

論文の内容の要旨

論文題目

コリネ型細菌における異種タンパク質分泌生産に関する基盤研究及びその応用

氏名

板屋 寛

これまで有用タンパク質の生産系として、*Escherichia coli*、*Bacillus*等の原核生物、酵母、糸状菌等の真核生物、昆虫細胞、動物細胞等の高等真核生物、無細胞合成系や生物体そのものの利用など、現在までに様々な生産系が開発されてきており、目的に応じて各発現系が選択されている。一方で産業利用に関しては生産量とコスト面を考慮すると、一般的には微生物を用いたタンパク質生産系が好ましいと考えられており、更にはダウンストリームプロセスまで考慮に入れると、培地中に目的タンパク質を分泌生産させる系が好ましいと考えられている。しかしながら、実用化レベルに達している異種タンパク質分泌系は、いずれも未だ、全ての異種タンパク質を効率よく生産できる汎用的な系としては確立されておらず、産業的に効率的な生産方法が望まれていながら既存の系では生産できないタンパク質も数多く存在する。そこで本研究は、従来よりアミノ酸発酵に用いてきた *Corynebacterium glutamicum* ATCC13869 株を用いた新規タンパク質分泌生産系を、より効率的で汎用的な系へと発展させていく事を目的として検討を行った。

第1章では、序論として、分泌生産させる放線菌 *Streptomyces mobaraensis* 由来のトランスグルタミナーゼ (MTGase)、並びに原核生物におけるタンパク質輸送系について述

べた。トランスグルタミナーゼは、タンパク質中の Gln 残基と Lys 残基との間に ϵ -(γ -Glu)-Lys 架橋を形成させる酵素であり、これまで食品産業においてタンパク質改変用途で多方面に利用されている一方で、今後は更にファインケミカル分野等、幅広い分野での産業利用が期待されている。現在、MTGase の商業生産は MTGase の由来菌株である *S. mobaraensis* にて行われているが、より効率的な生産方法が望まれている。

原核生物におけるは、最も一般的なタンパク質の膜輸送系として Sec 系輸送経路が存在しており、*E. coli* や *C. glutamicum* のみならず高等動物まで広く進化的に保存されている。これまでに、この Sec 系を用いて様々な産業用酵素・タンパク質が生産されている。この Sec 系分泌経路の特徴は、細胞内で立体構造をとらない“unfold”な状態の新生ポリペプチド鎖が、細胞膜上ないしは細胞内に存在する専用の装置 (SecYEG 及び SecA, SecDF など) を介して ATP の分解エネルギー依存的に膜輸送される事にあり、Sec 系により膜透過した新生ポリペプチド鎖は、膜輸送後に然るべき立体構造を形成して“fold”したタンパク質となる。ところが、近年になって新しい分泌経路である Twin Arginine Translocation pathway (Tat 系) が、植物細胞の葉緑体のチラコイド膜輸送において見出された。この Tat 系は Sec 系とは異なり、細胞内で予め“fold”された分泌タンパク質がそのまま細胞膜を透過する事、及びプロトン濃度勾配のエネルギーを利用する点を最大の特徴としている。Tat 系には、Sec 系とは異なる専用の分泌装置が必要であるが、その構成については生物種によって多様性に富んでおり、例えば *E. coli* では、膜タンパク質である TatA、TatB そして TatC が Tat 系の機能発現に必須であるとされている。一方、*C. glutamicum* における Tat 系についての解析はこれまで報告されていない。

第 2 章では、*C. glutamicum* ATCC13869 株以外の他のコリネ型細菌における Sec 系輸送経路を用いたタンパク質分泌能を調べた。プロ配列部分を含むプロ MTGase の分泌能を指標として調査した結果、ほとんど全てのコリネ型細菌において効率的なプロ MTGase の分泌生産が可能である事を見出し、様々なコリネ型細菌が異種タンパク質分泌能に優れている事を明らかにした。また、用いるシグナルペプチドの違いにより各コリネ型細菌のプロ MTGase 分泌量に違いが見られた。その中でも、特に *C. ammoniagenes* ATCC6872 株のプロ MTGase 分泌能が最も高く、ジャーファーメンターを用いた培養にて培養 71 時間で約 2.5 g/L のプロ MTGase 分泌量となる事を確認し、工業スケールのタンパク質生産に

