

第68回 日本生物工学会大会

トピックス集

2016



2016年9月28日（水）～30日（金）

富山国際会議場-ANA クラウンプラザ富山

トピックス集 目次

一般講演番号/一般講演タイトル/講演者/所属

<遺伝学、分子生物学および遺伝子工学>

3P-1a028 …1
DSB により誘発されるゲノム再編を駆動力とする出芽酵母の新規育種技術

池内 晓紀^{1*}・中村 里沙¹・田中 秀典¹・村本 伸彦¹・中村 隆宏²・太田 邦史²

¹ 豊田中央研究所、² 東京大学大学院総合文化研究科

3P-1p009 …3
麹菌カーボンカタボライト抑制制御因子 CreA の分解におけるカルボキシ末端領域の関与

田中 瑞己^{1*}・新谷 尚弘¹・五味 勝也¹

¹ 東北大学大学院農学研究科 生物産業創成科学専攻

<酵素学、タンパク質工学および酵素工学>

1P-1p020 …5
酵素法によるアルギニンから 3-ヒドロキシオルニチンおよび *trans*-3-ヒドロキシプロリンの合成

原 良太郎^{1*}・北辻 早希²・山縣 海²・木野 邦器^{1,2}

¹ 早稲田大学 理工学研究所、² 早稲田大学大学院 先進理工学研究科 応用化学専攻

2P-1p037 …7
抗体ダイレクトクローニング法による組換え抗体の樹立

加藤 三恵子¹・羽生 義郎^{2*}

¹ 株式会社バイオピーク、² 産業技術総合技術研究所 バイオメディカル研究部門

3P-1a042 …9
ナノ空間反応場を利用した 1 分子 DNA 増幅システムの構築

松浦 俊一^{1*}・馬場 知哉²・千葉 真奈美¹・角田 達朗¹・山口 有朋^{1,3}
¹ 産業技術総合研究所 化学プロセス研究部門、² 遺伝学研究所 系統生物研究センター、³ 科学技術振興機構 さきがけ

3P-1p066 …11
シリカ粒子形成促進タンパク質 “グラシン” の機能を利用した GFP のシリカへの固定化

小林 大起¹・天野 太郎²・有馬 二郎^{1*}・清水 克彦³

¹ 鳥取大学農学部 生物資源境学科、² 鳥取大学大学院農学研究科 生命資源科学専攻、³ 鳥取大学 产学・地域連携推進機構

トピックス集 目次

<代謝生理学・発酵生産>

- 1P-1p047 …13
Thermophilic ethanol fermentation by genetically engineered *Moorella thermoacetica*
(遺伝子組換え *Moorella thermoacetica* を用いた高温エタノール発酵)
Farida Rahayu^{1,2}・河合 優人¹・岩崎 祐樹¹・喜多 晃久¹・田島 誉久¹・加藤 純一¹・中島田 豊^{1*}
¹広島大学大学院先端物質科学研究科 分子生命機能科学専攻、²Indonesian Sweetener and Fiber Crops Research Institute, Indonesia

- 3P-1a091 …15
南極産担子菌酵母 *Mrakia blollapis* の低温ストレス反応
辻 雅晴¹
¹国立極地研究所

- 3P-1p091 …17
ディープラーニングを用いた生体分子解析
三宅 淳^{*}・金下 裕平・浅谷 学嗣・東 侑之介・田川 聖一・新岡 宏彦
大阪大学大学院、基礎工学研究科、機能創成専攻

<醸造・食品工学>

- 2P-1p073 …19
GC×GC-TOFMS で取得した揮発性成分プロファイルと清酒の「押し味」の相関解析
玉田 佳大¹・西村 泰央²・大東 功承¹・西本 遼¹・浅井 拓也¹・山下 伸雄¹・明石 貴裕^{1*}
¹白鶴酒造株式会社 研究室、²LECO ジャパン合同会社

- 2P-1p085 …21
pH 非調整型の培養系ヒト腸管モデルの確立
佐々木 建吾^{1*}・佐々木 大介¹・近藤 昭彦¹・大澤 朗²
¹神戸大学大学院科学技術イノベーション研究科、²神戸大学大学院農学研究科

<環境バイオテクノロジー>

- 1P-1p114 …23
人工プロモーターを用いたセルロース系バイオエタノール生産に資する遺伝子組換え酵母の開発
藤森 一浩^{*}・小林 洋介・佐原 健彦・扇谷 悟・鎌形 洋一
国立研究開発法人産業技術総合研究所・生物プロセス研究部門

トピックス集 目次

2P-1p119	…25
酵母における酸耐性・塩耐性付与遺伝子の解析と分子育種による耐性強化	
松鹿 昭則 ^{1,2*} ・鈴木 俊宏 ¹ ・根宜 香奈子 ¹ ・橋本 智代 ¹ ・五島 徹也 ³ ・星野 保 ^{1,2}	
¹ 産業技術総合研究所 機能化学研究部門 バイオ変換グループ、 ² 広島大学大学院先端物質科学研究所 分子生命機能科学専攻、 ³ 酒類総合研究所 酿造微生物研究部門 酵母研究グループ（現所属）	
3P-1a111	…27
<i>Rhodococcus</i> sp. Br-6 による複数の酸化還元メディエーターを介した臭素酸還元	
藤屋 寛子・玉井 奈生子・天知 誠吾	
千葉大学園芸学部	
<生物化学工学>	
2P-2p146	…29
抗体精製用プロテイン A クロマトグラフィー担体の高機能化	
西八條 正克 [*] ・鴻池 史憲・荻原 侑莉恵・中野 喜之・船木 正大・水口 和信	
(株) カネカ バイオテクノロジー開発研究所（次世代バイオ医薬品製造技術研究組合）	
<動物バイオテクノロジー>	
1P-2p161	…31
バイオ医薬品生産を目指したチャイニーズハムスター肺組織からの無血清馴化不死化細胞株樹立	
山野 範子 ^{1, 2} ・大政 健史 ^{2, 3*}	
¹ 徳島大学大学院生物資源産業学研究部 応用生物資源学分野、 ² MAB 組合、 ³ 大阪大学大学院工学研究科 生命先端工学専攻	
2P-2p160	…33
ボツリヌス菌由来 Hemagglutinin を用いたヒト iPS 細胞の高密度懸濁培養法の確立	
山本 陸 ¹ ・都倉 知浩 ^{1,2} ・Nath Suman Chandra ¹ ・金 美海 ¹ ・紀ノ岡 正博 ^{1*}	
¹ 大阪大学大学院工学研究科生命先端工学専攻、 ² 藤森工業株式会社	
2P-2p172	…35
培養上清成分のインプロセス・モニタリングによる細胞非侵襲的なヒト iPS 細胞の未分化性の評価	
豊田 健一 ^{1*} ・鈴木 崇 ¹ ・畠林 邦忠 ² ・平丸 大介 ¹ ・高橋 雅俊 ¹ ・加川 健一 ²	
¹ 株式会社 島津製作所、 ² 東京エレクトロン株式会社 革新技術企画室	

トピックス集 目次

<分析計測化学>

- 1P-2p169 …37
LC-TOFMS を用いた非誘導体化アミノ酸鏡像体の高速一斉分析法の開発
紺屋 豊・谷口 百優・福崎 英一郎*
大阪大学大学院工学研究科 生命先端工学専攻

<生体関連化学>

- 3P-2a142 …39
休眠型天然物生合成遺伝子を利用した機能性新規物質の探索とその生合成解明
恒松 雄太*・山本 剛・横山 葵・岸本 真治・渡辺 賢二
静岡県立大学薬学部

