



微生物の産業利用および異種タンパク質生産の効率化に関する研究

名古屋大学大学院生命農学研究科 加藤 晃代

はじめに

微生物による物質生産は、持続可能なバイオ産業の発展に欠かせない技術である。なかでも、機能を有するタンパク質やユニークな性質を持つ微生物を見つけること、タンパク質を作り評価すること、そしてタンパク質をはじめとする目的物質の生産性を向上させることは、バイオ系研究や商品開発を進める上で必須な工程である。昨今は、その各工程の迅速化や効率化も重要な課題の一つである。筆者らは、微生物由来酵素の探索から実用化に向けた研究開発、質量分析計による微生物の迅速識別技術の開発、医薬・診断薬・センサー等に利用可能なモノクローナル抗体の迅速探索技術開発、発現困難なタンパク質を微生物で高生産させるための技術開発等、微生物の産業利用を目指した研究を展開してきた。以下にそれらの概要を紹介する。

1. 有用糖質を合成可能な微生物由来酵素の開発

有用糖質である配糖体や希少糖合成のために必要な酵素の探索、酵素工学的性質解明とプロセス開発に取り組んだ(図1)。筆者は、独自の酵素探索系により、好塩性細菌 *Halomonas* sp. から、グリセロールに対し糖転移活性が高く  $\text{NH}_4^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Cs}^+$  などの一価カチオンに活性化されるユニークな酵素 ( $\alpha$ -glucosidase) を見出し、様々な  $\alpha$  グルコシル配糖体の高効率合成が可能であることを見出した<sup>1)</sup>。ジングロール配糖体についてはその酵素合成に世界で初めて成功した<sup>2)</sup>。また、安価なラクトースを原料としてプレバイオティクス効果を有する希少糖エピラクトースを合成可能な異性化酵素 Cellobiose 2-epimerase (CE) に関しては、複数の CE を好気性細菌から初めて同定しその酵素化学的諸性質を決定した<sup>3)</sup>。その中から、工業利用に適した 60°C 以上の耐熱性と反応性能を示す CE を見出すことに成功し<sup>4)</sup>、本酵素により希少糖生産プロセスおよび高純度化法開発に貢献した。

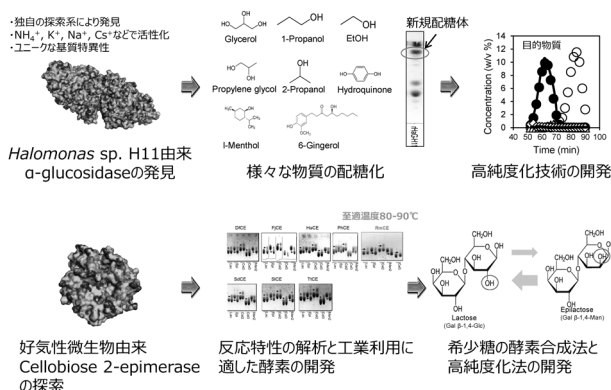


図1. 有用糖質を合成可能な酵素に関する研究開発

2. 質量分析計による微生物同定・識別技術の開発

愛知県が主催する産官学連携プロジェクトの研究者として、食中毒菌を高感度に検出・識別可能なデバイスの開発を目指し、マトリックス支援レーザー脱離イオン化飛行時間質量分析計 MALDI-TOF MS を用いたプロテオミクス的手法により、腸管出血性大腸菌、リステリア菌、サルモネラ菌、カンピロバクター属菌等の食中毒菌を血清型あるいは Linage レベルで迅速に識別可能とする技術を開発した。本成果は、信頼性の高いデータベースとして整備し論文にて公開するとともに、鳥津製作所と共同でソフトウェアとして製品化した(図2)。<sup>5-9)</sup>

