細胞表層工学による酵母細胞の新しい分子育種

細胞表層工学は、細胞表層にターゲティングされるタンパクと外来タンパクとの融合タンパクをコードする遺伝子を遺伝子工学的に作成することによって、任意のタンパクを細胞表層上に発現させようとする技術である。

近年、酵素をはじめとする様々なタンパクを生きた細胞の表面に安定に提示する技術として注目を集めている。

酵母を利用した細胞表層工学の第一人者である筆者に細胞表層工学の原理と応用、そして将来の可能性について詳細に解説していただいた。

植 田 充 美, 田 中 渥 夫

はじめに

最近、アメリカのベンチャー企業である BC インターナショナル (BCI) がアメリカ国内で砂糖キビの搾りかすなどの農業廃棄物を原料にした安価なエタノールの量産に世界で初めて踏み切ったという記事が世間を賑わした。身近な存在であるエタノールの燃料としてのエネルギー世界戦略の展開のスタートを予感させるとともに、エタノール生産においてその原料 (基質) やエタノールへの変換に関わる生体触媒 (酵素や微生物) には、まだまだ、潜在的な開拓の余地をはらんだ魅力が豊富に存在するのを感じずにはおれない。我々は、「細胞表層工学 (Cell Surface Engineering)」という新しいバイオテクノロジーの一分野を確立し、色々な方面にこのシステムの適用を企ててきている。ここでは、その中から、世界的なエネルギー生産戦略の一つとしてのエタノール生産を取り上げ、デンプンやセルロースといった地球規模で存在している原料をエタノールに変換する新しい酵母細胞の分子育種のアプローチを提唱してみた。

「細胞表層工学 (Cell Surface Engineering)」とは、細胞表層、即ち、細胞膜や細胞壁に着目して、これらの領域に輸送局在化するタンパクの機能する「場」を

与える分子情報を活用した技術により開かれた分野である。この技術を背景にして、外来タンパクを細胞膜の外側や細胞壁にターゲティングさせ、未開拓フロンティアエリアである細胞表層へ新機能を賦与して、従来の細胞をこれまで基質にできなかったものを基質にできる新機能を装備した細胞に生まれ変わらせた (第1図)。この分子育種された酵母細胞では、細胞表層に発現提示された酵素・タンパクがプロモーターの活性化により生産されるため、再生機能を有するという画期的なメリットがあり、これまでの培養工学にも新しい生体触媒としてのアイデアを提供できると考えられた。

1. 細胞表層工学 (Cell Surface Engineering)

酵母 *Saccharomyces cerevisiae* の細胞表層タンパクは主に、3つに大別できる。すなわち、細胞壁と共有結合しているタンパクと細胞壁間隙に浮遊しているタンパクと細胞膜と相互作用しているタンパクである (第2図)。細胞壁は、主に、マンナンタンパクと β -グルカンの二層構造になっているが、マンナンタンパクは、SDS で抽出される非共有結合で細胞壁に結合しているマンナンタンパクとグルカナーゼで抽出される共有結合で細胞壁に結合したマンナンタンパクの2種類か

Novel Molecular Breeding of Yeast by Cell Surface Engineering

Mitsuyoshi UEDA, Atsuo TANAKA

Laboratory of Applied Biological Chemistry, Department of Synthetic Chemistry and Biological Chemistry, Graduate School of Engineering, Kyoto University

第3図 酵母 *S. cerevisiae* の α -アグルチニンの分子構造とその GPI アンカー付着シグナル配列 (A) ならびに、タンパクの細胞表層提示のための遺伝子構築とその細胞表層発現タンパクのモデル図 (B)。A：矢印は切断部位；下線は本文の ω 部位。

の最外層に移行する(第4図B)。その際、これらのタンパクの細胞壁への固定には、GPI アンカーの糖鎖部分と細胞壁のグルカンの共有結合が行われる。

我々は、この細胞内タンパク輸送分子情報を用いて、細胞表層に外来タンパクを提示させる「細胞表層工学 (Cell Surface Engineering)」を開発してきた。すなわち、細胞表層最外殻に位置する α -アグルチニンの分子構造—分泌シグナル・機能ドメイン・細胞壁ドメイン(セリンとスレオニンに富むC末320アミノ酸残基)

構造—を利用して、このC末320アミノ酸残基のC末端に GPI アンカー付着シグナルが存在するので、分泌シグナル・機能ドメインを操作することによって、種々の酵素やタンパクを細胞表層に提示することが可能となるのである(第3図B)。このアグルチニンはその本来の機能や性質からして通常時には機能しないながらも、その発現の潜在スペースを細胞表層に保持しているとも考えられ、しかもその活性部分を細胞外に理想的に配向していると考えられる。この手法により細胞

