工業生産用ファージベクターの開発と それによる診断用酵素の生産[†]

(1991 年度農芸化学技術賞受賞)

中野衛一, 小山泰二, 鈴木 勝, 増田 力

(キッコーマン株式会社)

はじめに

近年, 有用酵素の高生産株を育種する手段として, 遺伝子組換え技術を使用する例が増えつつある。この技術により, 動物由来の酵素を生育の早い微生物を用いて生産することが可能となり, また, 微生物由来の酵素については, その高生産株の育種が手際よく短期間に行えるようになった。しかしながら, 大規模な生産に遺伝子組換え体を使用した例はいまだ少なく, 工業生産株の育種において遺伝子組換え法が従来の変異法にとって代わるためには, いくつかの問題を解決する必要があると思われる。

たとえば, 一般に利用されているプラスミドの場合, 宿主細胞より脱落しやすいという基本的問題がある。そのため, 酵素生産能の高い組換え体をどのようにして構築するかという課題に加え, でき上がった組換え株をいかに安定に保存し, かつ, 高生産能を維持しつつ大量培養を行うかといったことが問題となる。これに対し, バクテリオファージ由来のベクターの場合, 不安定な遺伝子のクローニングによく利用され, 安定性についてはあまり問題とならない。しかしながら, 生産に際し, ファージ特有の溶菌の問題に加え, 宿主と組換え体ファージを別々に用意する必要があり, 煩雑である。

筆者らは, 組換え体による工業生産に際して起こりうるこのように様々な問題に対処すべく研究開発を行い, 工業生産用ベクター“スリーパー”を完成した。このベクターに組み込まれた外来遺伝子は宿主染色体に組み込まれてしまい, 普段はほとんど発現せずに“眠ってい

る”ので, このように名付けたのである。スリーパーベクターの工業的実用化に当たり, 微生物あるいは動物より種々の酵素遺伝子をクローン化し, 酵素の高生産株を作製した。つづいて, それら組換え体の培養条件や生産物の精製方法などを種々検討し, 数トンクラスの培養規模にまでスケールアップした。その結果, 生産量および菌株の安定性ともに優れた成績が得られ, 工業生産株の育種に何ら問題なく, 本宿主-ベクター系を利用できることが確認された。

スリーパーベクターとその工業的利用について, 以下に紹介したい。

1. スリーパーベクター

大腸菌の最も一般的な溶原性ファージである λ ファージは, 宿主に溶原化された(プロファージの)状態では非常に安定である。一方, 誘発により自己増殖を開始すると, コピー数は急速に増加し, 100~1000 コピー/細胞にも達する。筆者らはこれらの点に注目し, λ ファージをベースに, 溶原化能を保持した一連の工業生産用ベクター, “スリーパー”の開発を行ってきた^(1,7,8)。

初期の λ 系ベクター^(2~4)と異なり, スリーパーベクターには, λ DNA 中央部に存在する宿主染色体への組込みに必要な遺伝子 *att-int-xis* が残されている(図1)。そのため, 外来遺伝子を組み込んだあとに, さらに宿主染色体上に組み込んでしまうことにより, 組換え体 DNA のコピー数と発現量を抑えて安定化できる。ターゲット遺伝子は, ファージのコートタンパク質遺伝子と入れ替える形で組み込めるよう, その部分に利用可能な制限酵素部位がいくつか存在する。それにより, 組換え体の安全性(ファージ粒子ができないため)と生産性(不都合なタンパク質をつくらないため)が高まり, また, ターゲット遺伝子の発現に, コートタンパク質遺伝子の

[†] Development of Bacteriophage Vectors for the Industrial Use and Their Application to the Production of Diagnostic Enzymes.