おける有望な宿主となりうる事を示した。

第3章では、*C. glutamicum* における Tat 系輸送経路についての解析を実施した。*C. glutamicum* のゲノム配列を調べた結果、*tatA* 遺伝子、*tatB* 遺伝子と *tatC* 遺伝子に加えて *tatE* 遺伝子が見出されたが、これまで *tatE* 遺伝子ホモログはグラム陰性腸内細菌のゲノム中でしか見つかっていない。*C. glutamicum* の Tat 系が機能しているかを評価する為に、*C. glutamicum* ATCC13869 株の *tatA*、*tatB*、*tatC* 及び *tatE* 遺伝子をクローニングし、各々の *tat* 遺伝子の単独欠損株及び *tatA* と *tatE* の 2 重欠損株を構築した。さらに *E. coli* の TorA (トリメチルアミン-N-オキシド還元酵素) タンパク質由来の Tat 系シグナルペプチドと融合させた GFP を用いる事によって、Tat 系輸送経路が機能する為には TatA と TatC が必須である事、そして TatA と TatE は機能的に重複している事を明らかにした。*C. glutamicum* の TatA の C 末端には特徴的なグルタミン残基クラスターが存在するが、TatA の機能にはこのグルタミン残基クラスターは必要でない事を示した。また、グラム陰性細菌の TatB とは異なり、*C. glutamicum* の TatB は必須ではないが、Tat 系を用いた最も効率の良いタンパク質分泌には必要である事を見出した。一方、*Arthrobacter globiformis* 由来イソマルトデキストラナーゼ (IMD) のシグナルペプチドには、Tat 系シグナルペプチドに共通の典型的な “Arg-Arg” モチーフが含まれているが、自身の IMD シグナルペプチドを持つ IMD および、この IMD シグナルペプチドと融合させたプロ MTGase と GFP の全てが *C. glutamicum* の Tat 系輸送経路にて分泌される事を示した。これらから、*C. glutamicum* における Tat 系輸送経路の存在を明らかにし、異種タンパク質の工業生産に *C. glutamicum* の Tat 系が利用出来る可能性について示した。

第4章では、グラム陰性細菌 *Chryseobacterium proteolyticum* 由来のプロテイングルタミナーゼ (PG) の *C. glutamicum* における分泌生産を検討した。PG は、不溶性の小麦グルテンを含む多くの基質タンパク質中のグルタミン残基の脱アミド化が可能であり、食品産業において潜在的な利用可能性があるが、*Chryseobacterium proteolyticum* 自身の PG 分泌生産量は非常に少なく、工業生産する上での大きなネックとなっている。そこで、*C. glutamicum* において、プロ配列部分を含む PG 生産の可能性について評価を行った。まず、PG 自身のシグナルペプチドを用いて Sec 系にて生産を試みたところ、PG の分泌生産は見られなかった。一方、シグナルペプチドを Tat 系依存シグナルペプチドに置換して、Tat

系にて生産を試みたところ、プロ PG の効率的な分泌生産に成功した。また、これまで主に Sec 系の宿主として用いてきた *C. glutamicum* ATCC13869 株由来の高分泌変異株 YDK010 株から野生株に変更する事でプロ PG の蓄積量は 183 mg/L に達した。更に放線菌 *S. albogriseolus* 由来サチライシン様セリンプロテアーゼである SAM-P45 によってプロ PG のプロ配列部分を切断する事により、プロ PG を活性型 PG に転換する事に成功した。以上により、Sec 系など他の輸送経路では分泌されないタンパク質を工業スケールで生産させる方法として、*C. glutamicum* の Tat 系輸送経路の利用が有効である事を初めて示した。

第 5 章では、*C. glutamicum* における各 *tat* 遺伝子の過剰発現の効果について検討を行った。プロ PG を用いた検討の結果、TatC もしくは TatAC を過剰発現させるとプロ PG の分泌量が 3 倍以上になり、TatABC を過剰発現させると 10 倍以上のプロ PG 分泌量になる事を発見した。この結果により、*C. glutamicum* における Tat 系依存性タンパク質の分泌発現においては、TatC 量が最初のボトルネックで TatB 量が 2 番目のボトルネックである事を示していると考えられた。加えて、*C. glutamicum* において TorA シグナルペプチドを用いて Tat 系輸送経路にて分泌されたプロ MTGase の分泌量は TatABC を過剰発現させる事により、Sec 系輸送経路での分泌生産時を上回る高い分泌量となる事を見出した。これらから、TatABC を過剰発現させる事により Tat 系輸送経路を利用した異種タンパク質の分泌効率を大幅に改善できる事を明らかにした。

第 6 章では本研究結果を総合的に考察した。本研究において、*Corynebacterium* 属細菌が全般的に高いプロ MTGase 分泌能を有し、*Corynebacterium* 属細菌が異種タンパク質分泌の宿主として有用である事を見出し、中でも *C. ammoniagenes* ATCC6872 が今後の有望な宿主となりうる事を見出した。また、*C. glutamicum* における Tat 系が機能している事を明らかにし、その最小機能単位は TatA と TatC であるが、最大機能の発現には TatB も必要である事を明らかにした。更に、Tat 系を用いる事によって Sec 系では分泌されない GFP, プロ PG の分泌発現に成功し、Tat 系を *C. glutamicum* のタンパク質生産に応用できることを初めて明らかにした。そして、TatABC の増幅によりプロ PG 及びプロ MTGase の高分泌化に成功し、Tat 系を用いた異種タンパク質発現では、分泌装置が律速因子となる事を見出した。これらの知見は、今後の *C. glutamicum* を用いた工業的なタンパク質分泌生産への応用が大いに期待される。