

酵母発現系を用いたハイスループット構造生物学



京都大学大学院農学研究科応用生命科学専攻 助教 水谷 公彦

はじめに

構造生物学は、農芸化学を含む生命科学の発展にとって欠くことのできない分野となった。筆者は、これまで一貫してX線結晶構造解析を手法とする分泌タンパク質、膜タンパク質の構造と機能の研究に取り組んできた。とくに、鉄を結合輸送するタンパク質であるトランスフェリンのX線結晶構造解析を中心として研究を行い、鉄結合に伴うドメインの大きな動きのしくみ、鉄放出のしくみの詳細などを解明した。このような構造生物学的研究において、目的タンパク質の調製を効率的に行う必要から、筆者は酵母 *Pichia pastoris* 発現系を用いており、トランスフェリンの大量調製とX線結晶構造解析に成功した。また、*P. pastoris* を用いた発現系をハイスループットで構築する方法を新たに開発し、今まで構造が不明であったメダカの α -アミラーゼなどのX線結晶構造解析に成功した。さらに、数種類のヒト、メダカなどの膜タンパク質の発現にも成功し、本方法が膜タンパク質、分泌タンパク質の発現系構築、構造決定に広く応用可能であることを示した。

1. ハイスループット発現系構築法の開発

メタノール資化性酵母 *Pichia pastoris* は高密度で培養が可能なこと、強力なプロモーターをもつことなどから、真核生物の分泌タンパク質や膜タンパク質の有用な発現ホストとして知られる。近年、*P. pastoris* による発現タンパク質は結晶構造解析にも用いられ、Gタンパク質共役受容体(GPCR)の構造決定などの成功を収めている。通常、*P. pastoris* の発現系構築は煩雑なものであるが、筆者は *P. pastoris* 細胞内でのDNA相同組換えを利用してハイスループットで簡単に発現系を構築する方法を開発、発表した。PCRでプラスミドと相同な配列を両端に付加した目的遺伝子と直線化したプラスミドを用いて通常の *P. pastoris* の形質転換操作を行うことで、酵母細胞内でDNA間の相同組換えが起こり発現プラスミドの構築と発現系の構築が同時にできる。実際にメダカのアンモニウムトランスポーター、メラトニンレセプター、*Saccharomyces cerevisiae* のCTR1、HSP30、ヒトの苦味受容体TAS2R16、トランスフェリンレセプターなど膜タンパク質(GFP融合体)の発現系を構築し、誘導後に蛍光顕微鏡観察による細胞内での局在の確認、蛍光強度測定による発現量の決定などの評価を行った(図1)。今後、*P. pastoris* によるハイスループットでのさまざまな膜タンパク質の発現系構築とその評価、およびタンパク質の調製、機能解析、結晶化などに応用可能である。

2. ハイスループット発現系構築法の分泌タンパク質生産への応用

ハイスループット発現系構築法は、分泌シグナルとタンパク質本体を正確、簡単につなぐこともできるため、分泌タンパク質にも広く応用可能である。実際に、メダカの分泌タンパク質 α -アミラーゼについて、発現系構築、精製、結晶構造解析を行

い報告した。メダカの α -アミラーゼは、ブタやヒトなど哺乳類の α -アミラーゼと立体構造が非常によく似ており、ほぼ同様のアミロペクチンに対する酵素活性を保持していた。しかし、メダカの α -アミラーゼは生デンプンに対する活性が低く、これは活性部位から離れた生デンプン吸着残基と考えられるトリプトファン残基がメダカ α -アミラーゼには存在しないためであることが立体構造から示唆された。なお、これはメダカのタンパク質の結晶構造を報告した世界で初めての論文である。同様に、メダカのリゾチームについても発現系を構築し、1.2 Å分解能で結晶構造解析を行った。立体構造はニワトリリゾチームとよく似ていたが、酵素活性の至適pHが大きく異なることが明らかになった。立体構造から活性中心付近では31番目のリシンのみがニワトリのもの(アラニン)と異なっていることがわかったため、この部分に関する変異体L31Aを前述のハイスループット発現系構築法で構築した(組み込む遺伝子をPCRで2断片にして、断片が重なる部分のプライマーに変異を入れることで簡単に変異体が作成できる)。その結果、メダカリゾチームL31A変異体は至適pHが、ニワトリのものに近くなることが明らかとなった。また、メダカリゾチームはニワトリリゾチームの4倍程度の活性があることがわかり、医薬への応用が期待される。

3. 分泌タンパク質の結晶構造解析

筆者は、これまで多くの分泌タンパク質(巻貝アメフラシの β -1,4-マンナーゼ、真核微生物 *Myrothecium verrucaria* のピリルビン酸化酵素、ニワトリのリゾチーム、トランスフェリンなど)の結晶構造解析と生化学的な研究を行ってきた。とくに

