

論文審査の結果の要旨および担当者

報告番号	※	第	号
------	---	---	---

氏 名 森 昭 博

論 文 題 目

産業関連酵素の微生物生産とその利用法に関する研究

論文審査担当者

主 査	名古屋大学教授	中 野 秀 雄
委 員	名古屋大学教授	北 島 健
委 員	大阪大学教授	黒 田 俊 一
委 員	名古屋大学准教授	岩 崎 雄 吾
委 員	名古屋大学助教	兒 島 孝 明

論文審査の結果の要旨

森昭博は、産業関連酵素の微生物生産とその利用法に関する研究に取り組み、タンパク質の分泌生産の高効率化が可能であるシグナルペプチド(SP)最適化ツールの開発、微生物細胞内における抗体-酵素融合タンパク質の作製、新規ホモジニアスイムノアッセイ法の開発を行った。以下にその要旨を記載する。

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ている。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。

2章では、分泌タンパク質生産の高効率化が容易に可能である新規のSP最適化法を開発した。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う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(Signal Peptide Optimization Tool)法を開発した。本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*Phanerochaete chrysosporium*由来エンドグルカナーゼにも適用したところ、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。2つのタンパク質で分泌効率上位のクローンのSPの種類は異なっており、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にも応用可能である。

3章では、*E. coli*細胞質内でルシフェラーゼ(Luc)修飾抗体を作製することを目的とした。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」などのデメリットが存在する。一方、中野らの研究グループでは、Fab抗体の重鎖・軽鎖それぞれのC末端に互いに接着するペプチドロイシンジッパー(LZ)を付加することによ

り、安定な活性を保持した Fab 抗体「Zipbody」を開発し *E. coli* で生産することに成功している。本章では、Zipbody に遺伝子的に Luc を融合させた Zipbody-Luc 融合体を *E. coli* にて作製し、その機能を評価した。

まず、マウス由来抗 *E. coli* 0157 Zipbody に Luc を融合させた Zipbody-Luc 融合体を作製し、これを検出抗体として 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。一方、LZ が付加されていない同 Fab 抗体に Luc を融合したのでは、western blotting で調べた発現量が Zipbody-Luc 融合体と同等であったにも関わらず、その検出シグナルは著しく低下した。このことから、酵素活性および抗原結合活性両方を保持する酵素標識抗体を作製するには、LZ が必要であることが分かった。さらに、ウサギ由来抗 *Listeria monocytogenes* の Zipbody に Luc を融合した Zipbody-Luc 融合体を検出抗体とした ELISA においても同様に抗原の検出に成功した。また、Zipbody を Luc 以外のタンパク質として、蛍光タンパク質 GFP とマウス由来 Zipbody を融合した Zipbody-GFP 融合体を作製した。本融合体においても、ELISA にて抗原検出することができた。すなわち、本研究では、マウスおよびウサギ由来の Zipbody に Luc または GFP を融合した状態で、*E. coli* 内で活性型として生産することができた。このことから、Zipbody の由来生物種を問わず、様々な検出用タンパク質を融合できることが示唆された。本章で開発した Zipbody と他の酵素等との融合体を「Zipbodyzyme」と命名した。

4 章では、3 章で開発した Zipbodyzyme を利用可能な、新規のホモジニアス免疫測定法である BINGO (Bioluminescent Interference Gathering Optical) assay を開発した。免疫測定法は、食品の安全管理や、病気の診断などで、幅広く用いられている。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り、その簡便さから従来の免疫測定法に代わる技術として注目されている。

ここで考案した BINGO 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、測定容器底部に集められた抗原を、抗体-Luc 融合体が認識する。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。本章ではビオチン-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 の原理を実証した。さらに抗原抗体反応による *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。

以上のように森昭博は本研究において、タンパク質の分泌生産を高効率化できるシグナルペプチド最適化法を確立した。また、細胞内での抗体-酵素融合タンパク質の作製に成功し、その融合タンパク質が利用可能な新規のホモジニアスイムノアッセイ法を開発した。

本研究によって得られた成果は、今後のタンパク質の微生物生産やタンパク質工学および生化学的検査手法の発展に寄与するところが多い。よって本委員会は本論文が博士(農学)の学位論文として十分価値あるものと認め、論文審査に合格と判定した。