

## 論文の内容の要旨

論文題目           トランスグルタミナーゼの高発現と  
                          リフォールディングに関する研究

氏名                   横山 敬一

食品加工分野でトランスグルタミナーゼ（以下 TGase）という酵素の有用性が認知され、広範に使用されるようになってきている。TGase は、タンパク質、またはポリペプチド鎖中の Gln 残基の  $\gamma$ -カルボキシアミド基と各種一級アミノ基間のアシル転移反応を触媒する酵素である。タンパク質中の Lys 残基の  $\epsilon$ -アミノ基も一級アミンとして作用し、タンパク質分子内、および分子間で  $\epsilon$ -( $\gamma$ -Glu)Lys 架橋結合を形成する。この反応により、タンパク質が架橋重合化し、食品などの物性変化や接着などの現象が起こる。TGase は、脳、肝臓、腎臓、表皮、血液等といった動物の諸組織、血液細胞及び血漿等に広範に存在し、止血血栓、創傷治癒、脳や神経系の病態（アルツハイマー病、ハンチントン病）、神経系の形成と再生、皮膚の形成と先天性疾患（先天性葉状魚鱗癬）、細胞の増殖、分化、アポトーシス等、様々な生命現象に関与していることも分かっているが、生理的な役割については未解明な部分が多い。

一方、本酵素の利用に関する研究が京大グループ及び味の素（株）グループによって展開され、食品加工分野のみならずその周辺分野にも幅広く応用可能であることが明らかにされてきている。さらに、味の素（株）及び天野エンザイム（株）の共同研究グループは、TGase 活性を有する微生物を丹念に探索した結果、その産生菌を発見し、通常の醗酵生産法による量産化を可能にした。

微生物から生産される TGase は、1988 年、*Streptoverticillium mobaraense* S-8112 株の培養ろ液中に発見された。それまで知られていた TGase はすべて動物、特に哺乳類の臓器、血液起源であったため希少かつ高価であり、TGase を実用的に使用することは困難と考えられていた。大量生産の容易な微生物起源 TGase（以下 MTGase）の発見は、実用的なコストでこの酵素を食品加工などに利用可能にする画期的なものであると言える。

MTGase の特性について概説すると、作用 pH の至適条件は pH 6~7 であるが、広い pH 範囲で作用することが特徴で、安定性も pH 5~10 と広範囲であった。酵素としては、比較的耐熱性があり、分子量が約 40,000、等電点が 8.5、 $\text{Ca}^{2+}$  イオンの存在量により活性に影響がないことなどが、従来の動物組織由来の  $\text{Ca}^{2+}$  依存性 TGase と異なっていた。TGase の利用を考えた場合、 $\text{Ca}^{2+}$  濃度に左右されないのが、食品加工などには、非常に有利と言える。

MTGase の基質特異性は、合成基質を用いた一連の解析により、グルタミン残

基単独、あるいは、アスパラギン残基には全く反応しないこと、また、グルタミン残基の周りの配列によって反応性が大きく変わることが分かっている。食品タンパクを基質とする場合、カゼインやゼラチンなど、ランダムな構造を多く含み、プロテアーゼのよい基質であるタンパク質、大豆タンパク質や小麦タンパク質のようにリジン残基やグルタミン残基を多く含むタンパク質が良い基質となる一方、ラクトアルブミン、オボアルブミン、ミオグロビン、アクチン等はあまりよく反応せず、よい基質ではない。しかしながら、これら反応性の悪いタンパク質でも、熱や pH で変性させることでアミノ酸の存在環境が改変され、反応性が改善される例がある。MTGase が反応することができるタンパク質は、動物由来 TGase に比べ、非常に広範囲のものであった。動物由来 TGase は基質特異性が厳密であるのに対して、MTGase は基質特異性が広いと言える。基質特異性の広さが、MTGase の特徴であり、広範な食品タンパク質に適用可能であった理由であり、食品以外の様々な用途に適用範囲を広げようと考えた場合、最も有用な TGase であると考えられる。