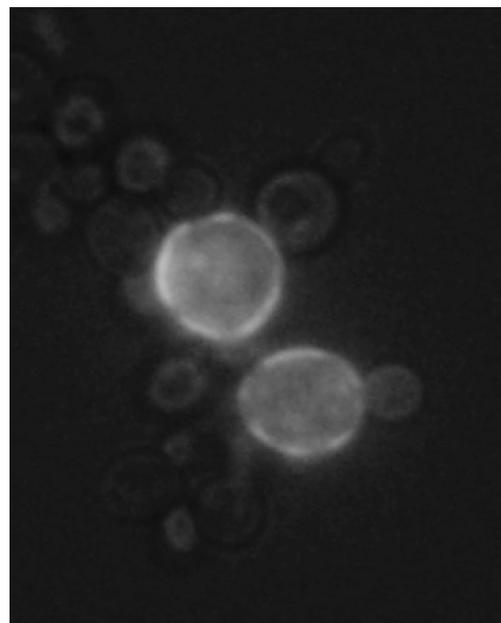


図1 酵母 *P. pastoris* で発現した膜タンパク質(CTR1) GFP融合体の蛍光顕微鏡写真



図2 ニワトリトランスフェリン N ロープの結晶構造
黒、ホロ型；グレー、アポ型。

トランスフェリンの鉄結合に関する構造生物学的研究を中心に行ってきた。トランスフェリンは二つのローブ状ドメインからなり、それぞれに一つの鉄イオン (Fe^{3+}) を結合する。筆者はニワトリトランスフェリン N ロープのアポ型、ホロ型（鉄結合型）、および C ロープのアポ型の結晶構造を明らかにした。N ロープ、C ロープは、それぞれが二つのドメインからなりドメイン間のクレフトに四つの残基を介して鉄を結合する。アポ型はドメイン間のクレフトが大きく開いた構造をもち、鉄の結合に伴いホロ型の閉じた構造へと変化する。この動きでドメイン間の二つの β -ストランドおよび C 末端付近のファンデルワールス結合がヒンジとして働くことを明らかにした（図2）。さらに、鉄結合中間体の構造を初めて決定し、まずドメイン間が開いた構造で片方のドメインの二つのチロシン残基のみに鉄が結合し、その後にドメインが閉じることを明らかにした。また、アルミニウムが結合したトランスフェリンの構造も初めて明らかにした。アルミニウムは鉄と同様に各ローブの四つの残基と結合し、ドメイン間のクレフトは鉄結合型より少し閉じた構造を取っていた。アルミニウムは認知症などの原因となる脳のタンパク質のアミロイド化にかかわり、トランスフェリンがアルミニウムの輸送も担うことから、この構造は鉄の結合を阻害せずアルミニウムの結合・輸送を阻害する薬剤の設計・探索などに役立つ。

また、筆者はニワトリとヒトトランスフェリンについて、*P. pastoris* での大量発現系を初めて構築した。どちらの組換えタンパク質も細胞外に分泌され、ハイマンノース型の糖鎖が付加

していた。また、どちらも天然のものと同様の構造をもち、二つの鉄イオンを結合した。（他グループもトランスフェリンの生産に成功し、ヒト細胞の無血清培地添加用などに市販されている。）トランスフェリンは血中で鉄を輸送し、細胞膜のトランスフェリンレセプターと結合することで細胞内に取り込まれ、酸性のエンドソーム中で鉄を放出する。トランスフェリンは鉄と同時に炭酸イオンなどのアニオンと結合することから、薬剤となるアニオンを開発できれば、トランスフェリンにより薬剤を細胞まで運ぶこと（ドラッグデリバリー）が可能になる。鉄やアニオンの結合放出の構造機構を解明するため、*P. pastoris* で発現したニワトリトランスフェリン N ロープの結晶構造解析を行った。分解能は 0.93 \AA であり、これはトランスフェリンで最初の超高分解能構造解析である。超高分解能の構造解析により水素原子の観察が可能になった。酸性条件下でドメイン間のクレフトを開いて鉄を放出する働きをもつ（二つのリシン残基が向かい合う）dilycine trigger について水素を可視化する水素原子オミットマップで水素原子を観察し、片方のリシン残基が中性条件で解離せずに水素結合を形成していることを明らかにした。また、鉄とともに結合する炭酸イオン周囲の水素を観察したところ、水素結合のパターンから炭酸イオンの解離状態が CO_3^{2-} であることが明らかになった。また、超高分解の構造解析により精密な C-O 間の原子間距離の測定が可能になり、その結果からも解離状態が CO_3^{2-} であることが確認された。このタンパク質について国際宇宙ステーション・きぼう実験棟の微小重力環境下で結晶化を行ったところ、良好な結晶が得られたため、さらに解析を進めている。

おわりに

酵母 *P. pastoris* を用いたハイスループット発現系構築法を利用して、さらに多くのタンパク質、酵素の構造解析を行い、得られた構造を基に、ドラッグデリバリーなどの応用的研究にも取り組み、その研究で農芸化学を含む生命科学の発展に貢献したい。

謝辞 本研究は、京都大学食糧科学研究所食品分子構造分野ならびに京都大学大学院農学研究科応用生命科学専攻応用構造生物学分野において行われたものです。本研究を行う機会を与えていただき、学生時代よりご指導いただきました京都大学名誉教授・廣瀬正明先生に心より御礼申し上げます。自由な研究環境を与えていただき、本奨励賞にご推薦いただきました京都大学教授・三上文三先生に厚く御礼申し上げます。また多くのご助言、ご支援を賜りました相原茂夫先生、高橋延行先生、山下穂波先生に心より感謝申し上げます。さらに、インペリアルカレッジロンドンおよび京都大学教授・岩田 想先生、京都大学教授・加納健司先生をはじめとしました多くの共同研究者の皆様にも厚く感謝いたします。また、研究の楽しさ、厳しさについて温かくご指導いただきました名古屋大学教授・故 坂神洋次先生には、心より御礼申し上げますとともに、ご冥福をお祈りいたします。本研究成果は、共に研究を行った卒業生・在学生の協力によるものであり、また、多くの方々のご指導の賜物であります。この場を借りて、深く御礼申し上げます。