

大豆ペプチドによる酵母指数増殖期での膜たん白質生産性増強効果

伊藤圭祐*・疋田 礼・河原崎泰昌

静岡県立大学食品栄養科学部

Effect of Soy Peptides on the Recombinant Protein Production in Yeast

Keisuke ITO*, Aya HIKIDA and Yasuaki KAWARASAKI

School of Food and Nutritional Sciences, University of Shizuoka, Shizuoka 422-8526

ABSTRACT

Eukaryotic membrane proteins are involved in a wide range of biological functions. For successful analysis, a large amount of receptor protein production is necessary. Although the yeast expression system is a useful tool for expression of heterologous proteins including receptors, the robust cell wall presents an obstacle to extracting proteins from the cell. Therefore, harvesting the protein in the exponential growth phase of the yeast, in which a cell has a comparatively thin cell wall, is an important factor for the protein yield. In this study, production of eight G protein-coupled receptors was compared using two types of media, one of which contained soy peptides and the other contained a free amino acids mixture. Yeast cell growth was improved in the media with the soy peptides, and the expression levels of six of the receptors were increased during the exponential phase by an average of 2.3 times over the free amino acids-based media. The enhancement of protein expression by soy peptides is explained by an alleviation of metabolite stress from amino acid source depletion caused by heterologous protein expression. These results suggest that soy peptides are useful for microorganism-mediated protein production. *Soy Protein Research, Japan* **15**, 156-159, 2012.

Key words : soy peptides, *Saccharomyces cerevisiae*, protein expression, exponential growth phase, membrane protein

膜たん白質は細胞の物質輸送やシグナル伝達等を担う生命活動の必須分子であり、X線結晶構造解析や抗体作製等の解析には、活性を有する膜たん白質の大量

調製が必要となる。しかしほとんどの膜たん白質は天然試料中の存在量が少ないことから、高収量な組換えたん白質生産法の開発は重要な課題である。

酵母*Saccharomyces cerevisiae*は取り扱いが容易であり、真核生物由来のたん白質を活性型で発現しやす

*〒422-8526 静岡市駿河区谷田52-1

いことから、膜たん白質の生産宿主として広く用いられている。しかし、堅い細胞壁により膜画分の抽出が困難であるという問題点もある。酵母の細胞壁は定常期において強度が増すことが報告されており¹⁾、実際に我々が検討した条件においても定常期の細胞は指数増殖期の細胞と比較して1/3程度の破碎効率であった²⁾。後の膜画分の抽出効率も考慮した膜たん白質の生産には、比較的細胞壁の薄い指数増殖期における生産量が重要である。指数増殖期の細胞は活発に増殖しており、それに伴いたん白質も盛んに合成されている。そのため組換えたん白質の生産ステージとして適しているが、たん白質合成によりアミノ酸源が大量に消費されることで、細胞内は高度な栄養要求状態にあると考えられた。そこで本研究では、ヒトにおいてアミノ酸よりも優れた吸収特性を示す大豆ペプチドを培養基材として用い、酵母指数増殖期における組換え膜たん白質生産性の増強効果を検討した²⁾。

方 法

酵母の生育解析

膜たん白質生産宿主として *S. cerevisiae* BY2777 株 (*MATa, prb1-1122, prc1-407, pep4-3, ura3-52, leu2, trp1*) を用い、大豆ペプチド (SP) 培地と、同等組成の遊離アミノ酸 (FAA) 培地での生育を解析した。各培地は2%大豆ペプチド (Hinute-AM, 不二製油社製) もしくはアミノ酸混合物, 2%グルコース, 0.67% Yeast Nitrogen Base, 100 mMリン酸ナトリウム緩衝液 (pH 6.0) を含む。酵母の培養は小型振盪培養装置 (TVS062CA, Advantec社製) を用いて各培地中でのOD660値を経時的に測定し、指数増殖期の比増殖速度から算出した世代時間を生育の指標とした。酵母ペプチドトランスポーター (Ptr2) 欠損株としては BY4742-Ptr2Δ株 (*MATa, his3Δ1, leu2Δ0, lys2Δ0, ura3Δ0*) を用いた。

組換え膜たん白質の生産

発現ベクターとして pRS426 GAL1_GFP を用いて、8種のモデル膜たん白質の生産を解析した。このベクターは GAL1 プロモーター下流の遺伝子発現をガラクトースにより強力に誘導することが可能であり、C末端に GFP が融合した組換えたん白質が発現する³⁾。グルコースの代わりに2%ガラクトースを含む培地を組換え、たん白質発現生産用培地として用いた。

組換え膜たん白質の発現は、膜画分の SDS-PAGE 後、ゲル中の GFP 蛍光を検出することにより解析した。生産量は蛍光光度計 (Versa Fluor, Bio-Rad社製) を用いて励起波長490 nm、蛍光波長510 nmでの酵母細胞懸濁液の蛍光強度から見積もった。

