グラム陰性細菌による蛋白質生産†

依田 幸司, 山崎 真狩

(東京大学農学部)

グラム陰性細菌の代表である大腸菌がもともと生産していた有用蛋白には、アルカリ性ホスファターゼ、DNA ポリメラーゼ I など現在も組換え DNA 実験で使われている酵素があるが、大腸菌が蛋白質生産の主役として浮上してきたのは、遺伝子操作の黎明期にあって最初に宿主として認定を獲得したことによるといえる。

当時までの遺伝学的・生化学的な基礎研究の蓄積は数多い微生物のなかでとび抜けており、必要な宿主変異株やベクターが直ちに作られて遺伝子組換え実験の安全性評価を短い時間で可能にした。そうしてソマトスタチン、インシュリン、各種インターフェロンなど、それまでは動物組織から微量しか抽出されえなかった生理活性ペプチドや蛋白質が大腸菌で生産されるという華々しい成果が世間を賑わしたのがすでに約十年前のことである。

それ以後も大学・企業を問わず多くの研究者が、生理活性蛋白からワクチン用抗原、有用酵素、基礎研究目的の蛋白などに対象を広げながら大腸菌を宿主とした組換え蛋白質の生産に関する研究に携っており、生産性向上に寄与する多くの知見を明らかにしてきた。他の細胞に比べ大腸菌の形質転換は簡便でありまた効率も高いから、最初のクローニングは相変わらず大腸菌で行われる。そこで遺伝子発現についてもまずは大腸菌で生産を試みるのが今も一般的な手順であろう。

大腸菌で組換え遺伝子の発現を向上させるために検討されてきた点を列挙してみると、

- (1) 組換えプラスミドのコピー数の増大と安定性の改良
- (2) 強力かつ制御可能なプロモーターを持つ発現ベ

クターによる、mRNA 転写量の増大と発現時期の制御

- (3) 典型的なターミネーターを付けるなど mRNA の非翻訳領域の最適化ないしポリヌクレオチドホスホリラーゼ欠損 *pnp* 変異株などの利用による mRNA の寿命の延長

- (4) SD 配列と開始コドン間の塩基数など mRNA 非翻訳領域の最適化による翻訳開始効率の向上

- (5) 大腸菌の tRNA 存在比にあわせた使用コドンの最適化

- (6) *lon*⁻, *htpR*⁻ などの宿主変異株による蛋白質の分解の抑制

- (7) シグナル配列の付与によるペリプラズムないし培地中への蛋白質分泌生産

などが挙げられよう。またどのような条件検討によっても大腸菌で生産されない蛋白質があり、たとえば B 型肝炎ウィルスの表面抗原 (HBsAg) のように酵母菌を宿主として初めて実用的な生産がはたされるものがある。この場合おそらく膜蛋白である HBsAg が、原核細胞の唯一の膜系である細胞質膜に組み込むこと自体が有害であり、真核生物である酵母のように複数の生体膜系を持つ宿主を使わねばならない。本稿では大腸菌で生産された蛋白の分解、大量生産されたとき起きる目的蛋白質の不溶化、および分泌生産の現状について論じる。

1. 大腸菌で生産された蛋白の分解⁽¹⁾

Bukhari & Zipser が大腸菌の *deg*⁻ という変異株における β -ガラクトシダーゼ断片の安定化を見出したのは 1973 年のことであるが、その後の解析で本変異は *lon*⁻ と同一であった。一方、Swamy & Goldberg は大腸菌抽出液中の蛋白分解酵素を分離して 6 種のプロテアーゼを見出し、そのひとつが ATP 依存のプロテアーゼであることを示したが、のちにそれが *lon* 遺伝子の産物であることが明らかにされた。異常蛋白の分解が ATP 依存で起こることは古くから知られており、*lon* プロテアーゼはまさに異常蛋白の分解にかかわる酵素と考えら

† Production of Proteins in Gram-Negative Bacteria.

