タンパク質生産における組換え糸状菌の利用†

堀内 裕之, 高木 正道

(東京大学農学部)

1. はじめに

遺伝子工学の技術の発展に伴い異種遺伝子をさまざまな生物に導入し、その遺伝子産物を導入した宿主に生産させることが可能となった。それにより、異種遺伝子産物生産のためのよりよい宿主の選択とその宿主に対する形質転換系の確立が精力的に行われてきた。この場合、まず宿主に用いる生物が人体にとって安全であることが重要である。一方、生産させる異種遺伝子産物を細胞外に分泌させることができれば、細胞内プロテアーゼの影響を回避できること、その後のタンパク質の精製が容易であること、タンパク質を多量に生産させることによる宿主の生育阻害の可能性がないこと、などの点で有利になる。よって宿主として利用する生物は高いタンパク質分泌能力を持つことが望まれる。糸状菌には、古来より発酵食品、醸造などに利用され人間の生活と深いかわりを持つことにより人体にとって安全であることが確認されているもの、さらに菌体外に多種の酵素を多量に(数 g/l〜数十 g/l 程度)培地中に分泌する能力を持つもの、培養工学的知見が蓄積されているもの、などが多種存在することから異種遺伝子産物生産の宿主として注目を集めている。そこで本レビューでは糸状菌を宿主とした異種遺伝子産物生産についての現状と、今後の問題点を述べる。また、分泌は菌糸の先端で先端生長と共役した系で主に行われると考えられるので、糸状菌の菌糸の先端生長についても筆者らの研究結果を中心に触れることにする。なお、糸状菌によるタンパク質生産については、64 巻 5 号の本欄においても塚越により述べられているので⁽¹⁾、今回は主に最近の報告についてまとめた。

2. 糸状菌を利用した異種遺伝子産物の生産

これまで糸状菌を宿主として分泌生産されたことが報告されているタンパク質を表 1 に示す。*Aspergillus nidulans* は菌体外へのタンパク質分泌能は高くないが、分子生物学的手法が早くから確立されていたため、糸状菌を宿主とした分泌生産のモデルシステムとしてさまざまな異種タンパク質の生産が試みられている。その後、*A. oryzae*, *A. niger* (*A. awamori*), *Trichoderma reesei* などの菌体外分泌能の高い糸状菌が宿主として利用されるようになった。糸状菌由来の酵素としては、凝乳酵素としてチーズの製造に利用されている *Rhizomucor miehei* の酸性プロテアーゼが、*A. oryzae* 由来の α -アミラーゼ遺伝子のプロモーター下流にその cDNA を連結することにより *A. oryzae* を宿主として 3 g/l 以上分泌されること⁽²⁾、*Rhizomucor miehei* 由来のリパーゼ⁽³⁾、*Humicola lanuginosa* 由来のリパーゼも *A. oryzae* を宿主として菌体外に分泌生産されること⁽⁴⁾が報告されている。また、*A. oryzae* 由来の α -アミラーゼが *T. viride* を宿主として 1 g/l 分泌されることも報告されている⁽⁵⁾。一方、高等動物由来である仔ウシキモシンについても *A. awamori* を宿主として分泌生産の系が検討改良されつつある。この場合、グルコアミラーゼの高分泌変異株を宿主とし、導入する遺伝子はグルコアミラーゼ遺伝子のコーディング領域の C 末端アミノ酸の直下流に仔ウシプロキモシン cDNA のコーディング領域をフレームをあわせて繋いだものを用い、グルコアミラーゼとプロキモシンの融合タンパク質として分泌させる方法をとっている。このようにして生産された融合タンパク質は自己触媒的に成熟型キモシンへと変化することが報告されている。この場合、菌体外への分泌量は 150 mg/l 程度でありグルコアミラーゼの分泌シグナルにプロキモシンを直接融合させた場合の 10 倍以上の分泌量であった⁽⁶⁾。さらに宿主の酸性プロテアーゼ遺伝子を遺伝子破壊の方法で破壊することにより、宿主由来の菌体

