくためには量的な問題が残った。新たに確立された中度好塩菌発現系は、この量的な問題を解決し、これまで研究された他のセリンラセマーゼの研究結果から推測するに、十分な生理活性を有している質的にも満足できる酵素を発現させた。以上の結果から、本研究で確立された中度好塩菌を宿主とする発現系は、異種タンパク質の発現を目的とした新たな微生物発現系の一つとして汎用されることが期待され、非常に意義深いものと考えられる。</p>	

学 位 論 文 要 旨

氏 名

Chizuru Nagayoshi

題 目

Studies of gene expression and production of heterologous proteins
in moderately halophilic bacteria

(中度好塩菌における遺伝子発現と異種タンパク質生産に関する研究)

Various host cells are used for a large scale production of recombinant proteins. Among them, bacterial cells are the most economic system due to their rapid growth and production cost. However, bacterial system often suffers expression of inactive, non-native protein as insoluble inclusion bodies. This problem may be overcome by increasing the stability of the expressed proteins. It would be desirable to increase the stability of the proteins by changing the cellular environment, but not by changing the protein sequence. Moderately halophilic bacteria may be ideal candidates as such a host cell. Moderately halophilic bacteria accumulate, against extracellular osmotic pressure, not only salts but also compatible solutes, including amino acids, sugars and polyols. Compatible solutes stabilize proteins in solution at sufficiently high concentration. As the intracellular concentration of compatible solutes can be modulated by changing the extracellular salt concentration, the stability of the expressed protein can also be modulated. I have initiated to establish the expression system using these bacteria.

First, a promoter was isolated from the moderately halophilic bacteria and its activity was examined using expression of beta-lactamase, as a reporter, derived from moderately halophilic bacteria. Both promoters from porin (*hopP*) and chaperonin (*groESL*) genes showed high transcriptional activity. This expression system using the above promoter was applied to the expression of human serine racemase (hSR). The hSR activity has been expected as a therapeutic target of neuropsychiatric diseases, since the product, D-Ser, is a modulator of the glycine site of N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptors. Abnormal activity of NMDA receptor was shown to relate to several psychiatric dysfunctions such as schizophrenia. Previously we expressed hSR in *E. coli* as insoluble inclusion bodies and were able to refold the protein into the active structure with detergent/cycloamylose-assisted method, but with a low yield. The newly developed expression system using moderately halophilic bacteria lead to soluble expression of hSR in an active form of high quality and quantity. These results demonstrate that the expression system developed using moderately halophilic bacteria can be used for an efficient, cost-effective production of heterologous proteins in an active form.

学位論文審査結果の要旨	
学位申請者 氏名	永吉 ちづる
審査委員	主査 鹿児島大学 教授 徳永 正雄
	副査 鹿児島大学 准教授 石橋 松二郎
	副査 琉球大学 教授 屋 宏典
	副査 佐賀大学 教授 渡邊 啓一
	副査 鹿児島大学 教授 八木 史郎
審査協力者	
題目	中度好塩菌における遺伝子発現と異種タンパク質生産に関する研究 (Studies of gene expression and production of heterologous proteins in moderately halophilic bacteria)
<p>生体組織や菌体など自然界の試料から天然状態のタンパク質を大量に得るには通常多くの時間と労力を必要とする。この状況を大きく改善して、有用タンパク質の解析や利用を飛躍的に進展させた技術が「組換えタンパク質発現系」である。現在では、高等動植物や昆虫細胞などでも遺伝子導入技術が確立され、より元の生体に近い環境での研究が進んでいるが、一方では不活性な封入体の形成など解決すべき課題も多い。好塩菌は通常生物が生息できない高い塩分濃度環境に適応して生育できる特殊能力を持っている。中度好塩菌は、0.2M～飽和食塩濃度までの極めて幅広い塩環境で生育でき、菌体内にいわゆる「適合溶質」と呼ばれる有機化合物を蓄積して外界の高塩濃度に対抗するとともに、菌体内タンパク質をはじめとする生体成分の安定化を図っている。</p> <p>本論文では、この中度好塩菌を宿主に用いた新たな「活性型異種タンパク質高効率発現系」の構築を目的とし、強力なプロモーターの分離とそのためのレポーターアッセイ系の確立、新たな選択マーカーの利用、形質転換法の検討などを行った。これらの知見を基に、大腸菌では完全に封入体を形成してしまう難発現性</p>	

