

博士論文

微生物による臨床検査用酵素の生産に関わる研究

平成 27 年 3 月

広島大学大学院生物圏科学研究科

歌 島 悠

# 博士論文

微生物による臨床検査用酵素の生産に関わる研究

平成 27 年 3 月

広島大学大学院生物圏科学研究科  
生物機能開発学専攻

歌島 悠

## 目次

序論	1
引用文献	5
第1章 コドン最適化による西洋ワサビペルオキシダーゼ遺伝子(HRP-C1a)の <i>Cryptococcus</i> sp. S-2 での組換え発現	7
第1節 緒言	7
第2節 コドン最適化した HRP-C1a の発現と mRNA の解析	10
【目的】	10
【材料】	10
【方法】	12
コドン最適化配列のデザイン	12
西洋ワサビペルオキシダーゼ発現ベクターの構築	16
<i>Cryptococcus</i> sp. U-5 株への形質転換	18
形質転換体の培養液上清と菌体内のペルオキシダーゼ活性の測定	18
HRP 活性測定	18
定量 RT-PCR による転写量の確認	19
3'-RACE によるポリアデニレーションサイトの確認	20
【結果】	22
発現ベクターの構築と形質転換体の取得	22
HRP 生産性の比較	22
mRNA レベルの比較	24
3'-RACE 解析	25
【考察】	28
第3節 HRP-C1a 遺伝子のシグナル配列改変による HRP 生産性への影響検討	30
【目的】	30
【材料】	30
【方法】	31
シグナル配列置換ベクターの構築	31
<i>Cryptococcus</i> sp. U-5 株への形質転換	34
形質転換体のペルオキシダーゼ生産性の確認	34
【結果】	35
分泌シグナル及び液胞滞留シグナルの HRP-C1a 生産への影響	35
【考察】	37
第4節 <i>Cryptococcus</i> sp. S-2 組換え HRP-C1a の実用性評価	38
【目的】	38
【材料】	38

【方法】	38
流加培養	38
組換え HRP-C1a の精製	39
分子量の測定	40
【結果】	41
流加培養	41
酵素特性の評価	42
【考察】	43
第 5 節 結論	45
引用文献	46
第 2 章 FAD 依存型グルコースデヒドロゲナーゼの機能改変と大量発現	49
第 1 節 緒言	49
第 2 節 麹菌 <i>Aspergillus oryzae</i> 由来フラビンアデニンジヌクレオチド依存型グルコースデヒドロゲナーゼ(FAD-GDH)の機能改変	51
【目的】	51
【材料】	51
【方法】	52
FAD-GDH 大腸菌発現ベクターの構築	52
AoFAD-GDH の大腸菌での発現確認	52
FAD-GDH 活性測定	53
AoFAD-GDH への部位特異的変異導入	54
AoFAD-GDH の耐熱性の確認	54
FAD-GDH の大量培養と精製	55
【結果】	56
FAD-GDH 遺伝子のクローニングと大腸菌での発現における分泌シグナル配列の影響	56
部位特異的変異導入による FAD-GDH の耐熱性向上	57
大腸菌で発現された FAD-GDH の特性	59
【考察】	60
第 3 節 麹菌 <i>Aspergillus oryzae</i> 由来フラビンアデニンジヌクレオチド依存型グルコースデヒドロゲナーゼ(FAD-GDH)の麹菌による発現	61
【目的】	61
【材料】	61
FAD-GDH 麹菌発現ベクターの構築	62
<i>Aspergillus oryzae</i> への形質転換	63
形質転換体の FAD-GDH 生産性の確認	64
FAD-GDH の大量培養と精製	64
分子量の測定	65

【結果】	66
<i>A.oryzae</i> FAD-GDH 発現ベクターの構築と形質転換体の取得	66
<i>A.oryzae</i> 発現による FAD-GDH への糖鎖付加と耐熱性向上	67
【考察】	70
第 4 節 <i>Cryptococcus</i> sp. S-2 による、 <i>A.oryzae</i> 由来 FAD-GDH の組換え発現	71
【目的】	71
【材料】	71
【方法】	75
<i>A.oryzae</i> 由来 FAD-GDH 変異体の <i>Cryptococcus</i> sp. S-2 発現ベクターの構築	75
<i>Cryptococcus</i> sp. U-5 株への形質転換	76
形質転換体の FAD-GDH 生産性の確認	76
流加培養	76
組換え FAD-GDH の精製	77
分子量の測定	78
糖鎖組成の解析	78
【結果】	79
<i>Cryptococcus</i> sp. S-2 による、 <i>A.oryzae</i> FAD-GDH の異種組換え発現と分泌シグナル配列の置換	79
流加培養	80
<i>Cryptococcus</i> sp. S-2 により発現された FAD-GDH の特性評価	81
<i>Cryptococcus</i> sp. S-2 により発現された FAD-GDH の糖鎖解析	83
【考察】	85
第 5 節 <i>Cryptococcus</i> sp. S-2 による、 <i>Mucor hiemalis</i> 由来 FAD-GDH の組換え発現	86
【目的】	86
【材料】	87
【方法】	92
<i>Mucor hiemalis</i> 由来 FAD-GDH の <i>Cryptococcus</i> sp. S-2 発現ベクターの構築と形質転換体の取得	92
<i>Mucor hiemalis</i> 由来 FAD-GDH の <i>Cryptococcus</i> sp. S-2 での発現確認	92
<i>Cryptococcus</i> sp. S-2 により発現された <i>Mucor hiemalis</i> 由来 FAD-GDH の特性評価	93
【結果】	94
<i>Cryptococcus</i> sp. S-2 による、 <i>Mucor hiemalis</i> 由来 FAD-GDH の異種組換え発現	94
<i>Cryptococcus</i> sp. S-2 により発現された、 <i>Mucor hiemalis</i> 由来 FAD-GDH の基質特異性	95
【考察】	94
第 6 節 結論	97
引用文献	98
第 3 章 担子菌酵母 <i>Cryptococcus</i> sp. S-2 の宿主ベクター系の改良	101
第 1 節 緒言	101

第 2 節 担子菌酵母 <i>Cryptococcus</i> sp. S-2 のウラシル要求性を利用した Pop-in/Pop-out によるマーカーリサイクル系の構築	102
【目的】	102
【材料】	102
【方法】	103
<i>ade1</i> 遺伝子の Pop-in/Pop-out コンストラクトの作製	103
<i>ade1</i> 遺伝子の Pop-in/Pop-out	106
【結果】	107
<i>ade1</i> 遺伝子の Pop-in による破壊	107
Pop-in カセットの Pop-out	108
【考察】	112
第 3 節 担子菌酵母 <i>Cryptococcus</i> sp. S-2 の translation elongation factor 1 $\alpha$ プロモーターの取得と利用	113
【目的】	113
【材料】	113
【方法】	114
<i>ade1</i> 遺伝子のクローニング	114
TEF1 $\alpha$ プロモーターの取得と TEF1 $\alpha$ プロモーターによる <i>ade1</i> 遺伝子の発現	114
【結果】	115
TEF1 $\alpha$ -promoter による <i>ade1</i> 遺伝子の発現	115
【考察】	115
第 4 節 担子菌酵母 <i>Cryptococcus</i> sp. S-2 の多糖低生産変異株の取得	117
【目的】	117
【材料】	117
【方法】	118
<i>Cryptococcus</i> sp. S-2 株の UV 変異処理	118
<i>Cryptococcus</i> sp. S-2 株の UV 変異体株の選抜	118
細胞外多糖類生産量の測定	118
【結果】	119
【考察】	120
第 5 節 担子菌酵母 <i>Cryptococcus</i> sp. S-2 の相同組換えに関与する <i>ku70</i> 遺伝子破壊株の取得と効果	121
【目的】	121
【材料】	121
【方法】	122
<i>ku70</i> 遺伝子 Pop-in/Pop-out コンストラクトの作製	122
<i>ku70</i> 遺伝子の Pop-in/Pop-out	125
<i>ku70</i> 遺伝子破壊株の <i>ade1</i> 遺伝子座へのターゲッティング率(相同組換えの頻度)の検討	125

<i>ku70</i> 遺伝子の <i>xy11</i> 遺伝子座へのターゲッティング率(相同組換えの頻度)の検討	125
【結果】	127
<i>ku70</i> の破壊	127
ターゲッティング効率の確認	128
【考察】	131
第 6 節 結論	132
引用文献	133
総括	134
謝辞	136

## 略語

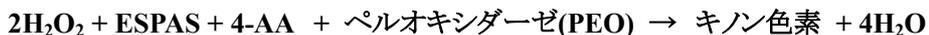
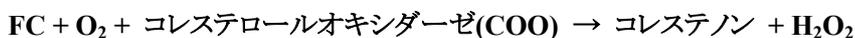
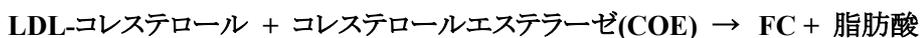
4-AA	4-aminoantipyrine
ABTS	2,2'-azinobis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)
<i>ade1</i>	phosphoribosylaminoimidazolesuccinocarboxamide synthase
CD	Czapek-Dox
COE	cholesterol esterase
COO	cholesterol oxidase
CTP	C-terminal vacuolar sorting peptide
DCPIP	dichlorophenolindophenol
DNA	deoxyribonucleic acid
DP	dextrin-peptone
FAD	fravin adenine denucleotide
ESPAS	N-Ethyl-N-(3-sulfopropyl)-3-methoxyaniline
FC	free cholesterol
5-FOA	5-fluoroorotic acid
GDH	glucose dehydrogenase
HRP	horseradish peroxidase
LDL	low density lipoprotein
<i>niaD</i>	nitrate reductase
NTP	N-terminal signal peptide
ORF	open reading frame
PCR	polymerase chain reaction
PEO	peroxidase
PMS	phenazine methosulfate
polyA	polyadenylate
RNA	ribonucleic acid
<i>sC</i>	adenosine triphosphate (ATP) sulfurylase
TEF1 $\alpha$	translation elongation factor 1 $\alpha$
TOOS	N-Ethyl-N-(2-hydroxy-3-sulfopropyl)-3-methylaniline
<i>ura5</i>	orotate phosphoribosyl transferase
UTR	untranscribed region
YNB	yeast nitrogen base

## 序論

臨床検査薬とは、臨床検査の検体検査において利用される試薬のことである。臨床検査は超音波や画像診断、心電図等、身体のなかの様子やその動きをみる「生体検査」と、尿や便、血液の成分を測定したり、取り出した組織の状態を観察する「検体検査」に分類され、特に検体検査においては、検体中の成分を分析するために、臨床検査薬が利用される。「検体検査」では、酵素や色素等の化学反応によって検査を行う「生化学検査」や抗原抗体法により検査を行う「免疫学的検査」、血液中の成分を分析する「血液学的検査」があり、その他にも、「細菌検査」や「遺伝子検査」などがある。「生化学検査」では、検体由来成分を酵素化学的、もしくは、化学的に反応させ、分光光学的に分析を行う方法が主流であり、検査薬として酵素が広く利用されている。

臨床検査薬に使用される酵素には、グルコースデヒドロゲナーゼ(GDH)、コレステロールオキシダーゼ(COO)、ペルオキシダーゼ(PEO)などさまざまな酵素が利用される。また、これらの臨床検査用酵素には、誤診断を防ぐために基質への高い特異性と反応性が求められる。さらに、臨床検査薬の長期間の保存に耐えるため、高い安定性が求められる。また、副反応を防ぐために、高い精製純度が求められる。

西洋ワサビペルオキシダーゼ(HRP)は過酸化水素(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)と色素などのメディエーターとの酸化反応を触媒する酵素であり、臨床検査の二次反応によく用いられる。例えば、悪玉コレステロールと呼ばれるLDL-Cの分析においては、「ダイヤカラー®・LDL(東洋紡社製)」という試薬が販売されており、西洋ワサビ由来のペルオキシダーゼが使用されている。以下に、その反応式を示す。



本試薬では、LDLコレステロールをコレステロールエステラーゼ、コレステロールオキシダーゼの反応によって生成された過酸化水素をペルオキシダーゼとESPAS(N-Ethyl-N-(2-hydroxy-3-sulfopropyl)-3-methylaniline)、4-AA(4-Amino antipyrine)に反応させてキノン色素を生成することにより、分光光学的分析を可能にしている(1)。ペルオキシダーゼはさまざまな検査の二次反応に用いられるため、目的以外の副反応を起こさないように高い純度の精製酵素が求められる。

グルコースデヒドロゲナーゼ(GDH)は血液中のブドウ糖と反応し、電子を放出するため、血糖値の測定を行う「自己血糖測定装置」に広く利用されている。糖尿病患者は、自己の血糖値をコントロールするために、食前、食後、就寝前など、一日に数回、自己血糖測定装置を用いて自身の血糖値を測定する必要がある。したがって、GDH には、血中のグルコース以外の糖類に反応しないように、基質に対する高い特異性が求められる。従来利用されてきた、ピロロキノリンキノン(PQQ)を補酵素とする PQQ-GDH は 2 糖であるマルトースにも作用する。したがって、輸液中に含まれるマルトースと反応し、誤診断となる医療事故が起こっており、米国 FDA から PQQ-GDH の使用については警告が発せられている(2)。さらに、GDH には糖尿病患者の長期使用に保存に耐えるため、高い安定性が求められる。

上記に示すような臨床検査用酵素の製造は動物の組織や植物体、微生物の培養液などから酵素を含む抽出液を採取し、塩析、ろ過、クロマトグラフィーなどの工程を経て、高度に精製され、製品化されている。近年では、分子生物学技術の進歩に伴い、遺伝子組換えにより特定の酵素遺伝子を大量に発現させることによって、精製工程を簡略化し、大量、安価に酵素を製造することが可能となってきた。

遺伝子の組換え発現に利用される宿主には、大腸菌 *Escherichia coli* や枯草菌 *Bacillus subtilis*、酵母 *Saccharomyces cerevisiae* やメタノール酸化性酵母 *Pichia pastoris* の他、糸状菌 *Aspergillus oryzae* の宿主ベクター系が主に利用される。これらの宿主ベクター系は非常に優れた異種タンパク質の生産宿主であるが、酵素の種類によっては発現量が低いなど、課題が多く残されている。本研究では、臨床検査薬などに使用される西洋ワサビペルオキシダーゼ(HRP)およびグルコースデヒドロゲナーゼ(GDH)の酵母を用いた組み換え生産について検討した。

HRP は、補酵素としてヘムを有するタンパク質であり、過酸化水素とメディエーターの酸化反応を触媒する。

#### <反応式>



通常、診断薬では、Donor を 4-AA(4-amino antipyrine)とフェノール、4-AA と ESPAS (N-Ethyl-N-(3-sulfopropyl)-3-methoxyaniline)として誘導体生成させ、その発色を分光光度計などにより検出することで  $\text{H}_2\text{O}_2$  の存在を検知する。

HRP に関しては、様々な微生物を用いた組換え発現が試みられているが、大腸菌では封入体として発

現することから、原核生物を用いた組換え発現は非常に困難である(3,4)。真核生物宿主である酵母 *Saccharomyces cerevisiae* では HRP は活性型で発現するものの、その生産量は微量である。メタノール資化性酵母 *Pichia pastoris* を宿主とした場合でも、その生産量は 1.3 mg/L 程度と微量である(5,6)。HRP の組換え発現については、植物細胞(7,8)やカイコ(9)を用いることも検討されているが、これらの発現系は大量生産に不向きであり、産業利用は困難である。

GDH はグルコースを酸化し、グルコノラク톤を生成する反応を触媒するため、主に糖尿病患者が自身の血糖値を測定する、自己血糖測定装置に使用される。

#### <反応式>



自己血糖測定装置では、この反応で生じるプロトンをフェリシアン化カリウムなどのメディエーターを介して電流値に変換し、血中のグルコース濃度が測定される。

GDH については、麹菌 *Aspergillus oryzae* から、フラビンアデニンジヌクレオチド(FAD)を補酵素とし、マルトースには作用しない、基質特異性に優れた GDH が取得されている(10)。*Aspergillus oryzae* 由来の GDH は原核生物宿主でも活性型で発現するものの、熱に対する安定性が低下することが確認されている。真核生物で行われる糖鎖修飾が大腸菌を宿主とした場合には行われず、タンパク質の安定性が低下することが原因と考えられる。麹菌由来のGDHについては、耐熱性を向上させるため、遺伝子への変異導入も試みられている(11)。

以上に示すように、臨床検査用酵素の組換え発現には、様々な課題が存在し、これらの課題を解決するために、真核生物由来の新たな異種タンパク質発現系が必要とされていた。

担子菌酵母の一種である、*Cryptococcus* sp. S-2 は独立行政法人酒類総合研究所(旧:国税庁醸造研究所)の家藤らによって取得された微生物である(12)。*Cryptococcus* sp. S-2 は、生デンプンを分解する $\alpha$ -アミラーゼを生産するため、もともとは排水処理を目的として単離されたが、好酸性のキシラン分解酵素のキシランナーゼ、ポリ乳酸等の各種生分解性プラスチック分解に有効なクチナーゼなどの有用な酵素を数多く生産することが確認されている(13,14,15)。これらの酵素を大量に発現させるため、ウラシル要求性を利用した組換え宿主ベクター系が構築された。さらに、キシロースの添加によって強力に誘導発現可能なキシランナーゼプロモーターが単離されている(15)。また、本発現系を用いることによって、ラッカーゼの組換

え発現にも成功している(16)。

本研究では、近年、酒類総合研究所で新規に開発された *Cryptococcus* sp. S-2 を宿主とした異種組換え発現系を利用し、これらの酵素の発現について解析を行い、発現が困難な原因究明やその問題解決のための検討を行った。さらに、酵素の高発現のための改良法も検討した。

第 1 章では、西洋ワサビペルオキシダーゼに着目し、遺伝子の発現、転写、翻訳、輸送のプロセスに注目し、*Cryptococcus* sp. S-2 による西洋ワサビペルオキシダーゼの異種組換え発現を試みた。

第 2 章では、FAD 依存型グルコースデヒドロゲナーゼに着目し、実用性の高い変異酵素の取得と、*Cryptococcus* sp. S-2 を宿主とした FAD 依存型グルコースデヒドロゲナーゼの組換え発現を検討した。

第 3 章では、*Cryptococcus* sp. S-2 をさらなる有用な異種タンパク質発現系として利用するため、宿主ベクター系の改良と、産業利用しやすい宿主の育種と取得を実施した。

## 引用文献

1. LDL-コレステロールキット ダイヤカラー®・LDL <http://www.toyobo.co.jp/seihin/dsg/LDL.pdf>
2. FDA Public Health Notification : Potentially Fatal Errors with GDH-PQQ\* Glucose Monitoring Technology, <http://www.fda.gov/MedicalDevices/Safety/AlertsandNotices/ucm176992.htm#>)
3. Smith AT, Santama N, Dacey S, Edwards M, Bray RC, Thorneley RN, Burke JF (1990) Expression of a synthetic gene for horseradish peroxidase C in *Escherichia coli* and folding and activation of the recombinant enzyme with Ca<sup>2+</sup> and heme. *J Biol Chem* **265**:13335-13343.
4. Kondo A, Kohda J, Endo Y, Shiromizu T, Kurokawa Y, Nishihara K, Yanagi H, Yura T, Fukuda H (2000) Improvement of productivity of active horseradish peroxidase in *Escherichia coli* by coexpression of Dsb proteins. *J Biosci Bioeng* **90**:600-606.
5. Morawski B, Lin Z, Cirino P, Joo H, Bandara G, Arnold FH (2000) Functional expression of horseradish peroxidase in *Saccharomyces cerevisiae* and *Pichia pastoris*. *Protein Eng* **13**:377-384.
6. Morawski B, Quan S, Arnold FH (2001) Functional expression and stabilization of horseradish peroxidase by directed evolution in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol Bioeng* **76**:99-107.
7. Matsui T, Nakayama H, Yoshida K, Shinmyo A (2003) Vesicular transport route of horseradish C1a peroxidase is regulated by N- and C-terminal propeptides in tobacco cells. *Appl Microbiol Biotechnol* **62**:517-522.
8. Matsui T, Hori M, Shizawa N, Nakayama H, Shinmyo A, Yoshida K (2006) High-efficiency secretory production of peroxidase C1a using vesicular transport engineering in transgenic tobacco. *J Biosci Bioeng* **102**:102-109.
9. Hartmann C, Ortiz de Montellano PR (1992) Baculovirus expression and characterization of catalytically active horseradish peroxidase. *Arch Biochem Biophys* **297**:61-72.
10. Kitabayashi M, Tsuji Y, Aiba H, Kawaminami H, Kishimoto T, Nishiya Y (2007) Glucose dehydrogenase. WO patent 2007/116710.
11. Kawaminami H, Tsuji Y, Kitabayashi M, Nishiya Y (2008) Modified flavine adenine dinucleotide dependent glucose dehydrogenase. WO patent 2008/059777.

12. Iefuji H, Iimura Y, Obata T (1994) Isolation and characterization of a yeast *Cryptococcus* sp. S-2 that produces raw starch-digesting  $\alpha$ -amylase, xylanase, and polygalacturonase. *Biosci Biotech Biochem* **58**:2261-2262.
13. Iefuji H, Chino M, Kato M, Iimura Y (1996) Raw-digesting and thermostable alpha-amylase from the yeast *Cryptococcus* sp. S-2: purification, characterization, cloning, and sequencing. *Biochem J* **318**:989-996.
14. Iefuji H, Chino M, Kato M, Iimura Y (1996) Acid xylanase from yeast *Cryptococcus* sp. S-2: purification, characterization, cloning, and sequencing. *Biosci Biotech Biochem* **60**:1331-1338.
15. Masaki K, Tsuchioka H, Hirano T, Kato M, Ikeda H, Iefuji H (2012) Construction of a new recombinant protein expression system in the basidiomycetous yeast *Cryptococcus* sp. strain S-2 and enhancement of the production of a cutinase-like enzyme. *Appl Microbiol Biotechnol* **93**:1627-1636.
16. Nishibori N, Masaki K, Tsuchioka H, Fujii T, Iefuji H (2012) Comparison of laccase production levels in *Pichia pastoris* and *Cryptococcus* sp. S-2. *J Biosci Bioeng* **115**:394-399.

## 第1章 コドン最適化による西洋ワサビペルオキシダーゼ遺伝子(HRP-C1a)の *Cryptococcus* sp. S-2 での組換え発現

### 第1節 緒言

西洋ワサビ(*Armoracia rusticana*)ペルオキシダーゼ(HRP)は、従来、分析、臨床検査、免疫化学、組織化学、細胞化学などの分野では発色剤の用途として広く用いられており、近年は、食品分野、廃水処理、環境浄化の分野においては酸化剤として利用され、その需要はますます高くなってきている(1)。しかしながら、ペルオキシダーゼを植物から抽出する場合、品種、栽培条件など様々な要因によってペルオキシダーゼ含量やアイソザイム組成比に著しい変動があるため、安定した品質のペルオキシダーゼを得ることが極めて困難であった。

HRPは活性中心にヘム鉄を含む酵素であり、8箇所のN型糖鎖結合サイトが存在する(1)。1990年以降、HRPの組換え発現が試みられた。これまでに報告されているHRPの組換え発現の検討結果について、Table 1-1に示した。

**Table 1-1 Production yield of HRP-C1a in various recombinant hosts.**

Host	Production yield (mg/Liter)	Characteristic features	Reference
<i>Escherichia coli</i>	0.34	Expressed in inclusion bodies	<i>Smith et al.</i> , 1990 (2)
<i>Escherichia coli</i>	0.07	Active HRP was expressed by co-expressed of Dsb protein	<i>Kondo et al.</i> , 2000 (3)
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	0.07	Active HRP was secreted in culture medium	<i>Morawski et al.</i> , 2001 (4)
<i>Pichia pastoris</i>	1.3	Fed-batch fermentation induced by methanol	<i>Morawski et al.</i> , 2001 (4)
<i>Nicotiana tabacum</i>	3	Transgenic Tobacco plant cell culture	<i>Matsui et al.</i> , 2003 (7)
<i>Spodoptera frugiperda</i>	41.3	Baculovirus-insect cell culture	<i>Hartmann et al.</i> , 1992 (8)

大腸菌 *Escherichia coli* を用いた発現では、フォールディングのステップを必要とするものの、500 ml の培養液から 0.17 mg の収率で活性型の HRP を取得することに成功している(2)。大腸菌による発現では、フォールディングに関与するアクセサリタンパク質である *dsb* 遺伝子をペリプラズムで発現させることによ

って、活性型 HRP の発現にも成功しているが、その生産量は約 0.07 mg/L と非常に低いレベルであった(3)。

HRP の組換え発現は、酵母でも検討されている。*Saccharomyces cerevisiae* を用いた組換え発現では、培養液上清に活性型で HRP を分泌することが確認されているが、その生産量は 0.07 mg/L/64 h とされている(4)。メタノール資化性酵母であり、強力な異種タンパク質発現宿主である、*Pichia pastoris* を用いた場合でも、HRP の生産量は 1.3 mg/L/87 h とされており(5)、*P. pastoris* による HRP の発現量を向上させるために、7 箇所のアミノ酸に変異を加えた改変型の HRP の組換え発現も行われており、発現量は 7.3 mg/L/87 h まで向上させているが、7 重変異体の HRP は熱に対する安定性が低下した(5)。

タバコ培養細胞を用いた HRP の組換え発現では、シグナル配列について検討が行われている。HRP の N 末端には分泌シグナルが存在し、C 末端には液胞への滞留シグナルが存在している(6)。C 末端の液胞滞留シグナルの除去により、細胞外への分泌発現が可能となり、また、N 末端の分泌シグナルを宿主由来の配列に置換することによって生産量を向上させることに成功し、その生産量は約 3 mg/L/7 days に達したことが報告されている(7)。さらに、カイコを用いた HRP の組換え発現についても試みられており、その生産量は 41.3 mg/L に達していることが示されている(8)。しかし、これら植物培養細胞やカイコを用いた組換え発現系は培養時間が非常に長く、培地成分が非常に高価であるなどの理由から、大量生産には不向きであり、産業製造が非常に困難である。

以上に示すように、HRP の組換え発現はさまざまな宿主で試みられており、発現には成功しているものの、その発現量が微量であったりして、産業製造への適用は非常に困難であった。産業レベルでの HRP の組換え発現製造では、安価な培地成分を用いても強力な発現が可能であり、かつ、大量培養することが可能な宿主-ベクター系が必要である。

コドン最適化は、異種タンパク質の発現を高めるための改善法として知られている(9)。遺伝子配列はタンパク質の発現量に影響を与え、mRNA のレベルや、翻訳効率、tRNA の消費率などに影響を与える(10)。

さらに、麹菌 *Aspergillus oryzae* においては、コドン最適化は野生型 DNA 配列中に潜在するポリアデニレーションシグナルによる mRNA 転写の終結を抑制することが示されている(11)。

タンパク質を菌体外に分泌生産する際には、N 末端にシグナル配列という細胞質から小胞体への輸送

シグナル配列が重要であることが知られている。使用するシグナル配列により、成熟タンパク質の分泌生産量が大きく変化することが報告されている(12)。

さらに、産業利用を考えた場合、生産プロセスレベルでの組換えタンパク質の生産量の改善が必要である。実験室レベルでのフラスコ培養から、培養装置でのタンパク質生産の可能性については、検討すべき重要な課題である。

*Cryptococcus* sp. S-2 は独立行政法人酒類総合研究所において単離された担子菌酵母で、異種タンパク質の組換え発現系が構築されている(13,14)。本組換え発現系には、キシロースによって強力に誘導発現可能なキシラナーゼプロモーターが用いられている。

第1章では、HRP を *Cryptococcus* sp. S-2 を宿主として大量に組換え発現させることを目的とし、コドンの最適化、シグナル配列の最適化、流加培養及び酵素の精製、特性評価を行った。

## 第2節 コドン最適化した HRP-C1a の発現と mRNA の解析

### 【目的】

*Cryptococcus* sp. S-2 は、酵母の中でも担子菌系の酵母(basidiomycete yeast)に属する。一般的に担子菌酵母の GC 含量は 50%以上とされており、*Cryptococcus* sp. S-2 では 67%と報告されている(14)。野生型の西洋ワサビペルオキシダーゼ(HRP)は植物由来遺伝子であるため、コードしている遺伝子の GC 含量は 43.7%である(2)。GC 含量の違いはコドンユースのの違いに反映され、発現量への影響をもたらす。そこで、本節では HRP 遺伝子のコドンを最適化した配列を合成し、*Cryptococcus* sp. S-2 で発現における、野生型配列と最適化配列の比較を行った。

### 【材料】

遺伝子の発現宿主には、*Cryptococcus* sp. U-5 株(*ura5*)を使用した。DNA 操作には、*Escherichia coli* DH5 $\alpha$  を、また plasmid は pCsUX を用いた。*Cryptococcus* sp. U-5 株培養及び形質転換体の前培養には YM 培地(0.3% Yeast Extract, 0.3% Malt Extract, 0.5% Peptone, 1.0% D-Glucose)を、形質転換体の取得には、YNB(-ura)培地(0.67% Yeast nitrogen base w/o AA, 0.078% -Ura DO supplement, 2.0% D-glucose)を、Xylanse promoter による誘導発現には YX 培地(2% Yeast Extract, 5% D-Xylose)をそれぞれ用いた。

発現に用いる西洋ワサビペルオキシダーゼ(以下 HRP と略す)の遺伝子は、主要なアイソザイムの一つである、“C1a” を用いた。野生型の HRP-C1a の遺伝子は、奈良先端大学の加藤晃先生より分譲頂いた pHRP-C1a をテンプレートに用いた(FIG 1-1)。*Cryptococcus* sp. S-2 にコドンを最適化した HRP-C1a 遺伝子は、タカラバイオ社の人工合成遺伝子作製サービスを利用して合成した(FIG 1-2)。また、本節で利用したプライマーの名称及び配列については、Table 1-2 に示した。

```

      10      20      30      40      50      60      70      80      90
ATGCATTCTCTTCTTCTTCTACTTTGTTCACTTGTATAACCTTAATCCCATTGGTATGTCTTATTCTTCATGCTTCTTTTGTCTGATGCT
M H F S S S S T L F T C I T L I P L V C L I L H A S L S D A

      100     110     120     130     140     150     160     170     180
CAACTTACCCTACCTTCTACGACAATTCATGTCTAATGTCTTAACATCGTACGGGATACTATTGTCAATGAGCTAAGATCAGACCCCT
Q L T P T F Y D N S C P N V S N I V R D T I V N E L R S D P

      190     200     210     220     230     240     250     260     270
CGTATGCCCCGAGCATCCTTCGCTTCACTTCCACGACTGCTTTGTTAATGGTTGTGACGCATCGATCTTGTTAGACAAACACAACATCA
R I A A S I L R L H F H D C F V N G C D A S I L L D N T T S

      280     290     300     310     320     330     340     350     360
TTTCGAACAGAGAAAGATGCGTTTGGAAACGCAAACTCGGCAAGAGGATTTCCAGTGATTGATAGAATGAAAGCCGCGTGGAGAGTGCA
F R T E K D A F G N A N S A R G F P V I D R M K A A V E S A

      370     380     390     400     410     420     430     440     450
TGCCCAAGAACCCTTTCATGCGCAGATTGCTCACCATTGCAGCTCAACAATCTGTCACTTTGGCGGGAGGTCCTTCTGGAGAGTTCCCT
C P R T V S C A D L L T I A A Q Q S V T L A G G P S W R V P

      460     470     480     490     500     510     520     530     540
TTGGGCAGAAGAGATAGCTTACAAGCATTCTGGATCTTGCTAATGCAAATCTCCAGCTCCATCTTCACACTTCCACAACCTAAAGAC
L G R R D S L Q A F L D L A N A N L P A P F F T L P Q L K D

      550     560     570     580     590     600     610     620     630
AGCTTTAGAAATGTTGGCCCTCAACCGTTCTTCTGATCTCGTTGCACTGTCCGGGGCCACACATTGGTAAAAATCAGTGTCCGTTTATT
S F R N V G L N R S S D L V A L S G G H T F G K N Q C R F I

      640     650     660     670     680     690     700     710     720
ATGGACAGATTATACAACCTCAGCAACACCGGTTTACCGATCCTACTCTCAACTACTTATCTCCAACCTCTTCGTTGGACTATGTCCC
M D R L Y N F S N T G L P D P T L N T T Y L Q T L R G L C P

      730     740     750     760     770     780     790     800     810
CTCAATGGTAATCTAAGCGCTTTGGTGGATTTTGATCTACGTACGCCAACGATTTTGGACAACAAATACATATGTGAATCTCGAAGAGCAA
L N G N L S A L V D F D L R T P T I F D N K Y Y V N L E E Q

      820     830     840     850     860     870     880     890     900
AAAGGACTTATCCAAGCGACCAAGAGTTGTTCTTAGCCCCAATGCCACTGACACAATCCCTTTGGTGAGATCATTGCTAATAGCACAC
K G L I Q S D Q E L F S S P N A T D T I P L V R S F A N S T

      910     920     930     940     950     960     970     980     990
CAAACATTCTCAATGCGTTTGTGGAGGCGATGGATAGGATGGGAAACATTACACCTCTTACAGGAACCTAAGGACAGATCAGGTTGAAT
Q T F F N A F V E A M D R M G N I T P L T G T Q G Q I R L N

      1000    1010    1020    1030    1040    1050    1060
TGTAGGGTGGTGAACCTCAACTCTACTCCATGATATGGTGGAGGTCGTTGACTTTGTTAGCTCTATGTGA
C R V V N S N S L L H D M V E V V D F V S S M *
    
```

FIG 1-1 Native HRP-C1a gene (HRP+CTP)/ntv.

Table 1-2 Primers used in this work.

Primer Name	Sequence
<b>Vector construction</b>	
HRP_F	5'-ACGCGTATGCATTTCTCTTCTTCTTCTACTTTGTTC-3'
HRP_R	5'-ACGCGTTCACATAGAGCTAACAAAGTCAAC-3'
HRPopt_F	5'-ACGCGTATGCACTTCTCGTCGTCGTCGACCCCTCTTC-3'
HRPopt_R	5'-ACGCGTTTACATCGAGCTGACGAAGTCGAC-3'
Xylpro_iR	5'-CGTGGATTGTATGTCGTGGAGAGG-3'
HRP_F(del-RE)	5'-ATGCATTTCTCTTCTTCTTCTACTTTGTTC-3'
HRPopt_F(del-RE)	5'-ATGCACTTCTCGTCGTCGTCGACCCCTCTTC-3'
pCsUX2_iF	5'-ACTAGTGAATTCACGCTCAGGAATGGGCTGTTTCAGC-3'
pCsUX2_iR	5'-ACGCGTCGTGGATTGTATGTCGTGGAGAGG-3'
<b>Colony direct PCR</b>	
pCsUX2_F	5'-AAGGAGTGACTACTGGTCTGACCATTTCGCC-3'
pCsUX-R	5'-TTTGTCGGACGACTCAGGTACTCGG-3'
<b>Quantitative Realtime PCR</b>	
HRP(ntv)RT_F1	5'-TTCTTCATGCTTCTTTGTCTGATGC-3'
HRP(ntv)RT_R1	5'-GTTTCAAACGCATCTTTCTCTGTT-3'
HRP(ntv)RT_F2	5'-CGGTTTACCCGATCCTACTCTCAAC-3'
HRP(ntv)RT_R2	5'-AATGATCTCACCAAAGGGATTGTGT-3'
HRP(opt)RT_F1	5'-CTCTTCACGTGCATCACCCTCAT-3'
HRP(opt)RT_R1	5'-GAAGCAGTCGTGGAAGTGGAGTC-3'
HRP(opt)RT_F2	5'-GATTCATCATGGACCGACTCTACAA-3'
HRP(opt)RT_R2	5'-GTTGAAGAAGGTCTGCGTCGAGTT-3'
CsActRT_F	5'-GACATCAAGGAGAAGCTCTGCTACG-3'
CsActRT_R	5'-GTACCACCAGACATGACAATGTTGC-3'

## 【方法】

### コドン最適化配列のデザイン

HRP-C1a の cDNA (FIG 1-1) は、全長が 1062 bp (終始コドン含まず) からなり、野生型の HRP-C1a 遺伝子 ((HRP+CTP)/ntv)) の GC 含量は 43.7% と低 GC 含量である。コドンの最適化では、*Cryptococcus* sp. S-2 が生産するアミラーゼ (Amylase)、クチナーゼ (Cutinase)、キシラナーゼ (Xylanase) をコードする塩基配列を参考にし (FIG 1-2)、それらに使用されるコドンを優先的に使用するように設計した。*Cryptococcus* sp. S-2 が生産するこれら 3 遺伝子の GC 含量は、それぞれ、58.1%、64.6%、59.9% と比較的 GC リッチであった。

Amino acid	Codon	% Frequency <sup>a</sup>		
		<i>Cryptococcus</i> sp. S-2	HRP C1a	
			Native	Optimized
Ala	GCT	23	28	4
Ala	GCC	43	12	92
Ala	GCA	10	36	0
Ala	GCG	24	24	4
Arg	CGT	12	24	0
Arg	CGC	32	0	0
Arg	CGA	44	5	100
Arg	CGG	8	10	0
Arg	AGA	0	48	0
Arg	AGG	4	14	0
Asn	AAT	9	56	0
Asn	AAC	91	44	100
Asp	GAT	16	54	0
Asp	GAC	84	46	100
Cys	TGT	5	70	0
Cys	TGC	95	30	100
Gln	CAA	10	85	0
Gln	CAG	90	15	100
Glu	GAA	11	13	0
Glu	GAG	89	88	100
Gly	GGT	21	29	0
Gly	GGC	57	18	100
Gly	GGA	12	47	0
Gly	GGG	10	6	0
His	CAT	13	50	0
His	CAC	87	50	100
Ile	ATT	16	50	0
Ile	ATC	84	44	100
Ile	ATA	0	6	0
Leu	TTA	0	12	0
Leu	TTG	12	26	0
Leu	CTT	9	28	0
Leu	CTC	46	19	93
Leu	CTA	4	12	0
Leu	CTG	28	5	7
Lys	AAA	0	100	0
Lys	AAG	100	0	100
Met	ATG	100	100	100
Phe	TTT	19	57	0
Phe	TTC	81	43	100
Pro	CCT	24	44	11
Pro	CCC	33	17	6
Pro	CCA	6	39	0
Pro	CCG	37	0	83
Ser	AGT	5	3	0
Ser	AGC	23	27	9
Ser	TCT	7	42	0
Ser	TCC	27	6	3
Ser	TCA	9	15	0
Ser	TCG	29	6	88
Thr	ACT	14	36	0
Thr	ACC	45	21	86
Thr	ACA	6	36	0
Thr	ACG	36	7	14
Trp	TGG	100	100	100
Tyr	TAT	8	40	0
Tyr	TAC	92	60	100
Val	GTT	4	32	0
Val	GTC	69	18	100
Val	GTA	4	9	0
Val	GTG	23	41	0

**FIG 1-2 Comparison of codon usage in *Cryptococcus* sp. S-2 genes with that in native and codon-optimized HRP C1a genes.**

<sup>a</sup> Percent frequencies of individual codons are shown for each corresponding amino acid.

設計された HRP-C1a 遺伝子((HRP+CTP)/opt)(FIG 1-3)は人工的に合成され、native の HRP-C1a ((HRP+CTP)/ntv)との相同性は 72.0%となり、構成する塩基の約 30%が置換された(FIG 1-4)。両 HRP-C1a 遺伝子のコドンユースエージの使用比率を比較したところ、(HRP+CTP)/ntv と比較して (HRP+CTP)/opt は GC 含量が高く、GC 含量は 63.9%となった。

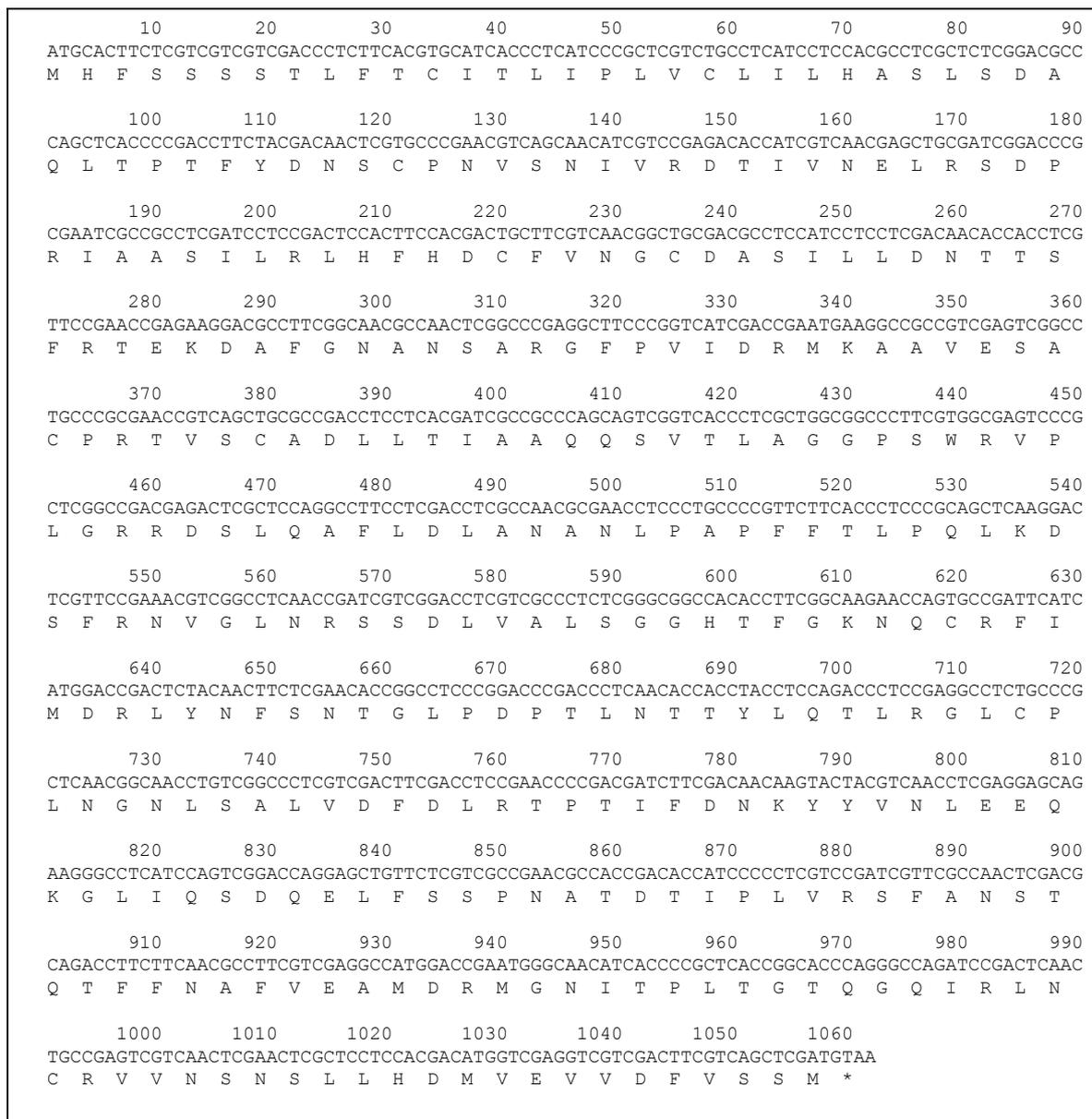


FIG 1-3 Codon optimized and synthesized HRP-C1a gene (HRP+CTP)/opt.

```

(HRP+CTP)ntv      1 : ATGCATTTCT CTCTTCTTC TACTTTGTT CACTGTATAA CCTTAATCCC ATTGGTATGT CTTATFTTTC ATGCTTCTTT GTCTGATGCT
*****
(HRP+CTP)opt      1 : ATGCACTTCT CGTCGTCGTC GACCCCTTTC ACGTGCATCA CCCTCATCCC GCTCGTCTGC CTCATCCCTC ACGCCTCGCT CTCGGACGCC

(HRP+CTP)ntv     91 : CAACCTTACC CTAGCTTCTA CGACAATTCA TGTCCCTAATG TCTCTAACAT CGTACGGGAT ACTATGTGTA ATGAGCTAAG ATCAGACCCT
*****
(HRP+CTP)opt     91 : CAGCTCACCC CGACCTTCTA CGACAACCTG TGCCCGAAGC TCAGCAACAT CGTCCGAGAC ACCATCGTCA ACGAGCTGCG ATCGGACGCC

(HRP+CTP)ntv    181 : CGTATTGCCG CGAGCATCCT TCGTCTTCAC TTCCACGACT GCTTTGTGTA TGGTTGTGAC GCATCGATCT TGTTAGACAA CACAACATCA
*****
(HRP+CTP)opt    181 : CGAATCGCCG CCTCGATCCT CCGACTCCAC TTCCACGACT GCTTCGTCAA CGGCTGCGAC GCCTCCATCC TCCTCGACAA CACCACCTCG

(HRP+CTP)ntv    271 : TTTGCAACAG AGAAGATGC GTTTGGAAC GCAAACCTCG CAAGAGGATT TCCAGTGATT GATAGAATGA AAGCCGCGGT GGAGAGTGCA
*****
(HRP+CTP)opt    271 : TTCCGAACCG AGAAGGACGC CTTCCGCAAC GCCAACTCGG CCCGAGGCTT CCCGGTCACT GACCGAATGA AGGCCGCGGT CGAGTCGGCC

(HRP+CTP)ntv    361 : TGCCCAAGAA CCGTTTCATG CGCAGATTG CTCACCATTG CAGCTCAACA ATCTGTCACT TTGGCGGGAG GTCCCTTCTG GAGAGTTCCT
*****
(HRP+CTP)opt    361 : TGCCCGCGAA CCGTCAGCTG CGCCGACCTC CTCACGATCG CCGCCACGCA GTCGGTCACC CTCGCTGGCG GCCCTTCGTG GCGAGTCCCG

(HRP+CTP)ntv    451 : TTGGGCAGAA GAGA-TAGCT TACAAGCATI TCTGGATCTT GCTAATGCAA ATCTTCCAGC TCCATTTCTC ACACCTCCAC AACTTAAAGA
*****
(HRP+CTP)opt    451 : CTCGGCCGAC GAGACTCGC- TCCAGGCCCT CCTCGACCTC GCCAACGCGA ACCTCCCTGC CCCGTTCTTC ACCCTCCCGC AGCTCAAGGA

(HRP+CTP)ntv    540 : CAGCTTTAGA AATGTTGGCC TCAACCGTTC TTCTGATCTC GTTGCACGTG CCGGGGGCCA CACATTTGGT AAAAATCAGT GTCGGTTTAT
*****
(HRP+CTP)opt    540 : CTCGTTCCGA AACGTGCGCC TCAACCGATC GTCGGACCTC GTGCCTCTCT CGGGCGGCCA CACCTTCGCG AGAACCAGT GCCGATTCAT

(HRP+CTP)ntv    630 : TATGGACAGA TTATACAACT TCAGCAACAC CGGTTTACCC GATCCTACTC TCAACACTAC TTATCTCCAA ACTCTTCGTG GACTATGTCC
*****
(HRP+CTP)opt    630 : CATGGACCGA CTCTACAACT TCTCGAACAC CGGCCCTCCG GACCCGACCC TCAACACCAC CTACCTCCAG ACCCTCCGAG GCCTCTGCCC

(HRP+CTP)ntv    720 : CCTCAATGGT AATCTAAGCG CTTTGGTGA TTTTGTCTA CGTACGCCAA CGATTTTGA CAACAAATAC TATGTGAATC TCGAAGAGCA
*****
(HRP+CTP)opt    720 : GCTCAACGGC AACCTGTCGG CCCTCGTCGA CTTTCACCTC CGAACCCCGA CGATCTTCGA CAACAAGTAC TACGTCAACC TCGAGGAGCA

(HRP+CTP)ntv    810 : AAAAGGACTT ATCCAAAGCG ACCAAGAGTT GTTCTCTAGC CCCAATGCCA CTGACACAAT CCCTTTGGTG AGATCATTTG CTAATAGCAC
*****
(HRP+CTP)opt    810 : GAAGGGCCTC ATCCAGTCGG ACCAGGAGCT GTTCTGCTCG CCGAACGCCA CCGACACCAT CCCCCTCGTC CGATCGTTGG CCAACTCGAC

(HRP+CTP)ntv    900 : ACAAACATTC TTCAATGCGT TTGTGGAGGC GATGGATAGG ATGGGAAACA TTACACCTCT TACAGGAACT CAAGGACAGA TCAGGTTGAA
*****
(HRP+CTP)opt    900 : GCAGACTTCT TTCAAGCCTC TCGTCGAGGC CATGGACCGA ATGGGCAACA TCACCCCGCT CACCGGCACC CAGGGCCAGA TCCGACTCAA

(HRP+CTP)ntv    990 : TTGTAGGGTG GTGAACCTCA ACTCTCTACT CCATGATATG GTGGAGGTGC TTGACTTTGT TAGCTCTATG TGA
*****
(HRP+CTP)opt    990 : CTGCCGAGTC GTCAACTCGA ACTCGCTCCT CCACGACATG GTCGAGGTGC TCGACTTCGT CAGCTCGATG TAA

```

FIG 1-4 The alignment of (HRP+CTP)/ntv vs (HRP+CTP)/opt.

