ミニレビュー [Nippon Nōeikagaku Kaishi Vol.64, No.5, pp.1035~1038, 1990]

=シリーズテーマ=

有用蛋白質の分泌生産——現状と展望——

有用蛋白質の分泌生産——現状と展望——	鵜高 重三	1035
グラム陰性細菌による蛋白質生産	依田 幸司, 山崎 眞狩	1039
グラム陽性細菌による蛋白質生産	山形 秀夫	1043
放線菌による蛋白質生産	長岡 行蔵	1047
酵母による遺伝子産物の分泌生産	山下 一郎	1051
糸状菌による蛋白質生産	塚越 規弘	1056
動物細胞による蛋白質生産	佐々田玲子, 垣沼 淳司	1060

有用蛋白質の分泌生産——現状と展望——†

鵜 高 重 三

(名古屋大学農学部)

ヒトないし動物の蛋白質の分泌生産は発酵の新しい分野の1つになりつつある。いまだ工業化の例数は少なく、時間を要しようが、種類、量ともに増加することは間違いない。これまでの発酵生産とは趣を異にし、その生産には分子生物学を基盤とした組換え DNA 技術の活用が必須であり、同時に従来の発酵技術の精緻さも要求されるのが特徴となっている。アミノ酸発酵の場合に生合成機構の解明がすぐ応用につながったように、蛋白質の分泌生産過程が分子レベルで解明されるに伴い、人為的デザインの下に種々の有用蛋白質がスムーズに高効率で生産されるという歴史をたどるのではなかろうか。この欄に水島他により蛋白質の分泌についてミニレビューが書かれてから3年余、この分野の研究テンポは早い。基礎および応用の両面で多数の論文が出され、レビューも少なくない⁽¹⁻³⁾。蛋白質の分泌生産の面から考えても、その生産性が低い場合どうすれば改善できるか。最近では解決への道筋が見えてきた感がある。

本稿では紙数も限られているので、異種蛋白質、とくにヒトないし高等動物の蛋白質の分泌生産に直接関係するテーマに絞って問題を取り上げ考察を加えたい。

1. 多様な蛋白質分泌生産系の開発

本特集で種々の細胞による有用蛋白質生産についてそれぞれのエキスパートが概説しているように、多様な生産系の開発が行われている。種々の生物を宿主とするのには理由があり、要するに1種類の生物であらゆる蛋白質を効率よく生産させるのは困難だからである。

大腸菌は早くから最も広く深く研究されていることはいうまでもなく、分子生物学の材料としてこんな便利な微生物は他にない。しかし、蛋白質の実用的な分泌生産の宿主としては短所も多く、今後大規模な蛋白質生産に用いられる可能性は少ないのではなかろうか。生産された蛋白質が不溶性の封入体を形成し、それを正常な高次構造を持つ活性体に戻す場合100%の再生が困難であることと精製が難しいのが最大の欠点であろう。

グラム陽性菌のいくつかは優れた宿主になりうると期待され、よく研究されている。枯草菌はその膨大な基礎研究と公認の安全性を背景としているので現在でも魅力的な宿主であるが、せっかく生産された蛋白質を分解す

† Extracellular Production of Useful Proteins
——Present and Perspective——
Shigezo UDAKA (Faculty of Agriculture, Nagoya University, Chikusa-ku, Nagoya 464)

る菌体外プロテアーゼの問題がなかなか解消されない。筆者らの研究している *Bacillus brevis* では培養液中に蓄積した蛋白質の分解がほとんど見られず、ヒトの蛋白質も他の系に較べれば格段に効率よく生産される⁽⁴⁾。この系が有用蛋白質の分泌生産のエースとなるのではないかと期待している。放線菌についても発現、分泌に関する知見が増えつつあり、この菌類特有の性質が明らかにされている。後述の糸状菌と同様に、多くの放線菌が種々の菌体外プロテアーゼを生産する可能性があり問題となる。

酵母のうち *Saccharomyces cerevisiae* は真核高等生物のモデル系として幅広い研究対象となっているが、蛋白質の分泌に関係する遺伝子についても詳しく解析されている。肝炎ウイルス表面抗原、仔牛のキモシン等多数の有用蛋白質がこの系によって分泌生産されることが報告されている。生産物は通常正しい高次構造と活性を有しているが、この系の最大の問題は生産量の少ないことであろう。メタノール資性酵母である *Pichia pastoris* を用いてこの問題を克服しようとする研究がある⁽⁵⁾。高濃度培養によって非常に多量の菌体を得ることにより蛋白質の種類によっては良好な生産量が得られている。ある種の糸状菌は昔から優れた酵素生産菌としてよく知られており、宿主として活用する研究も行われているが生産系を作るために必要な形質転換法やベクターの構築等の開発がおくれていた。強力なセルラーゼ生産菌である *Trichoderma* を宿主とする例が最近報告されたが、われわれも同様の菌を用いる系を開発した⁽⁶⁾。これからの発展が楽しみである。