日本生物工学会 2016 年度 受賞者

去る 5 月 19 日、理事会が開催され、本年度の受賞者が決定しましたのでお知らせ申し上げます。

- 第 35 回 **生物工学賞** 園元 謙二（九州大学大学院農学研究院・教授）
「アプローチをデザインするスマート発酵工学の基盤研究」
- 第 10 回 **生物工学功績賞** 本多 裕之（名古屋大学大学院工学研究科・教授）
「短鎖ペプチドの新機能発現に関する研究」
- 第 10 回 **生物工学功劳賞** 坂口 正明（サントリースピリッツ（株）商品開発研究部・スペシャリスト）
「产学連携活動の新規提案と推進による学会の活性化」
- 第 10 回 **生物工学功劳賞** 松井 和彦（味の素（株）研究開発企画部 兼 コーポレート戦略部・上席理事）
「产学連携活動の活性化策の検討と企画・運営」
- 第 49 回 **生物工学奨励賞（江田賞）** 伊藤考太郎（キッコーマン（株）研究開発本部・チームリーダー）
「しょうゆ醸造に寄与する麹菌由来グルタミナーゼに関する研究」
- 第 52 回 **生物工学奨励賞（斎藤賞）** 松浦 友亮（大阪大学大学院工学研究科・准教授）
「セルフリータンパク質合成系を用いた進化分子工学技術の開発」
- 第 39 回 **生物工学奨励賞（照井賞）** 河原 正浩（東京大学大学院工学研究科・准教授）
「キメラ受容体による細胞運動制御系の構築とライブラリー選択への応用」
- 第 25 回 **生物工学技術賞**
該当者なし
- 第 13 回 **生物工学アジア若手賞（Young Asian Biotechnologist Prize）** Dr. Choowong Auesukaree
(Mahidol University, Thailand)
Molecular mechanisms underlying yeast adaptive responses to environmental stresses and pollutants
- 第 5 回 **生物工学アジア若手研究奨励賞（The DaSilva Award）** Dr. Uschara Thumarat
(Prince of Songkla University, Thailand)
Biochemical characterization and molecular engineering of recombinant cutinases and carboxylesterase from a thermophilic actinomycete, *Thermobifida alba* AHK119
- 第 24 回 **生物工学論文賞**
 - 1) 古屋 俊樹*・下島 洋・木野 邦器（早稲田大学, *現, 東京理科大学）
Alteration of the substrate specificity of cytochrome P450 CYP199A2 by site-directed mutagenesis
 - 2) 高木 博史¹・橋田 恵介¹・渡辺 大輔¹・那須野 亮¹・大橋 正孝²・伊波 朋哉³・鼠尾まい子³・塚原 正俊³
(¹奈良先端科学技術大学院大学, ²奈良県産業振興総合センター, ³株式会社バイオジェット)
Isolation and characterization of awamori yeast mutants with l-leucine accumulation that overproduce isoamyl alcohol
 - 3) Mohamed Ali Abdel-Rahman^{1,2}・Yaotian Xiao¹・田代 幸寛¹・Ying Wang¹・善藤 威史¹・酒井 謙二¹・園元 謙二¹
(¹九州大学, ²Al-Azhar University, Egypt)
Fed-batch fermentation for enhanced lactic acid production from glucose/xylose mixture without carbon catabolite repression
 - 4) 稲生 崇規*・河邊 佳典・山城 拓郎**・亀山雄二郎***・汪 雪・井藤 彰・上平 正道
(九州大学, *現, テバ製薬, **現, 日医工, ***現, 医薬品医療機器総合機構)
Improved transgene integration into the Chinese hamster ovary cell genome using the Cre-loxP system
 - 5) 佐藤 俊輔・丸山 裕之・藤木 哲也・松本 圭司*
(（株）カネカ, *現, 大阪大学大学院工学研究科 カネカ基盤技術共同研究所)
Regulation of 3-hydroxyhexanoate composition in PHBH synthesized by recombinant *Cupriavidus necator* H16 from plant oil by using butyrate as a co-substrate
 - 6) 南畠 孝介*・前田 泰一**・山口 哲志・石原 亘***・石渡 啓****・高森 智史*****・山平 真也・長棟 輝行
(東京大学, *現, 九州大学, **現, (株) キッコーマン, ***現, (株) 長瀬産業, ****現, (株) グリコ, *****現, (株) ユニリーバー)
Photosensitizer and polycationic peptide-labeled streptavidin as a nano-carrier for light-controlled protein transduction
- 第 5 回 **生物工学生優秀賞（飛翔賞）**
 - 1) Ellen (東北大)
 - 2) 西川 洋平 (早稲田大学)
「マイクロドップレットによる単一微生物からの効率的な全ゲノム增幅法の開発」
 - 3) 劉 秋実 (名古屋大学)
「ウイルス表層機能ペプチドを提示する細胞質内送達用ナノキャリアの開発」
 - 4) 石井 友理 (関西学院大学)
「酢酸菌を宿主とした効率的タンパク質発現系の構築」
 - 5) 白米 優一 (愛媛大学)
「ポリ-γ-グルタミン酸バイオシステムの新たな生理機能と応用に関する研究」
 - 6) 安達 桂香 (九州大学)
「Clostridiales 目細菌群のクオラムセンシングとクオラムクエンチングに関する研究」

DSB により誘発されるゲノム再編を駆動力とする出芽酵母の新規育種技術

池内 晓紀^{1*}・中村 里沙¹・田中 秀典¹・村本 伸彦¹・中村隆宏²・太田 邦史²

¹ 豊田中央研究所

² 東京大学大学院総合文化研究科

*〒480-1192 愛知県長久手市横道 41-1

*E-mail: e1412@mosk.tytlabs.co.jp

染色体の欠失、重複、転座などの「ゲノム再編」は、遺伝的多様性を獲得する要因となり、生物進化の駆動力になったと考えられる。我々は、耐熱性制限酵素 *TaqI* を細胞内で発現させ、加温により DNA の二本鎖切断 (DSB) 活性を制御する事で、人為的にゲノム再編を誘発する「TAQing システム」を開発した。本発表では、TAQing システムにより誘発されるゲノム再編の頻度やゲノム構造の変化を解析すると共に、応用例として、ゲノム再編を駆動力とする新たな育種技術により、バイオエタノール生産酵母を進化育種した結果について報告する。

1. 背景

近年、比較ゲノム解析により、ゲノムの倍加と、DNA の二本鎖切断 (DSB) により誘発される染色体の欠失、重複、転座などのゲノム再編 (genome rearrangement) が生物進化の駆動力となった可能性が示唆されている (1, 2)。減数分裂期の計画的 DSB により生じるゲノム再編は、遺伝的多様性獲得の要因となり、遺伝子発現の変動をもたらす事で、生物は様々な環境に適応進化してきたと考えられる。一方、体細胞分裂期において複数の DSB が生じた際のゲノム動態への影響については未解明の部分が多い。

我々は、高度好熱菌 *Thermus thermophilus* HB8 由来の耐熱性制限酵素 *TaqI* を体細胞分裂期の出芽酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) の細胞内で発現させ、人為的にゲノム再編を誘発する「TAQing システム」を開発した (図 1)。

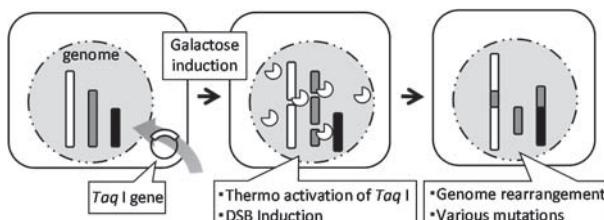


図 1. TAQing システムの原理

耐熱性制限酵素 *TaqI* は 4 塩基認識の多頻度切断酵素であり、至適温度が 65°C であるため常温では低い活性しか示さない。よって、加温により DNA 切断活性をコントロールする事で DSB を誘導する事が出来る。本システムは、減数分裂期の DSB とは異なる

り、染色体の重複、欠失、転座などが起こりやすく、ゲノム再編による遺伝的多様性を作り出す事が可能である (4, 5)。

本発表では、レポーター遺伝子に生じたゲノム再編をフローサイトメーターで解析する高感度なゲノム再編評価法により、*TaqI* 活性 (DSB 頻度) の強弱とゲノム再編率の相関関係を調べた。

また、細胞融合と TAQing システムにより、ゲノムの倍加・再編という生物の進化を模倣した育種技術を開発した。本手法により、バイオエタノール生産酵母のキシロース資化能力と耐熱性を連続的に進化育種した結果について報告する。

2. 結果と考察

(1) *TaqI* の活性制御とゲノム再編率

GFP 遺伝子を 2 つに分断し、約 400bp 重複する形で繋ぎ合わせた GF-FP レポーター遺伝子を出芽酵母 BY4741 株の *ADH3* 遺伝子の上流に挿入した。*TaqI* により GF-FP レポーター遺伝子間で DSB が生じ、相同組換え (Homologous Recombination) により完全

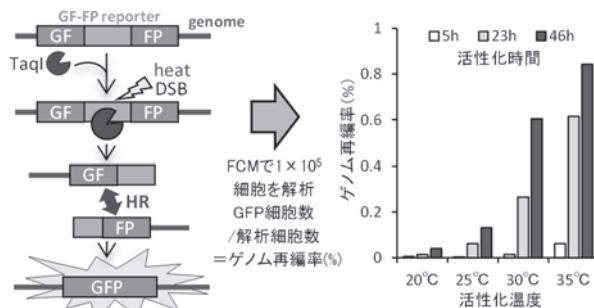


図 2. ゲノム再編評価法によるゲノム再編率の測定

長の GFP 遺伝子が再構築された場合、酵母が緑色蛍光を発するため、フローサイトメーターを用いる事でゲノム再編率を算出する事が出来る（図 2）。本評価法を用いて、様々な条件で *TaqI* を活性化し、ゲノム再編率を測定した。その結果、活性化温度と時間を変化させる事で、ゲノム再編率を 0.01~0.8% の幅広いレンジで制御出来る事が分かった。育種する形質の性質や選抜条件、スクリーニング方法等によりゲノム再編率を変化させる事で、効果的な育種が可能になると考えられる。

(2) TAQing システムによるセルロース系バイオエタノール生産酵母の進化育種

・キシロース資化能力の向上

ワイン酵母 OC-2 株にキシロース代謝経路の遺伝子群を導入した OC2-A 株（2 倍体）を用いて、プロトプラスト-PEG 法により細胞融合を行い、ゲノムが倍加した OC2A-CF 株（4 倍体）を取得した。OC2A-CF 株を用いて *TaqI* を発現誘導し、加温により *TaqI* の活性化を行う事でゲノム再編を誘発した。続いて、キシロースを主な糖源とする培地で継代を繰り返す事で集積培養を行い、キシロース資化能力が向上した OC2A-C5 株を取得した。

