

麹菌によるタンパク質大量生産システムの開発

坪井 宏和*・幸田 明生・峰時 俊貴・坊垣 隆之

麹菌 (*Aspergillus oryzae*) は、わが国において古くから清酒、味噌、醤油などの製造に使用されており、麹菌菌体とその生産物の安全性がきわめて高いこと、さらにアミラーゼなどの産業用酵素を大量に分泌生産する能力を有していることから、タンパク質生産の宿主として利用されている。筆者らは、*Aspergillus* 属において目的のタンパク質を効率よく生産させる高発現システムを確立し、現在、本システムを用いたタンパク質受託発現サービスを提供している。

本稿では、筆者らの高発現システムの概要を述べると共に、麹菌発現系の利点や今後の課題についても紹介したい。

シス・エレメント RegionIII の機能を利用したプロモーターの改良について

強力な転写活性を持つプロモーターを構築するにあたり、アミラーゼ系遺伝子の発現制御機構を解析する過程で発見したシス・エレメント (RegionIII) を多重導入することによる転写活性化を試みた。

アミラーゼ系遺伝子の発現は、マルトース、デンプンなどによる誘導を正に制御する転写因子 amyR とコンセンサス配列 (CGG-N8-CGG) の結合^{1,2)}、および多くの真核微生物に存在する広域転写因子である Hap 複合体と CCAAT 配列の結合³⁾により、転写レベルで協調して活性化される。麹菌の α -グルコシダーゼ遺伝子のプロモーターには、この二つのシス・エレメントが RegionIII と呼ばれる領域に連続して存在する (図1)⁴⁾。そこで、*A. oryzae* 宿主においてさまざまなプロモーターに RegionIII の 12 回繰り返し配列を導入したところ、*A. oryzae* 由来のグルコアミラーゼ遺伝子のプロモーター

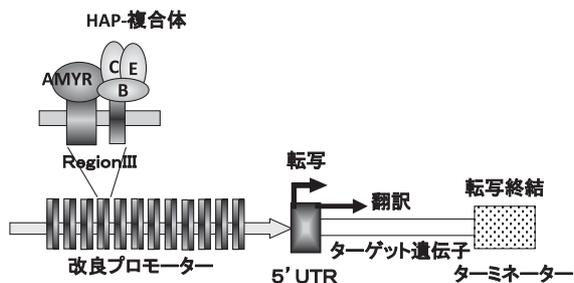


図1. 麹菌大量生産システムの発現カセット構成

で約4倍 (P-glaA142), *Aspergillus niger* の No8 プロモーターで約6倍 (P-No8142) のプロモーター活性の増加が観察された⁵⁾。さらに、麹菌の解糖系遺伝子の中でも特に高発現しているエノラーゼ遺伝子プロモーターへの RegionIII 導入を試みたところ30倍以上のプロモーター活性 (P-enoA142) の増加を示した (図2)⁶⁾。以上より、RegionIII の導入はプロモーターの転写活性化能を改良するための非常に効果的な手段であると考えられた。また、RegionIII の導入によるプロモーター活性の改良は、*A. niger* や *Aspergillus luchuensis* を宿主とした場合にも確認されており、*Aspergillus* 属宿主において広く機能することが予想された。

5'UTR の改変による翻訳の効率化について

目的のタンパク質をより高いレベルで発現させるためには、上で述べた転写の活性化に加えて、転写後の過程におけるタンパク質発現の効率を改良することも重要と考えられた。そのような観点から、筆者らは次に、転写産物 (mRNA) をより有効に利用するために翻訳の効率化を試みた。

真核生物における一般的な翻訳開始機構としては、リボソームによる mRNA 5' 末端からのスキヤニングモデルが提唱されている。ここでは、mRNA 5' 末端から開始コドンまでの 5'UTR が重要な役割を担っており、そ

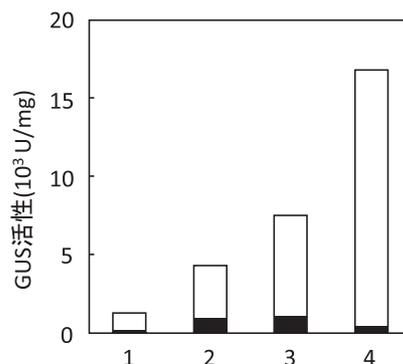


図2. シス・エレメント導入によるプロモーターの改良。プロモーター活性は、改良プロモーターの制御下にある β -グルコニダーゼ (GUS) 遺伝子が1コピー相同的に導入された形質転換体の GUS 活性を指標とした。RegionIII の繰り返し配列導入前の活性を■、導入後の活性を□で示す。レーン1: P-agdA142, レーン2: P-glaA142, レーン3: P-No8142, レーン4: P-enoA142。