† Utilization of Recombinant Filamentous Fungi for Protein Production.
Hiroyuki HORIUCHI and Masamichi TAKAGI
(Department of Agricultural Chemistry, University of Tokyo, Tokyo 113)

表 1 組換え糸状菌を利用したタンパク質の生産

由来	分泌されたタンパク質	宿 主	文献
動 物	キモシン	<i>Aspergillus nidulans</i>	(6, 7)
		<i>A. oryzae</i>	
		<i>Trichoderma reesei</i>	
		<i>A. awamori</i>	
		<i>A. nidulans</i>	
	ヒト, インターフェロン	<i>A. nidulans</i>	(8)
	ヒト, 組織プラスミノゲンアクチベーター	<i>A. nidulans</i>	
	ヒト, α_1 -アンチトリプシン	<i>A. nidulans</i>	
	ヒト, インターロイキンB	<i>A. nidulans</i>	
植 物	ヒト, 顆粒細胞コロニー刺激因子	<i>A. nidulans</i>	(9)
	ヒト, インターロイキン6	<i>A. nidulans</i>	
	ヒト, ラクトフェリン	<i>A. oryzae</i>	(15)
	タウマチン	<i>A. oryzae</i>	
糸状菌	<i>Rhizomucor miehei</i> 酸性プロテアーゼ	<i>A. nidulans</i>	(2)
		<i>A. oryzae</i>	
	<i>Rhizomucor miehei</i> リパーゼ	<i>A. oryzae</i>	(3)
	<i>Humicola lanuginosa</i> リパーゼ	<i>A. oryzae</i>	(4)
	<i>Phlebia radiata</i> ラッカーゼ	<i>T. reesei</i>	(16)
細 菌	<i>A. oryzae</i> α -アミラーゼ	<i>T. viride</i>	(5)
	<i>Cellulomonas fimi</i> エンドグルカナーゼ	<i>A. nidulans</i>	<i>A. nidulans</i>
	<i>E. coli</i> エンテロトキシン	<i>A. nidulans</i>	

表1は五味らの総説⁽¹⁷⁾のものに最近の報告を加えたもので、文献は本文中で引用したもの、新たに加えたものについてのみ記載した。

外プロテアーゼ活性を弱めた株を宿主として用いた結果キモシンを培地中へ 250 mg/l 分泌させることが可能になった。最近では、この宿主にさらに繰返し変異をかけキモシンの高分泌株をスクリーニングすること、および、宿主にデオキシングコース耐性変異を導入すること（これによりグルコアミラーゼ遺伝子のプロモーターがグルコース抑制を受けずに構成的に発現するようになる）により、キモシンを培地中に 1 g/l 以上分泌生産させることに成功している⁽⁷⁾。また、Contreras らは、ヒトのインターロイキン6をキモシン同様に *A. niger* のグルコアミラーゼ遺伝子のC末端アミノ酸の下流に KEX 2 様のプロテアーゼにより認識されるアミノ酸配列をコードする配列を、フレームをあわせて挟んで繋ぐことにより作製したキメラ遺伝子を *A. nidulans* に導入した。その結果、グルコアミラーゼ遺伝子の分泌シグナルのみ、または分泌シグナルとプロ配列にインターロイキン6を繋いだ場合に比べて、250 倍も効率よく分泌されることを明らかにしている。また、分泌されるインターロイキン6は KEX 2 様プロテアーゼによりN末端のグルコアミラーゼ部分が効率よくプロセッシングされることも報告している⁽⁸⁾。これらの場合グルコアミラーゼ由来

