

酒蔵発のタンパク質受託生産サービス

幸田 明生*・阪本 薫・山田 尚平・橋本 一俊・仙波 弘雅・木田真理衣
 畑 健介・加戸 悠・山田 浩之・坪井 宏和・坊垣 隆之
 (大関株式会社 総合研究所)

はじめに

日本の酒どころとして知られる灘五郷。当社はそのもっとも東側の「今津郷」に位置する創業300年を超える酒造メーカーである。当社総合研究所では、その技術的バックボーンとして本業である清酒醸造全般に関する研究開発はもとより、微生物や酵素など生物機能を新たな分野へ応用するための技術開発にも注力してきた。技術基盤を発展させてきた成果の一つが、現在提供している「タンパク質受託生産サービス」である。技術開発の始まりは、1990年代前半、清酒醸造において、なくてはならない微生物「麹菌」の形質転換系が開発され、分子生物学的なアプローチが急速に進み出した頃である。当社では、麹菌が多種類の酵素を菌体外に多量に分泌する能力に着目し、タンパク質生産宿主として利用するための研究を進め、現在の高生産システムを完成させた。また、受託生産サービスを拡大していく中で、麹菌宿主の他に、「遺伝子組換えカイコ」と「無細胞合成系」を加え、現在3種類の受託生産サービスを提供している。それぞれの系の特長と開発経緯について紹介したい。

麹菌を用いた組換えタンパク質生産

麹菌 (*Aspergillus oryzae*) は、わが国において長い年月にわたり醸造産業で利用されており、麹菌体とその生産物の安全性がきわめて高いこと、また、菌体外にアミラーゼなどの酵素タンパク質を多量に分泌生産する能力を有していることから、タンパク質生産の有望な宿主としてさまざまなグループにより研究が行われてきた。

当社では、麹菌アミラーゼ系酵素遺伝子の高発現に寄与するプロモーター上の共通保存配列 (RegionIII) を初めて見だし、その応用により、高い転写活性を示す改良プロモーターの構築に成功した^{1,2)}。また、麹菌において翻訳効率が5'UTR 依存的に大きく変化することを確認し、その領域を改変することで高い翻訳効率を実現した³⁾。いずれも、糸状菌の研究分野において先駆的な発見と技術開発であり、独自性の高い発現系となっている。加えて、新規なターミネーター配列の取得、生産

表1. 高発現システムを用いた生産事例

タンパク質	起源	生産量
糖質分解酵素	糸状菌	15 g/L以上
β-グルコシダーゼ	糸状菌	5 g/L以上
リパーゼ	糸状菌	4 g/L以上
β-マンノシダーゼ	糸状菌	2.6 g/L
リパーゼ	酵母	1.0 g/L以上
タンパク質1	放線菌	1.0 g/L以上
タンパク質2	放線菌	1.0 g/L以上
タンパク質3	植物	0.4 g/L以上
α-グルカンホスホリラーゼ	植物	0.1 g/L
リゾチーム	ニワトリ	0.05 g/L
タンパク質4	ヒト	0.05 g/L

したタンパク質を分解してしまうプロテアーゼ活性を抑えた株の育種などに取り組み、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⁴⁾、2009年より麹菌を用いたタンパク質受託生産サービスを提供している⁵⁾。

本発現システムを用いたタンパク質生産系は、最大で10 g/L以上の目的タンパク質分泌生産能を示す。麹菌のタンパク質分泌能は真核生物で最大とも言われ、麹菌宿主での生産性が他の生物種での生産性を大きく上回るケースも多い。これまでの受託プロジェクトにおける発現成功率は、糸状菌由来タンパク質で92%、原核生物由来タンパク質で65%、担子菌由来タンパク質で63%と高く、顧客から高い評価を頂いている。また、麹菌が安全な菌であることの理解が広まってきたことから、最近では食品関連領域での応用例も増えてきている。表1に、本発現システムを用いた生産事例を示す。