Koji YODA and Makari YAMASAKI (Department of Agricultural Chemistry, University of Tokyo, Bunkyo-ku, 113 Tokyo)

れた。さらに *lon* プロテアーゼは熱ショック蛋白 (HSP) の 1 つであり, *htpR* 遺伝子 (σ^{32}) の支配下にある異常蛋白の蓄積などのストレス刺激により転写が促進されるという目的制御を受けている。

さて, 組換え DNA により作られる異種蛋白は大腸菌においては異常蛋白として認識されるだろうか。何が異常蛋白として認識されるかで, 考えられていることの 1 つは部分的変性による蛋白の疎水性領域の露出である。正常な高次構造では内側に埋め込まれている疎水性領域が表面に露出することは変性の指標として考えやすいが, 実験的な証明は今後に残されている。もしそうであるとして, また大腸菌の細胞質内という状況で合成された異種蛋白質の folding が不完全となるなら, 即 *lon* プロテアーゼの標的となりうるであろう。この系の欠損株を宿主として使うことにより生産性が改良されたことを明記した論文をあまり見ないが, B 型肝炎の X 遺伝子産物の生産には *hptR* 変異株が使われている。

lon 欠失変異株に残っている ATP 依存プロテアーゼ活性の解析から, 2 サブユニットよりなる ATP 依存プロテアーゼ Ti が見出された。その欠損変異は *lon*⁻ との二重欠損で異常蛋白分解活性がさらに低下すると報告されているが, さらに未知の ATP 依存プロテアーゼがある可能性も示唆されている。これらのプロテアーゼがみな欠損した株が使えれば不安定な蛋白の分解は防げると期待される一方, 不要な蛋白を分解除去する清掃系を失った大腸菌はよほど生えにくいのではないかと心配される。

Strauch & Beckwith はペリプラズムに分泌された不安定な融合蛋白の切断が起きにくくなる変異株を取得して遺伝子を *degP* と名付けた⁽²⁾。 *degP*-株においてはペリプラズムに分泌した蛋白の安定性が上昇する。 *degP* 遺伝子産物は, 細胞質内における *lon* に対して, 表層蛋白の清掃に関与しているらしく, 欠損株は温度感受性になる⁽³⁾。

インターフェロン γ や T7 フェージの RNA ポリメラーゼはクローン化による高発現系で生産されると分解が起こる。この分解は大腸菌外膜に存在する酵素で *ompT* プロテアーゼ (プロテアーゼ VII) と呼ばれるものにより, 連続した塩基性アミノ酸の間が切断される⁽⁴⁾。細胞を破壊することにより細胞成分が混合し, 生きている菌では分解されなかった蛋白が分解されるわけである。 *ompT* についても欠損変異株が得られており, それ

を利用すればこの分解は防ぐことができる⁽⁵⁾。

2. 封入体 (inclusion bodies, IBs) の形成⁽⁶⁻⁸⁾

SDS-PAGE でバンドが見えるくらい生産されるようになると, その蛋白は細胞質中で不溶性の固まりとなっている場合が多い。大きな封入体を含む細胞は光学顕微鏡下にもきらきらと輝いて見える。細胞を破壊して沈降速度の大きい顆粒を集めれば, 封入体の精製は比較的容易であるが, いうまでもなく本来の活性は失われている。

抗原として利用する場合はともかく, 封入体中の蛋白を利用するには活性型に戻す操作が必要になる。通常は 8M 尿素あるいは 6M 塩酸グアニジン等により蛋白を溶かしたのちに精製し, 透析やゲル濾過で変性剤を除いて本来の高次構造に戻させる。このときはバッファの pH や塩濃度, 金属イオンなどの組成が重要である。蛋白濃度は低くしなければならず, 正しく folding したものをさらに精製しなければならない。工程は煩雑になる。