Eiichi NAKANO, Yasuji KOYAMA, Masaru SUZUKI and Tsutomu MASUDA (R & D Division of Kikkoman Corporation, 399 Noda, Noda City)

図 1 スリーパーベクターの概念図

図 2 スリーパーベクター, slp 501 S-Tc

強力なプロモーター P_R を利用できる。

宿主染色体に組み込まれた組換え体 DNA は、ベクター上の cI_{857} 遺伝子⁽⁵⁾ の働きにより、単に、培養温度を上げるだけで、染色体より切り出されて、自己増殖を開始する。また、 S_7 変異⁽⁶⁾ を導入したことにより、宿主の溶菌を抑え、組換え体 DNA のコピー数を 500~1000/細胞まで高められる。

最初のスリーパーベクターは 1976 年に完成したが、その後種々の改良を加え、多くの誘導体を得た。その詳細については、既報^(7,8) を参照していただき、ここでは、現在、診断用酵素などの生産に最もよく利用されているベクターについて、以下に紹介する。

(1) slp 501 S-Tc

このベクターは図 2 に示される構造をもち、DNA の左端より $EcoRI$ 部位の少し先までは $\phi 80$ ファージ由来で、残りのほとんどは λ 由来である。右端近くのテトラサイクリン耐性遺伝子は pBR 322 に由来するが、プロモーターを P_{trp} に変えてあるので、slp 501 S-Tc の溶原菌は、トリプトファンを含まない培地でのみ、1.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 程度の弱い耐性を示す。この耐性マーカーは、組換え体の選択の際に利用されるが、プラスミド株の場合のように、培養時の選択圧として利用されることはない。

ターゲット遺伝子は、DNA の左側、コートタンパク質遺伝子部分に組み込まれ、 $EcoRI$ を用いて 7~21 kb、 $KpnI$ では 8~22 kb のサイズが導入可能である。

(2) slp 501 S-Km

図 3 に示されるように、pUC 4 K 由来のカナマイシン

図 3 スリーパーベクター, slp 501 S-Km

耐性遺伝子を導入したベクターである。カナマイシンを含むプレート上、32°C で生育するコロニーを選択することにより、容易に組換え体を得ることができる。 $EcoRI$ で 8~22 kb のサイズを組み込める。

以上 2 種のベクターは λ 由来の att 部位をもつので、大腸菌染色体 17 分の位置に組み込まれるが、slp 2 S⁽⁹⁾ のように、 $\phi 80$ 由来の att をもち、27 分に組み込まれるタイプもある。

(3) 安定性

スリーパーベクターおよびその組換え体は、大腸菌の染色体に組み込んだ状態で半永久的に保存できる。溶原菌はソフトアガー培地に植え、30°C で培養した後に、キャップを固形パラフィンなどで密封し、室温で保存しておくと、少なくとも数年間はコロニーの選択をせずにそのまま使用できる。

(4) 使用法

図 4 にスリーパーの基本的使用法を示す。まず、ベクターを制限酵素で切断し、そのままあるいは左右両アームを精製した後に、目的の遺伝子をもつ DNA 断片を加えてリガーゼ処理し、組換え体 DNA を得る。次いで、*in vitro* パッケージ法^(9,10) により λ ファージのコートにパッケージしてファージ粒子とし、宿主大腸菌に感染させ、目的とする溶原菌を分離する。分離の際、組換え体を選択マーカーがない場合には、 $\lambda cb 2$ を感染させ生き残った株（溶原菌と λ 抵抗性変異株を含む）の中から、温度感受性を示すもの（=溶原菌）を分離する。

組換え体溶原菌は、32°C で培養すると、基本的に目的とする遺伝子産物をつくらないので、溶原菌の 32°C で生育速度は宿主大腸菌とまったく変わらない。42°C で 15 分間培養した後に、37°C（任意の温度でよい）で培養すると、組換え体 DNA が宿主染色体から切り出されて、自己増殖する。ベクター上の kil 遺伝子の働きにより分裂が抑えられるので、菌体はフィラメント状となり⁽¹¹⁾、組換え体 DNA は、最初は閉環状で、その後直鎖 DNA が直列につながった形でコピー数を急速に増加させる (rolling circle replication⁽¹²⁾)。

