

氏 名(本籍) 伊 達 雅 代

学位の種類 博 士 ( 農 学 )

学位記番号 農 第 7 1 1 号

学位授与年月日 平 成 18 年 3 月 2 日

学位授与の要件 学位規則第 4 条第 2 項該当

学位論文題目 *Corynebacterium glutamicum* における異種タンパク質分泌  
生産に関する基礎研究およびその応用

論文審査委員 (主 査) 教 授 神 尾 好 是  
(副 査) 教 授 西 森 克 彦  
教 授 勝 亦 瞭 一

# 論文内容要旨

## 第1章 序論

トランスグルタミナーゼ(protein-glutamine  $\gamma$ -glutamyltransferase, EC2.3.2.13)は、タンパク質中の Gln残基の $\gamma$ -カルボキシアミド基と、一級アミン(L-Lysの $\epsilon$ -アミノ基等)との間のアシル基転移反応を触媒する酵素であり、タンパク質中のLys残基がアシル受容体として反応した場合には、タンパク質分子間または分子内に $\epsilon$ -( $\gamma$ -Glu)-Lys架橋が形成される。トランスグルタミナーゼは非常に多様な生物種から見出されているが、本研究の主なる対象である *Streptomyces mobaraensis*(旧 *Streptoverticillium mobaraense*)由来トランスグルタミナーゼ(MTGase)は、微生物より発見された最初のトランスグルタミナーゼである。本酵素の生理学的な機能については明らかではないが、微生物由来のトランスグルタミナーゼとしては他に *S. cinnamoneus*等、数種の放線菌から見出されている。*S. mobaraensis*由来トランスグルタミナーゼは331アミノ酸残基よりなるタンパク質で、分子量はヒト血液凝固因子XIIIに代表される動物由来のトランスグルタミナーゼの約半分の38kDaであり、両者の配列を比較するとその相同性はほとんどない。また、活性の発現に $\text{Ca}^{2+}$ を必要としない $\text{Ca}^{2+}$ 非依存型で、動物由来トランスグルタミナーゼに比較し反応速度は速く、アシル供与体としての基質特異性が低いことが明らかとなっている。これらの性質は産業用酵素としての応用の可能性を考える上では好ましい特性であり、実際にMTGaseは食品の物性、風味の改善、肉の結着(蒲鉾、ソーセージ等)や、ゲル化食品(ヨーグルト、チーズ、豆腐等)に幅広く利用されている。また、食品以外の化粧品等ファインケミカルへの応用が検討されている。

現在 MTGase の工業生産は、*S. mobaraensis* を培養することにより行われているが、その生産性は低く、さらに効率的な生産方法の開発が望まれている。また、食品用途以外への展開には、更なる生産性の向上が必須である。これまでに *S. lividans* や *Escherichia coli* の分泌発現系を用いた MTGase の発現が検討されているが、その分泌量は *S. lividans* で0.1mg/L以下、*E. coli* では約5mg/Lと低かった。*E. coli* では菌体内に封入体として蓄積させることも可能ではあるが、精製プロセスにおけるリフォールディング操作等が煩雑であり、工業スケールでの生産への応用は難しいと考えられた。さらに、既存の異種タンパク質分泌発現系の利用は特許的に利用制限され、効率良い工業的 MTGase の生産には、新規のタンパク質分泌発現系の開発が必要であった。そこで、アミノ酸生産菌として利用されている *Corynebacterium glutamicum* に着目し、この菌株において新たな異種タンパク質分泌系を構築し MTGase の効率良い工業生産方法を確立することを目的として本研究を開始した。

*C. glutamicum* はグルタミン酸、リジン等のアミノ酸生産菌として数十年以上の間利用されており、生産されるアミノ酸は食品、飼料、或いは医薬用として使用されている。また、非感染性で毒素等を生産しない、安全な菌株である事が知られている。さらに長年のアミノ酸発酵研究により様々な育種手法や培養手法等に関し、多くの知見が蓄積されている。一方 *C. glutamicum* を利用して異種タンパク質を分泌発現させた例は非常に少なく、これまでにヌクレアーゼやプロテアーゼ等が僅かに分泌した例が報告されているにすぎず、工業生産に利用できるレベルのタンパク質大量分泌例は報告がなかった。

*C. glutamicum* ATCC13869 が、培養上清中に分泌するタンパク質は非常に少ないが、近年細胞表面タンパク質である CspA, および CspB が培養上清中に分泌されていることが報告された。そこで、これらの細胞表面タンパク質の分泌機構を利用することで、異種タンパク質分泌発現系の構築が可能であると考えた。

本研究では、まず、これらの細胞表面タンパク質のプロモーターおよびシグナル配列を利用し、MTGase の分泌発現系の構築を行った。その結果、プロ配列を付加したプロ MTGase の分泌に成功し、さらには、*S. albogriseolus* 由来のサチライシン様セリンプロテアーゼをプロ MTGase と同時に分泌発現させ、プロ配列を切断して活性型の MTGase を培養上清中に蓄積させることを可能とした。また、MTGase プロ配列を改変することにより、天然型と同じアミノ酸配列を有する、天然型と実質的に同等な MTGase の分泌発現及び高蓄積化に成功し、工業生産への展開を可能とした。さらに、MTGase 以外の様々な有用タンパク質の分泌発現を検討し、*C. glutamicum* によるタンパク質分泌生産系が非常に有用な系であることを明らかにした。