高等動物の細胞を分泌生産系に用いれば、ヒト蛋白質等を得るのには理想的ではあるが、問題は生産効率の低さと精製の困難さであろう。

2. ヒトの蛋白質は何故効率よく大量生産されないのか、分泌生産のどの過程が律速段階になっているのか。

上述のように多様な分泌生産系が開発され、微生物起原の蛋白質が比較的容易に大量生産されるにもかかわらず、有用性の高いヒト蛋白質を（種類を問わずどんなヒト蛋白質についても）効率よく生産する系は見出されていない。その原因を考察したい。

転写の効率はその開始、制御領域が同じであれば、作られるのが細菌蛋白質であろうと、ヒト蛋白質であろうと、基本的な差はないと考えられ、宿主細胞内でヒト遺伝子から生成する mRNA 量は強いプロモーターにつな

げればけっして少なくない。

翻訳の効率はいくつかの要素に左右されるであろう。1つは古くから知られているリボソーム結合部位（SD 配列）の構造がどれだけ翻訳に適しているかである。この問題は宿主細胞で高発現している遺伝子のプロモーター、SD を含む 5' 上流領域を利用すれば容易に解決できるであろう。2番目は mRNA の 2次構造の問題であり、その構造は翻訳の効率に大きな影響を与える⁽⁷⁾。生産する蛋白質のアミノ末端付近の塩基配列と発現や分泌に必要な 5' 上流領域の塩基配列との組合せによって強固な 2次構造を作る場合は、コードするアミノ酸を変えないで塩基を変更し mRNA の 2次構造生成を阻止しなければならない。生体中で微量で強い活性を持つホルモンのような蛋白質は本来あまり発現される必要がなく構造遺伝子内にも翻訳を阻害するような 2次構造を作らせる可能性がある。しかし、原核生物を宿主とする場合は転写と翻訳がカップルしていると考えられるので、翻訳開始領域の 2次構造がとくに翻訳の効率に大きな影響を与えるであろう。3番目の要素は mRNA の安定性である。真核生物におけるその寿命は原核生物に較べてはるかに長いのが普通であるが、mRNA の安定性が発現量に直接関係するという事は知られていない。

翻訳後、新生ポリペプチドが生体膜を通過して細胞外に、あるいは小胞体内に分泌される過程は種々の蛋白質因子の関与するかなり複雑な反応である。分泌が co-translational, post-translational を問わず、新生ポリペプチドは大腸菌の secB や trigger factor のような蛋白質と結合して unfold の状態、すなわち高次構造をとらないで、signal recognition particle のような構造体の作用で膜に接近し、分泌蛋白質の有するシグナルペプチド、膜に存在する secY のような蛋白質、その他の蛋白質因子の作用で膜を通過し、シグナルペプチドが酵素により切りはなされた成熟蛋白質が細胞外あるいは小胞体内へ放出される。このような蛋白質の分泌過程の基本的仕組みは細菌から高等動物に至るまで、ほぼ共通しているという考えが最近ますます強まっている⁽¹⁾。

次に遺伝子の発現から分泌に至るまで、各種の生産系におけるヒト蛋白質の生産について検討してみよう。大腸菌のようなグラム陰性菌では外膜の通過がネックになって蛋白質の細胞外への分泌は通常起こらない。ペリプラズムに分泌されれば正しい高次構造を持つ蛋白質が生産されようが、ペリプラズム空間での蓄積は量的に限界

があり、分解も受けやすい。外膜を通過させるにはカルボキシル末端側に特異なポリペプチドを必要とする場合がある⁽⁸⁾。次にグラム陽性菌であるが、枯草菌や *Staphylococcus* 属細菌のように酵素を大量に分泌する菌が多く、その優れた分泌能を利用する試みが多い。ただし、酵素生産菌はプロテアーゼ生産菌であることが多く、細菌起原の分泌蛋白質は分解されないことが多いが分泌生産されたヒト蛋白質は分解される。*B. brevis* のある種の菌株には菌体外プロテアーゼがほとんど認められず、*B. brevis* (その変異株も含め) を宿主とする蛋白質生産系では、正しい構造を持つヒト蛋白質を数 10~数 100 mg/l 生産できる。また、生産物の精製も比較的容易なので実用的に最も便利な系であるといえよう。このことはヒト蛋白質も原核生物で十分効率的に分泌生産されることを示しており、分泌過程が真核、原核生物を問わず基本的には同様であることを強く示唆するものである。

