



細胞表層活用の基盤開拓

京大大学院農学研究所応用生命科学専攻 植田 充 美

1. はじめに

学部学生のころからの石油発酵や炭化水素資化酵母の生理学的・発酵学的研究と大学院に入って興味をもった生命情報処理技術を基盤としたゲノム研究を結びつけて、タンパク質のもつアドレス情報のなかから、タンパク質の細胞表層への輸送機構の情報の集積解析を行った。すると、酵母などをはじめとする全生物に普遍的に存在する「細胞表層輸送システムのゲノム情報」が見つかり、「細胞表層工学 (Cell surface engineering)」を提唱した。Chemical Engineering News で新しいバイオテクノロジー研究領域「細胞表層工学の開発」の確立として評され、アメリカの学会から「アーミング (Arming) 技術」という「千手観音 (arming buddha)」を模した名を命名された。現在、原核生物から、酵母を始め、植物・動物などの真核生物も材料にした「細胞表層工学」は、基礎的にも応用的にも世界に拡大してきている (図1)。

2. 細胞表層タンパク質のもつ基本情報

細胞表層へのタンパク質の輸送機構は、パン酵母 *Saccharomyces cerevisiae* を材料として、細胞同士が、接合の時に誘導発現する性凝集細胞間接着分子であるアグルチニンタンパク質をモデルにして明らかにした。このタンパク質には、 $\alpha$ 接合型細胞で発現する  $\alpha$ -アグルチニンと a接合型細胞で発現する a-アグルチニンがあり、ともに細胞壁に結合して活性部位が細胞の最外層から突き出ており、この2つの分子を介して細胞間接着が起こる。 $\alpha$ -アグルチニンと a-アグルチニンのコア部分はそれぞれ共に、GPI (グリコシルフォスファチジルイノシトール) アンカー付着シグナルと推定される疎水性領域を C 末端に有しており、また、セリンとスレオニンに富む糖鎖修飾部位と接着にかかわる活性部位が N 末端側に有り、そのさらに N 末端に疎水性の分泌シグナルを持つ分子構造からなる。細胞膜へのアンカーリングに必要な GPI アンカーは、原生動物、粘菌、酵母、昆虫から哺乳類にいたるまで様々な真核生物に見いだされており、その基本骨格はよく保存されている。酵母の細胞壁に存在するタンパク質の GPI アンカー付加に必要な C 末端疎水性アミノ酸配列は、疎水性の性質以外にあまり共通性が見ら

れないが、C末端のこの疎水性部分で翻訳後の前駆体タンパク質は小胞体膜に一時的に保持され、タンパク部分は小胞体内腔に配向する。その後、トランスアミダーゼ活性を持つ酵素によりその C 末端 GPI 付加シグナル配列が認識されて、切断を受け、新たにできた C 末端 ( $\omega$  部位) は、既に小胞体で合成されている GPI アンカーのエタノールアミンのアミノ基との反応によりアミド結合が形成される。このようにアンカーリングされたタンパク質は小胞体内腔に露出した形で、さらにゴルジ体を経て、分泌小胞を介したエキソサイトーシスにより細胞膜へ輸送されて細胞膜に融合される。哺乳類の GPI アンカー付加タンパク質は、この融合によって細胞膜外に露出されて保持されるが、細胞壁をもつ酵母などの場合は、さらに細胞表層で PI-PLC (ホスファチジルイノシトール特異的ホスホリパーゼ C) によりさらに切断をうけて細胞壁の最外層に移行する。その際、これらのタンパク質の細胞壁への固定には、GPI アンカーの糖鎖部分に細胞壁のグルカンが共有結合されることが重要なプロセスとなる。これらの一連のプロセスの中で、細胞内でのタンパク質の品質管理によるフォールディングの管理と膜融合による巨大ネイティブタンパク質分子の細胞外への排出システムは注目すべきである (図2)。

実際、具体的には、酵母においては、細胞表層最外殻に位置するタンパク質の分子情報は、分泌シグナル・機能ドメイン・細胞壁ドメイン (セリンとスレオニンに富む C 末 320 アミノ酸残基) からなっており、 $\alpha$ -アグルチニンの場合には、この C 末 320 アミノ酸残基の C 末端に GPI アンカー付着シグナルが存在するので、分泌シグナル・機能ドメインを操作することによって、種々の酵素やタンパク質を細胞表層に提示することが可能となるのである。しかも、タンパク質の発現において、もっとも重要なフォールディングは真核細胞のナチュラルな戦略に委ねられ、また、アグルチニンの場合はその本来の機能や性質からして通常時には機能しないながらも、その発現の潜在スペースを細胞表層に保持しているとも考えられ ( $10^6$  分子/細胞)、しかもその活性部分を細胞外に理想的に配向していると考えられる。