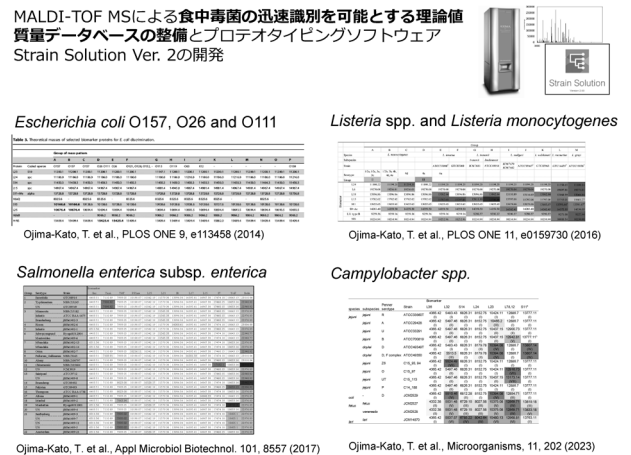


図2. 食中毒細菌識別のためのバイオマーカー質量データベースの開発成果

3. シングル B 細胞からの迅速抗体探索技術の開発

上述の研究者時代に、ウサギやヒトの B 細胞から迅速にモノクローナル抗体を取得可能な Ecobody 技術を開発した<sup>10-13)</sup>(図3)。本技法の開発過程で、微生物により生産可能な活性型抗体であるロイシンジッパー付加抗体フラグメント「Zipbody」を開発し<sup>14)</sup>、さらに、大腸菌無細胞タンパク質合成系にてタンパク質生産量を増大させる後述の N 末端 SKIK ペプチドタグを開発することで<sup>15)</sup>、抗体スクリーニング効率を飛躍的に改善させ、実用化可能なレベルにすることに成功した。そして、本技術を実装した大学発ベンチャー iBody を起業し、代表取締役として活動した。筆者らが中心となって開発した本技術は、高い特異性を有するウサギモノクローナル抗体やウイルス感染者からの有用ヒトモノクローナル抗体を迅速に取得・評価するために必要な技術として同社にて利用されている。現在筆者らは、得られた抗体を検査・診断薬として利用しやすくすることを目的とし、後述するタンパク質生産量増大ペプチドを利用した微生物による安価な機能抗体の開発を進めている。

## Ecobody技術

## ヒトやウサギからモノクローナル抗体を迅速・効率的に発掘

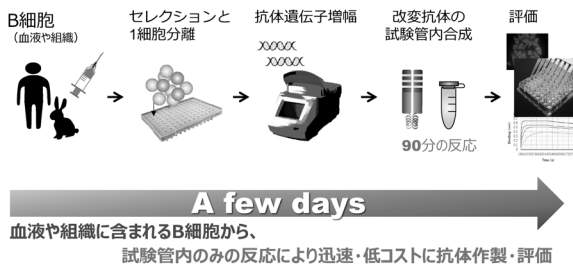


図3. 開発したモノクローナル抗体迅速取得技術の概要

## 5. 翻訳を促進する Translation Enhancing Peptide (TEP) の開発とその機構に関する研究

筆者は、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タンパク質生産量を数十〜百倍にも増大可能できる技術を開発し、大腸菌のみならず酵母においても有効であることや、様々な難発現タンパク質の生産性向上に効果的であることを明らかにした<sup>15)</sup>。その後、その機構を解明すべく研究を進め、SKIK をコードする塩基配列は何でもよいことや、転写ではなく翻訳効率を向上させていることなどを明らかにした。さらに、本SKIK タグは mRNA 上にリボソームを停滞させる新生ペプチドとして知られるアレストペプチド (AP) の効果を打ち消せるという驚くべき機能を有していることを発見した<sup>16)</sup>。これは、翻訳過程で生じる SKIK タグが新生鎖として翻訳促進能を発揮する可能性を示唆しており、タンパク質生産の効率化や翻訳の科学的理解を深める上で重要な知見である。現在、SKIK のような翻訳促進能を有するペプチドを Translation Enhancing Peptide (TEP) と命名し、AP の効果打ち消しを指標とした独自の探索系を立ち上げ、SKIK 以外の TEP を多数見出しつつある。また、酵母や哺乳類などでもその探索を進めており、TEP の特徴付けや予測技術開発も進めている。研究は、農芸化学分野そしてバイオ産業にとって必要不可欠な異種タンパク質生産技術における未解決な問題解決に大きく寄与しうるものと期待される。

