

## 有用タンパク質の微生物生産とその産業利用に関する研究



名古屋大学大学院生命農学研究科／名城大学総合研究所 加藤晃代

### はじめに

微生物とそれらが生産するタンパク質は、研究のみならず食品・医薬・化成品産業と切っても切り離せない関係となった。ゲノム情報が自由に手に入るようになった昨今でも、機能未知のタンパク質が多く存在し、有用タンパク質の探索・微生物生産に関する研究は盛んにおこなわれている。特に、いかに利用しやすいものを探索し、最適化するかは産業上最も重要な課題のひとつである。

著者は、主に食品産業分野での微生物・タンパク質利用およびそれらによる技術開発を目指し、有用糖質合成酵素、微生物同定技術、モノクローナル抗体取得技術、およびタンパク質の大量生産法など、多岐にわたる研究開発を展開してきた。以下に、研究成果の概要を紹介する。

### 1. 機能性糖質の酵素合成

#### 1-1. 糖転移酵素 $\alpha$ -グルコシダーゼ (AG)

AGは、マルトオリゴ糖の加水分解および糖転移活性を有する酵素であり、食品産業においては主に糸状菌由来酵素が分岐オリゴ糖や配糖体の合成に使用されている。

著者らは、糖転移活性が高く、かつ副産物が少ないAGによる配糖体合成法の確立を目指し、海洋微生物よりAGを探査した。その結果、サンゴより単離した好塩性の *Halomonas* sp. H11株より、糖転移効率が高く、様々なアルカリ金属塩に活性化される興味深い特性を有する新規AGを見出した。

本AGは、マルトースを糖供与体、グリセロール、エタノールなどのアルコール性OH基を有する物質を糖受容体としたときに配糖体を高効率で合成可能であり、三糖以上の副産物を殆ど生成しないという特徴を有していた。また、他起源酵素では配糖化が困難であったショウガ成分6-ジンゲロールに対する糖転移活性も高く、約60%の変換効率でジンゲロール配糖体を合成できることが分かった。本配糖体は水に可溶で熱に安定であることから、食品・化成品素材として有用と考えられた(図1)。

#### 1-2. 異性化酵素セロビオース 2-エピメラーゼ (CE)

エピラクトースはラクトース中のガラクトースがマンノースに異性化した希少糖であり、プレバイオティクス効果やミネラ

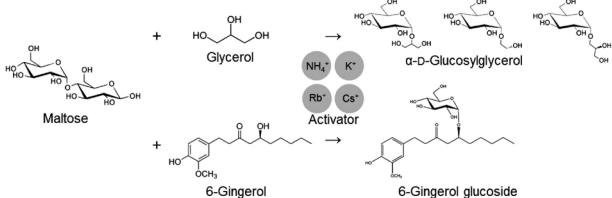


図1. *Halomonas* sp. H11由来AGによる配糖体合成

マルトースを糖供与体、グリセロールや6-ジンゲロールなどを糖受容体としたときに高効率で糖転移反応を触媒する。アルカリ金属塩により酵素が活性化される、副産物生成量が少ないなどの特徴を有する。

ル吸収促進効果などの機能が見出されている。著者はゲノムデータベースをもとにした探索法により、複数の好気性細菌から新規有用酵素を獲得した。その中から、工業利用に必要な60°C以上の耐熱性と反応性能を有する海洋性微生物 *Rhodothermus marinus*由来CEを見出し、酵素工学的諸性質を明らかにすると同時に本酵素による高純度エピラクトース生産プロセスを開発した。

### 2. 質量分析計 MALDI-TOF MSによる食中毒菌の迅速識別

マトリックス支援レーザー脱離イオン化飛行時間型質量分析計 (MALDI-TOF MS) による微生物同定法は、その利便性および迅速性から、臨床微生物検査分野を中心に1980年代後半以降急速に拡大してきた。しかし、従来のフィンガープリント法においては、種以上の詳細な識別が困難な場合があった。