の配列がその後に繋がれたアミノ酸配列の分泌効率をあげるとともに、プロテアーゼなどによる分解から守るためであろうと考えられている。以上のことより高等動物などのタンパク質を糸状菌に生産させる場合、その糸状菌において高分泌されるタンパク質のC末に目的のタンパク質を融合させる形で生産させること、宿主のプロテアーゼ遺伝子を破壊することなどにより目的のタンパク質の分泌量をかなり上昇させることが期待できる。一方、高等動物の糖タンパク質を糸状菌に生産させる場合糖鎖の構造が問題になるが、これについてヒトのラクトフェリンを *A. oryzae* で生産させたときに、ヒト由来のものと同程度のサイズの糖鎖が付加されることが報告されている⁽⁹⁾。しかしその糖の配列については同一でない可能性が高く、糖鎖の構造が生理活性に影響を及ぼすタンパク質を生産させる場合には問題である。今後、糖鎖工学の発展などにより、いったん生産されたタンパク質の糖鎖の構造の改変が可能になれば、この問題も解決されるものと思われる。図1に糸状菌での異種タンパク質生産における研究課題を示した。

3. 糸状菌の先端生長と分泌

糸状菌によるタンパク質分泌は、菌糸の先端で起こる

(1) 宿主・ベクター系

マーカ、コピー数、組み込み位置、安定性、多核性（ホモ化）

(2) プロモーター

グルコアミラーゼ、 α -アミラーゼ、セルラーゼ、グリセルアルデヒド 3-ホスフェートデヒドロゲナーゼ、ホスホグリセレートキナーゼ、その他

(3) プレ配列

糸状菌および糸状菌以外のものに由来するものの利用

(4) プロ配列（N末端側に付与する配列）とそのプロセッシング

糸状菌に由来するものの利用（グルコアミラーゼの全アミノ酸配列の利用等）

(5) 糖鎖の付加と構造

(6) 宿主のプロテアーゼ

変異株の取得と遺伝子破壊によるプロテアーゼ低生産株の造成

(7) 宿主の分泌能と先端生長

高分泌変異株の取得と先端生長機構の解析

図 1 糸状菌による異種タンパク質高分泌のための研究課題

と考えられており⁽¹⁰⁾、菌糸の先端生長のメカニズムを探ることは糸状菌の高分泌能を解明するうえで、重要なテーマの1つであると考えられる。筆者らのグループでは菌糸の先端生長が非常に早く、菌体外へのタンパク質分泌能も高い *Rhizopus* 属の糸状菌についてその先端生長のメカニズムを分子レベルで解析している。*Rhizopus* 属糸状菌は接合菌類に属し、古くから中国、東南アジアなどで醸造、発酵食品の生産に利用されており、その細胞壁はキチンとキトサンを主成分としている。われわれはキチンの合成・分解に焦点をあて、この糸状菌からキチナーゼ、キチン合成酵素をコードする遺伝子の単離、解析を行っている。また *A. nidulans* のキチン合成酵素についても単離、解析を行っている。

(1) キチナーゼ遺伝子の単離と解析⁽¹¹⁾: *Rhizopus oligosporus* の菌体培養上清より 2 種のキチナーゼを精製し、その N 末端アミノ酸配列を参考にして合成したプローブを用いて 2 種のキチナーゼ遺伝子 (*chi1*, *chi2*) を単離した。この 2 種の遺伝子がコードするキチナーゼは非常に相溶性が高く塩基配列から推定されるアミノ酸配列と精製標品について決定した C 末端アミノ酸配列を比

図 2 菌類のキチナーゼの構造

較したところ、両者とも C 末端のプロセッシングが起きていると推定された。またこの遺伝子を *S. cerevisiae* のグリセルアルデヒド 3-ホスフェートデヒドロゲナーゼ遺伝子のプロモーター下流に繋ぎ酵母で分泌させたところ不活性のキチナーゼが分泌された。このことから *R. oligosporus* においてキチナーゼは不活性な型で合成され、その後プロテアーゼによるプロセッシングを受けて活性化されると考えている。*R. oligosporus* のキチナーゼと *S. cerevisiae* のキチナーゼの構造の比較を図 2 に示す。