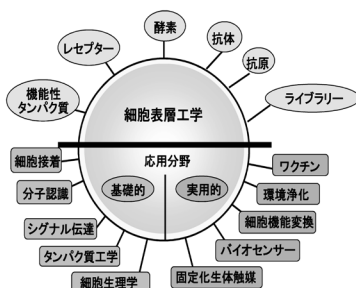


図 1 細胞表層工学の展開

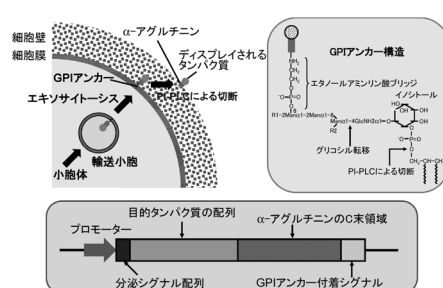


図 2 細胞表層工学の原理 (アーミング技術)

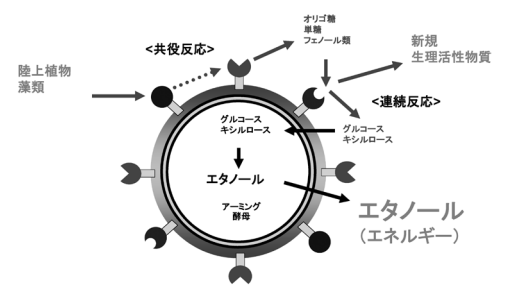


図 3 バイオマス利用細胞触媒の創製 (共役・連続酵素反応)

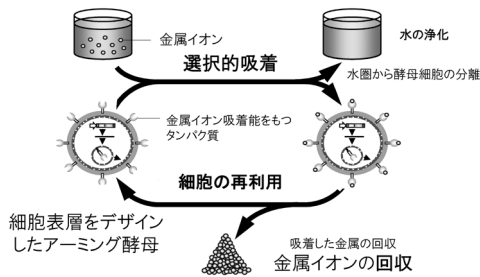


図4 金属選択的回収と水圏浄化細胞の創製

### 3. 細胞表面で酵素反応する細胞触媒基盤の創製

デンプンやセルロースなどの高分子を分解する酵素を、上述の手法により、酵母の細胞表面に提示して、細胞表面で低分子にまで分解して、直接エタノールを生産できる細胞生体触媒を開発し、多くのバイオエタノール生産プロジェクト研究の進展に寄与した(図3)。また、リパーゼを細胞表面提示した触媒を用いて、これまでのアルカリ法に替わる、廃油から新しいバイオディーゼルの製法を確立し、ベンチャー「バイオエナジー」を立ち上げ、商標ロゴにアミニング図案が採用された。また、細胞表面にタンパク質超複合体セルロソームを形成し、バイオマス成分の分解利用に有力な *Clostridium cellulovorans* のゲノム解読と特許化をアメリカのDOEに先行して行った。この情報をもとにして、開発してきた精密高速プロテオーム解析により、微生物のバイオマス分解戦略の解読に貢献してきている。

### 4. 細胞表面で選択的吸着させる細胞吸着基盤の創製

細胞表面に、水圏環境汚染の凶である銅、カドミウムやヒ素などのイオンを捕捉できるタンパク質を提示することにより、水圏からこれらの汚染源重金属イオンを除去回収できる選択的吸着体触媒の開発を行い、水圏の重金属汚染の浄化と水質改善に貢献しつつある(図4)。また、環境ホルモンの受容体の細胞表面提示も可能となり、生態系の攪乱汚染浄化に新しい視点をもつ生体触媒の開発展開をしてきている。レアメタルやレアアース選択的捕捉細胞は、都市鉱山として存在する金属廃棄物からのリサイクル回収システム技術の確立に貢献し、環境浄化だけでなく、資源回収の新しいバイオテクノロジー基盤研究へと拡大展開している。さらに、大型海藻に濃縮されている海洋の希薄な稀少金属の濃縮回収も実現してきている。