第4図 GPI アンカーの化学的構造 (A) と α -アグルチニンの細胞表層への輸送メカニズム (B)。A: Man, マンノース; GlcNH₂, グルコサミン。B: ER, 小胞体; PI-PLC, ホスファチジルイノシトール特異的ホスホリパーゼ C。

表層に新しい機能を賦与したり、スクリーニングなどにより得た特殊な機能をもつ細胞の表層にさらに細胞機能を増強する分子を修飾したりする分子育種を行い、もとの代謝系を保持したまま細胞を変換できる。この新しい手法とそれによって創製された細胞は、アメリカの Chemical & Engineering News (75 (15), 32 (1997)) などでも取り上げられ、世界初の技術と評されるとともに、この技術を用いて、酵母細胞が従来

持ち得ない機能を細胞表層に賦与された新しい機能性細胞は、「アーミング酵母 (Arming Yeast)」と命名されている³⁻¹⁰⁾。

2. デンプンを直接エタノールに変換できるアーミング酵母細胞

酵母 *S. cerevisiae* は、周知のごとく、デンプンを直接利用できない。地球上には、多くの未利用のデンプンもあり、これらを直接資化できる新機能酵母の創製に挑戦した (第1図)。まず、デンプンを直接利用できるグルコースに変換できるエキソ型酵素であるグルコアミラーゼを酵母の細胞表層に発現・提示するために、酵母内でも機能的な *Rhizopus oryzae* のグルコアミラーゼの分泌シグナルと、活性の強力なそのコード領域の遺伝子を用い、これと α -アグルチニン遺伝子の C 末端から 320 アミノ酸残基をコードする部分とを融合させ、さらに酵母解糖系の強力なプロモーターである *GAPDH* プロモーターを用いて酵母 *S. cerevisiae* 内で発現させるマルチコピー型や染色体組み込み型のプラスミドを構築した。細胞表層におけるグルコアミラーゼの局在性は、蛍光抗体染色による顕微鏡観察や免疫電子顕微鏡法によって確認した (第5図)。さらに、デンプンを唯一の炭素源として培養したところ、デンプンを効率よく分解・資化して生育し (第6図)、エタノールを生産できる能力を有していることが判明した。さらに、細胞壁の SDS による化学的処理やグルカナーゼによる酵素処理により、グルコアミラーゼが細胞表層に共有結合で強固に結合していることも確かめられた¹¹⁾。

この新しい機能は、目的のタンパクを活性を損なうことなく、また、再生可能な形で行えたことに加えて、酵母という生体触媒を細胞内代謝を乱すことなく、逆に細胞内代謝とを組み合わせた形で酵母細胞の細胞表層に新機能を与えた点でも新しい分子育種法と言える。

さらに、生デンプンの直接発酵試験を発酵能力の高い工業株を用いて行ったところ、グルコアミラーゼ単独発現・提示よりもさらに、 α -アミラーゼを共発現提示させることによりデンプンの有効利用率が上昇することを示唆する結果を得た¹²⁾。そこで、デンプンをエキソ型に分解するグルコアミラーゼとエンド型に分解する *Bacillus stearothermophilus* の α -アミラーゼを共

第5図 細胞蛍光抗体染色像 (A) と免疫電子顕微鏡像 (B)。

(A) a, b, c, d, グルコアミラーゼ細胞表面発現提示細胞 (a, bはコントロール細胞) ; e, f, g, h, CM セルラーゼ細胞表面発現提示細胞 (e, fはコントロール細胞) ; a, c, e, g, ノマルスキー微分干渉顕微鏡像 ; b, d, 抗グルコアミラーゼ抗体・FITC 標識2次抗体染色像 ; f, h, 抗CM セルラーゼ抗体・FITC 標識2次抗体染色像。

(B) a, グルコアミラーゼ細胞表面発現提示細胞の抗グルコアミラーゼ抗体・金コロイド標識2次抗体反応像 ; b, CM セルラーゼ細胞表面発現提示細胞の抗CM-セルラーゼ抗体・金コロイド標識2次抗体反応像 ; CW, 細胞壁 ; M, ミトコンドリア ; 金コロイドサイズ, 5 nm。

