

有用微生物の細胞機能に関する分子遺伝生化学的研究



東京大学大学院農学生命科学研究科 応用生命工学専攻 教授 依田 幸司

人類は古来より経験的に多様な微生物の働きを利用し、微生物の実体を知ってからは、積極的な探索と育種が進んだ。動植物に比べて、有用微生物の育種では、理屈に基づく計画的な改変と、膨大な数の変異体からの闇雲な探索が、容易に両立する。細胞機能の基礎的な理解が、闇雲な探索で取得された変異体の解析から生まれることも珍しくはない。これは、基礎と応用がおおよそ区別できないという、農芸化学の研究の特性によく合致するように思われる。

細胞の機能を司るタンパク質は、細胞の固有の領域に局在してこそ正しく機能する。1970年代に分子生物学が興隆し育種技術も発達したが、タンパク質の局在機構はほとんど未解明であった。筆者はこの機構を広く解明するため、細菌では分泌タンパク質遺伝子をクローン化・解析し、それを利用して異種タンパク質の分泌生産を果たし、真核微生物の酵母では多数の新規遺伝子を発見し、タンパク質局在に関わる重要な機能を明らかにするなど、微生物の細胞機能に関する諸問題を多岐にわたって研究してきた。

1. 細菌の分泌タンパク質

遺伝子組換え技術が使えるようになり、まず大腸菌がリン酸制限下で大量に分泌生産するアルカリ性ホスファターゼの構造遺伝子 (*phoA*) を取得して解析した。*phoA* は、*lac*、*trp* とともに大腸菌の三大レギュロンと呼ばれ、多数の変異株が蓄積し、鮮やかな青に発色する基質もあって、最初にはうってつけの材料と考えられた。プロモーターと分泌シグナル領域の配列・構造を明らかにし、菊池泰弘博士の学位論文になった。これを利用して、異種タンパク質をペリプラズムに生産できる分泌ベクターを創成して、ヒトEGFやB型肝炎ウイルス表層抗原などの生産に成功した。シグナル配列の最適化、分泌タンパク質高生産時の細胞障害回避、新規プロテアーゼ遺伝子の取得とプロ配列の役割解明など、産業利用につながる重要な課題を解決した。タンパク質の膜透過機構の研究は、この後も世界的に広く進められてきたが、万能な有用タンパク質分泌系はまだ夢で、個々の事例ごとに対策と工夫を必要とするのは残念である。

2. 遺伝子増幅の発見と応用

枯草菌から分離された多数のツニカマイシン耐性株の中に、1株だけ、同時に α -アミラーゼを高分泌する株があった。他の株の変異は、アミラーゼ構造遺伝子 *amyE* 近傍の *tmrB* 遺伝子にマップされるが、それらはアミラーゼ高分泌にならない。この機構がわからないため広い応用につなげられなかった。さまざまな検討の末、枯草菌を形質転換してツニカマイシン耐性かつアミラーゼ高分泌にする染色体断片がクローン化でき、その正体が「*amyE-tmrB* の下流に非同相組換えでもう一度 *amyE-tmrB* があるような、染色体二重化のつなぎ目のDNA」であることを発見した。この断片で枯草菌を形質転換しツニカマイシン存在下で培養すると、染色体は組換えを繰返し *amyE-tmrB* 領域が遺伝子増幅した。他の耐性株は *tmrB* のプロモーター領域の変異で発現を向上させ、ツニカマイシンに結

合して機能を阻害する *TmrB* タンパク質を増やしていた。ただ1株が、同じことを遺伝子増幅で引き起し、同時にアミラーゼの構造遺伝子も増やしていたのだった。変異といえばDNA塩基配列の変化とばかり考えていた筆者には、染色体領域の増幅は驚きだった。わかってみれば、これを利用して人為的に遺伝子増幅を誘起し、タンパク質を高分泌生産させる方法を確立することができた。

3. 酵母分泌関連変異株の取得と解析

真核微生物の酵母では、オルガネラ間の小胞輸送が、タンパク質の分泌や糖鎖修飾・局在化に必須である。カリフォルニア大学の Schekman 博士が、輸送の変異株を解析した最新の成果を話した京都での会議に、たまたま参加していた。これは中学生のときビートルズの「プリーズプリーズミー」をラジオで聴いたとき以来の衝撃だった。変異株と遺伝子解析が使えるなら、農芸化学の微生物でできないことではないし、まだ23遺伝子しか取られていないから大いに展望もあると考え、出芽酵母の研究を開始した。