最終的なコピー数は 500~1000/細胞となり⁽⁶⁾、加え

図 4 スリーパーベクターの基本的使用法

て、ファージプロモーター P_R とターゲット遺伝子上のプロモーターの働きにより、目的の遺伝子産物が著量蓄積される。この状態の菌体から DNA を抽出すると、大部分が組換え体 DNA なので、そのまま DNA 分析を行ったり、*in vitro* パッケージ法によりファージ粒子としたのちに、他の宿主へ溶原化できる。

ファージの溶菌遺伝子群の一部に変異を導入してあるので、培養中は宿主の溶菌は起こらず、生産物は菌体内に蓄積する。集菌後、キレート剤処理を行うと、ベクター由来の溶菌酵素の働きにより宿主細胞が溶け、生産物を高濃度で回収できる。

2. スリーパーベクターを用いた診断用酵素の生産

スリーパーを利用することにより、動物由来の酵素については、大幅なコストダウンが可能となり、また微生物由来の酵素については、長い期間と多くの労力を要した育種から解放されるばかりではなく、培養と精製の方法が画一化され、多品種生産が容易になると期待される。

現在までに、微生物^(13~15)および動物⁽¹⁶⁾由来の酵素数種類について生産を検討した。その結果、目的の遺伝子に大腸菌由来のプロモーターを付け、それを数個直列にスリーパーベクターに組み込む方法が最も効果的であることがわかった。使用する大腸菌プロモーターは、*lac* プロモーターなどのように、通常はリプレッションのかかっているものが望ましい。染色体に組み込まれている状態では、リプレッションにより目的の遺伝子産物がつくられないので、宿主に対する負担がまったくなく、一方、熱誘導後にはコピー数がリプレッサー数を上回ることにより、自動的にリプレッションが解除されるからである。

以下、3つの生産例を紹介する。

(1) クレアチナーゼの生産⁽¹⁴⁾

クレアチンをザルコシンと尿素に分解するクレアチナーゼは、クレアチナーゼとザルコシンオキシダーゼとともに血清中のクレアチニンの定量に使われる。クレアチナーゼはクレアチンに対する K_m 値が 40 mM と大きい実際の使用にあたっては大量の酵素を必要とする。さらに、クレアチナーゼ生産菌フラボバクテリウムは酵素生産のために、誘導基質として培地中にクレアチンまたはクレアチンの添加を必要とするが、これらは高価であるため工業化の大きな障害となり、遺伝子組換え技術によるクレアチナーゼの構成的な生産が望まれた。

クレアチナーゼ生産菌フラボバクテリウム U-188 株の染色体 DNA を *Sau* 3 AI 部分分解したものを、pBR 322 *Bam*HI 部位に挿入し、遺伝子ライブラリーを作製した。クレアチナーゼ活性を指標にして形質転換株をスクリーニングした結果、クレアチナーゼ遺伝子を含む組換えプラスミド pKLS 501, pKLS 511, pKLS 521 を得た。挿入 DNA の長さは各々 1.9 kb, 5.2 kb, 4.3 kb であった(図 5)。pKLS 501 の塩基配列を決定したところ、1134 塩基よりなるオープンリーディングフレームが存在した。予想されるタンパク質はアミノ酸 378 個からなり分子量は 42,651 であった。HB 101 (pKLS 501) のクレアチナーゼ活性は 0.0084 U/ml と弱かったので、開始コドンより 77 塩基上流にある *Sma*I 部位に *lac*

図5 クレアチナーゼ遺伝子を含む組換えプラスミドの制限酵素地図
フラボバクテリウム由来 DNA のみを示す。Bg, *Bgl* II; S, *Sal* I; Sm, *Sma* I; X, *Xho* I.