OC2A-C5 株のキシロース資化能力を評価するために、50 g/L のキシロースを含む発酵培地（10 g/L Yeast extract、50 g/L Xylose）に OC2-A 株、OC2A-CF 株、OC2A-C5 株をそれぞれ OD₆₀₀ = 1.0 で植菌し、32°C で発酵試験を行った。その結果、OC2-A 株、OC2A-CF 株が 72 時間で僅かなエタノール生産量だったのに対して、OC2A-C5 株は 48 時間で 50 g/L のキシロースを完全に消費し、21.3 g/L のエタノールを生産した（図 3A）。

・耐熱性の向上

次に、OC2A-C5 株を親株として、再度ゲノム再編を誘発し、耐熱性の育種を行った。YPX 培地（10 g/L Yeast extract、20 g/L Peptone、20 g/L Xylose）で 39°C から 41°C まで徐々に温度を上げながら継代を繰り返す事で集積培養を行い、耐熱性の向上した OC2A-TT 株を取得した。OC2A-TT 株の耐熱性を評価するために、グルコース+キシロースを含む発酵培地（10 g/L Yeast extract、30 g/L Glucose、30 g/L Xylose）に OC2A-C5 株、OC2A-TT 株をそれぞれ OD₆₀₀ = 1.0 で植菌し、40°C で発酵試験を行った。その結果、OC2A-TT 株は、親株である OC2-C5 株と比較して約 3 倍のエタノール生産量を示した（図 3B）。

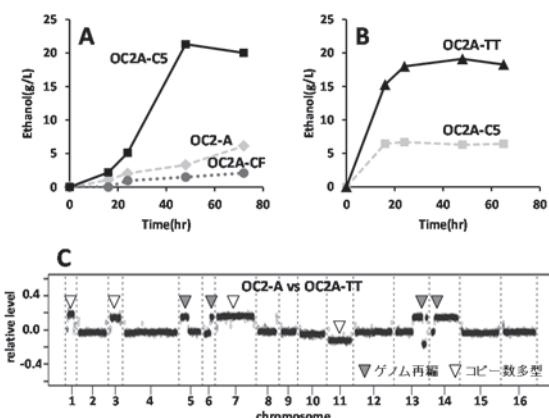


図 3. A.B. 育種株の発酵試験評価, C. タイリングアレイによるゲノム構造解析

今回育種した両形質は共に多数の遺伝子により支配される量的形質の可能性が高い。量的形質を複数兼ね備えた酵母を育種するためには、総体的な遺伝子発現のバランスが重要であり、これらの改変に TAQing システムを用いた育種技術が有効である事が示された。

(3) タイリングアレイによるゲノム構造解析

全ゲノムタイリングアレイを用いた Comparative genomic hybridization (CGH) 解析により、親株である OC2-A 株と OC2A-TT 株のゲノム構造を比較解析した（図 3C）。その結果、複数の染色体レベルのコピー数多型とゲノム再編が検出され、これらのゲノム構造の変化によりキシロース資化能力と耐熱性が向上した可能性が示唆された。

3. 今後の展望

本システムは、耐熱性制限酵素を細胞内で発現するだけで、簡便にゲノム再編を誘発できる。また、酵母だけでなく、植物を用いた研究でも大規模なゲノム再編が誘発され、次世代にゲノム構造の変化が伝わる事が分かっている。今後は、酵母以外の産業微生物や実用植物など様々な生物の形質を改良する育種への応用が期待される。

参考文献

- [1]. Kellis, M., et al.: Nature, 428(6983), 617-624 (2004)
- [2]. Nakao, Y., et al.: DNA Res., 16, 115-129 (2009)
- [3]. 特許第 5874949 号
- [4]. 特許第 5751609 号

麹菌カーボンカタボライト抑制制御因子 CreA の分解におけるカルボキシ末端領域の関与

田中 瑞己^{1*}・新谷 尚弘¹・五味 勝也¹

¹ 東北大学大学院農学研究科 生物産業創成科学専攻

*〒981-8555 宮城県仙台市青葉区堤通雨宮町 1-1

E-mail: mizuki.tanaka.a7@tohoku.ac.jp

糸状菌の多糖類分解酵素遺伝子の発現は、グルコースが存在するとカーボンカタボライト抑制 (CCR) によって強く抑制される。我々は、麹菌において CCR 制御因子である CreA が、CCR 非誘導条件下において核内から細胞質に移行し、速やかに分解されることをこれまでに明らかとしてきた。本研究では、CreA の安定性がカルボキシ末端近傍に存在する 20 アミノ酸の領域によって制御されている可能性を新たに示した。これは、糸状菌において CreA の安定性を制御する領域を示した初めての報告である。CCR は糸状菌による多糖類分解酵素の生産が抑制される主要な原因の一つであり、本研究の発展により多糖類分解酵素の生産性向上につながる新たな知見が得られることが期待される。

1. 背景

糸状菌（カビ）はアミラーゼやセルラーゼなどの多様な多糖類分解酵素を大量に生産するが、これらの遺伝子発現はグルコースが存在するとカーボンカタボライト抑制 (CCR) によって強く抑制される。多糖の分解によってグルコースが生じるため、CCR が多糖類分解酵素の生産が抑制される主要な原因の一つであると考えられている。我々は、麹菌 *Aspergillus oryzae* において CCR 制御因子である CreA とその関連因子 CreB を二重破壊することで、アミラーゼの生産量が野生株の 10 倍以上に増加することを明らかにしている[1]。また、CreA による CCR 制御機構の解析を進めており、昨年度の本大会では、CreA が CCR 非誘導条件下において核内から細胞質に移行し、速やかに分解されることを報告した[2]。本発表では、CreA の分解に関わる領域について解析した結果を報告する。

2. 材料と方法

麹菌において CreA タンパク質をウェスタン解析により検出するため、CreA に 3FLAG タグを融合して発現させた。また、発現用プロモーターとしてチアミンの添加によって発現抑制が可能な *thiA* プロモーター[3]を用い、以下の方法で CreA の安定性を評価した。まず、チアミン添加により 3FLAG 融合 CreA の発現を抑制した後、CCR 誘導炭素源（グルコース）及び非誘導炭素源（マルトース）を

それぞれ添加した。その後、経時的に CreA の量を調べ、CreA 量が炭素源添加時の半分量となる時間（半減期）を算出した。

3. 結果と考察

(1) アミノ末端及びカルボキシ末端にタグを融合した CreA の安定性

アミノ末端に 3FLAG タグを融合した CreA (3FLAG-CreA) の半減期を調べた結果、グルコース添加時は約 25 分であり、マルトース添加時は約 11 分であった（図 1）。また、核内から細胞質への移行に必要な核外排出シグナルに変異を導入した変異 CreA (3FLAG-CreANESm) では、マルトース添加時の

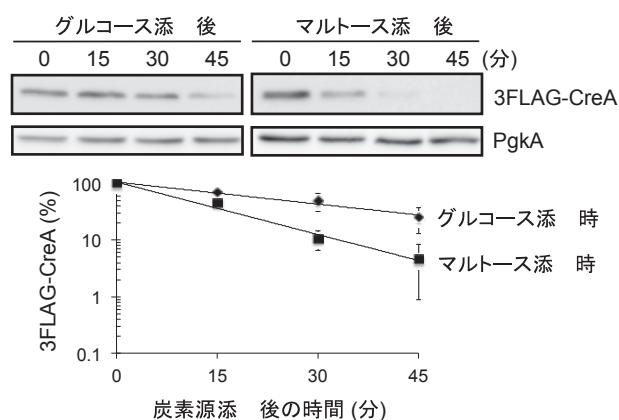


図 1 3FLAG-CreA の安定性

標準タンパク質 (PgkA) で標準化した 3FLAG-CreA のシグナル強度をプロットし、半減期を算出した

半減期が約 33 分であった。このことから、CCR 非誘導時には CreA が細胞質において不安定化することが示された。一方、カルボキシ末端に 3FLAG を融合した CreA (CreA-3FLAG) の半減期は、グルコース添加時が約 65 分、マルトース添加時が約 33 分であり、アミノ末端にタグを融合した場合よりもやや安定化していた。また、カルボキシ末端に緑色蛍光タンパク質 (GFP) を融合した CreA の局在を観察した結果、アミノ末端に GFP を融合した場合と同様に CCR 非誘導条件において核内の蛍光が見られなくなった。以上のことから、カルボキシ末端へのタグ融合による安定化は、局在の異常によるものではなく、カルボキシ末端領域に分解に重要な領域が存在し、タグを融合することで分解が阻害されるためである可能性が考えられた。

	半減期 (分)	
	グルコース	マルトース
3FLAG-CreA	25-33	11
3FLAG-CreANESm	63	33
CreA-3FLAG	65	33
3FLAG-CreA ₂₋₃₈₉	88	94
3FLAG-CreA ₂₋₄₀₉	28	10
3FLAG-CreA _{PA}	45	13

