

細胞表層工学によるリサイクル・バイオテクノロジーの展開 — 甲殻類廃棄物の有効利用に向けて —

植田充美

1. はじめに

「細胞表層工学 (Cell Surface Engineering)」とは、¹⁻⁶⁾ 細胞表層へ輸送局在化されるタンパク質の分子情報を活用して、外来タンパク質を細胞膜の外側や細胞壁にターゲティングさせ、未開拓エリアである細胞表層へ新機能を賦与することにより、従来の細胞を新機能を装備した細胞に生まれ変わらせる細胞育種工学でもある。別の見方をすると、すなわち生物細胞を生体触媒という見方をすると、遺伝子工学的に細胞表層に酵素・タンパク質を発現させ、細胞を固定化担体として利用することになり、酵素・タンパク質がプロモーターの活性化により生産されるため、再生機能を有するという画期的なメリットがあり、従来の遺伝子工学と固定化酵素というバイオテクノロジーの2本の支柱を結びつけたことになる。

2. 細胞表層輸送局在シグナル情報

酵母 *S. cerevisiae* で最も機能解析が進んでいる細胞壁タンパク質としては、細胞同士が、接合の時に誘導発現する性凝集細胞間接着分子であるアグルチニンタンパク質がある。このタンパク質には、 α 接合型細胞で発現する α -アグルチニンと a 接合型細胞で発現する a-アグルチニンがあり、ともに細胞壁に結合して活性部位が細胞の最外層から突き出ており、この2つの分子を介して細胞間接着が起こる。 α -アグルチニンと a-アグルチニンのコア部分はそれぞれ共に、GPI(グリコシルフォスファチジルイノシトール)アンカー付着シグナルと推定される疎水性領域をC末端に有しており、また、セリンとスレオニンに富む糖鎖修飾

* 京都大学大学院農学研究科応用生命科学専攻

部位と接着にかかわる活性部位がN末端側に有り、そのさらにN末端に疎水性の分泌シグナルを持つ分子構造からなる。細胞膜へのアンカーリングに必要なGPIアンカーは、原生動物、粘菌、酵母、昆虫から哺乳類にいたるまで様々な真核生物に見いだされており、その基本骨格はよく保存されている。酵母 *S. cerevisiae* の細胞壁に存在するタンパク質のGPIアンカー付加に必要なC末端疎水性アミノ酸配列は、疎水性の性質以外にあまり共通性が見られないが、C末端のこの疎水性部分で翻訳後の前駆体タンパクは小胞体膜に一時的に保持され、タンパク質部分は小胞体内腔に配向する。その後、おそらくトランスアミダーゼ活性を持つと思われる未知の酵素によりそのC末端GPI付加シグナル配列が認識されて、切断を受け、新たにできたC末端(ω 部位)は、既に小胞体で合成されているGPIアンカーのエタノールアミンのアミノ基との反応によりアミド結合が形成される。このようにアンカーリングされたタンパク質は小胞体内腔に露出した形で、さらにゴルジ体を経て、分泌小胞を介したエキソサイトーシスにより細胞膜へ輸送されて細胞膜に融合される。哺乳類のGPIアンカー付加タンパク質は、この融合によって細胞膜外に露出されて保持されるが、細胞壁をもつ酵母などの場合は、さらに細胞表層でPI-PLC (ホスファチジルイノシトール特異的ホスホリパーゼC)によりさらに切断をうけて細胞壁の最外層に移行する。その際、これらのタンパク質の細胞壁への固定には、GPIアンカーの糖鎖部分に細胞壁のグルカンが共有結合されることが重要なプロセスとなる。

