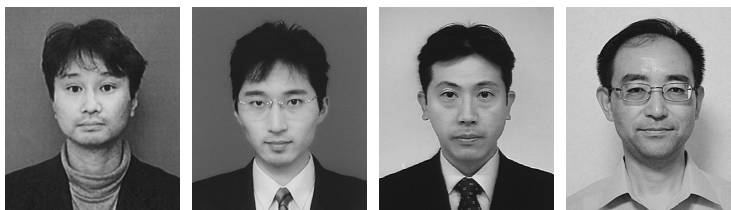


《農芸化学技術賞》

***Corynebacterium glutamicum* を用いた
タンパク質分泌生産系の開発**

味の素株式会社ライフサイエンス研究所 主席研究員 菊池慶実①
味の素株式会社ライフサイエンス研究所 主任研究員 萬年輝久②
味の素株式会社発酵技術研究所 主任研究員 竹中康浩③
味の素株式会社研究開発企画部 専任部長 小島淳一郎④

はじめに

さまざまな機能を有するタンパク質は、医薬品や産業用酵素として幅広く利用されており、全世界で約4兆円の市場を有し、その市場は年々伸び続けている。また産業用途のみならず、微量ではあるが研究用途として科学の進歩のために必要とされるタンパク質も数多くある。そのため、その生産規模にかかわらずタンパク質を効率的に生産する手段は、われわれ人類の生活向上、そして科学の進歩のために必要不可欠となっている。このような背景により、これまでに大腸菌、*Bacillus* 属細菌、カビ、酵母、動物細胞などを利用したタンパク質生産系が開発されてきた。しかしながら、これらの系を用いてもまだ効率良く生産することが困難な有用タンパク質も数多く存在している。われわれはこのような問題点を少しでも解決すべく、新しいタンパク質生産系を構築し、産業界、あるいは科学の発展に貢献することを目的に研究開発を行ってきた。

1. *C. glutamicum* でのタンパク質分泌生産系の開発

1957年に、木下らによってグルタミン酸生産菌として分離された、グラム陽性細菌 *Corynebacterium glutamicum* は、グルタミン酸、リジンをはじめとする、多くのアミノ酸の工業生産菌として50年以上にわたり産業利用されてきた。そのため、各種アミノ酸の生産性を向上させる目的で、代謝生理学、生化学、遺伝学、培養技法などに関する数多くの基礎的知見が得られてきた。一方、応用的側面から見ると、アミノ酸生産以外、とりわけアミノ酸の重合体であるタンパク質の生産に関する報告は、これまでほとんどなされていなかった。われわれは、*C. glutamicum* がもっている、タンパク質の素材となるアミノ酸の高い合成能力、この菌を利用しアミノ酸の工業生産を長年実施してきた味の素株式会社における技術蓄積から、この菌に着目し、まず食品加工用酵素として利用されているトランスグルタミナーゼをターゲットとし、新たなタンパク質分泌生産系構築のための研究開発を開始した。

放線菌由来のトランスグルタミナーゼ(MTG)は、タンパク質分子間の架橋反応を触媒することにより、食品タンパク質の物性変化や接着などを引き起こすユニークな酵素として、食品加工分野で広く利用されている。また最近では、食品加工分野以外での利用拡大の可能性も生じてきたことから、さらに効率的な生産手段が期待されていた。しかしながら、これまでに知られていた既存のタンパク質生産系を用いても、現行生産法を凌駕するような効率の良いMTGの生産手段を構築することはできなかった。そこでわれわれは、当社において技術蓄積の高かった *C. glutamicum* を利用したタンパク質分泌生産系の研

究開発に着手した。すでに報告されていた、*C. glutamicum* の細胞表面層画分に著量存在しているタンパク質の遺伝子プロモーター、そしてタンパク質の膜透過に必要なシグナル配列を利用したMTGの分泌発現の検討から開始した。その後、*C. glutamicum* の野生株と比べてMTGが5倍程度高分泌する変異株の創出、*C. glutamicum* の近縁種である *C. ammoniagenes* の細胞表面層タンパク質のシグナル配列の利用など、各種改良検討を実施することにより、MTGを数g/L分泌させることに成功し、工業化プロセスを構築するに至った。しかしながら、MTGは食品加工用途に利用されているため、組換え酵素となるこの系での実生産は、現時点では実施していない。

われわれが開発してきた *C. glutamicum* のタンパク質分泌生産系においては、既存のタンパク質生産系と比較し、主として以下の四つの有利な点を有していると考えている。

- (1) *C. glutamicum* 本来の分泌タンパク質が培養上清中に非常に少ないため、分泌させた目的タンパク質が非常に“きれい”な状態で培養上清中に蓄積される(図1)。そのため、目的タンパク質の精製工程を大幅に低減できる可能性が高い。
- (2) *C. glutamicum* の培養上清中にはタンパク質の分解活性が検出されず、他のタンパク質分泌系で問題となっているような、分泌させた目的タンパク質の分解が起こらない。これは異種タンパク質を分泌生産するうえで非常に有利な点となっている。
- (3) 分泌されたタンパク質は正常な高次構造を有している。これまでに分泌させたタンパク質は、ほとんどが本来のタンパク質と同じ活性を有していた。特に、インスリン様成長因子(IGF-1)をはじめとするヒト由来の有用タンパク質

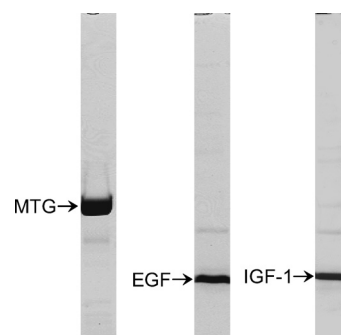


図1 *C. glutamicum* のタンパク質生産時における培養上清のSDS-PAGE像(ゲルはクマシー・ブリリアント・ブルーで染色)



