

[ 別紙 2 ]

## 論文審査の結果の要旨

申請者氏名 板屋 寛

---

様々な生産系によって有用タンパク質の生産が試みられているが、生産量とコストを考慮すると微生物を用いた分泌生産系が好ましいと考えられている。一方、これまでに実用化レベルに達している異種タンパク質分泌系では生産できない有用タンパク質も数多く存在する。本研究は、産業的に利用されている *Corynebacterium* 属細菌に着目し、新しい有用タンパク質分泌系の宿主としての可能性を検討したものであり、6章よりなる。

第1章は序論であり、各種の有用蛋白質生産系、*Corynebacterium* 属細菌の性質と産業利用、本研究で分泌生産を試みるトランスグルタミナーゼ、並びに原核生物のタンパク質分泌系である Sec 輸送系と Tat 輸送系の概略が述べられている。Tat 輸送系は、シグナルペプチドのアミノ末端領域にアルギニン残基が2個連続していることが特徴であり、そのため、Twin arginine translocation pathway (Tat 輸送系) と呼ばれる。Tat 輸送系は、Sec 輸送系とは異なり、細胞内で高次構造を形成したタンパク質を分泌することが特徴である。

第2章では、放線菌 *Streptomyces mobaraensis* のトランスグルタミナーゼを *Corynebacterium* の Sec 輸送系で分泌生産させることを検討した。トランスグルタミナーゼは、食品の物性・風味の改善、肉の結着やゲル化食品など、食品産業において利用されている。*S. mobaraensis* を用いてトランスグルタミナーゼの商業生産が行われているが、より効率的な方法が望まれている。プロ配列部分を含むプロトランスグルタミナーゼを、コリネ型細菌の Sec 系によって分泌生産させた結果、ほとんどのコリネ型細菌が効率良くプロトランスグルタミナーゼを分泌生産する事を見出した。中でも、*C. ammoniagenes* ATCC6872 株の分泌能が最も高く、ジャーファーメンターを用いた培養によって、71 時間の培養で約 2.5 g/L のプロトランスグルタミナーゼが分泌生産され、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が示された。

第3章では、*C. glutamicum* における Tat 輸送系の機能を解析し、有用タンパク質生産に利用する可能性について検討した。*C. glutamicum* の Tat 系遺伝子群は、*tatA*、*tatB*、*tatC* に加えて *tatE* を含む。これまでに TatE 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* ATCC13869 株の *tat* 遺伝子欠損株を構築し、*Escherichia coli* のトリメチルアミン-N-オキシド還元酵素(TorA)タンパク質に由来する Tat 輸送系シグナルペプチドと融合させた GFP を用いて解析した結果、Tat 経路が機能する最小構成単位としては TatA と TatC が必須である事、TatB は活性を促進すること、TatA と TatE は機能的に重複している事を明らかにした。また、*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、機能には必要ない事が示された。一方、Tat 輸送系で分泌されると考えられる *Arthrobacter globiformis* のイソマルトデキストラナーゼや、このシグナルペプチドと融合させたプロトランスグルタミナーゼ並びに GFP が *C. glutamicum* の Tat 輸送系で分泌される事を示した。これらの結果から、高次構造を形成した異種タンパク質の工業生産に *C. glutamicum* の Tat 輸送系が適用出来ることが示さ

れた。

第4章では、*C. glutamicum* の Tat 輸送系を用いて工業スケールでの異種タンパク質生産が可能である事を示した。グラム陰性細菌 *Chryseobacterium proteolyticum* によって分泌されるプロテイングルタミナーゼ (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るため、食品産業において潜在的な利用の可能性がある。そこで、*C. glutamicum* において、プロ配列部分を含む PG の分泌生産について検討した。PG 自身の Sec 輸送系シグナルペプチドを用いて生産を試みたが、PG は分泌されなかった。一方、Sec 輸送系のシグナルペプチドを様々なバクテリア由来の Tat 輸送系シグナルペプチドに置換したところ、プロ PG の効率的な分泌生産に成功した。また、宿主を検討することにより、プロ PG の分泌生産量は 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。これらの結果は、Sec 輸送系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 経路が有望であることを示している。

第5章では、*C. glutamicum* において TatABC を過剰発現させる事により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。*Chryseobacterium proteolyticum* 由来プロ PG は TatABC の過剰発現により、10 倍以上の分泌量になる事を明らかにした。さらに、TorA シグナルペプチドによるプロトランスグルタミナーゼの分泌は、TatABC を過剰発現させると、Sec 輸送系を上回る高い分泌量となる事を見出した。

第6章は以上の研究を総合的に考察したものであり、産業的に利用されている *Corynebacterium* 属細菌が有用タンパク質の分泌生産の宿主として優れていることを考察している。

以上本論文は、*Corynebacterium* 属細菌が有用タンパク質分泌生産系に優れた宿主となりうることを明らかにしたものであり、学術上、応用上貢献するところが少なくない。よって審査委員一同は、本論文が博士（農学）の学位論文として価値あるものと認めた。