## 第 2 章 *Corynebacterium glutamicum* における *Streptomyces mobaraensis* 由来 トランスグルタミナーゼの分泌

本章では、これまでタンパク質の分泌生産系としては用いられていなかった *C. glutamicum* を利用し、MTGase の分泌発現を検討した。まず、*C. glutamicum* の細胞表面タンパク質である CspB のプロモーター及びシグナル配列を利用した MTGase の発現プラスミドを構築した。しかしながら、構築したプラスミドを保持する形質転換株は取得することができなかった。一方、MTGase の N 末端に CspB の N 末端の配列を付加した形で構築した MTGase 発現プラスミドにおいては形質転換株が得られたが、完全な MTGase は分泌されず、断片化した MTGase が分泌された (Fig. 1)。以前より MTGase にはプロ配列の存在が推定されていたが、その配列は未知であった。そこで、MTGase 遺伝子をクローニングし、プロ配列を確定した (Fig. 2)。次に、プロ MTGase の分泌発現を検討したところ、*C. glutamicum* においてプロ MTGase を分泌させることに成功した (Fig. 3)。さらにプラスミドベクターやシグナル配列を変更する事により、プロ MTGase 分泌量は 235mg/L に達した。しかしながら、プロ MTGase は活性を有していないため、プロ配列を切断し活性型 MTGase へ変換する必要がある。 *S. albogriseolus* 由来のサチライシン様セリンプロテアーゼ SAM-P45 は、プロ配列の 41 番目 Ser の C 末端側を切断し、プロ MTGase を活性型に変換する。この知見に基づき SAM-P45 発現プラスミドを構築し、*C. glutamicum* においてプロ MTGase 発現プラスミドと共存、共発現させる事で、培養上清中に活性型の MTGase を分泌させることに成功した (Fig. 4)。

以上の結果は、原著論文(1)に発表した。

### 第3章 プロ配列領域改変による天然型 N 末端を有する MTGase 生産

第2章において、*C. glutamicum* を用いてプロ MTGase とサチライシン様セリンプロテアーゼである SAM-P45 を共発現することにより活性型 MTGase を分泌生産することに成功した。しかしその N 末端には、プロ配列 C 末端の4アミノ酸残基 FRAP が付加されており、天然型の N 末端アミノ酸配列とは異なっていた。本章では、まず、MTGase のプロ配列の一部欠失体を6種類構築し、プロ配列の分泌効率に及ぼす影響並びに、プロ配列改変の可能性について検討した(Fig. 5, Fig. 6)。次にこれらの知見を利用し、プロ配列の C 末端部分を SAM-P45 により切断されやすい配列に改変した。4種類のプロ配列改変型 MTGase を構築し、SAM-P45 による切断を検討したところ、生成した MTGase はいずれも天然型と同じ N 末端アミノ酸配列を有していた(Fig. 7)。以上の知見を基に、*C. glutamicum* の培養上清中に天然型と実質的に同等な MTGase を分泌させることに成功した。さらにジャーファーメンターによる培養条件検討等を実施し、MTGase の高蓄積化に成功し、工業生産への可能性を示した。

以上の結果は、原著論文(2)に発表した。

### 第4章 *Streptomyces cinnamoneus* 由来トランスグルタミナーゼのプロ配列を利用した MTGase の分泌

第3章において、プロ構造が MTGase の効率的分泌発現に非常に重要な役割を果たしていることを明らかにしてきた。そこで本章では、プロ配列を改変することにより、MTGase の分泌量をさらに向上させることを検討した。まず、*S. mobaraensis* 由来の MTGase と非常に相性の高い *S. cinnamoneus* 由来トランスグルタミナーゼのプロ配列を利用することを考えた(Fig. 8)。*C. glutamicum* において、*S. cinnamoneus* 由来のプロ配列を利用してプロ MTGase を分泌させた場合は、*S. mobaraensis* 由来のプロ配列を利用した場合に比較し、プロ MTGase 分泌量が約 1/2 に減少した。しかし両者のキメラプロ配列を構築し、利用することによりプロ MTGase の分泌量は *S. mobaraensis* 由来のプロ配列を利用した場合に比較し、約 20% 向上した(Fig. 9, Table 1)。さらに、このキメラプロ配列の C 末端部分を改変し、SAM-P45 と共発現することにより、天然型と実質的に同等な MTGase を分泌させることが可能となった。しかしながら、キメラプロ配列を有するプロ MTGase は、天然型のプロ配列を有するプロ MTGase に比較して、プロ配列が切断された後の活性型への変換に時間を要することが明らかとなった。この結果により、MTGase のプロ配列が活性型 MTGase の高次構造形成に大きく影響を与えていることが明らかとなった。