そもそも封入体はなぜできるのか。また封入体の形成は防ぐことができるだろうか⁽⁷⁾。

まず, 封入体になるのは異種蛋白や変異蛋白に限らない。大腸菌本来の蛋白ですら大量発現系では封入体を作る。多くの封入体は細胞質中で形成されるが, 分泌ベクターにより大量発現系を組むとペリプラズムに分泌したのちに封入体を形成する例をみることができる。以前には S-S 結合の架け違いが原因であるとする説が流布したことがあるが, 大腸菌 σ 因子のようにシステインを含まない蛋白も封入体を形成するので, 主たる原因ではないとされている。大腸菌細胞内は還元状態なので, S-S 結合は封入体蛋白には作られておらず, 細胞を壊した後の酸化により S-S 結合ができるという説のほうが考えやすい。蛋白質の分子量も関係なく, 分子量 10 万の T7 RNA ポリメラーゼは細胞全蛋白の 5% 生産しても水溶性であるが, インシュリン前駆体では封入体を形成する。

これでは原因が特定できないようだが, 1 つ間違いなのは封入体は蛋白が大量生産されるとき起こることである。特定の蛋白の濃度がある臨界量を越えたとき封入体が形成され, それ以下では蛋白分解系により分解されてしまう場合が多いのであろう。

もう 1 つの要因は温度である⁽⁶⁾。ヒト・インターフェロン $\alpha 2$, γ などは大腸菌を 37°C で培養して生産させたときには封入体を形成するが, 23~30°C で培養すると

30~90% が可溶性のままであると報告されている。これから封入体の形成は熱変性と関係した現象ではないかと考えられる。一般に蛋白の熱変性温度 (Td) は 45~60°C の範囲にある。封入体を形成する温度は明らかにこれよりは低い。にもかかわらず Td が 88°C である P 22 ファージの尾部スパイク蛋白や Td が 60~70°C の RNaseA も 35~40°C で封入体を形成する。これが矛盾してみえるのは、熱変性という現象を未変性と変性という2つの状態を一挙に移行するものと考えているためである。紫外部吸収の変化などで測定しうる総体的な値は、蛋白のごく一部で起きている部分的な unfolding 状態を捉えられないので考慮していない。封入体はこのような部分的な unfolding を契機として分子内にできべき結合が分子間にできるなどして形成され、低温培養はこの部分的 unfolding 状態を抑制していると考えられることができる。

では本来その蛋白を大量に生産している動物では何故封入体が形成されないのか。その状況を大腸菌において模倣できれば、大腸菌でも封入体の形成が抑制されると期待できる。3つの原因が考えられる⁽⁸⁾。

(1) folding 介助蛋白の存在：細胞質の HSP 70, 小胞体内の BiP, ミトコンドリアの HSP 60 などは蛋白の膜通過や細胞内輸送の際に folding の介助蛋白として機能し, molecular chaperone と呼ばれている。小胞体内での正しい S-S 結合形成には protein disulfide isomerase (PDI) が、プロリンの異性化には prolyl *cis-trans* isomerase (PPI) が触媒的に機能している。大腸菌でも GroEL, SecB, Trigger factor などの chaperone の存在が明らかになってきた。PDI に相当する thioredoxin, glutaredoxin も存在するので、これらを介助蛋白として同等に利用できるかもしれない。また chaperone としての機能も報告されているユビキチンとの融合蛋白化により生産性が向上する例が大腸菌でも報告されており⁽⁹⁾、介助蛋白の拡張として広く応用できるかもしれない。

(2) 翻訳後修飾：分泌蛋白・膜蛋白などの糖鎖付加はソーティングのマーカースとなることもあるが、蛋白の水溶性と安定性にも寄与している。糖鎖による修飾は大腸菌で行うのは当然不可能であろう。

(3) コンパートメント化：蛋白を特定のオルガネラに局在化することにより安定化させる。インシュリンは pH 7.8 の大腸菌細胞質ではほとんど溶けないが、pH

4.5~5.5 の分泌小胞にあれば可溶性のまま保つことができる。単細胞である大腸菌には動物細胞のように多様なオルガネラは存在しないので、ペリプラズムへの分泌がこれに相当するものである。