具体的には、酵母 *S. cerevisiae* においては、前述した細胞表層最外殻に位置する性凝集素タンパク質である α -アグルチニンの分子情報を活用するが、この分子の構造は、分泌シグナル・機能ドメイン・細胞壁ドメイン(セリンとスレオニンに富むC末320アミノ酸残基)からなっており、このC末320アミノ酸残基のC末端にGPIアンカー付着シグナルが存在するので、分泌シグナル・機能ドメインを操作することによって、種々の酵素やタンパクを細胞表層に提示(ディスプレイ)することが可能となるのである。細胞表層タンパク質の移行プロセスを、特に、医薬品や食品や飲料などのバイオプロセスに応用する場合、その安全性が極めて重要であるが、その点を考慮すると、パン酵母 *S. cerevisiae* は格好の細胞である。我々は、この酵母を用いて、細胞表層に外来タンパク質を提示させる「細胞表層工学」を開発してきた。この新しい手法とそれによって創製された細胞は、アメリカのChemical & Engineering News (75, 32 (1997))などでも取り上げられ、世界初の技術と評されるとともに、その先駆性が高く

評価された。我々は、この技術を用いて、酵母細胞が従来持ち得ない機能を細胞表層に賦与して、新しい機能性細胞につくりかえた。このような細胞は、千手観音になぞらえて、「アーミング酵母(Arming Yeast)」と命名されている。¹⁻⁶⁾

細胞表層工学技術(アーミング技術)は、分泌経路と細胞表層提示のためのGPIアンカーシステムという真核生物細胞の細胞内外移行シグナルとそれによる分子メカニズムに立脚して生命情報を活用したシステムであり、遺伝子の側としては多くの酵素やタンパク質をコードするものが、細胞の側としては、原生動物や昆虫から動植物細胞に至るまで、適用範囲が広い点でも汎用性のある手法として価値を有すると考えている。細胞表層に発現提示させるターゲット分子として、細胞同士を接着させる細胞認識分子やレセプターや抗原・抗体、さらには、機能性タンパクなどが注目を集めることが期待されている。

3. 細胞表層工学からコンビナトリアル・バイオエンジニアリングの創成⁷⁻⁹⁾

タンパク質のナノバイオテクノロジーの基盤技術ともなった上記「細胞表層工学によるタンパク質ディスプレイ法(アーミング技術)」は、DNA情報を活性のあるタンパク質分子に変換する新技術でもある。この技術は、さらに、「コンビナトリアル」手法と組み合わせ、ランダムなDNA情報からこれまでに存在しなかったタンパク質を創製したりする潜在的な能力のある魅力あふれる表層ディスプレイ技術として、既知のDNA情報を機能タンパク質に迅速に変換したり、タンパク質の機能変換とそのスクリーニングを高速にしたり、これまでにこの世の中に存在しなかったタンパク質をランダムなDNA情報から創成したりするという「コンビナトリアル・バイオエンジニアリング」と呼ばれている新しい手法を生み出し、DNA情報を基盤とした高機能タンパク質などのバイオ分子の創成系として、また、新しい生体触媒の創製系として、ナノバイオテクノロジーの基盤技術となり、その将来性が囑望されている。すなわち、多くの遺伝子に由来するタンパク質を網羅的に、かつ迅速に(これは、ハイスループットとも呼ばれる)選択して機能解析するために、導入した個々のDNAから生まれてきた個々のタンパク質が個々の細胞の表層や担体などの上に安定な形でディスプレイされ、ディスプレイされた細胞や担体を一つの支持体として、ディスプレイされたタンパク質をいつも生きたまま、必要ならいつでも増幅できる。さらに、タンパク質のアミノ酸配列分析をしなくても、PCR(遺

伝子増幅)法などの併用により、導入されたDNAの配列からディスプレイされたタンパク質のアミノ酸配列が決定できるという他の方法論の追随を許さないメリットも創出される。こういった情報分子を機能分子に変換する新しく、簡易で、迅速で、しかも、多くの組み合わせの(コンビナトリアル)分子ライブラリーから適合するものをシステムティックに選択できるのが、ニューバイオテクノロジーとしての「コンビナトリアル・バイオエンジニアリング」なのである。DNAという情報資源を基にして、これまでにない新しい機能バイオ高分子や細胞の世界を開拓していこうとする「コンビナトリアル・バイオエンジニアリング」は、さらなる新機能素材や物質の出現を予感させ、革命的な分子創造のサイエンスを生みだしていくであろう。従来、望みの機能を持つ分子の自然界からのスクリーニングは膨大な時間と労力が必要であったが、効率的な機能性バイオ分子を創る手法とそのシステム化の開拓は、さらにグリーンバイオ分野や医療分野へも大きく波及していき、ナノバイオテクノロジーとしての旗頭の先駆的役割を果たしている。