## 西洋ワサビペルオキシダーゼ発現ベクターの構築

*Cryptococcus* sp. S-2 への遺伝子導入及び異種タンパク質の高発現のためにプラスミドベクターには Masaki *et al.* (13)に記載の pCsUX (Xyl-promoter, Xyl-terminator, CsUra5, Amp<sup>r</sup>)を用いた。ベクター構築の概略を FIG 1-5 に示す。

野生型 HRP-C1a 遺伝子(HRP+CTP)/ntv は、pHRP-C1a ベクターをテンプレートにプライマーHRP\_F と HRP\_R のセットにより PCR により増幅後 *Mlu*I 処理し、同様に処理された pCsUX の *Mlu*I サイトにキシラナーゼプロモーターと同方向になるように挿入した。また、Signal-P(15)による解析の結果、pCsUX のキシラナーゼプロモーター領域中に、キシラナーゼの分泌シグナルの一部(36bp)が含まれていると予測されたため、本配列の除去と、さらに、挿入された制限酵素サイト(*Mlu*I)による発現への影響を排除するため、作製したプラスミドをテンプレートに、プライマーHRP\_F(del-RE)と Xylpro\_iR のセットにより inverse PCR を行い、キシラナーゼの分泌シグナルの部分断片と制限酵素 *Mlu*I サイトの除去を行った。最終的に作製されたプラスミドは pCsUX2-(HRP+CTP)/ntv とした。なお、Inverse PCR には KOD plus Mutagenesis kit(東洋紡社製)を用いた。

コドン最適化された HRP 遺伝子は、タカラバイオ株式会社から納品されたプラスミド pUC-HRP/opt を *Mlu*I によって消化して HRP-C1a 遺伝子を切り出し、同様に処理された pCsUX の *Mlu*I サイトにキシラナーゼプロモーターと同方向になるように挿入した。上述と同様に、キシラナーゼの分泌シグナルの部分配列と、制限酵素 *Mlu*I サイトの除去を行うため、作製したベクターをテンプレートに、プライマー HRPOpt\_F(del-RE)と Xylpro\_iR のセットにより inverse PCR を行い、キシラナーゼの分泌シグナルの部分断片と制限酵素 *Mlu*I サイトの除去を行った。作製されたプラスミドは pCsUX2-(HRP+CTP)/opt とした。

また、コントロールとして用いる空ベクターは pCsUX をテンプレートにプライマーpCsUX2\_iF と pCsUX2\_iR のセットで Inverse PCR を行うことにより Xylanase の分泌シグナルの部分配列除去し、pCsUX2 を構築した。

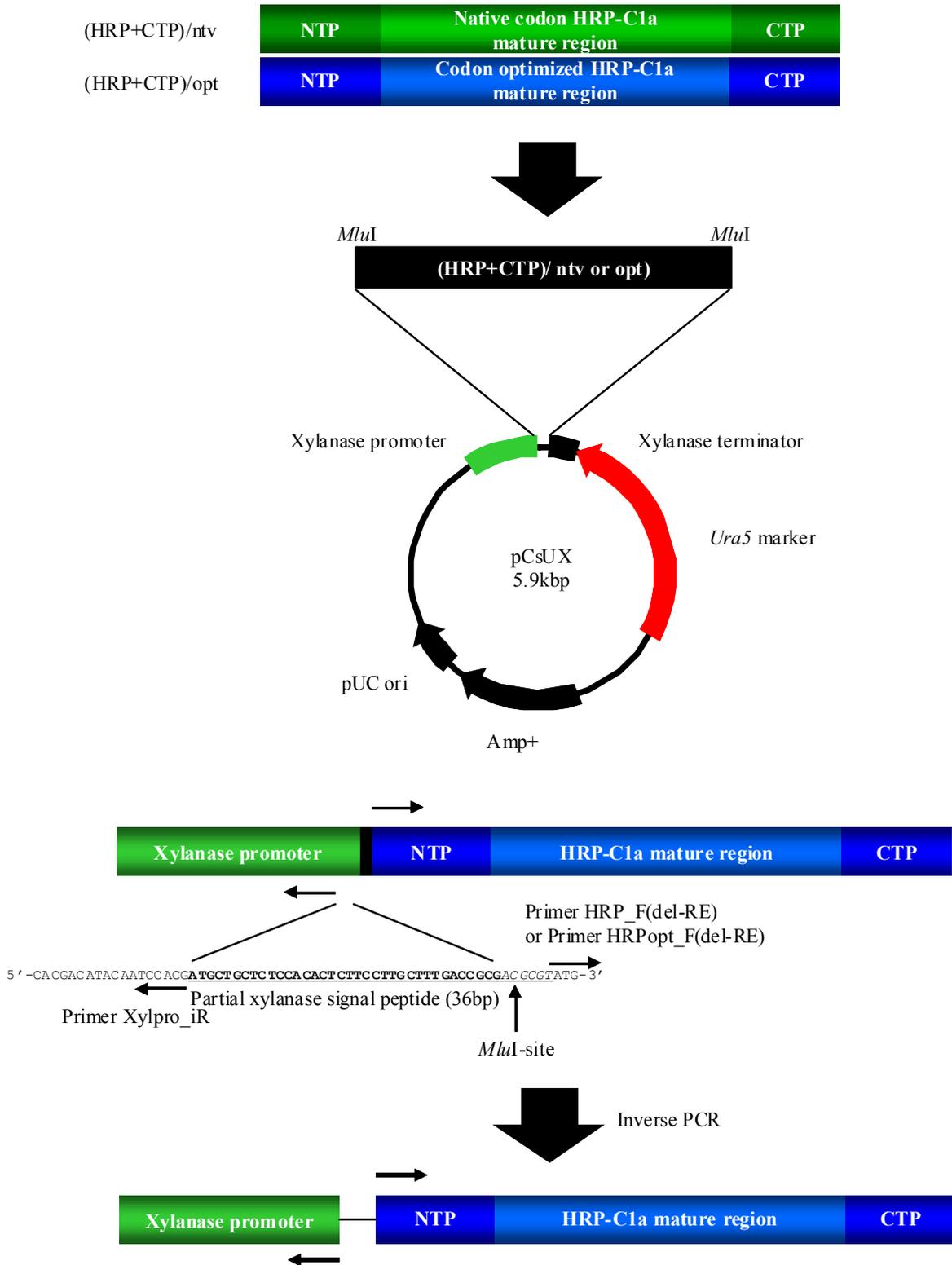


FIG 1-5 The scheme of vector construction.

### **Cryptococcus sp. U-5 株への形質転換**

*Cryptococcus sp. U-5* 株への形質転換は、Masaki *et al.* (13)に記載の方法により行った。すなわち、*Cryptococcus sp. U-5* 株を YM 培地(3 ml/10 ml 試験管)に 1 白金耳植菌し、25°C, 180 rpm(横振とう)で 2 日間培養し、培養液 0.6 ml を YM 培地(60 ml/200 ml バッフルフラスコ)に植菌し、25°C, 180 rpm(回転攪拌)で 16 時間培養した。培養液を無菌的に回収し、3000 rpm, 5 分, 4°C で遠心分離し、菌体を回収した。培養上清を除去し、フィルターろ過した Wash buffer (270 mM Sucrose, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM Tris-HCl (pH 7.6), 4 mM DTT)を 30 ml 加えて菌体を懸濁し、再度 3000 rpm, 5 分, 4°C で遠心分離し、菌体を回収した。この操作を 2 回行った。懸濁液上清を除去し、フィルターろ過した Electroporation buffer (270 mM Sucrose, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM Tris-HCl (pH 7.6))を 30 ml 加えて菌体を懸濁し、懸濁液の濁度(OD<sub>600</sub>)を測定した。懸濁液を 3000 rpm, 5 分, 4°C 遠心分離し、上清を除去した。菌体のペレットをフィルターろ過した Electroporation buffer で OD<sub>600</sub>=50 Abs となるように加えて懸濁し、コンピテントセルとした。

作製したコンピテントセルを Gene Pulser Cuvette 0.2 cm(BIO-RAD 社製)に 100 µl 加え、さらに *ura5* マーカー遺伝子の 3'末端を制限酵素 *Sbf*I により切断し、直鎖化したプラスミド DNA を 10 µg 分(~5 µl)加えて混合した。混合液及びキュベットを Gene Pulser(BIO-RAD 社製)にセットし、パルス印加を行った。印加条件は電圧 0.47 V, コンデンサ容量 25 µF, 抵抗∞で行った。電圧印加後、600 µl の Electroporation buffer を加えて懸濁し、YNB (-ura) plate 3 枚に均等に塗布植菌した。植菌したプレートは 25°C で 7 日間静置培養し、形質転換体コロニーを取得した。

形質転換体の遺伝子導入の確認は、コロニーから菌体を回収し、前処理した後、PCR を行うことにより行った。形質転換体コロニーから菌体を 1 白金耳回収して、50 mM NaOH 0.05 ml に懸濁し、98°C, 5 分加温後、1 M Tris-HCl buffer (pH 8.0)を 0.05 ml 加えて中和することで前処理を行った。前処理液をテンプレートにプライマー pCsUX2\_F と pCsUX-R のセットにより PCR を行うことで形質転換体への発現カセットの導入を確認した。PCR には KOD FX neo(東洋紡社製)を用いた。約 16 株の形質転換体について PCR を行い、HRP 遺伝子が導入されていることが確認された 8 株を選抜した。

### **形質転換体の培養液上清と菌体内のペルオキシダーゼ活性の測定**

前項で取得した形質転換体を YM 培地(3 ml/10 ml 試験管)に 1 白金耳植菌し、25°C, 180 rpm(横振とう)

で2日間培養し前培養液とした。前培養液 0.03 ml を YX 培地(3 ml/10 ml 試験管)に植菌し、25°C, 180 rpm(横振とう)で72時間培養した。培養液の分析は、遠心分離により菌体外タンパク質と菌体内タンパク質に分離して行った。培養液を1 ml 回収し、12000 rpm, 3 分, 4°C で遠心分離し、上清を菌体外タンパク質画分とした。遠心分離した培養液の上清を取り除き、1 ml の 50 mM リン酸カリウムバッファー(pH 6.0)を加え、さらにガラスビーズ(アズワン社製 BZ-06 0.5 mm~0.71 mm $\Phi$ )を加えて、マルチビーズショッカー(安井機械社製)で 2700 rpm, 3 分の条件で菌体を破碎した。破碎した菌体は、12000 rpm, 3 分, 4°C で遠心分離し、上清を回収して菌体内タンパク質画分とした。

HRP 活性の測定は 次に示す方法により行った。

### HRP 活性測定

試験管に 2.9 ml の 9.1 mM ABTS/100 mM リン酸カリウムバッファー(pH 5.0)と 0.1 ml の 0.3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 水溶液の混合溶液を調製し、25°C で約 5 分間予備加温した。この反応液に 50 mM リン酸緩衝液(pH 6.0)で適宜希釈したペルオキシダーゼ酵素溶液 0.05 ml を添加し緩やかに混和後、水を対象に 25°C に制御された分光光度計で、405 nm の吸光度変化を 5 分記録し、直線部分から 1 分間あたりの吸光度変化( $\Delta OD_{\text{test}}$ )を測定した。



盲検は酵素溶液の代わりにペルオキシダーゼを溶解、希釈する溶液を試薬混液に加えて、同様に1分間あたりの吸光度変化( $\Delta OD_{\text{blank}}$ )を測定した。これらの値から以下の式に従ってペルオキシダーゼ活性を求めた。ここで、ペルオキシダーゼ活性における1単位(U)は、pH 5.0、25°C 条件下で1分間に1マイクロモルの ABTS を酸化する酵素量として定義している。

$$\text{U/ml} = (\Delta OD_{\text{test}} - \Delta OD_{\text{blank}}) \times \text{希釈倍率} \times 3.05 / (36.8 \times 0.05 \times 1.0)$$

なお、式中の 3.05 は反応試薬+酵素溶液の液量(ml)、36.8 は本活性測定条件における酸化型 ABTS のミリモル吸光係数( $\text{cm}^2/\text{マイクロモル}$ )、0.05 は酵素溶液の液量(ml)、1.0 はセルの光路長(cm)を示す。

### 定量 RT-PCR による転写量の確認

Total RNA の抽出はホットフェノール法により行い、Kohrer *et al.* (16)に記載の方法で行った。形質転換

体を YM 培地(3 ml/10 ml 試験管)に 1 白金耳植菌し、25°C, 180 rpm(横振とう)で 2 日間培養して前培養液とし、前培養液 0.03 ml を YX 培地(3 ml/10 ml 試験管)に植菌し、25°C, 180 rpm(横振とう)で 24 時間培養した菌体を回収して、Total RNA を抽出した。抽出された Total RNA 100 µg を DNase I(タカラバイオ社製)によって処理し、さらに、ReverTra Ace qPCR RT kit(東洋紡社製)によって cDNA を合成した。

定量 PCR は、KOD SYBR qPCR Mix(東洋紡社製)を用いて行い、PCR には野生型 HRP 5'領域(65-300 bp)にはプライマー HRP(ntv)RT\_F1 とプライマー HRP(ntv)RT\_R1 のセット、野生型 HRP 3'領域(660-887 bp)にはプライマー HRP(ntv)RT\_F2 とプライマー HRP(ntv)RT\_R2 のセット、コドン最適化 HRP 5'領域(25-225 bp)には、プライマー HRP(opt)RT\_F1 とプライマー HRP(opt)RT\_R1 のセット、コドン最適化 HRP 3'領域(623-915 bp)にはプライマー HRP(opt)RT\_F2 とプライマー HRP(opt)RT\_R2 のセットで PCR を行い、また、コントロールとしてのアクチン遺伝子にはプライマー CsActRT\_F とプライマー CsActRT\_R のプライマーセットを用いた。

リアルタイム PCR の解析には、7500 Fast Real-time PCR System(アプライドバイオシステム社製)を用いて行い、mRNA の発現量はアクチンの mRNA 量に対して標準化した。

### 3'-RACE によるポリアダニレーションサイトの確認

(HRP+CTP)/ntv の形質転換体 No.1 及び(HRP+CTP)/opt 形質転換体 No. 2 から抽出された Total RNA を用いて、3'-RACE 解析を行った。3'-RACE の手順及び概略を FIG 1-6 に示した。上述の通り抽出された Total RNA から SMARTer™ RACE cDNA Amplification kit(クロンテック社製)を用いて cDNA ライブラリの合成を行った。cDNA の合成には、キット付属の 3'-RACE CDS Primer A (5'-AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTAC(T)30 V N-3')を用いた。3'-RACE に用いるセンスプライマーについては、野生型 HRP 遺伝子には、1 段階目に HRP\_F(del-RE)を 2 段階目には HRP\_F(del-sp)のプライマーを用いて PCR を行い、コドン最適化遺伝子は、1 段階目に HRPOpt\_F(del-RE)を 2 段階目に HRPOpt\_F(del-sp)のプライマーを用いて cDNA の増幅を行った。アンチセンスプライマーはキット付属のプライマーを用い、1 段階目には Universal Primer A Mix (UPM)( Long: 5'-ctaatacagactcactatagggc AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT-3', Short: 5'-ctaatacagactcactatagggc -3')を、2 段階目には、Nested Universal Primer A(5'-AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT-3')をそれぞれ用いた。

3'RACE によって増幅した PCR 産物は、Target clone plus(東洋紡社製)を用いて TA クローニングを行い、pTA2 に導入した。pTA2 はクローニングサイトの両サイドに *EcoRI* を含み、インサートのサイズは、プラスミドを *EcoRI* により消化し、アガロースゲル電気泳動を行うことにより解析を行った。また、インサートが導入されたプラスミドは Big-Dye Terminator 3.1 cycle sequencing kit(アプライドバイオシステム社製)及び、3730 DNA Analyzer (アプライドバイオシステム社製)によりシーケンスを解析することによって、polyA の付加部位を特定した。

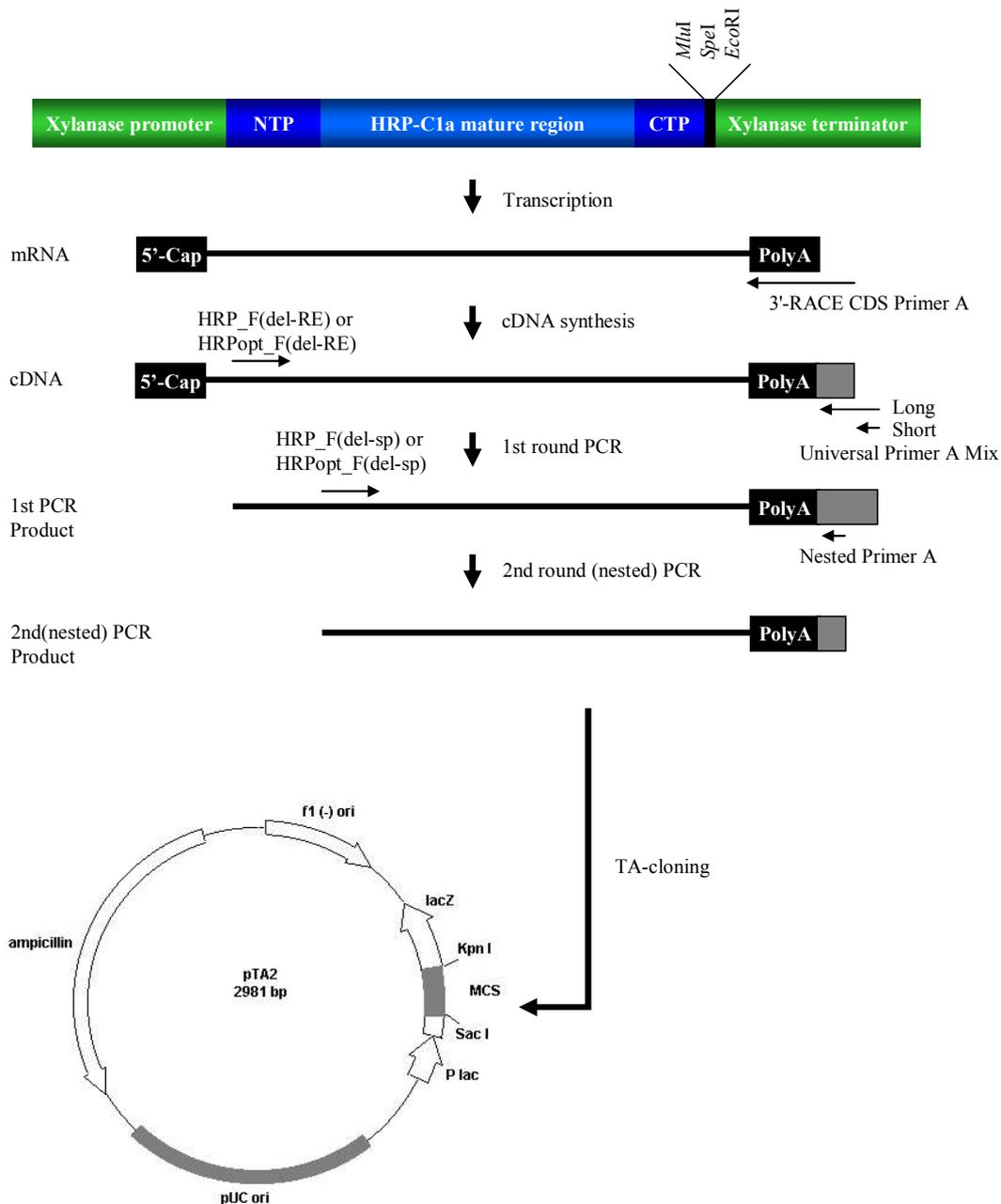


FIG 1-6 The 3'-RACE procedure.

## 【結果】

### 発現ベクターの構築と形質転換体の取得

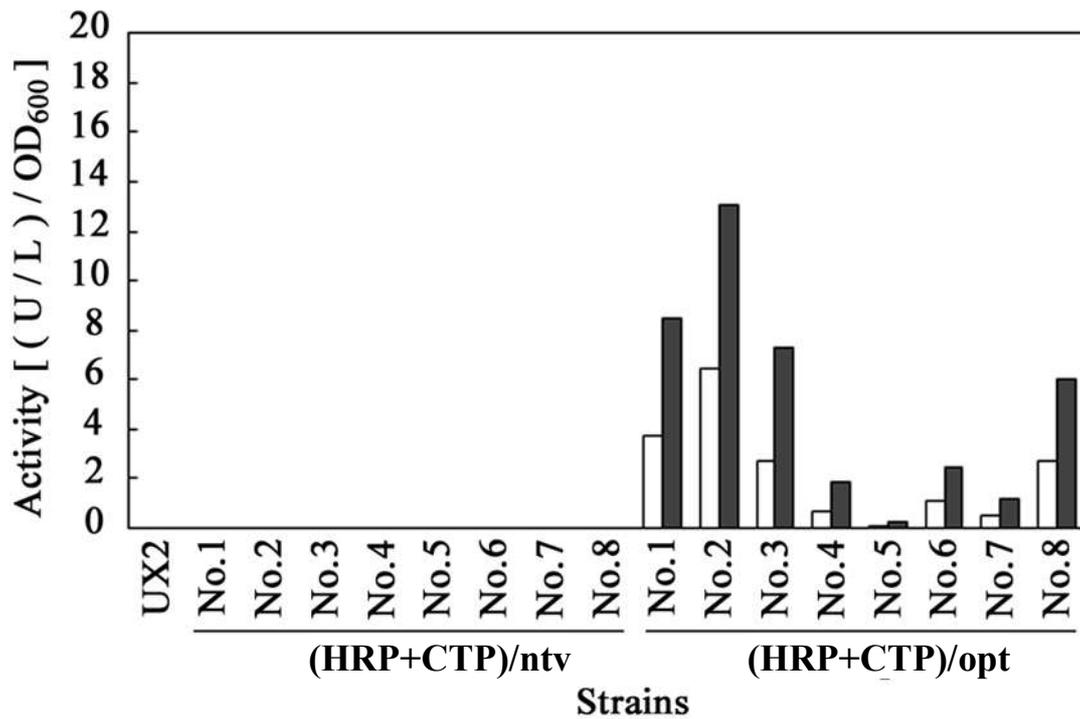
発現ベクターの構築は、pCsUX のキシロースによる誘導が可能なキシラナーゼプロモーターの下流に野生型の HRP-C1a 遺伝子若しくはコドン最適化された HRP-C1a 遺伝子を導入することによって行った。また、Signal-P による解析(15)によって、pCsUX にはキシラナーゼ遺伝子の分泌シグナル配列断片が 36 bp 含まれていると予測されたため、この部分を inverse PCR によって除去し、それぞれの遺伝子を導入した、pCsUX2-(HRP+CTP)/ntv 及び、pCsUX2-(HRP+CTP)/opt を作製した。

*Cryptococcus* sp. S-2 への形質転換は、ウラシル要求性変異株である U-5 株を宿主として用い、形質転換体の選抜はランダムに選択された株から 8 株の遺伝子導入が確認された株を選抜した。

### HRP 生産性の比較

FIG 1-7 に(HRP+CTP)/ntv 形質転換体及び、(HRP+CTP)/opt 形質転換体それぞれ 8 株の培養液遠心上清(菌体外)と菌体内の、培養液の OD<sub>600</sub>あたりの HRP 活性値([(U/L)/OD<sub>600</sub>])を示す。ここで調べたすべての (HRP+CTP)/ntv 形質転換体 8 株とコントロールとして培養した空ベクター(pCsUX2)を導入した形質転換体では、菌体内及び菌体外に HRP 活性は検出されなかった。

一方、コドンを最適化した(HRP+CTP)/opt の形質転換体では、選抜された形質転換体 8 株全てにおいて活性型の HRP の発現が認められた。また、最大の HRP 活性を示した(HRP+CTP)opt No.2 株の HRP 生産量は、菌体内及び菌体外の活性を合わせて、913 U/L であった。この値は、0.43mg/L に相当する。



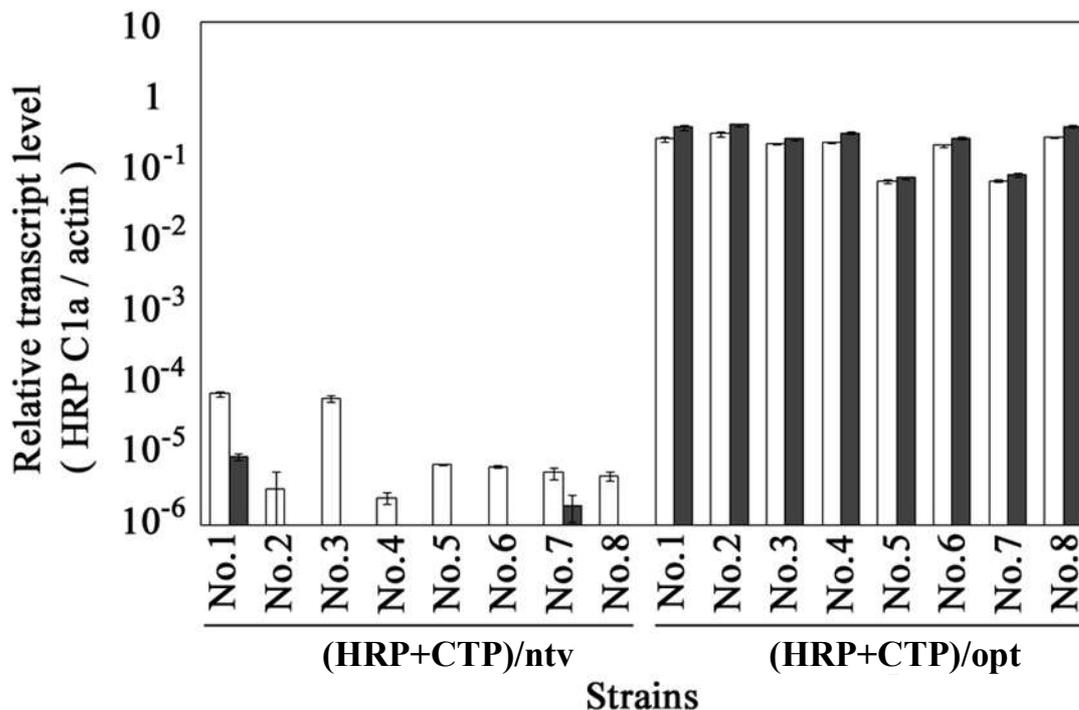
**FIG 1-7 HRP expression from transformants.**

Each transformant (nos.1-8) were randomly selected. The HRP activity levels of intracellular protein lysate (open box) or extracellular supernatant (filled box) were normalized by OD<sub>600</sub>. UX2 is HRP activities of a control vector (pCsUX2) transformant.

### mRNA レベルの比較

野生型 HRP-C1a 遺伝子を導入した形質転換体では HRP が発現しない原因を解析するため、mRNA レベルを Realtime-PCR(RT-PCR)によって測定を行った。その際、完全長の mRNA が転写されていない可能性も考慮し、RT-PCR のターゲットとなる領域は HRP 遺伝子の 5'側と 3'側の 2 箇所を設定した(FIG 1-10A の下線部)。

解析の結果、(HRP+CTP)/opt mRNA の mRNA レベルは、(HRP+CTP)/ntv の約 4,200~9,700 倍量高いことが確認された(FIG 1-8)。さらに、(HRP+CTP)/opt の形質転換体では、5'側の mRNA レベルと 3'側の mRNA レベルはほぼ同等であるのに対し、HRP/ntv+CTP の形質転換体では、8 株中 6 株で 3'側が転写されていなかった。



**FIG 1-8 Quantitative RT-PCR analysis of HRP mRNAs in the transformants.**

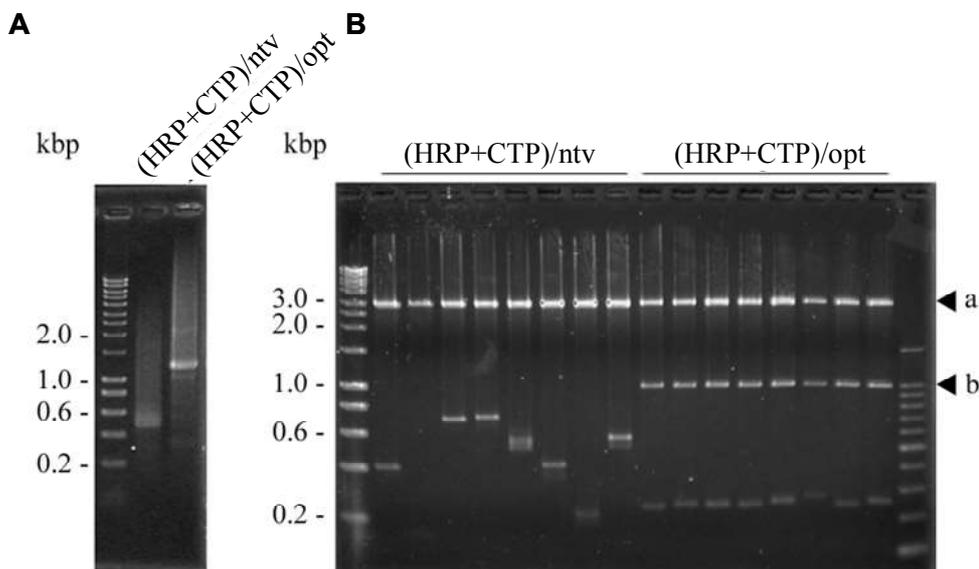
Total RNAs were extracted from transformants grown in expression medium for 24 hours. cDNAs were synthesized using oligo-dT20 primer, and were subjected to quantitative RT-PCR analysis using specific primers as described in Materials and Methods. The relative expression levels of 5'-region (open box) or 3'-region (closed box) in each of HRP genes were normalized with that of the actin gene in each of transformants. The values are means of results from three independent experiments, and the error bars denote standard errors.

### 3'-RACE 解析

前項では、(HRP+CTP)/ntv の mRNA レベルが極めて低いことが示された。野生型 HRP 遺伝子内部には、AT-rich 領域が存在するため、mRNA において ORF の途中でのポリ A 付加修飾が予測された。そこで、3'-RACE 法により mRNA の 3' 末端の解析を行った。

解析には mRNA レベルが比較的高かった、(HRP+CTP)/ntv 形質転換体の 1 株 (FIG 1-7 の no. 1) と (HRP+CTP)/opt 形質転換体の 1 株 (FIG 1-7 の no. 2) から抽出、精製された mRNA を用いて cDNA の合成を行い、クローン化されたそれぞれ 16 個の cDNA について 3' 末端の解析を行った。

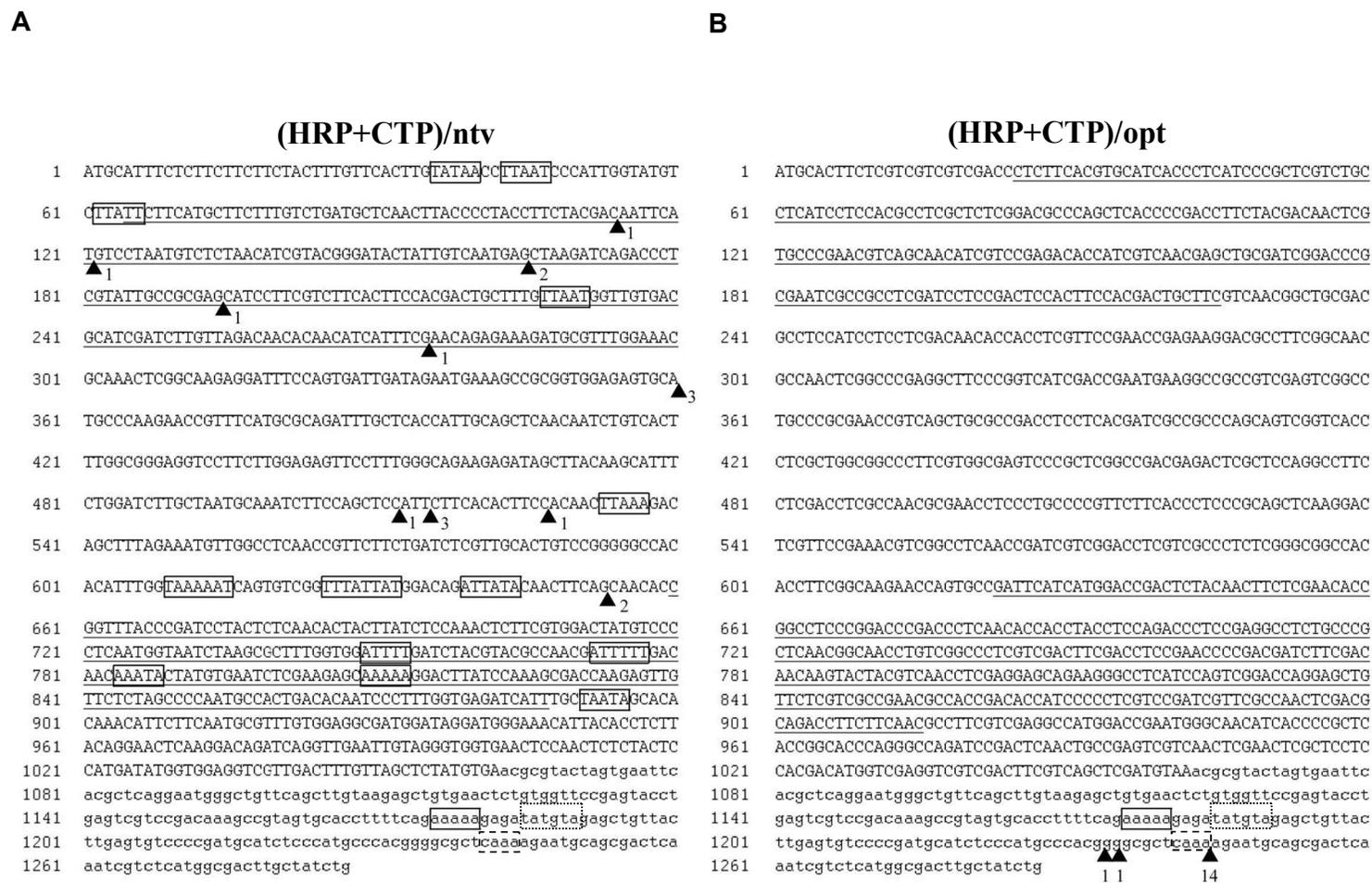
まず、合成された cDNA をアガロースゲル電気泳動で調べたところ、そのサイズは (HRP+CTP)/ntv では約 500 bp、(HRP+CTP)/opt では約 1,200 bp 程度であることが確認できた (FIG 1-9A)。次に、クローニングされた 16 クローンのインサートサイズを、プラスミドを制限酵素 *Eco*RI で処理することによって調べたところ、(HRP+CTP)/ntv では 200~700 bp、(HRP+CTP)/opt では全て 1,200 bp 程度であることが確認された (FIG 1-9 B)。



**FIG 1-9 3'-RACE analysis of the transformants.**

(A) Agarose gel electrophoresis of 3'-RACE PCR product. cDNA was synthesized using an 3'-RACE CDS Primer A in SMARTer™ RACE cDNA Amplification kit (Clontech). First PCR was performed using the forward specific primer (HRP\_F(del-RE) or HRPOpt\_F(del-RE) ) and the reverse universal primer. Then nested PCR was performed using the forward specific primer (HRP\_F(del-sp) or HRPOpt\_F(del-sp)) and reverse universal primer in the kit. (B) Agarose gel electrophoresis of restriction enzyme treated plasmids. Isolated plasmids including 3'-RACE PCR products were digested with *Eco*RI. Arrowheads show the bands of the TA-cloning vector (a) and the bands of full length HRP gene (b) .

続いて、クローニングされた cDNA の DNA 配列を解析した。FIG 1-10 では、poly(A)が付加された箇所を三角のシンボル(▲)で示しており、数字は polyA が付加されたクローンの数を示している。野生型 HRP では、開始コドンから 116 bp~658 bp の領域で polyA が付加されていた(Table 1-3)。これに対してコドン最適化 HRP では開始コドンから 1236 bp~1245 bp の位置で polyA が付加されており、本領域はキシラナーゼターミネーターの領域であるため mRNA 上の ORF は完全長が安定に維持されていることを示している。なお、本結果は、野生型 HRP 遺伝子では 5'領域でのみ転写が検出された RT-PCR の結果(FIG 1-8)とも一致する。



**FIG 1-10 Polyadenylation sites of HRP mRNA in the transformants.**

(A) DNA sequence of native HRP gene and following regions. (B) DNA sequence of codon optimized HRP gene and following region. Arrowheads indicate the polyadenylation sites and numbers are counts of clones. The nucleotide sequence of the coding region is indicated in uppercase letters, and the terminator sequence is indicated in lowercase letters. Underlines indicate the quantitative RT-PCR regions in FIG. 1-8 Boxes indicate AT-rich sequences (5 to 7 nucleotides), dotted boxes indicate UA-rich enhancer element (EE) like sequence and broken box indicate polyA-site.

**Table 1-3 The locations and frequencies of the poly(A) signals within HRP mRNA.**

<sup>a</sup> The ORF (from ATG to TGA) is from 1 to 1062. The xylanase terminator region is from 1081 to 1287

	Location <sup>a</sup>	Frequency
The native HRP gene		
	116	1
	121	1
	165	2
	194	1
	277	1
	360	3
	513	1
	515	3
	527	1
	658	2
The codon optimized HRP gene		
	1236	1
	1237	1
	1245	14

### 【考察】

本節では、HRP 遺伝子のコドンを最適化することにより、*Cryptococcus* sp. S-2 において、HRP を活性型で組換え発現可能となることを確認した(FIG 1-7)。RT-PCR 解析の結果、コドン最適化 HRP 遺伝子の mRNA レベルは野生型 HRP 遺伝子の mRNA レベルの約 4,200~9,700 倍高いことが確認された(FIG 1-8)。また、mRNA を用いた 3'-RACE 解析から、野生型の HRP 遺伝子配列を *Cryptococcus* sp. S-2 に導入した場合、ORF 内部で mRNA に PolyA 付加が起こり、不完全な mRNA が転写されていることが示唆された(FIG 1-9, 10)。

コドン最適化は異種タンパク質の組換え発現において翻訳効率を向上される方法として知られている。麹菌 *Aspergillus oryzae* を用いたダニアレルゲン遺伝子 Der f7 の異種組換え発現において、コドン最適化が coding region の polyA 付加を抑制し、Der f7 の発現量を向上されることに成功している(11,17)。また、スエヒロタケ *Schizophyllum commune* においては、コドンの最適化によって、完全長のハイグロマイシン遺伝子の mRNA レベルが増大することが示されており、どちらの場合でも遺伝子内部の AT-rich 領域が polyA 付加のターゲットとなる(18)。

本研究においてコドン最適化による mRNA レベルは大幅に向上しており、mRNA の安定化にも寄与していると考えられる。真核生物において、polyA の付加は mRNA の成熟化において必須のステップであ

る(19)。Poly(A)テールは RNA を 3'→5'エキソヌクレアーゼ活性からの分解を妨げる役割を担うことも報告されている(20)。*Saccharomyces cerevisiae* においては、UA-rich enhancer element (EE)と A-rich の positioning element (PE)が Hrp1p, Rna15, cleavage factor I によって認識されることが調べられており、通常 poly(A)サイトは PE の 10-30 塩基下流に位置するとされている(21,22)(FIG 1-11)。また、PolyA 付加に関与するこれらの配列は、哺乳類、植物、酵母で認識配列が異なる。

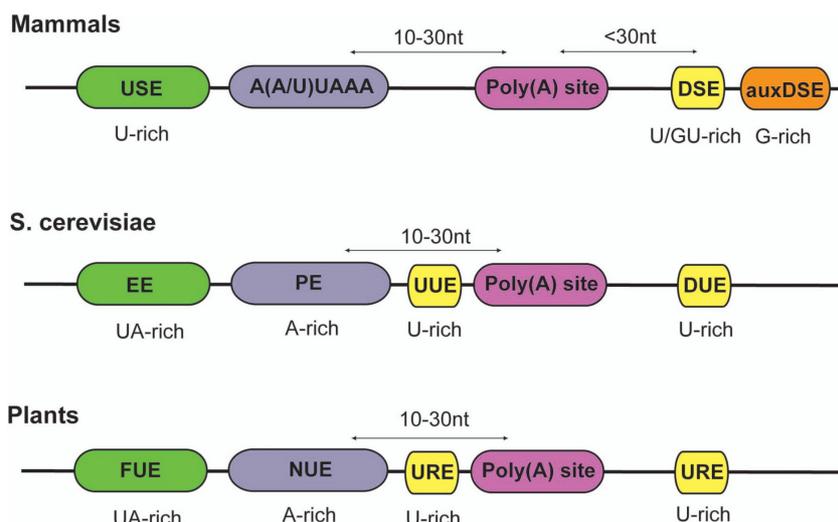


Figure 1. Comparison of the poly(A) signals from animals (canonical), the budding yeast (*S. cerevisiae*) and plants  
 USE: upstream element; DSE: downstream element; auxDSE: auxiliary downstream element; EE, efficiency element; PE, positioning element; UUE, upstream U-rich element; DUE, downstream U-rich element; FUE, far upstream element; NUE, near upstream element; URE, U-rich element. Same colors are used for similar cis-element to illustrate the conservation of the basic tripartite poly(A) signal across different phylogenetic groups.  
 Adapted from reference 2.

**FIG 1-11 The model of mRNA 3'-end processing components in human, yeast and plants.**  
 (Referenced from *Chan et al. (22)*)

キシラナーゼターミネーター配列中には EE-like の配列(UAUGUA)が確認された(FIG 1-10 の 1985 bp から 1990 bp の領域の点線ボックス)が、PE 配列は確認することが出来なかった。また、poly(A)-site(CAAA)は EE-like 配列の 50 塩基下流(FIG 1-10 の 1241 bp から 1244 bp の領域の破線ボックス)にその存在が認められ、(HRP+CTP)/opt では、ほぼこの位置で poly(A)が付加されていた。一方で、(HRP+CTP)/ntv の配列中には、EE 配列、PE 配列の存在を確認することは出来なかったが、ORF 中に poly(A)が付加されている事から、*Cryptococcus* sp. S-2 の polyadenylation に関与するコンセンサス配列は、*Saccharomyces cerevisiae* のそれとは異なる配列を認識していると考えられる。

以上の結果から、HRP 遺伝子のコドン最適化によって、*Cryptococcus* sp. S-2 が認識する内在性の poly(A)-site, EE 配列、PE 配列が除去され、ORF 内部での polyA 付加が抑制されたと考えられる。

### 第3節 HRP-C1a 遺伝子のシグナル配列改変による HRP 生産性への影響検討

#### 【目的】

第2節では、コドンの最適化によって、HRP-C1a 遺伝子を *Cryptococcus* sp. S-2 において活性型で異種発現させることに成功した。しかし、その生産量は、およそ菌体内、菌体外合わせて 913 U/L(0.47 mg/L)であり、過去に示された文献(Table 1-1)と比較すると、その生産量は低い。そこで、本節では、タンパク質の分泌発現に有効だと考えられているシグナル配列の改良により、HRP の生産性向上を目指した。

これまでの報告では、タバコ培養細胞での HRP-C1a の発現において、その C 末端には、液胞滞留シグナルと呼ばれる配列が存在しており、本配列を除去することによって、タバコ培養細胞で、細胞外に HRP-C1a を分泌発現させることが可能になることが示されている(6)。また、同じくタバコ培養細胞の研究において、HRP-C1a の分泌シグナル配列を、タバコ細胞由来のシグナル配列と 5'-UTR 配列に置換することで、分泌発現量が大幅に向上したことが示されている(7)。

本節では、HRP-C1a の C 末端液胞滞留シグナルの除去し、さらに N 末端の分泌シグナル配列を *Cryptococcus* sp. S-2 由来の配列へ置換し、これらのシグナル配列が、HRP-C1a の分泌生産量に与える影響を検討した。

#### 【材料】

遺伝子の発現宿主には、*Cryptococcus* sp. U-5 株(*ura5*)を使用した。DNA 操作には、*Escherichia coli* DH5 $\alpha$  を用いた。*Cryptococcus* sp. U-5 株培養及び形質転換体の前培養には YM 培地(0.3% Yeast Extract, 0.3% Malt Extract, 0.5% Peptone, 1.0% D-Glucose )を、形質転換体の取得には、YNB(-ura)培地(0.67% Yeast nitrogen base w/o AA, 0.078% -Ura DO supplement, 2.0% D-glucose )を、Xylanse promoter による誘導発現には YX 培地(2% Yeast Extract, 5% D-Xylose)をそれぞれ用いた。また、本節で利用したプライマーの名称及び配列については、Table 1-4 に示した。

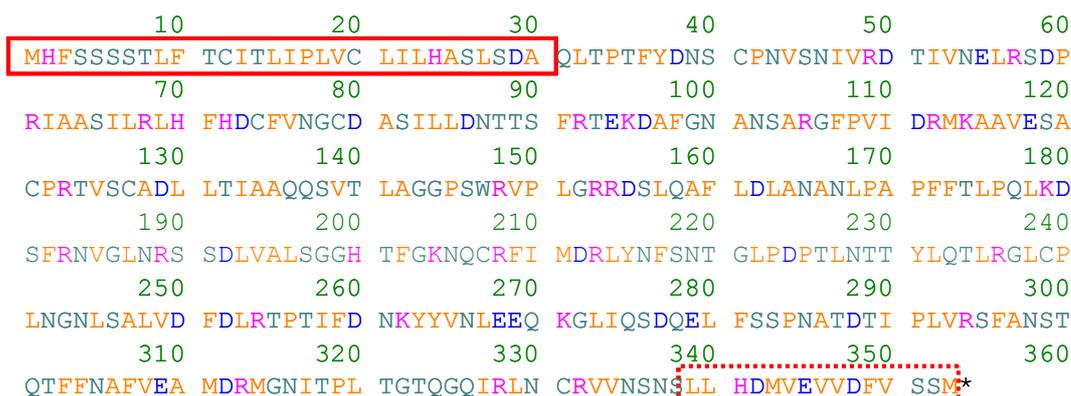
Table 1-4 Primers used in this work.

Primer Name	Sequence
<b>Vector construction</b>	
HRPopt_F	5'-ACGCGTATGCACTTCTCGTCGTCGTCGACCCTCTTC-3'
HRPopt_R	5'-ACGCGTTTACATCGAGCTGACGAAGTCGAC-3'
HRPopt-CTP_R	5'-ACGCGTTTACGAGTTCGAGTTGACGACTCGGCA-3'
Xylpro_iR	5'-CGTGGATTGTATGTCGTGGAGAGG-3'
HRPopt_F(del-RE)	5'-ATGCACTTCTCGTCGTCGTCGACCCTCTTC-3'
HRPopt_F(del-sp)	5'-CAGCTCACCCGACCTTCTACGAC-3'
Xs1_iR	5'- AGCTTCGGTGACCGGCGCAGCGGATGCTACCATCGCGGTCAAAGC AAGGAAGAGTGTGGAGAGCAGCATCGTGGATTGTATGTCGTGGAG AGGCTATGA-3'
Xs2_iR	5'- AGCGGATGCTACCATCGCGGTCAAAGCAAGGAAGAGTGTGGAGAG CAGCATCGTGGATTGTATGTCGTGGAGAGGCTATGA-3'
Cs_iR	5'- GGCTCGGCCGAGAGAAGCAGCGGACAGCACCGCGAGAGCGAGAGC GGAGACGAGCATCGTGGATTGTATGTCGTGGAGAGGCTATGA-3'
As_iR	5'- AGGGGACAGGCCAGCGACCAGTCCTAGAGAGGCGAGCAAGGCCCC AGCTAGGGAGCGGACAGGAGCCATCGTGGATTGTATGTCGTGGAG AGGCTATGA-3'

## 【方法】

## シグナル配列置換ベクターの構築

野生型の HRP-C1a の N 末端には、分泌シグナル配列(NTP: N-terminal signal peptide)が、C 末端には液胞滞留シグナル(CTP: C-terminal vacuolar sorting peptide)が存在している(6,7) (FIG 1-12)。



**FIG 1-12 HRP-C1a peptide sequence and signal peptide region.**

Box indicate N-terminal secretion signal peptide (NTP) and dashed box indicates C-terminal vacuolar sorting peptide (CTP).