新規に探索した分泌変異株から小胞体 (ER)-ゴルジ体間の輸送に関わる新しい遺伝子を発見した。純国産第1号なので、*SEC* などではなく「輸送」にちなんで *USO1* と命名し、中島春紫博士の学位論文になった。Usol タンパク質を精製すると、配列から予想されたように双頭単尾のダイマー構造をとっていた。Usol タンパク質が、ERから生じた新しいCOPII小胞と特異的に、しかも複数と結合することを *in vitro* 系で示すことができた。小胞を係留するタンパク質群として最初の発見で、小胞輸送機構の研究全体の発展に大きく寄与したと思う。

4. ゴルジ体タンパク質の動態

ゴルジ体の機能解明のため、糖鎖不全変異株を多数取得し、糖スクレオチドGDP-マンノース合成酵素 Vig9 や、Mnn9を含む2種のゴルジ体局在糖転移酵素複合体を発見した。また、GDP-マンノースのゴルジ体膜輸送体 Vig4 を詳細に調べ、従来考えられたようにゴルジ体に常駐しているのではなく、COPI小胞に乗ってERまで戻り、再びCOPII小胞に乗りゴルジ体に移るという、動的局在移動を繰り返していることを発見した。この知見から、Vig4はゴルジ体の層盤成熟モデルを実証する材料に使われ、本分野の研究に大きく貢献した。

一方、母細胞のゴルジ体が Ypt11 タンパク質の関与でミオシンに結合し、アクチン軸に沿って娘細胞に積極的に移行するという、オルガネラの母子間相続機構があることも明らかにした。

浸透圧保護下でしか生育できない脆弱細胞変異株の解析では、細胞壁糖タンパク質の重要性や、細胞壁に関わる遺伝子の発現がプロテインキナーゼC制御下にあることを見いだした。

5. ゲノム情報に基づく機能未知必須遺伝子の解析

酵母のゲノム情報が開示され、さまざまな網羅的解析がはなはなしく進められたが、それらからでは機能を予測できず、破壊株は致死になるという、機能未知必須遺伝子がいくつも残っ

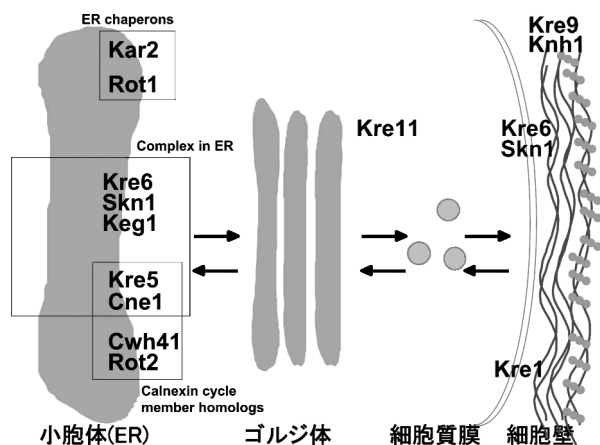


図1 新規の膜タンパク質 *Keg1* は、*Kre6* およびそれと相同な *Skn1* と結合し、それらのフォールディングと、細胞壁が極性成長する芽の領域への移行に関与する。図中に名を表示したタンパク質はどれが欠損を持っても細胞壁 β -1,6-グルカン合成に異常を起こす。

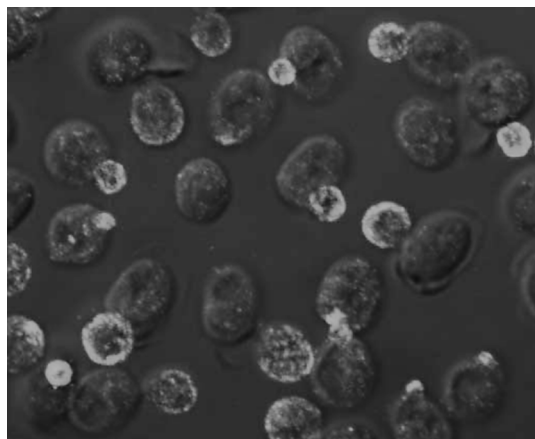


図2 野生型酵母の *Kre6* タンパク質を免疫蛍光染色すると、芽へ集積した像が見られる。図1に示したタンパク質に異常のあるものでは、この局在が見られなくなる。