図2 リーフレットなどで使用している CORYNEX® のロゴ

は、複数のジスルフィド結合をもつものも多いが、この系により分泌されたタンパク質においては、そのほとんどが正常なジスルフィド結合が形成されていた。

- (4) *C. glutamicum* は50年以上にわたりアミノ酸の工業生産菌として利用されてきたため、単純な培地での数百kLスケールでの培養法が確立している。これら知見により大量培養が簡便に行える。

以上の点から、開発してきた *C. glutamicum* のタンパク質分泌生産系が、医薬用タンパク質のように高度な精製を必要とする場合から、産業用酵素のように大量生産を必要とする場合まで、幅広く適応可能な有用な系であると考えられたため、CORYNEX®と名づけた商標(図2)を取得し、産業への利用拡大を図っていくこととした。

2. *C. glutamicum* での Tat 経路の利用

それでは、*C. glutamicum* のタンパク質分泌生産系がタンパク質生産系として完全な系であるかという点、現時点では決してそうとは言えない。特に、培養上清への分泌発現が困難なタンパク質も多く存在しているという点が第一に挙げられる。この問題点は、すべてのタンパク質分泌生産系に共通している問題点でもある。われわれはこの問題を少しでも解決する手段の一つとして、植物細胞の葉緑体において発見され、その後大腸菌等にも存在が確認されていた、Tat 経路(Twin-arginine translocation pathway)と呼ばれる新しいタンパク質分泌経路の利用を考えた。通常のタンパク質分泌経路は Sec 経路と呼ばれ、細胞内で翻訳されたタンパク質は高次構造を取ることなく、ひも状に伸びた状態で細胞膜を透過し、その膜透過後に高次構造が形成されている。しかしながら、新たに見いだされた Tat 経路は、細胞内で高次構造が形成され、その状態で細胞膜を透過している(図3)。このように細胞膜透過機構に関して非常に大きな違いを有しているため、従来の Sec 経路において効率良く分泌生産されなかったタンパク質を、Tat 経路を利用することにより効率良く分泌生産できるのではないかと考えた。*C. glutamicum* における解析の結果、この菌にも Tat 経路が存在することを見だし、その基礎的解析、およびタンパク質生産への応用展開を検討した。その結果、Tat 経路が *C. glutamicum* のタンパク質分泌生産系の汎用性を高め、これまで分泌発現が困難であったいくつかのタンパク質に関し、工業化が可能なレベルでの分泌発現を達成することができている。

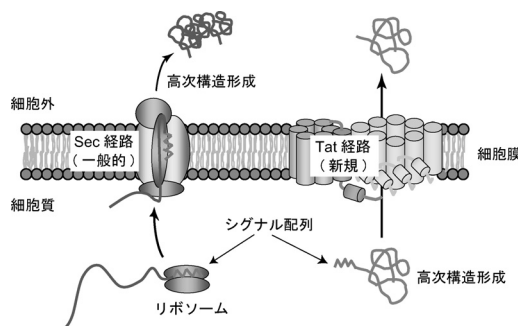


図3 Sec 経路(一般的経路)と Tat 経路(新規経路)におけるタンパク質膜透過の模式図

3. CORYNEX® の産業利用展開

近年市場を大きく伸ばしている抗体医薬は、ほとんどすべてがチャイニーズハムスターの卵巣由来の CHO 細胞を用いて生産されている。これまで CHO 細胞の増殖因子としてインスリンが用いられてきたが、インスリンと比較し培地への添加量が約 1/100 程度で効果が発揮される IGF-1 の需要が高まってきている。しかしながら、MTG 同様 IGF-1 も既存のタンパク質生産系においては効率的な生産が困難であり、非常に高価なタンパク質となっていた。われわれは、*C. glutamicum* のタンパク質分泌生産系を利用した IGF-1 の分泌発現、培養プロセス、そして精製プロセスの開発を検討した結果、培養上清中に IGF-1 が高純度で分泌されるという特徴を活かし、精製工程を極力簡略化した製造方法を確立することに成功した。その結果、コスト競争力のある細胞培地用 IGF-1 の画期的な工業化に成功し、2009 年から販売を開始した。

また 2009 年より、味の素株式会社は、CORYNEX® の商標のもと、タンパク質発現受託サービス事業を開始した。欧米の製薬会社などにおいては、既存のタンパク質生産系において、効率良く生産できないタンパク質医薬品候補を数多く有している。われわれは、このようなお客様が有しているタンパク質生産に関する諸問題の解決手段を提供できればと考え、CORYNEX® に関する技術紹介を幅広く行ってきた。その結果、これまでに多くのタンパク質発現受託アイテムを獲得し、お客様のニーズに応えるサービスを展開している。

以上のように、*C. glutamicum* のタンパク質分泌生産系には次世代タンパク質生産技術としての大きな期待が寄せられているが、今後もさらなる改良研究・開発を継続し、この系をタンパク質生産系として完全なものとしていき、われわれ人類の生活向上、そして科学の進歩のために貢献できるように努めていきたいと考えている。

本賞の成果は、味の素株式会社の多くの共同研究者、関連部所の皆様の尽力に負うところが多かったことを付記し、ご協力いただいた皆様にこの場を借りて感謝を申し上げます。また、最後になりましたが、本賞にご推薦いただきました東北大学名誉教授の神尾好是先生、および選考委員の先生方に厚く御礼申し上げます。