*Cryptococcus* sp. S-2 の分泌シグナル配列領域の予測は、Signal-P により予測を行った(15)。Table 1-5 に HRP-C1a の C 末端に存在する液胞滞留シグナル(CTP)のアミノ酸配列及び、N 末端に存在する分泌シグナル配列(NTP)、さらに、*Cryptococcus* sp. S-2 に由来する、キシラナーゼ、アミラーゼ、クチナーゼの分泌シグナル配列(X1-NTP, X2-NTP, A-NTP, C-NTP)の配列を示した。

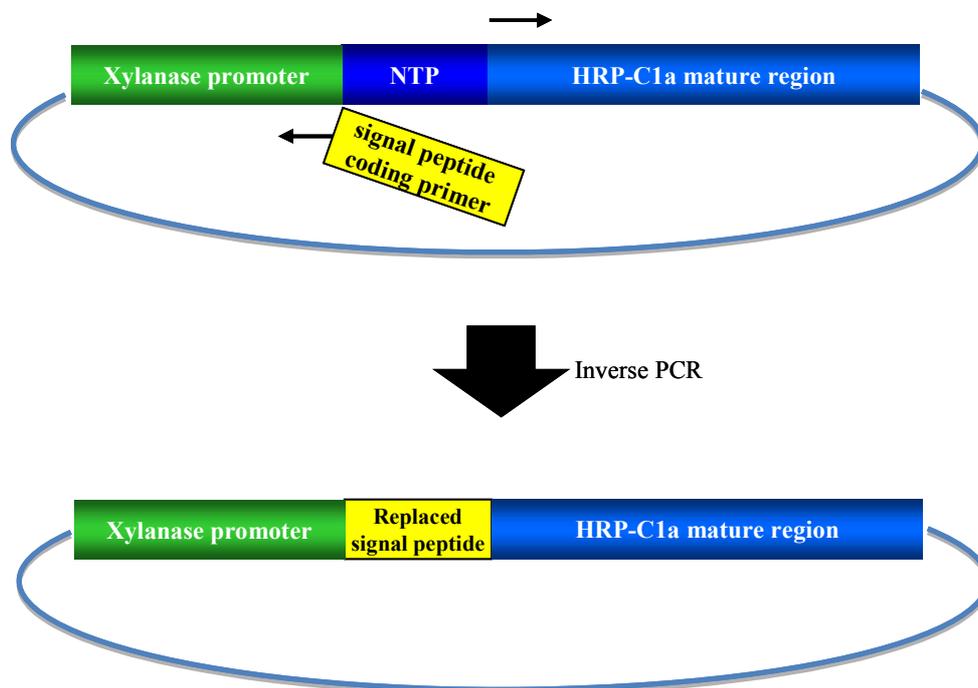
**Table 1-5 Signal sequences in this study.**

Signals	Sequences
C1a-NTP	MHFSSSSTLFTCITLIPLVCLILHASLSDA
X1-NTP	MLLSTLFLALTAMVASAAPVTEA
X2-NTP	MLLSTLFLALTAMVASA
A-NTP	MAPVRSLAGALLASLGLVAGLSP
C-NTP	MLVSALALAVLSAASLGRA
CTP	LLHDMVEVVD FVSSM

まず、第2節で記載のタカラバイオ株式会社の人工合成遺伝子作製サービスにより合成し、納品されたプラスミド pUC-HRP/opt をテンプレートに、プライマー HRP/opt\_F と HRP/opt-CTP のセットで PCR を行うことによって、C 末端の液胞滞留シグナルを除去した配列を増幅した。得られた PCR 産物を *MluI* によって消化して pCsUX の *MluI* サイトにキシラナーゼプロモーターと同方向になるように挿入した。また、キシラナーゼの分泌シグナルの部分配列と、制限酵素 *MluI* サイトの除去を行うため、作製したベクターをテン

プレートに、プライマーHRPopt\_F(del-RE)とXylpro\_iRのセットによりinverse PCRを行い、キシラナーゼの分泌シグナルの部分断片と制限酵素 *MluI* サイトの除去を行った。作製されたプラスミドは pCsUX2-HRP/opt とした。

N 末端の分泌シグナル配列の置換は、第 2 節で記載の pCsUX2-(HRP+CTP)/opt と上述の pCsUX2-HRP/opt をテンプレートとし、プライマーには *Cryptococcus* sp. S-2 由来タンパク質の分泌シグナル配列をコードする DNA を含むプライマーを用いて Inverse PCR を行うことにより HRP-C1a 由来の分泌シグナル配列の置換を行った。シグナル配列置換の方法について、概略を FIG 1-13 に示す。



**FIG 1-13 The scheme of signal replacement.**

pCsUX2-(HRP+CTP)/opt をテンプレートとして、プライマーHRPopt\_F(del-sp.)と Xs1\_iR のセット、プライマーHRPopt\_F(del-sp.)と Xs2\_iR のセットで Inverse PCR を行うことにより、それぞれ分泌シグナル配列を Xylanase1(X1)と Xylanase2(X2)に置換したプラスミドである、pCsUX2-X1 (HRP+CTP)/opt と pCsUX2-X2 (HRP+CTP)/opt をそれぞれ構築した。

続いて、pCsUX2-HRP/opt をテンプレートとして、プライマーHRPopt\_F(del-sp.)と Xs1\_iR のセット、プライマーHRPopt\_F(del-sp.)と Xs2\_iR のセット、プライマーHRPopt\_F(del-sp.)と Cs\_iR のセット、プライマーHRPopt\_F(del-sp.)と As\_iR のセット、で InversePCR を行うことにより、それぞれ分泌シグナル配列を Xylanase1(X1)、Xylanase2(X2)、Cutinase(C)、Amylase(A) に置換したプラスミドである、

pCsUX2-X1HRP/opt、pCsUX2-X2HRP/opt、pCsUX2-A-HRP/opt、pCsUX2-C-HRP/opt、をそれぞれ構築した。

### ***Cryptococcus* sp. U-5 株への形質転換**

*Cryptococcus* sp. U-5 株への形質転換は、Masaki *et al.* (13)に記載の方法により行った。

形質転換体の遺伝子導入の確認は、コロニーから菌体を回収し、前処理した後、PCR を行うことにより行った。形質転換体コロニーから菌体を1白金耳回収して、50 mM NaOH 0.05 ml に懸濁し、98°C, 5 分加温後、1 M Tris-HCl buffer (pH 8.0)を 0.05 ml 加えて中和することで前処理を行った。前処理液をテンプレートにプライマーpCsUX2\_F と pCsUX-R のセットにより PCR を行うことで形質転換体への発現カセットの導入を確認した。PCR には KOD FX neo(東洋紡社製)を用いた。得られた 16 株の形質転換体について PCR を行い、HRP 遺伝子が導入されていることが確認された 8 株を選抜した。

### **形質転換体のペルオキシダーゼ生産性の確認**

前項で取得した形質転換体を YM 培地(3 ml/10 ml 試験管)に1白金耳植菌し、25°C, 180 rpm(横振とう)で2日間培養し前培養液とした。前培養液 0.03 ml を YX 培地(3 ml/10 ml 試験管)に植菌し、25°C, 180 rpm(横振とう)で72時間培養した。培養液の分析は、遠心分離により菌体外タンパク質と菌体内タンパク質に分画して行い、活性測定は、第2節に記載の方法で行った。

## 【結果】

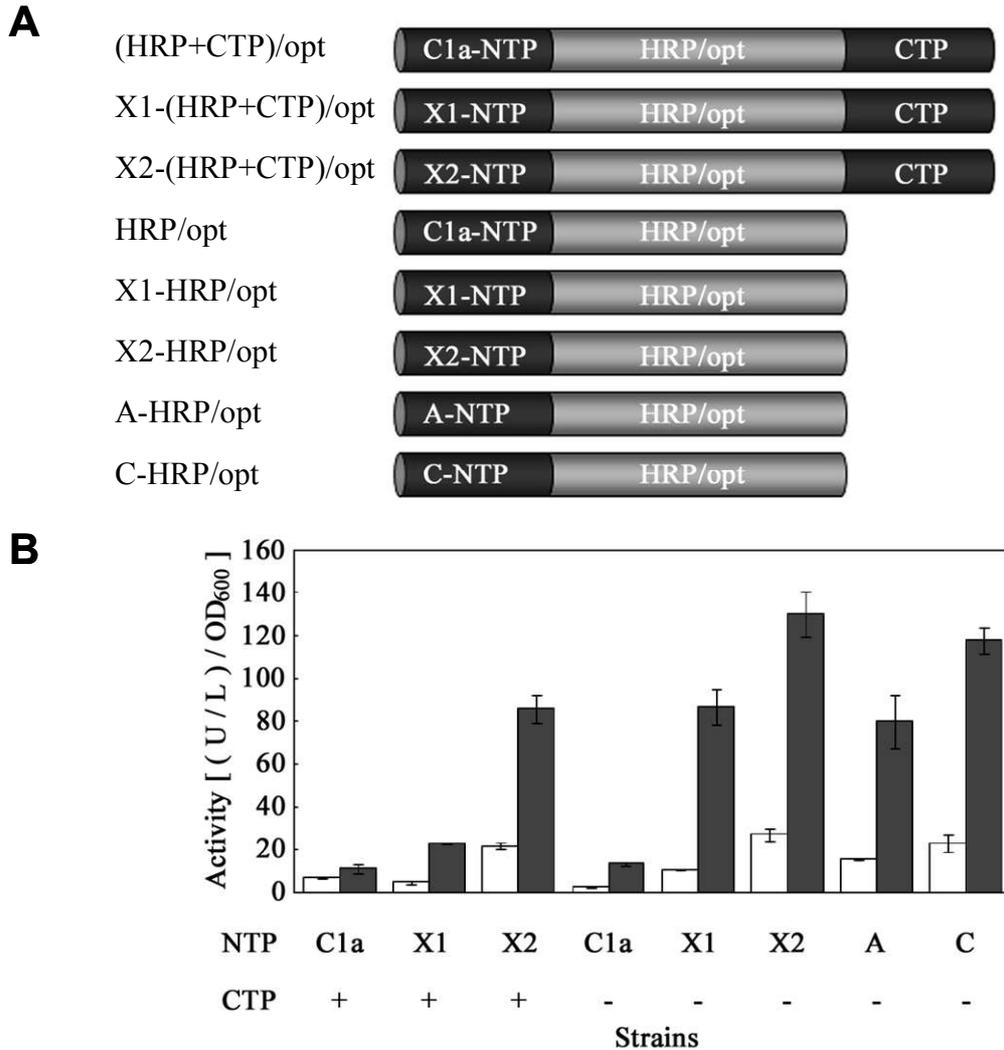
### 分泌シグナル及び液胞滞留シグナルの HRP-C1a 生産への影響

FIG 1-14A に示すシグナル配列を置換した 8 種の HRP 発現カセットを持つ、それぞれの形質転換体を作製し、それぞれ 8 株ずつについて培養を行い、もっとも高い生産性を示した形質転換体を 1 株ずつ選抜した。選抜された形質転換体について、独立して 3 回同様に培養を行い、培養液上清及び菌体抽出液の HRP 活性測定を行った。測定の結果、菌体濃度当たり最も高い生産性( $[(U/L)/OD_{600}]$ )を示したのは、X2-HRP/opt であった(FIG 1-14B)。

NTP については、キシラナーゼの X2 分泌シグナルに置換することによって、CTP がある場合生産性は  $86 [(U/L)/OD_{600}]$  を示し、native の分泌シグナルの場合( $11 [(U/L)/OD_{600}]$ )と比較して 7.5 倍に向上した。さらに、CTP を除去することにより  $130 [(U/L)/OD_{600}]$  まで生産性が向上した。

CTP 配列の除去については、野生型の NTP の場合、菌体内外の HRP 活性を合計した活性としては、HRP の生産性にほとんど影響を与えなかったが、菌体内外の活性比率が、CTP 有りの場合、菌体内 38%、菌体外 62% に対し、CTP を除去した場合、菌体内 19%、菌体外 81% となり、菌体外の HRP 活性の比率が僅かに向上した。

また、培養液上清への HRP の生産量は、野生型の NTP 及び CTP を含むコンストラクトは 490 U/L であり、NTP を X2 シグナルに置換する(X2-HRP/opt)と、13.2 倍向上した。培養液あたりの HRP 分泌生産量は X2-HRP/opt が最大で 6,447 U/L であり、生産された HRP 重量濃度は約 4.1 mg/L に相当する。



**FIG 1-14 Effects of various signal peptides on the production of HRP-C1a.**

(A) Schematic representation of recombinant HRP. The amino acid sequences of the signal peptides are as follows: C1a-NTP., MHFSSSTLFTCITLIPLVCLILHASLSDA ; X1-NTP., MLLSTLFLALTAMVASAAPVTEA ; X2-NTP., MLLSTLFLALTAMVASA ; A-NTP., MAPVRSLAGALLASLGLVAGLSP ; C-NTP., MLVSALALAVLSAASLGRA ; CTP, LLHDMVEVDFVSSM. CTP is a C-terminal propeptide.

(B) The HRP activity levels of intracellular protein lysate (open box) or extracellular supernatant (closed box). The value are mean of results from three independent experiments, and the error bars denote standard errors.

**【考察】**

本節では、HRP-C1a の N 末端に存在する分泌シグナル配列(NTP)の *Cryptococcus* sp. S-2 由来配列への置換、C 末端に存在する液胞滞留シグナル(CTP)の除去による、*Cryptococcus* sp. S-2 での HRP-C1a の生産量への影響を検討した。

今回作製した 8 種のコンストラクトのうち、最も高い HRP 生産性を示したのは、NTP を *Cryptococcus* sp. S-2 のキシラナーゼシグナル(X2)に置換し、CTP を除去したコンストラクト(X2-HRP/opt)であり、培養液上清の菌体濃度あたりの HRP 生産性は、野生型コンストラクトと比較して、11.8 倍にまで向上した。

まず、CTP 配列を除去する効果について考えると、N 末端が HRP-C1a のシグナルの場合、菌体内外の HRP 活性を合計した活性としては、HRP の生産量に影響を与えなかったが、菌体外活性の比率が 1.3 倍に向上したことから、*Cryptococcus* sp. S-2 の菌体内においても、CTP が細胞内に留まる効果を有していると考えられる。しかし、分泌シグナル配列を Xylanase 由来のものに置換した場合、菌体内外の HRP 活性を合計した活性は CTP 無しの方が高くなった。さらに、菌体外活性の比率は X1 シグナルの場合 CTP の除去によって菌体外の HRP 活性の比率は 83%に、X2 シグナルの場合は CTP の除去によって菌体外の HRP 活性の比率は 89%にそれぞれ向上した。

次に、NTP 配列については、*Cryptococcus* sp. S-2 由来配列に置換することによって、HRP の生産性は向上した。CTP が付加されたままの場合は、X1 の分泌シグナルでは培地中への分泌生産性が 11[(U/L)/OD<sub>600</sub>]から、23[(U/L)/OD<sub>600</sub>]へ、X2 の分泌シグナルでは培地中への分泌生産性が 86[(U/L)/OD<sub>600</sub>]に向上した。CTP を除去した場合、HPR/opt と比較して、X1 の分泌シグナルでは 6.5 倍、X2 の分泌シグナルで 9.7 倍、Amylase のシグナルでは 6.0 倍、Cutinase では 8.8 倍に生産性が向上した。

また、最も高い生産性を示した(X2-HRP/opt)では、野生型の分泌シグナルと液胞滞留シグナルが存在する場合と比較して細胞外の HRP 活性は 13.2 倍に向上しており、NTP の置換と CTP の除去の相乗効果により HRP の分泌生産が促進されたと考えられる。

## 第 4 節 *Cryptococcus* sp. S-2 組換え HRP-C1a の実用性評価

### 【目的】

第 2 節及び第 3 節では、コドンの最適化及びシグナル配列の最適化による分子生物学的方法によって HRP-C1a の生産性を向上させることに成功したが、実産業レベルではさらに高い生産量が求められる。

*Cryptococcus* sp. S-2 で使用するキシラナーゼプロモーターは、キシロースによって強力に誘導発現され、キシロースを連続的に培地中に添加することによって、継続的に発現誘導させることが可能である。

本節では、HRP-C1a の更なる高発現を試みるため、キシロースの連続添加による流加培養と、発現された HRP-C1a を精製し、その酵素特性の評価を行った。

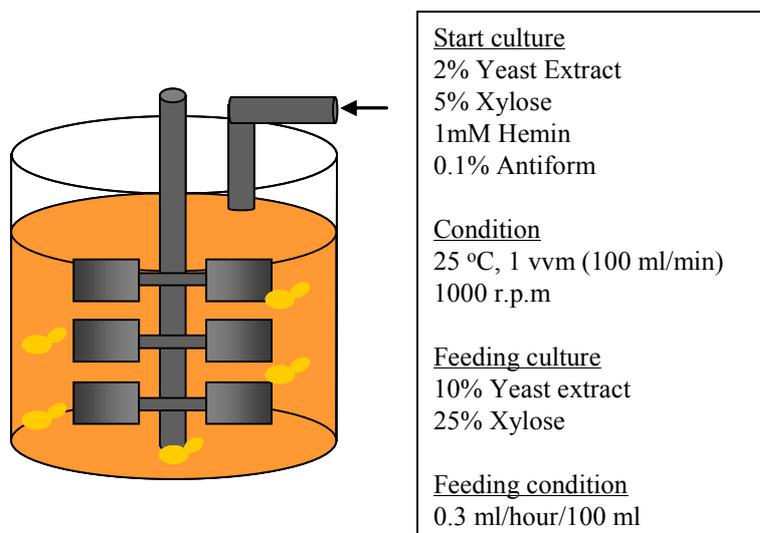
### 【材料】

HRP-C1a の発現には、前節で取得した、X2HRP/opt 株を用いた。その前培養には YM 培地(0.3% Yeast Extract, 0.3% Malt Extract, 0.5% Peptone, 1.0% D-Glucose )を用いた。流加培養には Bio Jr.8(エイブルバイオット社製)を用いた。

### 【方法】

#### 流加培養

X2HRP/opt 株の流加培養は以下の手順で行った。まず、3.0 ml の前培養培地に 1 白金耳植菌し、25°C, 180 rpm で 2 日間振とう培養を行い、前培養液とした。前培養液 1 ml を本培養培地 100 ml (2% Yeast extract, 5% Xylose, 1 mM Hemin(ウシ由来), 0.1% アデカノール(消泡剤))を含む小型培養槽(Bio Jr.8)に植菌し、25°C, 1000 rpm, 通気量 100 ml/min で 120 時間まで培養を行った。HRP の補酵素の供給を助ける目的で Hemin を添加した。また、培地には、流加培地(25% Xylose, 10% Yeast extract)を 0.3 ml/h/100 ml の速度で連続的に添加した。培養液のサンプリングは 24 時間毎に培養液を 1 ml 回収した。流加培養の概略を FIG 1-15 に示す。菌体濃度の測定は、培養液を適宜希釈して U-1900 ratio beam spectrophotometer(日立製作所社製)で 600 nm の吸光度を測定することにより算出した。



**FIG 1-15 The condition of Fed-batch fermentation.**

### 組換え HRP-C1a の精製

組換え HRP(rHRP)の精製品は以下の手順により取得した。まず、上述の通り、120時間の流加培養を行った X2-CTP 培養液を回収し、RPR9-2 ローターを用いて、5000 rpm で 30 分遠心して、培養液上清を得た。培養液上清を分子量 100 kDa カットの PS(Polysulfone)限外ろ過膜(MiniKrosPlus, Spectrum 社製)を透過させた。透過液は、分子量 10 kDa カットの PS(Polysulfone)限外ろ過膜 (SPECTRUM 社製)で濃縮し、さらに、50 mM リン酸カリウムバッファー(pH 6.0)を加えながら濃縮することで低分子を除去し、透析を行った。得られた濃縮液を 50 mM リン酸カリウムバッファーで緩衝化した DEAE-Sepharose fast flow (GE ヘルスケア社製) を充填したカラムに通液し、通過液を回収した。

通過液に 40%(w/v)の硫酸アンモニウムを添加し、同じく 40%(w/v)硫酸アンモニウムを 50 mM のリン酸カリウムバッファー(pH 6.0)に溶解した溶液で緩衝化した octyl-Sepharose (GE ヘルスケア社製)に通液し、HRP を吸着させた。溶出は、硫酸アンモニウム濃度 40%-0% のグラジエント溶出により行い、最大の HRP 活性を有するフラクションを回収した。回収したフラクションは、G25 Sephadex(GE ヘルスケア社製)で 20 mM 酢酸ナトリウムバッファー(pH 4.5)にバッファー置換した。回収液を 20 mM 酢酸ナトリウムバッファー(pH 4.5) で緩衝化した CM-Sepharose (GE ヘルスケア社製) を充填したカラムに通液し、HRP を吸着させた。溶出は、0-1M の NaCl を含む 20 mM 酢酸ナトリウムバッファー(pH 4.5)によるグラジエント溶出により

行い、最大の HRP 活性を有するフラクションを回収した。回収液は Amicon membrane filtration device(メルクミリポア社製)を用いて濃縮した。

HRP の純度は *RZ* 値(Reinheitszahl) value (23)を算出することにより行った。*RZ* 値はヘムの濃度( $A_{403}$ ) とタンパク質濃度( $A_{275}$ )から算出される値である。

$$RZ = \text{Absorbance } 403 \text{ nm} / \text{Absorbance } 275 \text{ nm}$$

タンパク質濃度は、BIO-RAD protein assay(バイオラッド社製)を用いて、BSA を対照にタンパク質濃度を算出した。酵素速度論解析は、ABTS の酸化を過酸化水素濃度 25-200 mM 条件下で測定することにより測定した。

### 分子量の測定

精製された組換え HRP を Endo H(ニューイングランドバイオラボ社製)によって処理することで、N 型糖鎖の除去を行った。まず、タンパク質を 0.5% SDS 及び 1% dithiothreitol で変性させ、Endo H により 37°C で 3 時間インキュベートして N 型糖鎖を除去した。SDS-PAGE には、Nu-PAGE(Invitrogen 社製)を用い、MOPS-SDS バッファー中で電気泳動を行った。泳動には、1 レーン当たり、2.5  $\mu\text{g}$  の HRP をアプライした。また、対照として、市販の西洋ワサビ由来 HRP2 種：PEO-131(東洋紡社製)、type XII(シグマアルドリッチ社製)についても同様に解析を行った。

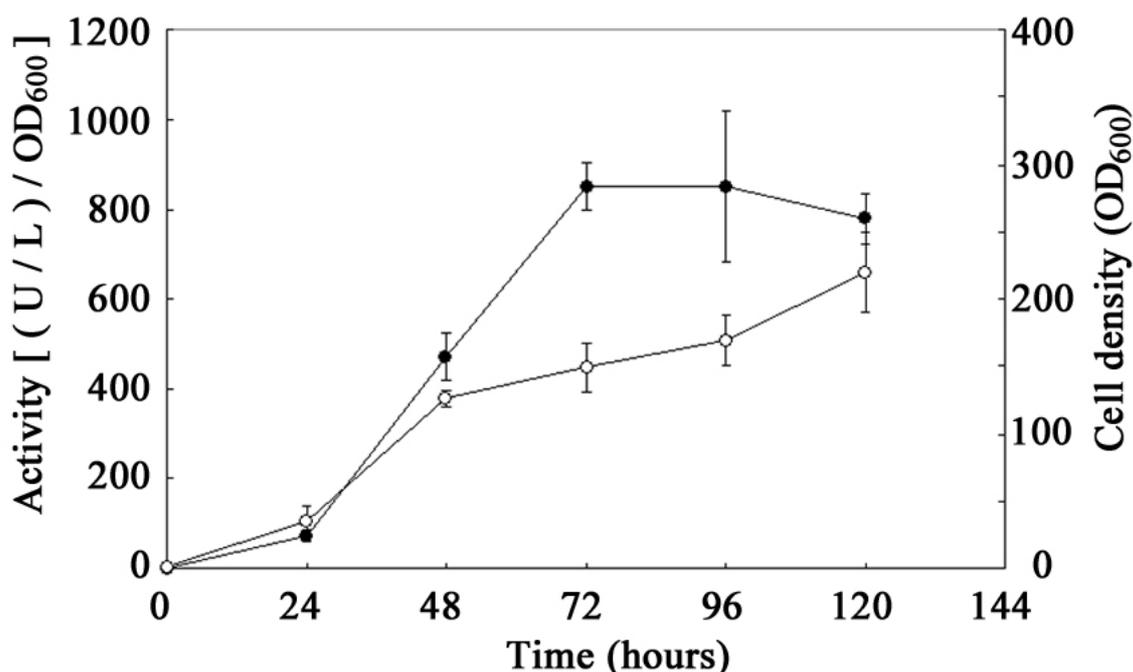
## 【結果】

## 流加培養

小型発酵槽を用いて、キシロース及び酵母エキスを連続的に添加した流加培養を行った結果、菌体濃度(OD<sub>600</sub>)当たりの HRP 活性は、培養御 72 時間時点で 851 [(U/L)/OD<sub>600</sub>]で最大となり、培養液上清当たりの HRP 活性は培養時間 120 時間で、171,000 U/L に達した (FIG 1-16)。菌体濃度は培養 120 時間目まで増加し、培養時間 120 時間時点で 220(OD<sub>600</sub>)に達した。

前節では、試験管培養にて、130 [(U/L)/OD<sub>600</sub>]の生産性を示したが、今回の流加培養では、その 6.0 倍の高い生産性(779 [(U/L)/OD<sub>600</sub>])を示した。

この流加培養では、培養液上清あたりの HRP 活性は 171,479 U/L に達し、前節で示した試験管培養(6,447 U/L)での生産量と比較して、約 27 倍の高い生産量となった。



**FIG 1-16 Time course of recombinant HRP production in fed-batch fermentations.**

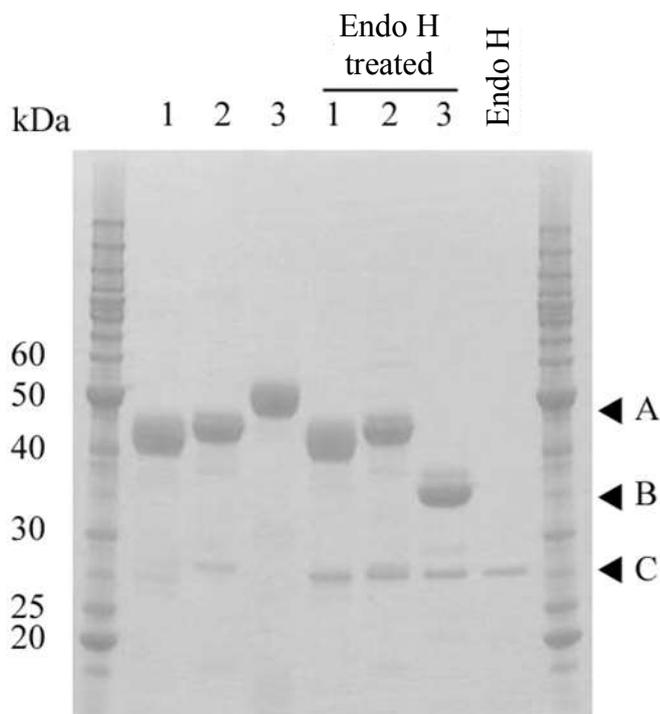
The X2-HRP/opt-CTP transformants were used. Closed circles indicate the activities in supernatant of culture, which are normalized by OD<sub>600</sub>. Open circles indicate the OD<sub>600</sub> of culture.

## 酵素特性の評価

流加培養によって得られた HRP を精製し、酵素特性を評価した。酵素の精製は、限外ろ過膜による分子量分画、疎水性クロマトグラフィー(Octyl-Sepharose)、イオン交換クロマトグラフィー(DEAE-sepharose, CM-sepharose)を行い、SDS-PAGE で単一バンドを示す精製酵素を得た(FIG 1-17 レーン 3)。

得られた rHRP の分子量は 50,000-60,000 の範囲にあり、Endo H による分解によって分子量は 37,000 に低下した。また、西洋ワサビから抽出された、市販の HRP の分子量は約 40,000-45,000 であり、rHRP は西洋ワサビ由来 HRP より分子量が約 5,000 大きかった。また、市販の HRP は Endo H で処理しても分子量に変化は無かった。

酵素のヘム含量の指標となる RZ 値( $A_{403}/A_{275}$ )は rHRP で 2.7 となり、市販の HRP(3.1-3.3)と比較して僅かに低い値となった。また、rHRP のタンパク質重量当たりの活性、 $K_m$ 、 $V_{max}$  については、市販の HRP とほぼ同程度の値となり、特に PEO-131(東洋紡社製)の HRP と近い値となった(Table 1-6)。



**FIG 1-17 SDS PAGE of HRPs.**

Lane1; commercial HRP from TOYOBO (PEO-131), lane2; commercial HRP from SIGMA (TypeXII), lane3; purified recombinant HRP in this study. HRPs treated with Endo H were applied to right side in this gel. Arrowheads show glycosylated (A) and deglycosylated (B) recombinant HRP produced in this study, and deglycosylating enzyme Endo H (C).

**Table 1-6 Kinetic parameters for commercial HRPs (PEO-131, TOYOBO and TypeXII, SIGMA) and recombinant HRP produced by *Cryptococcus* sp. S-2 and purified from the supernatant.**

	U/mg-protein	$RZ(A_{403}/A_{275})$	$K_m(H_2O_2)\mu M$	$V_{max}(U/mg)$
PEO-131	1664	3.3	153	2102
TypeXII	1314	3.1	111	1368
rHRP	1569	2.7	155	2111

### 【考察】

本節では、*Cryptococcus* sp. S-2 により組換え発現された HRP-C1a の更なる高発現のために、キシロースを連続的に添加する流加培養を検討した。続いて、精製後の HRP の特性評価を行った。

キシロースを連続的に添加する流加培養により、HRP の生産量は培養時間 120 時間目で 171,000 U/l に達した。この生産量は、rHRP のタンパク質当たりの比活性が 1569 U/mg であることから、およそ 110 mg/l の生産量と計算される。また、 $OD_{600}$  の値は、培養 120 時間目で 220 にまで達した。

今回の検討の結果、得られた組換え HRP の生産性は、過去に報告された HRP の生産量と比較しても、非常に高いレベルである (Table 1-7)。

**Table 1-7 Comparison of HRP-C1a production yield.**

Host	Production yield (mg/Liter)	Characteristic features	Reference
<i>Escherichia coli</i>	0.34	Expressed in inclusion bodies	<i>Smith et al.</i> , 1990 (2)
<i>Escherichia coli</i>	0.07	Active HRP was expressed by co-expressed of Dsb protein	<i>Kondo et al.</i> , 2000 (3)
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	0.07	Active HRP was secreted in culture medium	<i>Morawski et al.</i> , 2001 (4)
<i>Pichia pastoris</i>	1.3	Fed-batch fermentation induced by methanol	<i>Morawski et al.</i> , 2001 (4)
<i>Nicotiana tabacum</i>	3	Transgenic Tobacco plant cell culture	<i>Matsui et al.</i> , 2003 (7)
<i>Spodoptera frugiperda</i>	41.3	Baculovirus-insect cell culture	<i>Hartmann et al.</i> , 1992 (8)
<i>Cryptococcus</i> sp. S-2	110	Fed-batch fermentation induced by D-xylose	This study

精製された rHRP は十分に精製されており、タンパク質当たりの比活性、ミカエリスメンテン定数、 $V_{max}$  は市販の HRP とほぼ同等であったが、RZ で示されるヘムの含量は市販品よりやや低い結果となった。また、rHRP の分子量は市販の HRP と比較して大きく、rHRP の糖鎖含量は SDS-PAGE の結果から、約 35-43% と見積もられた。西洋ワサビ由来の HRP の糖鎖含量は約 22% であると想定されるため、植物由来の HRP と比較してその糖鎖含量は多いが、*Pichia pastoris* で組換え発現された HRP の糖鎖含量は 48-65% とされており (4)、*Pichia pastoris* で発現されたものよりは低いレベルとなった。また、糖鎖は Endo H によって容易に除去されたことから、酵母などの真菌が生産するハイマンノース型 (Man)<sub>n</sub>+GlcNAc<sub>2</sub> の糖鎖が結合していると考えられる。西洋ワサビから抽出される HRP の糖鎖構造は、植物型の糖鎖構造 (Xyl)Man<sub>3</sub>(Fuc)GlcNAc<sub>2</sub> を有しているとされている (1)。植物型糖鎖にはアスパラギン酸に結合する GlcNAc にフコースが結合しているため、Endo H では除去されにくいとされている。したがって、組換え発現された HRP の糖鎖構造は植物由来のものとは異なり、SDS-PAGE 解析からの推定分子量は約 5,000 程度大きい結果となった。さらに、酵素特性についても、植物由来の HRP とほぼ同等であることが確認でき、臨床診断薬に利用することは十分可能であると考えられる。

## 第5節 結論

本章では、西洋ワサビ(*Armoracia rusticana*)ペルオキシダーゼ(HRP)の *Cryptococcus* sp. S-2 による組換え発現について検討を行った。

第2節では、西洋ワサビから取得した HRP-C1a 遺伝子をそのまま *Cryptococcus* sp. S-2 に導入しただけでは、その発現が見られなかったが、HRP-C1a 遺伝子のコドンをもとに *Cryptococcus* sp. S-2 のコドン使用頻度に基づいて最適化したところ、発現可能となることを示した。また、コドンの最適化は、poly(A)付加の抑制、mRNA の安定化に寄与し、低 GC 含量の異種タンパク質を *Cryptococcus* sp. S-2 で組換え発現させるためには、コドンの最適化が有効であると考えられる。

第3節では、シグナル配列の最適化を検討したところ、C 末端の液胞滞留シグナルを除去し、N 末端を *Cryptococcus* sp. S-2 のキシラナーゼシグナルに置換することによって、野生型 HRP と比較して、HRP の分泌生産性が約 13.2 倍に向上することを示した。

第4節では、高密度培養により HRP-C1a の生産性が試験管培養時と比較して、さらに 27 倍に向上することを示した。最終的に得られた組換え HRP は、培養液当たり 110 mg/L の生産量となり、これまでに報告されている生産量をはるかに超える値であった。さらに生産された HRP は市販の HRP と比較して、分子量が大きく、ヘム含量がやや低いものの、比活性やミカエリスメンテン定数は市販の HRP とほぼ同等であることを示した。

## 引用文献

1. Veitch NC (2004) Horseradish peroxidase: a modern view of a classic enzyme. *Phytochemistry* **65**:249-259.
2. Smith AT, Santama N, Dacey S, Edwards M, Bray RC, Thorneley RN, Burke JF (1990) Expression of a synthetic gene for horseradish peroxidase C in *Escherichia coli* and folding and activation of the recombinant enzyme with  $\text{Ca}^{2+}$  and heme. *J Biol Chem* **265**:13335-13343.
3. Kondo A, Kohda J, Endo Y, Shiromizu T, Kurokawa Y, Nishihara K, Yanagi H, Yura T, Fukuda H (2000) Improvement of productivity of active horseradish peroxidase in *Escherichia coli* by coexpression of Dsb proteins. *J Biosci Bioeng* **90**:600-606.
4. Morawski B, Lin Z, Cirino P, Joo H, Bandara G, Arnold FH (2000) Functional expression of horseradish peroxidase in *Saccharomyces cerevisiae* and *Pichia pastoris*. *Protein Eng* **13**:377-384.
5. Morawski B, Quan S, Arnold FH (2001) Functional expression and stabilization of horseradish peroxidase by directed evolution in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol Bioeng* **76**:99-107.
6. Matsui T, Nakayama H, Yoshida K, Shinmyo A (2003) Vesicular transport route of horseradish C1a peroxidase is regulated by N- and C-terminal propeptides in tobacco cells. *Appl Microbiol Biotechnol* **62**:517-522.
7. Matsui T, Hori M, Shizawa N, Nakayama H, Shinmyo A, Yoshida K (2006) High-efficiency secretory production of peroxidase C1a using vesicular transport engineering in transgenic tobacco. *J Biosci Bioeng* **102**:102-109.
8. Hartmann C, Ortiz de Montellano PR (1992) Baculovirus expression and characterization of catalytically active horseradish peroxidase. *Arch Biochem Biophys* **297**:61-72.
9. Gustafsson C, Govindarajan S, Minshull J (2004) Codon bias and heterologous protein expression. *Trends Biotechnol* **22**:346-353.
10. Gustafsson C, Minshull J, Govindarajan S, Ness J, Villalobos A, Welch M (2012) Engineering genes for predictable protein expression. *Protein Expr Purif* **83**:37-46.
11. Tokuoka M, Tanaka M, Ono K, Takagi S, Shintani T, Gomi K (2008) Codon optimization increases steady-state mRNA levels in *Aspergillus oryzae* heterologous gene expression.

- Appl Environ Microbiol* **74**:6538-6546.
12. Oka C1, Tanaka M, Muraki M, Harata K, Suzuki K, Jigami Y. (1999) Human lysozyme secretion increased by alpha-factor pro-sequence in *Pichia pastoris*. *Biosci Biotechnol Biochem* **63**:1977-83.
  13. Masaki K, Tsuchioka H, Hirano T, Kato M, Ikeda H, Iefuji H (2012) Construction of a new recombinant protein expression system in the basidiomycetous yeast *Cryptococcus* sp. strain S-2 and enhancement of the production of a cutinase-like enzyme. *Appl Microbiol Biotechnol* **93**:1627-1636.
  14. Iefuji H, Iimura Y, Obata T (1994) Isolation and Characterization of a Yeast *Cryptococcus* sp. S-2 That Produces Raw Starch-digesting  $\alpha$ -Amylase, Xylanase, and Polygalacturonase. *Biosci Biotech Biochem* **58**:2261-2262.
  15. Petersen TN, Brunak S, von Heijne G, Nielsen H (2011) SignalP 4.0: discriminating signal peptides from transmembrane regions. *Nat Methods* **8**:785-786.
  16. Kohrer K, Domdey H (1991) Preparation of high molecular weight RNA. *Methods Enzymol* **194**:398-405.
  17. Tanaka M, Tokuoka M, Shintani T, Gomi K (2012) Transcripts of a heterologous gene encoding mite allergen Der f 7 are stabilized by codon optimization in *Aspergillus oryzae*. *Appl Microbiol Biotechnol* **96**:1275-1282.
  18. Schuren FH, Wessels JG (1998) Expression of heterologous genes in *Schizophyllum commune* is often hampered by the formation of truncated transcripts. *Curr Genet* **33**:151-156.
  19. Mandel CR, Bai Y, Tong L (2008) Protein factors in pre-mRNA 3'-end processing. *Cell Mol Life Sci* **65**:1099-1122.
  20. Ford LP, Bagga PS, Wilusz J (1997) The poly(A) tail inhibits the assembly of a 3'-to-5' exonuclease in an in vitro RNA stability system. *Mol Cell Biol* **17**:398-406.
  21. Leeper TC, Qu X, Lu C, Moore C, Varani G (2010) Novel protein-protein contacts facilitate mRNA 3'-processing signal recognition by Rna15 and Hrp1. *J Mol Biol* **401**:334-349.

22. Chan S, Choi EA, Shi Y, Serene (2011) Pre-mRNA 3'-end processing complex assembly and function. *Wiley Interdiscip Rev RNA*. **2**:321-35.
23. Shannon LM, Kay E, Lew JY. (1966) Peroxidase isozymes from horseradish roots. I. Isolation and physical properties. *J Biol Chem* **241**:2166-2172.

## 第2章 FAD 依存型グルコースデヒドロゲナーゼの機能改変と大量発現

### 第1節 緒言

血糖自己測定は、糖尿病患者が通常の自分の血糖値を把握して治療に生かすために重要である。血糖自己測定に用いられるバイオセンサは、一般的に、絶縁体基板上に、測定電極、対電極及び検知電極からなる電極層を形成し、これらの電極基板上に、グルコースを基質とする酵素と電子受容体を含む試薬層を形成させる。このバイオセンサによる血糖値の測定は、バイオセンサに血液を添加して、試薬層中のグルコースを基質とする酵素を血液中のグルコースと反応させて、電子を生成させ、この電子による電子受容体の還元及び酸化から生じる電流値に基づいて血液中のグルコース濃度(血糖値)を求めることによって行われる。世界の糖尿病患者数は、約3億人にも達しており、血糖を測定するため、大量のバイオセンサ用の酵素が安価に提供されることが重要である。

バイオセンサで使用されるグルコースを基質とする酵素の例としては、グルコースオキシダーゼ(EC 1.1.3.4)が挙げられる。グルコースオキシダーゼは、グルコースに対する特異性が高く、熱安定性に優れていることから、血糖自己測定用のバイオセンサとして古くから利用されている(1)。グルコースオキシダーゼを利用した血糖自己測定用のバイオセンサにおいては、グルコースを酸化して D-グルコン- $\delta$ -ラクトンに変換する過程で生じる電子がメディエーターを介して電極に渡されることで血液中のグルコース濃度が測定される。しかし、グルコースオキシダーゼは反応で生じたプロトンに酸素を還元するため、溶存酸素が測定値に影響し、正確なグルコース量が測定できないという問題があった(2)。

これに対して、グルコースデヒドロゲナーゼ(GDH)は溶存酸素の影響を受けないことから、近年、自己血糖測定に広く用いられている。GDHには大きくわけて3種類のタイプがあるが、それぞれに問題点も指摘されている。

一つ目は、ピロロキノリンキノン依存型グルコースデヒドロゲナーゼ(PQQ-GDH)である。このタイプのGDHは、基質特異性に乏しく、マルトースやラクトースといったグルコース以外の糖類にも作用するため、測定値の正確性を損ねてしまうという欠点がある(3)。そのため、2009年には、FDAからマルトースに対して作用する点において警告が発せされている(4)。

二つ目は、NAD(P)依存型グルコースデヒドロゲナーゼであり、ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド

(NAD)を補酵素として使用する。このタイプの GDH には基質特異性には優れる酵素が存在するものの、安定性の悪い NAD を別添する必要があるため、血糖測定が煩雑になるという欠点がある(5)。

三つ目は、フラビンアデニンジヌクレオチドを補酵素とするグルコースデヒドロゲナーゼ(FAD-GDH)がある。上記二種類の GDH の問題点を解決するため、近年利用が進められており、*Burkholderia cepacia* (6,7,8), *Aspergillus terreus* (9), *Glomerella cingulata* (10)から取得されている。また、麹菌 *Aspergillus oryzae* については、1967年に Bak TG らによってその特性が調べられ(11,12,13,14)、2007年にはその遺伝子配列が明らかになった(15)。*A. oryzae* 由来の FAD-GDH はグルコースに対する基質特異性に優れ、マルトース等の糖類とは反応性が低いため、自己血糖測定用酵素として非常に優れた特性を有している。また、*A.oryzae* 由来の FAD-GDH は *Aspergillus flavus* NRRL3357 株でグルコースオキシダーゼとアノテーションされている配列(XP\_002372599.1)と 100%一致していることが報告されており、また、大腸菌 *Escherihia coli* で発現することが確認されている(16)。

さらに、最近では、小腸の吸収能力試験に用いられるキシロースに対して、反応性が非常に低い FAD-GDH が取得されている。従来知られている FAD-GDH よりもキシロース反応性が低い FAD-GDH はケカビ属(*Mucor* sp.)から単離されており、東洋紡株式会社、キッコーマン株式会社から特許が出願されている(25, 26)。

本章では、*A.oryzae* 由来の FAD-GDH に関して、大腸菌での発現を行うとともに、さらに耐熱性を向上させるために遺伝子への変異導入を検討した。また、本変異遺伝子を *A. oryzae* に導入することによって、糖鎖結合型酵素とすることで耐熱性の向上を試みた。さらに、第1章で報告した、*Cryptococcus* sp. S-2 による異種タンパク質組換え発現系を用いて、FAD-GDH のさらなる高生産化の検討を行った。さらに、*Mucor* 属由来の FAD-GDH についても、*Cryptococcus* sp. S-2 による異種タンパク質発現系を用いて発現させることを試みた。

## 第2節 麹菌 *Aspergillus oryzae* 由来フラビンアデニンジヌクレオチド依存型グルコースデヒドロゲナーゼ(FAD-GDH)の機能改変

### 【目的】

自己血糖測定に用いられる GDH に求められる特性としては、グルコース以外の糖質に影響を受けない高い基質特異性を有することが必要である。さらに、輸送や保管中に酵素が失活しない高い安定性が求められる。麹菌 *Aspergillus oryzae* が生産する FAD-GDH を大腸菌で発現させたところ、その耐熱性は低く血糖測定用の酵素としては安定性が不十分であった(15)。

そこで、FAD-GDH の安定性を向上させるために、FAD-GDH 遺伝子に変異を加え、耐熱性の向上を試みた。

### 【材料】

FAD-GDH 遺伝子は、東洋紡保存株である、*A. oryzae* TE5008 株を培養し、mRNA を抽出後に合成した cDNA をテンプレートに PCR を行うことによって取得した。Total RNA の精製の用いる菌体の培養には、誘導培地(1.5% Soy-peptone, 1% Malt-extract, 2% Glucose, 0.05 mM p-Benzoquinone)を用いた。

大腸菌での FAD-GDH の発現宿主には、*Escherichia coli* DH5 $\alpha$  を、発現プラスミドには pBKS(+))を用いた。大腸菌の培養及び形質転換体の前培養には Ampicillin 含有 LB 培地(1.0% Triptone, 1.0% NaCl, 0.5% Yeast extract, 100  $\mu$ g/ml Ampicillin)を、形質転換体の発現培養には Ec 発現培地(2.4% Polypeptone, 2.4% Yeast extract, 0.4% Glycerol, 100 mM K-phosphate pH7.0, 100  $\mu$ g /ml Ampicillin)をそれぞれ用いた。また、本節で利用したプライマーの名称及び配列については、Table 2-1 に示した。

Table 2-1 Primers used in this work

Primer Name	Sequence
AoFADGDH_F	5'- GGAATTCCATATGCTCTTCTCACTGGCATTCTTG -3'
AoFADGDH_F(w/o-sp)	5'- GGAATTCCATATGAAGAACAACACTACGACATACGACTACA -3'
AoFADGDH_R	5'- TAGTGGATCCCTAAGCACTCTTCGCATCCTCCTTA -3'
AOGLD_G163R_F	5'- GTCGGCTGGTTCGAGGAGCCTGGCCTCC-3'
AOGLD_G163R_R	5'- GGAGGCCAGGCTCCTCGACCAGCCGAC-3'
AOGLD_K369R_F	5'- GCCCGGACCGTCAGGGTCAGCAACGGC-3'
AOGLD_K369R_R	5'- GCCGTTGCTGACCCTGACGGTCGCGGC-3'
AOGLD_V551C_F	5'- TGCGGCCACTTGTGCAGCACGCTTTAT-3'
AOGLD_V551C_R	5'- ATAAAGCGTGCTGCACAAGTGGCCGCA-3'
V551C_C547A_F	5'- CTTCCAGGTTGCCGGCCACTTGTGCAGCACGCTTT-3'
V551C_C547A_R	5'- AAAGCGTGCTGCACAAGTGGCCGCAACCTGGAAG-3'

## 【方法】

## FAD-GDH 大腸菌発現ベクターの構築

麹菌 *A. oryzae* 由来 FAD-GDH 遺伝子の取得は以下の手順で行った。まず、*A. oryzae* TE5008 株を誘導培地(50 ml/500 ml 坂口フラスコ試験管)に1白金耳植菌し、30°C, 180 rpm(横振とう)で2日間培養し、ミラクロス(カルビオケム社製)でろ過して菌体を分離し、得られた菌体を液体窒素で凍結させた。凍結された菌体を乳棒、乳鉢粉碎し、粉碎菌体を得た。粉碎菌体を ISOGEN II(日本ジーン社製)を用い、ユーザーマニュアルに従って、Total RNA を精製した。得られた Total RNA から ReverTra Ace α (東洋紡社製)を用いて cDNA への逆転写を行った。また、逆転写には、oligo(dT20) プライマーを用いた。

FAD-GDH の大腸菌への遺伝子導入及び発現のためのプラスミドベクターには、pBKS(+)(+)を用いた。pBKS(+)(+)は pBlueScript KS(+)(+)に inverse PCR によって Lac 遺伝子の直前に *NdeI* サイトを導入したプラスミドである。合成した cDNA をテンプレートとして、プライマー AoFADGDH\_F と AoFADGDH\_R のセットにより PCR で遺伝子を増幅後、*NdeI* 及び *BamHI* 処理し、同様に処理された pBKS(+)(+)の *NdeI*, *BamHI* サイトに Lac プロモーターと同方向になるように挿入し、pBSKN-AoFADGDH を得た。

また、発現させる FAD-GDH 配列には、配列中の N 末端に存在する分泌シグナルを除去した配列を使用した。分泌シグナル配列領域の予測は、Signal-P により解析を行い(17)、N 末端から 22 アミノ酸 (MLFSLAFLSALS LATASPAGRA)が分泌シグナル領域と予測されたため、本配列を除去した領域を PCR により増幅し、クローニングを行った。得られた cDNA をテンプレートとして、プライマー AoFADGDH\_F(w/o-sp)と AoFADGDH\_R のセットにより増幅後 *NdeI* 及び *BamHI* 処理し、同様に処理さ

れた pBKS(+)*Nde*I, *Bam*HI サイトに Lac プロモーターと同方向になるように挿入し、プラスミド pBKS-S2AoFADGDHを得た。得られたプラスミドを *E. coli* DH5 $\alpha$  に形質転換し、Ampicillin 含有 LB 寒天培地(1.0% Triptone, 1.0% NaCl, 0.5% Yeast extract, 100  $\mu$ g/ml Ampicillin, 1.5% Agar)培地上で生育させて、シングルコロニーを選抜することで形質転換体を得た。

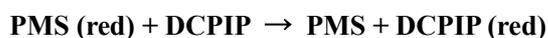
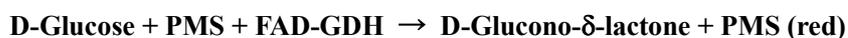
### AoFAD-GDH の大腸菌での発現確認

前項で取得した形質転換体を LB 培地 (3 ml/10 ml 試験管)に 1 白金耳植菌し、30°C, 180 rpm(横振とう)で 24 時間培養し前培養液とした。前培養液 0.03 ml を Ec 発現培地(3 ml/10 ml) 試験管に植菌し、30°C, 180 rpm(横振とう)で 24 時間培養した。培養液の分析は、遠心分離により菌体を回収し、超音波破碎した破碎液を用いて行った。培養液を 1 ml 回収し、12000 rpm, 3 分, 4°C で遠心分離し、上清を取り除いた。沈殿に 1 ml の 50 mM リン酸カリウムバッファー(pH 5.5)を加えて菌体を懸濁させ、超音波破碎装置 (SONIFIER 250, BRANSON 社製)で出力 80%の強度で 1 分間処理した。破碎液を 12000 rpm, 3 分, 4°C で遠心分離し、上清を回収した。得られた上清は、50°C のウォーターバスで 10 分間処理し、残存活性を測定した。

FAD-GDH 活性の測定は 次に示す方法により行った。

### FAD-GDH 活性測定

試験管に 3.0 ml の 200 mM glucose, 1.63 mM phenazine methosulfate (PMS), 0.068 mM dichlorophenolindophenol (DCPIP), 0.1% Triton X-100 を含む、100 mM PIPES-NaOH 緩衝液(pH6.5)を調製し、37°C で約 5 分間予備加温した。この反応液に 0.1% Triton X-100 を含む 50 mM リン酸緩衝液(pH 5.5)で適宜希釈した FAD-GDH 酵素溶液 0.1 ml を添加し緩やかに混和後、水を対象に 37°C に制御された分光光度計で、600 nm の吸光度変化を 5 分記録し、直線部分から 1 分間あたりの吸光度変化( $\Delta$ ODtest)を測定した。



盲検は酵素溶液の代わりに FAD-GDH を溶解、希釈する溶液を試薬混液に加えて、同様に 1 分間あたり

の吸光度変化( $\Delta\text{OD}_{\text{blank}}$ )を測定した。これらの値から以下の式に従って FAD-GDH 活性を求めた。ここで、グルコースデヒドロゲナーゼ活性における 1 単位(U)は、pH 6.5、37°C 条件下で 1 分間に 1 マイクロモルの DCPIP を還元する酵素量として定義している。

$$U/ml=(\Delta\text{OD}_{\text{test}}-\Delta\text{OD}_{\text{blank}})\times\text{希釈倍率}\times 3.10/(16.8\times 0.1\times 1.0)$$

なお、式中の 3.1 は反応試薬+酵素溶液の液量(ml)、16.8 は本活性測定条件における酸化型の DCPIP のミリモル吸光係数( $\text{cm}^2/\text{マイクロモル}$ )、0.1 は酵素溶液の液量(ml)、1.0 はセルの光路長(cm)を示す。