カイコを用いた組換えタンパク質生産

上述した麹菌の発現システムを用いた受託生産サービスを提供していく中で、哺乳類タンパク質を生産したいという問合せも増えてきたのだが、実のところ、麹菌は、微生物由来の酵素の大量生産や高純度生産には優れた能力を発揮するが、哺乳類由来のタンパク質の生産性は十分ではないケースが多い。そこで、タンパク質受託生産サービスの拡充を目的に、国立研究開発法人農業・食品

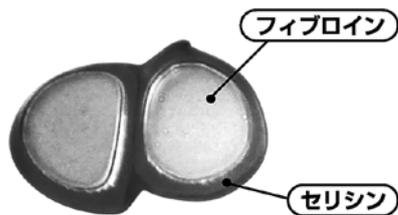


図1. 絹糸の構造. 絹糸の横断切片を色素染色したもの.

産業技術総合研究機構（農研機構）および株式会社免疫生物研究所から新たに遺伝子組換えカイコによるタンパク質生産技術を導入し、2014年5月より、カイコによるタンパク質受託生産サービスを開始した⁶⁾。「酒造メーカーが何故カイコを？」とよく聞かれたが、哺乳類タンパク質が得意なカイコの導入は、我々にとって自然なチャレンジであった。

カイコは、古来、絹糸の生産に利用され、完全に家畜化された昆虫である。幼虫は移動が少なく、成虫も飛ぶことができないため、飼育管理が容易である。また、数千年にわたる養蚕の技術が蓄積されており、大量飼育や人工飼料を用いた無菌飼育も可能である。加えて、ヒトに感染するウイルスなども確認されておらず、安全な生物である。このように、組換えタンパク質生産宿主として多くの利点を備えているカイコ⁷⁾を、当社におけるタンパク質生産の宿主の第2弾として導入したわけである。当社のサービスは、カイコの繭に組換えタンパク質を生産する遺伝子組換えカイコを作出するサービスである^{8,9)}。繭を構成する絹糸は、繊維の本体を形成するフィブロインと、フィブロインの周囲に存在する親水性のセリシンから構成されるが、目的タンパク質をセリシン層に局在させることで、繭を中性の緩衝液などに浸すだけでタンパク質を容易に回収することができる（図1）。抗体など複雑な構造のタンパク質を分泌発現させることが可能であり、高純度で回収できる。さらに、遺伝子組換えカイコの作出過程でウイルスを使用しないため、繭に作らせたタンパク質はカルタヘナ法の規制対象外となり顧客側の煩雑な手続なども回避できるというメリットがある。本系は、医薬品メーカーや体外診断薬メーカーからの依頼が多い。

カイコ無細胞タンパク質合成系

麹菌と遺伝子組換えカイコは、ターゲットタンパク質の大量生産に適した系であり、現在、実生産を視野に入れた複数のプロジェクトが進行している。他方、麹菌の形質転換や、カイコへの遺伝子導入には数か月単位の時間がかかるため、多種類のタンパク質を迅速に発現し評価したいといった研究目的には不適であった。そこで、