*著者紹介 大関株式会社総合研究所化成品開発グループ (課長) E-mail: hirokazu.tsuboi@ozeki.co.jp

の領域の構造や配列が翻訳効率に大きく影響すると考えられている。

一方、麹菌をはじめとする糸状菌の翻訳機構についてはほとんど研究されておらず、5'UTRと翻訳効率との関係を定量的に解析した報告はなかった。そこで筆者らは、翻訳における5'UTRの影響を検討するために、同一プロモーターに異なる5'UTRを連結しレポーター遺伝子産物の生産量を活性により評価した⁷⁾。まず、高発現プロモーターP-No8142の下流に、レポーターとして大腸菌β-グルクロニダーゼ (GUS) 遺伝子をpBI221由来の5'UTRを含んだ形で連結したコントロールベクターを構築した。次に、このベクターの5'UTRをNo8142プロモーター由来の5'UTRに置換したもの(pNANG-8142UTR)、さらに3'側にエノラーゼ遺伝子(enoA)の5'UTRを追加したもの(pNANG-8142/enoAUTR)、およびほぼ完全にenoAの5'UTRに置換したもの(pNANG-enoAUTR)を構築(図3A)し、得られた形質転換体のGUS活性を比較した結果、コントロールに比べて4~8倍GUS活性が上昇した(図3B)。ノーザン解析(図3C)によりそれぞれの形質転換体のmRNA量には違いが見られないことから、得られたGUS活性の上昇は、転写量の増大やmRNAの安定性の向上などによるものではなく、翻訳段階に起因したものであり、単位mRNAあたりの翻訳効率が上昇したものであることが示された。

次に、もっとも高い翻訳効率を示した発現コンストラクト、pNANG-enoAUTRの多コピー形質転換体を取得しGUS活性を評価した。その結果、非常に高いGUS活性(161,000 U/mg protein)が得られ、蓄積したGUSタンパク質は菌体内全可溶性タンパク質の50%以上を占

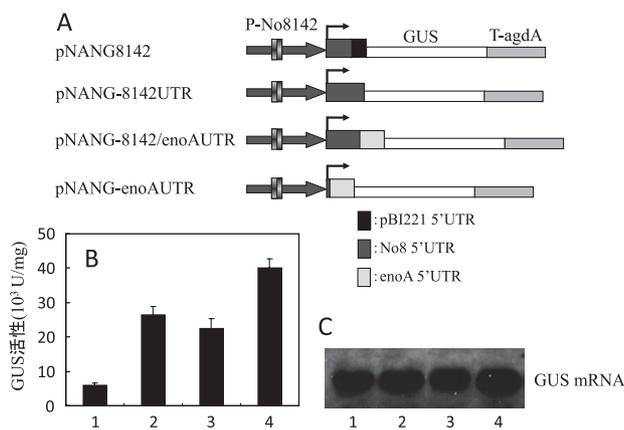


図3. 翻訳効率における5'UTRの影響. 異なる5'UTRを導入した発現コンストラクトの模式図(A), 相同的1コピー導入株のGUS活性(B), ノーザン解析(C). レーン1: pNANG8142, レーン2: pNANG-8142UTR, レーン3: pNANG-8142/enoAUTR, レーン4: pNANG-enoAUTR.

めるほどであった。以上の結果から、5'UTRの改変により翻訳(開始)効率を高めることが異種タンパク質の高生産に非常に重要であることが確認された。

一般的に、翻訳効率には5'UTRの長さ、2次構造、開始コドン近傍の塩基配列などが重要な役割を担っていると考えられている。今後、多種類の5'UTRを試験することにより、さらに効率的な5'UTRが取得できるだけでなく、mRNAの配列・構造と翻訳効率の関係を体系的に理解することが可能になるだろう。

高効率なターミネーターの探索と利用について

遺伝子発現においては、ターミネーターによる効率的な転写終結も重要であると考えられる。糸状菌で作用する高効率なターミネーターを探索できれば、タンパク質の生産性を増加できると考えられる。

ここで、真核生物で一般に提唱されている転写終結機構について説明する。動物細胞などでは、転写終結部位の近くにAAUAAAという配列があり、これを特定の酵素が認識して、その3'側(下流)約25塩基のところmRNAを切断している。さらに、mRNAの3'末端に普通200~400個のA(「ポリ(A)鎖」という)が付加される⁸⁾。このポリ(A)鎖はmRNAの目印で、キャップ構造とともに働いて、翻訳の効率を高めるとされている。また、3'側からの分解を防ぐ働きもある。

糸状菌のターミネーターについても予測遺伝子の直後から数百bpの塩基配列をPCRなどで取得することが可能となったが、ターミネーターの配列、構造、機能について詳細に解析した報告はなく、その機構はまったく解明されていない。それゆえ、糸状菌宿主において新規なターミネーターを探索することによりタンパク質の生産量を増大させようとする試みはこれまでなかった。

そこで筆者らは、優れたターミネーターとして機能する塩基配列の取得を目的として*A. oryzae*のゲノムライブラリーを作製し、前述のGUSをレポーターとしてショットガンクローニングを行った。その結果、高いレポーター活性を示す配列としてT-2-5-1を取得した。T-2-5-1は1577bpからなる断片であった。しかしながら、ゲノム