### AoFAD-GDH への部位特異的変異導入

S2AoFADGDH への変異導入は、inverse PCR により行った。また、変異導入箇所は、特許 WO2008/059777(18)に記載の部位を参考に決定し、G163R, K369R, V551C と、G163R+V551C, K369R+V551C, C547A+V551C の 6 種類の変異体を作製した。変異導入は、プラスミド pBKSN-S2AoFADGDH をテンプレートに Table 2-1 に記載のプライマーを用いて変異導入を行った。Inverse PCR には KOD plus mutagenesis kit(東洋紡社製)を用い、変異導入された FAD-GDH の塩基配列は Big-Dye Terminator 3.1 cycle sequencing kit(アプライドバイオシステム社製)及び、3730 DNA Analyzer(アプライドバイオシステム社製)により解析し、変異導入を確認した。

### AoFAD-GDH の耐熱性の確認

前項で取得した形質転換体を LB 培地 (3 ml/10 ml 試験管)に 1 白金耳植菌し、30°C, 180 rpm(横振とう)で 24 時間培養し前培養液とした。前培養液 0.03 ml を Ec 発現培地(3 ml/10 ml) 試験管に植菌し、30°C, 180 rpm(横振とう)で 24 時間培養した。培養液の分析は、遠心分離により菌体を回収し、超音波破碎した破碎液を用いて行った。培養液を 1 ml 回収し、12000 rpm, 3 分, 4°C で遠心分離し、上清を取り除いた。沈殿に 1 ml の 50 mM リン酸カリウムバッファー(pH 5.5)を加えて菌体を懸濁させ、超音波破碎装置 (SONIFIER 250, BRANSON 社製)で出力 80%の強度で 1 分間処理した。破碎液を 12000 rpm, 3 分, 4°C で遠心分離し、上清を回収した。得られた上清は、50°C のウォーターバスで 10 分間処理し、残存活性を測定した。

## FAD-GDH の大量培養と精製

上述で得られた形質転換体(S2AofADGDH, S2AofADGDH(G163R+V551C))を用いて、大量培養と酵素の精製を行った。アンピシリン含有 LB 寒天培地上に生育させた形質転換体を 37°C, 16 時間生育させ、アンピシリン含有 LB 培地(60 ml/500 ml-坂口フラスコ)に 1 白金耳植菌し、37°C, 180 rpm で 16 時間振とう培養を行い、前培養液とした。前培養液全量を *Ec* 発現培地 6L を含む 10L-培養槽(エイブルバイオ社製)に植菌し、30°C, 100 rpm, 通気量 2 L/min で 48 時間まで培養を行った。

FAD-GDH の精製は以下の手順で行った。

まず、上述の通り、48 時間の培養を行った培養液を回収し、RPR9-2 ローターを用いて、5000 rpm で 30 分遠心分離を行い、その後清を除去し、沈殿を得た。沈殿を 50 mM リン酸カリウムバッファー(pH 6.0)で懸濁し、フレンチプレス(GEA Niro Soavi 社製)で処理して、菌体を破碎した。破碎菌体にポリエチレンイミンを添加し、破碎菌体及び核酸を凝集させ、助剤ろ過(ラジオライト#100)を用いて、沈殿を除去した。ろ過液に 40%(w/v)の硫酸アンモニウムを添加し、同じく 40%(w/v)硫酸アンモニウムを 50 mM リン酸カリウムバッファー(pH 6.0)に溶解した溶液で緩衝化した Phenyl-Sepharose (GE ヘルスケア社製)へ通液し、FAD-GDH を吸着させた。溶出は、硫酸アンモニウム濃度 40%-0% のグラジエント溶出により行い、最大の FAD-GDH 活性を有するフラクションを回収した。回収したフラクションは、G25 Sephadex(GE ヘルスケア社製)で 50 mM リン酸カリウムバッファー(pH6.0)に置換(脱塩)した。得られた脱塩液を 50 mM リン酸カリウムバッファーで緩衝化した DEAE-Sepharose fast flow (GE ヘルスケア社製) を充填したカラムに通液し、通過液を回収した。得られた精製酵素は野生型を S2AofADGDH、G163R+V551C の変異が導入されたものを S2AomADGDH とした。

タンパク質濃度は、BIO-RAD protein assay(BIO-RAD 社製)を用いて、BSA を対照にタンパク質濃度を算出した。酵素速度論解析は、DCPIP の還元をグルコース濃度 10-100 mM 条件下で測定することにより測定した。

【結果】

FAD-GDH 遺伝子のクローニングと大腸菌での発現における分泌シグナル配列の影響

AoFADGDH の cDNA は、全長が 1779 bp(終始コドン含まず)からなり、593 アミノ酸をコードする。N 末端の 22 アミノ酸は、分泌シグナル配列と予測され、麹菌での細胞外分泌に必須と考えられる(FIG 2-1)。

一方、大腸菌での異種タンパク質の発現においては、分泌シグナル配列は不要と考えられるため、22 アミノ酸を除去し大腸菌での生産性への影響を検討した。

```

1  ATGCTCTTCTCACTGGCATTCCCTGAGTGCCTGTGCGTGGCCACGGCATCACCGGCTGGACGGGCCAAGAACACTACGACATACGACTAC  90
   M L F S L A F L S A L S L A T A S P A G R A K N T T T Y D Y
>Secretion signal peptide
91  ATCGTTGTGGGAGCGGCACAAGTGGTCTTGTGGTFCGCAAAATCGCCTTTTCTGAGAACCCCGATGCTCCGTTCTTCTGCTTGGAGCCGGT  180
   I V V G G G T S G L V V A N R L S E N P D V S V L L L E A G
181 GCTTCTGTGTTCAACAACCCGGACGTAACCAACGCTAACGGTTATGGATTGGCCTTTGGCTCGGCCATCGACTGGCAGTACCAAGTCTATT  270
   A S V F N N P D V T N A N G Y G L A F G S A I D W Q Y Q S I
271 AACCAAAAGCTATGCAGGAGGTAACAGCAAGTTCTGCGTGTGGTAAGGCCCTTGGAGGAACCAAGTCAATCAATGGAATGGCCATATACC  360
   N Q S Y A G G K Q Q V L R A G K A L G G T S T I N G M A Y T
361 CGCGCAGAGGATGTCAGATTGACGTTTGGCAGAACTTGGAAACGAAGTTGGACGTGGAAGATCTCTTACCATACTACCTGAAGAGT  450
   R A E D V Q I D V W Q K L G N E G W T W K D L L P Y Y L K S
451 GAAAACCTGACGGCCCCACAGCTCTCAGGTTGCTGTGGCGCTGCTTATAACCCCTGCCGTGAATGGAAAAGAAGGCTCTCTCAAGGTC  540
   E N L T A P T S S Q V A A G A A Y N P A V N G K E G P L K V
541 GGCTGGTCGGGAAGCCTGGCCTCCGTAATCTGTGCTGCTGTAACCGTACGTTCCAAGCCGCTGGTGTCCATGGGTTGAGGATGTC  630
   G W S G S L A S G N L S V A L N R T F Q A A G V P W V E D V
631 AATGGAGGCAAGATGCGTGGCTTCAACATCTACCCATCCACCCCTGACGTTGACCTCAATGTCGCGAAGATGCGACCCGGGCATACTAC  720
   N G G K M R G F N I Y P S T L D V D L N V R E D A A R A Y Y
721 TTCCCTTATGATGACAGGAAGAACCCTCACCTGCTGGAGAACCACCACTGCCAACCCGCTTTTCTGGAAGAACGGCTCTGCTGAGGAAGCT  810
   F P Y D D R K N L H L L E N T T A N R L F W K N G S A E E A
811 ATTGCGGATGGTTCGAGATCACTCCGCTGATGGCAAGGTCCTGCTGTCATGCAAAGAAAGAGGTCATCATCTCTGCTGGTGCCTG  900
   I A D G V E I T S A D G K V T R V H A K K E V I I S A G A L
901 CGGTCTCTCTCATTCTCGAGCTTTGAGGAGTTGAAACCCAACCTCCTCAAAAAGAACAACATAACCCACGTTGTCATCTCCCCACC  990
   R S P L I L E L S G V G N P T I L K K N N I T P R V D L P T
991 GTTGGGAGAACCCTCAAGACCAAGTCAACAACGGCATGGCTGGCGAAGGATACGGCGTCTTCCGCGTGCCTCAACCCGTGACCTACCT  1080
   V G E N L Q D Q F N N G M A G E G Y G V L A G A S T V T Y P
1081 TCCATCTCCGACGCTTTCGGTAACGAGACTGACTCTATCGTTGCATCTCCTCCGATCTCAACTCTCCGACTACGCCCGCCGACCGTCAAG  1170
   S I S D V F G N E T D S I V A S L R S Q L S D Y A A A T V K
1171 GTCAGAACCGCCACATGAAGCAGGAGGACCTTGGAGCCCTTACCAGCTCCAATTTGACCTCATCGTCAAGGACAAGTCCCTATCGCC  1260
   V S N G H M K Q E D L E R L Y Q L Q F D L I V K D K V P I A
1261 GAGATCCCTCTTCCACCCCGTGGTGGAAACGCCGTGCTCCTCCGAATTTGGGGCTTGCCTCCCTTCGCCCCTGGCAACATCCACATTAGC  1350
   E I L F H P G G G N A V S S E F W G L L P F A R G N I H I S
1351 TCCAATGACCCGACTGCTCCCGCCGATCAACCCTAACTACTTTATGTTCCGAATGGGACGGCAAGGCCAGGCCGGTATGCCCAGTAC  1440
   S N D P T A P A A I N P N Y F M F E W D G K S Q A G I A K Y
1441 ATCAGAAAGATTTCCGACGCGCACCATTGAACAACCTTATTGCGAAGGAAACCAAGCCGGTCTCTCTGAGATTCGGCCACTGCTGCG  1530
   I R K I L R S A P L N K L I A K E T K P G L S E I P A T A A
1531 GATGAGAAGTGGTGAATGGCTCAAGGCTAACTATCGTTCCAACTTCCACCCGTCGGAACCTGCTGCCATGATGCCTCGTTCATTGGT  1620
   D E K W V E W L K A N Y R S N F H P V G T A A M M P R S I G
1621 GGCGTTGTTGATAACCGTCTCCGGGCTATGGTACCAGCAATGTTCCGCTGCTAGATGCGTCTGTCCTGCCCTTCCAGGTTTGGCCGAC  1710
   G V V D N R L R V Y G T S N V R V V D A S V L P F Q V C G H
1711 TTGGTTAGCACGCTTTATGCCGTTGCCGAGCGCTTCCGACTTGATTAAGGAGGATGCGAAGAGTGCTTAG  1782
   L V S T L Y A V A E R A S D L I K E D A K S A *

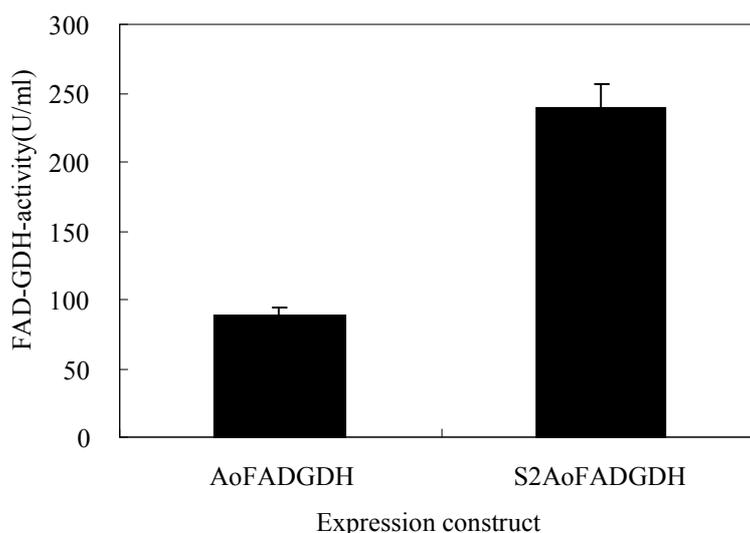
```

FIG 2-1 Cloned FAD-GDH cDNA sequence from *Aspergillus oryzae* TE5008 strain.

Underline indicate the predicted secretion signal peptide. Boxes indicate mutation points in this study.

それぞれの形質転換体の培養の結果、分泌シグナル配列を有する形質転換体は、培養液中の FAD-GDH 活性が 88 U/ml であり、一方、分泌シグナル配列を除去した形質転換体の FAD-GDH 生産量は、239 U/ml となった(FIG 2-2)。

また、それぞれの FAD-GDH の 50°C, 10 分処理後の残存活性は、分泌シグナルありで 30%, 分泌シグナルなしで 35%となり、ほぼ同程度の耐熱性を示した。



**FIG 2-2** The effect of secretion signal peptide in expression level of FAD-GDH in *E.coli*.

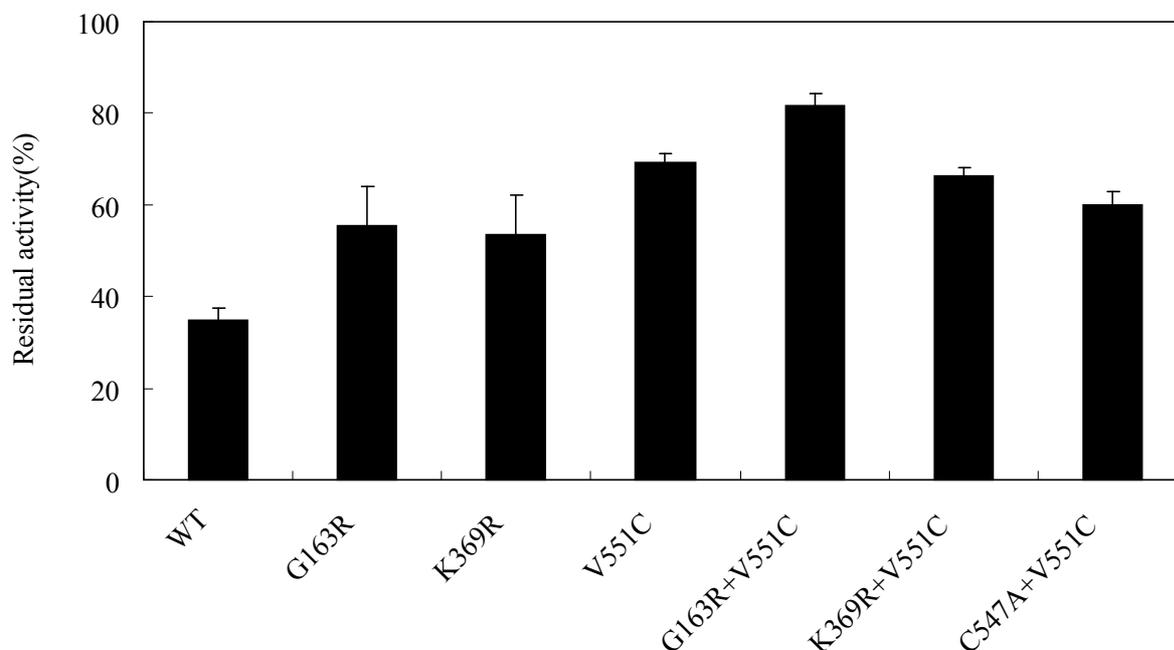
Cells were grown in 3 ml cultures at 30°C for 24 h. The FAD-GDH activity levels of intracellular protein lysate were measured. The values are means of results from three independent experiments, and the error bars denote standard errors.

#### 部位特異的変異導入による FAD-GDH の耐熱性向上

特許 WO 2008/059777 には、*A. oryzae* 由来の FAD-GDH にランダムに変異を導入することによって、耐熱性が向上することが示されている。本特許によると、G163R と V551C の二重変異体が最も耐熱性向上効果が高いことが示されており、本研究でも G163R と V551C の変異を導入することにした。また、本特許においては、K120E+S167P+K369R の 3 変異体についても、耐熱性が向上することが示されており、K120E には耐熱性向上効果がなく、S167P には耐熱性向上効果があることが確認されている。一方、K369R については単独での変異導入による効果は確認されていなかった。そこで、G163R, K369R, V551C の単独変異体を作製し、さらに、これらの変異を組み合わせた二重変異体 G163R+V551C, K369R+V551C も作製した。また、V551C はシステインが導入されており、V551C と V551C の近傍に存在

する C547 の間にジスルフィド結合が付加された可能性が考えられたため、C547 についても変異を加え、C547A+V551C を作製し、ジスルフィド結合を形成させないことで耐熱性に影響を与えるかどうか検討した。

耐熱性評価の結果、野生型配列では 50°C、10 分間の処理によって、残存活性は 35%まで低下するのに対して、G163R では 55%、K369R では 53%、V551C では 69%の残存活性を示し、耐熱性が向上した (FIG 2-3)。また、最も耐熱性向上効果が高かった V551C 変異と、G163R または K369R を組み合わせたところ、G163R+V551C の二重変異で残存活性が 82%、K369R+V551C の二重変異で残存活性が 66%となった。また、V551C 変異と C547A の変異を組み合わせたところ、残存活性は 60%となり、やや耐熱性は低下した。



**FIG 2-3 Stabilities of wild-type and evolved FAD-GDH variants expressed in *E. coli*.**

Cells were grown in 3 ml cultures at 30°C for 24 h. Residual activities measured after 10 min incubation at 50°C in K-Phos buffer (50mM, pH5.5). Stability was determined from the ration of residual to initial activity. The values are means of results from three independent experiments, and the error bars denote standard errors.

## 大腸菌で発現された FAD-GDH の特性

大腸菌で発現された FAD-GDH は精製により高純度に精製され、これを用いて酵素特性を調べた (Table 2-2)。S2AoFADGDH 及び S2AomFADGDH(変異体 G163R+V551C)の両精製酵素について、Glucose を含む 9 種類の糖類(Maltose, D-Xylose, D-Galactose, Fructose, 2-deoxy-D-Glucose, Mannose, Lactose, Sucrose)に対する作用性を調べたところ、Glucose への作用性に対して、Maltose, Galactose, Fructose, Lactose, Sucrose への作用性は 1%未満であり、G163R と V551C の変異導入によって変化しなかった。D-Xylose, 2-deoxy-D-Glucose, Mannose に対する作用性は、それぞれ S2AoFADGDH で 7.9%, 38.3%, 3.3%、S2AomFADGDH で 7.5%, 32.8%, 2.6%であり、変異の導入によって、各糖類への作用性には影響を与えなかった。D-Glucose に対する  $V_{max}$  は S2AoFADGDH で 1525 U/mg、S2AomFADGDH では 1418 U/mg となり、変異導入によってわずかに  $V_{max}$  が低下した。グルコースに対するミカエリスメンテン定数については、S2AoFADGDH は 57 mM、S2AomFADGDH は 64 mM となり、変異導入によってわずかに  $K_m$  が上昇した。

**Table 2-2 Enzyme specificity of wild type FAD-GDH(S2AoFAD-GDH) and mutant (S2AomFAD-GDH:G163R+V551C).**

Substrate specificity(%) (in 200mM substrate)	S2AoFADGDH	S2AomFADGDH (G163R, V551C)
D-Glucose	100.0	100.0
Maltose	0.3	0.3
D-Xylose	7.9	7.5
D-Galactose	0.7	0.5
Fructose	0.0	0.0
2-deoxy-D-Glucose	38.3	32.8
Mannose	3.3	2.6
Lactose	0.0	0.0
Sucrose	0.0	0.0
<b><math>V_{max}</math> (U/mg-protein)</b>		
for D-Glucose	1525	1418
for D-Xylose	128	118
for 2-deoxy-D-Glucose	892	804
<b><math>K_m</math> (mM)</b>		
for D-Glucose	57	64
for D-Xylose	23	33
for 2-deoxy-D-Glucose	141	194

**【考察】**

本節では、*A. oryzae* 由来の FAD-GDH 遺伝子をクローニングし、大腸菌での組み換え発現のために分泌シグナル配列の除去による生産性の向上、および、部位特異的変異導入による耐熱性の向上について検討した。

麹菌 *A. oryzae* TE5008 株は、東洋紡株式会社の保存菌株であり、本菌から取得された FAD-GDH は 593 アミノ酸から構成されている。一方で、ゲノム解析がなされた麹菌 RIB40 株(ATCC 42149 株)には、5 アミノ酸の欠損と 1 アミノ酸の置換があり、この変異により FAD-GDH 活性がなくなることが国際特許 WO2008/001903 で確認されている(19)。N 末端の 22 アミノ酸は、分泌シグナル配列と予測され、本配列を除去し、大腸菌で発現させたところ、FAD-GDH の生産量は 2.7 倍に向上したものの、酵素の耐熱性にはほとんど影響がなかった。このことから、FAD-GDH の大腸菌での発現において、分泌シグナル配列を除去することによって、大腸菌内での発現、若しくはフォールディングが効率化されたことが予測される。

FAD-GDH への部位特異的変異導入では、G163R+V551C の二重変異によって、50°C、10 分処理後の残存活性を 35%から 82%に大幅に向上した。V551C の変異は、FAD-GDH の耐熱性向上に大きく寄与しており、その原因をシステイン残基導入によるジスルフィド結合の形成によるものと考え、近傍のシステイン残基 C547 をアラニンに置換した変異体を作製し、耐熱性を評価した。その結果、熱処理後の残存活性は 60%となり V551C の単独変異と比較してやや耐熱性が低下したが、野生株の耐熱性(35%)までには低下しなかった。本結果から、V551C 変異によって挿入されたシステイン残基は C547A とは直接ジスルフィド結合しているとは考えにくく、新たに導入されたシステイン側鎖がタンパク質の立体構造の安定化に影響を与えていると考えられる。

また、V551C 変異に加えて、G163R または、K369R の変異を加えたところ、G163R との二重変異では耐熱性が V551C 単独変異より向上したのに対して、K369R との二重変異では耐熱性はほとんど変化しなかった。すなわち、G163R と V551C の変異が相加的に耐熱性を向上させる効果があるが、K369R については、V551C の変異とは耐熱性を相乗的に向上させる効果は無いと考えられる。

### 第3節 麹菌 *Aspergillus oryzae* 由来変異型フラビンアデニンジヌクレオチド依存型グルコースデヒドロゲナーゼ(FAD-GDH)の麹菌による発現

#### 【目的】

第2節では、大腸菌において FAD-GDH を活性型で発現させ、さらに、G163R+V551C の変異導入によって、耐熱性を大幅に向上させることが可能になった。しかし、大腸菌で発現させた FAD-GDH の耐熱性は、50°C、10 分処理で残存活性が 82%であり、さまざまな環境で使用される血糖測定用の酵素としては耐熱性が不十分である。また、大腸菌で組換え発現された FAD-GDH は菌体内に蓄積されており、工業生産において菌体破碎や、核酸、細胞膜成分等の除去が必要となるため煩雑な精製工程が必要となる。FAD-GDH を実用化するためには、さらに安定性を向上させる必要があり、工業生産を実現させるためには、精製工程をさらに簡略化する必要がある。

これらの課題を解決するためには、FAD-GDH の真核生物宿主による発現が有効であると考えられる。麹菌や酵母をはじめとする真核生物では、タンパク質の分泌経路によってタンパク質を分泌発現することが可能である。分泌生産により工業生産における精製工程を簡略することが可能となると考えられる。また、真核生物宿主により分泌生産されたタンパク質には N 型糖鎖が結合する。N 型糖鎖の結合は、近傍に位置するフェニルアラニン残基の芳香環と相互作用することによって、タンパク質の立体構造を安定化させるとされている (20)。 *Aspergillus oryzae* 由来 FAD-GDH についても、真核生物宿主で発現させることにより N 型糖鎖が結合し、FAD-GDH の安定性が向上する考えられる。

本節では、取得した FAD-GDH 遺伝子を *A. oryzae* に導入して発現させることにより、分泌発現とさらなる耐熱性向上を検討した。

#### 【材料】

遺伝子の発現宿主には、麹菌 *A. oryzae* NS4(*niaD*<sup>-</sup>, *sC*)株を使用した。DNA 操作には、*Escherichia coli* DH5 $\alpha$ を用いた。*A. oryzae* NS4 株の培養及び形質転換体の前培養には DP 培地(2.0% デキストリン水和物, 1.0% ポリペプトン, 0.05% KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.01% MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O)を、最小培地には、Czapek-Dox-NO<sub>2</sub>/SO<sub>4</sub> (CD NO<sub>2</sub>/SO<sub>4</sub>) 培地(1.0% glucose, 0.3% NaNO<sub>2</sub>, 0.2% KCl, 0.1% KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.05% MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O,

0.001% FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O)を用い、形質転換体の取得には、CD-NO<sub>2</sub>/SO<sub>4</sub> 培地へプロトプラスタスタビライザーとして、1.2 M Sorbitol を添加した選択培地を用いた。Amylase promoter による誘導発現には Ao 発現培地(1.0% Malt Extract, 1.5% Soy-peptone, 0.1% MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 2% Glucose, 2% Maltose)を用いた。また、本節で利用したプライマーの名称及び配列については、Table 2-3 に示した。

**Table 2-3 Primers used in this work.**

Primer Name	Sequence
AoFADGDH_F	5'- GGAATTCCATATGCTCTTCTCACTGGCA TTCCTG -3'
AoFADGDH_R	5'- TAGTGGATCCCTAAGCACTCTTCGCATCCCTCCTTA -3'
AOGLD_G163R_F	5'- GTCGGCTGGT CGAGGAGCCTGGCCTCC -3'
AOGLD_G163R_R	5'- GGAGGCCAGGCTCCTCGACCAGCCGAC -3'
AOGLD_V551C_F	5'- TCGGCCACTTGTGCAGCACGCTTTAT -3'
AOGLD_V551C_R	5'- ATAAAGCGTGTGCACAAGTGGCCGCA -3'
PUSA_F	5'- CCATGCTTGGAGGATAGCAA -3'
PUSA_R	5'- CACTGTCCAATGCCAGATTG -3'

## 【方法】

### FAD-GDH 麹菌発現ベクターの構築

FAD-GDH の麹菌への遺伝子導入及び発現のためのプラスミドベクターには、pUSA を用いた。pUSA ベクターは、マーカー遺伝子として、*Aspergillus nidurans* 由来の ATP-sulfurylase を含み、SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>イオンの資化性によって、形質転換体の選抜が可能である(21)。また、pUSA は *A.oryzae* 由来の  $\alpha$ -Amylase のプロモーター及びターミネーターを含み、マルトースなどの炭素源によって誘導発現が可能である(22)。

第2節で合成した cDNA をテンプレートとして、プライマーAoFADGDH\_FとAoFADGDH\_RのセットによりPCRで遺伝子を増幅後、*Nde*I及び*Bam*HI処理し、さらに、Blunting high(東洋紡社製)によって末端を平滑末端にした。制限酵素 *Sma*Iによって処理されたpUSAベクターにAmyBプロモーターと同方向になるようにFAD-GDH遺伝子挿入し、pUSA-AoFADGDHを得た。

pUSA-AoFADGDH プラスミドへの変異導入は、inverse PCR により行った。また、変異導入箇所は、G163R+V551C の変異を導入し、pUSA-AomFADGDH を取得した。Inverse PCR には KOD plus mutagenesis kit(東洋紡社製)を用い、変異導入されたベクターは Big-Dye Terminator 3.1 cycle sequencing kit(アプライドバイオシステム社製)及び、3730 DNA Analyzer(アプライドバイオシステム社製)により解析し、変異導入を確認した。

### *Aspergillus oryzae* への形質転換

麹菌 *A. oryzae* NS4 株への形質転換は、*Yamada et al.* (21)に記載の方法により行った。

具体的には、プラスミド pUSA-AoFADGDH 及びプラスミド pUSA-AomFADGDH を形質転換した大腸菌 DH5 $\alpha$  を 1 白金耳分、アンピシリン含有 LB 培地(50 ml/500 ml 坂口フラスコ)に植菌し、37°C, 16 時間, 180 rpm で振とう培養した。得られた培養液を Qiafilter plasmid Midi kit(QIAGEN 社製)を用いて精製し、精製プラスミドを得た。プラスミドの精製方法はキット付属のマニュアルに従って行った。得られたプラスミド 10  $\mu$ g 分を制限酵素 *Sbf*I で消化し、プラスミドを直鎖化して、形質転換に用いた。

麹菌への形質転換は、プロトプラスト-PEG 法によって行った。まず、NS4 株を DP 寒天培地上に植菌し、30°C 条件下で約 1 週間培養し、分生子を形成させた。培養した寒天培地に滅菌水を約 10 ml 添加して懸濁し、懸濁液を同じく滅菌したミラクロス(カルビオケム社製)でろ過して分生子懸濁液を得た。分生子の濃度はトーマ氏血球計算版を用いて分生子数をカウントして濃度を決定した。

得られた分生子懸濁液を DP 液体培地 (200 ml/500 ml バッフル付三角フラスコ)に最終濃度が 10<sup>5</sup>/ml の分生子濃度となるように植菌し、30°C, 100 rpm (ロータリー振とう)で 24 時間培養を行った。培養液を滅菌した 11G1 ガラスフィルター(イワキ硝子社製)でろ過し、0.8 M NaCl で十分に洗浄して、プロトプラスト化溶液(5 mg/ml Yatalase(タカラ)バイオ社製), 0.8 M NaCl, 10 mM Na-Phosphate buffer, pH6.0)に懸濁し、ヤタラーゼによって処理した。ヤタラーゼ処理は 30°C, 80 rpm(横振とう)で 3 時間処理を行った。ヤタラーゼ処理液をミラクロス(カルビオケム社製)でろ過して、3G2 ガラスフィルター(イワキ硝子社製)によってろ過した。ろ過液を 3000 rpm, 5 分遠心し、上清を除去した。沈殿を Solution I(0.8 M NaCl, 10 mM CaCl<sub>2</sub>, 10 mM Tris-HCl, pH8.0)で 2 回洗浄し、トーマ氏血球計算版でプロトプラストの濃度を計測して、プロトプラストの濃度を 2.0x10<sup>8</sup>/ml に調製した。

得られたプロトプラスト溶液に制限酵素処理したプラスミド(10  $\mu$ g 分)と Solution II(25% PEG6000, 50mM CaCl<sub>2</sub>, 50mM Tris-HCl, pH8.0)を 10  $\mu$ l を加えて混合し、氷上で 10 分静置した。次に、Solution II を 500  $\mu$ l 添加して、さらに氷上で 30 分静置した。続いて、Solution I を 1 ml 添加して混合液を懸濁し、プラスチックシャーレ 3 枚に分割して塗布し、さらにオートクレーブ後に 42°C に冷却した 1.2 M Sorbitol と 0.35% の寒天を含む CD (NO<sub>2</sub>/SO<sub>4</sub>)培地を各プレートに 5 ml ずつ添加し、寒天を固まらせた。作製したプレートを 30°C 条件下で 1 週間静置培養した。生育した形質転換体は 1.5% の寒天を含む CD (NO<sub>2</sub>/SO<sub>4</sub>)培地に植

え継ぎを行い、形質転換体の純化を行った。形質転換体の植え継ぎ純化は3日ごとに3回行った。

形質転換体の遺伝子導入の確認は、コロニーから菌体を回収し、前処理した後、PCRを行うことにより行った。形質転換体コロニーから菌体を1白金耳回収して、50 mM NaOH 0.05 ml に懸濁し、98°C, 5 分加温後、1 M Tris-HCl buffer (pH 8.0)を 0.05 ml 加えて中和することで前処理を行った。前処理液をテンプレートにプライマーpUSA\_F と pUSA\_R のセットにより PCR を行うことで形質転換体への発現カセットの導入を確認した。PCR には KOD FX neo(東洋紡社製)を用いた。約 50 株の形質転換体について PCR を行い、FAD-GDH 遺伝子が導入されていることが確認された株を選抜した。

### 形質転換体の FAD-GDH 生産性の確認

前項で取得した形質転換体を DP 培地(3 ml/10 ml 試験管)に1白金耳植菌し、30°C, 180 rpm(横振とう)で2日間培養し前培養液とした。前培養液全量を Ao 発現培地 (30 ml/500 ml 坂口フラスコ)に植菌し、35°C, 180 rpm(横振とう)で96時間培養した。培養液の分析は、培養液を 12000 rpm, 3 分, 4°C で遠心分離して菌体を沈殿させ、上清の FAD-GDH 活性を測定することによって算出した。

FAD-GDH 活性の測定は、第2節で示す方法と同様にして行った。

### FAD-GDH の大量培養と精製

上述で得られた形質転換体の内、最も高い FAD-GDH 生産量を示した株を選抜し、大量培養と酵素の精製を行った。Czapek-Dox 培地で 30°C, 1 週間生育させた形質転換体を DP 培地(60 ml/500 ml-坂口フラスコ)前培養培地に1白金耳植菌し、30°C, 180 rpm で2日間振とう培養を行い、前培養液とした。前培養液全量を本培養培地 6 L (1.0% Malt Extract, 1.5% Soy-peptone, 0.1% MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 2% Glucose, 2% Maltose, 0.04 アデカノール(消泡剤))を含む 10L-培養槽(エイブルバイオット社製)に植菌し、30°C, 300 rpm, 通気量 6 L/min で 72 時間まで培養を行った。

FAD-GDH の精製は以下の手順で行った。

まず、上述の通り、72 時間の流加培養を行った培養液を回収し、助剤ろ過(ラジオライト#100)によって、菌体を除去した。除菌液を分子量 30 kDa カットの PS(Polysulfone)限外ろ過膜 (メルクミリポア社製 ペリコン 2)で濃縮し、さらに、50 mM リン酸カリウムバッファー(pH 6.0)を加えながら濃縮することで低分子を除

去し、透析を行った。濃縮液に40%(w/v)の硫酸アンモニウムを添加し、同じく40%(w/v)硫酸アンモニウムを50 mMのリン酸カリウムバッファー(pH 6.0)に溶解した溶液で緩衝化した Phenyl-Sepharose (GE ヘルスケア社製)に通液し、FAD-GDHを吸着させた。溶出は、硫酸アンモニウム濃度40%-0%のグラジエント溶出により行い、最大の FAD-GDH 活性を有するフラクションを回収した。回収したフラクションは、G25 Sephadex(GE ヘルスケア社製)で50 mMリン酸カリウムバッファー(pH6.0)置換した。得られた脱塩液を濃縮液を50 mMリン酸カリウムバッファーで緩衝化した DEAE-Sepharose fast flow (GE ヘルスケア社製)を充填したカラムに通液し、通過液を回収した。得られた酵素液は野生型の FAD-GDH を raAoFADGDH, G163R+V551C の変異を導入したものを raAomFADGDH とした。

タンパク質濃度は、BIO-RAD protein assay(BIO-RAD 社製)を用いて、BSA を対照にタンパク質濃度を算出した。酵素速度論解析は、DCPIP の還元をグルコース濃度 10-100 mM 条件下で測定することにより測定した。

### 分子量の測定

精製された組換え FAD-GDH は Endo H(ニューイングランドバイオラボ社製)によって処理することで、N 型糖鎖の除去を行った。まず、タンパク質を 0.5% SDS 及び 1% dithiothreitol で変性させ、Endo H により 37°C で 3 時間インキュベートした。SDS-PAGE には、Nu-PAGE(Invitrogen 社製)を用い、MOPS-SDS バッファー中で電気泳動を行った。泳動には、1 レーン当たり、2.5 µg の FAD-GDH をアプライした。

## 【結果】

***A.oryzae* FAD-GDH 発現ベクターの構築と形質転換体の取得**

*A.oryzae* での FAD-GDH の発現のため、*A.oryzae* 発現ベクターpUSA に FAD-GDH 遺伝子を挿入し、野生型の FAD-GDH 遺伝子を挿入した pUSA-AoFADGDH 及び、アミノ酸改変によって耐熱性を向上した FAD-GDH を挿入した pUSA-AomFADGDH をそれぞれ構築した(FIG 2-4)。pUSA は、マーカー遺伝子として *A. nidurans* 由来の *sC* 遺伝子を有しており、*A.oryzae* への形質転換では、*sC* locus ではなく、染色体上にランダムに挿入されることが確認されている(21)。その理由は、*sC* マーカーの *A.nidurans* と *A.oryzae* 間の相同性が低いことによるものとされている。染色体上に発現カセットがランダムに導入されるため、遺伝子が導入される位置によっては、発現量が大きく異なる。また、遺伝子の発現プロモーターには $\alpha$ -Amylase promoter (PamyB)が使用されており、本プロモーターはマルトースやデンプンなどのグルコースが $\alpha$ -1,4 結合した多糖類を培地に添加することで、発現が誘導されることが確認されている。本研究においても、培養液中にマルトースを 2%添加することで、FAD-GDH の発現が誘導された。

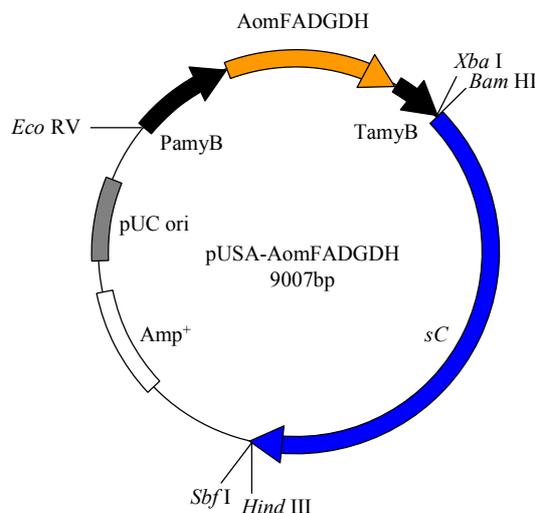
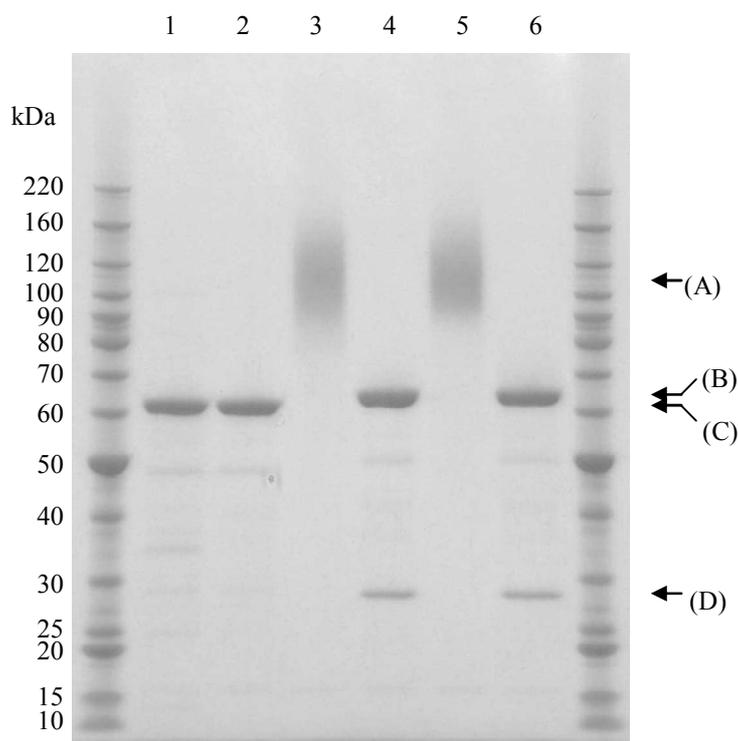


FIG 2-4 The FAD-GDH expression plasmid pUSA-AomFADGDH pUSA-AoFADGDH containing *sC* marker (*sC*) of *A.nidurans* and  $\alpha$ -Amylase promoter (PamyB) and terminator (TamyB) of *A.oryzae*. FAD-GDH genes were inserted between AmyB-pro and AmyB-ter.

***A.oryzae* 発現による FAD-GDH への糖鎖付加と耐熱性向上**

*A.oryzae* によって分泌発現された FAD-GDH は、高純度に精製された。SDS-PAGE の結果から、精製された FAD-GDH の分子量は野生型、変異型ともに 90,000~200,000 の不均一な分子量を有していた(FIG 2-5 レーン 3, レーン 5)。また、精製された FAD-GDH の糖鎖は Endo H によって容易に除去され、分子量が 65,000 程度まで低下したことから(FIG 2-5 レーン 4, レーン 6)、不均一でかつ多量の N 型糖鎖の修飾が起こっていると考えられる。



**FIG 2-5 SDS PAGE of recombinant FAD-GDHs.**

Lane1; wild type FAD-GDH expressed in *E. coli*, Lane2; FAD-GDH mutant (G163R+V551C) expressed in *E. coli*, Lane3; wild type FAD-GDH expressed in *A. oryzae*, Lane4; deglycosylated wild type FAD-GDH expressed in *A. oryzae*, Lane5; FAD-GDH mutant (G163R+V551C) expressed in *A. oryzae*, Lane6; deglycosylated FAD-GDH mutant (G163R+V551C) expressed in *A. oryzae*. Arrows show (A) glycosylated recombinant FAD-GDHs expressed in *A. oryzae*, (B) deglycosylated recombinant FAD-GDHs expressed in *A. oryzae*, (C) FAD-GDHs expressed in *E. coli*, (D) deglycosylating enzyme Endo H.

*A. oryzae* によって分泌発現された FAD-GDH の酵素特性は、大腸菌で組換え発現された FAD-GDH と比較して、比活性、Vmax, ミカエリスメンテン定数(Km)については大きな違いは認められなかった(Table 2-4)。

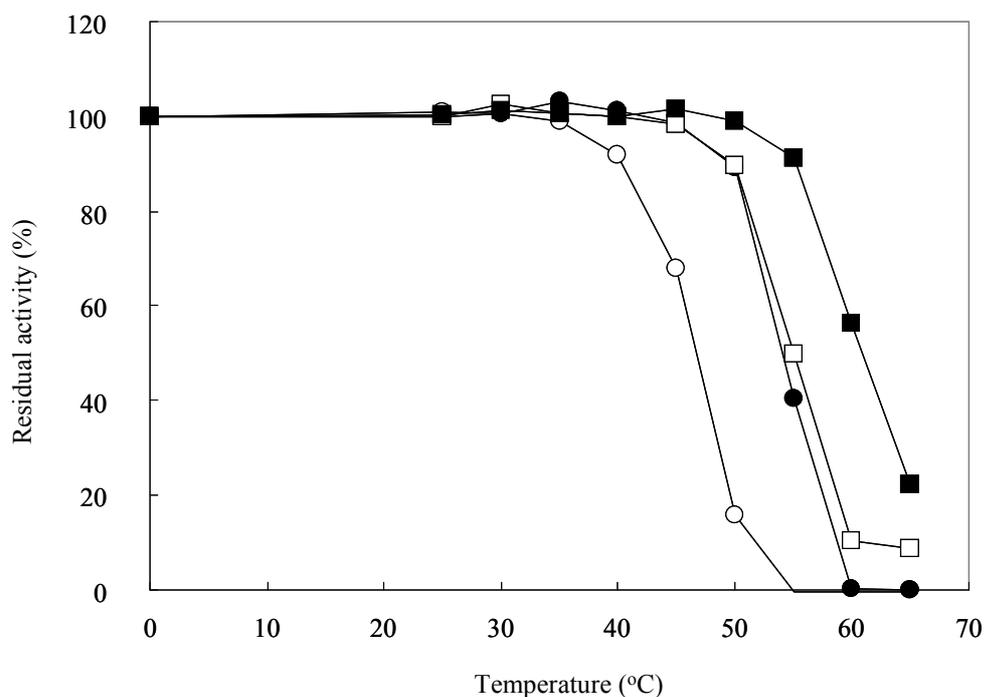
**Table 2-4 Enzyme specificity of FAD-GDHs.**

Substrate specificity(%) (in 200mM substrate)	S2AoFADGDH*1	S2AomFADGDH*1 (G163R, V551C)	raAoFADGDH*2	raAomFADGDH*2 (G163R, V551C)
D-Glucose	100.0	100.0	100.0	100.0
Maltose	0.3	0.3	0.4	0.3
D-Xylose	7.9	7.5	9.6	9.1
D-Galactose	0.7	0.5	0.7	0.6
Fructose	0.0	0.0	0.0	0.0
2-deoxy-D-Glucose	38.3	32.8	44.5	35.2
Mannose	3.3	2.6	3.2	2.6
Lactose	0.0	0.0	0.0	0.0
Sucrose	0.0	0.0	0.0	0.0
<b>Vmax (U/mg-protein)</b>				
for D-Glucose	1525	1418	1352	1143
for D-Xylose	128	118	125	107
for 2-deoxy-D-Glucose	892	804	884	739
<b>Km (mM)</b>				
for D-Glucose	57	64	54	64
for D-Xylose	23	33	25	35
for 2-deoxy-D-Glucose	141	194	166	230

\*1: These FAD-GDHs were produced in *E. coli*. Enzyme properties are cited from Table 2-2.

\*2: These FAD-GDHs were produced into culture medium by *A. oryzae*.

前節で取得した、大腸菌で発現された野生型の FAD-GDH 及び変異型の FAD-GDH は野生型では 35°C、変異型では 45°C まで安定であるのに対して、*A. oryzae* によって分泌発現された FAD-GDH の耐熱性は、大腸菌で組換え発現された FAD-GDH よりも高く、野生型で 45°C まで、変異型で 50°C まで 100% の活性を維持していた(FIG 2-6)。



**FIG 2-6 Thermal stabilities of wild-type FAD-GDH and FAD-GDH mutants expressed in *E. coli* or *A. oryzae*.** Residual activities measured after 10 min incubation at 50°C in Potassium Phosphate buffer (50 mM, pH5.5). Stability was determined from the ration of residual to initial activity. Open circles indicate the residual activity ratio of wild type FAD-GDH expressed in *E. coli*, Closed circles indicate the residual activity ratio of FAD-GDH mutant expressed in *E. coli*, Open square indicate the residual activity ratio of wild type FAD-GDH expressed in *A. oryzae*, Closed square indicate the residual activity ratio of FAD-GDH mutant expressed in *A. oryzae*.