以上の結果は、原著論文(3)に発表した。

## 第 5 章 *Corynebacterium glutamicum* におけるタンパク質分泌生産系の展開:

### ヒト由来上皮細胞成長因子の分泌への応用

*C. glutamicum*を宿主とする異種タンパク質分泌発現系により、*S. mobaraensis*由来のMTGaseを約 1g/L分泌させることに成功し、分泌量に関しては、工業生産可能なレベルに達した。また、細菌由来の種々の酵素の大量分泌発現にも成功しているが、細菌由来以外のタンパク質の分泌発現については検討を行っていなかった。本章においては、ヒト由来の有用タンパク質であるEpidermal Growth Factor(hEGF)の分泌発現を検討した。hEGFは 53 アミノ酸残基よりなるポリペプチドで、分子内に 3 個のジスルフィド結合を有しており、そのジスルフィド結合が生物活性に必須であることが明らかとなっている。MTGaseの場合と同様に、*C. glutamicum* 由来CspBプロモーター、*C. ammoniagenes*由来のCspAシグナル配列を用いて、hEGFの分泌発現プラスミドを構築し、このプラスミドを*C. glutamicum*に導入する事で、約 100mg/LのhEGFの分泌発現に成功した(Fig. 10)。*C. glutamicum*により分泌されたhEGFは、天然型のhEGFと同じN末端アミノ酸配列、分子量、そして生物活性を有していることを確認した(Fig. 11)。これらの結果より、*C. glutamicum*を宿主としたタンパク質分泌発現系を用いることにより、ヒト由来のタンパク質に関しても正しい高次構造、および活性を有したタンパク質を生産する事が可能である事を示すことができた。これまでに*C. glutamicum*を用いて、様々な有用タンパク質の分泌発現を試み、原核生物のみならず、様々な真核生物由来のタンパク質を分泌発現することが可能であることを確認し、この系が汎用的に有用な系であることを示した。

以上の結果は、原著論文(4)に発表した。

## 結論

本博士論文では次のことを明らかにした。

- 1) アミノ酸生産菌として有用な *C. glutamicum* を用いた異種タンパク質分泌生産系を構築し、*S. mobaraensis* 由来プロ MTGase の分泌発現に成功した。
- 2) MTGase のプロ配列が分泌効率に大きな影響を与えている事を明らかにした。
- 3) MTGase のプロ配列の C 末端領域をプロテアーゼ SAM-P45 で切断されやすい配列に改変する事で、天然と実質的に同等な活性型 MTGase を生産させる事に成功した。
- 4) *S. cinnamoneus* 由来トランスグルタミナーゼのプロ配列と *S. mobaraensis* 由来 MTGase のプロ配列とのキメラ型プロ配列を利用する事により MTGase の分泌量を向上させる事に

成功した。

- 5) プロ配列は効率良い分泌ばかりでなく、MTGase の高次構造や活性発現にも大きな影響を与えている事を明らかにした。
- 6) hEGF 等の様々な有用生理活性タンパク質の分泌発現が可能であることを確認し、*C. glutamicum* を用いた異種タンパク質分泌生産系が汎用的に有用な系である事を明らかにした。

#### 原著論文

1. **Kikuchi, Y., Date, M., Yokoyama, K., Umezawa, Y., and Matsui, H.** (2003) Secretion of active-form *Streptovorticillium mobaraense* transglutaminase by *Corynebacterium glutamicum*: processing of the pro-transglutaminase by a co-secreted subtilisin-like protease from *Streptomyces albogriseolus*. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**, 358-366.
2. **Date, M., Yokoyama, K., Umezawa, Y., Matsui, H., and Kikuchi, Y.** (2003) Production of native-type *Streptovorticillium mobaraense* transglutaminase in *Corynebacterium glutamicum*. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**, 3011-3014.
3. **Date, M., Yokoyama, K., Umezawa, Y., Matsui, H., and Kikuchi, Y.** (2004) High level expression of *Streptomyces mobaraensis* transglutaminase in *Corynebacterium glutamicum* using a chimeric pro-region from *Streptomyces cinnamoneus* transglutaminase. *J. Biotechnol.* **110**, 219-226.
4. **Date, M., Itaya, H., Matsui, H., and Kikuchi, Y.** (2005) Secretion of human epidermal growth factor by *Corynebacterium glutamicum*. *Lett. Appl. Microbiol. in press*

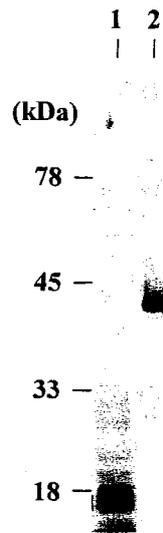
#### 特許

1. **Ejima, D., Sato, Y., Watanabe, M., Date, M., and Takahara, Y.** (1992) Processes for purifying human BCDF. International Patent Cooperation Treaty patent WO9214832.
2. **Maekawa, T., Mitsui, A., Date, M., Fukuda, H., and Takahara, Y.** (2000) Method for analyzing gene expression frequency. International Patent Cooperation Treaty patent WO0049143.