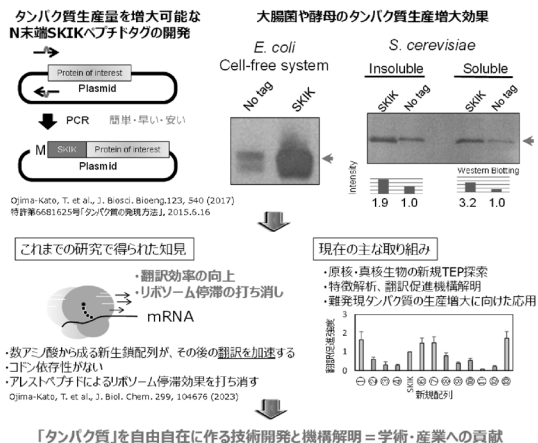


図4. Translation Enhancing Peptide (TEP) に関する研究概要

おわりに

筆者は、これまで一貫して微生物および分子生物工学的手法を基盤として、有用酵素・抗体に代表される機能性タンパク質の創出ならびに産業利用、そして微生物によるタンパク質生産とその実用化・効率化をめざし、研究に取り組んできた。今後も、農芸化学分野の基礎および応用研究の発展に微力ながら貢献できるよう、研究開発を進めていく所存である。

## (引用文献)

- Ojima, T. et al., Appl. Environ. Microbiol. 78, 1836-1845 (2012)
- Ojima, T. et al., Carbohydr. Res. 354, 59-64 (2012)
- Ojima, T. and Saburi, W. et al., Biosci. Biotechnol. Biochem. 77, 189-193 (2013)
- Ojima, T. and Saburi, W. et al., Biosci. Biotechnol. Biochem. 75, 2162-2168 (2011)
- Ojima-Kato, T. et al., J. Microbiol. Methods. 119, 233-238 (2015)
- Ojima-Kato, T. et al., PLoS One. 11, e0159730 (2016)
- Ojima-Kato, T. et al., Appl. Microbiol. Biotechnol. 101, 8557-8569 (2017)
- Ojima-Kato, T. et al., Microorganisms, 11, 202 (2023)
- Fukuyama, Y. et al., J. Mass Spectrom. 54, 966-975 (2019)
- Ojima-Kato, T. et al., J. Immunol. Methods. 427, 58-65 (2015)
- Ojima-Kato, T. et al., Sci. rep. 7, 13979 (2017)
- Ojima-Kato, T. et al., Antibodies, 7, 38 (2018)
- Ritthisan, P. et al., J. Biosci. Bioeng. 126, 705-709 (2018)
- Ojima-Kato, T. and Fukui, K. et al. Protein Eng.Des.Sel. 29, 149-157 (2016)
- Ojima-Kato, T. et al., J. Biosci. Bioeng. 123, 540-546 (2017)
- Ojima-Kato, T. et al., J. Biol. Chem. 299, 104676 (2023)

謝辞 これらの研究は、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」、名城大学農学部および名古屋大学大学院生命農学研究科にて実施したものです。博士取得を志すきっかけを与えていただきました佐分利亘先生 (北海道大学)、そして日本食品化工株式会社研究所の皆様へ深く御礼申し上げます。また、研究遂行にあたり、ご指導ご鞭撻を賜りました、松井博和先生 (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、現理化学研究所)、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、福山裕子博士 (株式会社島津製作所)、皆川洋子先生 (愛知衛生研究所)、飯島義雄先生 (神戸環境保健研究所)、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)、坂田淳子先生 (大阪健康安全基盤研究所) 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知の拠点あいちの皆様、名古屋大学生命農学研究科分子生物工学研究室の中野秀雄先生、兒島孝明先生 (現名城大学)、スタッフおよび学生の皆様へ深く感謝いたします。