

## 平成 27 年度 全体研究開発報告書

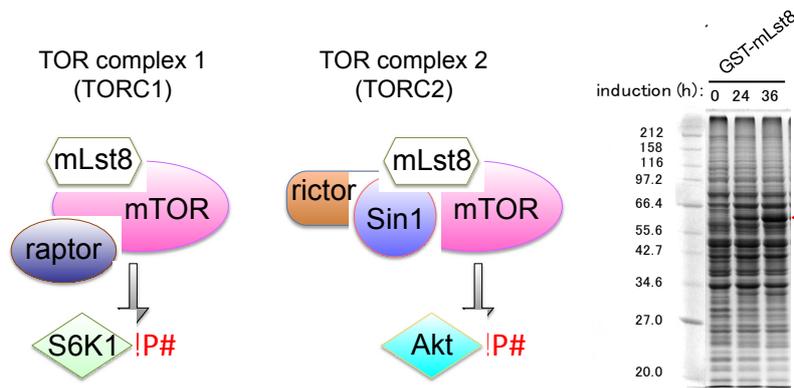
1. 補助事業名：創薬等ライフサイエンス研究支援基盤事業（創薬等支援技術基盤プラットフォーム事業）
2. 補助事業課題名：最先端 NMR 構造解析に向けた蛋白質試料評価調製システムの高度化と外部支援(多様な発現系の整備支援と高度化)
3. 研究開発代表者：国立大学法人奈良先端科学技術大学院大学 バイオサイエンス研究科  
教授 塩崎 一裕
4. 研究開発の成果

細胞の増殖や代謝をコントロールする細胞内シグナル伝達経路の異常は、癌や代謝病に多くみられ、事実、タンパク質キナーゼ等を中心にシグナル伝達経路の構成因子を標的とする創薬は成功例が蓄積しつつあり、今後も多いに期待されている。従って、シグナルタンパク質の簡便な発現・精製システムの確立は、構造解析とそれに基づいた創薬に貢献するものと期待されるが、タンパク質発現系として汎用される大腸菌では産生の困難な真核生物シグナルタンパク質が数多い。昆虫細胞や哺乳類培養細胞によってヒト・シグナルタンパク質の産生も行われているが、これらの発現系は時間、労力、経費のすべての点において極めてコストが高い。

真菌を宿主とする、より安価な真核生物発現系としては、これまでに出芽酵母、麴カビ、ピキア酵母が使われてきたが、分裂酵母(*Schizosaccharomyces pombe*)はそのいずれとも進化的に遠く隔たっており (>10 億年)、遺伝子発現機構やタンパク質の翻訳後修飾などでも大きな違いが見られる。NMR によるタンパク質構造およびその動態の解析やタンパク質間相互作用の検出には、試料生産の際に安定同位体標識を行う必要があるため、最少培地での培養が必要になるが、大腸菌以外で最少培地が利用可能な宿主は極めて少ない。酵母は最少培地が利用可能であり、NMR 試料生産にとっても貴重な宿主である。

### ① 分裂酵母発現系を用いたヒト由来タンパク質の組換え発現

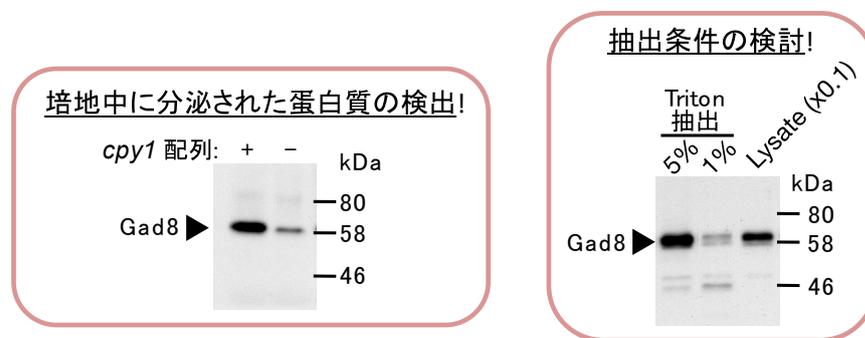
本課題では、培養培地に含まれるビタミン B1 によって制御の可能な誘導型 *nmt1* プロモーターを用いた分裂酵母発現ベクターによって各種組換えタンパク質の産生を試みてきた。本年度に支援案件として取り組んだのは、ヒト由来 mLST8 タンパク質の産生である。mLST8 (326 残基、36 kDa) は、これまでに報告されている Target Of Rapamycin (TOR) キナーゼの制御サブユニットの中で最も安定的に TOR キナーゼに結合するサブユニットで、TOR complex 1 (TORC1) および TOR complex 2 (TORC2) 複合体の両方に含まれる (下図)。モデル生物における遺伝学的解析によると、TORC2 の活性には必須であるが TORC1 の機能には必須でない可能性があり、TOR キナーゼの触媒活性そのものに必要なサブユニットではないと考えられるが、その分子機能は不明である。