プロモーターを挿入して pKLS 508 を作製したところ 1.80 U/ml になった。さらに, *lac* プロモーターに連結したクレアチナーゼ遺伝子をプラスミド上で2個直列につなげた後に, スリーパーベクター slp 501 S-Tc へ挿入した(図6)。その結果クレアチナーゼ遺伝子を6個組み込んだ slp 501-cre を得た。JM 109 (pKLS 508) での発現には IPTG による誘導が必要であったが, 1100 (slp 501-cre) での発現は, IPTG を必要とせず熱誘導のみで行われ, 菌体内可溶性タンパク質の 60% (11 U/ml) に達した(図7)。そのため, フラボバクテリウムで生産するよりも高純度の酵素標品が, しかもかなり簡略化され

図7 スリーパー株によるクレアチナーゼの生産
矢印がクレアチナーゼを示す。

た精製法によって得られた。

(2) ギャルコシノキシダーゼ (SO) の生産⁽¹⁵⁾

ギャルコシンをホルムアルデヒド, グリシン, 過酸化水素に分解する SO は, クレアチナーゼと共に, 腎機能疾患の診断に用いられるフラビン酵素である。バチルス属細菌による SO の生産にも誘導基質の添加を必要とするが, 反応生成物ホルムアルデヒドは生育阻害を引き起こ

図6 クレアチナーゼを生産するスリーパー組換え体の作製

図 8 ギャラクソニンオキシダーゼを生産するスリーパー組換え体の作製

す。さらに生産された SO には、夾雑酵素などの問題もあった。そのため遺伝子組換えによるこれら問題点の克服を目指した。

耐熱性 SO 生産菌バチルス NS-129 染色体 DNA の *Sau* 3 AI 部分分解ライブラリーより、ギャラクソニンからホルムアルデヒドを生成する形質転換株をスクリーニングした結果 5.3 kb を挿入した pKLS611 を得た。欠失変異の作製から 1.7 kb *Hpa*I-*Bgl*II 断片中に SO 遺伝子が存在することがわかり、塩基配列を決めたところ、1161 塩基のオープンリーディングフレームがあった。予想されるタンパク質はアミノ酸 387 個からなり、分子量は 42,955 であった。この断片を pUC18 にサブクローニングして pSO1 を、また *Hpa*I 部位より BAL31 nuclease で SO 遺伝子上流域を欠失させて高発現となった pSO11 を作製した (図 8)。IPTG で誘導したときの SO 活性は JM109 (pSO1) は 1.36 U/ml, JM109 (pSO11) は 4.80 U/ml であった。さらに、クレアチナーゼと同様にプラスミド上で 2 個連結した後に、スリーパーベクター slp501S-Km へ組み込み、SO 遺伝子を

8 個もつ slp501-SO を作製した。この組換え体も、IPTG を必要とせず熱誘導のみで SO 遺伝子は発現したが、本酵素は FAD を補酵素として必要とするので、熱誘導後、クレアチナーゼのように急激な生産量の増加は見られなかったが、培養を続けると徐々に増加し、菌体内可溶性タンパク質の約 30% (32 U/ml) の生産量を示した (図 9)。本酵素のような耐熱酵素の場合、熱処理によって宿主大腸菌由来の酵素を失活させてしまうことも可能であり、精製法を簡略化できる。

(3) ゲンジボタル由来ルシフェラーゼの生産

ホタルの発光に関与するルシフェラーゼは、反応に ATP を必要とするので (図 10)、微量な ATP の定量に利用され、その応用として、微生物中の ATP を測定してその微生物量を推定するなど、広く利用が考えられている酵素である。ホタルよりの抽出では生産量および生産コスト共に限りがあるので、遺伝子組換え体による生産が望まれていた。

そこで、ゲンジボタルよりルシフェラーゼ cDNA をクローニングし⁽¹⁶⁾、*trp* プロモーターを付加してスリー

図 9 スリーパー株によるガラクトシンオキシダーゼの生産
矢印がガラクトシンオキシダーゼを示す。

パーベクターに導入した。培養経過を図 11 に示す。動物由来の酵素のためか、熱誘導後の培養温度は、やや低めの方が高い生産量が得られた。

このように低い温度での培養が必要な例は、動・植物由来のタンパク質の生産においていくつか知られているが、スリーパーベクターはそのような生産にも適していることが、この例でわかった。同じように高温下でコピー数が増加するランナウェイプラスミド⁽¹⁷⁾と違って、スリーパーでは高温培養が一時的で済み、熱誘導後の培養温度は任意に設定できる。また、誘導前は目的とする遺伝子の発現はほぼ完全に抑えられているために、そのような組換え株でも通常の温度で培養できるからである。ルシフェラーゼの生産では、プラスミド株と比べ、スリーパー株の方が 100 倍程度高い生産量が得られた。