た、その中から膜タンパク質候補を選び、GFP タグ標識体が ER かゴルジ体に局在するものについて詳しく調べた。筆者らの選んだ解析法は、まず error-prone PCR で温度感受性変異株を分離し、準制限温度などで変異形質を詳細に調べられるようにしたうえで、多コピーサプレッサーを取得するものである。サプレッサー遺伝子の産物はごく近傍で機能していることが多いので、調べるべきことが限定できる。その結果、GPI アンカーへのマンノース付加酵素 *Pga1* (ER)、イノシトールホスフォセラミド合成酵素 *Keil* (ゴルジ体)、 β -1,6-グルカン合成に関わる *Keg1* (ER) など、従来の変異株探索からは発見できなかった新規膜タンパク質の機能を明らかにすることができた。*Keg1* は他の ER シャペロンとともに β -1,6-グルカン合成酵素候補 *Kre6* の細胞膜移行を制御すると予想され (図1, 図2)、さらなる解析によりいまだ不明の細胞壁 β -1,6-グルカン合成機構を明らかにできると期待している。

6. ゴルジ体サブ領域の単離と新規膜タンパク質

ゴルジ体を構成するタンパク質は、常に動的な移動を繰り返しているが、ある瞬間には、*cis*・*medial*・*trans* など異なるサブ

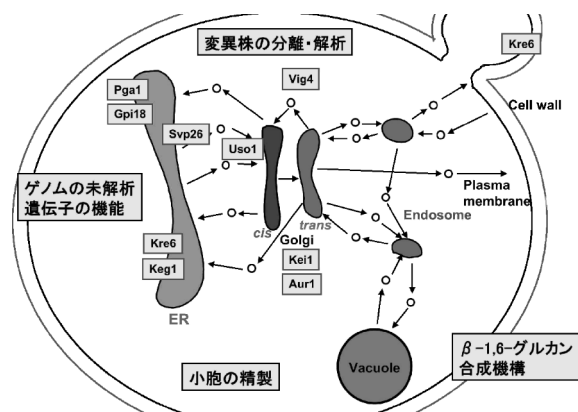


図3 酵母を材料とした研究をまとめると、*USO1*, *VIG4* のように変異株を分離して解析する古典的アプローチ、*PGA1*, *KEI1*, *KEG1* のようにゲノム情報で未解析なものを調べるアプローチ、*Svp26* のようにオルガネラを精製し構成タンパク質中で未解析なものを調べるアプローチ、 β -1,6-グルカン合成のようにそもそも機構が未解明なものごとを調べるアプローチがあった。すべてが未知という「謎」にひかれたのだが、*Keg1* と *Kre6* のように、同じところに行き着いたものもある。

領域に存在する。各サブ領域を解析するため、抗体で吸着して膜小胞を精製する方法を開発した。*Sed5* (*cis*) あるいは *Tlg2* (*trans*) をもつゴルジ体サブ領域の構成膜タンパク質を網羅的に同定し、機能未知新規タンパク質を発見した。その一つ *Svp26* は、数種のマンノース転移酵素と ER で結合し、それらをゴルジ体へ運ぶ COPII 小胞に積み込むのを助けていた。ER には *Svp26* 以外にもゴルジ体への輸送を助ける「選別アダプター」があることを発見し、タンパク質の局在を決定する新たな機構があることを明らかにした。

7. おわりに

以上のように、筆者は、大腸菌・枯草菌・出芽酵母で、不思議な現象、新しいタンパク質、機能不明の遺伝子など、ひたすら「謎」にひかれて研究を続けてきた (図3)。主たる材料は、単細胞微生物で、多くの研究者がこぞって実験材料に使ったものでもある。変異体、遺伝子、ベクター、抗体などが豊富で自由に入手でき、形質転換や細胞分画など再現性の高い技術が確立していることは、新しい現象や、もっと深遠な機構の解析に切り込むには、極めて重要である。遺伝子操作も、PCR も、ゲノム情報も、エピトープや GFP タグも、それらが使えるようになったことで、さまざまな研究基盤が整備されたのはありがたい。研究経費が以前よりかさむようになったのは困ったことではあるが、研究の困難の本質はそこにはない。

謝辞 本研究は、東京大学農学部農芸化学科微生物学研究室ならびに東京大学大学院農学生命科学研究科応用生命工学専攻分子生命工学研究室において、多くの学生・大学院生・研究生および共同研究者諸氏によって成し遂げられたものであり、その努力に厚く御礼申し上げます。研究室スタッフとして教育研究に多大にご尽力くださいました片岡宏志博士、野田陽一博士、足立博之博士、また常に温かいご指導を賜りました、故田村學造先生、山崎真狩先生、永井和夫先生、高月 昭先生はじめ諸先生に、心より感謝申し上げます。