**【考察】**

本節では、*A. oryzae* 由来の FAD-GDH 遺伝子を *A. oryzae* にて発現させ、AmyB promoter による誘導発現によって FAD-GDH を効率的に発現することに成功した。さらに、得られた FAD-GDH を精製し、大腸菌で組換え発現された FAD-GDH との特性比較を行った。

麹菌を始めとする真核生物では、分泌タンパク質に N 型の糖鎖が結合することが知られており、N 型糖鎖の結合は、近傍に位置するフェニルアラニン残基の芳香環と相互作用性、タンパク質立体構造を安定化させることが報告されている(20)。*A. oryzae* 由来の FAD-GDH において、N 型糖鎖が結合すると予測されるモチーフ(N-X-S/T)は、全部で 10 箇所(N3, N70, N131, N169, N175, N233, N243, N292, N300, N347)存在している。N 型糖鎖結合モチーフに近接して存在するフェニルアラニン残基は、N175 の近傍に F178 が、N243 の近傍に F241 が、N347 の近傍に F345 がそれぞれ存在している。これらの残基が FAD-GDH の安定性向上に影響を与えているかどうか確認するためには、さらなる検討が必要である。

麹菌で組換え発現された FAD-GDH は野生型及び変異型ともに、SDS-PAGE では分子量が 90,000～200,000 にわたったブロードのバンドとなり、多量の N 型糖鎖が不均一に結合しているものと考えられる。また、糖鎖は Endo H によって容易に除去されたことから、真菌に特異的な high-mannose 型の糖鎖が結合していると考えられる。

麹菌で組換え発現された野生型 FAD-GDH は大腸菌で発現された野生型 FAD-GDH と比較して、耐熱性が大幅に向上していることが確認された。その他の酵素特性には大きな違いは無かった。また、G163R+V551C の変異導入の組み合わせによって、耐熱性はさらに向上し、50°C, 10 分処理でも *A. oryzae* 発現 G163R+V551C 変異体は活性が維持された。

以上の結果から、タンパク質自体への変異導入による耐熱性向上と、糖鎖付加による耐熱性向上の相乗効果により、安定性が高い、血糖測定用の酵素を開発することに成功した。

## 第4節 *Cryptococcus* sp. S-2 による、*Aspergillus oryzae* 由来 FAD-GDH の組換え発現

### 【目的】

第2節及び第3節では、*Aspergillus oryzae* 由来 FAD-GDH の耐熱性を向上させるため、部位特異的変異導入及び糖鎖付加の効果を確認した。

本節では、耐熱性が向上した FAD-GDH 変異体の更なる高発現を試みるため、*Cryptococcus* sp. S-2 を宿主として用い、FAD-GDH をキシラナーゼプロモーター下で発現させ、キシロースの連続添加による流加培養を試みた。

### 【材料】

遺伝子の発現宿主には、*Cryptococcus* sp. U-5 株(*ura5*)を使用した。DNA 操作には、*Escherichia coli* DH5 $\alpha$  を、またプラスミドは pCsUX2 を用いた。*Cryptococcus* sp. S-2 U-5 株培養及び形質転換体の前培養には YM 培地(0.3% Yeast Extract, 0.3% Malt Extract, 0.5% Peptone, 1.0% D-Glucose )を、形質転換体の取得には、YNB(-*ura*)培地(0.67% Yeast Nitrogen Base w/o AA, 0.078% -Ura DO Supplement, 2.0% D-Glucose )を、Xylanase promoter による誘導発現には YX 培地(2% Yeast Extract, 5% D-Xylose)をそれぞれ用いた。

発現に用いる FAD-GDH の遺伝子は、*Cryptococcus* sp. S-2 にコドン最適化した合成遺伝子を Genscript 社の人工合成遺伝子作製サービスを利用して合成した。合成配列の 5'及び 3'末端には *Mlu*I サイトを付加した配列を付加して合成した(FIG 2-7)。設計した *A.oryzae* 由来 FAD-GDH の DNA 配列は、野生型配列と 78.8%の相同性を有する配列となり(FIG 2-8)、コドンユースは *Cryptococcus* sp. S-2 の 3 種類の酵素(Xylanase, Cutinase, Amylase)にあわせてため、遺伝子の GC 含量は 65.6%と、高 GC 含量となった(FIG 2-9)。本節で利用したプライマーの名称及び配列については、Table 2-5 に示した。

```

10      20      30      40      50      60      70      80      90
ATGCTCTTCAGCCTCGCCTTCCTCAGCGCCCTCAGCCTCGCCACCGCCAGCCCTGCCGGCCGAGCCAAGAACACGACCACCTACGACTAC
M L F S L A F L S A L S L A T A S P A G R A K N T T T Y D Y
>Secretion signal peptide
100     110     120     130     140     150     160     170     180
ATCGTCGTCGGCGGGCGGCACCTCGGGCCTGGTTCGTCGCAACCGACTCAGCGAGAACCCTCGACGTCTCGGTCTCTGCTCGAGGCGGGC
I V V G G T S G L V V A N R L S E N P D V S V L L L E A G
190     200     210     220     230     240     250     260     270
GCCAGCGTCTTCAACAACCTGACGTCACGAACGCCAAGGCTACGGCCTCGGCTTCGGCTCGGCCATGACTGGCAGTACCAGAGCATC
A S V F N N P D V T N A N G Y G L A F G S A I D W Q Y Q S I
280     290     300     310     320     330     340     350     360
AACCAGTCGTACGCCGGCGCAAGCAGCAGGTCTGCGAGCGGGCAAGGCCCTCGGCGGCACCAGCAGCATCAACGGCATGGCGTACACC
N Q S Y A G G K Q Q V L R A G K A L G G T S T I N G M A Y T
370     380     390     400     410     420     430     440     450
CGAGCCGAGGACGTCCAGATCGACGCTTGGCAGAAGCTCGGCAACGAGGGCTGGACGTGGAAGGACCTGCTCCCGTACTACCTGAAGTGC
R A E D V Q I D V W Q K L G N E G W T W K D L L P Y Y L K S
460     470     480     490     500     510     520     530     540
GAGAACCTCACCGCCCTACGTCGAGCCAGGTGCGCGGGGGCGCGGTACAACCTGCCGTCAACGGCAAGGAGGGCCCTCTGAAGGTC
E N L T A P T S S Q V A A G A A Y N P A V N G K E G P L K V
550     560     570     580     590     600     610     620     630
GGCTGGTCGGGCGAGCTCGGAGCGGCCAAGCTGTCGGTTCGCGCTCAACCGAACCTTCCAGGCCGCGGGCGTCCCTTGGTTCGAGGAGCTC
G W S G S L A S G N L S V A L N R T F Q A A G V P W V E D V
640     650     660     670     680     690     700     710     720
AACGGCGGCAAGATGCGAGGCTTCAACATCTACCCCTCGACGCTGGACGTTCGACCTCAACGTCCGAGAGGACGCCGCGGAGCCTACTAC
N G G K M R G F N I Y P S T L D V D L N V R E D A A R A Y Y
730     740     750     760     770     780     790     800     810
TTCCCGTACGACGACCGAAAGAACCTGCACCTGCTCGAGAACCACCGCGCAACCGACTCTTCTGGAAGAAGCGCAGCGCCGAGGAGGCG
F P Y D D R K N L H L L E N T T A N R L F W K N G S A E E A
820     830     840     850     860     870     880     890     900
ATCGCCGACGGCGTCGAGATCACCTCGGCGGACGGCAAGGTACGCGAGTCCACGCCAAGAAGGAGGTATCATCAGCGCGGGCGCCCTC
I A D G V E I T S A D G K V T R V H A K K E V I I S A G A L
910     920     930     940     950     960     970     980     990
CGATCGCCTTGATCCTCGAGCTGAGCGGCGTGGCAACCCTACCATCCTCAAGAAGAACAACATCACCCCTCGAGTCGACCTGCCTACG
R S P L I L E L S G V G N P T I L K K N N I T P R V D L P T
1000    1010    1020    1030    1040    1050    1060    1070    1080
GTCGGCGAGAACCCTCCAGGACAGTTCAACAACGGCATGGCCGGCAGGGGTACGGCGTCTCGCGGGCGCCAGCACCGTCCAGTACCCC
V G E N L Q D Q F N N G M A G E G Y G V L A G A S T V T Y P
1090    1100    1110    1120    1130    1140    1150    1160    1170
TCGATCAGCGAGTCTTCGGCAACGAGACCGACTCGATCGCTCGCTGCGAAGCCGCTCTCGACTACGCCGCGGCCACGGTCAAG
S I S D V F G N E T D S I V A S L R S Q L S D Y A A A T V K
1180    1190    1200    1210    1220    1230    1240    1250    1260
GTCTCGAACGGCCACATGAAGCAGGAGGACCTCGAGCGACTGTACCAGCTCCAGTTCGACCTGATCGTCAAGGACAAGTCCCTATCGCG
V S N G H M K Q E D L E R L Y Q L Q F D L I V K D K V P I A
1270    1280    1290    1300    1310    1320    1330    1340    1350
GAGATCTCTTCACCTGGCGGGGCAACGCCGTCTCGAGGAGTCTGGGGCTGCTCCCTTTCGCCCGAGGCAACATCCACATCTCG
E I L F H P G G G N A V S S E F W G L L P F A R G N I H I S
1360    1370    1380    1390    1400    1410    1420    1430    1440
AGCAACGACCCTACCGCCCTCGGCCATCAACCCCACTACTTATGTTGAGTGGGACGGCAAGAGCCAGGCGGGCATCGCCAAGTAC
S N D P T A P A A I N P N Y F M F E W D G K S Q A G I A K Y
1450    1460    1470    1480    1490    1500    1510    1520    1530
ATCCGAAGATCCTCCGATCGGCGCCGCTGAACAAGCTCATCGCCAAGGAGACCAAGCCTGGCCTCAGCGAGATCCCTGCCACGGCGGCC
I R K I L R S A P L N K L I A K E T K P G L S E I P A T A A
1540    1550    1560    1570    1580    1590    1600    1610    1620
GACGAGAAGTGGGTGAGTGGCTCAAGGCCAATACCGAAGCAACTCCACCTGTCGGCACCGCGCCATGATGCCTCGATCGATCGGC
D E K W V E W L K A N Y R S N F H P V G T A A M M P R S I G
1630    1640    1650    1660    1670    1680    1690    1700    1710
GGCGTCTGACAACCGACTCCGAGTCTACGGCACGCAACGTCGAGTCTCGACGCCTCGGTCCTTCCAGGTCTCGCGCCAC
G V V D N R L R V Y G T S N V R V V D A S V L P F Q V C G H
1720    1730    1740    1750    1760    1770    1780
CTCGTCTCGACCCTGTACGCGCTCGCCGAGCGACGACCTCATCAAGGAGGACGCCAAGAGCGCCTAG
L V S T L Y A V A E R A S D L I K E D A K S A *

```

FIG 2-7 Codon optimized and synthesized FAD-GDH gene from *Aspergillus oryzae* (AoFADGDH/opt).

Underline indicates the predicted secretion signal peptide.

```

AoFADGDH/ntv 1 : ATGCTCTTCT CACTGGCATT CTTGAGTGGC CTGTGCTGG CCACGGCATT ACCGGCTGGA CGGGCCAAGA ACACACTAGC ATAGACTACT
AoFADGDH/opt 1 : ATGCTCTTCA GCCTCGCCTT CCTCAGCGCC CTCAGCCTCG CCACCGCCAG CCTGCGCGGC CGAGCCAAGA ACACAGCCAC CTAGACTACT

AoFADGDH/ntv 91 : ATCGTTGTGG GAGGCGGCAC AAGTGGTCTT GTGTGCGCAA ATCGCCTTTC TGAGAACCCT GATGTCTCCG TTCTTCTGCT TGAGGCGCGT
AoFADGDH/opt 91 : ATCGTCGTGG GCGGCGGCAC CTCGGGCGCT GTGTCGTGCC ACCGACTCAG CGAGAACCCT GACGTCTCCG TCCTCCTGCT CGAGGCGGGC

AoFADGDH/ntv 181 : GCTTCTGTGT TCAACAACCC GGACGTAACC AACGCTAACG GTTATGGATT GGCCTTTGGC TCGGCATTCG ACTGGCAGTA CCAGTCTATT
AoFADGDH/opt 181 : GCCAGCGTCT TCAACAACCC TGACGTCACG AACGCCAACG GCTACGGCCT CGCGTTCGGC TCGGCATTCG ACTGGCAGTA CCAGAGCATC

AoFADGDH/ntv 271 : AACCAAAGCT ATGCAGGAGG TAAACAGCAA GTTCTGCGTG CTGGTAAGGC CTTTGAGGGA ACCAGTACAA TCAATGGAAT GGCCTATACC
AoFADGDH/opt 271 : AACCACTCGT ACGCCGCGCG CAAGCAGCAG GTCTCTGCGAG CCGGCAAGGC CCTCGCGCGC ACCAGCACGA TCAACCGCAT GGCCTACACC

AoFADGDH/ntv 361 : CGCGCAGAGG ATGTCCAGAT TGACGTTTGG CAGAACCTTG GAAACGAAGG TTGACGCTGG AAAGATCTCC TACCATACTA CCTGAAGAGT
AoFADGDH/opt 361 : CGAGCCGAGG ACGTCCAGAT CGACGCTCTG CAGAAGCTTG GCAACGAGGG CTGACGCTGG AAGGACCTCG TCCCTACTA CCTGAAGTCT

AoFADGDH/ntv 451 : GAAAACCTGA CGGCCCTCAC CAGCTCTCAG GTTGCTGCTG CCGCTGCTTA TAACCCCTGC GTGAATGGAA AGAAGGTCC TCTCAGGTC
AoFADGDH/opt 451 : GAGAACCTCA CCGCCCTCAC GTCGAGCCAG GTCGCGCGGG CCGCCCGGTA CAACCCCTGC GTCAACGGCA AGGAGGGCCC TGTGAAGTCT

AoFADGDH/ntv 541 : GGCTGGTCCG GAAGCCTGGC CTCGGGTAAT CTGTGCTGTT CTCTGAACCG TACGTTCCAA GCCCGTGGTG TTCCATGGGT TGAGGATGTC
AoFADGDH/opt 541 : GGCTGGTCCG GCAGCCTCGC GAGCGGCAAC CTGTGCTGTC CCTCAACCG AACCTTCAG GCCCGGGGCG TCCCTGGGTG CGAGGACGTC

AoFADGDH/ntv 631 : AATGGAGGCA AGATGCGTGG CTTCAACATC TACCATCCAA CCCTCGACGT TGACCTCAAT GTCCGGGAAG ATGCAGCCCG GGCATACTAC
AoFADGDH/opt 631 : AACGGCGGCA AGATGCGAGG CTTCAACATC TACCCTCGAA CGCTGGACGT CGACCTCAAC GTCCGAGAGG ACGCCGCGCG AGCCTACTAC

AoFADGDH/ntv 721 : TTCCTTATG ATGACAGGAA GAACCTTCAC CTGTGCGAGA ACACCCTGTC CAACCCGCTT TTCTGGAAGA ACGGCTCTGC TGAGGAAGCT
AoFADGDH/opt 721 : TTCCTGATAG ACGACCGAAA GAACCTGCAC CTGTGCGAGA ACACCACGGC GAACCGACTT TTCTGGAAGA ACGGCGCGCG CGAGGAGGCG

AoFADGDH/ntv 811 : ATTGCGGATG GTGTGAGAT CACCTCCGCT GATGGCAAGG TCACTCGTGT GCATGCAAAG AAAGAGGTCA TCATCTCTGC TGGTGCCTCG
AoFADGDH/opt 811 : ATCGCCGAGC GGTGCGAGAT CACCTCGGCG GACGGCAAGG TCACCGGAGT CCACGCCAAG AAGGAGGTCA TCATCAGCGC GGGGCGCCTC

AoFADGDH/ntv 901 : CGGTCTCCTC TCATTCTCGA GCTTTCAGGA GTTGGAAACC CAACCATCCT CAAAAGAAGC AACATAACCC CAGGTGTCTGA TCTCCCACC
AoFADGDH/opt 901 : CGATCGCCTC TGATCCTCGA GCTGAGCGGC GTCGGCAACC CTACCATCCT CAAGAAGAAG AACATCACCC CTCGAGTCGA CCTGCCTACG

AoFADGDH/ntv 991 : GTTGGGAGAG ACCTCCAAGA CCAGTTCAAC AACGGCATGG CTGGGGAAGG ATACGGCGTC CTTGCGGGTG CCTCAACCGT GACCTACCCT
AoFADGDH/opt 991 : GTCGGCGAGA ACCTCCAGGA CCAGTTCAAC AACGGCATGG CCGGCGAGGG CTACGGCGTC CTCGCGGGCG CCAGCACCGT CACGTACCCT

AoFADGDH/ntv 1081 : TCCATCTCCG ACCTCTCCGG TAACGAGACT GACTCTATCG TTGATCTCT CCGATCTCAA CTCTCCGACT ACGCCGCGCG GACCGTCAAG
AoFADGDH/opt 1081 : TCGATCAGCG ACCTCTCCGG CAACGAGACC GACTCTATCG TCGCTCGCT GCGAAGCCAG CTCTCCGACT ACGCCGCGCG CACGGTCAAG

AoFADGDH/ntv 1171 : GTCAGCAACG GCCACATGAA GCAGGAGGAC CTTGAGCGCC TCTACCAGCT CCAATTTGAC CTATCCTCTA AGGACAAGGT CCCTATCGCC
AoFADGDH/opt 1171 : GTCTCGAAGC GCCACATGAA GCAGGAGGAC CTCGAGCGAC TGTACCAGCT CCAGTTGAGC CTGATCTCTA AGGACAAGGT CCCTATCGCG

AoFADGDH/ntv 1261 : GAGATCCTCT TCCACCCTGG TGGTGAAGC GCGGTGCTCT CCGAATCTCG GGGCTTGCTT CCCTTCGCCC GTGGCAACAT CCACATTAGC
AoFADGDH/opt 1261 : GAGATCCTCT TCCACCCTGG CCGGCGCAAC GCGGTCTCTA GCGAGTCTCG GGGCTGCTC CCTTTCGCCC GAGGCAACAT CCACATCTCG

AoFADGDH/ntv 1351 : TCCAATGACC CGACTGCTCC CGCCGCCATC AACCTAAGT ACTTTATGTT CGAATGGGAC GGCAAGAGCC AGGCCGGTAT CGCCAAGTAC
AoFADGDH/opt 1351 : AGCAACGACC CTACCGCCCC TCGCGCCATC AACCCAACT ACTTCTATGT CGAGTGGGAC GGCAAGAGCC AGGCCGGCAT CGCCAAGTAC

AoFADGDH/ntv 1441 : ATCAGGAAGA TTCTCCGCG CCGACCATTT AACAACTFTA TTGCGAAGGA AACCAAGCCC GGTCTCTCTG AGATCCGGCG CACTGCTGCG
AoFADGDH/opt 1441 : ATCCGAAGA TCCTCCGATC GCGCCGCTG AACAACTCTA TCGCCAAGGA GACCAAGCCT GGCCTCAGCG AGATCCCTGC CACGCGCGCC

AoFADGDH/ntv 1531 : GATGAGAAGT GGGTTGAATG GCTCAAGGCT AACTATCGTT CCAACTTCCA CCCGTCGGA ACTGCTGCCA TGATGCCTCG TTCATTGGT
AoFADGDH/opt 1531 : GACGAGAAGT GGGTCGAGTG GCTCAAGGCC AACTACCGAA GCAACTTCCA CCTGTGCGC ACCGCGGCCA TGATGCCTCG ATCGATCGGC

AoFADGDH/ntv 1621 : GCGTGTGTG ATAACCGTCT CCGGGTCTAT GGTACCAGCA ATGTCGCGGT CGTAGATGCG TCTGTCTTGC CTTCCAGGT TTGGGGCCAC
AoFADGDH/opt 1621 : GCGTGTGTG ACAACCGACT CCGAGTCTAC GGCACAGCA ACCTCCGAGT CGTCGACGCC TCGGTCTTGC CTTTCCAGGT CTGGGGCCAC

AoFADGDH/ntv 1711 : TTGGTTAGCA CGCTTTATGC CGTTGCCGAG CCGCCTTCGG ACTTGATTA GGAGGATGCG AAGAGTCTCT AG
AoFADGDH/opt 1711 : CTCGTCTCGA CCCTGTACGC CCGCGCCGAG CGAGCCAGCG ACCTCATCAA GGAGGACGCC AAGAGCCCT AG

```

FIG 2-7 The alignment of AoFADGDH/ntv vs AoFADGDH/opt.

Amino acid	Codon	% Frequency		
		<i>Cryptococcus</i> sp. S-2	AoFADGDH	
			Native	Optimized
Ala	GCT	23	31	0
	GCC	43	45	69
	GCA	10	15	0
	GCG	24	9	31
Arg	CGT	12	38	0
	CGC	32	33	0
	CGA	44	4	100
	CGG	1	2	0
	AGA	0	0	0
	AGG	4	8	0
Asn	AAT	9	20	0
	AAC	91	80	100
Asp	GAT	16	43	0
	GAC	84	57	100
Cys	TGT	5	0	0
	TGC	95	100	100
Gln	CAA	10	35	0
	CAG	90	65	100
Glu	GAA	11	36	0
	GAG	89	64	100
Gly	GGT	21	35	0
	GGC	57	33	100
	GGA	12	30	0
	GGG	10	2	0
His	CAT	13	14	0
	CAC	87	86	100
Ile	ATT	16	36	0
	ATC	84	61	100
	ATA	0	4	0
Leu	TTA	0	0	0
	TTG	12	11	0
	CTT	9	25	0
	CTC	58	57	64
	CTA	4	2	0
	CTG	28	25	36
Lys	AAA	0	23	0
	AAG	100	77	100
Met	ATG	100	100	100
Phe	TTT	19	17	0
	TTC	81	83	100
Pro	CCT	24	33	74
	CCC	33	30	15
	CCA	6	22	0
	CCG	37	15	11
Ser	AGT	7	15	0
	AGC	33	27	53
	TCT	10	36	0
	TCC	37	39	0
	TCA	12	15	0
	TCG	100	100	47
Thr	ACT	14	23	0
	ACC	45	48	58
	ACA	6	10	0
	ACG	36	19	42
Trp	TGG	100	100	100
Tyr	TAT	8	36	0
	TAC	92	64	100
Val	GTT	4	40	0
	GTC	69	42	100
	GTA	4	4	0
	GTG	23	15	0

FIG 2-9 Comparison of codon usage in *Cryptococcus* sp. S-2 genes with those in native and codon-optimized AoFADGDH genes. Percent frequencies of individual codons are shown for each corresponding amino acid.

Table 2-5 Primers used in this work.

Primer Name	Sequence
rcAOFADGDH(opt-sp)_F	5'- AAGAACACGACCACCTACGACTACATCGTC -3'
rcAOFADGDH_G163R_F	5'- GTCGGCTGGTCGCGAAGCCTCGCGAGC -3'
rcAOFADGDH_G163R_R	5'- GCTCGCGAGGCTTCGCGACCAGCCGAC -3'
rcAOFADGDH_V551C_F	5'- TGCGGCCACCTCTGCTCGACCCTGTAC -3'
rcAOFADGDH_V551C_R	5'- GTACAGGGTCGAGCAGAGGTGCCGCA -3'
Xs1_iR	5'- AGCGGATGCTACCATCGCGGTCAAAGCAAGGAAGAGTGTGGAGAGCAGCAT CGTGGATTGTATGTCGTGGAGAGGCTATGa -3'
Xs2_iR	5'- AGCTTCGGTGACCGGCGCAGCGGATGCTACCATCGCGGTCAAAGCAAGGAAG AGTGTGGAGAGCAGCATCGTGGATTGTATGTCGTGGAGAGGCTATGA -3'
As_iR	5'- AGGGGACAGGCCAGCGACCA GTCCTA GAGAGGCGAGCAAGGCCCAAGCTAG GGAGCGGACAGGAGCCATCGTGGATTGTATGTCTGGAGAGGCTATGA -3'
Cs_iR	5'- GGCTCGGCCGAGAGAA GCAGCGGACAGCACCGCGAGAGCGAGAGCGGAGAC GAGCATCGTGGATTGTATGTCGTGGAGAGGCTATGA -3'
pCsUX2_F	5'- AAGGAGTGA CTACTGCTGACCATTCGCC -3'
pCsUX_R	5'- TTTGTCGGACGACTCAGTACTCGG -3'

## 【方法】

***A. oryzae* 由来 FAD-GDH 変異体の *Cryptococcus* sp. S-2 発現ベクターの構築**

*Cryptococcus* sp. S-2 への遺伝子導入及び異種タンパク質の高発現のためにプラスミドベクターには pCsUX2 (Xyl-promoter, Xyl-terminator, CsUra5, Amp<sup>r</sup>)を用いた。

Genscript 社より納品された、pUC57-rcAoFADGDH に G163R+V551C の変異を導入するため、pUC57-AoFADGDH をテンプレートとして、プライマー rcAoFADGDH\_G163R\_F と rcAoFADGDH\_G163R\_R のセットで Inverse PCR を行い、G163R の変異を導入した。さらに、V551C の変異を導入するためにプライマー rcAoFADGDH\_V551C\_F と rcAoFADGDH\_V551C\_R のセットで Inverse PCR を行い、V551C の変異を導入して、プラスミド pUC57-rcAOmFADGDH を得た。プラスミド pUC57-rcAOmFADGDH を *Mlu*I によって切断し、インサート配列を切り出し、同様に処理された pCsUX2 ベクターの *Mlu*I サイトにキシラナーゼプロモーターと同方向になるように挿入して、pCSUX2-rcAOmFADGDH を得た。

次に、分泌シグナル配列を *Cryptococcus* sp. S-2 由来の配列に置換するため、pCsUX2-rcAOmFADGDH をテンプレートとして、プライマー rcAOFADGDH\_F(del-sp.) と Xs1\_iR のセット、プライマー rcAOFADGDH\_F(del-sp.) と Xs2\_iR のセット、プライマー rcAOFADGDH\_F(del-sp.) と Cs\_iR のセット、プライマー rcAOFADGDH\_F(del-sp.) と As\_iR のセット、で Inverse PCR を行うことにより、分泌シグ

ナル配列を Xylanase1(X1)、Xylanase2(X2)、Cutinase(C)、Amylase(A)に置換したベクターである、pCsUX2-Xs1rcAomFADGDH、pCsUX2-Xs2rcAomFADGDH、pCsUX2-ArcAomFADGDH、pCsUX2-CsrcAomFADGDH をそれぞれ構築した。

### ***Cryptococcus* sp. U-5 株への形質転換**

*Cryptococcus* sp. U-5 株への形質転換は、Masaki *et al.* (22)に記載の方法により行った。形質転換には前項で作製したプラスミドを制限酵素 *Sbf*I によって消化し直鎖化したプラスミドを使用した。

形質転換体の遺伝子導入の確認は、コロニーから菌体を回収し、前処理した後、PCR を行うことにより行った。形質転換体コロニーから菌体を1白金耳回収して、50 mM NaOH 0.05 ml に懸濁し、98°C、5 分加熱後、1 M Tris-HCl buffer (pH 8.0)を 0.05 ml 加えて中和することで前処理を行った。前処理液をテンプレートにプライマーpCsUX2\_F と pCsUX-R のセットにより PCR を行うことで形質転換体への発現カセットの導入を確認した。PCR には KOD FX neo(東洋紡社製)を用いた。約 16 株の形質転換体について PCR を行い、FAD-GDH 遺伝子が導入されていることが確認された形質転換体を数株を選抜した。

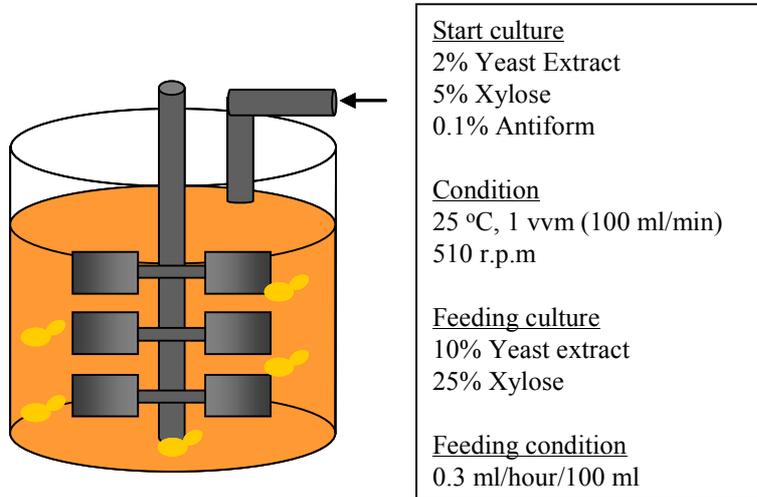
### **形質転換体の FAD-GDH 生産性の確認**

前項で取得した形質転換体を YM 培地(3 ml/10 ml 試験管)に1白金耳植菌し、25°C、180 rpm(横振とう)で2日間培養し前培養液とした。前培養液 0.03 ml を YX 培地(3 ml/10 ml 試験管)に植菌し、25°C、180 rpm(横振とう)で72時間培養した。培養液の分析は、遠心分離により菌体外タンパク質と菌体内タンパク質に分画して行った。FAD-GDH 活性の確認は、前項に記載の方法で行った。

### **流加培養**

形質転換体の流加培養は以下の手順で行った。流加培養の概略を FIG 2-10 に示す。X1-AOmFADGDH 形質転換体を 3.0 ml の前培養培地に1白金耳植菌し、25°C、180 rpm で2日間振とう培養を行い、前培養液とした。前培養液 1 ml を本培養培地 100 ml (2% Yeast extract, 5% Xylose, 0.1% アデカノール(消泡剤))を含む小型培養槽(Bio Jr.8)に植菌し、25°C、510 rpm、通気量 100 ml/min で96時間まで培養を行った。また、培地には、流加培地(25% Xylose, 10% Yeast extract)を 0.3 ml/h/100 ml の

速度で連続的に添加し、サンプリングは 24 時間毎に培養液を 1 ml 回収した。菌体濃度の測定は、培養液を適宜希釈して U-1900 ratio beam spectrophotometer(日立製作所社製)で 600 nm の吸光度を測定することにより算出した。



**FIG 2-10 The condition of Fed-batch fermentation.**

### 組換え FAD-GDH の精製

組換え FAD-GDH の精製品は以下の手順により取得した。

まず、上述の通り、96 時間の流加培養を行った X2-CTP 培養液を回収し、RPR9-2 ローターを用いて、5000 rpm で 30 分遠心して、培養液上清を得た。除菌液を分子量 30 kDa カットの PS(Polysulfone)限外ろ過膜 (メルクミリポア社製 ペリコン 2)で濃縮し、さらに、50 mM リン酸カリウムバッファー(pH 6.0)を加えながら濃縮することで低分子を除去し、透析を行った。濃縮液液に 40%(w/v)の硫酸アンモニウムを添加し、同じく 40%(w/v)硫酸アンモニウムを 50 mM リン酸カリウムバッファー(pH 6.0)に溶解した溶液で緩衝化した Phenyl-Sepharose (GE ヘルスケア社製)通液し、FAD-GDH を吸着させた。溶出は、硫酸アンモニウム濃度 40%-0% のグラジエント溶出により行い、最大の FAD-GDH 活性を有するフラクションを回収した。次に、回収したフラクションを、G25 Sephadex(GE ヘルスケア社製)で 50 mM リン酸カリウムバッファー (pH6.0)へ置換した。得られた脱塩液を 50 mM リン酸カリウムバッファーで緩衝化した DEAE-Sepharose fast flow (GE ヘルスケア社製) を充填したカラムに通液し、通過液を回収した。

## 分子量の測定

精製された組換え FAD-GDH は Endo H(ニューイングランドバイオラボ社製)によって処理することで、N 型糖鎖の除去を行った。タンパク質を 0.5% SDS 及び 1% dithiothreitol で変性させ、Endo H により 37°C で 3 時間インキュベートした。SDS-PAGE には、Nu-PAGE(Invitrogen 社製)を用い、MOPS-SDS バッファー中で電気泳動を行った。泳動には、1 レーン当たり、2.5 µg の FAD-GDH をアプライした。

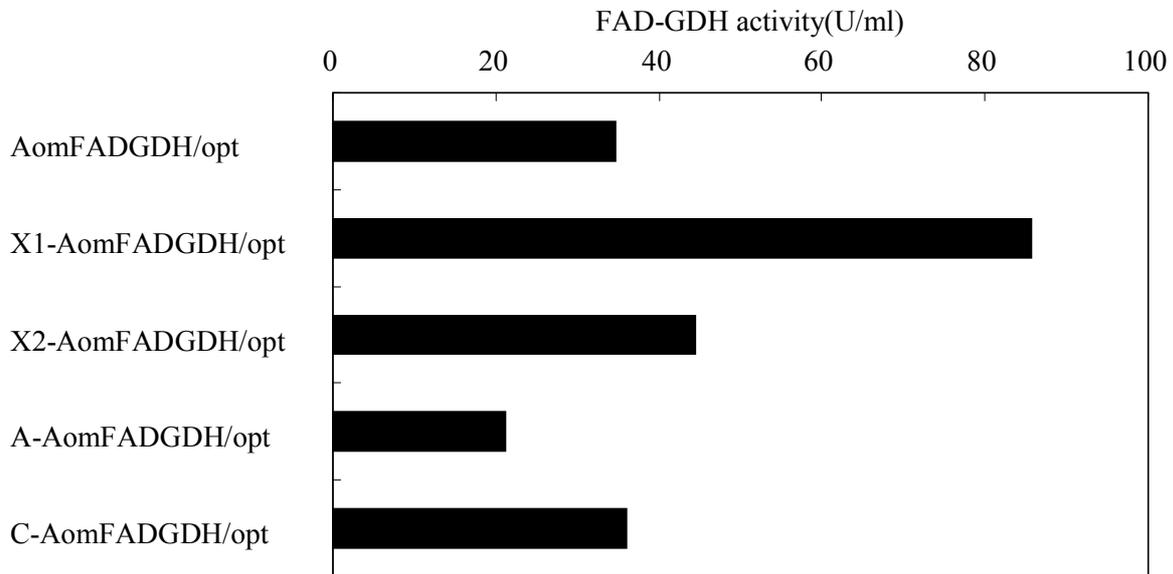
## 糖鎖組成の解析

精製された *A.oryzae* で発現させた FAD-GDH 及び、*Cryptococcus* sp. S-2 で発現させた FAD-GDH の糖鎖組成を MALDI-TOF MS で解析を行った。糖鎖の精製は BlotGlyco(住友ベークライト社製)と、キット付属のプロトコルに従った行い、精製糖鎖サンプルは住友ベークライト社に送付して MALDI-TOF MS 解析を実施した。

## 【結果】

***Cryptococcus* sp. S-2 による、*A.oryzae* FAD-GDH の異種組換え発現と分泌シグナル配列の置換**

コドン最適化された FAD-GDH を、*Cryptococcus* sp. S-2 に導入し、発現を確認したところ、培養液上清に FAD-GDH 活性が確認された。*A.oryzae* 由来 FAD-GDH の分泌シグナルが付加された配列を用いた場合でも、細胞外の FAD-GDH 活性は 34.6 U/ml となり、FAD-GDH は細胞外に分泌された。また、シグナル配列を *Cryptococcus* sp. S-2 の X1 シグナル配列に置換したところ、細胞外の FAD-GDH の生産量は 2.47 倍に向上した(FIG 2-11)。一方、X2 分泌シグナルに置換した場合、FAD-GDH の活性は 1.28 倍、Cutinase のシグナルで 1.04 倍となったが、Amylase のシグナルに置換した場合、0.61 倍となり FAD-GDH のシグナル配列の場合より分泌発現量が低下した。

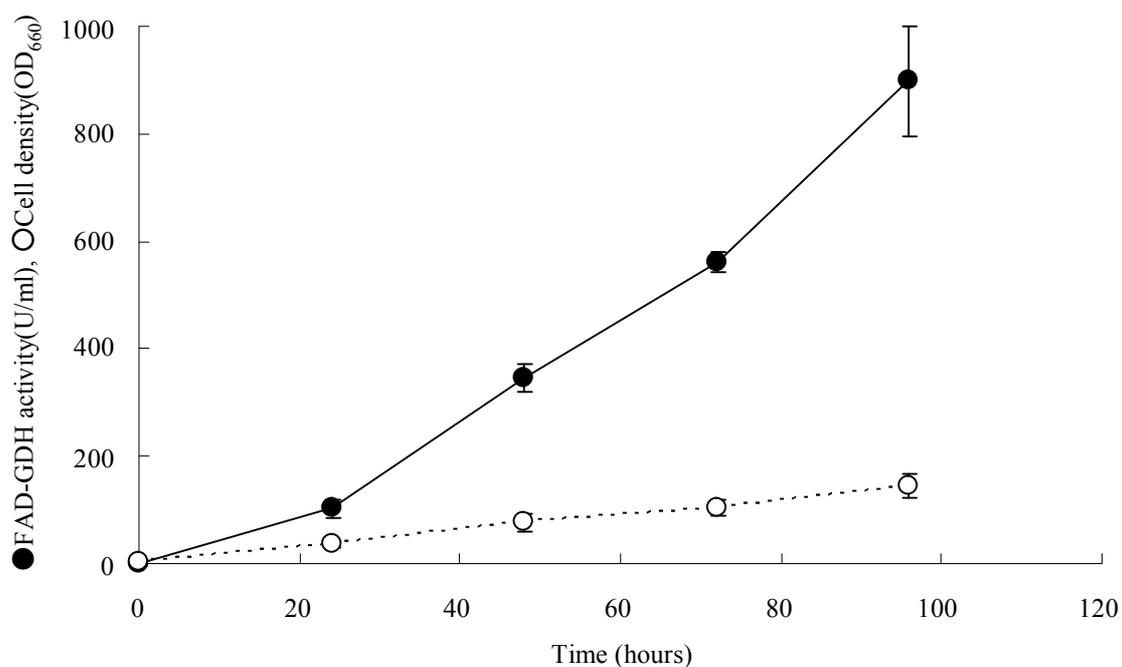


**FIG 2-11 Effects of various signal peptides on the production of FAD-GDH derived from *Aspergillus oryzae* expressed in *Cryptococcus* sp. S-2.**

The FAD-GDH activity levels of extracellular supernatant were measured.

## 流加培養

小型発酵槽を用いて、キシロース及び酵母エキスを連続的に添加した流加培養を行った結果、培養時間 96 時間で、FAD-GDH の生産量は、培養液上清で 897 U/ml にまで向上した(FIG 2-12)。この生産量は、バッチ培養での生産量(FIG 2-10)と比較して、約 10.5 倍高い生産性となった。

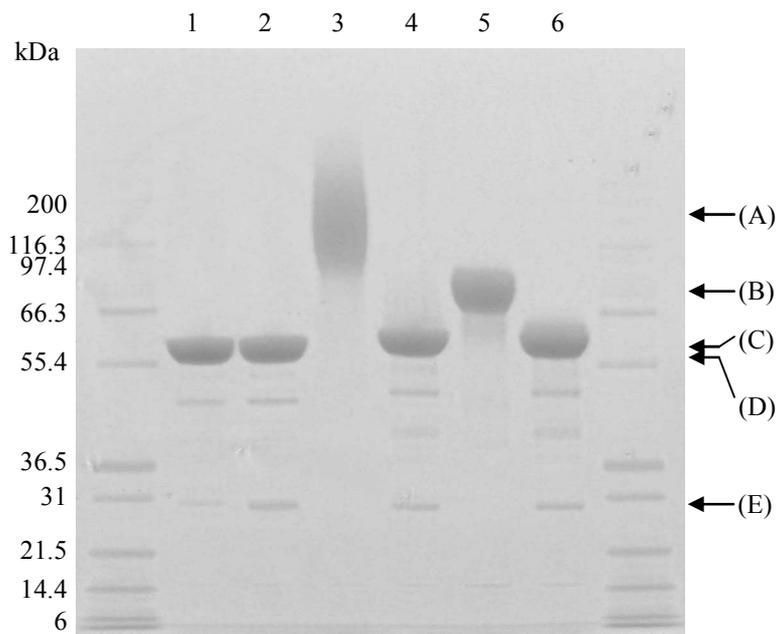


**FIG 2-12 Time course of recombinant FAD-GDH production in fed-batch fermentations.**

The X1-AoFADGDH/opt transformant was used. Closed circles indicate the activities in supernatant of culture, and open circles indicate the OD<sub>660</sub> of culture. The values are mean of results from three independent experiments, and the error bars denote standard errors.

***Cryptococcus* sp. S-2 により発現された FAD-GDH の特性評価**

*Cryptococcus* sp. S-2 によって分泌発現された FAD-GDH は、高純度に精製され、その分子量は SDS-PAGE の結果から、90,000 と判断された (FIG 2-13、レーン 5)。*A. oryzae* で組換え発現された FAD-GDH の分子量は 90,000~200,000 であったことから *A. oryzae* で発現させた FAD-GDH と比較して糖鎖含量は少ないと考えられる。また、精製された FAD-GDH の糖鎖は Endo H によって容易に除去され、分子量が 57,000 程度まで低下したことから、結合している糖鎖は、high-mannose 型と考えられる。



**FIG 2-13 SDS PAGE of recombinant FAD-GDHs.**

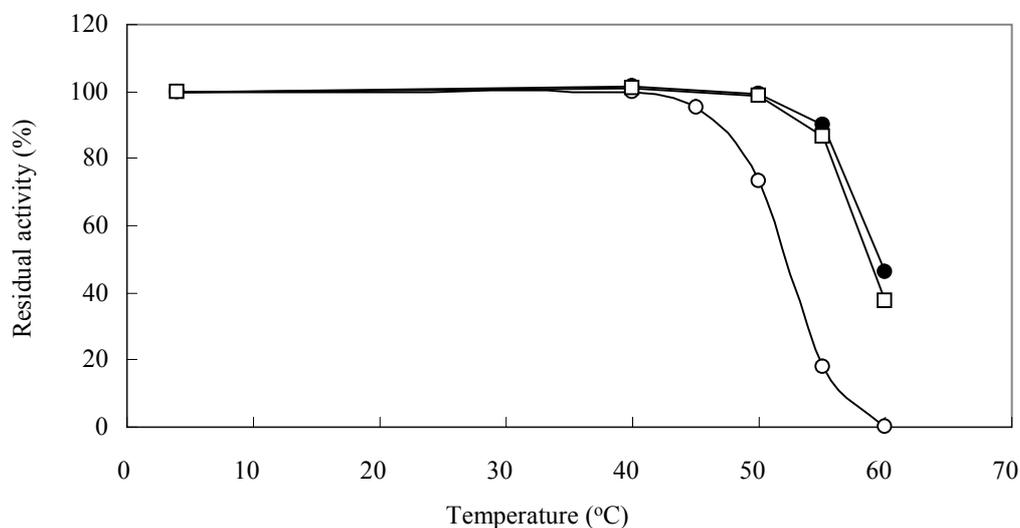
Lane1; FAD-GDH mutant (G163R+V551C) expressed in *E. coli*, Lane2; deglycosylated FAD-GDH mutant (G163R+V551C) expressed in *E. coli*, Lane3; FAD-GDH mutant (G163R+V551C) expressed in *A. oryzae*, Lane4; deglycosylated FAD-GDH mutant (G163R+V551C) expressed in *A. oryzae*, Lane5; FAD-GDH mutant (G163R+V551C) expressed in *Cryptococcus* sp. S-2, Lane6; deglycosylated FAD-GDH mutant (G163R+V551C) expressed in *Cryptococcus* sp. S-2. Arrows show (A) glycosylated recombinant FAD-GDH expressed in *A. oryzae*, (B) glycosylated recombinant FAD-GDH expressed in *Cryptococcus* sp. S-2, (C) deglycosylated recombinant FAD-GDH expressed in *A. oryzae* and *Cryptococcus* sp. S-2, (D) FAD-GDH expressed in *E. coli*, (E) deglycosylating enzyme Endo H.

*Cryptococcus* sp. S-2によって発現された FAD-GDH の酵素特性は、大腸菌、*A. oryzae* で組換え発現された FAD-GDH と比較して、基質特異性、ミカエリスメンテン定数(Km)において、大きな違いは認められなかった (Table 2-6)。

**Table 2-6 Enzyme specificity of three FAD-GDHs expressed in various hosts.**

Substrate specificity(%) (in 200mM substrate)	Expression host		
	<i>E. coli</i>	<i>A. oryzae</i>	<i>Cryptococcus</i> sp. S-2
D-Glucose	100	100	100
Maltose	0.3	0.4	0.3
D-Xylose	7.5	9.1	8.6
D-Galactose	0.5	0.6	n.d.
Km (mM)			
for D-Glucose	64	64	68

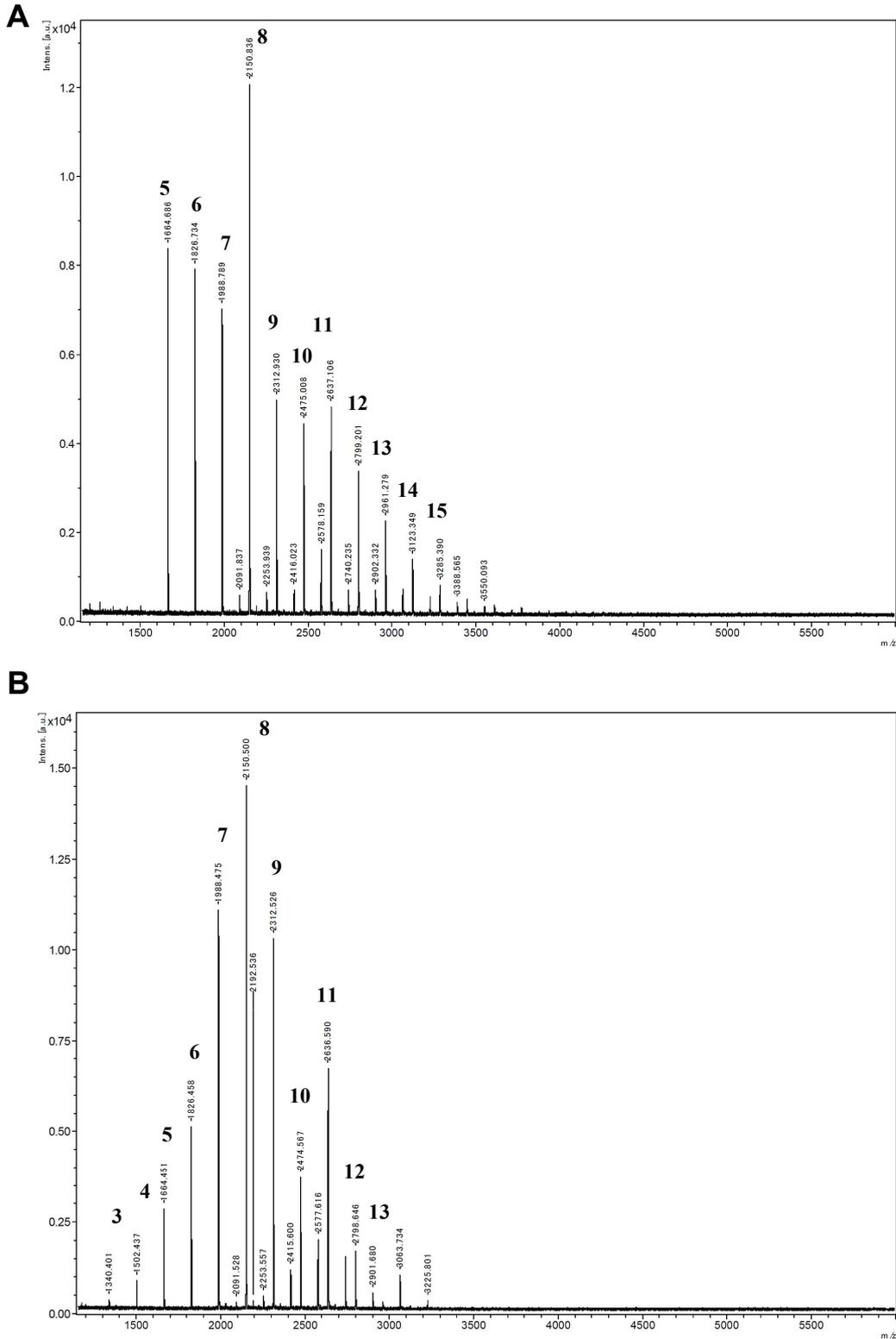
耐熱性については、大腸菌で発現させた FAD-GDH と比較して向上した。*A. oryzae* で組換え発現された FAD-GDH よりわずかに安定性が低い結果となった(FIG 2-14)。



**FIG 2-14 Thermal stabilities of evolved FAD-GDH variants expressed in *E. coli*, *A. oryzae* and *Cryptococcus* sp. S-2.** Residual activities measured after 10 min incubation at 50°C in K-Phos buffer (50mM, pH5.5). Stability was determined from the ration of residual to initial activity. Open circles indicate the residual activity ratio of FAD-GDH mutant expressed in *E.coli*, Closed circles indicate the residual activity ratio of FAD-GDH mutant expressed in *A. oryzae*, Open square indicate the residual activity ratio of FAD-GDH mutant expressed in *Cryptococcus* sp. S-2.

***Cryptococcus* sp. S-2 により発現された FAD-GDH の糖鎖解析**

*A.oryzae* と *Cryptococcus* sp. S-2 で発現された FAD-GDH の分子量は大きく異なるものの、Endo H による処理によって N 型糖鎖を除去した時のタンパク質部分の分子量はほぼ同じである。分子量が異なる原因は、N 型糖鎖の鎖長の差であると考え、*A.oryzae* 及び *Cryptococcus* sp. S-2 によって発現され、精製された FAD-GDH を用いて、MALDI-TOF-MS による糖鎖解析を行った。解析の結果、*A.oryzae* で発現させた FAD-GDH は hexose が 5 個～16 個の糖鎖が検出されており、さまざまな鎖長の糖鎖が結合していると推測される(FIG 2-15 A)。また、ピークシグナルの強度は高分子側ほど小さいものの、高分子のピークも十分な強度で検出された。一方で、*Cryptococcus* sp. S-2 で発現させた FAD-GDH から hexose が 5 個～12 個の糖鎖が検出されているが、hexose が 7,8,9 個のピークが強く検出され、hexose 11 個以上のピークはシグナルが小さい傾向があった(FIG 2-15 B)。



**FIG 2-15 MALDI TOF/MS analysis of N-type oligosaccharide**

The MALDI-TOF MS analysis of the N-linked glycans from FAD-GDH mutant (G163R+V551C) expressed in *A.oryzae* (A) and *Cryptococcus* sp. S-2(B). X-axis (m/z) indicates molecular mass and Y-axis (Intensity) shows the strength of a signal. Numbers of hexose in N-glycans are shown at each signal on plots.

## 【考察】

*Cryptococcus* sp. S-2 での異種タンパク質の組換え発現において、コドンの最適化、シグナル配列の置換、キシロースによる流加培養が効果的であることが第1章で確認された。そこで、本節では、*Cryptococcus* sp. S-2 宿主ベクター系を用いて、麹菌由来の FAD-GDH の組換え発現を検討した。

まず、コドン最適化遺伝子を合成し、*Cryptococcus* sp. S-2 に導入することによって、FAD-GDH は活性型で発現することを確認し、シグナル配列は Xylanase 由来の配列に置換することによって、FAD-GDH の生産性は約 2.5 倍に向上することを確認した。HRP-C1a の組換え発現では X2 シグナルが最適であったのに対して、FAD-GDH の発現では X1 シグナルが最適となっており、発現させるタンパク質の種類によって、最適な分泌シグナル配列は異なった。

キシロースを連続的に添加する流加培養では、小スケールでの培養と比較して、その生産量は約 10.5 倍にまで向上した。FAD-GDH の発現量は、897 U/ml であり、その生産量はおよそ 785 mg/L 程度と想定される。

精製された FAD-GDH の分子量は約 90,000 であり、ほぼ均一の分子量となっており、*A.oryzae* で発現された FAD-GDH と比較して、糖鎖組成は均一かつ短いと推定される。担子菌の糖鎖は、子囊菌の糖鎖と比較して短いとされ、スエヒロタケ *Schizophyllum commune* の糖鎖は  $\text{Man}_{5,9}\text{GlcNAc}_2$  の構造を有しているとされている。担子菌に分類される微生物には、マンノシルトランスフェラーゼをコードする遺伝子群(*och1*, *mnn10*, *mnn9*, *mnn1*)のホモログが存在しておらず、Mannose が 9 個以上伸張しないとされている(24)。また、糖鎖は Endo H 処理によって容易に除去されたことから、酵母などの真菌が生産するハイマンノース型  $(\text{Man})_n+(\text{GlcNAc})_2$  の糖鎖が結合していると考えられる。

以上により、自己血糖測定に用いられる FAD-GDH を、担子菌酵母 *Cryptococcus* sp. S-2 の異種タンパク質発現系を用いることによって、大量に発現させることが可能となった。本研究により、自己血糖測定において使用される FAD-GDH を安価に、かつ、大量に供給することが可能になると考えられる。

## 第5節 *Cryptococcus* sp. S-2による、*Mucor hiemalis*由来 FAD-GDHの組換え発現

### 【目的】

前節では、*Aspergillus oryzae*由来 FAD-GDHの *Cryptococcus* sp. S-2での組換え発現を検討し、大量発現に成功した。*A. oryzae*由来の FAD-GDHは、マルトースに作用しないという点で、PQQ-GDHと比較して、非常に優れているが、近年では、キシロースにも作用しない FAD-GDHが必要とされている。

キシロースは医療現場において、小腸の吸収機能を調べるためにキシロース吸収テストとして使用される。そのため、万が一、キシロース吸入テストを実施している患者が麹菌由来の FAD-GDHを搭載したセンサーによって自己血糖測定を行った場合、誤測定となる可能性がある。キシロースに作用しない FAD-GDHについても、研究、開発が進められており、特許も出願されている。

2010年にはキッコーマン社から、キシロースへの作用性が低い *Mucor prainii*由来の FAD-GDHに関する特許が出願されており(25)、2012年には東洋紡からキシロースへの作用性が低い、*Mucor hiemalis*由来の FAD-GDHに関する特許が出願されている(26)。これら *Mucor*属由来 FAD-GDHの基質特異性について Table 2-7に示す。

*Mucor*属由来の FAD-GDHは、特性には優れるものの、野性株での生産量は微弱であり、大腸菌や麹菌による組換え発現を行ってもその発現量は非常に微量であることが、同特許に記載されている。

本節では、これら *M. hiemalis*由来の FAD-GDHを高生産するため、*Cryptococcus* sp. S-2を宿主として、組換え高発現を試みた。

**Table 2-7 The patent information about the substrate specificity of the FADGDHs from *Mucor* species.**

Substrate	<i>Mucor prainii</i>	<i>Mucor javanicus</i>	<i>Mucor circinelloides</i>	<i>Aspergillus terreus</i>	<i>Aspergillus oryzae</i>	<i>Mucor hiemalis</i>
D-Glucose	100	100	100	100	100	100
Maltose	1.09	0.72	1.25	1.4	0.00	1.7
D-Galactose	0.44	0.54	1.25	1.2	-	1.2
D-Xylose	1.53	1.43	2.00	9.1	17.6	1.2
Mannose	0.66	0.36	1.00	2.8	1.40	-
Sucrose	0.00	0.36	0.25	0.1>	-	-
Trehalose	0.22	0.00	0.25	1.7	-	-
Maltotriose	0.88	0.54	1.00	-	-	-
Maltotetraose	0.66	0.54	1.50	-	-	-

% -Activity

Substrate specificity of various FAD-GDHs are quoted from "WO patent 2010/140421" and "WO patent 2013/065623".