表 1 炭素源添加後の各種 CreA の半減期

(2) カルボキシ末端領域の安定性への関与

CreA のカルボキシ末端領域が安定性に与える影響について調べるため、末端の 40 アミノ酸及び 20 アミノ酸をそれぞれ欠失させた変異 CreA のアミノ末端にタグを融合し、安定性を調べた。末端の 40 アミノ酸を欠失させた CreA (3FLAG-CreA₂₋₃₈₉) は、グルコース添加時の半減期が約 88 分、マルトース添加時の半減期が約 94 分であり、著しく安定化していた。一方、末端の 20 アミノ酸を欠失した変異体 (3FLAG-CreA₂₋₄₀₉) では半減期の大きな変化は観察されなかった。以上の結果から、カルボキシ末端から 40-20 アミノ酸の領域が CreA の分解において非常に重要であることが示された。この領域内には、他の糸状菌の CreA にも保存されたプロリンリッチな領域が存在した。一般的に、プロリンリッチ配列はタンパク質間の相互作用に重要であることが知られている。そこで、このプロリンリッチ配列をアラニンに置換した (3FLAG-CreA_{PA}) ところ、グルコース添加時の半減期が約 45 分とやや長くならることから、この

プロリンリッチ配列が核内における構成的な分解に関わっていることが示唆された。一方で、マルトース添加時の半減期にはほとんど変化がなかったことから、細胞質での積極的な分解にはプロリンリッチ配列は関与していないことが示唆された。

4. 今後の展望

本研究により、CreA の安定性がカルボキシ末端近傍に存在する 20 アミノ酸の領域によって制御されていることが示唆された。これは、糸状菌において CreA の安定性を制御する領域を示した初めての報告である。

creA 破壊による酵素タンパク質の高生産化は、麹菌のみならず、セルラーゼ高生産糸状菌である *Trichoderma reesei* などにおいても報告されており [4]、糸状菌による酵素タンパク質生産において *creA* の破壊は非常に有効な手段である。一方で、CreA は非常に多くの遺伝子の発現を制御する転写因子であり、その破壊は細胞に重大な影響を与える。実際に、*creA* 破壊により寒天培地上での生育が著しく悪化することが報告されており [1,4]、液体培養時にも形態が変化することが明らかになっている [5]。

本研究をさらに推進し、CreA の安定性を決定する領域やアミノ酸残基をさらに絞り込むとともに、安定性の制御に関する因子を同定することにより、生育に影響を与えることなく酵素タンパク質の高生産化が可能となる新たな知見が得られることが期待される。また、CCR 制御因子の分解については他の生物においてもほとんど報告がないことから、学術的に重要な知見が得られることも期待される。

謝辞

本研究は「農林水産業・食品産業科学技術研究推進事業」の支援により行われたものである。

参考文献

- [1]. Ichinose, S., et al.: Appl. Microbiol. Biotechnol., 98, 335-343 (2014)
- [2]. 田中瑞己ら: 第 67 回日本生物工学会大会講演要旨集, 1P-010 (2015)
- [3]. Kubodera, T., et al.: FEBS Lett., 555, 516-520 (2003)
- [4]. Nakari-Setälä, T., et al.: Appl. Environ. Microbiol., 75, 4853-4860 (2009)
- [5]. 一瀬桜子ら: 第 67 回日本生物工学会大会講演要旨集, 1P-006 (2015)

酵素法によるアルギニンから3-ヒドロキシオルニチン およびtrans-3-ヒドロキシプロリンの合成

原 良太郎^{1*}・北辻 早希²・山縣 海²・木野 邦器^{1,2}¹早稲田大学 理工学研究所²早稲田大学大学院 先進理工学研究科 応用化学専攻

*〒169-8555 東京都新宿区大久保3-4-1

*E-mail: ryo_h@aoni.waseda.jp

医薬品原料として有用なヒドロキシプロリン類のうち、trans-3-ヒドロキシプロリン(trans-3-Hyp)は、唯一選択的な合成法が確立されていない。我々は、既知アルギニン水酸化酵素によるアルギニンの水酸化に続き、アルギナーゼおよびオルニチンシクロデアミナーゼの反応を導入することでtrans-3-Hypの合成が可能と推察した。実際に組換え酵素を調製し、上記反応経路を検討したところ、予想通りtrans-3-Hypの選択的合成が可能であった。また、本経路における律速段階はオルニチンシクロデアミナーゼによる反応であることを明らかにした。本研究で構築した経路では、位置・立体異性体の副生も無く、trans-3-Hypの選択的合成における有力な手段となり得る。

1. 背景

2-オキソグルタル酸(2-OG)依存型ジオキシゲナーゼ(EC 1.14.11.X)は酸素添加酵素のひとつであり、微生物から植物、高等動物に至るまで広範な生物種において見られる酵素である。その基質は、アミノ酸、ペプチド、ピリミジン塩基、脂肪酸、植物ホルモン、薬物など多岐に渡っている。当該酵素は、反応において2-OGを補助基質として用い、他の酸素添加酵素に多く見られるような電子伝達タンパク質や還元酵素、NAD(P)Hは必要としない。さらに、酵素活性も比較的高いものが多く、安定性にも優れているため、工業利用にとって好ましい特性を有する。

我々は、有用ヒドロキシアミノ酸の工業的生産を目指し、酵素探索ならびにバイオプロセスの開発を実施してきた。とりわけ、2-OG依存型ジオキシゲナーゼに着目し、当該酵素を用いた多様なヒドロキシアミノ酸の合成に成功している。しかし、これまでに報告されている酵素では合成できない化合物も多く存在する。医薬品原料として有用なtrans-3-ヒドロキシプロリン(trans-3-Hyp)もそのひとつであり、既存の酵素では合成できない唯一のHypと考えられている(図1)。本研究では、2-OG依存型ジオキシゲナーゼによるアミノ酸の水酸化と、それに続くアミノ酸代謝酵素を利用することにより、選択的にtrans-3-Hypを合成するプロセスの開発を試みた。

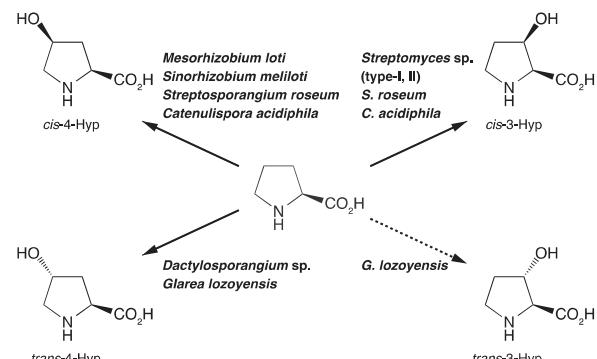


図1 微生物由来プロリン水酸化酵素によるヒドロキシプロリン類の合成

2. 材料と方法

Streptomyces sp. NBRC 13098由来アルギニン水酸化酵素[1], *Mesorhizobium loti* MAFF303099由来アルギナーゼおよびオルニチンシクロデアミナーゼの各遺伝子をpET-21a(+)におけるT7プロモーターの下流に連結し、C末端にHis-tag融合タンパク質として発現するよう設計し、それぞれの発現プラスミドを構築した。大腸菌Rosetta 2(DE3)においてIPTGにより遺伝子発現を誘導後、菌体を破碎し、Ni²⁺アフィニティーカロマトグラフィーにより精製酵素を得た。

3. 結果と考察

(1) *trans*-3-Hyp 合成経路の構築

アルギニン水酸化酵素、アルギナーゼ、オルニチンシクロデアミナーゼを用いた3段階の反応経路を設計し、アルギニンから *trans*-3-Hyp への反応を検討した(図2)。実際に、アルギニン水酸化酵素によりアルギニンから3-ヒドロキシアルギニン(3-hArg)を合成し、次いでアルギナーゼによって3-ヒドロキシオルニチン(3-hOrn)へと変換した。さらに、オルニチンシクロデアミナーゼにより3-hOrnから *trans*-3-Hypを合成可能であることを確認した。続いて各反応条件を最適化し、*trans*-3-Hypの合成を検討した。その結果、アルギニン水酸化酵素による3-hArgの合成、およびアルギナーゼによる3-hOrnの合成は短時間で効率よく進行したもの、3段階目のオルニチンシクロデアミナーゼによる*trans*-3-Hypの合成は反応速度が遅く、変換率も約50%で停止した[2]。

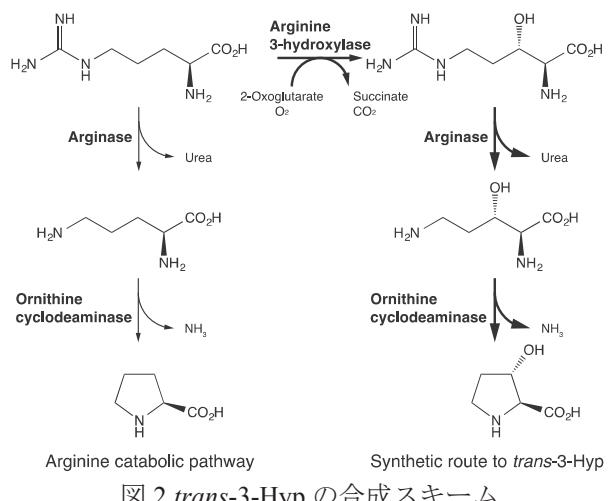


図2 *trans*-3-Hyp の合成スキーム

(2) 酵素活性の反応速度論的解析

trans-3-Hyp合成における律速段階が3段階目の反応であることが示唆されたため、酵素活性の速度論的解析を実施した。その結果、アルギナーゼの3-hArgに対する K_m は32.7 mMであり、アルギニンの4.58 mMと比較して高く、 k_{cat} は1.51 s⁻¹であり、アルギニンの30.1 s⁻¹と比較して1/20であった。一方、オルニチンシクロデアミナーゼの3-hOrnに対する K_m は6.25 mMであり、オルニチンの5.79 mMと同程度であったが、 k_{cat} は7.36×10⁻⁴ s⁻¹となり、オルニチンの20.5 s⁻¹と比較して1/28000であり、大幅に低かった。よって、本プロセスのボトルネックは3段階目の環化反応であることが示され、*trans*-3-Hyp合成における律速性とも一致した[2]。