タンパク質であるヒト脳由来セリンラセマーゼ (hSR) を活性を持った可溶性の状態で発現させることに成功し、均一に精製後その酵素化学的性質を明らかにした。hSRはグリア細胞に局在し、生成産物であるD-SerはNMDA受容体の内因性コアゴニストとして働き、統合失調症やアルツハイマー病をはじめとする脳機能障害と強い関連が示唆されており、治療や創薬の有望なターゲットと考えられている。

まず中度好塩菌由来の強力なプロモーターを分離する目的で、その転写活性を評価するために活性測定が容易で安定性が高い中度好塩菌由来の β -ラクタマーゼ (BLA) をレポーターとして用いたアッセイ系を開発した。次に強力かつ構成的に発現していると考えられる中度好塩菌外膜主要タンパク質ポーリン遺伝子よりプロモーター領域と予測できる領域を分離し、その活性を評価したところ、元のBLAプロモーターと比較して約5倍高いプロモーター活性を示した。さらに、熱ショックにより合成が強力に誘導されると期待されるシャペロニン (GroESL) 遺伝子領域をクローニングし、塩基配列を明らかにするとともにそのプロモーター領域の転写活性を測定した。宿主として醤油もろみから分離した中度好塩菌 *Halomonas* sp. 40株を、またプロモーターにはポーリンプロモーターを用いてN末端にHis-tagを付加したHis-hSRの発現を試みたところ、1000~1300U/mgという高い比活性を持った可溶性His-hSRが発現し、1リッター培養液あたり約200 μ gの均一な標品を精製できた。封入体として大腸菌で発現したものから *in vitro* で得た可溶化His-hSR標品に比べ、比活性で2倍、タンパク質濃度で約50倍の高純度の酵素標品を得ることができた。このHis-hSRは、Serのラセミ化反応に加え、セリンデヒドラターゼ活性 (L-SerもしくはD-Serからピルビン酸を生成) を有しており、*in vivo* では脳内Ser濃度をコントロールしていることが示唆された。50 $^{\circ}$ C以上の熱処理で急速に失活し、凍結融解処理でも活性を失う不安定な酵素であった。活性にはピリドキサルリン酸を補酵素として、またMg²⁺、Ca²⁺などの2価金属を要求し、至適pHは、8.8~9.0であった。また1 mM ATPの添加で、両酵素活性とも3倍程度比活性が上昇した。ヒト脳由来hSRの基本的な酵素化学的性質を詳細に明らかにできたのは今回が最初であり、中度好塩菌の異種タンパク質発現系について種々の要素を検討し、中度好塩菌を宿主に用いた「活性型異種タンパク質高効率発現系」を確立できたことは、大きな成果と考えられる。よって、本論文は博士 (農学) の学位論文として十分に価値あるものと判定した。

最終試験結果の要旨	
学位申請者 氏名	永吉 ちづる
審査委員	主査 鹿児島大学 教授 徳永 正雄
	副査 鹿児島大学 准教授 石橋 松二郎
	副査 琉球大学 教授 屋 宏典
	副査 佐賀大学 教授 渡邊 啓一
	副査 鹿児島大学 教授 八木 史郎
審査協力者	
実施年月日	平成19年 12月 27日
試験方法 (該当のものを○で囲むこと。) <input checked="" type="radio"/> 口答 <input type="radio"/> 筆答	
<p>主査及び副査は、平成19年12月27日の公開審査会において学位申請者に対して、学位申請論文の内容について説明を求め、関連事項について試問を行った。具体的には別紙のような質疑応答がなされ、いずれも満足できる回答を得ることができた。</p> <p>以上の結果から、審査委員会は申請者が博士（農学）の学位を受けるに必要な十分の学力ならびに識見を有すると認めた。</p>	

学位申請者	
氏名	永吉 ちづる

[質問 1] hSRを大腸菌で発現させ時、可溶性画分には、全く発現しなかったのか？

[回答 1] 37℃での発現では、可溶性画分には全くしなかった。低温培養では、少し発現したが、酵素活性は認められなかった。

[質問 2] 大腸菌では活性のあるhSRが全く取れなくて、中度好塩菌では旨く行く主な原因は、どのように考えているか？

[回答 2] 中度好塩菌の利点は、外界の浸透圧に対抗して細胞内に適合溶質と塩を蓄積することであり、これらが異種タンパク質のfoldingを助けることが予想される。現時点では、まだ適合溶質の種類や量の変動などの定量はしていないが、大腸菌における低温発現により少量発現した可溶性hSRは活性を持たないので、中度好塩菌では、適合溶質の効果があると期待できる。

