

平成28年度医療研究開発推進事業費補助金
(創薬等ライフサイエンス研究支援基盤事業) 補助事業成果報告書

I. 基本情報

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）
Platform Project for Supporting Drug Discovery and Life Science Research
(Platform for Drug discovery, Informatics, and Structural life science)

補助事業課題名：（日本語）「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）
（英語）Support and upgrade of sample evaluation/preparation system for advanced protein NMR study (Development and support of diverse protein expression systems)

補助事業担当者（日本語）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
所属 役職 氏名：（英語）Kazuhiro Shiozaki, Professor, Graduate School of Biological Sciences, Nara Institute of Science and Technology

実施期間：平成 28 年 4 月 1 日 ～ 平成 29 年 3 月 31 日

II. 成果の概要（総括研究報告）

鎌田芳彰助教（国立基礎生物学研究所 進化多様性生物学領域）からヒト mLST8 タンパク質の組換え産生の依頼を受け、本事業で高度化を進めた分裂酵母 (*Schizosaccharomyces pombe*) 発現系を用いてその大量生産に成功した。ラパマイシンは免疫抑制剤としてだけでなく、抗ガンや寿命延長作用など多様な活性が報告されており、その細胞内標的因子は Target Of Rapamycin (TOR) と名付けられた Ser/Thr-特異的タンパク質キナーゼである。mLST8 は TOR キナーゼと安定に結合する主要サブユニットの一つであるが、その役割や生理学的機能は明らかでない。mLST8 タンパク質を分裂酵母で組換えタンパク質として生産・精製し、TOR 複合体サブユニットやその他の細胞内タンパク質との相互作用の生化学的・構造生物学的解析を可能にするために、GST 融合タンパク質としてビタミン B1 誘導プロモーターから発現することによってクーマシー染色レベルの発現を確認した。タンパク質分解酵素遺伝子の多重破壊株を宿主として発現効率と安定性の向上にも成功し、さらにアフィニティ精製を行った。一部、不溶であったものの、可溶画分から精製できたものについてはヒト培養細胞

抽出液と混合し、mTOR キナーゼとの結合活性を検定することができた。

分裂酵母を宿主として発現したタンパク質の簡便な精製を可能にし、その発現系の汎用性を高めるために、ビタミン B1 飢餓で発現誘導可能な *nmt1* プロモーターや熱ショックタンパク質遺伝子プロモーターを持つベクターを構築し、さらに GST や各種 epitope tag との融合タンパク質を発現するためのベクターを準備した。真核生物由来タンパク質の組換え生産のモデルケースとして、酵母およびヒト細胞由来のタンパク質キナーゼの大量発現と精製の試行実験を行い、産生したキナーゼの活性確認に成功した。また、組換えタンパク質を培地中に分泌させることを目的として、分泌シグナル配列を用いた分裂酵母発現ベクターを新たに構築した。すなわち、目的とするタンパク質のアミノ末端に、カルボキシペプチダーゼ-Y (Cpy1) の分泌シグナル配列を融合して発現させるベクターを作成して、タンパク質キナーゼ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目的タンパク質が検出できた。また、弱い界面活性剤を用いることによって、分泌後に菌体に吸着している組換えタンパク質を効率よく回収できることを見出した。さらに、強力な熱ショックタンパク質遺伝子のプロモーターを組み込んだ発現プラスミドやタンパク質分解酵素遺伝子を多重破壊した宿主株を新たに導入し、細胞毒性のない組換えタンパク質の組換え発現において産生量や粗抽出液中の安定性を高めることにも成功した。

分裂酵母を用いて発現した組換えタンパク質の構造解析や複合体解析を可能にするための分子標識技術として、¹⁴N 標識や組換えタンパク質中の特定の残基を人工アミノ酸に置換する技術を確立した。分裂酵母で発現する組換えタンパク質の ¹⁴N 標識に用いる EMM (Edinburgh Minimal Medium) 培地中の塩化アンモニウム濃度を減少させた場合の分裂酵母細胞の生育とタンパク質発現を検討し、塩化アンモニウム濃度の最適化を行った。また、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を確立するために、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。組換え発現するタンパク質をコードする塩基配列において、目的の残基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培地に添加した人工アミノ酸が挿入された組換えタンパク質の発現が確認できた。光反応性の人工アミノ酸を導入した場合には、分裂酵母生細胞に紫外線を照射することで複合体構成因子間に架橋反応を誘導することにも成功し、他研究者への技術供与が可能になった。

