

主論文要約

産業関連酵素の微生物生産とその利用法に関する研究

Study on the microbial production of industrially-relevant proteins and their applications

名古屋大学 大学院生命農学研究科 生命技術科学専攻

生物機能技術科学講座 分子生物工学研究分野

森 昭博

1. 序

現在、酵素、抗体、表面タンパク質、受容体などの様々なタンパク質が医療や工業で用いられており、その世界市場は大きく拡大しつつある。今後、微生物によるタンパク質のさらに高効率な生産が求められると考えられるが、通常、各タンパク質に合わせた宿主、発現条件（分泌生産または細胞内）の検討が必要である。本論文においては、微生物によるタンパク質の分泌生産効率を向上させる汎用的手法を検討した。また最も産業的に有用なタンパク質の1つである抗体と酵素とを、両方の活性を保持したまま融合させる手法を開発した。さらに抗体-発光タンパク質融合体を利用した新規免疫学的検出手法を開発を行った。

2. シグナルペプチド最適化ツールを用いたタンパク質分泌生産の最適化

分泌タンパク質生産の高効率化を容易に行うことができる汎用的手法として、新規のシグナルペプチド(SP)最適化法である SPOT 法(Signal Peptide Optimization Tool)を開発した。タンパク質の分泌生産は、精製が容易である、宿主への細胞毒性が低減できるなどのメリットがある。SP はタンパク質の分泌効率に大きな影響を与えることが知られており、その最適化が目的タンパク質の高効率な分泌生産に重要である。しかし従来の SP 最適化法は制限酵素処理を必要とすることから、N 末端に SP 以外の介在配列が付加され、目的タンパク質の機能や3次元構造に悪影響を与えることが知られていた。そこで本研究では、目的タンパク質の N 末端に介在配列が付加されない SP 最適化方法である SPOT 法を開発した。SPOT 法とはリモートカッター制限酵素と、In-Fusion Cloning 反応を組み合わせた方法である(Fig. 1)。まず、(1)各 SP を PCR により増幅後、(2)リモートカッター制限酵素による処理に供して SP 配列に由来しないスペーサー配列を切断する。(3)SP ライブラリーに目的タンパク質をコードする遺伝子の 5' 末端からなるリンカー配列をライゲーション反応によって付加させ、(4)In-Fusion Cloning 反応により目的タンパク質の上流にクローニングを行う。

SPOT 法により、モデル宿主微生物として *Saccharomyces cerevisiae* を用いて、モデルタンパク質 *Aspergillus oryzae* 由来 β -ガラクトシダーゼの分泌生産に適した SP の選択を試みた。SP ライブラリーとしては、*S. cerevisiae* 由来の細胞外領域及び細胞壁に局在する 60 種類のタンパク質由来の SP から構成されたものを利用した。

その結果、最も高効率な SP として WT の SP と比較して 2.0 倍の分泌量を示す AGA2 由来の SP を獲得した。さらに SPOT 法を他の産業的に有用なタンパク質である *Phanerochaete chrysosporium* 由来エンドグルカナーゼに適用したところ、最も高効率な SP として、WT の SP よりも 2.1 倍分泌量を向上させる YGP1 由来の SP を獲得することに成功した。

また、2つのタンパク質で分泌効率上位のクローンの SP の種類は異なっていた。LacA に対しては、上位のクローンから見出された CRH1 が、PcEG では、中位のクローンから検出された。YGP1、SED1 は PcEG に対して高い適合性を示したものの、LacA の上位のクローンからは見出されなかった。各タンパク質と高い適合性を持つ SP を SPOT 法により選択できることが分かった。

本法は *S. cerevisiae* 以外の様々な宿主菌株、目的タンパク質にも応用可能であり、他の産業上有用なタンパク質を高効率に分泌生産できる SP の選択が期待される。

3. 抗体-標識タンパク質融合体の開発

酵素修飾された抗体は、ELISA や Western blotting での検出に汎用されている。しかし、これまで抗体への酵素の付加は主に化学修飾により行われてきており、「抗体一分子に対する修飾酵素分子数を制御できない」、「修飾のための煩雑な実験操作が必要になる」などのデメリットが存在する。そこで、本章では Fab 抗体に遺伝子的にルシフェラーゼ (Luc) を融合させた Fab-Luc 融合体を開発した。また、融合タンパク質などの分泌に適さないタンパク質は、一般的に微生物の菌体内で生産されていることから、*Escherichia coli* の菌体内で Fab 抗体-標識タンパク質融合体を発現させた。

