

## 細菌にただひとつのタンパク質を作らせる

渡辺 誠司

物質を変換して付加価値の高いモノを得るために、タンパク質である酵素が多用されている。新しい化合物を効率良く得るためには、酵素がどのような活性をもち、どのような物質（基質）を、どのような物質（産物）へ変換するかを知ることが非常に重要であり、加えてより良い変換効率を得る条件を探ることもまた重要となる。これらを知る上で、タンパク質の立体構造を理解することが重要となるが、構造解析を行うためには精製されたタンパク質が多量に必要となる。これまでに多くのタンパク質の大量発現、精製、そして構造解析がなされてきた。

一方、現在、盛んに構造解析がなされているタンパク質に膜トランスポーターがある。トランスポーターは生体で物質を変換する際の基質取込みおよび産物排出に関わるため、物質生産において重要なタンパク質複合体である。トランスポーターは複数のタンパク質が集合しており、それらが生体膜内に埋没しているため、大量発現、精製、および構造解析にいたるすべてが困難である。

今回紹介するSPP (Single Protein Production) システムは、MazFというRNaseを利用したユニークなタンパク質発現系である<sup>1)</sup>。このMazFは微生物生理学的にも非常に興味深いタンパク質であるので、興味のある方はぜひ文献を一読いただきたい<sup>2)</sup>。MazFは、一本鎖RNAのACA配列を認識して切断し、菌体内のほぼすべてのmRNAを分解する。目的タンパク質をコードするmRNA中にACA配列が含まれないようにDNA配列を変換したプラスミドを用いることで、MazFによる分解を受けない1種類のmRNAのみが菌体内に存在することになる。タンパク質合成に必要なリボソームなどはそのままであるため、そのmRNAをタンパク質へ翻訳する作業が行われ、ただひとつのタンパク質のみが菌体の中に蓄積していく(図1)。

タンパク質の立体構造解析は、結晶化させたタンパク質にX線を照射して回折結果を解析するX線回折法が

一般的であるが、NMR (Nuclear Magnetic Resonance) や電子顕微鏡を使った解析法も近年発達してきている。NMR法は溶液中の、すなわち実際に反応を行うときの酵素の構造を把握したり、基質と結合した際の構造の変化を詳しく調べることが可能である。しかし、NMR法ではタンパク質を安定同位体<sup>13</sup>C, <sup>15</sup>N, あるいは<sup>2</sup>Hでラベルする必要があり、そのラベル効率や経済的理由から利用が困難であった。SPPシステムにおいては、安定同位体の取り込み効率が高く、発現させる菌液を濃縮できるため、安定同位体の使用量がきわめて少なく済む特徴がある<sup>3)</sup>。

SPPシステムのもう一つの特徴は、生体細胞を使って発現をさせる点にある。通常、mRNAから翻訳された後のタンパク質はそれだけでは機能を発揮できず、生体内で折り畳まれたり、S-S結合を形成することで活性型の構造となり、その多くは活性を発揮する場所に局在化する。また、複数のタンパク質が集まることで一つの機能を発揮したり、リン酸化などの修飾を受ける場合もある。SPPシステムでは生体細胞を用いることから、大量発現させたタンパク質の高次構造形成、局在化、翻訳後修飾などが行われる<sup>4)</sup>。一方、生細胞を用いない*in vitro* 翻訳系においては高次構造化、局在化、および修飾を行うための酵素や脂質を目的に応じて加える必要があり、煩雑かつ低効率となる。

発酵食品製造の観点から見ると、タンパク質の構造解析や機能解析は非常にミクロな領域からのアプローチであるが、そこで得られた知見は必ずマクロな領域（製造）にも活用される。発酵食品は微生物の働きによって作られ、発酵というプロセスを経て原料から付加価値の高いモノが生産される。食酢製造で肝となる酢酸菌を例にとると、エタノールを酢酸に変換する反応をはじめ、多くの生体反応が細胞膜で起こっており、数多くのトランスポーターが存在することが実験データやゲノム情報から示唆されている<sup>5)</sup>。これら発酵に関わるタンパク質の構造解析と機能解析を進めることで、より生産効率の高い、また付加価値の高いモノの提供ができるだろう。

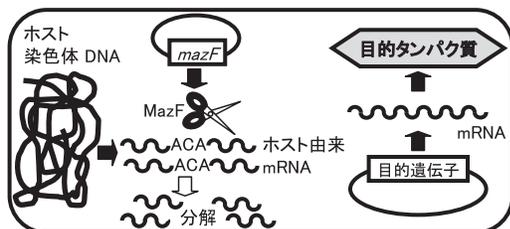


図1. SPPシステムによるタンパク質発現モデル

- 1) Suzuki, M. *et al.*: *Mol. Cell*, **18**, 253 (2005).
- 2) Yamaguchi, Y. and Inouye, Y.: *Nat. Rev. Microbiol.*, **9**, 779 (2011).
- 3) Mao, L. *et al.*: *J. Struct. Funct. Genomics*, **10**, 281 (2009).
- 4) Mao, L. *et al.*: *Protein Science*, **19**, 2330 (2010).
- 5) Nakano, S. *et al.*: *Appl. Environ. Microbiol.*, **72**, 497 (2006).