Rapamycin is a potent immunosuppressant, but this drug is also known for its activities against cancer cell proliferation and for life span extension. The cellular target of rapamycin is a Ser/Thr-specific protein kinase named TOR, which forms a high molecular weight complex together with multiple regulatory subunits, including mLST8. Here we show that human mLST8 can be produced at a high level as a recombinant protein in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. The protein was successfully expressed from the thiamine-repressible promoter as a fusion to glutathione *S*-transferase (GST) at a detectable level by Coomassie blue staining. Expression in a fission yeast strain which lacks multiple protease genes allowed increased expression and stability of GST-mLST8. The soluble fraction of GST-mLST8 was affinity-purified and assayed for its ability to bind the mTOR protein kinase in the lysate of cultured human cells. These studies contribute to biochemical and structure biological analyses of mLST8 to elucidate its function.

The fission yeast *S. pombe* is only distantly related to the budding yeast *Saccharomyces* and

can serve as a unique eukaryotic host to express recombinant proteins. To further develop the fission yeast expression system for diverse research purposes, we constructed a number of expression vectors using the thiamine-repressible promoter and the heat-shock gene promoter in combination with different types of tag sequences such as GST and the commonly used epitope tags. Using those vectors, protein kinases from fission yeast and humans were successfully overproduced in their active forms. We also constructed a vector to express recombinant protein as a fusion with the secretion signal sequence derived from the carboxypeptidase Y (Cpy1), so that the protein can be recovered in the culture medium in the presence of mild detergent. In addition, new expression vectors with the heat shock gene promoter and a strain lacking multiple protease genes were found to significantly improve production and stability of recombinant proteins.

Analysis of protein structure by NMR and X-ray crystallography as well as dissection of protein-protein interactions within a complex are greatly aided by molecular labeling techniques. Here we have developed methodologies to label recombinant proteins expressed in the fission yeast system. For ^{14}N -labeling of recombinant proteins, concentration of NH_4Cl in the Edinburgh Minimal Medium (EMM) was optimized by examining the rates of host strain growth and protein expression at different NH_4Cl concentrations. In addition, a protocol to incorporate unnatural amino acids (UAA) into recombinant proteins has been established; we constructed a plasmid to express the bacterial amber suppressing tRNA^{Tyr} together with a modified version of Tyr aminoacyl-tRNA synthetase. In fission yeast strains carrying this plasmid, UAA was successfully inserted to recombinant protein where the amber codon was introduced within the gene encoding the recombinant protein. When photo-reactive UAA was used, interacting proteins were covalently crosslinked within living *S. pombe* cells irradiated by UV light. These techniques are expected to allow researchers to utilize fission yeast as a protein expression system useful for protein structure and *in-vivo* interaction studies.

III. 成果の外部への発表

(1) 学会誌・雑誌等における論文一覧 (国内誌 1 件、国際誌 4 件)

1. Kataoka S, Fruita K, Hattori Y, Kobayashi N, Ikegami T, Shiozaki K, Fujiwara T, Kojima C. ^1H , ^{15}N and ^{13}C resonance assignments of the conserved region in the middle domain of *S. pombe* Sin1. Biomolecular NMR Assignments. 2015, 9, 89-92.
2. Furuita K, Kataoka S, Sugiki T, Hattori Y, Kobayashi N, Ikegami T, Shiozaki K, Fujiwara T, Kojima C. Utilization of paramagnetic relaxation enhancements for high-resolution NMR structure determination of a soluble loop-rich protein with sparse NOE distance restraints. Journal of Biomolecular NMR. 2015, 61, 55-64.
3. Hatano T, Morigasaki S, Tatebe H, Ikeda K, Shiozaki K. Fission yeast Ryh1 GTPase activates TOR Complex 2 in response to glucose. Cell Cycle. 2015, 14, 848-56.
4. 福田智行, 塩崎一裕. Mammalian target of rapamycin (mTOR). 生体の科学. 2015. 66, 436-7.

5. Tatebe H, Murayama S, Yonekura T, Hatano T, Richter D, Furuya T, Kataoka S, Furuita K, Kojima C, Shiozaki K. Substrate specificity of TOR complex 2 is determined by a ubiquitin-fold domain of the Sin1 subunit. eLife. 2017, 6, e19594.