第6図 グルコアミラーゼと α アミラーゼを細胞表層に共発現提示した細胞のデンプンを唯一の炭素源とした時の生育。

生育：コントロール細胞(△)； α アミラーゼ細胞表層発現提示細胞(○)；グルコアミラーゼ細胞表層発現提示細胞(□)；グルコアミラーゼ・ α アミラーゼ細胞表層共発現提示細胞(◇)

培地中のデンプン濃度：コントロール細胞(▲)；グルコアミラーゼ細胞表層発現提示細胞(■)；グルコアミラーゼ・ α アミラーゼ細胞表層共発現提示細胞(●)

発現提示した細胞を構築した。 α アミラーゼの場合、酵母分泌系の Kex 2 プロテアーゼによって細胞表層に提示されるべき α アミラーゼの培地への漏出が見られたが、部位特異的な変異操作により安定に細胞表層に提示できる α アミラーゼ提示細胞ができ、グルコアミラーゼと α アミラーゼの両方の共発現提示が可能となった。これは、グルコアミラーゼを単独提示した前述の細胞と比較して、デンプンを唯一の炭素源として、より速やかに分解・資化して生育した(第6図)¹³⁾。これにより、世界で初めて可溶性ならびに生のデンプンを唯一の炭素源として生育するアーミング酵母が誕生した。これらの細胞の培養の過程では、培地にグルコースが歩留まりせずに(未発表データ)すみやかに代謝されており、培地中のグルコースによるいわゆる細胞におけるグルコース抑制¹⁴⁾や雑菌の汚染を回避できることも予測された。

3. セルロースを直接エタノールに変換できるアーミング酵母

デンプンよりはるかに有望で再生可能な資源である反面、環境汚染にもなっているのがセルロースであり、

第7図 セルロースの酵素による分解(A)とセルロース酵母のモデル図(B)。

将来の有効利用を視野に入れてセルロースを資化して生育できる酵母が創製できれば、バイオレメディエーション(環境浄化)としても、また、バイオコンバージョン(生物変換)としてもその有用性は測り知れない。ただ、セルロースの分解には、多くの酵素(第7図

第8図 細胞蛍光抗体染色像。

A, C, 位相差顕微鏡像；B, D, 蛍光顕微鏡像。B, 抗CM-セルラーゼ抗体・FITC 標識2次抗体染色像；D, 抗 β -グルコシダーゼ抗体・FITC 標識2次抗体染色像。1, コントロール細胞；2, CM-セルラーゼ細胞表面発現提示細胞；3, β -グルコシダーゼ細胞表面発現提示細胞；4, CM-セルラーゼ・ β -グルコシダーゼ細胞表面共発現提示細胞。Bar: 5 μ m。

A) やその複合体であるセルロソーム (第7図B) などの関与が知られており、また、酵母がセルロース由来のグルコースを栄養源にするには、最終的に β -グルコシダーゼを必要とする。

そこで、我々は、セルロース資化酵母のプロタイプとして、現在手に入る可溶性のセルロースであるセロピオースやセロオリゴ糖などを用いて、*Aspergillus aculeatus* のCM (カルボキシメチル)-セルラーゼ (CMCase) と β -グルコシダーゼを細胞表面に提示してセルロースを分解して生育できるモデル細胞の構築を試みた^{15,16)}。CM-セルラーゼを細胞表面に発現提示させるために、CM-セルラーゼ自身の分泌シグナルと α -アグルチニンのGPI-アンカー付着シグナルの組み合わせを、また、 β -グルコシダーゼを細胞表面に発現提示させるために、*R. oryzae* のグルコアミラーゼの分泌シグナルと α -アグルチニンのGPI-アンカー付着シグナルの組み合わせを用いた。細胞分画の結果、この両酵素が細胞表面に発現提示されていることが判明したので、抗*A. aculeatus* CM-セルラーゼ抗体ならびに抗*A. aculeatus* β -グルコシダーゼ抗体を1次抗体として、FITC 標識ヤギ抗ウサギ IgG 抗体を2次抗体として蛍光顕微鏡観察を行った。コントロール細胞に比べて、CM-セルラーゼを細胞表面提示した細胞では、抗CM-セルラーゼ抗体でのみ (第5, 8図)、ま

第9図 CM-セルラーゼと β -グルコシダーゼを細胞表面に共発現提示した細胞のセロピオース (A) ならびに、セロオリゴ糖 (B) を唯一の炭素源として培養した時の生育。

コントロール細胞 (○)；CM-セルラーゼ細胞表面発現提示細胞 (△)； β -グルコシダーゼ細胞表面発現提示細胞 (■)；CM-セルラーゼ・ β -グルコシダーゼ細胞表面共発現提示細胞 (●)