真核微生物では *Saccharomyces cerevisiae* がよく研究され、宿主として長所が多いがヒト蛋白質の生産性がありまら上らないのが問題である。細胞外への分泌に多数の遺伝子産物が関与しており、変異によって桁はずれに生産が増えないのは律速反応が多いゆえではなからうか、すでに述べたメタノール資化性 *Pichia* 酵母の場合は非常に多量の菌体を用いることによって、多量の動物蛋白質を得ている。したがって生産効率は高いとはいえないが、この場合も蛋白質の種類によって生産量が桁違いに異なるのが興味深い。糸状菌ではもとも多量の酵素を分泌する菌株が存在するので、その能力を生かせれば酵母を用いるよりはるかに多量の分泌が期待できる。糸状菌は分泌した酵素により生物起原の種々の高分子物質(蛋白質や多糖類)を分解利用して貧栄養環境でも増殖する性質がある。したがってプロテアーゼを分泌する菌が多いので、糸状菌によるヒト蛋白質の生産の障害となろう。真核微生物を用いる場合のもう 1つの問題は、分泌蛋白質に通常糖鎖付加が起こることである。ヒトの細胞で作られる糖鎖とは組成が異なるので、その抗原性が欠点になる場合がありえよう。

原核生物、真核生物のいずれにおいても蛋白質分泌の基本的機構はすでに述べたように共通である可能性が高い。それでは分泌過程のどこが異なるのであろうか。主な違いは 2つあると考えられる。1つは生体膜の構造の相違で、細菌の細胞質膜と動物の小胞体の膜とは脂質も膜蛋白質もその組成が相当異なっているだろう。細菌

の膜には呼吸系の酵素をはじめ各種のパーミターゼ等非常に多種類の蛋白質がうめ込まれているのに対し、小胞体膜の組成は比較的簡単かもしれない。動物の蛋白質は細菌の膜を通過する際しばしば膜に滞留して膜の機能に重大な影響を及ぼし、菌自体に致死的に作用することもある。他の違いは、分泌後の環境がまったく異なることである。細菌では細胞の外が文字通り外界であるのに対し、真核細胞では小胞体という閉ざされた特殊な環境へ分泌されることである。小胞体には protein disulfide isomerase が多量に存在することが知られ、この酵素は単に新生分泌蛋白質に正しい S-S 結合を作らせるだけではなく、分泌蛋白質が糖鎖等によって修飾されやすいような別の役割も果たしているのではないかと推定されている⁽⁹⁾。蛋白質への糖鎖の付加が起こったり、蛋白質内のプロリン残基における 2次構造を決める prolyl-peptidyl cis-trans isomerase (これは細胞質内の酵素と云われているが) の作用も加わって、小胞体は分泌蛋白質の生合成が完成する場所と考えられる。

このような分泌過程の違いが原因で、細菌によるヒト蛋白質の効率よい生産が困難になっているのではなからうか。その効率を上げる手段が上述のような考察を通じて示唆されよう。

3. 展 望

種々の有用蛋白質を分泌生産するのに多様な系が開発されつつある。それぞれ特徴があり一長一短あって、あらゆる面から完璧な系はないし、1つの系に限定する必要もないと思われる。それは生産しようとする蛋白質が多様なゆえでもある。たとえば細菌に対して溶菌活性を有するヒト・リゾチームを活性のある形で細菌に大量生産させるのはむづかしいであろう。特殊な糖を含む糖蛋白質を生産するには動物の培養細胞を利用する必要がある。もっとも、将来糖鎖を蛋白質に正しい構造を持つように自由に付加できるようになれば話はおのずから異なってくる。生産する蛋白質の性質、利用目的によってその生産系は徐々に 3つか 4つの系に限定されるのではないかと考えられる。

今後の研究によって、分泌の過程や機構が詳細に解明され、原核生物と真核生物におけるそれらの差異もさらに明らかになれば、どのような蛋白質はどの系で分泌生産させればよいか、より正確に予測できよう。さらに、生産効率の向上についても適切な対策を講ずることができる。いずれにしても、まだこれからの研究課題が多い。

が、有用蛋白質の大量生産に関する研究は非常に興味ある応用上も重要な分野であることは間違いない。

-
- (1) M. H. Saier, Jr., P. K. Werner and M. Müller : *Microbiol. Rev.*, **53**, 333 (1989).
 - (2) S. Udaka, N. Tsukagoshi and H. Yamagata : *Biotech. Gen. Eng. Rev.*, **7**, 113 (1989).
 - (3) M. Ratner : *Bio/Technology*, **7**, 1129(1987).
 - (4) H. Yamagata, K. Nakahama, Y. Suzuki, A. Kakinuma, N. Tsukagoshi and S. Udaka : *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **86**, 3589 (1989).
 - (5) M. E. Digan, S. V. Lair, R. A. Brierly, R. S. Siegel, M. E. Williams, S. B. Ellis, P. A. Kellaris, S. A. Provow, W. S. Craig, G. Velicelebi, M. M. Harpold, G. P. Thill : *Bio/Technology*, **7**, 160 (1989).
 - (6) 成 程, 塚越規弘, 鵜高重三 : 日本農芸化学会大会要旨集, 福岡, 1990.
 - (7) M. Kubo and T. Imanaka : *J. Bacteriol.*, **171**, 4080 (1989).
 - (8) H. Miyazaki, N. Yanagita, S. Horinouchi and T. Beppu : *J. Bacteriol.*, **171**, 6566 (1989).
 - (9) R. B. Freedman : *Cell*, **57**, 1069 (1989).
-