結果と考察

大豆ペプチドが酵母の生育に及ぼす影響

糖源をガラクトースとした場合の世代時間はグルコースと比較して2倍に延び、膜たん白質の発現によりさらに生育が阻害された (Fig. 1)。これは組換えたん白質を発現することにより細胞が受けるストレスを示している。この各発現株における組換えたん白質発現ストレス (膜たん白質発現プラスミド保有株の世代時間/空プラスミド保有株の世代時間) は培地中のアミノ酸源の違いに影響されなかったが、SP培地での世代時間は全発現株で同様に FAA 培地の 0.8倍であり、生育改善効果がみとめられた。これは特に膜たん白質発現条件において世代時間の顕著な短縮となった。

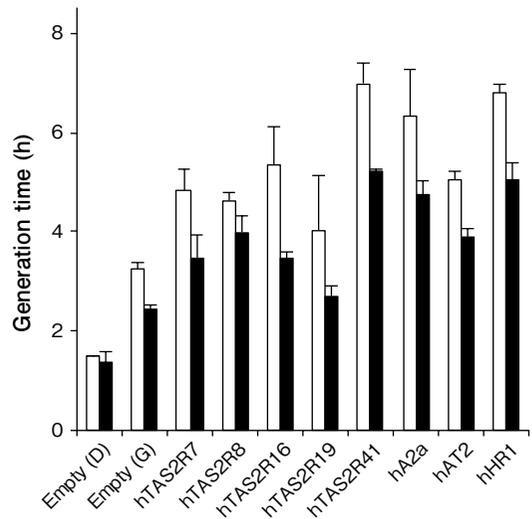


Fig. 1. Comparison of generation times using different culture media. Yeast generation time (t_d) in the exponential-growth phase was calculated by the following equation: $t_d = \log_{10} 2 \times (t_2 - t_1) / (\log_{10} N_2 - \log_{10} N_1)$, where N_1 and N_2 represent the OD₆₆₀ values of the culture measured at two distinct time-points (t_1 and t_2). Generation times are presented as the means \pm SD ($n=3$). Hollow column, free amino acids medium; solid column, soy peptides medium. D, glucose as carbon source; G, galactose as carbon source.

膜たん白質の発現生産

SP培地により発現生産した全てのモデル膜たん白質はSDS-PAGEにおいてほぼ単一バンドであった (Fig. 2). これは遊離アミノ酸培地での発現生産の結果と一致していることから³⁾, SP培地で発現生産した膜たん白質はアミノ酸培地を用いた場合と本質的に同等であることが示唆された.

SP培地での指数増殖期における膜たん白質の生産量は, FAA培地と比較してhTAS2R8は1.2倍, hTAS2R19は1.3倍, hTAS2R41は2.6倍, hA2aは1.3倍, hAT2は5.4倍, hH1Rは1.8倍に増加した (Fig. 3). hTAS2R7およびhTAS2R16の発現量には大きな変化は見られなかった. 一方, 定常期における発現量は全てのモデル膜たん白質において, 両培地間で同様であった (data not shown). 発現量と膜たん白質の種類, もしくは組換えたん白質発現ストレスとの関連は見出せなかったが, SP培地による生育改善効果は全ての発現株で同程度であることから, SP培地における組換え膜たん白質の生産性増強効果は, 主にたん白質の大量合成に伴うアミノ酸源不足の緩和によるものと考えられる.

ペプチドトランスポーター欠損株の生育解析

ヒトにおける大豆ペプチドの優れた吸収特性は, 小腸上皮に発現するペプチドトランスポーターに

よる高効率なペプチド吸収に依存する^{4,5)}. そこで *S. cerevisiae*におけるジ・トリペプチドトランスポーター (Ptr2) の欠損株を解析した (Fig. 4). その結果, Ptr2欠損株のSP培地中での生育はFAA培地と比較して著しく悪化し, ペプチド資化能をほぼ失っていたことから, 本研究で用いた大豆ペプチドの大部分はPtr2を介して取り込まれることが明らかとなった. 蛍光ラベル化ペプチドを用いた解析の結果, 取り込まれたペプチドは液胞に輸送されることが示唆された (data not shown). これらの結果から, 大豆ペプチドはPtr2によって取り込まれた後に液胞プロテアーゼによって速やかに分解され, たん白質合成に伴うアミノ酸源の不足を緩和することで, 指数増殖期での組換え膜たん白質の生産性を増強させることが示唆された.

本研究により, 大豆ペプチドが膜たん白質生産用の微生物培養基材として有用である可能性が示された. その効果には大豆ペプチドの吸収特性がカギであることから, 現在, 我々は大豆ペプチドが有する優れた吸収特性の分子メカニズムを解明するため, ペプチドトランスポーターの構造機能相関解析を進めている.