た、 β -グルコシダーゼを細胞表面提示した細胞では、抗 β -グルコシダーゼ抗体でのみ、さらに、両酵素を提示した細胞では、両方の抗体で細胞に蛍光染色が見られた (第8図)。2次抗体として5 nm の金コロイド標識したヤギ抗ウサギ IgG 抗体により免疫電子顕微鏡観察を行ったところ、CM-セルラーゼの細胞表面局在を確認できた (第5図)。構築したアーミング酵母細胞のセルロース分解・資化能をセロピオースやセロオリゴ糖を唯一の炭素源として調べた結果、両酵素を提示した細胞は、これらを炭素源として生育できることが判

第 10 図 細胞表層工学とその応用。

明した(第 9 図)。この細胞は、セロオリゴ糖などのセルロースを唯一の炭素源として生育できるという世界初の細胞表層にセルラーゼを装備したアーミング酵母であり、今後のセルロースのクリーンなエネルギーへの変換戦略への足がかりとなる細胞となることが大いに期待されている。

お わ り に

我々の開発した細胞表層工学技術は、分泌経路と細胞表層提示のための GPI アンカーシステムという真核生物細胞の細胞内外タンパク移行の分子メカニズムに立脚した生命情報を活用したシステムであり、多くの酵素やタンパクをコードする遺伝子と細胞との組み合わせにより、適用範囲が広く汎用性があり、これまでの手法とは全く異なる新しい分子育種法である。この手法により、細胞表層に細胞認識分子やレセプターや抗原・抗体、さらには、機能性タンパクなどを提示させ、すでに種々のアーミング細胞を創製している(第 10 図)¹⁷⁾。この日本から発信した新しい分子育種法が日本固有の文化とも言える醸造技術に加味されて、細胞表層領域というフロンティアを開拓する基礎研究とその応用研究であるバイオテクノロジーの新分野が発展していつてくれることを期待している。

参 考 文 献

- 1) 植田充美, 田中渥夫: ケミカル・エンジニアリング, **44**, 440 (1999).

- 2) T. MURAI, M. UEDA and A. TANAKA: *Recent Res. Devel. Microbiology*, **3**, 7 (1999).
- 3) 植田充美: バイオサイエンスとインダストリー, **55**, 253 (1997).
- 4) 植田充美: バイオサイエンスとインダストリー, **55**, 275 (1997).
- 5) 植田充美, 田中渥夫: 化学と生物, **35**, 525 (1997).
- 6) 村井稔幸, 植田充美: BIO INDUSTRY, **15**, 19 (1998).
- 7) 植田充美, 村井稔幸: 日本生物工学会誌, **76**, 508 (1998).
- 8) M. UEDA, T. MURAI, Y. SHIBASAKI, N. KAMASAWA, M. OSUMI and A. TANAKA: *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **864**, 528 (1998).
- 9) M. UEDA, T. MURAI and A. TANAKA: *Handbook of Food Enzymology*, in press.
- 10) M. UEDA and A. TANAKA: *J. Biotechnol.*, in press.
- 11) T. MURAI, M. UEDA, M. YAMAMURA, H. ATOMI, Y. SHIBASAKI, N. KAMASAWA, M. OSUMI, T. AMACHI and A. TANAKA: *Appl. Environ. Microbiol.*, **63**, 1362 (1997).
- 12) T. MURAI, T. YOSHINO, M. UEDA, I. HARANOYA, T. ASHIKARI, H. YOSHIZUMI and A. TANAKA: *J. Ferment. Bioeng.*, **86**, 569 (1998).
- 13) T. MURAI, M. UEDA, Y. SHIBASAKI, N. KAMASAWA, M. OSUMI, T. IMANAKA and A. TANAKA: *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **51**, 65 (1999).
- 14) M. M. C. MEIJER, J. BOONSTRA, A. J. VERKLEIJ and C. T. VERRIPS: *J. Biol. Chem.*, **273**, 24102 (1998).
- 15) T. MURAI, M. UEDA, H. ATOMI, Y. SHIBASAKI, N. KAMASAWA, M. OSUMI, T. KAWAGUCHI, M. ARAI and A. TANAKA: *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **48**, 499 (1997).
- 16) T. MURAI, M. UEDA, T. KAWAGUCHI, M. ARAI and A. TANAKA: *Appl. Environ. Microbiol.*, **64**, 4857 (1998).
- 17) 植田充美: 日本応用酵素協会誌, **33**, 18 (1998).