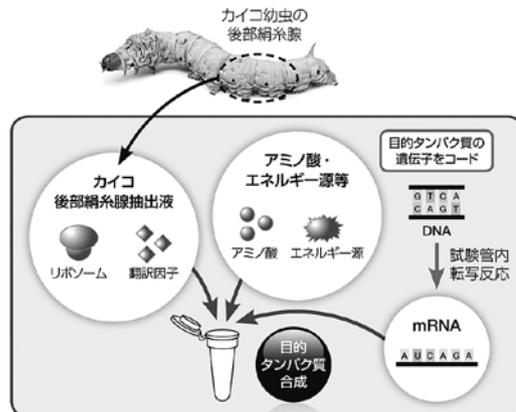


図2. カイコ後部絹糸腺抽出液を用いた無細胞タンパク質合成

迅速な合成サービスを提供することを目的に、新たな発現系を探索していたところ、沖縄工業高等専門学校の伊東教授らのグループの学会発表要旨が目にとまり、早速コンタクトを取った。約1年間の試験検討を経て、伊東教授が立ち上げた沖縄高専発のバイオベンチャーである株式会社シルクルネッサンスからカイコ無細胞タンパク質合成に関するノウハウの実施許諾を得た。当社における第3弾である。無細胞タンパク質合成とは、タンパク質合成反応に必要な各種因子（リボソーム、翻訳伸長因子など）を含んだ細胞抽出液に、目的タンパク質をコードしているmRNAとアミノ酸やエネルギー分子（ATP）など反応に必要な成分を加え、試験管内でタンパク質を合成する手法である。（株）シルクルネッサンスの無細胞合成技術は、カイコの後部絹糸腺抽出液を用いるユニークな系であり（図2）¹⁰⁾、すでにカイコそのものを用いた受託生産サービスを提供していた当社にとって、必然の「ご縁」を感じるものであった。2019年8月にスタートしたカイコ無細胞タンパク質合成サービスの最大の利点は、納期15営業日という速さである¹¹⁾。ベクター構築、mRNA合成、タンパク質合成、アフィニティー精製、解析までを15営業日で実施する。本合成系は、細胞毒性を有するタンパク質の合成も可能であり、ヒトなど哺乳類由来のタンパク質を高確率で可溶化合成できる。現在、合成量のさらなる増加や、一度に数十以上の多種類のタンパク質を効率的に迅速合成することを目指し、系の改良を進めている。

おわりに

本稿では、酒蔵の新たなチャレンジとしてバイオサービスについて紹介した。発端となった麹菌研究への着手、遺伝子組換えカイコの導入、無細胞合成系の導入、すべ



てご縁あつてのコラボレーションから構築したものである。当社の3つの系もそうであるが、タンパク質生産において、現時点で万能な系は存在しないため、ターゲットタンパク質の種類や用途によってベターと思われる系を選択することになる。顧客から相談を受けた際には、ターゲットタンパク質についてできる限りの情報を得たうえで、当社のこれまでの発現実績と知見に照らし合わせ、適していると思われる系を提案している。当社の系が不適と考えられる案件については、他社の系を推薦することもある。当社では、2012年から毎年継続的にバイオ関連の展示会に出展しており、これまでに延べ3000名以上の研究者の方々と意見交換し、関連情報も蓄積されてきており、実際の受託プロジェクトに活かせる場面が増えてきた。醸造微生物である麹菌の研究に端を発する酒蔵発の技術が、広くライフサイエンス分野に貢献できるよう、さらに有用性を高めていきたい。

文 献

- 1) Minetoki, T. *et al.*: *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **50**, 459 (1998).
- 2) Tsuboi, H. *et al.*: *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **69**, 206 (2005).
- 3) Koda, A. *et al.*: *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **66**, 291 (2004).
- 4) 坪井宏和ら：生物工学, **95**, 659 (2017).
- 5) 大関（株）「麹菌によるタンパク質受託発現」：
https://www.ozeki.co.jp/food_bio/protein_expression/aspergillus.html (2020/10/9).
- 6) 大関（株）「遺伝子組換えカイコによるタンパク質受託発現」：
https://www.ozeki.co.jp/food_bio/protein_expression/silkworm.html (2020/10/9).
- 7) 瀬筒秀樹, 立松謙一郎：生化学, **86**, 553 (2014).
- 8) Tomita, M. *et al.*: *Transgenic Res.*, **16**, 449 (2007).
- 9) Tomita, M.: *Biotechnol. Lett.*, **33**, 645 (2011).
- 10) 伊東昌章：蚕糸・昆虫バイオテック, **89**, 51 (2020).
- 11) 大関（株）「無細胞タンパク質合成サービス」：
https://www.ozeki.co.jp/food_bio/protein_expression/cell_free.html (2020/10/9).