おわりに

物質生産に使われるベクターの場合、単に遺伝子の“運び屋”にとどまらず、効率的な生産を行うために、さまざまな工夫が必要である。ところが、遺伝子産物の発現量が高くなるに従い、その組換え体の安定性が極端に低下してしまう場合が多い。高発現をいかに安定に維持するかが工業生産用ベクターに要求される課題である。

スリーパーベクターの開発は 1975 年より開始したが、組換え体のコピー数を状況に応じて変化させることで、この問題に対処した。ちょうど同じ頃、プラスミドの系でも、培養温度を上げることによりコピー数が増加するランナウェイベクター⁽¹⁷⁾が開発された。しかしなが

図 10 ホタルの発光反応

図 11 スリーパー株によるゲンジボタルルシフェラーゼの生産

ら、ランナウェイの場合、コピー数を増加させる機能が通常のプラスミドに付加されただけで、安定性を高める工夫はあまりなされなかった。スリーパーではバクテリオファージのもつ溶原化能を利用することで、プラスミドとは比較にならないほどの安定性が得られたのである。

ここでは触れなかったが、スリーパーのもう 1 つの特徴は数種類の遺伝子を同時に発現させられることで、この特徴を生かして、複数の酵素を必要とするバイオリアクターへの応用も試みている⁽⁸⁾。

現在、スリーパー株の培養は数トンクラスの規模でも行われており、温度変化による培養制御がこのクラスでも十分利用可能であることが確かめられている。

最後に、本研究開発を遂行するに当たり、数々のご指導・ご鞭撻をいただき、あるいは参加協力いただきましたキッコーマン(株)および(財)野田産業科学研究所の多くの方々に感謝申し上げます。また、終始ご指導いただいた東京大学名誉教授、池田庸之助先生に深謝いたします。

- (1) E. Nakano and T. Masuda: *Agric. Biol. Chem.*, **46**, 313 (1982).
- (2) N. E. Murray and K. Murray: *Nature*, **251**, 476 (1974).

- (3) A. Rambach and P. Tiollais : *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **71**, 3927 (1974).
- (4) M. Thomas, J. R. Cameron and R. W. Davis : *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **71**, 4579 (1974).
- (5) R. Sussman and F. Jacob : *Compt. Rend. Acad. Sci.*, **254**, 1517 (1962).
- (6) A. R. Goldberg and M. Howe : *Virology*, **38**, 200 (1969).
- (7) 中野衛一 : 蛋白質 核酸 酵素, **32**, 1133 (1987).
- (8) 中野衛一, 松山 旭 : 蛋白質 核酸 酵素, **35**, 2348 (1990).
- (9) L. Enquist and N. Sternberg : "Methods in Enzymology," Vol. 68, ed. by R. Wu, Academic Press, New York, 1979, p 281.
- (10) B. Horn : "Methods in Enzymology," Vol. 68, ed. by R. Wu, Academic Press, New York, 1979, p 299.
- (11) D. Court and A. B. Oppenheim : "Lambda II," ed. by R. W. Hendrix *et al.*, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, 1983, p 251.
- (12) M. E. Furth and S. H. Wickner : "Lambda II," ed. by R. W. Hendrix *et al.*, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, 1983, p 145.
- (13) Y. Koyama and E. Nakano : *Agric. Biol. Chem.*, **54**, 1315 (1990).
- (14) Y. Koyama, S. Kitao, H. Yamamoto-Otake, M. Suzuki and E. Nakano : *Agric. Biol. Chem.*, **54**, 1453 (1990).
- (15) Y. Koyama, H. Yamamoto-Otake, M. Suzuki and E. Nakano : *Agric. Biol. Chem.*, **55**, 1259 (1991).
- (16) T. Masuda, H. Tatsumi and E. Nakano : *Gene*, **77**, 265 (1989).
- (17) B. E. Uhlin and K. Nordstrom : *Mol. Gen. Genet.*, **165**, 167 (1978).