4. 細胞表層工学の展開

—甲殻類廃棄物から抗菌オリゴ糖の生産をめざした新規キトサナーゼの分子生物学的解析—

カニの名産地として有名な福井県の農家では、食べた後のカニ殻を畑に撒くことによって作物の生産性が良くなるのが昔から慣習的に知られている。この点に注目し、甲殻類表層分解微生物としてスクリーニングされたのが *Paenibacillus fukuinensis* である。¹⁰⁾ 本菌株はキチンを分解するキチナーゼおよびキトサンを分解するキトサナーゼの両方を分泌する非常に珍しい菌株である。そこで、これまでに十分な研究が進んでおらず、将来的に産業利用の可能性のあるキトサナーゼに焦点を当て研究を行っている。解析の結果より本酵素は、キトサナーゼ活性に加えてグルカナーゼ活性も有する二機能性酵素であり、糖質加水分解酵素の分類法でこれまで見つかっている一般のキトサナーゼのファミリー(Family 46)ではなく、グルカナーゼが属するFamily 8 に分類される非常に特徴的な酵素であることが明らかになった。そこで、世界でも数種しか見つかっていないFamily 8 に分類されるキトサナーゼの基質分解様式を明らかにし、二機能性酵素として存在し得る要因、および、Family 8 に分類されるグルカナーゼとの相関関係を探索することで、酵素の分子進化についても新しい知見が得られる

可能性がある。

Family 8 に分類される酵素において特徴的な部位としてproton acceptor部位が挙げられる。グルカナナーゼではアミノ酸1残基が proton acceptor として関与しているが、キトサナーゼにおいては2残基が関与していると考えられる。この2残基の相関が二機能性を有する要因であると推測されるが、従来法ではこの2残基に網羅的に変異を導入した変異体構築には多大なる時間と労力が必要であるため容易に研究を進めることが不可能であった。しかし、酵母分子ディスプレイ法を用いることで、手間なく迅速に網羅的な変異体ライブラリー構築が可能のため、この2残基間の相関についての解析が大幅に時間を短縮して、しかも考えられる組み合わせの解析をすべて行うことが可能である。

新しい研究手法として、細胞表層工学による酵母の分子ディスプレイ系を用いて、キトサナーゼ活性に関与するproton acceptor部位の解明を行った。proton acceptor部位であると推定されているGlu302, Asn312二残基を他のアミノ酸に置換した変異体ライブラリー作製のために、*P. fukuinensis* 由来のキトサナーゼ遺伝子のGlu302, Asn312に相当するコドンに変異を導入することで、二残基の相関について包括的解析を行った(図1)。

従来の活性部位の特定は、変異体の取得までの精製に多大なる時間と労力がかかるために、機能しないと推定されるアラニンやグリシンのようなアミノ酸残基に置換した一部の変異体において機能相関が研究されていた。本研究で用いた手法では、酵母の細胞表層にディスプレイしたタンパク質を細胞ごと生体触媒として扱うことのできるため、精製の手間がなく、迅速に網羅的な変異体の構築が可能となる。これより、構築した変異体ライブラリーにおいてキトサナーゼ活性値を比較することで、他のアミノ酸残基の種類による活性への影響をすべて残らず解析することが可能であり、従来法ではカバーしきれない範囲に至るまでを迅速に包括的な解析を行うことが可能である。酵母細胞表層上に*P. fukuinensis* 由来のキトサナーゼをディスプレイすることに成功したので、構築に成功したディスプレイ酵母を親株として、Glu302, Asn312に相当するコドンに変異の導入を行い、変異体キトサナーゼを酵母の細胞表層上にディスプレイした変異体ライブラリーの構築を行った。構築した変異体ライブラリーにおいて活性値の包括的な解析を行った結果、多くの一残基置換体では活性低下は確認できなかったが、Lys, Arg のような塩基性アミノ酸残基に置換した場合のみ大きな活性低下が起こることを確認した。さらに、二残基共に塩基性アミノ酸残基に置換することで初めて