4. 今後の展望

本研究では、アルギニン水酸化酵素、アルギナーゼ、およびオルニチンシクロデアミナーゼを利用してアルギニンから *trans*-3-Hypへのユニークな合成経路の開発に成功した。近年、*trans*-4-Hypの工業生産[3]をはじめとし、2-OG依存型ジオキシゲナーゼを利用したものづくりが活発化してきており[4]。プロリンから *trans*-4-Hyp[5]、*cis*-3-Hyp[6]、*cis*-4-Hyp[7]を選択的に合成可能な酵素は全て2-OG依存型ジオキシゲナーゼであるため、*trans*-3-Hypを合成可能な酵素も当該酵素ファミリーに存在すると推察されるが、報告は無い。最近、糸状菌 *Glarea lozoyensis* の抗生物質生合成遺伝子クラスター解析によって *trans*-3-Hypを合成可能なジオキシゲナーゼが報告されたが[8]、*trans*-3-Hypよりも *trans*-4-Hypを約8倍多く生成するため、*trans*-3-Hypの選択的な合成は依然困難である。本研究で構築した *trans*-3-Hyp合成法は、極めて選択性が高く、位置・立体異性体の副生も無いため *trans*-3-Hypの選択的な合成における有力な手段といえる。

2-OG依存型ジオキシゲナーゼは、基質アミノ酸および補助基質2-OGをグルコースなどの糖質を原料とした代謝により供給可能であるため、効率的な発酵生産への展開が可能である。また、今回示したように、水酸化反応に続き、アミノ酸代謝関連酵素を導入することでより多様なアミノ酸誘導体合成も期待できる。

参考文献

- [1]. Yin, X. and Zabriskie, T. M.: ChemBioChem, **5**, 1274-1277 (2004)
- [2]. Hara, R., et al.: Appl. Microbiol. Biotechnol., **100**, 243-253 (2016)
- [3]. Shibasaki, T., et al.: J. Biosci. Bioeng., **90**, 522-525 (2000)
- [4]. Hibi, M. and Ogawa, J.: Appl. Microbiol. Biotechnol., **98**, 3869-3876 (2014)
- [5]. Shibasaki, T., et al.: Appl. Environ. Microbiol., **65**, 4028-4031 (1999)
- [6]. Mori, H., et al.: J. Bacteriol., **179**, 5677-5683 (1997)
- [7]. Hara, R. and Kino, K.: Biochem. Biophys. Res. Commun., **379**, 882-886 (2009)
- [8]. Houwaart, S., et al.: ChemBioChem, **15**, 2365-2369 (2014)

抗体ダイレクトクローニング法による組換え抗体の樹立

加藤 三恵子¹, 羽生 義郎^{2*}

¹株式会社バイオピーク,

²産業技術総合技術研究所 バイオメディカル研究部門

* 〒305-8566 茨城県つくば市東1-1-1

* E-mail: y.hanyu@aist.go.jp

抗体医薬においては、モノクローナル抗体が次々と上市され、巨大な市場を形成している。診断においては、抗体を用いることにより、多様な疾患に対して素早い診断が可能になっている。研究において抗体は必須のバイオツールである。この様に、モノクローナル抗体は、研究・診断・医薬分野において重要性は増しており、より親和性・特異性の高いモノクローナル抗体が求められている。このニーズに応えるためには、従来のモノクローナル作製技術では間に合わず、組換え技術を用いたモノクローナル抗体作製技術が必要とされている。我々は、微生物コロニーを用いて組換えモノクローナル抗体(scFv) 產生クローンを短期間でスクリーニング可能とする抗体ダイレクトクローニング法を確立した。この方法により、陽性クローンを従来法の 10 倍以上多く得る事や、ウサギ等のマウス以外の動物種のモノクローナル抗体樹立が可能となった。

1. 抗体の重要性は増している

モノクローナル抗体は抗原を特異的に認識する優れた機能を持ったタンパク質であり、研究・診断に欠かせないツールであるのみならず、医薬品としても大きな役割を果たしている。1970 年に発明されたモノクローナル抗体は、マウス抗体であったため当初に期待されたほどの臨床効果が得られなかつたが、1990 年代に組換え技術によるマウス抗体のヒト化技術やヒト免疫グロブリン遺伝子を CHO 細胞などで発現させる技術が開発されて以降、再び抗体医薬への期待が高まり研究開発が活発化した。飛躍的に抗体関連技術が進展し、抗体医薬分野での成果はめざましく、次々と新規医薬の開発が進んでいる[1]。現在、モノクローナル抗体に対しては、単に抗原を認識するのみでなく、抗原の機能を活性化、阻害する機能性抗体や抗原の微細な構造変化を認識する抗体、抗原の翻訳後修飾を識別する機能等が求められている。このような高機能の有用抗体を効率的に迅速に樹立する技術はとても大切であるが、従来の抗体作製技術ではこのニーズに十分に対応しきれていない。

組換え技術を用いた抗体樹立法では、抗体遺伝子ライブラリーを用いて、標的抗原に対する抗体を生産するクローンをスクリーニングする事によって、モノクローナル抗体を樹立する。毒性抗原や微量抗原に対する抗体樹立に対応可能である。抗体のスクリーニングはインビトロで行われるため、抗原や望む抗体の性質に合わせたアッセイが可能であり、従来のハイブリドーマ法では確立できなかつた抗体を樹立できる可能性がある。組換えモノクローナル抗体作製においては、多様性の大きいライブラリーを確保し、非特異反応の低いスクリーニング技術を用いて陽性クローンを同定する事が重要である[2]。

2. 組換え抗体のスクリーニング法

組換え抗体のスクリーニング法には、ディスプレイ法とコロニーアッセイ法の主に 2 つがある。ディスプレイ法は、抗体遺伝子と抗体を結びつけ、抗原認識機能を元にスクリーニングし、その遺伝子情報を得る方法である。繊維状ファージのコートタンパク質に scFv を連結させ、ファージ上に scFv をディスプレ

イするファージディスプレイ法が良く用いられる。スクリーニングには、固相化した抗原と抗体ライブラリーを反応させ、結合の弱いクローナンを洗い流し、結合するクローナンを選抜するパニング法が用いられる。パニング法は陽性クローナンの選抜・増殖・濃縮の繰り返しにより、大きなライブラリーを処理できる利点があるが、非特異結合も増幅されるため、偽陽性のクローナンが多い問題がある。

コロニーアッセイ法は、抗体遺伝子ライブラリーを大腸菌に形質転換し、分離可能な單一コロニーから scFv を発現・分泌させ、抗原認識機能を持つ scFv をスクリーニングし、その遺伝情報を得る方法である。結合性等を指標にしたアッセイに基づいてクローナンを選抜するので、偽陽性が少なく、確実に高い結合性を持つクローナンが同定可能である利点を持つ。大腸菌のコロニーをフィルター上に形成させ、そのフィルターを抗原コートメンブレン上へと移動させ、抗体を発現誘導し、そこで抗原抗体反応を確認するコロニーリフトアッセイ法が良く用いられる。この手法は、抗体の発現が不安定であるためアッセイ感度が不足したり、操作中の大腸菌死滅のため遺伝子回収ができなかったり、操作の煩雑さによるコンタミの発生等の問題がある。

3. ダイレクトクローニング法の開発

我々は、コロニーリフトアッセイ法の問題を克服するために、フィルターの移動無くスクリーニングをワンステップで行う抗体ダイレクトクローニング法を開発した（図 1）。本方法は、抗原を免疫した動物の B 細胞から抗体遺伝子 (V_H , V_L) 抽出し、分泌発現ベクターに組込み、抗体遺伝子ライブラリーを作製する[3, 4]。このライブラリーで大腸菌を形質転換後、コロニー形成・抗体の発現誘導・抗原抗体反応の 3 つを同時に行う。コロニーを形成させると同時に、培地中に含まれる発現誘導剤によって、陽性クローナンから分泌発現された抗体が抗原コートメンブレンに捕捉される。抗体に付加した His タグを利用して、抗原に結合した抗体を検出し、陽性クローナンを

クローニングする。本研究では、ウサギにマウス IgG を免疫し、抗マウス IgG モノクローナル抗体を樹立し、その特異性・親和性を評価した。その結果、ハイブリドーマ法に比べて、スクリーニング規模が拡大されたことで、陽性クローナンを 10 倍以上多く得られた。