**【材料】**

遺伝子の発現宿主には、*Cryptococcus* sp. U-5 株(*ura5*)を使用した。DNA 操作には、*Escherichia coli* DH5 $\alpha$ を、またプラスミドは pCsUX2 を用いた。*Cryptococcus* sp. U-5 株培養及び形質転換体の前培養には YM 培地(0.3% Yeast Extract, 0.3% Malt Extract, 0.5% Peptone, 1.0% D-Glucose)を、形質転換体の取得には、YNB(-ura)培地(0.67% Yeast nitrogen base w/o AA, 0.078% -Ura DO supplement, 2.0% D-glucose)を、Xylanase promoter による誘導発現には YX 培地(2% Yeast Extract, 5% D-Xylose)をそれぞれ用いた。

発現に用いる FAD-GDH の遺伝子は、*M. hiemalis* 由来の野生型遺伝子は、特許 WO2013/065623(26)に記載の配列を使用した。すなわち、NBRC6754 株を YG 培地(2% Yeast extract, 4% Glucose)培養し、mRNA を精製後、合成した cDNA をテンプレートとして PCR により増幅した(FIG 2-16)。

*Cryptococcus* sp. S-2 で発現させるためにコドン最適化された合成遺伝子は Genscript 社の人工合成遺伝子作製サービスを利用して合成した(FIG 2-17)。コドン最適化された *M. hiemalis* 由来の FAD-GDH の 5' 及び 3'末端には *Mlu*I サイトが付加され、プラスミド pUC57-reMhFADGDH にクローニングされた。設計した *M. hiemalis* 由来 FAD-GDH の DNA 配列は、野生型配列と 74.7%の相同性を有する配列となり(FIG 2-18)、コドンユースは *Cryptococcus* sp. S-2 の 3 種類の酵素(Xylanase, Cutinase, Amylase)にあわせてため、遺伝子の GC 含量は 65.6%となり、高 GC 含量となった(FIG 2-19)。本節で利用したプライマーの名称及び配列については、Table 2-8 に示した。



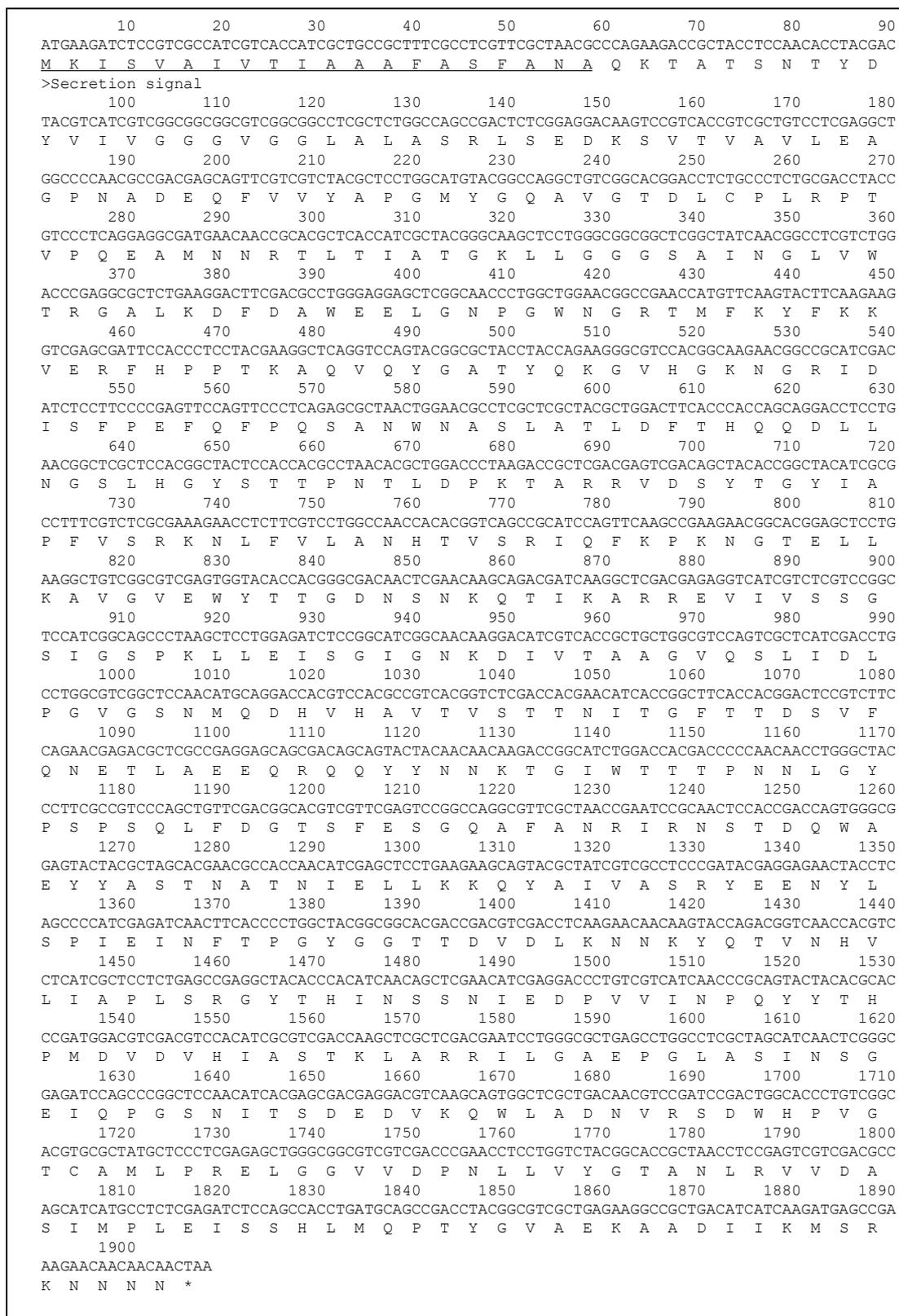


FIG 2-17 Codon-optimized and synthesized FAD-GDH gene from *Mucor hiemalis* (MhFADGDH/opt).

Underline indicates the predicted secretion signal peptide.

```

MhFADGDH/ntv 1 : ATGAAGATTT CTGTTGCCAT TGTAACTATT GCTGCAGCAT TTGCTTCTTT CGCTAATGCT CAAAAAAGT CTACATCTAA CACTTATGAT
MhFADGDH/opt 1 : ATGAAGATCT CCGTCGCCAT CGTCACCATC GCTGCCGCTT TGCCCTCGTT CGCTAACGCC CAGAAGACCG CTACCTCCAA CACCTACGAC

MhFADGDH/ntv 91 : TACGTTATTG TTGGTGGTGG TGTGGTGGT TTAGCTTTAG CTAGCCGCTT TTCTGAAGAT AAGAGCGTTA CTGTGCTGT CTTGGAAGCT
MhFADGDH/opt 91 : TACGTCATCG TCGGCGGGCG CGTCGGGGCC CTCGCTCTGG CCAGCCGACT CTCGGAGGAC AAGTCCGCTCA CCGTCGCTGT CCTCGAGGCT

MhFADGDH/ntv 181 : GGCCCTAATG CTGATGAGCA ATTTGTAGTA TATGCTCCGT GAATGTATGG ACAAGCTGTC GGTACGGACC TTTGCCCTCT TCGCCCACT
MhFADGDH/opt 181 : GGCCCCAAGC CCGACGAGCA GTTCGTCTGC TACGCTCCGT GCATGTACGG CCAGGCTGTC GGCACGGACC TCTGCCCTCT GGCACCTACC

MhFADGDH/ntv 271 : GTTCCTCAAG AGGCTATGAA CAACAGAACC CTTACCATTG CTACTGGTAA ATTATTAGGT GCGGCTAGTG CTATCAATGG CCTAGTTTGG
MhFADGDH/opt 271 : GTCCCTCAGG AGGCGATGAA CAACCGCAGC CTCACCATTG CTACGGGCAA GCTCCTGGGC GCGGCTCGG CTATCAACGG CCTCGTCTGG

MhFADGDH/ntv 361 : ACTCGTGGTG CATTGAAGGA TTTGTAGTCT TGGGAAGAAC TTGGTAACCC CGGTGGAAC GGAGAAGACTA TGTTTAAGTA CTTAAGAAG
MhFADGDH/opt 361 : ACCGAGGGCG CTCTGAAGGA CTTGAGCGCC TGGGAGGAGC TCGGCAACCC TGGCTGGAAC GGCCGAAGCA TGTTCAGTA CTTCAAGAAG

MhFADGDH/ntv 451 : GTTGAACGTT TCCATCCCTC TACAAAAGCT CAAGTTCAAT ACGGTGCTAC ATACCAAAAG GGTGTCCATG GTAAAAATGG TCGTATCGAT
MhFADGDH/opt 451 : GTCGAGCGAT TCCACCCCTC TACGAAGGCT CAGGTCCAGT ACGGCGCTAC CTACCAGAAG GCGCTCCAGC GCAAGAAGCG CCGCATCGAC

MhFADGDH/ntv 541 : ATCTCCGTTCC CTGAATTTCA ATTCCCTCAA TCTGCCAACC GGAATGCATC TCTTGCCACT CTTGATTTTA CCCATCAGCA AGATCCTTGG
MhFADGDH/opt 541 : ATCTCCGTTCC CCGAGTTCCA GTTCCCTCAG AGCGCTAACC GGAACGCCTC GCTCGCTACG CTGGACTTCA CCCACCAGCA GGACCTCCTG

MhFADGDH/ntv 631 : AATGGTCTCT TTCATGGTTA TTCACTACT CCAAACACTT TGAATCCCAA GACAGCTCGT CGTGTGATT CTTACACTGG TTATATTGCT
MhFADGDH/opt 631 : AACGGCTCGC TCCACGGCTA CTCCACCAGC CTAACACAGC TGGACCCCAA GACCGCTCGA CAGTCTGACA GCTACACGGG CTACATCGGG

MhFADGDH/ntv 721 : CCCTTTGTTA GTCGAAAGAA TCTTTTGGT TTAGCTAATC ATACTGTTC TCGTATTCAA TTTAAGCCCA AGAATGGTAC TGAGCTTTTA
MhFADGDH/opt 721 : CCTTTCGTCT CGGAAAGAAA CCTCTTGGTC CTGGCAACCC ACACGGTCAG CCGCATCCAG TTTAAGCCGA AGAACGGCAC GGAGCTCTCT

MhFADGDH/ntv 811 : AAGCGCGTTG GTGTTGAGTG GTATACCACCT GGTGACAATT CTAACAAACA AACCATCAA GCTCGTCGTG AAGTCAATGT ATCCTCTGGT
MhFADGDH/opt 811 : AAGGCTGTGC GCCTCGAGTG GTACACCACG GGCACAACCT CGAACAAAGCA GACGATCAAG GCTCGACGAG AGGTCACTGT CTCGTCCGGC

MhFADGDH/ntv 901 : TCTATTGGTA GTCCTAAGCT TCTTGAATTT TCCGGTATG GTAACAAGGA TATTGTTACA GCTGCTGGTG TTAATCTTTT AATTGATTTA
MhFADGDH/opt 901 : TCCATCGGCA GCCCTAAGCT CTTGGAGATC TCCGGCATCG GCAACAAGGA CATCGTCACC GCTGCTGGGG TCCAGTCTGT CATCGACCTG

MhFADGDH/ntv 991 : CCTGGAGTTG GATCCAACAT GCAAGATCAC GTTCATGCTG TTAGTGTCTC CACTACGAAC ATCACTGGTT TCACTACTGA CAGCGTCTTC
MhFADGDH/opt 991 : CCTGGCGTGC GCTCCAACAT GCAGGACCCG CTCACGCGCG TACGGTCTC GACCAGGAAC ATCACCGGCT TCACCACGGA CTCGCTCTTC

MhFADGDH/ntv 1081 : CAAAATGAAA CTCTCGCTGA AGAACAAAGA CAACAATACT ACAATAACAA GACCCGGGAT TGGACCACAA CCCCTAATAA CCTTGTTTAC
MhFADGDH/opt 1081 : CAGAACGAGA CGCTCGCCGA GGAGCAGCGA CAGCAGTACT ACAACAACAA GACCCGGCAT TGGACCACGA CCCCCAACAA CCTGGCTAC

MhFADGDH/ntv 1171 : CCCAGTCCCTA GCCAACTCTT TGATGGTACT TCTTTTGAAT CTGGTCAAGC TTTGCTAAT AGAATTCGTA ACTCCACTGA TCAATGGGCT
MhFADGDH/opt 1171 : CCTTCGCGCT CCCAGCTGTT CGACGGCAGC TCGTTCGAGT CCGGCCAGGC GTTCGCTAAC CGAATCCGCA ACTCCACCGA CCAGTGGGCG

MhFADGDH/ntv 1261 : GAATACTATG CCTCCACTAA TGCTACCAAT ATTGAGTTGT TGA AAAAGCA ATATGCTATT GTCGCTAGTC GTTATGAGGA GAATATTTA
MhFADGDH/opt 1261 : GAGTACTACG CTAGCACGAA CCCCACCAAC ATCGAGCTCC TGAAGAAGCA GTACGCTATC GTCGCTCCCG GATACGAGGA GAACTACCTC

MhFADGDH/ntv 1351 : TCTCCATTG AAATTAATTT CACTCCTGGT TATGGCGGAA CTACTGACGT CGACCTCAAG AACACAAGT ATCAAATGT CAACCAGTT
MhFADGDH/opt 1351 : AGCCCCATCG AGATCAACTT CACCCCTGGC TACGGCGGCA CGACCGAGCT CGACCTCAAG AACACAAGT ACCAGACGGT CAACCAGTTC

MhFADGDH/ntv 1441 : CTTATTGCTC CTTTATCTCG TGGTTACACT CATATCAACT CTCTAATAT TGAGGACCCT GTTGTTATTA ATCCCAATA CTATACTCAT
MhFADGDH/opt 1441 : CTCATCGCTC CTCTGAGCCG AGGCTACACC CACATCAACA GTCGAACAT CGAGGACCCT GTGCTATCA ACCCCAGTA CTACACGCAC

MhFADGDH/ntv 1531 : CCTATGGATG TTGATGTTCA TATCGCTCC ACTAAACTG CTGCTCGAAT TTTAGGTGCT GAACCTGGTC TTGCTTCCAT CAATTCTGGT
MhFADGDH/opt 1531 : CCGATGGAGC TCGACGTCCA CATCGCTCG ACCAAGCTCG CTCGACGAAT CCTGGCGCT GAGCCTGGCC TCGCTAGCAT CAACTCGGGC

MhFADGDH/ntv 1621 : GAAATTCAC CTGGGCTAA TATCACTAGT GATGAAGATG TCAAGCAATG GTTAGCTGAT AATGTTCTGT CTGACTGGCA TCCCTGTGGT
MhFADGDH/opt 1621 : GAGATCCAGC CCGGCTCCAA CATCACGAGC GACGAGGAGC TCAAGCAGTG GCTCGCTGAC AACGCTCGAT CCGACTGGCA CCTGTGCGC

MhFADGDH/ntv 1711 : ACTTGTGCTA TGCTTCCCTG AGAACTGGT GGTGTTGTTG ATCCTAATCT CTTGGTTTAT GGTACTGCTA ACTTGAAGT TGTGATGCT
MhFADGDH/opt 1711 : ACGTGCCTFA TGCTCCCTCG AGAGCTGGC GGCCTGCTGC ACCCGAACCT CCTGGTCTAC GGCACCGCTA ACCTCCGAGT CGTGCAGGCC

MhFADGDH/ntv 1801 : TCTATTATGC CTCTTGAAT CTCTTCTCAT TTAATGCAAC CTACCTATGG TGTGCTGAA AAGGCTGCTG ATATCATTA GATGCTCGC
MhFADGDH/opt 1801 : AGCATCATGC CTCTCGAGAT CTCCAGCCAC CTGATCGAGC CGACCTACGG CGTGCTGAG AAGGCTGCTG ACATCATTA GATGAGCCGA

MhFADGDH/ntv 1891 : AAGAACAACA ATAACATA
MhFADGDH/opt 1891 : AAGAACAACA ACAACTAA

```

FIG 2-18 The alignment of MhFADGDH/ntv vs MhFADGDH/opt.

Amino acid	Codon	% Frequency		
		Cryptococcus sp. S-2	MhFADGDH	
			Native	Optimized
Ala	GCT	23	81	62
Ala	GCC	43	11	28
Ala	GCA	10	8	0
Ala	GCG	24	0	9
Arg	CGT	12	58	0
Arg	CGC	32	13	17
Arg	CGA	44	8	83
Arg	CGG	1	0	0
Arg	AGA	0	21	0
Arg	AGG	4	0	0
Asn	AAT	9	53	0
Asn	AAC	91	47	100
Asp	GAT	16	77	0
Asp	GAC	84	23	100
Cys	TGT	5	50	0
Cys	TGC	95	50	100
Gln	CAA	10	96	0
Gln	CAG	90	4	100
Glu	GAA	11	71	0
Glu	GAG	89	29	100
Gly	GGT	21	77	0
Gly	GGC	57	8	100
Gly	GGA	12	11	0
Gly	GGG	10	4	0
His	CAT	13	85	0
His	CAC	87	15	100
Ile	ATT	16	70	0
Ile	ATC	84	30	100
Ile	ATA	0	0	0
Leu	TTA	0	28	0
Leu	TTG	12	17	0
Leu	CTT	9	41	0
Leu	CTC	58	83	59
Leu	CTA	4	2	0
Leu	CTG	28	0	41
Lys	AAA	0	27	0
Lys	AAG	100	73	100
Met	ATG	100	100	100
Phe	TTT	19	60	0
Phe	TTC	81	40	100
Pro	CCT	24	75	66
Pro	CCC	33	22	16
Pro	CCA	6	3	0
Pro	CCG	37	0	19
Ser	AGT	7	17	0
Ser	AGC	33	11	30
Ser	TCT	10	72	0
Ser	TCC	37	25	37
Ser	TCA	12	0	0
Ser	TCG	100	100	33
Thr	ACT	14	66	0
Thr	ACC	45	19	57
Thr	ACA	6	11	0
Thr	ACG	36	4	43
Trp	TGG	100	100	100
Tyr	TAT	8	58	0
Tyr	TAC	92	42	100
Val	GTT	4	71	0
Val	GTC	69	21	100
Val	GTA	4	8	0
Val	GTG	23	0	0
stop	TAA	67	100	100
stop	TAG	33	0	0
stop	TGA	0	0	0

FIG 2-19 Comparison of codon usage in native and codon-optimized MhFADGDH genes.

Percent frequencies of individual codons are shown for each corresponding amino acid.

Table 2-8 Primers used in this work.

Primer Name	Sequence
MhGDH_F	5'- AAAAACGCGTATGAAGATTTCTGTTGCCATTGTAACTATTG -3'
MhGDH_R	5'- AAAAACGCGTTTAGTTATTGTTGTTCTTTCGAGACATCTTAATG -3'
rcMfGDH(-sp)	5'- CAGAAGACCGCTACCTCCAACAACCTACGAC -3'
Xs1_iR	5'- AGCGGATGCTACCATCGCGGTCAAAGCAAGGAAGAGTGTGGAGAGCAGCATCG TGGATTGTATGTCGTGGAGAGGCTATGA -3'
Xs2_iR	5'- AGCTTCGGTGACCGGCGCAGCGGATGCTACCATCGCGTCAAAGCAAGGAAGA GTGTGGAGAGCAGCATCGTGGATTGTATGTCGTGGAGAGGCTATGA -3'
As_iR	5'- AGGGGACAGGCCAGCGACCAGTCCTAGAGAGGCGAGCAAGGCCCCAGCTAGGG AGCGGACAGGAGCCATCGTGGATTGTATGTCGTGGAGAGGCTATGA -3'
Cs_iR	5'- GGCTCGGCCGAGAGAAGCAGCGGACAGCACCGCGAGAGCGAGAGCGGAGACGA GCATCGTGGATTGTATGTCGTGGAGAGGCTATGA -3'
pCsUX2_F	5'- AAGGAGTGACTACTGGTCTGACCATTCGCC -3'
pCsUX_R	5'- TTTGTCGGACGACTCAGGTAATCGG -3'

## 【方法】

***Mucor hiemalis* 由来 FAD-GDH の *Cryptococcus* sp. S-2 発現ベクターの構築と形質転換体の取得**

cDNA から増幅した *M. hiemalis* 由来 FAD-GDH 配列及び、Genscript 社より納品された、pUC57-rcMhFADGDH を *Mlu*I によって消化し、同様に処理された pCsUX2 の *Mlu*I サイトにキシラナーゼプロモーターと同方向になるように挿入した。各々の FAD-GDH を導入し、pCsUX2-MhFADGDH/ntv 及び、pCsUX2-MhFADGDH/opt をそれぞれ作製した。pCsUX2-MhFADGDH/opt をテンプレートとして、分泌シグナル配列を、*Cryptococcus* sp. S-2 由来の配列に置換するため、Inverse PCR を行い、分泌シグナル配列を Xylanase1 及び Xylanase2, Amylase, Cutinase のものにそれぞれ置換したプラスミドを得た。得られたプラスミドは、それぞれ、pCsUX2-X1-MhFADGDH/opt, pCsUX2-X2-MhFADGDH/opt, pCsUX2-A-MhFADGDH/opt, pCsUX2-C-MhFADGDH/opt とした。なお、それぞれのシグナル配列は、第1章の Table 1-5 に示されているものと同じである。*Cryptococcus* sp. U-5 株への形質転換は、Masaki *et al.* (22)に記載の方法により行った。得られた形質転換体数株を植え継ぎ、活性を確認した。

***Mucor hiemalis* 由来 FAD-GDH の *Cryptococcus* sp. S-2 での発現確認**

上述の通り得られた形質転換体数株を 1 ml 液体培地(2% Yeast extract, 5% Xylose)を含む、96-well の

ディーププレートに1白金耳分植菌し、25°C, 600 rpm, 48時間振とう培養した。培養液を12000 rpm, 3分遠心し、上清の活性を測定した。FAD-GDH活性測定は、本章の第2節に従った。

#### ***Cryptococcus* sp. S-2により発現された *Mucor hiemalis* 由来 FAD-GDH の特性評価**

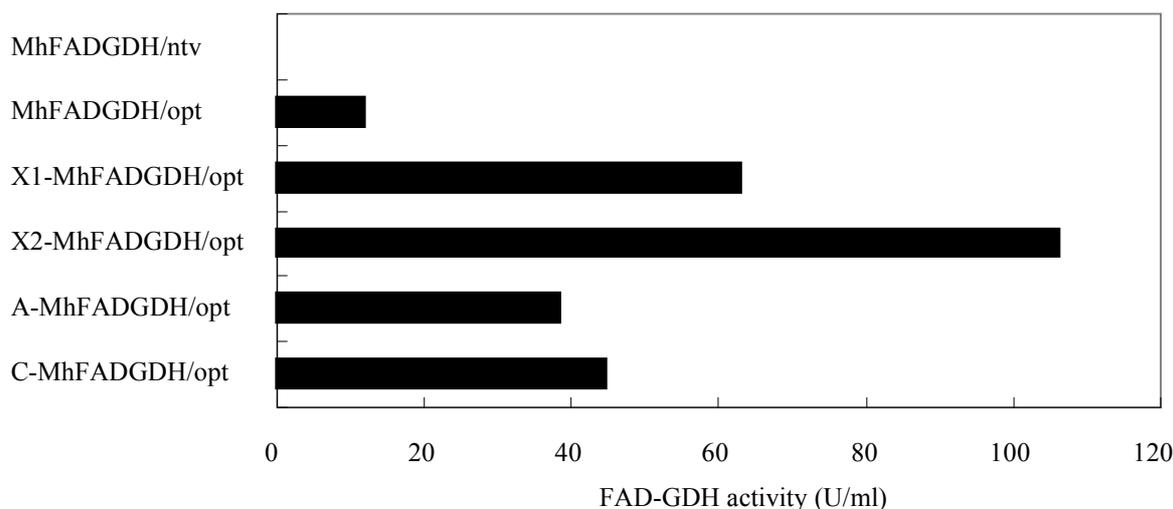
上述の通り得られた形質転換体の培養液上清を用いて、FAD-GDHの糖類(グルコース、マルトース、キシロース)に対する基質特異性を測定した。

## 【結果】

***Cryptococcus* sp. S-2による、*Mucor hiemalis*由来 FAD-GDHの異種組換え発現**

第1章でも検討したとおり、*Cryptococcus* sp. S-2での異種タンパク質の組換え発現には、コドンの最適化とシグナル配列の最適化が有効である。*M. hiemalis*由来のFAD-GDHについても、*Cryptococcus* sp. S-2用にコドンを最適化したところ、GC含量は62.3%となり、高GC含量となった(FIG 2-19)。

コドン最適化されたFAD-GDHは、*Cryptococcus* sp. S-2において培養液上清に活性型として発現したが、野生型配列を導入した*Cryptococcus* sp. S-2組換え体では、FAD-GDH活性が検出されなかった。また、分泌シグナルを*Cryptococcus* sp. S-2由来の配列に置換したところ、野生型配列の分泌シグナルを使用した場合と比較して、培養液上清のFAD-GDHの発現量は、X1シグナルに置換した場合で5.3倍、X2シグナルに置換した場合で8.9倍、Amylaseのシグナルに置換した場合で3.2倍、Cutinaseのシグナルに置換した場合で3.8倍に向上し、最適な分泌シグナル配列は、X2シグナルであった(FIG 2-20)。



**FIG 2-20 Effect of codon usage and various signal peptides on the production of FAD-GDH derived from *Mucor hiemalis*.**

The FAD-GDH activity levels of extracellular supernatant were measured.

***Cryptococcus* sp. S-2により発現された、*Mucor hiemalis*由来 FAD-GDHの基質特異性**

*M. hiemalis*由来のFAD-GDHは基質特異性に優れ、特にキシロースへの作用性が低減しているとされている。X2-MhFADGDH/opt形質転換体培養液上清を用いて、各基質に対する活性を測定したところ、Glucoseに対する作用性を100%としてマルトースへの作用性は2.0%、キシロースに対する作用性は0.6%と非常に低いレベルであった(Table 2-9)。

**Table 2-9 Enzyme specificity of recombinant MhFADGDH.**

Substrate specificity(% (in 50mM substrate)	Recombinant AomFADGDH	Reference (WO 2013/065623)	Recombinant MhFADGDH
D-Glucose	100	100	100
Maltose	0.3	1.7	2.0
D-Xylose	11.7	1.2	0.6

**【考察】**

本節では、*Cryptococcus* sp. S-2の宿主ベクター系を用いて、*Mucor hiemalis*由来のFAD-GDHの組換え発現を検討した。

これまでに、*M. hiemalis*由来のFAD-GDHは、野生株での生産性が約0.7 U/mlと報告されている(26)。

*M. hiemalis*の野生株から取得されたFAD-GDH遺伝子を*Cryptococcus* sp. S-2に導入したところ、FAD-GDH活性は検出されなかった。その原因は、第1章で述べたとおり、遺伝子の内部配列中に存在する内在性のpoly(A)付加シグナルによって、mRNAの転写が途中で停止しているものと考えられる。一方、コドン最適化遺伝子はGC含量が高い配列となっており、内在性のpoly(A)シグナルが除去され、完全長のmRNAが転写され、その結果、活性型でFAD-GDHを発現できた(106 U/ml)ものと考えられる。

分泌シグナル配列に関しては、HRP-C1aの発現の場合と同様、X2シグナルが最適であった。*A. oryzae*由来FAD-GDHの発現ではX1シグナルが最適であったことから、発現させるタンパク質によって、最適な分泌シグナルは異なるようである。

本研究により、由来が異なるFAD-GDHであっても、コドン最適化及び分泌シグナル配列最適化によって、*Cryptococcus* sp. S-2を宿主として、活性型のFAD-GDHを組換え発現させることが可能であることを見出した。

## 第6節 結論

本章では、自己血糖測定に用いられる、グルコースデヒドロゲナーゼについて、機能の改変、異種発現について検討を行った。

第2節では、マルトースへの作用性が低い、*Aspergillus oryzae* 由来の FAD-GDH について、大腸菌での発現、及び、耐熱性を向上させるために、遺伝子配列への変異導入を行った。その結果、大腸菌での FAD-GDH の組換え発現に成功し、アミノ酸置換により耐熱性を大幅に向上させることに成功した。

第3節では、耐熱性が向上した *A.oryzae* 由来の FAD-GDH を *A.oryzae* で組換え発現させた。発現した FAD-GDH には N 型糖鎖が付加され、耐熱性が向上することを示した。

第4節では、*Cryptococcus* sp. S-2 を宿主として、アミノ酸置換により耐熱性が向上した *A.oryzae* 由来の FAD-GDH の異種発現を検討した。第1章で構築した HRP 発現におけるストラテジー同様、コドンの最適化、分泌シグナルの最適化、キシロース流加培養により FAD-GDH の生産量は大幅に向上することを示した。

第5節では、キシロースへの作用性が低い *Mucor hiemalis* 由来の FAD-GDH について、*Cryptococcus* sp. S-2 を宿主として組換え発現を検討した。第4節と同じく、コドンの最適化と分泌シグナルの最適化により、*M. hiemalis* 由来 FAD-GDH を活性型で分泌発現させることが可能であることを示した。

以上の結果から、自己血糖測定に用いられる、グルコースデヒドロゲナーゼについて、耐熱性が高く、また、基質特異性に優れた酵素を大量に生産する方法を確立した。

本研究で試みた *Cryptococcus* sp. S-2 による異種タンパク質発現のための戦略である、コドン最適化、シグナル配列最適化、キシロース流加培養は、第1章で示した、西洋ワサビペルオキシダーゼだけでなく、FAD-GDH の発現にも応用可能であることを示した。

## 引用文献

1. Wilson R, Turner APF (1992) Glucose oxidase: an ideal enzyme. *Biosensor Bioelectron* **7**:165–185.
2. Tang ZR, Louie RF, Lee JH, Lee DM, Miller EE, Kost GJ (2001) Oxygen effects on glucose meter measurements with glucose dehydrogenase- and oxidase-based test strips for point-of-care testing. *Crit Care Med* **29**:1062–1070.
3. Igarashi S, Sode K (2004) Engineering PQQ glucose dehydrogenase with improved substrate specificity-first site-directed mutagenesis studies on the active center of PQQ glucose dehydrogenase. *Biomol Engineer* **21**:81–89.
4. FDA Public Health Notification : Potentially Fatal Errors with GDH-PQQ\* Glucose Monitoring Technology, (<http://www.fda.gov/MedicalDevices/Safety/AlertsandNotices/ucm176992.htm#>)
5. Gorton L, Dominguez E (2002) Electrocatalytic oxidation of NAD(P)H at mediator-modified electrodes. *Rev Mol Biotechnol* **82**:371–392.
6. Inose K, Fujikawa M, Yamazaki T, Kojima K, Sode K (2003) Cloning and expression of the gene encoding catalytic subunit of thermostable glucose dehydrogenase from *Burkholderia cepacia* in *Escherichia coli*. *Biochim Biophys Acta* **1645**:133-138.
7. Tsuya T, Ferri S, Fujikawa M, Yamaoka H, Sode K (2006) Cloning and functional expression of glucose dehydrogenase complex of *Burkholderia cepacia* in *Escherichia coli*. *J Biotechnol* **123**:127-136.
8. Yamaoka H, Yamashita Y, Ferri S, Sode K (2008) Site directed mutagenesis studies of FAD-dependent glucose dehydrogenase catalytic subunit of *Burkholderia cepacia*. *Biotechnol Lett* **30**:1967-1972.
9. Tsujimura S, Kojima S, Kano K, Ikeda T, Sato M, Sanada H, Omura H (2006) Novel FAD-dependent glucose dehydrogenase for a dioxygen-insensitive glucose biosensor. *Biosci Biotechnol Biochem* **70**:654-659.
10. Sygmund C, Staudigl P, Klausberger M, Pinotsis N, Djinović-Carugo K, Gorton L, Haltrich D, Ludwig R (2011) Heterologous overexpression of *Glomerella cingulata* FAD-dependent glucose dehydrogenase in *Escherichia coli* and *Pichia pastoris*. *Microb Cell Fact* **10**:106.
11. Bak TG, Sato R (1967) Studies on the glucose dehydrogenase of *Aspergillus oryzae*. I. Induction of its synthesis by rho-benzoquinone and hydroquinone. *Biochim Biophys Acta* **139**:265-276.

12. Bak TG (1967) Studies on glucose dehydrogenase of *Aspergillus oryzae*. II. Purification and physical and chemical properties. *Biochim Biophys Acta* **139**:277-293.
13. Bak TG (1967) Studies on glucose dehydrogenase of *Aspergillus oryzae*. 3. General enzymatic properties. *Biochim Biophys Acta* **146**:317-327.
14. Bak TG, Sato R (1967) Studies on glucose dehydrogenase of *Aspergillus oryzae*. IV. Histidyl residue as an active site. *Biochim Biophys Acta* **146**:328-335.
15. Kitabayashi M, Tsuji Y, Aiba H, Kawaminami H, Kishimoto T, Nishiya Y (2007) Glucose dehydrogenase. WO patent 2007/116710.
16. Mori K, Nakajima M, Kojima K, Murakami K, Ferri S, Sode K (2011) Screening of *Aspergillus*-derived FAD-glucose dehydrogenases from fungal genome database. *Biotechnol Lett* **33**:2255-2263.
17. Petersen TN, Brunak S, von Heijne G, Nielsen H (2011) SignalP 4.0: discriminating signal peptides from transmembrane regions. *Nat Methods*, **8**:785-786.
18. Kawaminami H, Tsuji Y, Kitabayashi M, Nishiya Y (2008) Modified flavine adenine dinucleotide dependent glucose dehydrogenase. WO patent 2008/059777.
19. Yada T, Miyamoto K, Honda M (2008) FAD-conjugated glucose dehydrogenase gene. WO patent 2008/001903.
20. Culyba EK, Price JL, Hanson SR, Dhar A, Wong CH, Gruebele M, Powers ET, Kelly JW. (2012) Protein native-state stabilization by placing aromatic side chains in N-glycosylated reverse turns. *Science*, **331**:571-5.
21. Yamada O, Lee BR, Gomi K (1997) Transformation system for *Aspergillus oryzae* with double auxotrophic mutations, *niaD* and *sC*. *Biosci Biotech Biochem* **61**:1367-1369.
22. Yamada O, Na Nan S, Akao T, Tominaga M, Watanabe H, Satoh T, Enei H, Akita O (2003) *dffA* gene from *Aspergillus oryzae* encodes L-ornithine N5-oxygenase and is indispensable for deferriferichrysin biosynthesis. *J Biosci Bioeng* **95**:82-88.
23. Masaki K, Tsuchioka H, Hirano T, Kato M, Ikeda H, Iefuji H (2012) Construction of a new recombinant protein expression system in the basidiomycetous yeast *Cryptococcus* sp. strain S-2 and

- enhancement of the production of a cutinase-like enzyme. *Appl Microbiol Biotechnol* **93**:1627-1636.
24. Berends E, Ohm RA, de Jong JF, Rouwendal G, Wosten HA, Lugones LG, Bosch D (2009) Genomic and biochemical analysis of N-glycosylation in the mushroom forming basidiomycete *Schizophyllum commune*. *Appl Environ Microbiol* **75**:4648-4652.
  25. Tajima R, Ichiyangi A, Ichikawa K, Yoshimura T (2010) Flavin-bound glucose dehydrogenase. WO patent 2010-140431.
  26. Sumida Y, Aiba H, Kawaminami H, Hirao R, Utashima Y, Kishimoto T, Yanagidani S (2013) Novel glucose dehydrogenase. WO patent 2013/065623.

## 第 3 章 担子菌酵母 *Cryptococcus* sp. S-2 の宿主ベクター系の改良

### 第 1 節 緒言

第 1 章、第 2 章で示したように、担子菌酵母 *Cryptococcus* sp. S-2 は異種タンパク質の組換え発現宿主として非常に優れており、コドンの最適化とシグナル配列の最適化を行うことによって、さまざまなタンパク質を高発現することが可能になった。本章では、*Cryptococcus* sp. S-2 による異種タンパク質生産に必要な基盤技術の整備を目的とし、産業利用に重要な技術として、以下の 4 点に着目し検討を行った。

*Cryptococcus* sp. S-2 の遺伝子操作に利用することができる組換えマーカーは、現時点では、ウラシル要求性マーカーのみであり、多重遺伝子破壊や遺伝子の破壊と発現の組み合わせなどの検討が困難である(1)。*Cryptococcus* sp. S-2 の育種を進めるためには、複数のマーカー遺伝子が必要である。そこで、本章の第 2 節では遺伝子組換えマーカーリサイクル技術の開発を行った。

*Cryptococcus* sp. S-2 による異種タンパク質の発現では、これまでに取得されている発現プロモーターは、3 種類(Xylanase, Cutinase, Amylase)で、いずれも炭素源による誘導型プロモーターである。目的とする遺伝子を強制的に発現させる場合、恒常的に遺伝子を発現する場合もある。そこで、本章の第 3 節では新たに恒常発現プロモーターの取得を行った。

*Cryptococcus* sp. S-2 などの担子菌酵母や担子菌は細胞外に大量の多糖類を分泌することが知られている(2)。細胞外に分泌された多糖類は、濃縮の際に工程液の粘度を上昇させるため、限外ろ過膜や除菌ろ過膜への負荷が大きくなり、膜の閉塞を発生させる。そこで、本章の第 4 節では、細胞外多糖類低生産変異株の取得を行った。

宿主の育種においては、遺伝子を効率的に破壊することが必要である。*Cryptococcus* sp. S-2 の遺伝子組換えにおいて、DNA は染色体上にランダムに組み込まれるため、目的の遺伝子を効率的に破壊することは非常に困難である。そこで、本章の第 5 節では、遺伝子の相同組換え効率の向上のための検討を行った。

## 第2節 担子菌酵母 *Cryptococcus* sp. S-2 のウラシル要求性を利用した Pop-in/Pop-out によるマーカーリサイクル系の構築

### 【目的】

*Cryptococcus* sp. S-2 の遺伝子組換えマーカー遺伝子としては、ウラシル要求性遺伝子マーカーである *ura5* 遺伝子が報告されているのみである。*ura5* 遺伝子は、orotate phosphoribosyl transferase をコードしており、ウラシル要求性株である *Cryptococcus* sp. S-2 U-5 株に形質転換を行うことにより、ウラシル要求性の有無を指標として形質転換体を選抜することが可能である。

また、5-FOA(5-Fluoroorotic acid)は、正常なピリミジン合成系を有する酵母細胞に対してのみ致死作用を示すため、5-FOA の存在下で培養することにより、ウラシル要求性株のポジティブスクリーニングを行うことが可能である(3)。

この 5-FOA の性質を利用して、*Pichia pastoris* においては Pop-in/Pop-out 遺伝子破壊法が報告されている(4)。この方法では、まず、ウラシル要求性マーカー遺伝子とターゲット DNA を連結して宿主ゲノム中に導入する(pop-in)。次に、導入したターゲット DNA と、宿主の染色体上に存在する塩基配列との間で相同組換えを起こさせ、ウラシル要求性マーカー遺伝子とともにターゲット配列を除去する(pop-out)。この方法により、ウラシル要求性マーカー遺伝子をリサイクルすることが可能になるため、遺伝子の多重破壊が可能になる。

そこで、*Cryptococcus* sp. S-2 の *ura5* マーカー遺伝子を使用し、*Cryptococcus* sp. S-2 における、Pop-in/Pop-out による遺伝子破壊方法について検討することとした。

### 【材料】

DNA 操作には、*Escherichia coli* DH5 $\alpha$ を、形質転換の宿主には *Cryptococcus* sp. U-5 株(*ura5*)を使用した。形質転換体の取得には、YNB(-ura)培地(0.67% Yeast Nitrogen Base w/o Amino Acid, 0.078% -Ura DO Supplement, 2.0% D-Glucose)を用い、遺伝子の Pop-out による、ウラシル要求性株の選抜には、5-FOA 選択培地(0.67% Yeast Nitrogen Base w/o Amino Acid, 0.078% -Ura DO Supplement, 500 mg/L Uracil, 0.2% 5-FOA, 2% D-Glucose)を用いた。

アデニン要求性株の生育試験には、YNB(+ura) 培地(0.67% Yeast Nitrogen Base w/o Amino Acid, 500 mg/L Uracil, 2% D-Glucose)若しくは、YNB(+ura+ade) (0.67% Yeast Nitrogen Base w/o Amino Acid, 500 mg/L Uracil, 500 mg/L Adenine, 2% D-Glucose)をそれぞれ用いた。また、本節で利用したプライマーの名称及び配列については、Table 3-1 に示した。

**Table 3-1 Primers used in this work.**

Primer name	Sequence
Ade1P2k_F	5'- GCTTTGAACTTCCAGCTCGTAGACAGTAG -3'
Ade1T2k_R	5'- CTTGAGACCCTCAGCATACACCCAA -3'
pCR-ade1-PT-F	5'- ACAGTGGTGCGCTCCATCGA -3'
pCR-ade1-PT-R	5'- GTCGGTCGAGGTGAGCTGCT -3'
ura5-ade1-F	5'- CTCACTCGACCGACATGAGCAGTGCCGTTCCCTTC -3'
ura5-ade1-R	5'- GGAGCGCACCACTGTCTACGCCTGAATACCGTACT -3'
Ura5 708-688R	5'- CTACGCCTGAATACCGTACT -3'
Ade1+936F	5'- GGTATTCAGGCGTAGCGTTCAGACCGAGTAGATCA -3'
pCR-ade1-PT-R2	5'- GGAGCGCACCACTGTGTGCGTTCGAGGTGAGCTGCT -3'
Ade1-500F	5'- CTCGTTGAAGCTGCGTCCGT -3'
Ade1-1436F	5'- GGTATTCAGGCGTAGGGCGGCGTCACCGACGCGCT -3'
pCR-ade1-PT-R3	5'- CGCAGCTTCAACGAGGTCGGTTCGAGGTGAGCTGCT -3'
Ade1-1000F	5'- AGCAGAGGTGTCCTGGAACC -3'
pCR-ade1-PT-R4	5'- CAGGACACCTCTGCTGTCGGTTCGAGGTGAGCTGCT -3'

## 【方法】

### *ade1* 遺伝子の Pop-in/Pop-out コンストラクトの作製

*Cryptococcus* sp. S-2 の *ade1* 遺伝子破壊株を作製するために、*ade1* 遺伝子の Pop-in/Pop-out コンストラクトを作製した。Pop-in/Pop-out コンストラクトの作製には、*Cryptococcus* sp. S-2 の *ade1* 遺伝子の上流 1935bp と、下流 1826bp を使用した(FIG 3-1)。

まず、*ade1* 遺伝子の上流 1935bp と *ade1* 遺伝子の ORF と、*ade1* 遺伝子の下流 1826bp を含む領域を、プライマー *ade1*P2k\_F とプライマー *ade1*T2k\_R のセットで PCR により増幅し、Zero Blunt PCR Cloning Kit(Invitrogen 社)を用いて、pCR-Blunt 中にクローニングした。インサートが導入されたプラスミドを取得し、pCR-*ade1* とした。

次に、pCR-*ade1* から、プライマー pCR-*ade1*-PT-F とプライマー pCR-*ade1*-PT-R を用いて inverse PCR を行

い、*ade1* 遺伝子の ORF 部分を除去した PCR 産物を作製した。さらに、pCsURA5 から、プライマー *ura5-ade1-F* とプライマー *ura5-ade1-R* を用いて、PCR を行い、*Cryptococcus* sp. S-2 株由来の *ura5* 遺伝子を増幅した。このようにして増幅した 2 つの PCR 産物を、In-Fusion HD Cloning Kit(タカラバイオ社)を用いて融合させ、*ade1* 遺伝子破壊用ベクターである pCR-*ade1-ura5* を作製した。

次に、この pCR-*ade1-ura5* から、以下の 3 通りの PCR 及び in-fusion 反応を行い pop-in/pop-out 用の遺伝子断片を有するプラスミドを作製した(FIG 3-2)。。

1 つ目は、プライマー pCR-*ade1-PT-F* とプライマー pCR-*ade1-PT-R* のセットで PCR を行った PCR 産物と、プライマー *ura5-ade1-F* とプライマー *ura5-ade1-R* のセットで増幅した PCR 産物を in-fusion 反応させて、*ade1-Upop1000a* ベクターを作製した。

2 つ目は、プライマー *ade1-500F* とプライマー *Ura5 708-688R* のセットで増幅した PCR 産物と、プライマー *ade1-1436F* とプライマー pCR-*ade1-PT-R3* のセットで増幅した PCR 産物を in-fusion 反応させて、*ade1-Upop500a* ベクターを作製した。

3 つ目は、プライマー *ade1-1000F* とプライマー *Ura5 708-688R* のセットで増幅した PCR 産物と、プライマー *ade1+936F* とプライマー pCR-*ade1-PT-R4* のセットで増幅した PCR 産物を in-fusion 反応させて、*ade1-Upop1000b* ベクターを作製した。

5' -  
 GAAAGTCAGGACTCGATTGACAAGCCGGGTGAGACTCCGGCCAAAGCACTCAATACGGTTCTCGCTTGAACCTCCAGCTCCGTAGACAGATGC  
 AACATCGTGCAGACTCGACTTTGAGGAGCTGGCCGGCCGAGAACACTCAATCGAACATCGCGCTTTTGCCCGATAAGAGGCGGAGTACCAGCT  
 ATCGTCCCAACCTCCAGGATACACGGCCGAGACATTATCCGGAAAGTGTGCGCCGAGGAAAGTGTGCGCCGAGGAGTGTGCGCCGAGTTCGGT  
 ATCCTCTGAAGCAGCTGTATGCTTTCATATTGAGGGAATGAAGTGCATCCTCCAGGCAGTGTACAACTGGCAGGCGTGGGTCTGGACACAGTCT  
 GCATTCAGCCAAAGGCGCCGACTAACTGCGCGCAGCTCATATCGCTTACTCGTGCCTCTGCTCAAGATTGCCGACTTCTCACTGCGGGAGTCC  
 ACGTCAGTCTTTTCGAGCTGGTGTCCGCTCGAGTCAAGCTGATCAGAGTAGTGAAGATCCTGCTTGGCGATGTAAGCCAGCTCGGGGGCAACGA  
 GTCGCTGCCGACACCCGCTCACCTGCCTAGCTGCATGCTTCTCGATGCTAAACAAGTCTACCTTTGAGACGCTCAAGTGGCGTGTCAAGTACTA  
 CTGCTTTATCCTCAAAGCCGTGTTCGAGACGCTGCGCGTCCCGTGCACAAGCTCGAGTTTATCACTGGTACAAGTACCAGCTGACTCCGGAGTA  
 CACCTTCACATGTACAAGTGAAGTCAACGACTAGCATCCCGCGGATCATAGGCTTATGACCAAGTTCATCTCTTGACTACGACCCAGGCGCGTGA  
 GCACCGCGGTGGGATGTTGTCAAGGCGTCAAGAGCCCCCTGATGTTGCTGCTTACCTTGGTGTGACAGGCTCTTGACGAGCAGTACCTGGA  
 TGTCACTTCCAGTTCCGGCGGTGTGACCAAGTGTGAGTGCAGCTTCCAGCCGAGTAGATCACGTGCTGAGCGACTATAGCCCAAGATCTTCATGTAC  
 GCGCGCAGTTCCTGCCAAGATGGGCTACGCCAAGCGGGCGCACTTGTGAACACGATGGTTCCTCGGCTTTCGCGCGGCAAGATGTGCTCTCG  
 GACCCAAAGTCCAAGTAGACTTCTTGACTCGCCGGGACATCAAGCTAAGCTGAAGGCGGGTGTGCACGCCCGCCAGGTCGAGGGCAAC  
 GGTGCTTTCGCTTCGTAAGGCGGTGCTATCCCGTGAAGAGCTGAGGAGGAGCGGCCATGCTCGCGGGGAGAAAGTTTGCCCTCGCGAT  
 GGCTCGGCCCTGTGCTTCGTAAGGAGGCGCCACCCGAGGCAAGCTTACCATTACCCGACCGGAGAAAGTTGCGCGGTGATATCCACTTTGGC  
 ACCTACAGGCGCTCGAGGACGCTACGCCAAGGAGGATATCCACCCGGGAGACCTCAAGGCGGGCTCACCGACGCGCTCATCAAGCTTCTCGGG  
 CCCATTGCGCCAAAGTTTACGCCAACCCGAGTGGCAGGAGGCGGAGAAAGGTTACCCGGACGCGTGTCCAGGTCGCGCTCGCTCGGCC  
 AAGCAGGCGCAGGCGCAAGCCGAGGCGAAGCTTGGGTTAAGCGGTTGCATGGTGCCTGCTTTGAGCTGATCAGTGCAGAAAAGGAGAA  
 GGAGTCCGAAACAGCCCGCAGCGAGGAGGAGCGTGGCGCTTCCGCGGCAAGGAGGAGGAGGAGTTCGCAAGGCGCAGGCGCAAGCAGG  
 CGGTAACGATCTCTACAGAGGAGTCAAACAGCGGAGCGCGCTGCGGCCGCTGTACCCCTTCGCGCGGACGCGATCCGTTGACTTCCGC  
 CTCAGCTCGGACGTTGCGGTGCGTTTATTATAACATCTATCTTGAGCATTGGTGAAGTCAAGCTCAGCAGCTCACCCTCGACCGAC