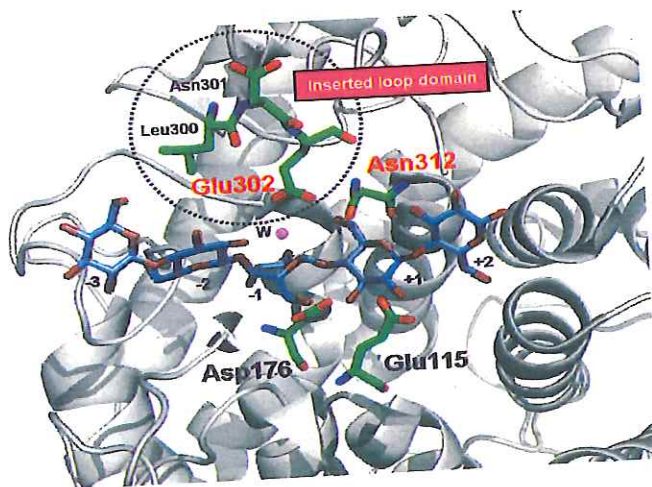
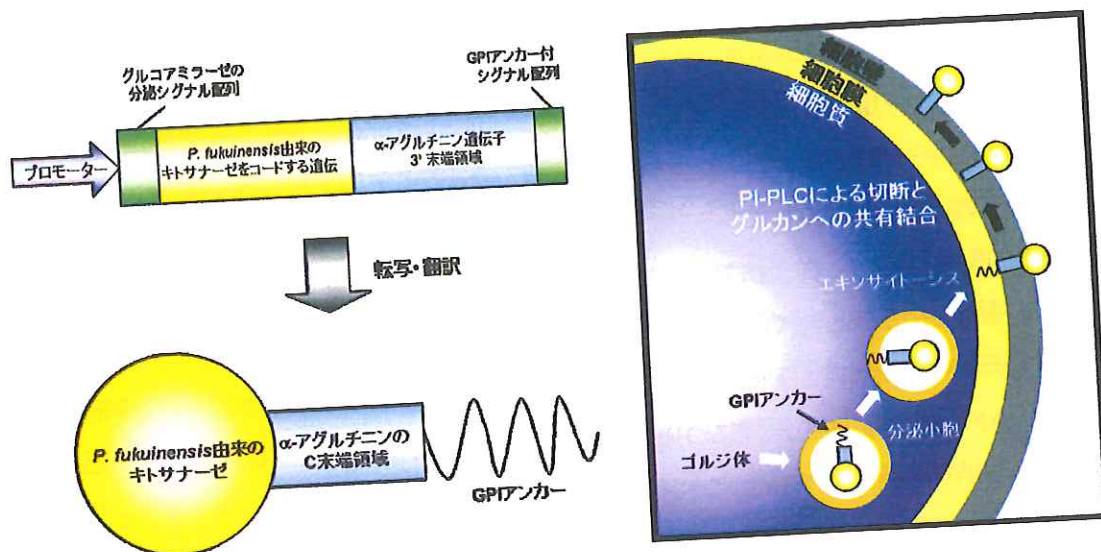


図1. 本キトサナーゼの細胞表面ディスプレイ法と活性部位近傍の構造

活性は失われるという興味深い結果も同様に得られた。この結果から、Glu302, Asn312は共にproton acceptor部位として機能する重要なアミノ酸残基であり、Asn312の存在が二機能性酵素として存在している大きな要因となることを明らかにすることに成功した。この二残基の相関関係についての知見は、酵母ディスプレイ法による包括的な解析でなければ得ることは不可能であり、本法が非常に有効な手法であることも同時に証明した。