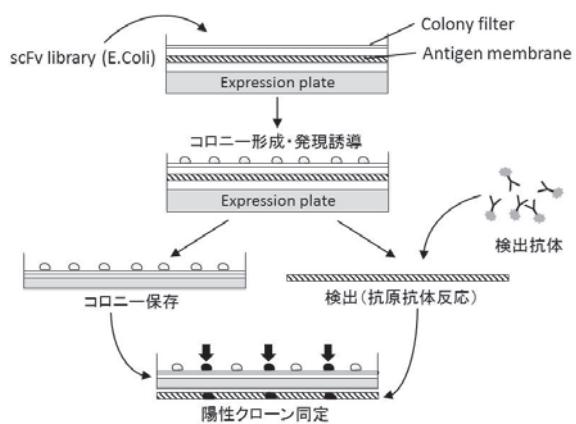


図 1. 抗体ダイレクトクローニング

4. まとめ

抗体ダイレクトクローニング法は、コロニー形成・抗体の発現誘導・抗原抗体反応の 3 つを同時に行うことで、ワンステップでのスクリーニングを可能とした。これにより、フィルターの移動や、コロニー形成後の発現誘導が不要になるため、抗体の発現や遺伝子回収が確実となり、高効率的な抗体樹立が可能となった。ウサギ等のマウス以外の動物種のモノクローナル抗体が樹立や、微生物を用いた簡便な抗体生産等の利点がある。

参考文献

- [1] Dawn M. Ecker, et al.: *mAbs* Vol 7, 9-14, 2015
- [2] Mieko Kato and Yoshiro Hanyu.: *Medical Research Archives* Vol 2, No 7 1-14, 2015
- [3] Mieko Kato and Yoshiro Hanyu.: *Journal of Immunological Methods* 396 15-22, 2013
- [4] Mieko Kato and Yoshiro Hanyu.: *Methods in Molecular Biology* 2016 in press

ナノ空間反応場を利用した 1分子 DNA 増幅システムの構築

松浦 俊一^{1*}・馬場 知哉²・千葉 真奈美¹・角田 達朗¹・山口 有朋^{1,3}

¹産業技術総合研究所 化学プロセス研究部門

²遺伝学研究所 系統生物研究センター

³科学技術振興機構 さきがけ

*〒983-8551 宮城県仙台市宮城野区苦竹 4-2-1

*E-mail: matsuura-shunichi@aist.go.jp

極微量の核酸（DNA）からの精密で高感度な DNA 増幅・検出技術は、微量サンプルを対象とした遺伝子診断技術等への広範な利用が期待されている。しかし、従来の核酸増幅技術（PCR 法等）では、反応系外から偶然に混入した標的 DNA とは異なる微量の DNA や増幅プライマーに由來した非特異的な DNA 増幅の抑制に技術課題があった。この課題の解決に向けて、我々は、メソポーラスシリカの規則性ナノ細孔に DNA 増幅酵素を集積することで、酵素周辺の反応環境の制御を可能にする新規の DNA 増幅システムを開発した。シリカ細孔が副反応抑制場として機能することにより、数分子レベルでの精密かつ高感度な DNA 増幅を達成した。

1. 背景

DNA 解析に基づいた犯罪捜査や化石試料等からの遺伝子の精密診断では、極微量の DNA しか得られないことが多く、高感度かつ高精度の DNA 増幅技術の開発が求められている。しかし、従来のポリメラーゼ連鎖反応法（PCR）等の DNA 増幅技術では、標的の DNA 分子が極度に減少すると、標的以外の DNA や増幅プライマーに起因する非特異的な DNA 増幅（バックグラウンド）が増大し、標的 DNA の選択的増幅が阻害される点に課題があった。すなわち、既存の DNA 増幅技術による遺伝子診断および解析における感度、精度、コストなどは、DNA 増幅反応における標的 DNA の分子数がボトルネックとなっていた。この課題の克服には、より微量の標的 DNA であっても、DNA 増幅酵素／標的の DNA 分子／増幅プライマー、これらの間での特異性を高度に維持できる反応場の確立が不可欠である。

そこで我々は、細孔径をナノレベルで調節可能なメソポーラスシリカ（無機多孔質材料）に DNA 増幅酵素を精確に配向・集積させ、酵素周辺の反応環境を制御することにより、標的 DNA のみの選択的増幅を図るという、新規の反応制御技術の開発を行った（図 1）。本研究では、ナノ空間への DNA 增幅酵素の精密配置と反応制御の実現により、究極的には 1 分子レベルの極微量 DNA からの増幅を可能にする技術開発を目的としている。

既往の研究では、多孔性チタニア膜[1]や金表面処理ガラス基板[2,3]への DNA 增幅酵素の固定化技術

が開発されているが、微量 DNA を対象とした高効率の DNA 増幅反応は達成できていない。

一方、本研究で開発する DNA 増幅技術では、メソポーラスシリカと DNA 増幅酵素との複合化の際、シリカと DNA の静電反発により、シリカ表面への DNA の非特異的な吸着を抑制しつつ、DNA 増幅酵素の選択的な固定化が可能である。さらに、洗浄操作により DNA 增幅酵素溶液に混入しているバックグラウンド DNA を系外へ排除できるため、非特異的な DNA 増幅の大幅な抑制につながる。本手法は、従来の PCR 法や Multiple Displacement Amplification (MDA 法) などに適用可能であり、1 細胞レベルの微量な試料、又は、難培養性細胞からの高精度の DNA 増幅の実現が期待できる。

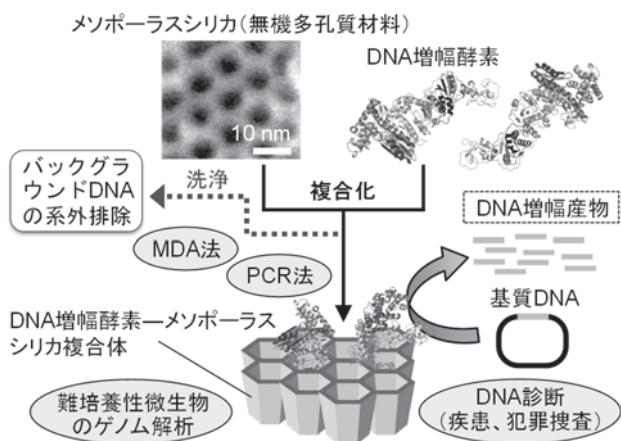


図 1 メソポーラスシリカを利用した DNA 増幅技術

これまでに我々は、PCR法においてメソポーラスシリカがDNA增幅酵素の安定な固定化場並びに反応場として好適であることを見出した[4]。そこで次に、本手法の極微量DNA增幅の実行可能性について評価した。

2. 材料と方法

DNA增幅酵素の固定化支持体として、細孔径の異なる7種類のメソポーラスシリカ（平均細孔直径：2.6、4.2、5.4、7.1、10.6、18.5、24.5 nm）を適用し、比較検討した。

各種メソポーラスシリカ粉末(0.5 mg)にDNA增幅酵素（耐熱性DNAポリメラーゼ）を含んだ緩衝液を添加し、混合することによって酵素を固定化した。次に、酵素を含まない緩衝液を用いてDNA增幅酵素-メソポーラスシリカ複合体の洗浄を行った。続いて、環状のプラスミドDNA（約4 kbp、0.01 fg~1 ng）、プライマー、dNTPs等を含んだ緩衝液を添加し、プラスミドDNA上の標的配列（約1.5 kbp）のPCR增幅を試みた。

3. 結果と考察

(1) DNA增幅効率に与えるシリカ細孔径の影響

固定化DNA增幅酵素によるDNA增幅効率は、メソポーラスシリカの細孔径に大きく依存し、標的DNAを高効率に増幅可能なシリカの最適細孔径が明らかになった。また、固定化酵素を回収、洗浄することによって酵素溶液中に含まれているバックグラウンドDNAを除去した後にPCRを実施した結果、標的DNAの選択的増幅に成功した。

以上より、メソポーラスシリカはDNA分子の吸着を抑制しながらDNA增幅酵素を環状DNAと相互作用可能な状態で固定化できることが判明した。

(2) 極微量DNAの増幅検証

次に、基質DNAを1 ng (2×10^8 分子)から段階的に減少させたところ、従来法のDNA增幅酵素が遊離状態での反応系では1 pg (2×10^5 分子)以下で非特異的なDNA増幅が進行し、標的DNAの選択的増幅が阻害された（図2a）。一方、固定化酵素では、同条件において非特異的なDNA増幅の抑制が示唆され、メソポーラスシリカの細孔径の最適化によって、遊離酵素を用いたDNA増幅反応で必要とされる基質DNA量よりも更に100万分の1の微量の基質DNA、すなわち、数分子レベルの基質DNAか

らの選択的増幅が可能となった（図2b,c）[5]。

以上より、メソポーラスシリカのナノ空間がDNA増幅における副反応抑制場として活用でき、DNA増幅反応の特異性及び感度を飛躍的に向上できることを明らかにした。

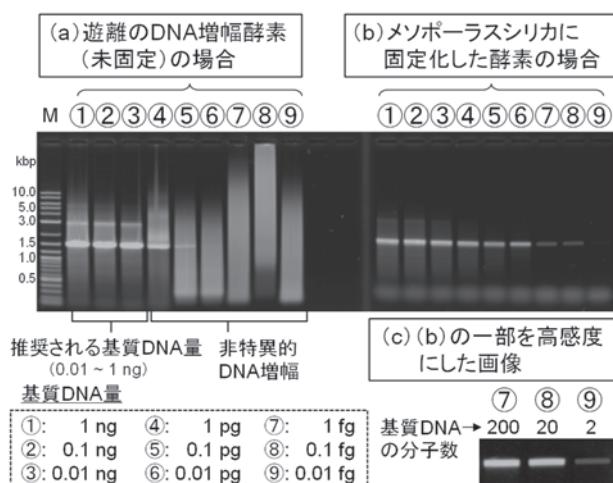


図2 シリカ細孔を反応場とした極微量DNA増幅

4. 今後の展望

今後は、メソポーラスシリカの細孔径、細孔構造の他、シリカ表面の親疎水性の制御とも組み合わせることで、DNA增幅酵素のより精密な配置と非特異的DNA増幅の抑制効果の維持、さらには標的DNAの増幅効率の向上を計画している。本技術の確立により、1細胞レベルの核酸情報(DNAおよびRNA)の高精度の解析に向けた、RT-PCR法や等温DNA増幅法(Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP法))による高感度の遺伝子診断、MDA法による難培養性の環境微生物等のゲノム解析への応用などが期待される。