10 20 30 40 50 60 70 80 90  
 ATGCCAAGCTCAAGTGTGCAAGGGCAAGGTCAGGACATCTACGAGATTCGCGGCGAGCCAGACAGATGCTGTTGTTGCGACC  
 M P K L K L L A K G K V R D I Y E I P G E P D K M L F V A T  
 100 110 120 130 140 150 160 170 180  
 GACCGCATCAGCGCTTTCGACTGTCTGATGGTCAACGGCATTCCTAAGAAGGGTATCACCTTGACTACGCTGTCCGGCTTCTGGTTCCAC  
 D R I S A F D C L M V N G I P K K G I T L T T L S G F W F H  
 190 200 210 220 230 240 250 260 270  
 AAGCTCTCGCACATCATCCCAACCAGCTTCTCGGCCATCTTGCAGGCTCATCCGCTCTGCCAAGTGTGCTGACC  
 K L S H I I P N H V L A P S L P G P S S S S S A L P K C L T  
 280 290 300 310 320 330 340 350 360  
 GACCCCGCTTCGCGGTGGTTCAGAGTTCGCGCGCAGCTTGCAGGAGTACAAGGAGCAGCTTGTGCGCCGAGCATGATCGTCAAGAAATGC  
 D P A S A W S E F P R S L D E Y K E Q L V G R S M I V K K C  
 370 380 390 400 410 420 430 440 450  
 GAGGTTGTCAAGATCGAGGCGATGTTCCGAGGTTACATCACTGGCTCCGCGTGGTCAAGTACAAGAGAGCCAGACGCTGCACGGTATC  
 E V V K I E A I V R G Y I T G S A W S E Y K K S Q T V H G I  
 460 470 480 490 500 510 520 530 540  
 CAGATGCCTGAGGCGCTGGTTCGAGTTCGAGAGCTGCCAAGCCGCTGTTACGCTTCGACCAAAGCCGACCGAGGCGGACGACGACGAG  
 Q M P E G L V E S Q K L P K P L F T P S T K A D Q G E H D E  
 550 560 570 580 590 600 610 620 630  
 AACATCCACCCTGACAAGGTCAGGACATCTGCGCGCCGAGCTTGCAGGCGGAGTTCGAGCGGGTGGCGATTACGCTTTACAGCGGAGGCA  
 N I H P D K V K D I C G A E L A A E I E R V A I Q L Y S E A  
 640 650 660 670 680 690 700 710 720  
 GCAGAGTACGCTTGGCCCGCGTCTGATCCTCGCCGACCAAGTTCGAGTTCGCGCTGTTGCCGTGCGCGAAGCGCGGTTTCGACGGC  
 A E Y A L A R G L I L A D T K F E F G L L P S P N G R F D G  
 730 740 750 760 770 780 790 800 810  
 AAGGACCTGATCCTGATTGACGAGGTTGCTCAGCCGATTCGTCGAGGTTACTGGTTCGCGAGACGCTTACGTCGAGGGCAAGCCCGAGGCG  
 K D L I L I D E V L T P D S S R Y W S A D A Y V E G K P Q A  
 820 830 840 850 860 870 880 890 900  
 AGCTTCGACAAGCAGTACTTGCAGGCTGGTTGATCGCCAGGCTTGCAGAAACAGGACGCGCTCAAGCTCCCGGAGGACGTTGTCAAG  
 S F D K Q Y L R D W L I A Q G L R N K D G V K L P E D V V K  
 910 920 930 940 950 960  
 GAGCAGGAGGCAAGTACGAGGAAGCCAGGACCGAGTCAATGGGCTTGGGCAAGTTCGCGCCCTAG  
 E T R A K Y E E A R D R V M G L G K F A A \*

ACAGTGGTGCCTCCATCGATTGATCGGTATATATATGATCATACATCTGTACAGAACTTGGCACAGAGCTCGGTAGACTGTCTAGTCTGTGCC  
 GGCTGTGCGATCCTTCCCTGTGCGAGGTTTCTAAGCCGATTTGGCAGCGAAGAACCAGGTGTCAACTGAGGAAGGTGAGTCAATCGAACCCTGTC  
 CAACTAGTCAACCCAGCAGCACTCACGATCTCTGGAGTTGCGGAGGTTCAATGCTCATGTCGACGCTTCCACCAGTTCAAAGCCCTGGTGATCC  
 ATCGCGGACAGGATGTTGCAAGCGGACATGCGCGCGGCACTTACTTCTGTGCGGTCGCAAGTGTCAAGGATGACCGCGCAGTTTCATCTGCAAG  
 CATTCGCGGTTCTTTCTCTCGTCTTGGATACCGCGGTGGCCACATGCGGACAGCTTAAATGAATGCGCTGCTTGGTTTGTGCTGTTGGGGCTGTG  
 ATGAGGCAATCTTGTGCTACTCGTTGAAGCTGCGGTCGCTGTGAGTAACTTCCGGGCTGTCAATGGATCAGACCTGCTGATGCTGAAGAATA  
 TACGCTGACGCGCGGTCAGCGCGGAAACAGCAGCGAGTCTTGTCTATTTGTTTTCGACAGATCACAGAAAGTGTGCAAGTGGCTTCCCTGCG  
 ACGCAAGCAATGAAGCAGTGGATGATCAGGCGTCGAGCAGGACAGCTTCCGAGCCAAAGCCCTGCCCTGTCCCCCATGGTCAGCCACACTGGG  
 GTGCCAGGCGGAGATGATCTTACAAGGTTTCCGCGCAGCTTCCACTCGAAACTCGCCTGATCATATGGCTCGGCTGTTGTATACCCACCG  
 GCCACGCCCTTGGATCGCCTCGCAAGCGCGGAAGTGAAGTGGGCGGGAACCCGATGATACGGATTGCGTCCCTCGACAGCAACAGCGGAGG  
 CGAAGATCGATGGCGGGCGTTGTAAGTCTTCAGATGAAGCAGAGGTTCTTGAACCCGGGCTTCAGGCTTCTGATGCGGGAAATCCCTGCT  
 GCTGGCTGCTGCTGCCGCTGTCGGGTGAGGACGAGGCGGAGCGCGGGCGGAGCGCTTCTCTTTGTTGCTATGGTGGCTGAAGAGGCCATGTTGA  
 TGGATCCGGATGCTATGCAATTCATCAAGAGGACATGTCCAATGATGGCGCGCTGCCGCGGAGCTGTGCAAGGTGCGGCCCTAGTGGGCTCTGG  
 TACTTGGATCATCCGAAACATGGAGCTCGTCCCCACTCTGACACGGTGGCGGGTGGGAAAATCAAGGACCCCGTCAAGTAAACGGGTCATGT  
 TTCGCGACGCGGTTGGTCTGGCAAGCAAGTCAACGATCAACATTTGGTCAGAGCACCATGGCGACCCGAATATGATGATGTGTAGGCTGCCAG  
 CACCAGTCAATGGCGGGACTCCACAGCTGACCTTGTCCAGGCTCACAATCAGCCGTTGTTATCGACAATGTGAGCTGCCATTTGATGGCAGGCT  
 GGACACAGCAGGCGCTGATGATATAGGGGCTGCGGACTTCAAGGCTGGCTTCCGCGGCAAGAGCAGCCACCATGTTTCAATCTCTCTGTTGAAG  
 CAGGCTCAGGCGCTTCTGCACTTGAGCTGGCTTACTTGCAGCAGTGTGGACGCGCAAGCACCCTCGCATCATGGCTGGTGCATACAGGACA  
 ACTTGTTCATTTGGCGGAGAGCTCAGGAGCTGCGCGGCTTTTAAAGATCAAGTACCCGATGGAGCAGGAAATCGTTACCAGCTGGGACGACATGG  
 AGAATAATGGGTTGGGTGATGCTGAGGCTTCAAGGCGTGTGCGGAGGAGTGAAGTGCCTCCGCGAACAAGGCTGCAAGGCGAGGCGT  
 AGACGTCAGCACCCGGTGTCTTTCAGAGAAGCGCGCTCAATCCACGCGAAAACCGGATGTGGCCGCGCAAAATTTCT -3'

FIG 3-1 The *adel* gene ORF and upper and lower regions.

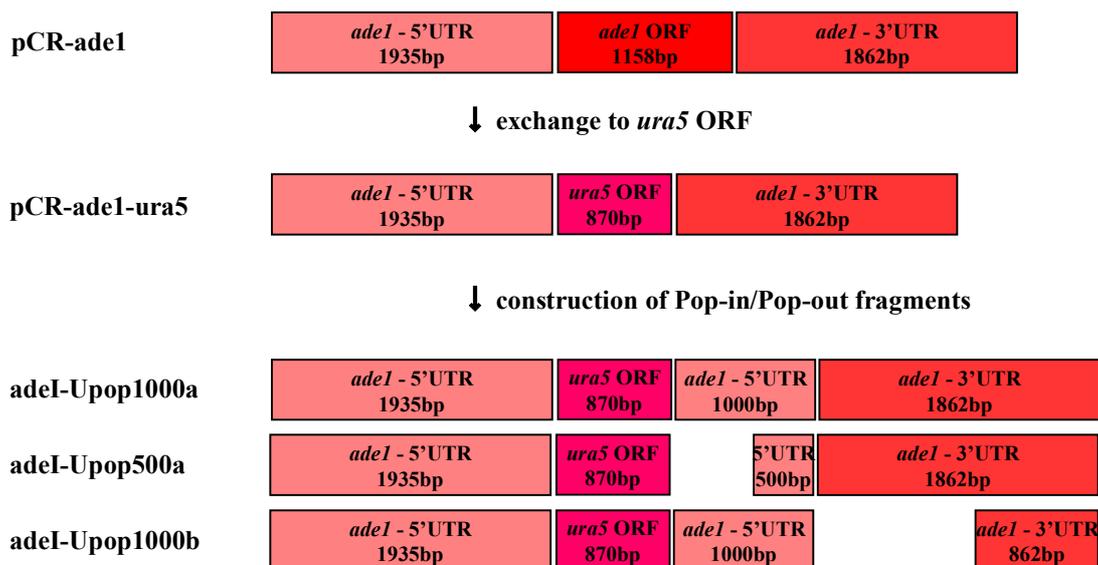


FIG 3-2 Schematic representation of *ade1* gene disruption constructs by Pop-in/Pop-out.

### *ade1* 遺伝子の Pop-in/Pop-out

*Cryptococcus* sp. U-5 株への形質転換は、Masaki *et al.* (1)に記載の方法により行った。前項で作製したプラスミドを制限酵素 *Sbf*I により消化し、直鎖化したプラスミド DNA を用いて、エレクトロポレーション法によって形質転換を行った。

形質転換で得られた形質転換体については、プライマー *ade1*-P2K とプライマー *ade1*-T2K\_R のセットで PCR を行うことで形質転換体への発現カセットの導入を確認した。得られた形質転換体を、YNB+ura 寒天培地及び YNB+ura+ade 寒天培地培地にそれぞれ植菌し、菌体の生育の有無により、各形質転換体の栄養要求性を確認した。

*ade1* 遺伝子破壊後の Pop-out は、以下の手順で行った。形質転換体を 5 ml の YNB+URA 培地で 25°C、48 時間培養した。得られた培養液 0.1ml を 5-FOA 選択培地植菌し 25°C で 1 週間静置培養して、生育コロニーを選抜した。生育したコロニーについては、プライマー *ade1*-P2K とプライマー *ade1*-T2K\_R のセットにより PCR を行うことで Pop-in カセットの Pop-out を確認した。Pop-in/Pop-out コンストラクトが Pop-out された場合、*ade1*-Upop-1000a と *ade1*-Upop-500a については 3797bp、*ade1*-Upop-1000b については 2797bp の PCR 産物が得られる。

得られた Pop-out 株を、YNB+ura 寒天培地及び、YNB+ade 寒天培地、及び 5-FOA 選択プレートにそれぞれ植菌し、菌体の生育を確認した。

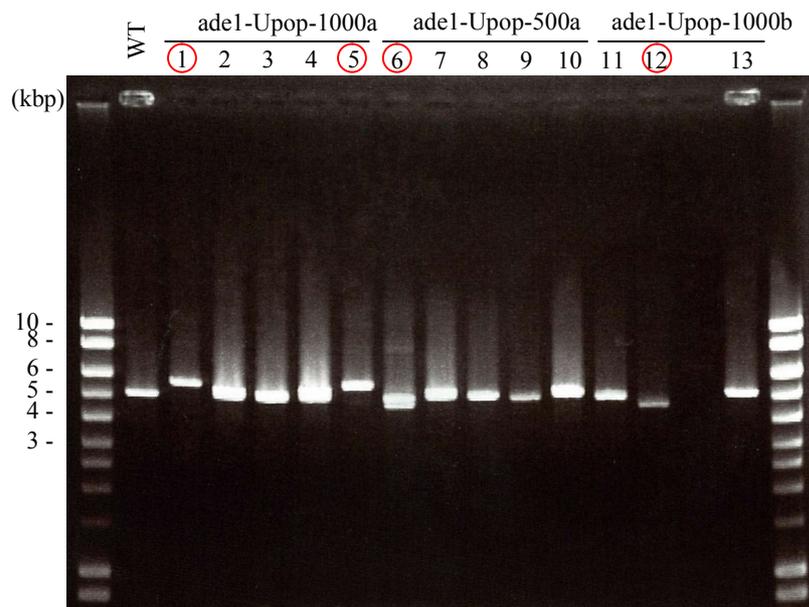
## 【結果】

### *ade1* 遺伝子の Pop-in による破壊

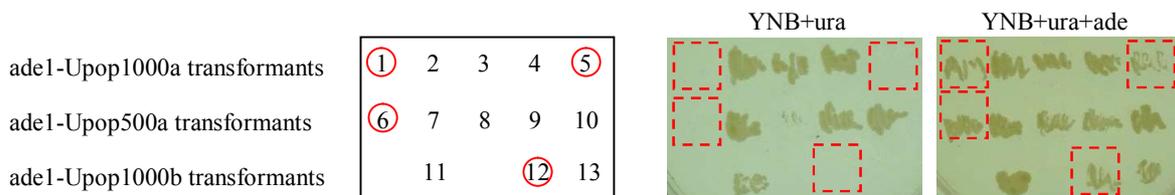
形質転換体の Pop-in/Pop-out カセットの導入は PCR により *ade1* 遺伝子座への導入を確認した。FIG 3-3A に示すように、*ade1*-Upop1000a 形質転換体については、5 株中 2 株が、*ade1*-Upop500a 形質転換体については、5 株中 1 株が、*ade1*-Upop1000b 形質転換体については 3 株中 1 株が、*ade1* 遺伝子座に Pop-in/Pop-out コンストラクトが相同組換えにより導入されていることを確認した。

得られた形質転換体についてアデニン要求性を確認したところ、アデニン非存在下では生育が確認されず、アデニンを添加した培地でのみ生育が確認された(FIG 3-3B)。本結果から、得られた形質転換体は、*ade1* 遺伝子が破壊され、アデニン要求性となっていることが確認された。

A



B



**FIG 3-3 Disruption of *ade1* gene by Pop-in/pop-out constructs.**

(A) Colony direct PCR result. (B) Auxotrophy test of *ade1* gene disrupted mutant by Pop-in. *ade1*-P2K and *ade1*-T2K primers were used for PCR. Pop-in strains were indicated by red color.

### Pop-in カセットの Pop-out

*ade1* 遺伝子座に導入された、Pop-in/Pop-out カセットの Pop-out は(FIG 3-4)に示す原理によって染色体から除去される。すなわち、*ade1* 遺伝子の上流領域と *ura5* 遺伝子の下流にある相同領域(*ade1* 遺伝子の上流領域の一部)が、染色体内部で相同組換えされ、*ura5* マーカーを含む領域が除去される。

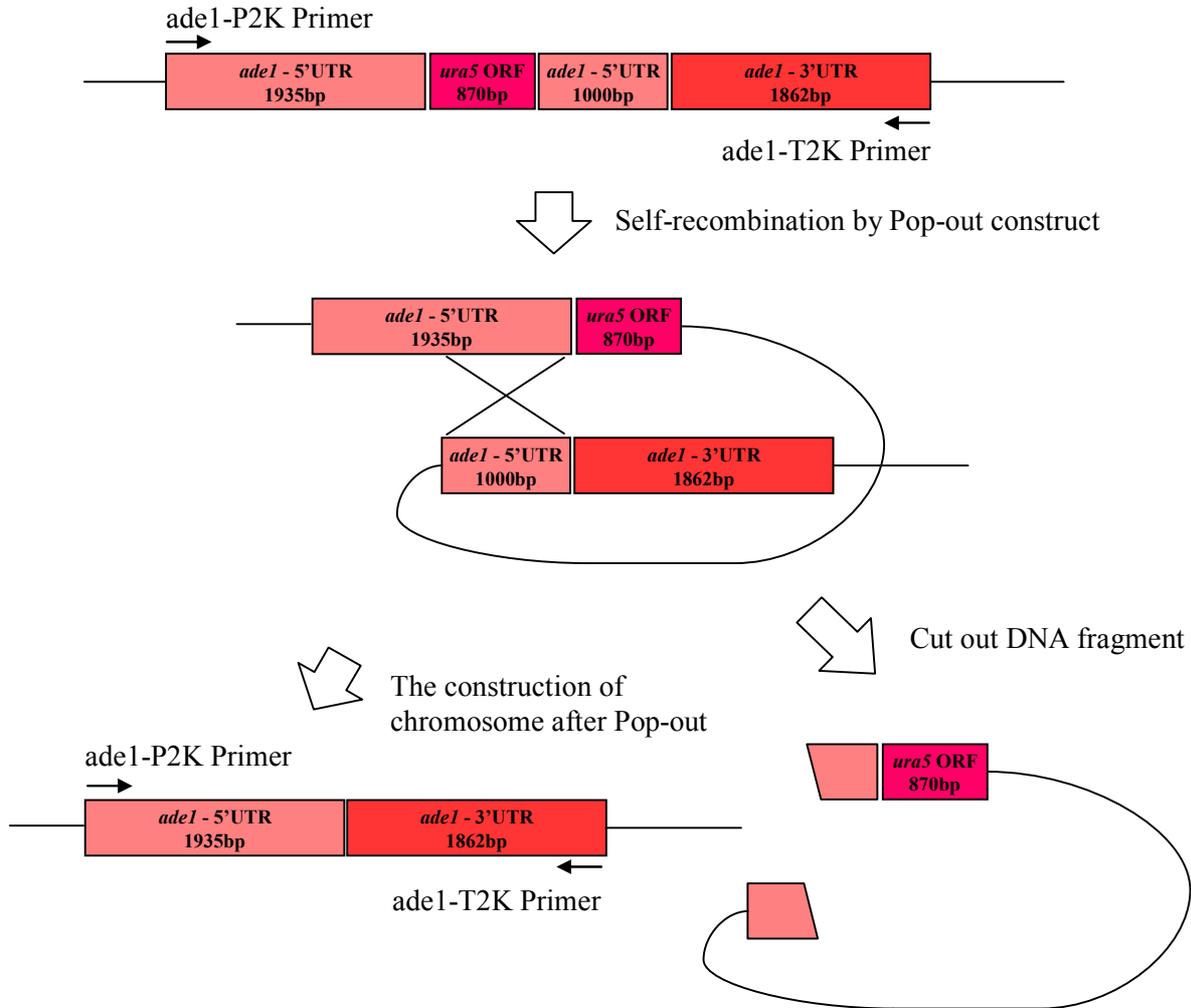
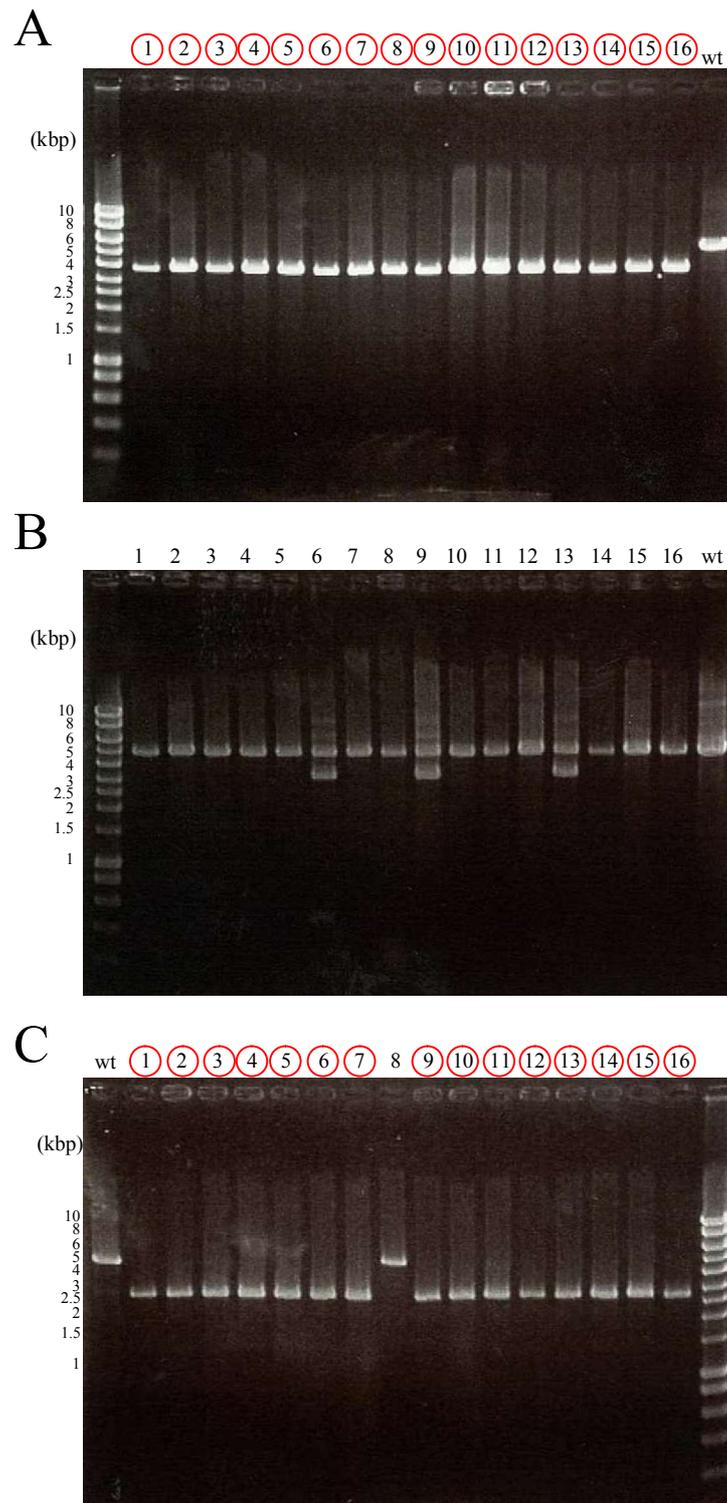


FIG 3-4 Schematic representation of *ura5* marker Pop-out.

染色体内部での相同組換えは、一定の確率で発生すると考えられ、*ura5* 除去された相同組換え体を 5-FOA 含む培地を用いたポジティブスクリーニングにより選抜することで、Pop-out 株が選抜できると考えられる。得られたコロニーについて PCR により Pop-out を確認したところ、*ade1*-Upop-1000a 形質転換体の Pop-out 候補株では、16 株中 16 株が Pop-out されていることが確認された(FIG 3-5A)。*ade1*-Upop-500b 形質転換体の Pop-out 候補株では、16 株中 13 株で野生株と同じ位置にバンドが出現し、3 株からは 2 本

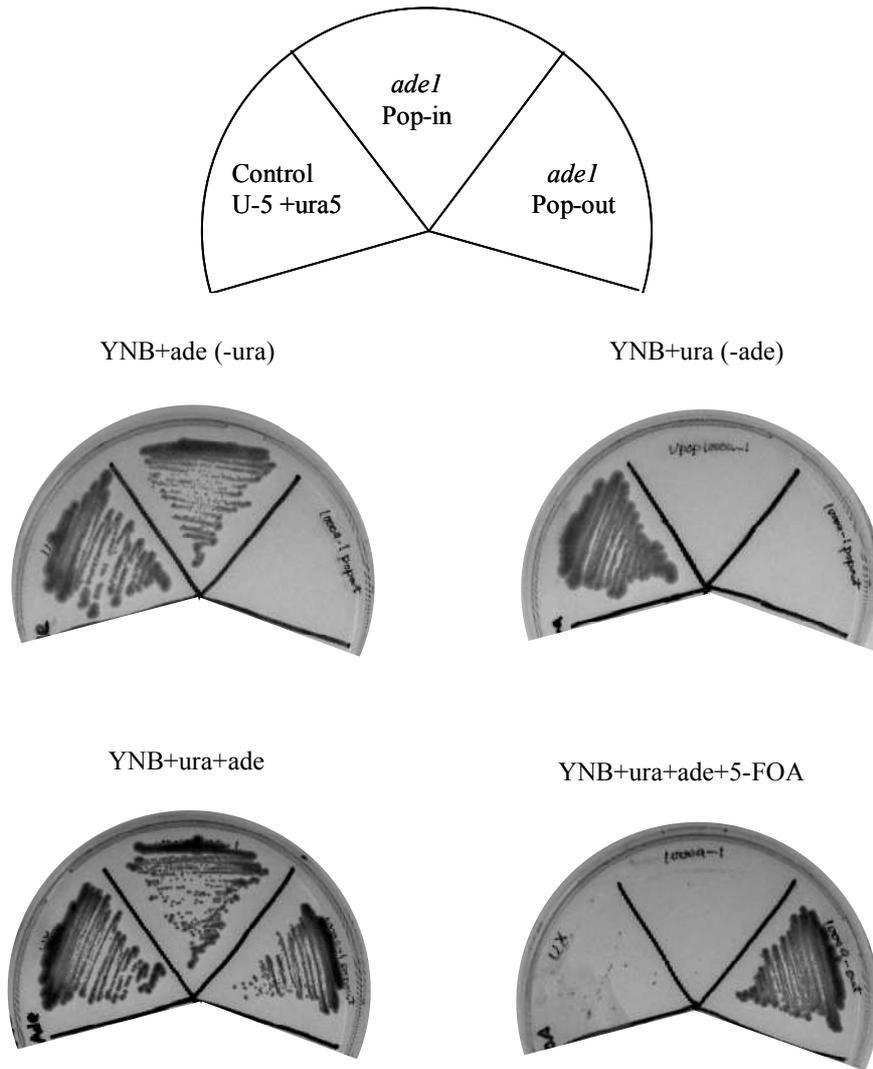
のバンドが出現した(FIG 3-5B)。野生株と同位置にバンドが出現した 13 株については、菌株の純化が不十分であったためか、野生株の U5 株が生育してきたものと考えられる。2 本バンドが出現した 3 株については、*ura5* 遺伝子が一部 Pop-out されているものの、野生株が一部混在していたものと考えられる。*ade1-U<sub>pop</sub>-1000b* 形質転換体の Pop-out 候補株では 16 株中 15 株が Pop-out されていた(FIG 3-5C)。以上のことから、Pop-in/Pop-out コンストラクトの Pop-out のためには、少なくとも 1000 bp の長さの相同配列があれば十分であることが判明した。

さらに、栄養要求性試験の結果から、Pop-out 株では、アデニン要求性に加えて、ウラシル要求性になっていることが確認された(FIG 3-6)。得られた Pop-out 株を A1U5 株とした。



**FIG 3-5 PCR analysis of 5-FOA resistant strains that are candidates of pop-out strains.**

Pop-out efficiency of Ade1-Upop-500a transformed mutant(A), Ade1-Upop-1000a(B), Ade1-Upop-1000b(C) Sixteen mutants grown in 5-FOA medium were selected and checked the *ura5* marker deletion by colony-direct PCR. *ade1-P2K* and *ade1-T2K\_R* primers were used for PCR. Pop-out strains were indicated by red color.



**FIG 3-6 Auxotrophy test of Pop-in/Pop-out mutants.**

Control U-5+*ura5*: U-5 strain (*ura5*<sup>-</sup>) + pCsUX

*ade1* Pop-in: FIG 3-3 (A), No. 1 strain

*ade1* Pop-out: FIG 3-5 (B), No. 1 strain

**【考察】**

本節では、*Cryptococcus* sp. S-2 を宿主とした、組換えマーカーのリサイクル系として、*ura5* マーカーを用いた、Pop-in/Pop-out 手法の検討を行った。

まず、Pop-in による遺伝子破壊については、作製した 3 つのコンストラクト(ade1-Upop1000a, ade1-Upop500a, ade1-Upop1000b)の全てでアデニン要求性株を取得することが出来た。ade1-Upop1000a, ade1-Upop-500a は *ade1* 遺伝子上流 1935bp, 遺伝子下流 1862bp を有しており、また、ade1-Upop1000b は *ade1* 遺伝子上流 1935bp、遺伝子下流を 862bp 含んでおり、ade1-Upop1000b のコンストラクトを用いた場合でも *ade1* 遺伝子座にコンストラクトが挿入された形質転換体が得られたことから、遺伝子の Pop-in には、最低でも 862bp あればターゲティングが可能であると考えられる。

遺伝子の Pop-out については、今回の検討では ade1-Upop500a の形質転換体からは Pop-out 株が取得することが出来なかった。原因については、ade1-Upop500a 株の純化不足が疑われるため、相同配列領域が 500bp で Pop-out することが可能であるかどうかについては、さらに検討が必要である。ade1-Upop1000a 及び ade1-U-pop1000b の形質転換体からは、それぞれ 16 株中 16 株、もしくは 15 株の Pop-out 株が得られたことから、遺伝子相同領域が 1000bp 含まれていれば、遺伝子の Pop-out が可能であることが確認された。

*ade1* 遺伝子については、アデニンの要求性マーカーとしても使用することが可能と考えられ、本研究により、*Cryptococcus* sp. S-2 における組換えマーカーを 1 つから 2 つに増加させることに成功した。

### 第3節 担子菌酵母 *Cryptococcus* sp. S-2 の translation elongation factor 1 $\alpha$ プロモーターの取得と利用

#### 【目的】

前項ではウラシルマーカ―を利用した Pop-in/Pop-out 手法によって、*ade1* 遺伝子を破壊し、マーカ―リサイクル系を構築することに成功し、結果的に遺伝子の多重破壊が可能となった。

一方、目的の遺伝子を強制的に発現させるためには、培養条件に左右されない、恒常的に発現するプロモーターも必要である。*Cryptococcus* sp. S-2 による異種タンパク質の発現では、これまでに取得されている発現プロモーターは、3種類(Xylanase, Cutinase, Amylase)であるが、いずれも炭素源による誘導型プロモーターであり、恒常的に発現するプロモーターは取得されていない。

遺伝子の恒常的な発現プロモーターとして、様々な微生物で Translation elongation factor 1 $\alpha$ (TEF1 $\alpha$ )のプロモーターが使用されている。TEF1 $\alpha$ は様々な生物に存在しており、そのプロモーターは恒常的に、かつ、強力に発現することが知られている。

本節では、*Cryptococcus* sp. S-2 が保有する TEF1 $\alpha$ のプロモーター領域から、恒常的に発現するプロモーターの取得を行った。

#### 【材料】

DNA 操作には、*Escherichia coli* DH5 $\alpha$ を、形質転換の宿主には *Cryptococcus* sp. A1U5 株(*ura5*, *ade1*)を使用した。形質転換体の取得には、YNB(+ura)培地(0.67% Yeast Nitrogen Base w/o Amino Acid, 500 mg/L Uracil, 2.0% D-Glucose )を用いた。また、本節で利用したプライマーの名称及び配列については、Table 3-2 に示した。

**Table 3-2 Primers used in this work.**

Primer name	Sequence
Ade1U1KF	5' - GTTCGGCGGTGTGGACCAGG -3'
Ade1terR	5' - CAGAAGTCAATGCCGCGCGC -3'
CsEF1p_F(Mun)	5' - AAAACAA TTGCTTTGCTGAGGACGGTGACCAGGAGGCCGA -3'
EF1pAde1_fF	5' - GACAGCGCGGCAGTATCAAATGCCCAAGCTCAAGCTGCT -3'
EF1pAde1_fR	5' - AGCAGCTTGAGCTTGGGCATTTTGATACTGCCGCGCTGTC -3'

## 【方法】

### *ade1* 遺伝子のクローニング

まず、前項で作製した *Cryptococcus* sp. S-2 の *ade1* 遺伝子上流約 2kbp と、*ade1* 遺伝子の ORF 領域、及び *ade1* 遺伝子下流約 2kbp を含む、pCR-*ade1* を検討に用いた。プライマー *ade1*U1KF とプライマー *ade1*terR のセットで PCR を行い、*Cryptococcus* sp. S-2 の *ade1* 遺伝子上流 1kbp と、*ade1* 遺伝子の ORF 領域、*ade1* 遺伝子下流 0.3kbp を含む領域を増幅した産物を Target-clone plus(東洋紡社製)にクローニングして、pTade1+1k-0.3k を作製した。

### TEF1 $\alpha$ プロモーターの取得と TEF1 $\alpha$ プロモーターによる *ade1* 遺伝子の発現

TEF1 $\alpha$ のプロモーター領域については、*Cryptococcus* sp. S-2 のゲノムデータから探索し、配列を確認した(FIG 3-7)。TEF1 $\alpha$ のプロモーター領域は、*Cryptococcus* sp. S-2 株のゲノム DNA を鋳型として、プライマー CsEF1p\_F(Mun)と、プライマー EF1pade1\_fR のセットで PCR を行って増幅した *Cryptococcus* sp. S-2 由来 TEF1 $\alpha$ プロモーター配列の PCR 産物と、プライマー EF1pade1\_fF とプライマー *ade1*terR のセットで PCR を行って増幅した *Cryptococcus* sp. S-2 の *ade1* 遺伝子の ORF 領域と *ade1* 遺伝子下流領域 0.3kbp を含む PCR 産物を Fusion-PCR し、得られた産物を Target-clone plus(東洋紡社製)にクローニングして、pTTef1p-*ade1* を作製した(FIG 3-8)。

上述のようにして作製した 3 つのプラスミド(pCR-*ade1*, pTade1+1k-0.3k, pTTef1p-*ade1*)を用いて、*Cryptococcus* sp. S-2 A1U5 株に形質転換を行った。形質転換は Masaki *et al.* (1)に記載の方法により行い、形質転換体の選抜には、YNB(+ura)培地を用いた。

5'-  
 CTTTGC TGAGGACGGTGACCAGGAGGCCGAGTCGTTCCATGGCGCAGGCTGCTCAGTCGGCCGCGGAGTCAAGCGATGCGAGCTCGAGCGCTCC  
 GCGGGAGACGTCTGTCAAGGACAAGGAGGCGCGCAAGGCTGAGAAGGCCGCCGAAAGCTGAGAAGGCAGCGAAGAAGCGGAGAAAGAGGCACG  
 GAGAGCGCCAAAGCCGAGAAGAAGGTCAAGGCGGAAATCGCCGATGCCACTCCGGGCGAGGCCACCGAAGCCGGCCAGTCAAGGAGAAGGAGAA  
 GGAGAAGAAGCGGAGTAAGCGTCAGAAGGAGGAAGGTGTCAGTGAGGAGAAGCCCAAGAAGCGGAAGAGGGAGTAGGGATGTTAGATATCATGCTG  
 CGTCATTGGTGTATGTACGATATACTATAGGCCAAGACCGTGGTTGCCCTCAAGCACAAAGCACTGCGTGGCCAGCCGAGATGCCACATAGAGGTA  
 TTAGCCACGTGGCGTGAAGCCAGGGTGCGGCGAGCTCCGCTTTCCTGGATTTTTTACCCTGCCGACCGGTGAATGAAGGGTCTAGAAGCCCTGA  
 ATGACCGGTGCCACAAGCGAAAAAATGCTAATCCCGAATTCGCCGAAAAGGGTTCTGGAGCAAAATCCAGCCCGCTGCCAAAAGGGTAGAAAATTCA  
 ACGCCCTGGGCCCCTGTTCTCTCCTCCAATCGTCTCTTTATCCTCTAAACAGACACCAATCGTAAGTCACCCATCCCACCCATCAGCGACGATGCCA  
 GGCTCCACAGACCCTCCACAGCTCGGACTTGTGTTGTCGTCGTCATGCGTTTCTGCGCTGTCCGGCGATCACAGGGGCGGCCTTGGC  
 GCAGGTGGCCATCCGGTCATTTTCACATAGTTGCCGCCAGTTGTCCTCCATTCCTCTGTACACTCCTCTCATGGGGCTGACTTCTGCTCCCTGCCA  
 TTTACTTCACGAGCTCTGCTGACAGCGCGGCAGTATCAA -3'

FIG 3-7 TEF1 $\alpha$  promoter region sequence.

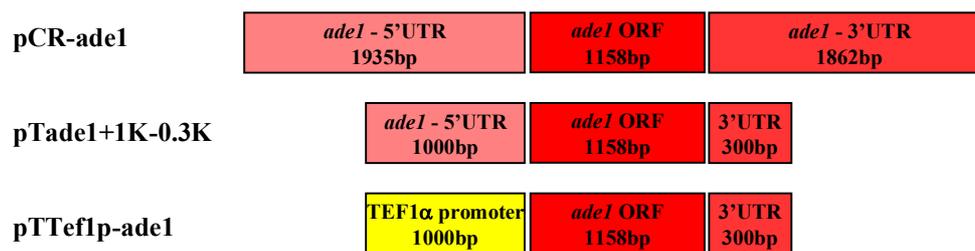


FIG 3-8 Schematic representation of *ade1* markers.

### 【結果】

#### TEF1 $\alpha$ -promoter による *ade1* 遺伝子の発現

形質転換の結果 pCR-ade1 及び、pTTef1p-ade1 を形質転換に用いた場合は、形質転換体を多数取得することができたが、pTade1+1k-0.3k を形質転換に用いた場合は、形質転換体を得ることができなかった。

### 【考察】

本節では、*ade1* 遺伝子を組み換えマーカーとして利用するための発現に必須な領域の確認、及び、恒性発現プロモーターである、TEF1 $\alpha$  promoter の取得、さらに、TEF1 $\alpha$  promoter の利用による *ade1* 遺伝子の発現を検討した。

通常、遺伝子の発現には、遺伝子の上流約 1kbp が関与しているとされており、*ade1* マーカーについてもプロモーター領域を 1kbp まで短くした発現カセットを作製し、形質転換を行ったが、形質転換体は取得することが出来ず、*ade1* の発現には 1kbp 以上のプロモーター領域が必要であると考えられる。一方で、プロモーター領域 2kbp を用いた発現カセットでは、形質転換体を取得することが出来ることから、プロモーター領域としては 2kbp あれば十分と考えられる。

TEF1 $\alpha$ プロモーターは、恒常発現型のプロモーターとして広く微生物での遺伝子発現に利用されている。*Cryptococcus* sp. S-2 のゲノムデータから TEF1 $\alpha$ の領域を推定し、遺伝子上流 1kbp をプロモーター領域として使用し、*ade1* 遺伝子の発現を試みたところ、*ade1* 遺伝子は発現し、形質転換体を得ることが出来た。また、ターミネーター部分については、300bp であっても *ade1* 遺伝子が発現したため、遺伝子の発現終結には 300bp の領域で十分であったと考えられる。

pCR-*ade1* に含まれる *ade1* のマーカー領域は 4955bp と非常に長く、発現ベクターを構築する際にはベクターサイズが非常に大きくなるため扱いにくいマーカーとなっていたが、TEF1 $\alpha$ プロモーターを利用した *ade1* の発現カセットは、2458bp とほぼ半分の大きさに縮小することが出来たため、扱い易いマーカー遺伝子となったと考えられる。

また、TEF1 $\alpha$ プロモーターは YNB+ura 培地上で *ade1* 遺伝子を発現しており、*Cryptococcus* sp. S-2 で通常使用する最小培地でも遺伝子を発現させることが可能であり、恒常的に遺伝子を発現させることが可能と考えられる。

## 第4節 担子菌酵母 *Cryptococcus* sp. S-2 の多糖低生産変異株の取得

### 【目的】

*Cryptococcus* sp. S-2 を始めとする担子菌酵母は、遺伝子組換えによる異種タンパク質生産の宿主として極めて有用であるが、担子菌酵母は、細胞外に多量の多糖類を分泌生産するという問題があった。この細胞外多糖類の生産は、培養液の粘性を上昇させるため、培養液からの菌体除去やタンパク質精製の工程において、分離不良や限界ろ過膜の目詰まりを招きやすく、タンパク質を効率良く精製することが困難である。

そのため、従来、(i)培養液上清を凍結融解して細胞外多糖類を凝集除去する方法や、(ii)培養液上清に冷アセトンを加え細胞外多糖類を凝集させてグラスウールフィルターで除去する方法、(iii)ポリエチレングリコールで細胞外多糖類を凝集沈殿させる方法などが用いられてきた(2)。しかし、これらの方法は、いずれもその操作性及び経済性の観点からスケールアップには不向きであった。方法(i)については、培養液を大規模に凍結させるのは容易でないという問題があり、方法(ii)については、大量のアセトンを投入後、これを留去するのは非効率的であり、安全性に対して特段の配慮が必要になる。さらに、方法(iii)については、ポリエチレングリコールの使用によって、後工程で使用する限外濾過膜の劣化や廃液処理の問題がある。

これらの理由から、細胞外に大量に分泌生産された多糖類を除去することは、操作性、経済性、安全性の観点から困難であり、多糖類の生産を抑えた微生物育種が効果的だと思われる。そこで、本節では、*Cryptococcus* sp. S-2 において、自然変異体から、細胞外多糖の分泌生産抑制される変異株の取得を目的とした。

### 【材料】

変異を導入する親株には、第2節で取得した A1U5 株(*ura5<sup>-</sup>*, *ade1<sup>-</sup>*)を用いた。変異体の生育には YM 培地(0.3% Yeast Extract, 0.3% Malt Extract, 0.5% Peptone, 1.0% D-Glucose), YX 培地(2% Yeast Extract, 5% D-Xylose)を用い、流加培養には Bio Jr.8(エイブル-バイオット社製)を用いた。

## 【方法】

### *Cryptococcus* sp. S-2 株の UV 変異処理

*Cryptococcus* sp. S-2 A1U5 株を 3ml の YM 培地に 1 白金耳植菌し、25°C, 180 rpm で 2 日間振とう培養を行った。次に、培養液を滅菌水で段階希釈し、希釈した培養液 0.1ml を YM 寒天培地に塗布植菌した。この植菌培地を殺菌灯 GL-15(Panasonic 社製)の光源から約 30cm 離れた位置に配置して 10 分間 UV を照射し、25°C で 3 日間静置培養を行った。生育した菌株を植え継ぎ、約 500 株の変異体を得た。

### *Cryptococcus* sp. S-2 株の UV 変異体株の選抜

得られた変異体約 500 株を 3 ml の YX 培地に 1 白金耳植菌し、25°C, 180 rpm で 3 日間振とう培養を行った。培養液上清 0.5 ml に冷エタノール 5 ml を加え、細胞外多糖類を沈殿させ、沈殿物量が親株と比較して低下した菌株を 4 株(D1 株、D9 株、D10 株、D11 株)選抜した。次に、選抜した 4 株及び親株の A1U5 株を炭素源を含まない 100 ml 培養液(5% Yeast extract, 0.1% アデカノール(消泡剤))を含む小型培養槽(Bio Jr.8)に植菌し、25°C, 1000 rpm, 通気量 100 ml/min で 3 日間培養を行った。また、培地には、流加培地(50% Xylose)を培養開始時から 0.3 ml/h/100 ml の速度で連続的に添加した。菌体濃度の測定は、培養液を適宜希釈して U-1900 ratio beam spectrophotometer(日立製作所社製)で 600 nm の吸光度を測定することにより算出した。

### 細胞外多糖類生産量の測定

細胞外多糖の生産量は以下の手順により定量した。培養後の培養液を遠心分離して得た上清 0.5 ml に冷エタノール 5 ml を加え、細胞外多糖類を沈殿させた。遠心分離して得た上清を除去した後、沈殿物を 10 ml の蒸留水で溶解した。溶解液 0.5 ml に 0.5 ml の 5%(w/v)フェノールを加えて混合し、続いて 2.5 ml の 97%濃硫酸を添加した。反応液を室温に冷却後、490 nm における吸光度を測定した。対照として 0-200 mg/L の濃度に調製された D-mannose 溶液で検量線を作成し、溶解液中の糖含量を推定し、培養液中の糖含量を算出した。

## 【結果】

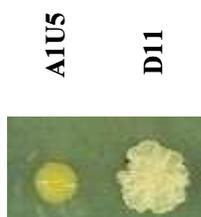
1次スクリーニングで選抜された4株(D1株、D9株、D10株、D11株)については、親株のA1U5株と比較して、流加培養時の細胞外多糖の生産量が大幅に低減されていることが確認された(Table 3-3)。

特に、D11変異株については、親株のA1U5株が細胞外多糖類を4.85 g/L生産しているのに対して、D11株の細胞外多糖類生産量は1.20 g/Lであり、D11株は、親株と比較して大幅に抑制されていた。また、D11株の菌体量は親株とほぼ同等であり、細胞外多糖の生産量は生育に影響を与えなかった。他の3株の変異体については、細胞外多糖類の生産量は低減されているものの、D11株よりもその生産量はやや高い結果となった。また、D10株は、菌体濃度も低く、生育にやや阻害が起こっていると考えられた。

**Table 3-3 Poly-saccharide production of mutants.**

strains	extracellular polysaccharide production (g/L)	Cell density (OD <sub>660</sub> )
A1U5	4.85	129.1
D1-mutant	1.60	136.5
D9-mutant	1.67	153.0
D10-mutant	1.89	72.1
D11-mutant	1.20	124.6

D11株については、寒天培地上でのコロニーの形状についても親株のA1U5株と大きく異なっており、乾燥したコロニーを形成していた(FIG 3-9)。



**FIG 3-9 Observation of colony form..**

A1U5 strain and D11 strain were inoculated on the YM agar plate culture and incubated at 25°C for 3 days.

**【考察】**

本節では、UV による変異によって、細胞外多糖類の生産量を低減させた変異体を取得することを目的として検討を行った。UV 変異処理は、菌株の育種に古来より幅広く使用されてきた方法であり、多くの場合、染色体DNAに点変異が導入されるとされている。*Cryptococcus* sp. S-2 は今回の条件では約10分間のUV照射によってほぼ100%の菌が死滅することを確認しており、生存率は1%未満である。

得られた変異体については、コロニーの形状が親株と比較して乾燥した、しわの多いコロニーを形成しており、細胞外多糖の生産が形成するコロニーの形状にも影響を与えていると考えられる。

取得した変異体500株のうち、4株の多糖低生産変異体を取得できたことから、多糖の生産に関与する遺伝子は比較的変異が入り易いものと考えられ、また、多糖低生産変異体でも生育への影響はほとんど無いと考えられることから、細胞外多糖の生産は、生育にはほとんど関係しないと考えられる。

細胞外多糖の生産にかかわる遺伝子の取得についても試みたが、現在のところ遺伝子の特定には至っておらず、今後変異遺伝子の特定を行う予定である。

最終的に取得されたD11変異株については、生育及び異種タンパク質の生産性についてもほとんど影響を与えないことを確認しており、産業利用において有用な宿主を取得することができたものとする。

## 第5節 担子菌酵母 *Cryptococcus* sp. S-2 の相同組換えに関する *ku70* 遺伝子破壊株の取得と効果

### 【目的】

*Cryptococcus* sp. S-2 株に外来遺伝子、若しくは、*Cryptococcus* sp. S-2 由来の遺伝子を導入した場合、*Cryptococcus* sp. S-2 株の染色体上にランダムに遺伝子が導入されることが知られており、ターゲットとする位置に外来遺伝子を導入することは非常に困難である(1)。*Cryptococcus* sp. S-2 株において相同組換え効率が低い原因は、外来遺伝子の導入時に、非相同末端結合(Non-Homologous End Joining)が起こっているためと考えられ、*Cryptococcus* sp. S-2 株には非相同組換え機構が備わっていると考えられる。

真核生物において、二本鎖 DNA の切断が修復される過程で働く非相同末端結合機構は、*ku70-ku80* ヘテロダイマー、DNA リガーゼ IV-Xrcc4 複合体を介して進行することが報告されており(5)、*ku* 遺伝子変異体において、ターゲッティング頻度が向上することが、アカパンカビ *Neurospora crassa*(6)、コウジカビ *Aspergillus oryzae*, *Aspergillus sojae*(7)などの真核生物において報告されている。

さらに、*Cryptococcus* sp. S-2 と同じく、担子菌酵母に分類される *Cryptococcus neoformans* において、遺伝子の相同組換え効率が非常に低いが、*ku* 遺伝子の破壊により、遺伝子の相同組換え効率が飛躍的に向上したことが示されている(8)。

本節では、*Cryptococcus* sp. S-2 について、*ku70* 遺伝子の破壊、および、*ku70* 破壊株を用いた *ade1* または、キシラナーゼ遺伝子(*xy11*)破壊における相同組換え効率を調べた。

### 【材料】

DNA 操作には、*Escherichia coli* DH5 $\alpha$  を、形質転換の宿主には前節で育種した *Cryptococcus* sp. D-11 株(*ura5<sup>-</sup>*, *ade1<sup>-</sup>*)を使用した。形質転換体の取得には、YNB(-ura)培地(0.67% Yeast Nitrogen Base w/o Amino Acid, 0.078% -Ura DO Supplement, 2.0% D-Glucose)を用い、遺伝子の Pop-out による、ウラシル要求性株の選抜には、5-FOA 選択培地(0.67% Yeast Nitrogen Base w/o Amino Acid, 0.078% -Ura DO Supplement, 500 mg/L Uracil, 0.2% 5-FOA, 2% D-Glucose)を用いた。また、本節で利用したプライマーの名称及び配列については、Table 3-4 に示した。

Table 3-4 Primers used in this work.