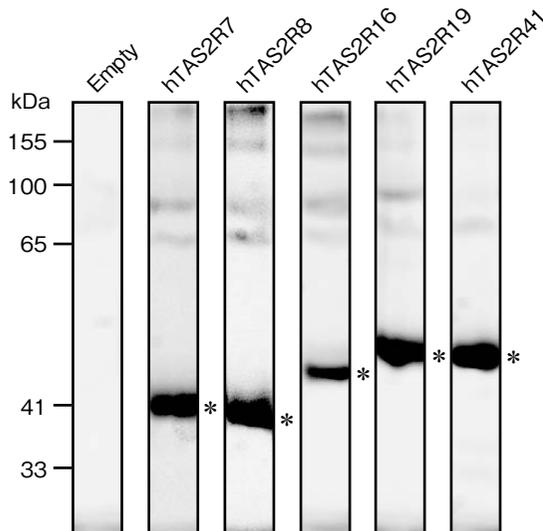


Fig. 2. SDS-PAGE analysis of model membrane proteins. Crude membranes were loaded onto SDS-PAGE gels and analyzed by the in-gel fluorescence of GFP. Asterisks indicate bands for hTAS2R-GFP fusion proteins.

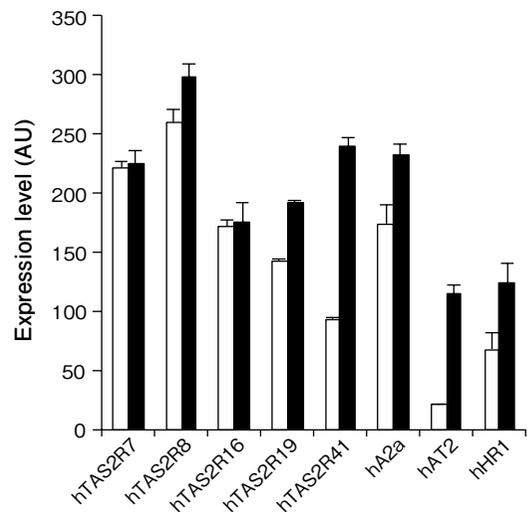


Fig. 3. Expression levels of receptor-GFP fusion proteins in the exponential phase. Cell suspensions were analyzed to estimate the expression levels of the GFP-fusion receptors. GFP fluorescence emission was measured at 510 nm at an excitation wavelength of 490 nm. Hollow column, free amino acids medium; solid column, soy peptides medium. AU, arbitrary units of GFP fluorescence intensity. Expression levels are presented as means \pm SD (n=3).

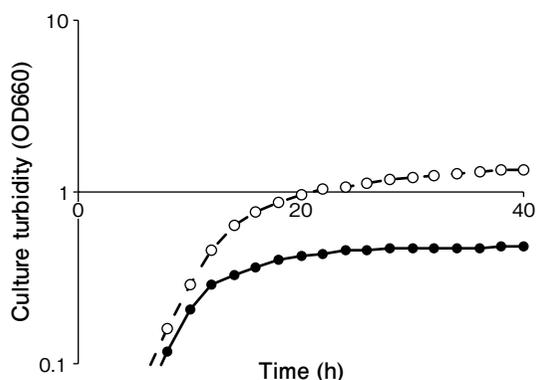


Fig. 4. Cell growth analysis of peptide transporter knockout strain BY4742-Ptr2Δ. Pre-culture cells were diluted to give OD₆₆₀=0.06 in each medium and cultivated at 30°C. Culture turbidity was monitored by measuring OD₆₆₀. Hollow circle, 0.13 diluted free amino acids medium; solid circle, 0.13 diluted soy peptides medium.

要 約

酵母*Saccharomyces cerevisiae*を用いた組換え膜たん白質の調製は、細胞壁が薄く、破碎が比較的容易な指数増殖期に行うことが望ましい。指数増殖期では活発な細胞増殖に加え、組み換えたん白質の大量発現により細胞内アミノ酸源が枯渇すると考えられる。そこで、優れた吸収特性を示す大豆ペプチドを培養基材として用いた結果、大豆ペプチドは指数増殖期でのアミノ酸源の不足による生育阻害ストレスを緩和し、組換え膜たん白質の生産性を増強することが示された。

文 献

- 1) Smith AE, Zhang Z, Thomas CR, Moxham KE and Middelberg AP (2000): The mechanical properties of *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci USA*, **97**, 9871-9874.
- 2) Ito K, Hikida A, Kitagawa S, Misaka T, Abe K and Kawarasaki Y (2012): Soy peptides enhance heterologous membrane protein productivity during the exponential growth phase of *Saccharomyces cerevisiae*. *Biosci Biotechnol Biochem*, **76**, 628-631.
- 3) Sugawara T, Ito K, Shiroishi M, Tokuda N, Asada H, Yurugi-Kobayashi T, Shimamura T, Misaka T, Nomura N, Murata T, Abe K, Iwata S and Kobayashi T (2009): Fluorescence-based optimization of human bitter taste receptor expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem Biophys Res Commun*, **382**, 704-710.
- 4) Adibi SA (1997): The oligopeptide transporter (Pept-1) in human intestine: biology and function. *Gastroenterology*, **113**, 332-340.
- 5) Maebuchi M, Samoto M, Kohno M, Ito R, Koikeda T, Hirotsuba M and Nakabou Y (2007): Improvement in the intestinal absorption of soy protein by enzymatic digestion to oligopeptide in healthy adult men. *Food Sci Technol Res*, **13**, 45-53.