

ヒト血清アルブミンとその融合タンパク質の発現系構築と分泌シグナル配列の最適化

(大阪公大院農) ○小森 美月・藤枝 伸宇・森田 能次

Construction of expression systems for Human Serum Albumin and its fusion proteins, and optimization of secretion signal sequence (*Graduate School of Agriculture, Osaka Metropolitan University*) ○Mizuki Komori, Nobutaka Fujieda, Yoshitsugu Morita.

Fusion proteins are used as biopharmaceuticals. Fusion of Human serum albumin (HSA) to a medicinal protein is effective in improving its stability in the body. Therefore, there is a need to construct a high expression system that efficiently produces HSA fusion proteins. *Pichia pastoris* is also known as a host of a powerful heterologous protein production system. *Pichia pastoris* can secrete proteins to the medium using a secretion signal peptide. However, optimization of the secretion signal is necessary to obtain high expression levels¹⁾.

In this study, we aim to construct a high-secretory expression system for HSA fusion proteins using *Pichia pastoris* as a host. First, we selected the α mating factor secretion signal as a secretion signal and constructed an HSA secretory expression system in *Pichia pastoris*. Then, we introduced mutations into the secretion signal and compared the expression levels of HSA. Horseradish peroxidase (HRP), which is used in various detection methods and is a highly challenging target for recombinant production²⁾, was selected as a protein fused with HSA. Peroxidase assay was used for quantification of the HSA-HRP fusion protein, and culture conditions were also examined to improve the expression level.

Keywords: *Pichia pastoris*; Human Serum Albumin; α mating factor secretion signal

融合タンパク質はバイオ医薬品として使用され、中でもヒト血清アルブミン (HSA) の薬効を持つタンパク質への融合は、体内安定性の向上に有効である。そのため、HSA 融合タンパク質を効率的に生産する高発現系の構築が求められている。一方、ピキア酵母は強力な異種タンパク質生産系の宿主として知られている。ピキア酵母は、分泌シグナルを利用することで、タンパク質を培地中に蓄積することが可能である。しかし、高い発現量を得るには分泌シグナルの最適化が必要である¹⁾。

本研究では、ピキア酵母を宿主とした HSA 融合タンパク質の高分泌発現系の構築を目的とする。まず、分泌シグナルとして α 交配因子分泌シグナルを選択し、ピキア酵母における HSA 分泌発現系を構築した。次に、分泌シグナルへの変異導入を行い、HSA 発現量の比較を行った。さらに、融合するタンパク質として、様々な検出法で使われている西洋ワサビペルオキシダーゼ (HRP) を選択した。HRP は異種発現が難しいタンパク質として知られている²⁾。HSA-HRP 融合タンパク質の定量方法として、ペルオキシダーゼアッセイを使用し、発現量向上のため分泌シグナルへの変異導入および培養条件の検討を行った。

1) J. Lin-Cereghino, *et al.*, *Gene*, **2013**, 519, 311.

2) O. Spadiut, *et al.*, *Protein Exp. Purif.*, **2014**, 95, 104.