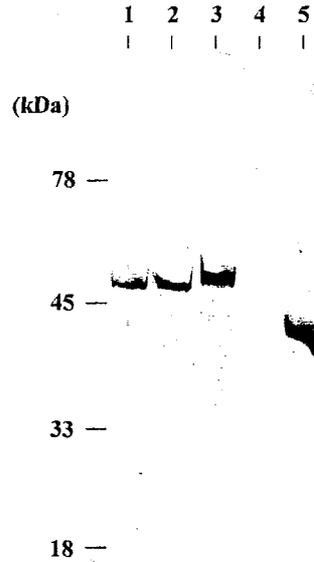
3. **Kikuchi, Y., Date, M., Umezawa, Y., Yokoyama, K., and Matsui, H.** (2001) Process for producing transglutaminase. International Patent Cooperation Treaty patent WO0123591.
4. **Kikuchi, Y., Date, M., Umezawa, Y., Yokoyama, K., Heima, H., and Matsui, H.** (2002) Method for the secretion and production of protein. International Patent Cooperation Treaty patent WO2002081694.
5. **Umezawa, Y., Yokoyama, K., Kikuchi, Y., Date, M., and Onishi, N.** (2004) Process for producing microbial transglutaminase. International Patent Cooperation Treaty patent WO2004078973.
6. **Date, M., Kikuchi, Y., Itaya, H., and Nakamura, N.** (2005) Method of producing protein. International Patent Cooperation Treaty patent WO2005103278.

#### 参考論文

1. **Watanabe, H., Takehana, K., Date, M., Shinozaki, and T., Raz, A.** (1996) Tumor cell autocrine motility factor is the neuroleukin/phosphohexose isomerase polypeptide. *Cancer Res.* 56, 2960-2963
2. **Ejima, D., Watanabe, M., Sato, Y., Date, M., Yamada, N., and Takahara, Y.** (1999) High yield refolding and purification process for recombinant human interleukin-6 expressed in *Escherichia coli*. *Biotechnol Bioeng.* 62, 301-310.
3. **Umezawa, Y., Yokoyama, K., Kikuchi, Y., Date, M., Ito, K., Yoshimoto, T., and Matsui, H.** (2004) Novel prolyl tri/tetra-peptidyl aminopeptidase from *Streptomyces mobaraensis*: substrate specificity and enzyme gene cloning. *J. Biochem.* 136, 293-300.



**Fig. 1.** Western blot analysis using anti-MTGase antibody to detect MTGase in culture supernatants. Lane 1, the culture supernatant of *C. glutamicum*(pVKTG3); lane 2, purified MTGase derived from *S. mobaraense*.



**Fig. 3.** Western blot analysis of MTGase in culture supernatants: Lane 1, *C. glutamicum* (pVKPTG1); lane 2, *C. glutamicum* (pVKPTG2); lane 3, *C. glutamicum* (pVKPTG3); lane 4, *C. glutamicum* (pVKPTG0); lane 5, purified MTGase from *S. mobaraense*.

```

gtcgacgcgggccgggaggggtgcgcgggcgcccttcggctgtgtggacgaagcgctcg
gtcggagggggcgccgatcgtccttggggcggggtggccggaattgcccattgggtg
ttgccggggaatcgacccgaagacatgatcacttctcgtatccacccgatcacgtatccg
ggagtcgagaagtgttacgcccgtgcccctgtcccgctcctcacccctgtcgccgtgacag
cgaccgcggttcttccactcgcacggacggccccacaggaccttccggcccggctcgcc
ccgcccctcggtgacggcctccgaataacgcccggccggggcctcggccggttgacc
gatccgggtcacgcccccgccggggcgggccacgtccggtctcggccccggccgacat
cggetcgactgccttcgctcgaacttcttcccgcctcccgccgctttttccgcccgc
gaaggtgcgggcgacgcgtaccgaaatcccccttcacgcgacgtgcttccgcacggccgcg
ttcaacgatgttccacgacaaa[ggag]tgcaggtttccATGCGCATACGCCGAGAGCTC
                                     M R I R R R A L

TCGTCTTCGCCACTATGAGTGCGGTGTATGCACCGCCGGATTTCATGCCGTCGGCCGGCG
V F A T M S A V L C T A G F M P S A G E

AGGCCGCCGCCGACAAATGGCGCGGGGAAGAGACGAAGTCCTACGCCGAAACCTACGCC
A A A D N G A G E E T K S Y A E T Y R L

TCACGGCGGATGACGTCGCGAACATCAACGCGCTCAACGAAAGCGCTCCGGCCGCTTCGA
T A D D V A N I N A L N E S A P A A S S

GCGCCGCCCGTCTGTTCCGGGCCCCGACTCCGACGACAGGGTCACCCCTCCCGCCGAGC
A G P S F R A P D S D D R V T P P A E P

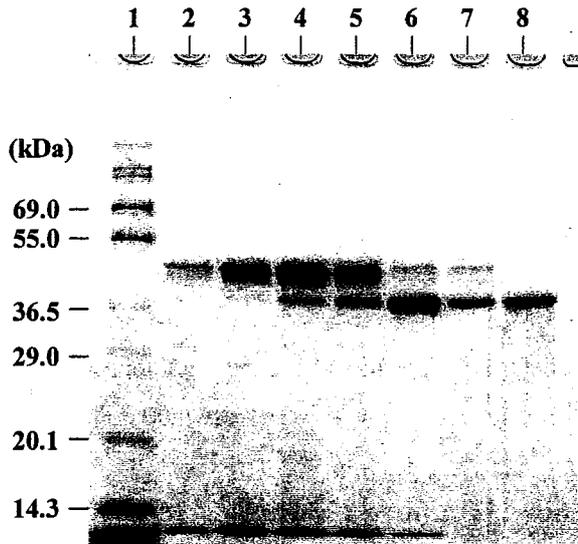
CGCTCGACAGGATGCCCGACCCGTACCCTCCCTCGTACGGCAGGGCCGAGACGGTCTGTA
L D R M P D P Y R P S Y G R A E T V V N

ACAACTACATACGCAAGTGGCAGCAGGTCTACAGCCACCGCGACGGCAGGAAGCAGCAGA
N Y I R K W Q Q V Y S H R D G R K Q Q M

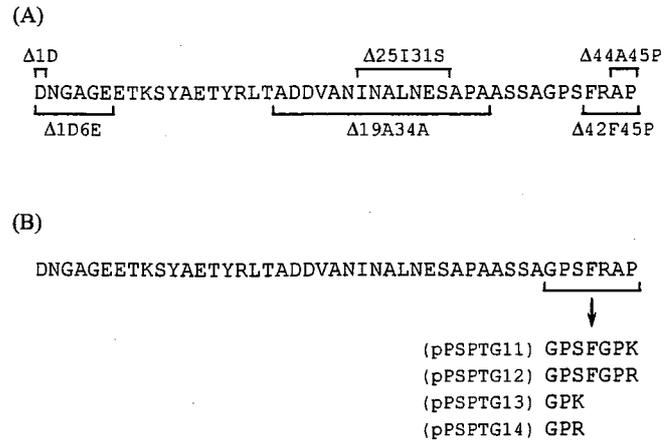
TGACCGAGGAGCAGCGGGAGTGGCTGT...
T E E Q R E W L S...