表1. 探索したターミネーターがGUSレポーター活性に及ぼす影響

| | 使用した領域 | GUS活性 (U/mg) |
|-------------|---------|-------------------|
| T-agdA (既存) | | 4.6×10^4 |
| 2-5-1 | 1-1577 | 6.3×10^4 |
| 2-5-11 | 1-827 | 7.5×10^4 |
| 2-5-12 | 1-572 | 6.5×10^4 |
| 2-5-13 | 261-827 | 5.3×10^4 |
| 2-5-14 | 261-572 | 2.5×10^4 |

表2. 高生産システムを利用したタンパク質生産実績

| タンパク質 | 起源 | 所在 | 発現量 |
|--------------------------------|------|-----|--|
| 糖質分解酵素 | 糸状菌 | 分泌 | 15 g/L 以上 |
| β -glucosidase | 糸状菌 | 分泌 | 5 g/L 以上 |
| Lipase | 糸状菌 | 分泌 | 4 g/L 以上 |
| S-1 nuclease | 糸状菌 | 分泌 | 0.5 g/kg フスマ (固体培養) |
| β -mannosidase | 糸状菌 | 分泌 | 2.6 g/L |
| β -glucuronidase | 大腸菌 | 菌体内 | 70% (菌体内総タンパク質) |
| Bacterial alkaline phosphatase | 大腸菌 | 菌体内 | 30% (菌体内総タンパク質) 4.4 g/kg フスマ (固体培養) |
| Lipase | 酵母 | 分泌 | 1 g/L 以上 |
| α -glucan phosphorylase | 植物 | 菌体内 | 100 mg/L |
| Lysozyme | ニワトリ | 分泌 | 数十 mg/L |
| 分泌タンパク質A | ヒト | 分泌 | 50 mg/L |

情報によってORFと予測される配列の直後には位置していなかった。そのため、偶然ターミネーターとして機能する配列が取得できたと考えられた。

次に、3'RACEによりT-2-5-1の転写終結部位を調べたところ、ターミネーターの上流より343～460 bpに存在していた。ターミネーターを短縮化するため、転写終結部位より上流30 bpまでのヌクレオチド鎖を含む領域を削除しないようにトランケートしたT-2-5-1の断片を4種類作製した。これらをT-2-5-1の代わりに導入しGUS活性を測定したところ、既存の α -グルコシダーゼ遺伝子のターミネーター (T-agdA) と比較して高い活性を示した。特にT-2-5-11およびT-2-5-12ではGUS活性がそれぞれ1.61, 1.39倍増加した(表1)。

したがって、T-2-5-1, ならびにT-2-5-1をトランケートしたT-2-5-11およびT-2-5-12は、糸状菌で強力なターミネーターとして機能することが確認された。

麹菌発現系をさらに利用される系にするためには

ここまでの成果をもとに、高い転写活性を持つ改良プロモーターP-enoA142⁶⁾に、高い翻訳効率を示す熱ショックタンパク質Hsp12の5'UTR⁹⁾と高効率なターミネーターを連結することでオリジナルな高発現ベクターの開発に成功した。また、本稿で紹介した以外にもコドンの最適化やプロテアーゼ低生産宿主の使用などを実施し、総合力として高い収量で目的タンパク質を生産する発現システムを確立した。表2に、本発現システムを用いた発現例を示す。

これまでの受託プロジェクトでの発現成功率は、糸状菌由来タンパク質で93%、原核生物由来タンパク質で82%と高く、ユーザーから高い評価をいただいている。特に目的タンパク質の糖鎖が機能性に必須である場合、真核微生物でありタンパク質の分泌能力の高い麹菌が宿主としてもっとも相応しいケースもある。その一方で、

麹菌の糖鎖構造は詳細に解析されていないため、複雑な糖鎖構造を持つタンパク質を生産する際には注意が必要である。今後、糖鎖などの修飾機構を明らかにし、その機構を制御または改変することにより、麹菌発現系が利用される場面を増やしていきたいと考えている。

また、高等生物由来のタンパク質を分泌生産させた場合に、コドンの最適化などを実施したにもかかわらず、満足な生産性が得られない場合がある。この原因の一つとして、小胞体内に備わる品質管理機構によって目的のタンパク質が分解されていることが考えられる。今後はこの品質管理機構のメカニズムを理解することによって、何が分解される要因となっているのかを特定し、生産が困難とされているタンパク質を生産したいと考えている。

麹菌の長所は安全性と分泌生産能の高さであることから、この特徴を生かしつつ、今後も発現システムの強化を行って行きたい。結果、世の中に貢献できる事例が1件でも多く生まれれば、非常に喜ばしいことである。

文 献

- 1) Petersen, K. L. *et al.*: *Mol. Gen. Genet.*, **262**, 668 (1999).
- 2) Gomi, K. *et al.*: *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **64**, 816 (2000).
- 3) Kato, M.: *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **69**, 663 (2005).
- 4) Minetoki, T. *et al.*: *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **50**, 459 (1998).
- 5) 峰時俊貴: *化学と生物*, **38**, 831 (2000).
- 6) Tsuboi, H. *et al.*: *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **69**, 206 (2005).
- 7) Koda, A. *et al.*: *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **66**, 291 (2004).
- 8) Zhao, J. *et al.*: *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, **63**, 405 (1999).
- 9) Koda, A. *et al.*: *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **70**, 333 (2005).