Primer name	Sequence
Ku70U2kF(SbfI)	5'- AACCTGCAGGACGTCCAT ACCTGCATCCGCGTTAGCAAAC -3'
Ku70U2kR(SbfI)	5'- AACCTGCAGGGCCTGTCTGTAAAGCAAGAATGGTGAGCC -3'
Ku70popF(EcoRI)	5'- CGGGGAGTCCGACCATAGCCACCACGATCT -3'
Ku70D2kR(EcoRI)	5'- TGTCTCAAACGGGATCCTCGGACGGGCCA -3'
Ku70popfF	5'- CCATTC'TTGCTTTAACAGACAGGCTCGAGCTTGTACATGGATGCACAT -3'
Ku70popfR	5'- ATGTGCATCCATGTACAAGCTCGAGCCTGTCTGTAAAGCAAGAATGG -3'
CsKu70coloP_F	5'- AAAACTGACCTCCGATCAATCGTGCTATTT -3'
CsKu70coloP_R	5'- GAGGTGAGCACAAGTAAGCAAGACAAAGT -3'
XylU2kF	5'- ACCAGGTGCAGTACGGGCCAT -3'
XylD1kR	5'- TGTGTGCGCTTGCATCGGAACA -3'
XylUpper1kR	5'- TTTACAGCTGCTCCTCGAATCGTAGATCCG -3'
XylteriF(SbfMun)	5'- CCTGCAGGCAATTGACGCTCAGGAATGGGCTGTTCAGCTTGTA -3'
Ade1_R(MunI)	5'- AAAACAA TTGCTAGGCGGCGAACTTGCCCA -3'
XylUpperF	5'- CGGATCTACGATTCGAGGAGCAGCTGTAAA -3'
pCsUX_R	5'- TTTGTCGGACGACTCAGGTACTCGG -3'

## 【方法】

***ku70* 遺伝子 Pop-in/Pop-out コンストラクトの作製**

非相同末端結合機構に関与する *ku70* 遺伝子の破壊を行うため、pCsURA5をベースとして、*ku70* 遺伝子の Pop-in/Pop-out コンストラクトを作製した。*ku70* 遺伝子を FIG 3-10 に示す。まず、*Cryptococcus* sp. S-2 のゲノム DNA を鋳型として、プライマー-Ku70U2kF(SbfI)とプライマー-Ku70U2kR(SbfI)のセットで PCR を行い、*ku70* 遺伝子の ORF の上流約 2kbp を増幅し、*SbfI* で制限酵素処理した後、同じく *SbfI* 処理した pCsURA5 に挿入して、pCsU-Ku70U2K を作製した。

次に、*Cryptococcus* sp. S-2 のゲノム DNA を鋳型として、プライマー-Ku70popF(EcoRI)とプライマー-Ku70D2kR(EcoRI)のセットで PCR を行い、*ku70* 遺伝子の ORF の上流約 1kbp を増幅した産物と、プライマー-Ku70popfF とプライマー-Ku70popfR のセットで PCR を行い *ku70* 遺伝子の ORF の下流約 2kbp を増幅した産物を Fusion-PCR によって融合させ、*EcoRI* で制限酵素処理した後、同じく *EcoRI* で処理した pCsU-Ku70U2K に挿入して、pCsKu70Upop を作製した (FIG 3-11)。

5' -

```

ACGTCCATACATCGCATCCGCGTTAGCAAACTCGTACATCCCGACGTGCAGAACTCACCTCAAGAGGCCCGCCCGGATGTTCTTCTGATGAGC
TCGGGGAGCGCCTTTGCATACTCCCATCTCTTTGGGCTGAGGTCGATATCGCCGCAATCTTGCCCTCGACGTTGACTCTCGCCGTGCCG
CTGAGGTAGATGCTTCGGGCTTGAGGTGCAGGTTTCATGAGTAGAATGCGATTTCGACTCTGGAGGTACGAGTCGATACGGTGCAGGCTACCTGC
TGCCCGACGTTTCAGGATACGGCAGAACAACTCTGGGCTCTGTGATGGTCTGGTAAACTTTTTCTGACGCTCGATCCGCTTGCGGAAGTCGGCC
TCAGCCTCTCTGTGACATGCCGCGTAGTCCGGTCCGCTGAGCGCGCTTTGAGAGCGATGTTGGCTGCATAACAGCTGGGTCGTCGACGATC
GACTCGAGGTACAGCAGTTGAAGTCTGGCTCTGCGCCACCCGATGCCGATCTTGTCTCTGCCAAAGTCAGTCCCGAACCTTATCGTCCAGCA
GTACTCCGCGGCAAGCCAGGCATCGAAAACCTGACCTCCGATCAATCGTGTATTTGTCGCGCTGGTTCATCAGCTTCTCCGTACGAACTCAGT
GCTCTTGAACCCCAATGACCTGCTGCTTCTGCTTACGCAAGTATCAATGCTTCCAGACTTTCATTCGCCAGTTTTTCTCTCTGCT
TGTCGCTTGTCTGACAGTGAAGAACTGCGCCGAGTGGTGGCCCTTGCCCTGCTCTGACGTCAGTCAAGTCCGCGGGTTCGCTATGACCTC
GAGTCAAAGCCTTACGCTGCTGCGCAGCTCTGGCTTTTGTATCGCTCAGCTGGCGCAGATTGAAACCTCGACGTTGACTCGAGCCAAACGGAGA
TACCCGATFGACCGGTCAGGCTGACATCTGCCGCTGCGGGGAGTCCGACCATAGCCACCACGATCTTGGCTTCAGAGATTAACCGAGCTTCG
ACTACGACATCGTCAGCCGAGGATGCTCTGTACCGCGGCAACAACGTAACCTGACCGACTGTGCCAATCTCTGATACTGATGGCCGCTGCTGGA
CACCTTGGCGTCTGCTGATGACCTTGGTAGTATCATCCAGCCTTCCGACGCTGCGTGGTGGTTCAGCTGTGCTTCGACAGGTTTCGTCGCGGCTC
CTCAGTCCGCAAGGACAAGAGTGGGCTGACGAAGCTAGAGGACCCTGTAGCTGCCGCGGACCTACAGTCCAGTCTGGGCTCCGAGTCCGAGCTTCG
TTCCAGGTACACTTCCCGGGCTCCCGAAGCATCTATCGCAGCCTCATAGTGGGAATGCCGGCGGCTTCGGCTGCTCGCACCGCTAGGTGCAG
CGCTGGGCGGATACCTACCGACGGGCTGGTGGCGACCCAGCCTGTGGGCTCTTGGTTCATCGCAGGCTGTCAGCTTGGAGATCGCGTCCCGGA
GACCTGCTGGTTCGACCGGGGAGGCTGATCTCGGCCATGAGCGAATGGCGGCAATAGGCTTGTTCGATAGTGCAGGGGGGCTGGCTTGGGCT
GTGTAGCCGTAGAGGACGAGGGCGGCGGGCGCTGGCCCTCTTGGGCTCTTTCGGTGGAGGCATCGACATGTTGCGGATCGAGTCTGACCAAG
AAGCACCTTCACTTGACACTGCAAAATGGGAAATGGTTCAGAACACAGGATTTCTGAGACGAGGCAAGCCGTTGAGCGCGGCAAGGGCGAGATGATT
GCCCGCAGGACAAGGGAGATAGCCGGCTTATTAGCGGGCTCACGGAATAAATACACGTCAGATCCGACAGAGAGGGGCCCTTGTGTTGACGGG
TTGACGGTCTGATCATGTTCCAGTCACTTCTGACCTCCAGAAAGGGCTACCATTCTGCTTTAACAGACAGG
    
```

>ORF

```

ATGAGCTCGTACTACGGAGACAAGGGAAGAGATGTGCCAAGCTGGGAGAGCTTTGAGGCGCAGGATGACGACGATGTCGTCGACCGTTCCGAGGTTG
AGCGCTATCGGGGCGCTGAACTTCAGTCACTCCGTTGCTAATGCCAATCGAAGTACCGGTACCGCAACAAGGATCACATCTTGTCTGATCGATGCGT
CTTTGTCGATGACAGACCTCGGCCAGATAGGTCGAATCTTGAAGGTGTGATCAAGGGTCGGAGCGCCCTGCATAGGTTGAGGTTTCGGGCTG
GTTTCTCAAGAGCAAGGTCACTACCGGTCGAGCGACAGCCTCGCGCTGCTGCTCTACAATGTCGACGTCGAGCTGACGTTACGTTATGTTAT
CGCTCTGACACCCCGACGATCAGTCAAGCCCGGAGCTCTGGCTCTCCAAGTACAACCCGGCACCTACGTGCACACCGCTGCGGCTGCTG
AACCGGGAGGAGATCAAGAAGACGATCAAGCTCGTCGAGGACGTCGACGAGTATGCGCGCTTGGCTGACGATGACGAGACGAGCAGCTGAG
GTCCTGCGGACACCCTTTCGCCGCTGTGCCAAGAAGGAAGAGCTCAACGTGCTGACGTCGCTGGTCACTGCAACTCTCTCTTTCGGGACGACGGG
ACCAAGCTGGCCGGCAACAAGCGCTGTCTTAGTGACGGACAACGACGATCTCTGGGAGTAGTACAAATCGTGTCCGGCACGTACAGTCTAT
GGCGATTTGCTCAGCTACGGAATCACCATCAACAGCTTCTTCTCATGATCGGCCAAACCCACTTCAAACCCGACCTTATCTGGAACGCTCAGTCT
TCCCGACCGAAGGAGTGTGCTTGGCAGCTTTTCTGATGTTGTACGGTCTGACGACTACAGGATATATTTGAACAGAGAGGAAGGGCGAGGTTGGC
CCGCGGACGACGGAACCGGACGAGGACGGTCTCGATCACTCGTGAATATGAGGACCTCGTCACTTTCGTAATGCGCTTAAGCGCAAGCAGT
TCACCAATCTTCTGCTTCCGGCGCAAGGACGGGACATTTGCTCATCGGTTGACGCGGTTGAGACAGGGCGATGGCCCTTCGATGACTAGTGGCTCA
TCTACAGCTTCCGATGATTCGAAGCAGACCAGGGCCAGCCGAGTACGTCGCGATGCGGGGTCAAACGGTGAAGAAGTCTCACAGAACGCTG
AGTACACTTCGGCGAGACTGGCGCACGCTACGACCGGAAGAGATCAGCCGGCTACCAATTTGGTTCACAGCTCCACCATTCAAATACGCTCG
AGCCCAATTTGGTGGGAGACCGGGGACGATCTTGGCGAGCAGCAGATGGTCTCGGACGAAAGCGGTCGGGCTGGAGACAGGTCGGCTGCGAGG
ACGAGGGCAAGATCTCGATCTTAAAGCTAGAGAAGGAGTTCGGTAAGCCATCAAGGACGTCAAAGGCTTACTACTGGCGCCGACAGGATA
AGATGACGGCTAAGACGAGGTTGAGTCAAAGCTTGTACAGCTATGTTATCTGATACTGAGGTCAGGTCGAAATTTTCGCCCGACGAGATCTGCA
GTTCAAATCGATGGGTCTGCCAACACGTCAGTGGGATACGTTGTTGAGCAGCCCGCTGACCCGAACAGAGATCAAAGATTTCTGGGTTCCAATCAC
CACATGCTCAAGTTTGAAGGAGAACATCAAGCATTCTGACTTTATCTATCCGACGAGGACGTCGATCTACGACAGGCGAGTGGCGCGAGCT
GATGGACCAACTTATACCGGTCGACGAGACATTTGCGCGCTGCTGGAAGTCTGTTTGAACCTCAAGCGCATGGCTGGCGTTGCGGCTTACGAT
CCGCGCAACTCGACCGCGGAGTTCGCGCTTGTATCCCTCAGGAAGAGAGCTTTACCAAGGAAGGAGGGCAAGAGGATGCGCCAGGCTTTACG
GATTAATCTGCTTTTCGGGACGATATGCGGACGCGCTCGGGTCTGACCGACAACCTACTAGGTGAGTGCACTCGAATCAGGTCATCAAAC
GGCTGACGACTCGCAGCAACCGAGCAGCAGGCCAAGCTGATGAGCAACGTTGGTCAAGCGGCTGAGGTTTCGCTGCGGGCAGGTACCCGCTCAGACG
TTACCCCAACTCCGGGCAAGTCCCAGAACGCCAGAGCACTATCGCGACGCTGACATCCGGCAGCTCTGGCGTTCACCTACGCTCAGTTGCAATCA
CTAGCCTTTGAGGAGGACTTTGATCCCGCAGGCGACAGACCGACTCGACCGCAGCTTGCAGAACCCAGGGATGCAAGAGCCGCTGGGATG
TTCATGACAGGATGGACAGGAGTATCTCAGGAGGACGAGCGGGTCAAGCGGACATTTGGCTTGGTGCAGGCAAGAAGGGCAACAAAGCCACAG
ACGGCGCCGCGCAGTGTATCTGGATGCGAGCATCTGGCAGATCTGGTGGGAATGTACAAGGCCGCGCAGCTAGACAGGTTGGCCGCCCTCAAG
CACAGCAACGGGATCATGTTGACATGCAAGGCAAGGTTGGCCGACTGAGGAGTCTCTCGGTTCCACAGTGAAGTCGCCCGGACTACGCT
CGGTTGGTGAAGTGCACGCTGACATATGACAGCTTCTCGCTTGGCGGAGCAGCAAGAAGGCCGCGCATCATCGAGGCTCTCACGCCGATCTCGAG
AAATGGCAATGGCCCGGCAAGAAGACAAGAGCATTTGA
    
```

```

TCGAGCTTGTACATGGATGCACATGCCCATTGCCATAGACGCTTGTACAGTATGCATAGACACTTAACGACTTGAAGTACTGACTGGCACTTGAAC
TTGCTTGTCTACTTGTGCTCGACCTCCCTGTTCTGAGCGAGGATCTCGATCCAGTAGCCTGCGGGCGTCAGCCAGGGCGCATGTGCTTGTTCAGG
CAGGACTCACCGTCAGGTCGTAGATGAAAGCGATGTGTCACGGAACGTCAGCACTCGGGCTTTGGCGCTCGTTGATCACTCACCTCATGCGGC
CGTCTCGGGCTCTTCTGAACTTGAAGCCTCTCGTTCGAAAGCGCAACCGCCGCTCGAGGTTGTCGACCGTATGGCGATGTTGGCCGAAAC
CGCGGTGAGGCTCTCTGTTGCTGAAACGTAGCCCTTGAACCTCGGGTCCGACTTACAAGCGTTCGCTCAGCCCATGTTGTAATACGCGCTG
GGCGCGTAGAGACGACCAAGTCCGCTGGTTCCAGCAGAGCTCGAGAAGCCCTGCTTGTGCAACATGACCTTGCCCATCTCTCTCTGACATGT
CCTTGTGCGCAACTCGGAGGCGTAGGCGAGGAAGTAGTTGGTGAAGTCCGACCGGACGACTCGCGGAACTTCAACAGGGCGCTCAGCCGGGT
TCACCCGTAGGACAAAAGTACCCAGGACATACCTTATGCGGAGGACGTTCTCGTAGAACGGGATCGAAGCCTTGGGCTTCTGATCTGAGAGCA
TGAGCGATAGTCCGGATGCTGCAAGGCTGCTACCTAAGCATGGTGTGGTTGAACCTTGTAGGTAGCGGGGAAGACTGGTGGACGACATCTGT
ATAGTCTTGCATGTTGTTTCAAGCGGACAGCTGGGGCTGTTAATCAAGCGGACGAGCTTCTTTTTGTAAGACTCACTGGCAGTCTTTTGGAG
GGTCTCGTTGCGAGAGATGACATGACTGTTGTAATAGCAACGATCCGGTACTGCTTCTGCTAAATACAGCTTGTACAGCAGACTCATGCATGC
CCAGCGTTCGAGGCTATGTCGCTGATGTCGAGTGGAGTGAACGACTTCCGCTCGGAGTTGGCCGATACGGCGCTTCGGCGATCTCGG
GGGATTTGGGTTCTGGCGCAGTGGATGAGGGATATTTGACAGCAGGCGGCGAGGTTATCTGCTTACCATTCAATCTCTTACCATGAACTCGT
CTCATCTGGCAGCTGCCAATGTCGAGATGCTTACAATCTGGCTGAACTCAATGGCAACCCGGTCTGCTGCTGCGCCAGCAGTGCAGGCGGA
GACTCGGTCCCGCTCAAAGTCCCGGCAAAAGCCGATTCGAGCGAGGACGATGTCGAGCTCATGGACTGCTTGGCTGCGGCTGAGGCGTGAAGCG
GGAGCGAGACCCCATGTCCTTCCGAACTTGCATCGTGTGAGAAAGGCCATCCAGGGTCTGAGGACGTAAGTCCAACCTGCGACTCTCTTGGTGA
GCGCTGACAGCTTTGAGCTCGCGCGGAAAAGGCCAAAAGTTCGCTGAGTTCTACGAACTCGCAAACTCGCAGATCGAAGACCTGCTCAAGCCGCT
ATCGACCTTGTGCGCCGAGGGCAACAAGAGGCCAAAAGATAATGCTCTCAAGGTCAGATCGCGGTCACCTCAGCTTCTCTTCAACTGCGCTTT
GGCTGCTGACAGCTATATGCGCAATCAGCAGCGGCTCGCTCGCGCTTTCGCCAGTTGACATTGACGCTGGTGAAGTTCCTTCTGGTCTGCT
GTGCTTCTGCTGACGGGTCAGTGTGTAAGCCCATTTGGTTAAGGACCTTCTTTCTTTTGGCTGCTGACCCGCGCAGTTGACCCGCTGGCCAAAC
TGATCTGTGGCTCGCCACCGGGCTCCAGTCCGGCAGAGGAAAAAATGGCCGTCGAGGATCCCGTTTTGAGACA -3'
    
```

FIG 3-10 *ku70* gene ORF and upper and lower region sequences.

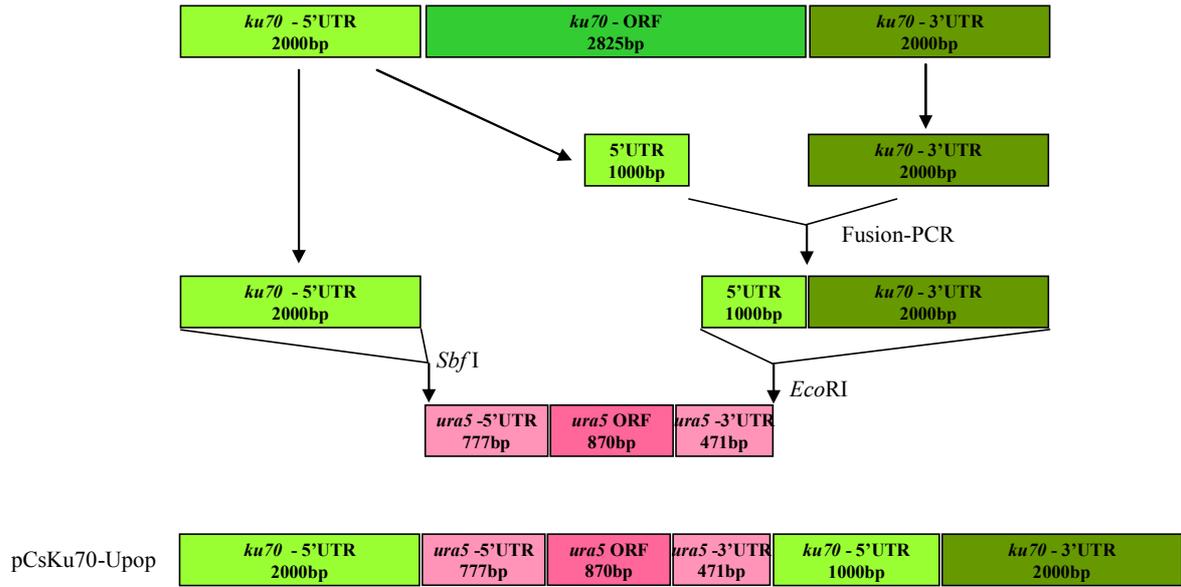


FIG 3-11 Schematic representation of *ku70* gene Pop-in/Pop-out cassette construction.

### ***ku70* 遺伝子の Pop-in/Pop-out**

*ku70* の Pop-in/Pop-out を行う組換え宿主としては、本章の第4節で取得した、*Cryptococcus* sp. S-2. D11 株(*ura5<sup>-</sup>*, *ade1<sup>-</sup>*)を使用した。pCsKu70Upop を用いた D11 株の形質転換は、Masaki *et al.* (1)に記載の方法により行い、形質転換体の選抜は YNB-ura 培地を用いた。また、形質転換には、pCsKu70Upop を制限酵素 *Sbf1* により消化し、直鎖化したプラスミド DNA を用いた。得られた形質転換体については、*ku70* 遺伝子座への相同組み換えを確認するため、プライマーCsKu70coloP\_F とプライマーCsKu70coloP\_R のセットでコロニーPCRを行い、*ku70* 遺伝子座への Pop-in カセットの導入を確認した。

Pop-in/Pop-out カセットの Pop-out は以下の手順により行った。形質転換体を 5 ml の YNB+URA 培地で 25°C、48 時間培養し、得られた培養液 0.1 ml を 5-FOA 選択培地植菌し 25°C で 1 週間静置培養して、生育コロニーを選抜した。生育したコロニーについては、プライマーCsKu70coloP\_F とプライマーCsKu70coloP\_R のセットでコロニーPCRを行い、Pop-in カセットの Pop-out を確認した。得られた *ku70* 遺伝子の Pop-out 株を DK191 株と命名した。

### ***ku70* 遺伝子破壊株の *ade1* 遺伝子座へのターゲッティング率(相同組換えの頻度)の検討**

続いて、*ku70* 遺伝子の破壊株 DK191 株を用いて、*ade1* 遺伝子の破壊効率を調べた。*ura5* 遺伝子をマーカーとした *ade1* 遺伝子破壊カセットを有する pCR-*ade1* を制限酵素 *Sbf1* にて直鎖状にし、DK191 株の形質転換を行った (FIG 3-13 A)。対照として、*ku70* 遺伝子が破壊されていない D11 株も同様に形質転換を行った。形質転換は Masaki *et al.* (1)に記載の方法により行い、形質転換体の選抜には、アデニン欠損合成培地を用いた。得られた形質転換体の確認は、プライマーade1P2k\_F とプライマーade1T2k\_R のセットでコロニーPCRを行うことによって確認した。

### ***ku70* 遺伝子の *xy11* 遺伝子座へのターゲッティング率(相同組換えの頻度)の検討**

*ade1* をターゲットとした検討では、遺伝子座の相同配列部分として上流 2kbp と下流 2kbp を使用したため、相同配列部分が長く、*ku70* 遺伝子が機能している D11 株でもターゲッティング率は 31%と比較的高い値となった。そこで *ku70* 遺伝子破壊の効果をさらに厳格な条件下で確認するため、相同配列部分が短いコンストラクトを用いて、ターゲッティング率の検証を行った。また、ターゲットには、*Cryptococcus* sp. S-2 での

高発現が確認されているキシラナーゼをコードする *xyII* を対象とした。

まず、*Cryptococcus* sp. S-2 のゲノム DNA を鋳型として、プライマー XylU2kF とプライマー XylD1kR のセットで PCR を行い、キシラナーゼ遺伝子上流 2kbp と ORF、及び下流 1kbp を含む領域を増幅し、Target clone plus(東洋紡社製)を用いて TA-cloning を行い、pT-XylU2K-ORF-D1K を作製した。次に、pT-XylU2K-ORF-D1K を鋳型として、プライマー XylUpper1kiR とプライマー XylteriF(SbfMun)のセットで Inverse-PCR を行い、キシラナーゼ遺伝子上流約 1kbp と *xyII* 遺伝子の ORF 部分を除去した pT-XylUp1K-D1K を作製した。

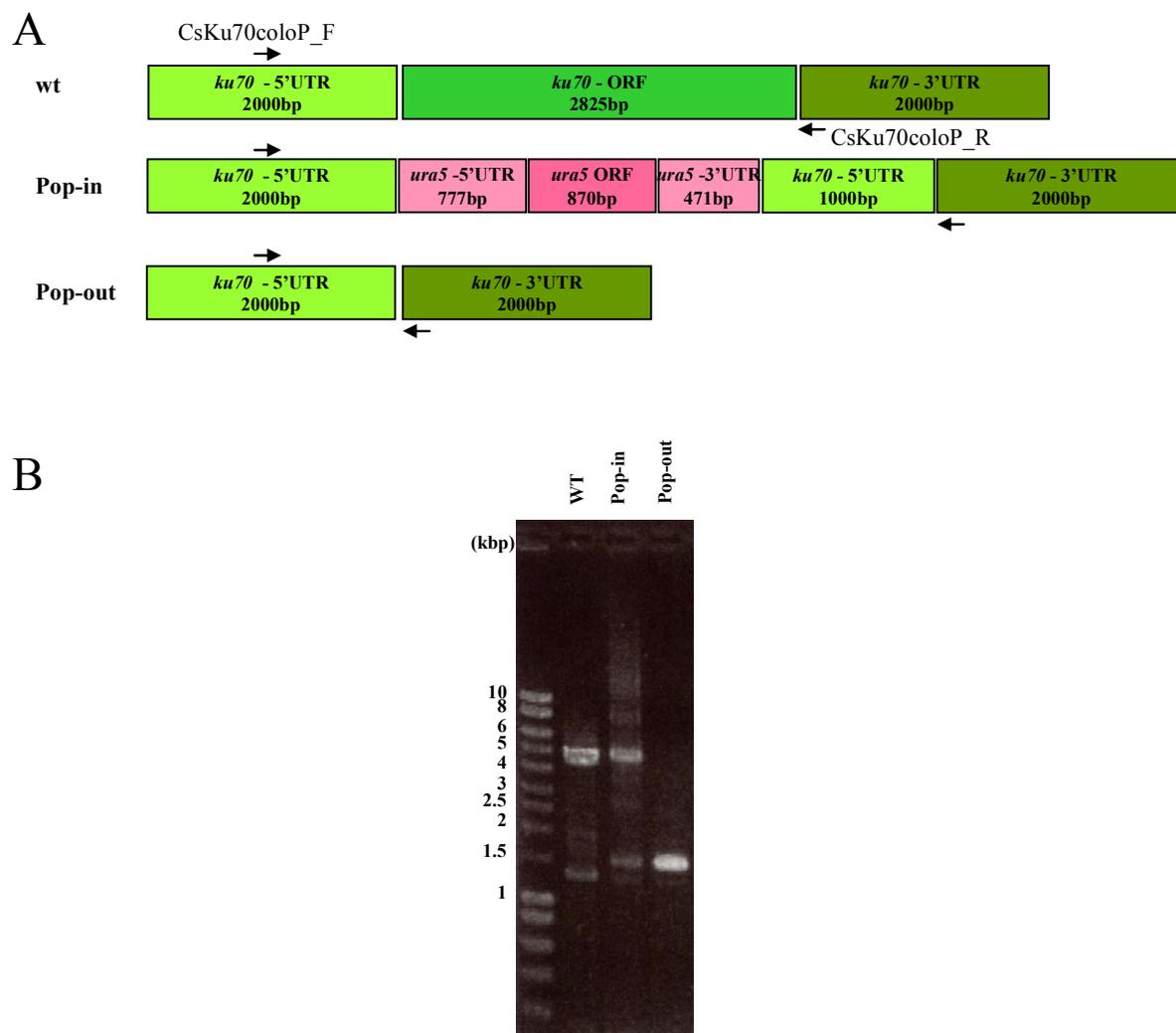
次に、第 2 節で作製した、pTTef1p-*ade1* を鋳型として、プライマー CsEF1p\_F(Mun)とプライマー *ade1\_R*(MunI)のセットにより PCR を行い、Tef1 プロモーターと *ade1* の ORF を含む領域を増幅し、制限酵素 *MunI* で処理した。その後、同じく *MunI* で処理した pT-XylUp1K-D1K に導入し、pTXylpdelA を作製した (FIG 3-14 A)。

形質転換は *Masaki et al.* (1)に記載の方法により行い、形質転換体の選抜には、アデニン欠損合成培地を用いた。得られた形質転換体の確認は、プライマー XylUpperF とプライマー pCsUX\_R のセットでコロニー PCR を行うことによって確認した。

**【結果】**

***ku70* の破壊**

*ku70* 遺伝子の破壊は、本章の第2節で構築した Pop-in/Pop-out 法によって行い、*ku70* 遺伝子が Pop-out された形質転換体を取得することに成功した(FIG 3-12)。得られた形質転換体は、その生育などに影響はないことが確認され、*ku70* 遺伝子は *Cryptococcus* sp. S-2 において必須遺伝子ではないと考えられる。



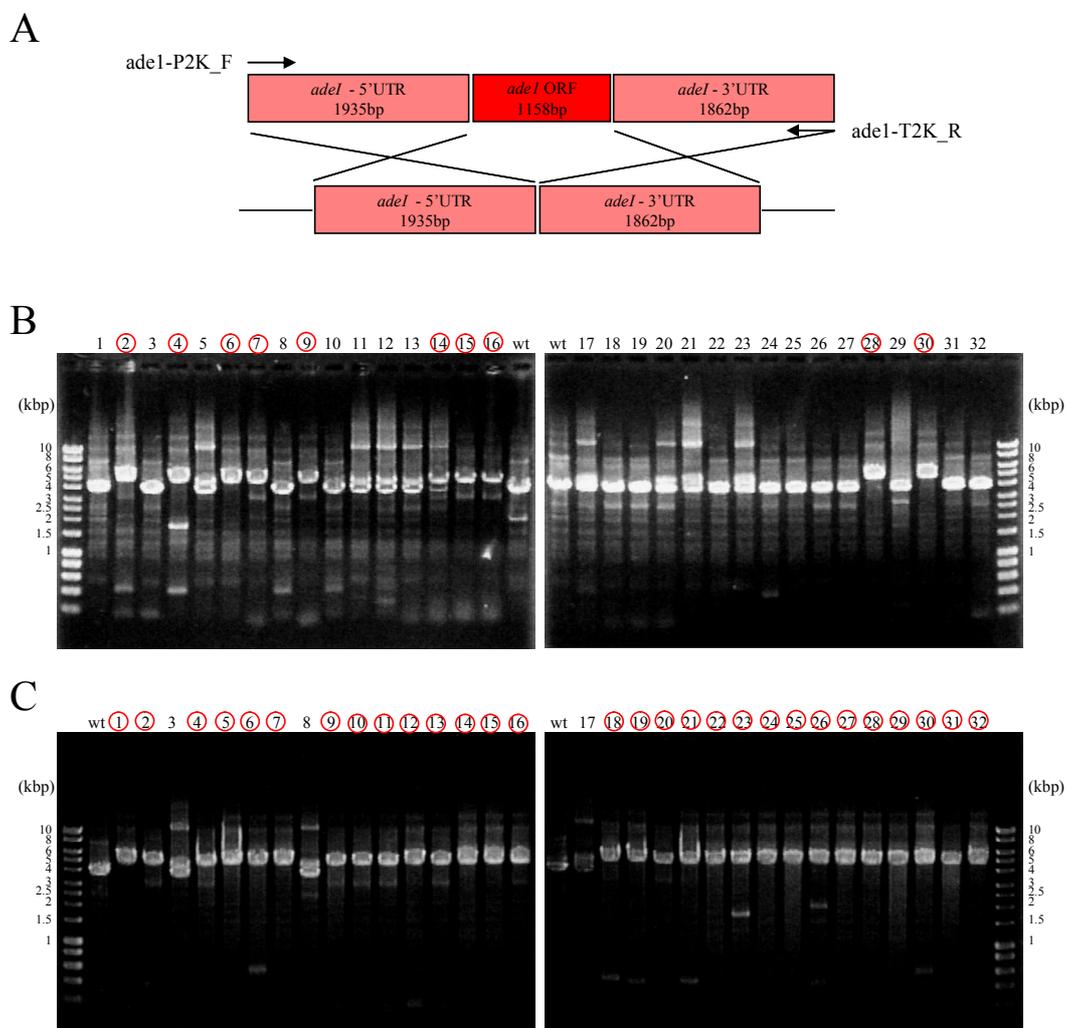
**FIG 3-12 Disruption of *ku70* gene by Pop-in/Pop-out construct and *ura5* marker Pop-out.**

(A) Schematic representation of *ku70* gene Pop-in/Pop-out disruption.

(B) Colony direct PCR result CsKu70coloP\_F and CsKu70coloP\_R primers were used for PCR.

### ターゲティング効率の確認

まず、*ade1* 遺伝子をターゲットとした相同組換えでは *ade1* 遺伝子上流及び下流約 2kbp を相同配列として利用し、相同組換え効率の検証を行った(FIG 3-13 A)。得られた形質転換体 32 株について相同組換えの確認を行った。結果、D11 株を宿主とした場合は、32 株中 10 株で *ade1* 遺伝子座に相同組換えで DNA が導入されたことが確認され、ターゲティング率は 31%であった(FIG 3-13 B)。それに対して、DK191 株を宿主とした場合は、32 株中 29 株で *ade1* 遺伝子座に相同組換えで DNA が導入されたことが確認され、ターゲティング率は 91%であった(FIG 3-13 C)。この結果から、*ku70* 遺伝子の破壊により、ターゲティング率は 3.4 倍向上したことが明らかとなった。



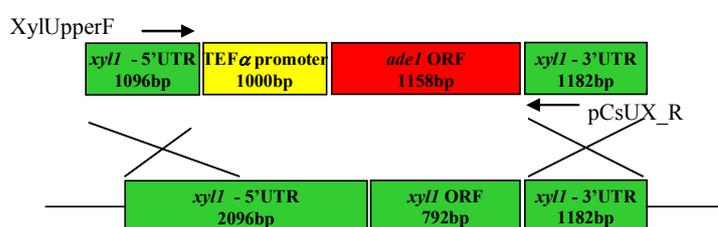
**FIG 3-13** *ade1* targeting efficiency.

(A) Schematic representation of *ade1* gene targeting reversion.

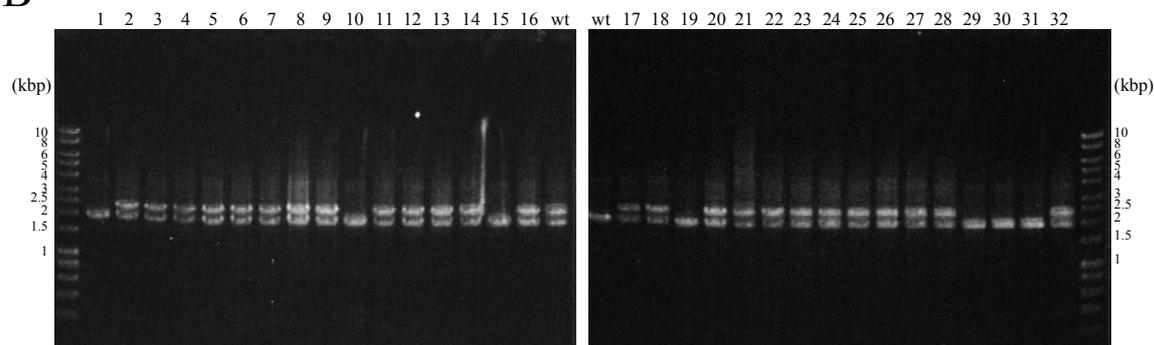
(B) 32 transformants grown in YNB(+ura) medium were selected and checked the *ade1* gene targeting as host D11(A), and DK191(B). *ade1*-P2K\_F and *ade1*-T2K\_R primers were used for PCR.

次に、*xy11* 遺伝子をターゲットとした相同組換えでは、*xy11* 遺伝子の上流 2kbp から 1kbp の間の 1kbp の領域と、*xy11* 遺伝子の下流 1kbp の領域を相同配列として利用し、相同組換え効率の検証を行った (FIG 3-14 A)。得られた形質転換体 32 株について確認を行ったところ、D11 株を宿主とした場合は、32 株の全てで *xy11* 遺伝子座に二重相同組換えで DNA が導入された株は全く取得できなかった (FIG 3-14 B)。それに対して、*ku* 破壊株である DK191 株を宿主とした場合は、32 株中 22 株で *xy11* 遺伝子座に二重相同組換えで DNA が導入されたことが確認され、ターゲティング率は、69%であった (FIG 3-14 C)。この結果から、*ku70* 遺伝子の破壊により、ターゲティング率は飛躍的に向上していることが明らかとなった。

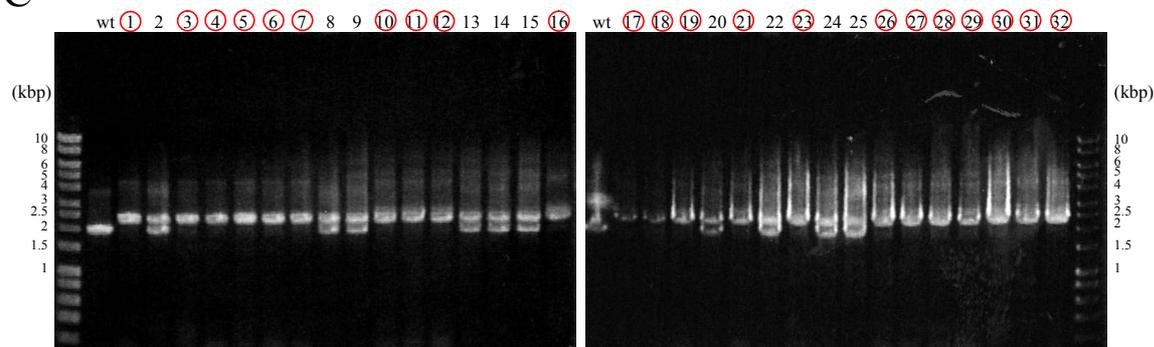
A



B



C



**FIG 3-14** *xy11* gene targeting efficiency.

(A) Schematic representation of *xy11* gene targeting disruption by *ade1* marker.

(B) 32 transformants grown in YNB(+ura) medium were selected and checked the *ade1* gene targeting as host D11(A), adn DK191(B). XylUpper\_F and pCsUX\_R primers were used for PCR.

Table 3-5 に、本節で検討した遺伝子破壊の結果を示す。

**Table 3-5 Influence of the targeting efficiency by disruption of *ku70* gene in *Cryptococcus* sp. S-2.**

Target		Result	Targetting efficiency (%)
<i>adel</i>	D11	10/32	31
	$\Delta ku70$	29/32	91
<i>xyl1</i>	D11	0/32	0
	$\Delta ku70$	22/32	69

### 【考察】

本節では、相同組換え効率に関与する遺伝子である *ku70* について、その遺伝子破壊及び破壊による相同組換え効率向上の効果を確認した。

*ku70* 遺伝子の破壊は、先に構築した Pop-in/Pop-out 法を適用し、マーカー遺伝子をリサイクルしてかつ、*ku70* 遺伝子を破壊することに成功した。

*ku70* 遺伝子破壊株を用いた相同組換え効率の検証では、*ade1* 遺伝子の破壊では、相同領域を 2kbp とした場合、相同組換え効率は 31%から 91%に向上した。キシラナーゼ遺伝子の破壊では、相同領域を 1kbp とした場合には 0%から 69%に向上することを確認した。

以上の結果から、*ku70* 遺伝子が遺伝子の相同組換えに関与しており、*ku70* 遺伝子の破壊により、*Cryptococcus* sp. S-2 における遺伝子のターゲティングが容易になることが明らかとなった。本結果により、*Cryptococcus* sp. S-2 における遺伝子操作が簡便となり、研究開発を飛躍的に向上させることが可能になると考えられる。

## 第6節 結論

本章では、*Cryptococcus* sp. S-2 を産業的に利用しやすく、また、研究対象として利用しやすい宿主とするため、宿主ベクター系の改良及び育種を行った。

第2節では、ウラシルマーカ―を利用した Pop-in/Pop-out によるマーカ―リサイクル系を構築することによって、遺伝子の多重破壊を可能とし、さらに、マーカ―遺伝子として利用するための *ade1* 遺伝子の破壊を行った。

第3節では、第2節で作製した *ade1* マーカ―をより利用しやすいマーカ―とするため、恒常的に発現する TEF1 $\alpha$ プロモーターを取得し、*ade1* 遺伝子の発現に利用することで、*ade1* マーカ―のサイズを 4955bp から 2458bp までほぼ半分の長さに短縮することに成功した。

第4節では、*Cryptococcus* sp. S-2 が培養中に多量に生産する細胞外多糖類の生産量を低減させるため、UV 変異による育種を行い、細胞外多糖類の分泌生産量を 4.85 g/L から 1.20 g/L に低減した変異体を取得するに至った。本変異株は大規模スケールでの産業利用に非常に有用な菌株となった。

第5節では、*Cryptococcus* sp. S-2 の遺伝子操作を容易にするために、遺伝子の相同組換えに関与する *ku70* 遺伝子の破壊を試みた。*ku70* 遺伝子は Pop-in/Pop-out によって破壊することに成功し、また、*ku70* 遺伝子の破壊によって、遺伝子の相同組換え効率が大幅に向上することを確認した。

以上の結果から、*Cryptococcus* sp. S-2 の遺伝子操作技術を改良して、研究対象として利用しやすい宿主ベクター系を構築し、また、産業的にも利用しやすい宿主を育種することに成功した。

## 引用文献

1. Masaki K, Tsuchioka H, Hirano T, Kato M, Ikeda H, Iefuji H (2012) Construction of a new recombinant protein expression system in the basidiomycetous yeast *Cryptococcus* sp. strain S-2 and enhancement of the production of a cutinase-like enzyme. *Appl Microbiol Biotechnol* **93**:1627-1636.
2. 微生物の分類と同定 (財団法人東京大学出版社) P92-93.
3. Boeke JD, Trueheart J, Natsoulis G, Fink GR. (1987) 5-Fluoroorotic acid as a selective agent in yeast molecular genetics. *Methods Enzymol* **154**:164-175.
4. Soderholm J, Bevis BJ, Glick BS. (2001) Vector for pop-in/pop-out gene replacement in *Pichia pastoris*. *Biotechniques* **31**:306-310.
5. Walker JR, Corpina RA, Goldberg J. (2001) Structure of the Ku heterodimer bound to DNA and its implications for double-strand break repair. *Nature* **412**:607-614.
6. Ninomiya Y, Suzuki K, Ishii C, Inoue H (2004) Highly efficient gene replacements in *Neurospora* strains deficient for nonhomologous end-joining. *PNAS* **101**:12248–12252.
7. Tadashi Takahashi, Tsutomu Masuda, Yasuji Koyama (2006) Enhanced gene targeting frequency in *ku70* and *ku80* disruption mutants of *Aspergillus sojae* and *Aspergillus oryzae* *Mol Gen Genet* **275**: 460-470.
8. Goins CL, Gerik KJ, Lodge JK. (2006) Improvements to gene deletion in the fungal pathogen *Cryptococcus neoformans*: absence of Ku proteins increases homologous recombination, and co-transformation of independent DNA molecules allows rapid complementation of deletion phenotypes. *Fungal Genet Biol* **43**:531-44.

## 総括

本研究では、担子菌酵母 *Cryptococcus* sp. S-2 を宿主として用い、臨床検査診断に用いる酵素の組換え発現について検討し、*Cryptococcus* sp. S-2 における異種タンパク質発現の基盤技術を構築すると共に、宿主を改良し、産業上利用しやすく、また、研究開発の対象として非常に扱い易い宿主ベクター系の開発を行うことができた。

第 1 章においては、西洋ワサビペルオキシダーゼを対象として、*Cryptococcus* sp. S-2 による異種タンパク質発現を検討した。その結果、「コドン最適化」が高発現に大きな効果を示した。コドン最適化と高発現の関係を調べると、コドンの最適化により、遺伝子配列中に潜在的に存在するポリ A 付加シグナルが除去されることが明らかとなった。また、分泌シグナル配列を宿主由来のキシラナーゼのものに置換し、HRP の C 末端に存在する液胞滞留シグナルを除去することで、HRP の分泌経路が最適化され、分泌生産効率が向上することを確認した。さらに HRP の生産性を向上させるため、キシロースを連続的に添加する流加培養によって、HRP の生産量はさらに向上し、その生産量はおよそ 110 mg/L に達した。本章で示した HRP の組換え発現量は過去に試みられた大腸菌 *Escherichia coli* やメタノール資化性酵母 *Pichia pastoris* での報告をはるかに超えるものであり、*Cryptococcus* sp. S-2 が異種タンパク質の発現において非常に優れていることが示された。

第 2 章では、FAD 依存型グルコースデヒドロゲナーゼ(FAD-GDH)を対象として、実用性の高い変異酵素の取得と、FAD-GDH の組換え発現を検討した。自己血糖測定装置において利用される FAD-GDH には高い基質特異性と共に、高い安定性が求められており、麹菌 *Aspergillus oryzae* 由来の FAD-GDH に G163R+V551C の 2 箇所部位特異的変異を加えることにより、FAD-GDH の耐熱性を大幅に向上させることに成功した。そのアミノ酸置換変異型 FAD-GDH は *A. oryzae* を宿主として組換え発現させた場合、N 型糖鎖の修飾によって、さらに耐熱性が向上することを確認した。このようにして得られた FAD-GDH は第 1 章と同じく、「コドン最適化」と「シグナル配列置換」とさらに「キシロース流加培養」によって、*Cryptococcus* sp. S-2 により、高レベルで FAD-GDH を組換え発現可能であることを確認した。他の FAD-GDH についても *Cryptococcus* sp. S-2 による発現を検討した。キシロースへの作用性が低い、ケカビ *Mucor hiemalis* 由来 FAD-GDH についても「コドン最適化」と「シグナル配列置換」「キシロース流加培養」によって *Cryptococcus* sp. S-2 で組換え発現可能であることを確認し、*Cryptococcus* sp. S-2 が様々な

臨床検査用酵素の組換え発現に適していることを示した。

第3章では、*Cryptococcus* sp. S-2 をさらなる有用な異種タンパク質発現系として利用するため、宿主ベクター系の改良と、産業利用しやすい宿主の育種を行った。宿主ベクター系の改良では、Pop-in/Pop-out法を用いて、*ade1* 遺伝子の破壊を行い、ツールとしての栄養要求性マーカーを追加した。さらに、*ade1* マーカーをより扱い易いものとするため、TEF1 $\alpha$ プロモーターを利用することで、マーカーカセットの短縮を行った。同じくPop-in/Pop-out法によって、遺伝子組換えに関与する*ku70* 遺伝子を破壊することで、DNAの相同組換え効率を向上させることにも成功した。これらの宿主ベクター系の改良により、遺伝子破壊が容易になり、分子生物学的解析も非常に簡便になったものと考えられる。また、*Cryptococcus* sp. S-2 を産業的に利用しやすい宿主とするために、*Cryptococcus* sp. S-2 が細胞外に多量に分泌生産する多糖を減少させた低生産株をUV変異により取得した。これにより、酵素の精製プロセスを簡略化することが可能となる。

以上に示すように、本研究によって、臨床検査用酵素を *Cryptococcus* sp. S-2 を用いて組換え発現させるための基盤技術を構築し、宿主ベクター系の整備、産業利用可能な宿主の取得が達せられたと考えられる。現在、本研究成果をもとに異種組換え発現系の製品化開発にも取り組んでいる。本宿主ベクター系を用いた臨床検査用酵素の組換え発現については、経済産業省から遺伝子組換え微生物の第二種使用許可を頂いている。これにより、*Cryptococcus* sp. S-2 の組換え菌の産業利用が可能となり、本技術の実用化がなされることが期待される。

*Cryptococcus* sp. S-2 の宿主ベクター系は、今後もさまざまな臨床検査用酵素の組換え発現に適用することが可能である。今後さらに研究開発を進め、医療の現場において活用される臨床検査用酵素を開発していきたい。

## 謝辞

本研究をまとめるにあたり、終始ご懇篤なるご指導と御教鞭を賜りました広島大学大学院生物圏科学研究科 客員准教授 兼 独立行政法人酒類総合研究所醸造技術応用研究部門 主任研究員 正木和夫 先生に心から感謝の意を表します。

また、有益なご助言とご指導をいただきました、愛媛大学農学部 客員教授 家藤治幸 先生、独立行政法人酒類総合研究所醸造技術応用研究部門 部門長 山田修 先生、東洋紡株式会社バイオケミカル事業部 事業部長 曾我部敦 氏、東洋紡株式会社敦賀バイオ研究所 所長 服部静夫 氏、東洋紡株式会社敦賀バイオ研究所バイオケミカルグループ グループリーダー 岸本高英 氏、東洋紡株式会社敦賀バイオ研究所バイオケミカルグループ チームリーダー 相場洋志 氏、現 摂南大学理工学部 生命科学科 教授 西矢芳昭 先生に心より感謝いたします。

本研究の遂行にあたり、多大なるご指導とご教示を賜りました 現 実践女子大学 生活科学部 秋田修 教授、現 岩手大学 農学部 教授 下飯仁 先生、独立行政法人酒類総合研究所 醸造技術基盤研究部門 副部門長 兼 広島大学大学院先端物質科学研究科 客員准教授 岩下和裕 先生に深く感謝致します。

本研究の共同研究者として実験に協力頂きました、現 東洋紡株式会社 バイオケミカル事業部 北林雅夫 博士、東洋紡株式会社 敦賀バイオ研究所 松本弘嵩 氏、西井祐子さん、小林沙夜香さん、北林清子さん、小松智恵さんに深く感謝致します。

本研究に際し惜しめないご協力および有用な御助言をいただきました、独立行政法人酒類総合研究所 醸造技術応用研究部門並びに、東洋紡株式会社 敦賀バイオ研究所の諸兄姉に感謝の意を表します。