参考文献

- [1]. Bellino, M. G., et al.: *Small*, 6, 1221-1225 (2010)
- [2]. Lim, G., et al.: *Anal. Biochem.*, 419, 205-210 (2011)
- [3]. Lim, G., et al.: *Anal. Biochem.*, 432, 139-141 (2013)
- [4]. Matsuura, S., et al.: *RSC Adv.*, 4, 25920-25923 (2014)
- [5]. 松浦俊一他, 特開 2016-10402

シリカ粒子形成促進タンパク質“グラシン”の機能を利用した GFP のシリカへの固定化

小林大起¹・天野太郎²・有馬二朗^{1*}・清水克彦³

¹鳥取大学農学部 生物資源境学科

²鳥取大学大学院農学研究科 生命資源科学専攻

³鳥取大学 産学・地域連携推進機構

*〒680-8553 鳥取県鳥取市湖山町南 4-101

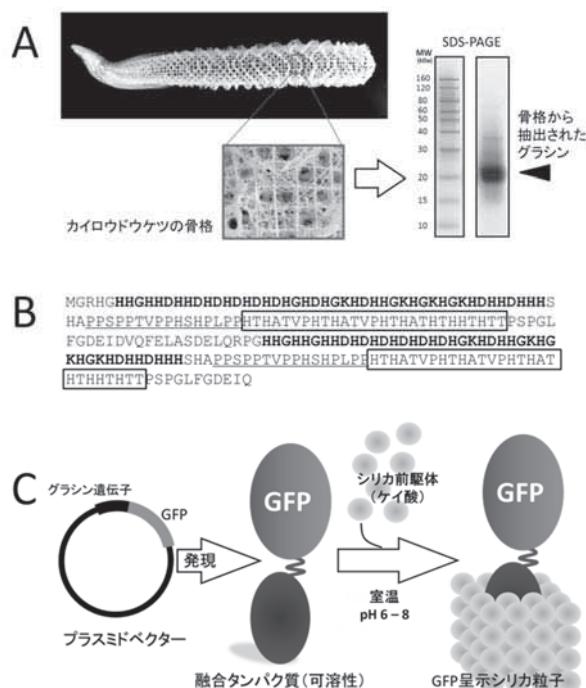
E-mail: arima@muses.tottori-u.ac.jp

グラシンは、ガラスカイメン類カイロウドウケツのシリカ骨格に見出されたタンパク質で、室温、中性においてケイ酸から速やかにシリカを形成し、自身はシリカに埋め込まれるという極めてユニークな性質を持ち合わせている。この機能は、タンパク質のシリカへの固定化に利用できると考えられたため、本研究では、グラシン融合 GFP を構築し、GFP のシリカへの固定化を試みた。グラシン融合 GFP 溶液は、ケイ酸を添加すると、GFP 特有の蛍光色のシリカを形成すると同時に、溶液の蛍光色は、シリカ形成後には無色となった。従って、GFP はグラシンと融合することで、活性を損なわずにシリカ粒子近傍に固定化されると考えられた。

1. 背景

ガラスカイメン類カイロウドウケツ *Euplectella aspergillum* は、シリカガラスを主成分とする骨格をもつ海綿動物である（図 1A）。このシリカガラス骨格には微量の有機物が含まれており、このうちの水溶性タンパク質が“グラシン”と命名された[1]。グラシンは、分子量が約 23 kDa のタンパク質であり、既知のタンパク質との相同性が見られず、His、Thr、Pro、Asp に富む。また、His と Asp リッチ領域、Pro リッチ領域、His と Thr リッチな領域の 3 つのユニットから構成され、スペーサーを挟んで、同様の領域が再度繰り返される Direct Repeat 構造を有する（図 1B）。グラシンの機能としては、室温、中性 pH でケイ酸から速やかにシリカ粒子形成を促進し、自身は形成されたシリカに埋め込まれる。従って、グラシンはカイロウドウケツのシリカ骨格形成に関与すると考えられている。

現在、新たな分析・合成デバイス等への利用に向け、タンパク質の効率的な固定化の技術開発が進められている。グラシンは、ナノスケールのシリカ粒子を形成する機能を有しているため、グラシンとタンパク質との融合により、温和な条件下で一粒子一タンパク質に近い均一なタンパク質表示シリカ粒子の形成が可能であると考えられる（図 1C）。本研究では、タンパク質の中でも GFP に焦点を当て、グラシンをタグとして付与した GFP を構築し、タグ付き組換え GFP をケイ酸溶液と混合することで GFP のシリカ



への固定化試みた。

図 1 グラシンの構造とその機能を使用したタンパク質の固定化 A：ガラスカイメン類カイロウドウケツの骨格とグラシン B：グラシンの一次構造 C：グラシンの機能による GFP の固定化

2. 材料と方法

カイロウドウケツのグラシン遺伝子の配列を基に、大

腸菌での発現に最適化した配列を、グラシンの人工遺伝子として使用した。単体のグラシンやグラシン融合 GFP の発現系は pET-24b をベクターとして使用して構築し、それらの生産には *E. coli* Rosetta (DE3)を宿主として、Overnight Express TB instant を培地として使用した。また、比較対象として、単体の GFP 及びグラシンも調製した。これらのタンパク質は、25°Cで 48 時間振とう培養することで発現させ、培養後の菌は超音波破碎を行った後に 70°Cで 10 分間熱処理を行った。

グラシンの機能によるシリカ粒子の形成は、pH6.0 の条件下でサンプルにケイ酸を混合し、数分、室温で放置した後に生じた沈殿を遠心して回収した。グラシン融合 GFP のシリカ粒子形成と GFP 固定化は、生じたシリカ粒子の蛍光を目視で評価した。また、その比較対象として、単体の GFP 及び GFP とグラシンの混合物でも同様のシリカ粒子形成の操作を行った。

3. 結果と考察

(1) グラシン融合 GFP の構築

GFP 融合グラシンの発現系を構築し、大腸菌を使用して生産を行った。SDS-PAGE 及び Western Blot の結果、グラシン単体や GFP 単体と比較して GFP 融合グラシンはいずれもバンドが太く（図 2）、両タンパク質の融合が大腸菌での発現量に良い影響を与えることが考えられた。なお、SDS-PAGEにおいて、組換え型のグラシンは、その低い電荷や何らかの要因により約 40kDa 付近に観察される（図 2）。

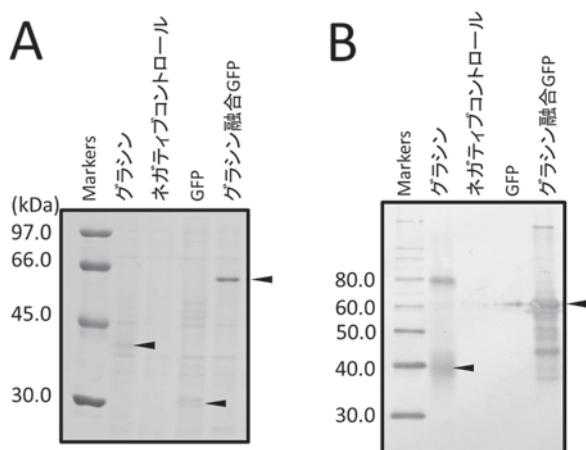


図 2 グラシン融合 GFP 及びそれぞれの単体のタンパク質における SDS-PAGE(A) 及び Western blot(B)

(2) グラシン融合 GFP のシリカ形成能と GFP の固定化

グラシン融合 GFP 溶液にケイ酸を添加すると、組換え

グラシンと同等のシリカ形成能を示し、得られたシリカ粒子からは GFP 特有の蛍光色が観察された（図 3）。また、もともと GFP のために蛍光色を示していたグラシン融合 GFP 溶液は、シリカ形成後には無色となった。一方で、GFP に対しケイ酸を添加しても、シリカは形成されず、上清も蛍光色のままであった（図 3）。これらの結果から、GFP はグラシンと融合することで、シリカ粒子に固定化されたと考えられた。