(2) キチン合成酵素遺伝子の単離と解析: *R. oligosporus* のキチン合成酵素遺伝子についても *S. cerevisiae* のキチン合成酵素 2 遺伝子をプローブとして 2 種 (*chs1*, *chs2*) 単離した⁽¹²⁾。さらに同様の手法で *A. nidulans* より 2 種のキチン合成酵素遺伝子 (*chsA*, *chsB*) を単離した。この *A. nidulans* の *chsA*, *chsB* 遺伝子について遺伝子破壊を行ったところ、*chsA* 破壊株の菌糸の先端生長については野生株と同様の表現形を示したのに対し、*chsB* 破壊株において菌糸の先端生長が強く抑えられた⁽¹³⁾。最近 Yarden らは、*Neurospora crassa* においてキチン合成酵素 1 遺伝子の不活化を行ったところ、その先端生長が強く抑えられることを報告している⁽¹⁴⁾。これらのことから、ある種のキチン合成酵素が菌糸の先端生長において非常に重要な役割を果たしていると考えられる。

今後、これらキチナーゼ、キチン合成酵素の菌糸先端生長における役割をさらに解析することが糸状菌における先端生長とタンパク質高分泌の関係の解明に役立つものと思われる。

(1) 塚越規弘: 農化, 64, 1056—1059 (1990).

(2) T. Christensen, H. Woeldike, E. Boel, S. B. Mortensen, K. Hjortshøj, L. Thim, and M. T. Hansen: *Bio/Technology*, 6, 1419—1422 (1988).

(3) B. Høge-Jensen, F. Andreassen, T. Christen-

- sen, M. Christensen, L. Thim, and E. Boel: *Lipids*, **24**, 781—785 (1989).
- (4) 高木 忍, トム ブスク ニールセン: 1992 年度日本農芸化学会大会講演要旨集, 1992, p. 377.
- (5) C. Cheng and S. Udaka: *Agric. Biol. Chem.*, **55**, 1817—1822 (1991).
- (6) M. Ward, L. J. Wilson, K. H. Kodama, M. W. Rey, and R. M. Berka: *Bio/Technology*, **8**, 435—440 (1990).
- (7) N. S. Dunn-Coleman, P. Bloebaum, R. M. Berka, E. Bodie, N. Robinson, G. Armstrong, M. Ward, M. Przetak, G. L. Carter, R. LaCost, L. J. Wilson, K. H. Kodama, E. F. Baliu, B. Bower, M. Lamsa, and H. Heinsohn: *Bio/Technology*, **9**, 976—981 (1991).
- (8) R. Contreras, D. Carrez, J. R. Kinghorn, C. A. M. J. J. van den Hondel, and W. Fiers: *Bio/Technology*, **9**, 378—381 (1991).
- (9) P. P. Ward, J.-Y. Lo, M. Duke, G. S. May, D. R. Headon, and O. M. Connely: *Bio/Technology*, **10**, 784—789 (1992).
- (10) H. A. B. Wösten, S. M. Moukha, J. H. Sietsma, and G. H. Wessels: *J. Gen. Microbiol.*, **137**, 2017—2023 (1991).
- (11) K. Yanai, N. Takaya, N. Kojima, H. Horiuchi, A. Ohta, and M. Takagi: *J. Bacteriol.*, **174**, 7398—7406 (1992).
- (12) 本山高幸, 須藤正幸, 矢内耕二, 堀内裕之, 太田明德, 高木正道: 1992 年度日本農芸化学会大会講演要旨集, 1992, p. 285.
- (13) 小島信子, 矢内耕二, 高谷直樹, 堀内裕之, 太田明德, 高木正道: 1992 年度日本農芸化学会大会講演要旨集, 1992, p. 285.
- (14) O. Yarden and C. Yanofsky: *Genes Dev.*, **5**, 2420—2430 (1991).
- (15) Y. T. Hahm and C. A. Batt: *Agric. Biol. Chem.*, **54**, 2513—2520 (1990).
- (16) M. Saloheimo and M.-L. Niku-Paavola: *Bio/Technology*, **9**, 987—990 (1991).
- (17) 五味勝也, 原 昌道: 蛋白質 核酸 酵素, **35**, 2552—2566 (1990).