```

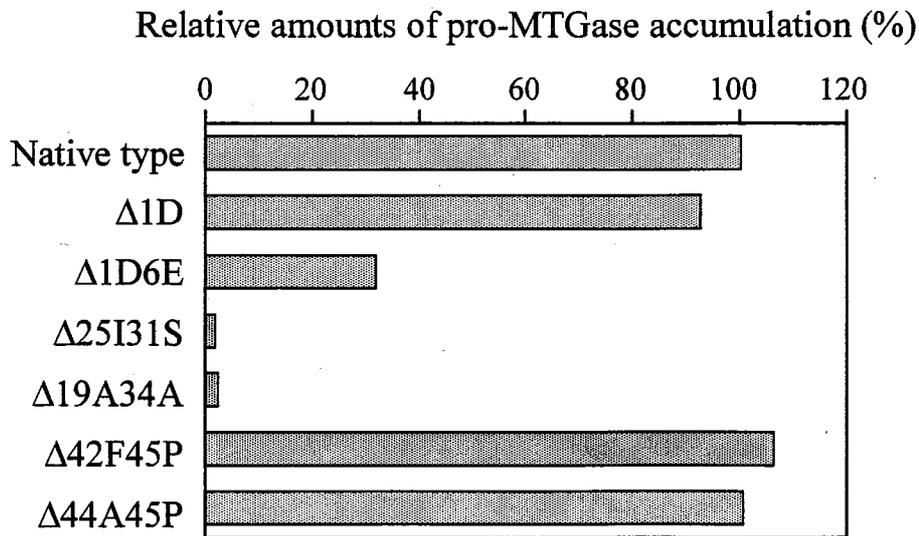
**Fig. 2.** Nucleotide sequence of the MTGase gene from *S. mobaraense* and the deduced amino acid sequence. The sequence is presented in the 5' to 3' direction. The deduced amino acid sequence is shown under the nucleotide sequence. The putative Shine-Dalgarno sequence, the amino acid sequence of the signal peptide, and the amino acid sequence of the pro-domain of the MTGase are indicated by a box, a single underline, and a double underline, respectively.



**Fig. 4.** SDS-PAGE analysis of the active-form MTGase produced by *C. glutamicum* carrying plasmids expressing pro-MTGase and SAM-P45. Ten microliters of supernatant and an equal volume of sample buffer were applied to each slot and analyzed by SDS-PAGE. After electrophoresis, the gel was stained with SYPRO Orange as described in Materials and Methods. Lane 1, molecular weight markers; lane 2, 3, 4, 5, 6, and 7, culture supernatants after 24, 30, 45, 54, 70, and 140 h of cultivation; lane 8, purified MTGase from *S. mobaraense*.