味の素（株）グループでは、さらに、基質特異性や至適温度などで特色を持った多くの TGase を見出すため、自然界より新規な TGase を探索した。その中でマダイ肝臓由来 TGase (FTGase) は、一次配列、分子量、Ca 要求性である点で動物由来 TGase と類似していることから、立体構造、基質特異性が動物由来のものと同様であると予測され、動物由来 TGase のモデルとして構造、機能相関研究に使用できると考えられた。一方、MTGase は、一次配列、分子量の点で、動物由来 TGase とは全く類似性がなく、新規な立体構造を持つ TGase であることが予測された。FTGase、MTGase は、基質特異性等が異なる代表的な 2 種類の TGase (動物由来 TGase、微生物由来 TGase) のモデルとなると考えられ、TGase の構造と機能の関連性を研究する材料として最適であると思われた。

以上のような背景から、TGase の構造、機能相関を解明することを目的として研究を開始した。本研究においては、大腸菌でマダイ肝臓由来 TGase と MTGase の高発現系を構築した。マダイ肝臓由来 TGase は、単独では大腸菌菌体内で不溶性顆粒となるものの、菌体内に分子シャペロン DnaJ を共発現させることにより、菌体内に可溶性の形で高発現させることに成功した。大腸菌分子シャペロンのうち、DnaK と GroEL が過剰発現した異種タンパク質のフォールディングに重要な機能を果たしていることは既に知られていたが、DnaJ については初めての知見である。

MTGase は、大腸菌発現用に遺伝子の全合成を行うことにより、成熟型 MTGase の配列を持つ不溶性顆粒の形で、MTGase を大腸菌内に高発現させることに成功した。さらに、大腸菌内で不溶性顆粒の形で大量発現した MTGase を効率的にリフォールディングする方法を確立した。効率的なリフォールディングを行うためには、酸性で希釈を行い、溶解度の高い状態（リフォールディング中間体）を経由させることが重要であった。リフォールディング中間体の形成には時間がかかり（約 2 時間）、このリフォールディング中間体を経由しないと効率的なリフォールディングができないことを明らかにした。顆粒に含まれる不純物の

影響を排除するため、リフォールディング条件の検討には精製した MTGase の凍結乾燥パウダーを用いていたが、確立した条件を不純物を含む顆粒に適用したところ、精製パウダーを用いた時よりは若干タンパク質回収率が下がるものの、60~70%のタンパク質回収が得られた。酸性で希釈し、一定時間後、pH を中性にシフトするだけの簡単な操作で、この回収率が得られることから、将来的な工業スケールでの実施に耐えうる工程であることが示せた。このリフォールディング方法を用いて、立体構造解析用に精製 MTGase を大量調製した。

リフォールディングのポイントは、酸性で希釈し保持することによって中間体を形成させることであったが、この中間体は、天然構造とは異なること、pH をシフトしないと天然構造へと移行しないこと、天然構造を酸性にしてもこの構造にはならないことから、リフォールディング中間体であると結論付けた。この中間体は、天然構造の約 35%の活性を持ち、CD による解析により、2次構造は天然構造とほぼ同じで3次構造に違いが見られること、超遠心による沈降速度実験で、この中間体は、天然構造より膨張した構造をとっていることを明らかにした。この中間体は典型的なモルテングロビュール状態をとっているリフォールディング中間体であると考えられた。

本研究により、タンパク質工学的な TGase の改変研究と TGase の高純度精製標品の大量調製が可能となり、実際に、マダイ肝臓由来 TGase と MTGase の両方ともに、既に、X線結晶構造が解明されている。マダイ肝臓由来 TGase の立体構造は予想通り、動物由来 TGase と類似性の高いものであった。MTGase の立体構造は、類似の構造が知られていない全く新規なものであった。さらに、本研究以降に、NMR法を用いた TGase の基質特異性を解析する手法（E L T法）を新たに構築した。これまで、TGase 反応によって実際にどの Gln 残基に Lys 残基が導入されたかは、ペプチドマッピングによって決定するしか方法がなかった。ペプチドマッピングは非常に煩雑であり、また、反応性について議論することはできなかった。この E L T法によって、TGase の基質特異性の違い、反応性の違いを詳細かつ迅速に解析することができるようになった。本研究を通して得られた結果を基に、現在、TGase という架橋酵素の構造、機能相関の解明研究が進められており、いずれ、改変型 TGase の創出による TGase の機能拡大、食品以外への TGase の用途拡大に資するようになると期待している。