3. 分泌生産

ペリプラズムは細胞質膜で区切られた、細胞質とは異なる環境であり、そこでは蛋白の folding や安定性も異なると考えられる。大腸菌でプロインシュリンを生産する場合、細胞質内よりペリプラズムのほうが 10 倍も安定であったという Talmadge らの先駆的研究の後、多くの蛋白の分泌生産が試みられてきた。シグナル配列の切断により N 末端が天然と同じものにできるという点も分泌生産の魅力のひとつである。それらの試みの結果については現在のところ、あるものでは大量分泌生産に成功し、あるものでは成功しなかったというほかない。一般則の確立とそれによる結果の予想は困難である。

細胞質内でほとんど生産できなかったヒト上皮細胞成長因子 (hEGF) はペリプラズムに分泌させることで天然と同じ形で大量生産することが可能になった⁽¹⁰⁾。Staphylococcus のスクレアーゼ A やヒトの細胞質蛋白である superoxide dismutase のような酵素も活性を持つ形でペリプラズムに分泌されている⁽¹¹⁾。2種のペプチド鎖からなる免疫グロブリン F_v 断片では、2つともにシグナル配列を付けて同一細胞で分泌生産させることにより、完成した F_v 断片を可溶性でペリプラズムへの生産に成功している⁽¹²⁾。

先の hEGF の場合や β -エンドルフィンでは、これら 50 アミノ酸前後までの大きさのポリペプチドに特徴的なことかもしれないが、培養時間を長くすると大部分が培地中に分泌する。これら低分子ペプチドの生産にはきわめて有用な生産方法であろう。また異種分泌蛋白遺伝子で大腸菌で発現させたときに意図せず培地中まで分泌している例が少なからず認められている。ヒト・マウスのキメラ Fab 断片の場合も培地に出ている⁽¹³⁾。掘越らの pEAP ベクターは ColE1 プラスミドの *kil* 遺伝子を適量発現させることによりペリプラズムに分泌した蛋白をさらに培地中に漏出させる目的で作られ、ヒト成長ホルモン (hGH)、ヒト IgG Fc 断片等の菌体外分泌生産に成功している⁽¹⁴⁾。

おわりに

大腸菌における蛋白生産で現在重要と思われる分解、封入体、分泌生産について述べたが、おそらくいずれも

生産したい蛋白質の構造的特徴と直接にかかわる問題である。対象の蛋白により最も効果の大きい要素を考えて対策をたてることにより生産性の改善がみられるなら、蛋白生産の宿主としての大腸菌の役割は今後も大であるといわねばならない。引用文献は最新の総説を主体とした。

- (1) 田中啓二：蛋白質 核酸 酵素, **37**, 1267(1989).
- (2) K. L. Strauch and J. Beckwith : *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **85**, 1576 (1988).
- (3) K. L. Strauch, K. Johnson and J. Beckwith : *J. Bacteriol.*, **171**, 2689 (1989).
- (4) K. Sugimura and T. Nishihara : *J. Bacteriol.*, **170**, 5625 (1988).
- (5) J. Grodberg and J. T. Dunn : *J. Bacteriol.*, **170**, 1245 (1988).
- (6) C. H. Schein and M. H. M. Noteborn : *Bio/Technol.*, **6**, 291 (1988).
- (7) A. Mitraki and J. King : *Bio/Technol.*, **7**, 690 (1989).
- (8) C. H. Schein : *Bio/Technol.*, **7**, 1141 (1989).
- (9) T. R. Butt, S. Jonnalagadda, B. P. Monia, E. J. Sternberg, J. A. Marsh, J. M. Stadel, D. J. Ecker and S. T. Crooke : *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **86**, 2540 (1989).
- (10) 依田幸司：農化, **62**, 1743 (1988).
- (11) M. Takahara, H. Sagai, S. Inouye and M. Inouye : *Bio/Technol.*, **6**, 195 (1988).
- (12) A. Skerra and A. Plückthun : *Science*, **240**, 1038 (1988).
- (13) M. Better, C. P. Chang, R. R. Robinson and A. H. Horwitz : *Science*, **240**, 1041 (1988).
- (14) 工藤俊章：農化, **62**, 1619 (1989).