**Fig. 5.** Structures of the deleted or mutated pro-domains. (A) Deleted pro-domains. Each deleted region is indicated by an upperline ( $\Delta 1D$ ,  $\Delta 25I31S$ , or  $\Delta 44A45P$ ) or an underline ( $\Delta 1D6E$ ,  $\Delta 19A34A$ , or  $\Delta 42F45P$ ). (B) Mutated pro-domains. The mutated region (GPSFRAP) of the pro-domain is underlined. The plasmids expressing prepro-MTGase genes with mutated pro-domain GPSFGPK, GPSFGPR, GPK, and GPR are pPSPTG11, pPSPTG12, pPSPTG13, and pPSPTG14, respectively.



**Fig. 6.** Secretion of pro-domains harboring deletions. Values are averages of two independent experiments. The value for the amount of the pro-MTGase accumulation with the native-type pro-domain was set at 100 % for each experiment.

pPSPTG1 DNGAGEETKSYAETYRLTADDVANINALNESAPAASSAGPS FRAPDSDD...

(native)

pPSPTG11 DNGAGEETKSYAETYRLTADDVANINALNESAPAASSAGPSFGPK DSDD...

pPSPTG12 DNGAGEETKSYAETYRLTADDVANINALNESAPAASSAGPSFGPR DSDD...

pPSPTG13 DNGAGEETKSYAETYRLTADDVANINALNESAPAAS SAGPK DSDD...

pPSPTG14 DNGAGEETKSYAETYRLTADDVANINALNESAPAAS SAGPR DSDD...

**Fig. 7.** Sites of SAM-P45 cleavage of pro-MTGases with mutated pro-domains. The amino acid sequence of the MTGase is indicated by an underline, and the site of SAM-P45 cleavage by an arrow.

(A)

pPSPTG1 DNGAGEETKSYAETYRLTADDVANINALNESAPAASSAGPSFRAP DSDD...

pPSPTG5 DNGAGEETKSYAETYRLTADDVESINALNERALTLGQPGKPPKELPPSASAPSRAP DSDD...

pPSPTG4 GDGEEKGSYAETHGLTADDVESINALNERALTLGQPGKPPKELPPSASAPSRAP DSDD...

(B)

pPSPTG5 DNGAGEETKSYAETYRLTADDVESINALNERALTLGQPGKPPKELPPSASAPSRAP DSDD...

(pPSPTG50) GPK

(pPSPTG51) FGPK

(C)

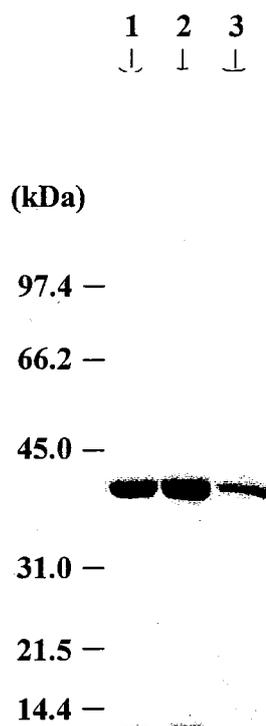
pPSPTG11 DNGAGEETKSYAETYRLTADDVANINALNESAPAASSAGPSFGPK DSDD...

pPSPTG50 DNGAGEETKSYAETYRLTADDVESINALNERALTLGQPGKPPKELPPSASAPSGPK DSDD...

pPSPTG51 DNGAGEETKSYAETYRLTADDVESINALNERALTLGQPGKPPKELPPSASAPSEFGPK DSDD...