大腸菌での組換え発現では mLST8 の産生レベルは極めて低かったものの、分裂酵母を宿主として用いた場合には、発現誘導後 24-36 時間でクーマシー染色によって顕著なバンドとして検出されるレベルまで組換えタンパク質の蓄積が見られた（上図、赤矢頭）。

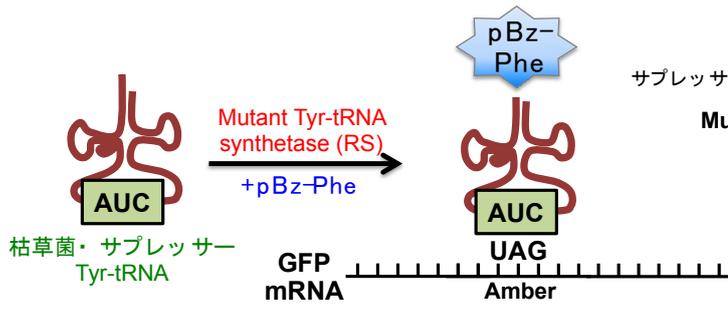
## ② 分裂酵母タンパク質発現系の高度化

分裂酵母を宿主とするタンパク質発現系の改変型として、組換えタンパク質を細胞外に分泌する蛋白質発現系の構築を目指し、目的とする蛋白質のアミノ末端に、カルボキシペプチダーゼ-Y (Cpy1) の分泌シグナル配列 (17アミノ酸残機) を融合して発現させるベクターを構築した。試行実験として、通常、細胞質で発現しているタンパク質キナーゼ Gad8 をこのベクターから発現させたところ、培地中に分泌された Gad8 キナーゼが検出できた (下図左)。さらに、弱い界面活性剤を含むバッファーを用いることによって、分泌後に菌体に吸着している Gad8 タンパク質を効率よく回収できることを見出した (下図右)。



## ③ 分裂酵母産生蛋白質への人工アミノ酸置換システムの導入

分裂酵母発現系において発現した組換えタンパク質の構造決定およびタンパク質間相互作用の解析を容易にするために、特定の残基の標識・修飾を可能とする人工アミノ酸置換システムの分裂酵母への導入を行った。まず、大腸菌のサプレッサー  $tRNA^{Tyr}$  および変異型のチロシル tRNA 合成酵素を分裂酵母において発現するプラスミドを構築した。この変異型チロシル tRNA 合成酵素は、チロシンの代わりに光反応性の人工アミノ酸である *p*-benzoyl-L-phenylalanine (pBz-Phe) をサプレッサー  $tRNA^{Tyr}$  に付加することができる。緑色蛍光タンパク質 (GFP) をコードする塩基配列において、目的の残基 (下図の例は Tyr-40) をコードするコドンを終止コドン (アンバー) に置換した発現プラスミドと共に分裂酵母に導入したところ、終止コドンの位置に pBz-Phe が挿入された組換えタンパク質の発現が確認できた。すなわち、組換え発現するタンパク質の目的の残基を、培地に添加した人工アミノ酸に置換することが分裂酵母で可能となった。



		GFP-Y40amber					
サブプレッサー Tyr-tRNA:	+	-	+	+	-	+	
Mutant Tyr-RS:	-	+	+	-	+	+	
pBz-Phe:	-	-	-	+	+	+	
GFP							+
Control							+