[質問 3] 中度好塩菌は、培地の塩濃度を変化させると細胞内の塩の濃度も変わるか？

[回答 3] 外部環境の塩濃度に対応して細胞内塩濃度も変化することが知られている。

[質問 4] 今回hSRを発現させた時の培地の塩濃度は？

[回答 4] 0.3 Mぐらいから、3 M, 4 Mまで、この菌が生育できる範囲内で調べた。

hSRは、あまり高塩濃度では、発現が抑制される傾向であった。

[質問 5] 例えば、培地塩濃度がかなり高い時には、hSRの可溶性への発現効率はどうなっていたか？

[回答 5] 形質転換体は、非形質転換体よりも極端な塩環境では生育がより抑制されるので、その生育抑制の影響が大きく、可溶性への発現効率の差は良く分からなかった。

[質問 6] *groE* のプロモーター活性と *bla* プロモーター活性と比較して、その強さはどうか？

[回答 6] *groE* のクローニングに時間がかかり、先ほど発表したデータのみで、詳細な検討は未だ行っていない。

[質問 7] ポーリンのプロモーターは明らかに転写活性が強いが、それに比べてどうか？

[回答 7] 形質転換に用いた宿主菌株が異なるので、現時点では直接比較できないが、今後は是非検討してゆきたい。

[質問 8] *groE* プロモーターの温度変化で、高温では活性がかえって低下しているようなデータであったが、BLAの蛋白量も測定しているか？

[回答 8] BLA蛋白量は、あまり変化がないという結果である。

[質問9] そうすると BLA の安定性とかの問題か？

[回答9] BLA は、*in vitro* で良く調べられていて、とても安定な酵素であることが分かっている。*groE* プロモーターの転写活性の詳細については、今後検討したい。

[質問10] 中度好塩菌において、可溶性で発現した理由は、適合溶質の働きが大きいのか、それともシャペロンの効果もあると考えられるが、どちらの効果が大きいのか？

[回答10] 適合溶質の種類によって効率が異なると考えられるので、適合溶質の効果の方が大きいと考えている。

[質問11] いったん、活性のある状態で取れたら、その後は、溶質は必要ないのか？

[回答11] いったん可溶性で取れたものは、活性測定時には溶質は必要ない

[質問12] 大腸菌から refolding して得た標品と中度好塩菌で可溶性で発現した標品では、どの程度性質に違いがあるのか？

[回答12] 二価金属の効果に若干の違いが認められた。

[質問13] 両方で比活性が異なる原因は？ 中度好塩菌からの標品のほうが、実際に生体内のものに近いのか、それとも夾雑タンパク質が少ないのか？

[回答13] 大腸菌から refolding した hSR の比活性はマウス、ラットのものと同程度だったので、これがヒトの天然型の活性と判断していた。しかし、今回中度好塩菌で得られたものは、もっと高い比活性を示した。生体から取ったもののデータがないので、どちらが近いかは議論できない。

[質問14] 電気泳動などで、両蛋白質の純度はどうか？

[回答14] refolding したものは、Q カラムを通してあるので、よりきれいかもしれない。

[質問15] 両標品の安定性の比較はどうか？

[回答15] refolding させたサンプルは、蛋白濃度がかなり薄いので、直接は比べられないが、4℃保存で活性は24時間ぐらいいは安定である。中度好塩菌からのものは、1週間は安定。

[質問16] 発現効率の良い培養条件があるが、その要因はどのように考えるか？

条件検討の時の実験は、統計的な処理もできるのではないかと？

[回答16] 統計的な処理はしていない。

[質問17] 培養条件の組み合わせ、たとえば、塩濃度と培養温度の関係は？

[回答17] 低温条件では、低塩濃度で生育しやすく、高い温度では、高濃度塩条件のほうが生育が良い傾向がある。

[質問18] refolding 条件の検討で、各因子の相乗効果はあるか？

[回答18] 相乗効果は認められる

[質問19] 中度好塩菌の最適生育温度は？

[回答19] 30℃～42℃で良好な生育を示します。

[質問20] 発現の収率というのは、菌体量当たりか、培地量当たりか？

[回答20] 菌体量当たりの収率で、培養ステージをそろえて取っている。

[質問21] エナンチオカラムで、Serの検出を254nmで測定している理由は？

[回答21] 1mM CuSO₄ とSerの錯体の吸収254nmを用いている。

[質問22] refoldingさせた標品はQカラムを素通りしているが、Sカラムは試してみたか？

[回答22] この時点では、十分精製できたと判断していたのでやっていません。