1 10 20 30 40 50

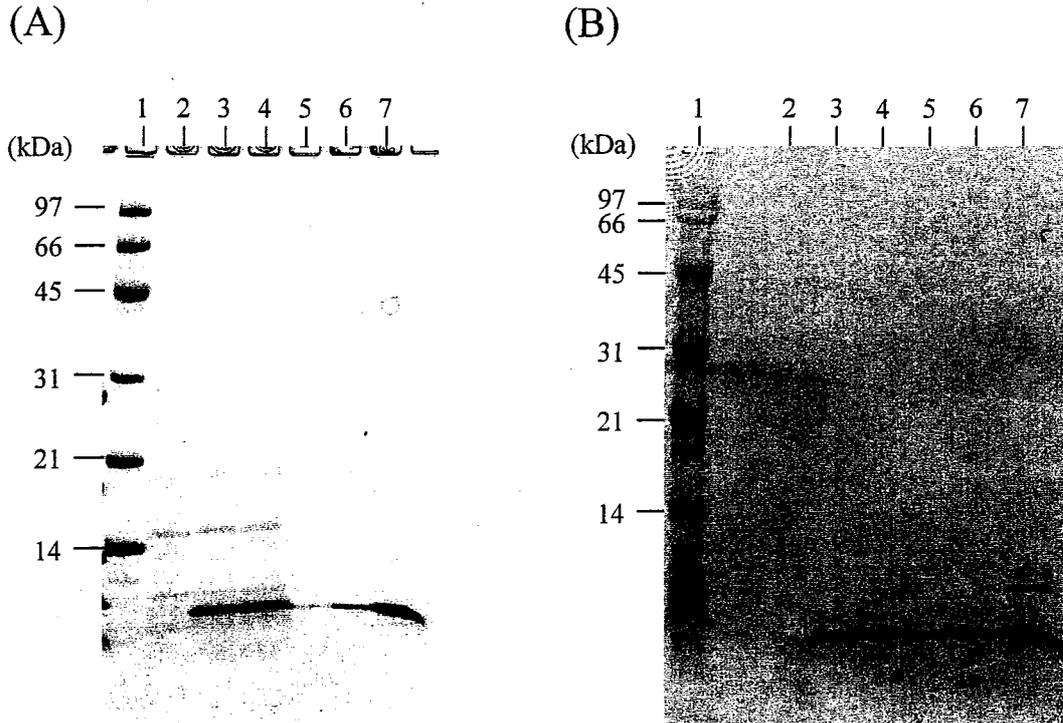
**Fig. 8.** Amino acid sequences of pro-regions and N-terminal regions of the MTGase. The amino acid sequences of the mature MTGase are indicated by boxes. (a) *S. mobaraensis* (pPSPTG1), chimera consisting of *S. mobaraensis* and *S. cinnamoneus* (pPSPTG5), and *S. cinnamoneus* (pPSPTG4) transglutaminase pro-regions. The amino acid sequence of the pro-region from *S. mobaraensis* is underlined in chimeric pro-region (pPSPTG5). The sites of SAM-P45 cleavage are indicated by arrows. (b) Mutated chimeric pro-regions. The plasmids expressing pro-MTGase genes with mutated pro-regions GPK and FGPK are pPSPTG50 and pPSPTG51, respectively. (c) Sites of SAM-P45 cleavage of mutated native (pPSPTG11) and chimeric (pPSPTG50 and pPSPTG51) pro-regions. The mutated regions of the native and the chimeric pro-regions is underlined. The sites of SAM-P45 cleavage are indicated by arrows.



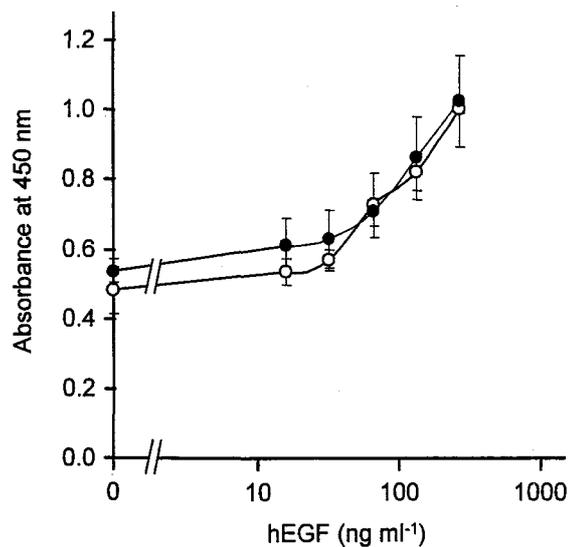
**Fig. 9.** SDS-PAGE analysis of the MTGase produced by *C. glutamicum* carrying plasmids expressing pro-MTGase and SAM-P45. Ten microliters of supernatant mixed with an equal volume of sample buffer were applied to each slot and analyzed by SDS-PAGE. After electrophoresis, the gel was stained with Coomassie brilliant blue R-250. Lane 1, culture supernatant from *C. glutamicum* YDK010 (pPSPTG11 and pVSS1) after 70 h; lane 2, culture supernatant from *C. glutamicum* YDK010 (pPSPTG51 and pVSS1) after 70 h; lane 3, purified MTGase from *S. mobaraensis*.

**Table 1.** The amounts of pro-MTGase accumulations in the culture supernatant of *C. glutamicum* YDK010.

plasmid	pro-region	pro-MTGase (mg/L)
pPSPTG1	<i>S. mobaraensis</i>	700
pPSPTG4	<i>S. cinnamoneus</i>	373
pPSPTG5	<i>S. mobaraensis</i> + <i>S. cinnamoneus</i>	863
pPSPTG50	<i>S. mobaraensis</i> + <i>S. cinnamoneus</i>	881
pPSPTG51	<i>S. mobaraensis</i> + <i>S. cinnamoneus</i>	876



**Fig. 10.** SDS-PAGE and Western blot analyses of hEGF produced by *C. glutamicum* carrying the plasmid expressing hEGF. (A) Supernatant (10 $\mu$ l) mixed with an equal volume of sample loading buffer was applied to each slot and analysed by SDS-PAGE. After electrophoresis, the gel was stained with Coomassie brilliant blue R-250. (B) Supernatant (1 $\mu$ l) was analysed by SDS-PAGE as mentioned above. After electrophoresis, Western blot analysis using anti-hEGF antibody. Lane 1, molecular weight markers; lane 2, culture supernatant from *C. glutamicum* YDK010 after 1 d; lane 3 and 4, culture supernatants from *C. glutamicum* YDK010 (pPSEGF) after 1 d; lane 5, 6, and 7, 0.02, 0.2, and 2  $\mu$ g of authentic hEGF, respectively.