著者は、ゲノミクスとプロテオミクスを融合したプロテオタイピング法の一つ、S10-GERMS法 (S10-spc-alpha operon Gene Encoded Ribosomal protein Mass Spectrum) を基とし、食中毒細菌の血清型レベルでの識別法および高精度細菌識別ソフトウェア Strain Solution を開発した(図2)。これにより、大腸菌O157に代表される腸管出血性大腸菌やリストリア菌などの食中毒細菌の血清型を MALDI-TOF MS にて迅速に識別することが可能となった。

### 3. モノクローナル抗体 (mAbs) の迅速取得法

mAbsは医薬・診断に汎用されているが、一般的に用いられているハイブリドーマ法による抗体取得や動物細胞による抗体生産には多大な時間と労力が必要とされる。

一方、筆者らのグループでは、B細胞1細胞からのPCRと無細胞タンパク質合成系を組み合わせた、迅速mAbs抗体取得法を開発してきた。本手法では、mAbsをFragment of antigen binding (Fab)としてin vitroで発現・評価するため動物細胞発現系を用いた系と比較し迅速化が容易である。しかし、同じ動物種から得られたmAb遺伝子であっても、クローンによってFabの形成効率および生産量そのものが低いことが課題であった。

そこで、まずFab形成効率を改善するために抗体重鎖と軽鎖の末端に互いに接着するロイシンジッパーペプチド、付加した「Zipbody」を開発し大腸菌の無細胞タンパク質合成系で活性型

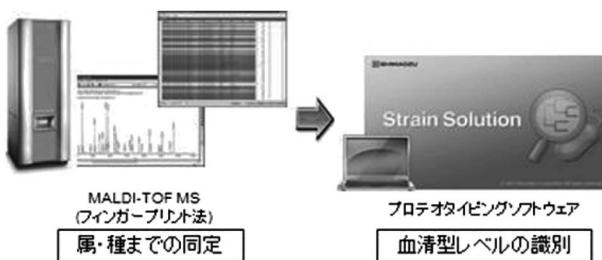


図2. MALDI-TOF MSによる高精度な菌株同定システム

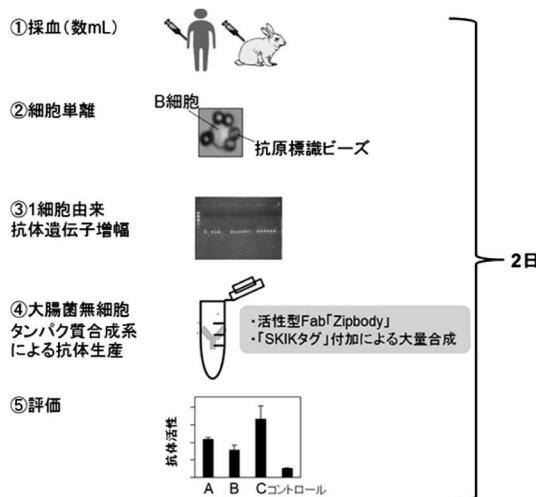


図3. mAbs取得技術「Ecobody法」の概要  
免疫された動物（ヒト・ウサギなど）の血液からB細胞を単離し、2日以内に抗体評価を行うことを可能とした。

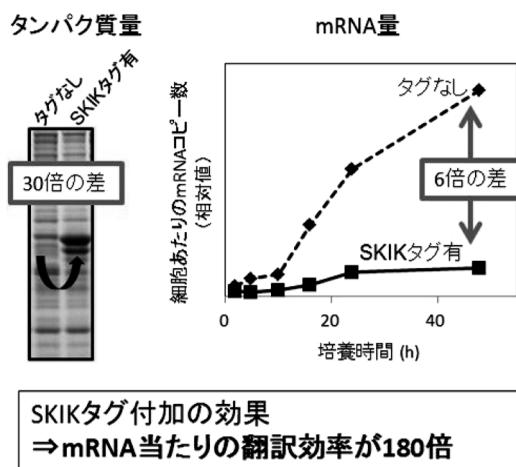


図4. N末端SKIKペプチドタグによる難発現タンパク質の生産増大効果  
大腸菌で難発現であったマウス由来の抗体遺伝子を発現させた例を示す。SKIKペプチドタグの付加により、菌体当たりのタンパク質生産量が30倍、mRNAコピー数が1/6倍となり、翻訳効率が劇的に上昇している可能性が考えられた。