### 5. 食品、創薬、ワクチン開発への基盤開拓

オワンクラゲのGFPを細胞表面提示した酵母を用いて、共同研究により得られたパンなどの発酵食品品質解析の成果が多くの発酵食品の品質改善や製法の精密機械化に貢献している。さらに、細胞膜への提示技術も新たに確立し、創薬の標的受容体GPCRのペプチドリガンドの探索とGPCRの機能評価も可能になった。また、病原抗原タンパク質の酵母細胞表面提示ワクチンにより、細胞表面を強力なアジュバンドとした新規の高機能経口ワクチンの開発も展開している。

### 6. 網羅的なライブラリー作製を基盤とする戦略的タンパク質「考」学への展開

導入したDNAから生まれてきたタンパク質を細胞の表面にディスプレイする手法を、「コンビナトリアル・バイオエンジニアリング」と呼んだ。この手法は、多くの遺伝子由来するタンパク質を網羅的に、かつハイスループットに選択して機能解析することができ、導入した個々のDNAから生まれてきた

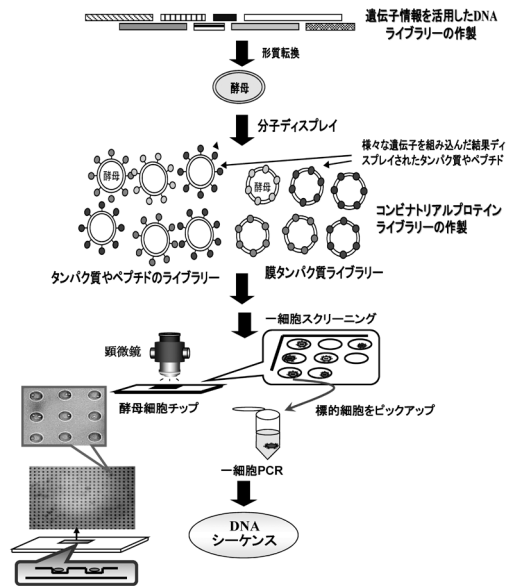


図5 網羅的タンパク質ライブラリー作製を基盤とするタンパク質「考」学の展開

個々のタンパク質が個々の細胞の表面や担体などの上に安定な形でディスプレイされ、細胞や担体を一つの支持体として、タンパク質をいつも生きたまま、必要ならいつでも表面に増幅でき、切り出すことも可能になった。さらに、タンパク質のアミノ酸配列分析なしで、PCR法の併用により、導入されたDNAの配列からディスプレイされたタンパク質のアミノ酸配列が決定できるという他の方法論の追従を許さないメリットも創出される。このように、情報分子を機能分子に変換し、多くの組み合わせの分子ライブラリーから適合するものをシステムティックに選択できる特徴を生かして、「多様性」・「提示」・「選択」をキーワードに、生体環境で機能する未知の新しい機能分子や細胞を、「自然界から探す」という方向からナノテクノロジーを導入して「情報分子集団(ライブラリー)から創る」という方向への研究も進めている(図5)。一方、この手法は、網羅的にタンパク質の変異体の作製やゲノムにコードされていないタンパク質などの網羅的ライブラリーの作成をもとにしたタンパク質の構造と機能相関研究にも新しい視点を提供してきており、網羅的ライブラリーの作製を基盤とするタンパク質工学の新たな展開—タンパク質「考」学—も展開してきている。ハイスループットな手法の開拓に、モノリスシリカキャピラリーカラムによる高速・高分離能HPLCやシングルセルを扱うチップやロボット、レーザー加工機の開発も導入し、これまでにないナノテクノロジー産業のバイオ分野への参入を促進してきた。実際これを利用して、機能を増強した多くの変異体酵素の作製や抗体や抗体酵素の創製を容易にするとともに、変異の激しいインフルエンザウイルスのタンパク質を迅速に作製し変異に対応した阻害剤スクリーニングの高速化にも展開している。

謝辞 研究を進展させるなかで、共同研究をしていただいた方々や卒業生、ならびに、京都大学大学院農学研究科応用生命科学専攻の諸先生方や現在籍学生の方々、推薦いただいた関西支部の役員の方々に深謝いたします。また、コンビナトリアル・バイオエンジニアリング研究会の皆様のご長年にわたるご支援にも感謝いたします。