(2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表

1. TOR キナーゼの基質特異性を決定する分子メカニズム, 口頭, 塩崎一裕, 第 35 回日本分子生物学会年会, 2012/12/13, 国内.
2. 環境ストレスを感知する MAP キナーゼの機能と制御, 口頭, 塩崎一裕, 変異機構研究会 第 26 回夏の学校, 2013/6/22, 国内.
3. Osmostress signaling by the Wis4-Win1 MAPKKK heteromer stabilized by the Mcs4 response regulator, 口頭, Shiozaki K, Morigasaki S, Ikner A, Tatebe H, 7th International Fission Yeast Meeting, 2013/6/26, 海外.
4. Sin1 is a conserved substrate-binding subunit of the Target Of Rapamycin (TOR) protein kinase, ポスター発表, Yonekura T, Murayama S, Tatebe H, Kataoka S, Furuita K, Kojima C, Shiozaki K, 7th International Fission Yeast Meeting, 2013/6/27, 海外.
5. インスリンシグナル経路に相同な分裂酵母グルコース応答経路, 口頭, 塩崎一裕, 第 76 回酵母研究会講演会, 2013/8/8, 国内.
6. Mechanisms that determine the substrate specificity of TOR kinase, 口頭, Shiozaki K, Cell Biology of Yeasts, 2013/11/7, 海外.
7. TORC2 制御サブユニットの必須分子機能, 口頭, 建部恒, 児嶋長次郎, 塩崎一裕, 第 36 回日本分子生物学会年会, 2013/12/5, 国内.
8. 分裂酵母 TOR キナーゼ複合体はスフィンゴ脂質生合成の制御に関与する, 口頭, 江森翠, 秦野智行, 建部恒, 塩崎一裕, 酵母遺伝学フォーラム 第 47 回研究報告会, 2014/9/2, 国内.
9. なぜTORC2はTORC1の基質をリン酸化できないのか, 口頭, 秦野智行, 建部恒, 塩崎一裕, 第 4 回 TOR 研究会, 2014/9/17, 国内.
10. TOR キナーゼ複合体 2 (TORC2)の環境応答制御とその生理学的意義, 口頭, 建部恒, 秦野智行, 森ヶ崎進, 江森翠, 塩崎一裕, 第 37 回日本分子生物学会年会, 2014/11/25, 国内.
11. Genetic dissection of Target of Rapamycin (TOR) signaling in cellular growth response to nutrients, 口頭, Shiozaki K, Hiroshima Research Center for Healthy Ageing (HIHA) 4th Workshop, 2015/6/19, 国内.
12. Negative regulation of TOR complex 1 by heterodimeric Gtr1-Gtr2 GTPases, 口頭, Fukuda T, Tatebe H, Shiozaki K, 8th International Fission Yeast Meeting, 2015/6/25, 国内.
13. Regulation and function of the two Target of Rapamycin (TOR) complexes, 口頭, Shiozaki K, 日本分子生物学会・日本生化学会 合同大会, 2015/12/1, 国内.
14. Target of Rapamycin (TOR) signaling from and to vacuoles/lysosomes, 口頭, Shiozaki K, International Symposium: Protein Trafficking and Intracellular Signaling of Plant and Fungal Cells, 2016/2/9, 国内.

15. 分裂酵母 GATOR1-Gtr1 経路による TORC1 活性制御機構の解析, 口頭, 松田崇斗, Chia K-H. Sofyantro F, 天井貴光, 福田智行, 建部恒, 塩崎一裕, 酵母遺伝学フォーラム 第 49 回研究報告会, 2016/9/10, 国内.
16. Genetic dissection of Target Of Rapamycin (TOR) signaling conserved from yeast to humans: Regulation of TOR complex 1, 口頭, Shiozaki K, Philippine Society for Cell Biology 1st International and 7th Annual Convention and Scientific Meeting, 2016/10/20, 海外.
17. Genetic dissection of Target Of Rapamycin (TOR) signaling conserved from yeast to humans: Substrate recognition by TOR complex 2, 口頭, Shiozaki K, Philippine Society for Developmental Biology 8th Annual National Convention, 2016/10/22, 海外.

(3) 「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み

1. iPS 細胞だけじゃない – 「スーパーモデル」酵母細胞, 塩崎一裕, NAIST カフェ (東京), 2012/11/24, 国内.
2. 酵母から学ぶヒト細胞のしくみと病気, 塩崎一裕, 関西文化学術研究都市 6 大学連携市民公開講座, 2013/9/13, 国内.
3. 英検 4 級の酵母研究者がアメリカで大学教授になった話, 塩崎一裕, バイオサイエンス・カフェ (東京), 2016/2/13, 国内.
4. 英検 4 級の酵母研究者がアメリカで大学教授になった話, 塩崎一裕, バイオサイエンス・カフェ (大阪), 2017/3/11, 国内.

(4) 特許出願

該当なし