のFabを生産することを可能とした。さらに、タンパク質生産量を改善するために、後述する「N末端SKIKペプチドタグ」を考案し、抗体を大腸菌発現系において大量生産可能とする技術を開発した。ZipbodyとSKIKタグの組み合わせにより、様々な食中毒菌に対するウサギmAbsの創出と大腸菌による大量生産系を確立し、動物のB細胞1個からわずか2日間で抗体遺伝子を取得・評価可能な「Ecobody法」を完成させた（図3）。

#### 4. タンパク質の大量生産を可能とするN末端タグ

遺伝子によって大腸菌におけるタンパク質発現量が異なることは、タンパク質の評価ならび実用化において最大の課題となる場合がある。通常、そのような「難発現タンパク質」の発現量を増大させるためには、コドン・培地・誘導条件の最適化、可溶性タンパク質と融合発現、さらには宿主-ベクター系の見直し等の手間と時間がかかる検討を要する。

著者らは、本課題を簡便に解決する手段を模索し、大腸菌で元来高発現なタンパク質のN末端アミノ酸配列傾向を報告する一本の論文から着想を得、難発現タンパク質のN末端にSer-Lys-Ile-Lysから成る4アミノ酸のペプチドタグ（SKIKタグ）を付加し発現するのみで、大腸菌におけるタンパク質発現量を数十～百倍に増大可能であることを見出した。また、本SKIKタグは、*in vitro*の大腸菌無細胞タンパク質合成系、様々なプロモーター制御下においても効果があった。さらに、真核異種発現システムの代表である酵母においても有効であり、抗体以外の様々な難発現タンパク質でも効果を有することを明らかとした。

本現象のメカニズムは謎であるが、SKIKタグの付加により細胞内mRNAコピー数当たりの翻訳効率が100倍以上にも効率化することでタンパク質生産量が増大している可能性を明らかにした（図4）。今後、本メカニズム解明と応用研究を目指し、タンパク質生産に関するライフサイエンス分野の研究・産業に貢献したいと考えている。

**謝 辞** 本研究は名古屋大学生命農学研究科、日本食品化工株式会社、愛知県「知の拠点あいち重点研究プロジェクト2—食の安全・安心技術開発プロジェクト」および名城大学において行われたものです。研究遂行にあたりご指導ご鞭撻を賜りました、中野秀雄先生（名古屋大学）、松井博和先生（北海道大学）、佐分利亘先生（北海道大学）、田村廣人先生（名城大学）、工藤俊章先生（長崎大学、現北里大学）、山本健博士（日本食品化工株式会社）、相沢健太氏（日本食品化工株式会社）、小林哲夫先生（名古屋大学）、熊澤茂則先生（静岡県立大学）、河原崎泰昌先生（静岡県立大学）に深く感謝いたします。微生物同定システム開発の共同研究においては野村静男氏、島圭介氏、船津慎治氏（株式会社島津製作所）、皆川洋子先生（愛知県衛生研究所）、飯島義雄先生（神戸市環境保健研究所）、伊藤猛氏（日本食品分析センター）、高橋肇先生（東京海洋大学）、岸本満先生（名古屋学芸大学）に多大なるご協力をいただきました。最後に、本研究を遂行するにあたり日頃よりサポートをいただいた日本食品化工株式会社研究所の皆様、知の拠点あいちの研究員の皆様、名古屋大学生命農学研究科分子生物工学研究室の先生方、学生の皆様に深く感謝いたします。