**Fig. 11.** Stimulation of the growth of MCF-7 cells by hEGF. Authentic hEGF (open circle) or hEGF secreted by *C. glutamicum* (closed circle) was added to the cultures at various concentrations (0, 15.625, 31.25, 62.5, 125 and 250 ng ml<sup>-1</sup>). After 4 d, the numbers of living cells were measured using the WST-1 assay method.

## 論文審査結果要旨

トランスグルタミナーゼ (protein-glutamine  $\gamma$ -glutamyltransferase, EC2. 3. 2. 13) は、タンパク質中の Gln 残基の  $\gamma$ -カルボキシアミド基と、一級アミン (L-Lys の  $\epsilon$ -アミノ基等) との間のアシル基転移反応を触媒する酵素であり、タンパク質中の Lys 残基がアシル受容体として反応した場合には、タンパク質分子間または分子内に  $\epsilon$ - ( $\gamma$ -Glu) -Lys 架橋が形成される。トランスグルタミナーゼは非常に多様な生物種から見出されているが、本研究の対象である *Streptomyces mobaraensis* (旧 *Streptovercillium mobaraense*) 由来トランスグルタミナーゼ (TGase) は、微生物より発見された最初のトランスグルタミナーゼである。

*S. mobaraensis* 由来トランスグルタミナーゼは 331 アミノ酸残基よりなるタンパク質で、分子量はヒト血液凝固因子 XIII に代表される動物由来のトランスグルタミナーゼの約半分の 38kDa であり、両者の配列を比較するとその相同性はほとんどない。また、活性の発現に  $\text{Ca}^{2+}$  を必要としない  $\text{Ca}^{2+}$  非依存型で、動物由来トランスグルタミナーゼに比較し反応速度は速く、アシル供与体としての基質特異性が低いことが明らかとなっている。これらの性質は産業用酵素としての応用の可能性を考える上では好ましい特性であり、実際に TGase は食品の物性、風味の改善、肉の結着 (蒲鉾、ソーセージ等) や、ゲル化食品 (ヨーグルト、チーズ、豆腐等) に幅広く利用されている。現在 TGase の工業生産は、*S. mobaraensis* を培養することにより行われているが、その生産性は低く、さらに効率的な生産方法の開発が望まれている。また、食品用途以外への展開には、更なる生産性の向上が必須である。これまでに *S. lividans* や *Escherichia coli* の分泌発現系を用いた TGase の発現が検討されているが、その分泌量は *S. lividans* で 0.1mg/L 以下、*E. coli* では約 5mg/L と低かった。*E. coli* では菌体内に封入体として蓄積させることも可能ではあるが、精製プロセスにおけるリフォールディング操作等が煩雑であり、工業スケールでの生産への応用は難しいと考えられた。さらに、既存の異種タンパク質分泌発現系の利用は特許的に利用制限され、効率良い工業的 TGase の生産には、新規のタンパク質分泌発現系開発が必要であった。そこで、アミノ酸生産菌として利用されている *Corynebacterium glutamicum* に着目し、この菌株において新たな異種タンパク分泌系を構築し TGase の効率良い工業生産方法を確立することを目的として本研究を遂行し以下の 6 項目について成功した。

1) アミノ酸生産菌として有用な *C. glutamicum* を用いた異種タンパク質分泌生産系を構築し、*S. mobaraensis* 由来プロ TGase の分泌発現に成功した。2) TGase のプロ構造が分泌効率に大きな影響を与えている事を明らかにした。3) TGase のプロ構造の C 末端領域をプロテアーゼ SAM-P45 で切断されやすい配列に改変する事で、天然と実質的に同等な活性型 TGase を生産させる事に成功した。4) *S. cinnamoneus* 由来 TGase のプロ構造と *S. mobaraensis* 由来 TGase のプロ構造とのキメラ型プロ構造を利用する事により TGase の分泌量を向上させる事に成功した。5) プロ構造は効率良い分泌ばかりでなく、TGase の高次構造や活性発現にも大きな影響を与えている事を明らかにした。6) ヒト由来の有用タンパク質である Epidermal Growth Factor (hEGF) 分泌発現を検討した。hEGF は 53 アミノ酸残基よりなるポリペプチドで、分子内に 3 個のジスルフィド結合を有しており、そのジスルフィド結合が生物活性に必須であることが明らかとなっている。TGase の場合と同様に、*C. glutamicum* 由来 CspB プロモーター、*C. ammoniagenes* 由来の CspA シグナル配列を用い、hEGF の分泌発現プラスミドを構築し、このプラスミドを *C. glutamicum* に導入する事で、100mg/L の hEGF の分泌発現に成功した。以上の結果を世界の一流学術雑誌原著論文 4 報に発表した。さらに特許 6 報を取得した。このように本研究者の博士論文は、アミノ酸生産菌として利用されている *Corynebacterium glutamicum* に着目し、この菌株において新たな異種タンパク分泌系を構築し TGase の効率良い工業生産方法を確立したことで、審査員一同は、本研究者に博士 (農学) の学位を授与するに値するものと認定した。