カニなどの甲殻類の殻から取得できる天然の多糖であるキチン・キトサンの地球上におけ

る年間の生合成量はセルロースに匹敵する約 1×10^{11} トンと推定されている。セルロースはバイオエタノール生産など有効利用されているにも関わらず、キチン・キトサンは回収に多大な手間とコストがかかるためこれまでの利用率は数%にすぎなかった。そのためカニ殻は、そのほとんどが廃棄物として大量に存在しているのが現状である。近年、キトサンを分解して得られるキトサンオリゴ糖の中で、6,7糖のような鎖長のオリゴ糖に、抗菌活性、抗ガン活性、コレステロール低下活性のような生理活性が特に高いことが明らかになり、医療、食品、そして農業分野などで利用価値が見出された。これより、キチン・キトサンを含む甲殻類の殻は世界最大の未利用バイオマスとして貴重な資源として考えることが可能で、処理の手間とコスト軽減するような有効利用法が確立されれば、廃棄物の処理という側面からも社会的に非常に有益である。

現在、キトサンの分解は化学法で行われているが、化学法では用いる薬品によって環境に負荷がかかるデメリットがある。また、環境負荷が低い酵素法であっても自然界に存在するキトサナーゼによるキトサン分解は、最終的に2,3糖という短鎖にまで分解されるため、特に生理活性の高い6,7糖のオリゴ糖は生成されない。そこで、高生理活性を有する6,7糖を選択的に生産する酵素が取得できれば、環境負荷を減らし、より効率的にキトサンオリゴ糖を取得することが可能である。これより、昔から知られている植物の生育を促進する物質の同定が可能であるというエコサイクルの創製にも寄与し、さらに、分解産物であるキトサンオリゴ糖の抗菌活性のような生理活性を利用して、感染症拡大防止を目指した抗菌オリゴ糖生産などの産業利用にも貢献できる。

本研究により明らかにした*P. fukuinensis*の酵素は珍しく、自然界でキトサンは接合菌類の細胞壁に存在するのみで、キチンに比べてほとんど存在しないため、キトサナーゼの存在意義は疑問である。しかし、他の微生物の中にも両酵素を分泌するものが存在することから我々は、キチンを脱アセチル化する酵素であるデアセチラーゼがキトサナーゼの分泌に関与しているのではないかと推測した(図2)。さらに、デアセチラーゼがキチナーゼおよびキトサナーゼと共に*P. fukuinensis*によって自ら産生されていれば、キチンからキトサンオリゴ糖生産までを本菌株のみを用いて効率的に取得する系の構築が可能であることから、大量に存在する甲殻類の殻の廃棄物処理コストの軽減に貢献できる可能性があり、さらなる研究展開をめざしている。

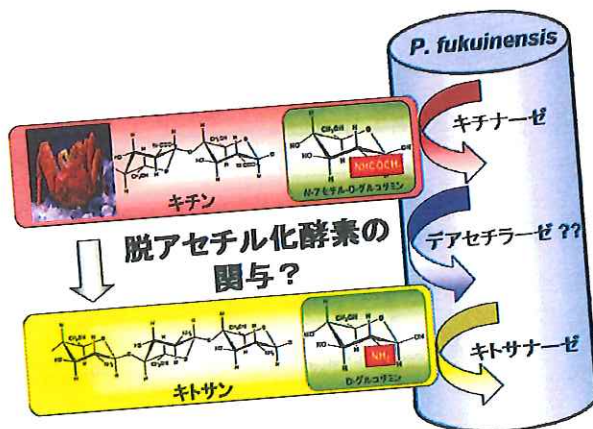


図2 脱アセチル化の予測モデル図

文 献

- 1) M. Ueda et al.: Appl. Environ. Microbiol., 63, 1362 (1997)
- 2) 植田充美:現代化学, 361, 484 (2001).
- 3) 植田充美:化学と生物, 35, 525 (1997)
- 4) 植田充美:ケミカルエンジニアリング, 44, 440 (1999)
- 5) 植田充美:現代化学, 366, 46 (2001)
- 6) 植田充美:未来材料, 4, 44 (2004)
- 7) 植田充美:化学フロンティア 第9巻、化学同人(2003)
- 8) 植田充美:コンビナトリアル・バイオエンジニアリングの最前線、シーエムシー出版(2004)
- 9) 植田充美:ナノバイオテクノロジーの最前線、シーエムシー出版(2003)
- 10) H. Kimoto et al.:J. Biol. Chem., 277, 14695-14702 (2002)