マウス由来抗 *E. coli* 0157 Fab 抗体、ウサギ由来抗 *Listeria*

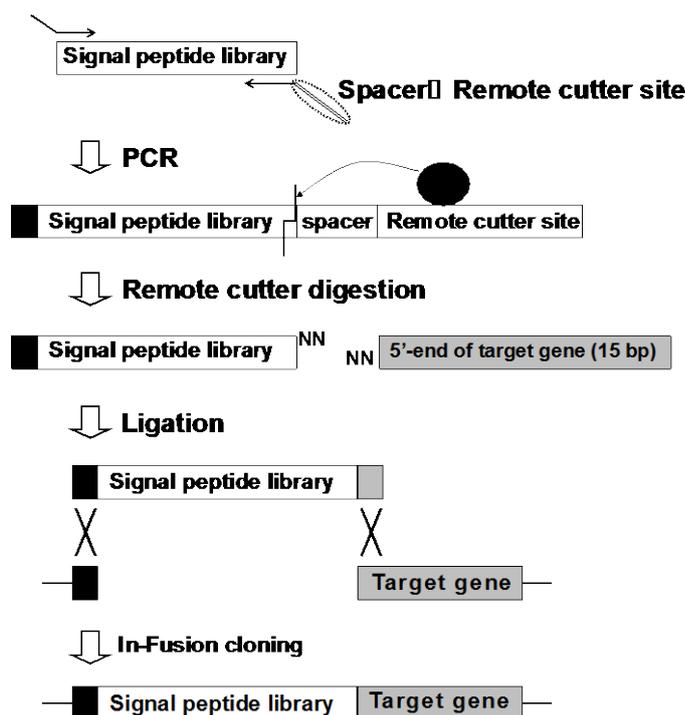


Fig. 1 Procedure of Signal Peptide Optimization Tool (SPOT). (Mori *et al.* *J. Biosci. Bioeng.*, 120 518-525 2015)

monocytogenes Fab 抗体にルシフェラーゼ (Luc) を融合させた Fab-Luc 融合体を *E. coli* で生産し、それらを検出抗体として ELISA を実施したところ、Luc 由来の発光により抗原の検出に成功した。続いて、Luc 以外のタンパク質の Fab 抗体への融合を検討した。GFP をマウス由来抗 *E. coli* 0157 Fab 抗体に付加した Fab-GFP 融合体を検出抗体として ELISA を実施したところ、GFP 由来の蛍光によっても抗原の検出に成功した。

4. 新規ホモジニアス免疫測定法の開発

ホモジニアス免疫測定法とは、洗浄作業等の分離操作を行わない均一系による免疫測定法である。最もよく用いられる免疫測定法である ELISA は高感度で高選択性であるものの、抗原のコーティングや洗浄作業を伴って人手や時間がかかる。ホモジニアス免疫測定法では、煩雑な操作を必要とせず、より短い時間で検出が可能であり、盛んに研究されている。また、一般に用いられている免疫測定法としてはラテックス法やイムノクロマト法があるが、夾雑物に影響を受けやすい、定量性がないなどの欠点がある。

ここで考案した BINGO (Bioluminescent Interference Gathering Optical) assay は抗体-Luc 融合体と、融合体の発光を吸収可能な色素の使用を特徴とする。検体中に抗原が存在する場合、測定容器底面に固定化された抗体や、遠心分離によって底部に抗原が集められ、抗体-Luc 融合体がそれらの抗原を認識する (Fig. 2)。測定系には融合体の発光を吸収するための色素が加えられているが、融合体が抗原に結合した場合は測定容器底部に偏在するため、色素の影響を大きく受けることなく、発光が測定容器下部の光電子増倍管 (PMT) に到達して検出される。抗原が存在しない場合は、融合体は測定系中を分散しており、その発光は色素によって吸収される。最適な色素として、Luc の活性を阻害せず、Luc の発光波長を吸収するブルーデキストランを選択した。

ビオチン-ストレプトアビジン結合を利用したモデル系の実験により、BINGO assay の原理を実証することができた。さらに抗原抗体反応を用いて *E. coli* 0157 の検出を試みた結果、 4.0×10^4 の菌の検出に成功した。BINGO assay は、他の食中毒菌の検出や臨床診断など、他の抗原への応用も可能であり、今後の発展が期待される。

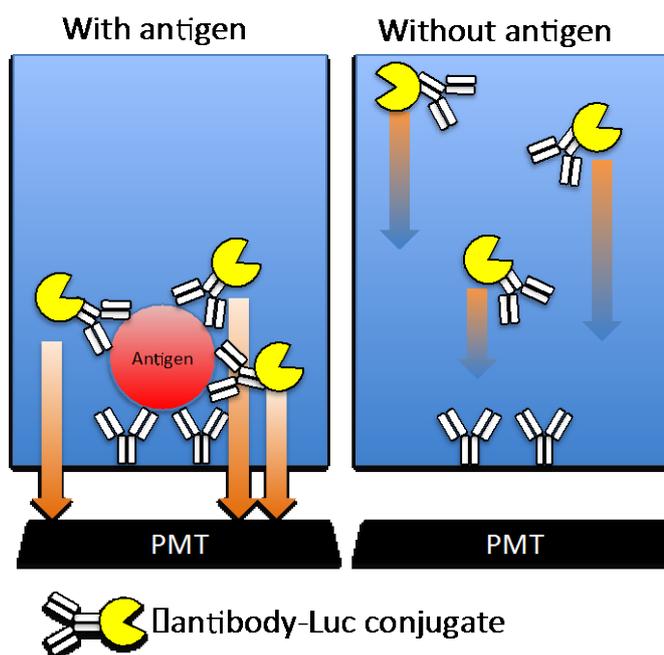


Fig. 2 Illustration of BINGO assay.