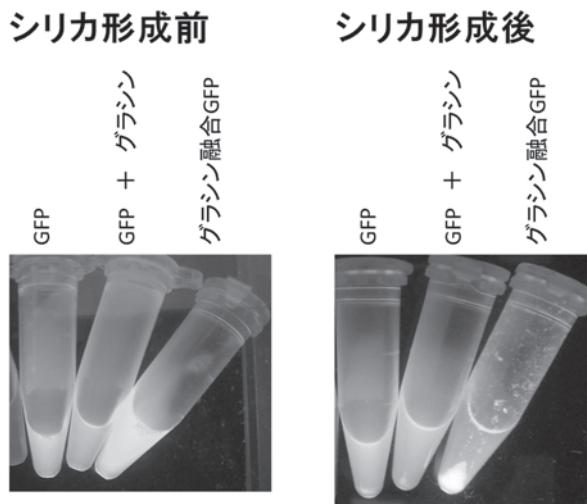


図 3 グラシン融合 GFP のシリカ形成能と GFP 固定化の評価

4. 今後の展望

これまで、固定化タンパク質は分析センサーやバイオリアクターといった形での利用に向けて開発されてきた。実際に、グルコース等の生体物質センサーや異性化糖生産では実用化がされているが、様々な問題が混在しているため、実用化も一部のタンパク質に限られ、現在も様々な分野で酵素固定化技術に強い関心が寄せられている。本研究で作成されたグラシン融合 GFP による検討では、シリカ粒子に GFP が呈示されていると考えられる。また、GFP 呈示シリカは、精製前のグラシン融合 GFP にケイ酸を添加してシリカ粒子を形成させ、それを回収することで得られるため、精製と固定化が一つの操作で完了する。このような利点を活かし、今後は酵素を中心とする様々なタンパク質を対象に固定を試みると共に、新たな分析／ものづくりデバイスの開発を行っていく予定である。

参考文献

- [1]. Shimizu, K. et al.: Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 112, 11449-11454 (2015)

Thermophilic ethanol fermentation by genetically engineered *Moorella thermoacetica* (遺伝子組換え *Moorella thermoacetica* を用いた高温エタノール発酵)

Farida Rahayu^{1,2}・河合優人¹・岩崎祐樹¹・喜多晃久¹・田島誉久¹・加藤純一¹・

○中島田豊^{1*}

¹ 広島大学大学院先端物質科学研究科 分子生命機能科学専攻

² Indonesian Sweetener and Fiber Crops Research Institute, Indonesia

*〒739-8530 広島県東広島市鏡山 1-3-1

*E-mail: nyutaka@hiroshima-u.ac.jp

好熱性木モ酢酸菌 *Moorella thermoacetica* にエタノール生合成遺伝子を導入するとともに、本来の酢酸生合成経路を破壊することで製作した遺伝子組み換え株は、グルコースおよびキシロースのリグノセルロース模擬糖化液から高収率にエタノールを生産する能力を有していた。これは、本好熱性エタノール生産株が、リグノセルロース系バイオマスを原料とする高温エタノール発酵菌として有望であることを示す。さらに、高温発酵特性を生かした発酵・蒸留同時プロセスの可能性が示されたことから、本好熱性菌を用いることで、従来と比較して省エネルギーなプロセス開発が期待できる。

1. 背景

オイルショック、地球温暖化、化石燃料枯渇への懸念から、再生可能資源であるバイオマスからの液体燃料・化成品原料の実用生産が期待されている。その中で、サトウキビやトウモロコシを原料として発酵法で容易に生産できる第1世代バイオエタノールは、早くから、ガソリン代替燃料としてブラジルやアメリカ合衆国で用いられてきた。しかし、第1世代バイオエタノールが国際的な食料価格高騰を引き起こした反省から、食料と競合しない木材・草本・有機廃棄物を利用した第2世代バイオエタノールの生産研究が世界的に推し進められている。しかし、主に製造コスト面から実用化されたとは言い難い。

我々は、エタノール製造プロセスの革新的な効率化を目指して、従来バイオエタノール発酵に利用されている酵母や遺伝子組換え大腸菌などの中温菌

(30-40°C程度で増殖する微生物) ではなく、遺伝子工学的にエタノール生産能を付与した 50-60°Cに最適増殖温度を持つ好熱性細菌を用いた高温エタノール発酵プロセスを開発している。高温エタノール発酵は中温発酵と比較すると、1) アミラーゼやセルラーゼなど糖化酵素の最適温度が 50°C程度、蒸留工程が 70°C程度なので、発酵プロセスの中で一度冷却し

発酵、再加熱して蒸留する中温発酵プロセスと比較してエネルギー消費が少ない、2) 雑菌汚染のリスクが低い、3) 温度条件が近いので酵素糖化処理・エタノール発酵・蒸留の 3 工程を 1 つの系で行える等、より効率化されたバイオプロセスとなる(図 1)。

2. 材料と方法

本研究では、偏性嫌気性好熱木モ酢酸生成菌である *Moorella thermoacetica* ATCC39073 株をプラットフォームとして、我々が独自開発した遺伝子組み換え技術を活用して[1, 2]、エタノール生産変異株を製作した。好熱性木モ酢酸生成菌を用いた理由は主に 3 つある。1) グルコースはもとよりキシロースを資化できるので、リグノセルロース系バイオマスの発酵に適している。2) Wood-Ljungdahl pathway により $H_2 + CO_2$ ガス、または有機物ガス化により得られる合成ガス (H_2 と CO の混合ガス) を資化するので、糖質に加え、リグニン、さらには廃プラスチックなど全ての有機物からガス化経由でエタノールを生産できる(図 1)。3) 本来の生産物が酢酸だけなので、目的生産物の生合成経路導入とともに、酢酸生成経路を遮断するだけで、本来の最終代謝産物の副生産なしに目的産物の高収率生産も期待できる。

3. 結果と考察

(1) 遺伝子組換えによる好熱性ホモ酢酸菌のエタノール発酵菌への転換

本菌を酢酸発酵からエタノール発酵菌に転換するために、二つのホスホトランスクアセチラーゼ遺伝子 (*pduL1, pduL2*) を破壊すると共に、アルデヒドデヒドロゲナーゼ (*Mt-aldh*) 遺伝子を導入した。*Mt-aldh* を導入しただけでは、フルクトースを基質としたエタノール生産はほとんど見られなかつたが、*pduL* を二つとも破壊した *Mt-aldhΔpta* 株は、主要代謝産物をほぼエタノールに変換した（図 2）。

(2) *Mt-aldhΔpta* 株によるバイオマス由来糖質からのエタノール発酵特性

分子育種した *Mt-aldhΔpta* 株について、グルコースを基質として馴養後、エタノール生産条件を最適化した。その結果、最大で 120mM グルコースから 210mM のエタノールを生産し（理論収率の 87.5%）、酢酸生成はほぼ抑制された。また、本菌はキシロースを旺盛に資化した。そこで、模擬バイオマス糖化液（グルコース:キシロース=2:1 の混合糖液）を用いたところ、酢酸などの副生はほぼ見られず（図 3）、エタノール収率は 0.48g/g-混合糖に達した。本結果は、*Mt-aldhΔpta* 株が、リグノセルロース糖化液の高温エタノール発酵菌として有望であることを示す。

(3) エタノール発酵・蒸留同時プロセス

Mt-aldhΔpta 株を用いたエタノール発酵・蒸留同時プロセスを開発するために、現在、バイオリアクターを用いた検討を行っている。まず、エタノール回収を行わずにグルコースの流加培養を行ったところ、200mM 以上のエタノール蓄積により発酵が停止した。そこで、N₂ガス通気によるエタノール蒸留回収機構組み込んだところ、培養液エタノール濃度を 200mM 以下に制御でき、発酵は停止しなかつた。これは、エタノール発酵・蒸留同時プロセスの可能性を示唆するものである。

4. 今後の展望

本研究では、好熱性ホモ酢酸菌を宿主として、エタノール合成遺伝子の導入と同時に酢酸生成遺伝子を破壊することで、リグノセルロース系バイオマスを原料とする好熱性エタノール生産菌を育種できること、さらに、高温発酵の利点を生かした発酵・蒸留同時プロセスの可能性を示した。今後、さらにプロセスの効率化・最適化を図り実用化を目指したい。また、本菌のもう一つの特徴である合成ガス、

および H₂-CO₂ 資化性を活用することで、糖質に限定されず、様々な再生可能エネルギーを水素経由で利用した CO₂ 固定型バイオプロセスの開発を目指している。

参考文献

- [1]. Kita, A., et al.: J. Biosci. Bioeng., 115, 347-352 (2013).
- [2]. Iwasaki, Y., et al.: FEMS Microbiol. Lett. 343, 8-12 (2013).

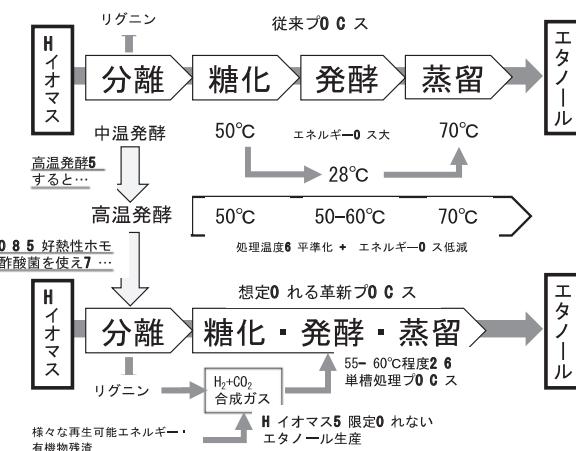


図 1 遺伝子組換え *M. thermoacetica* 高温エタノール発酵菌を用いたエタノール生産イメージ

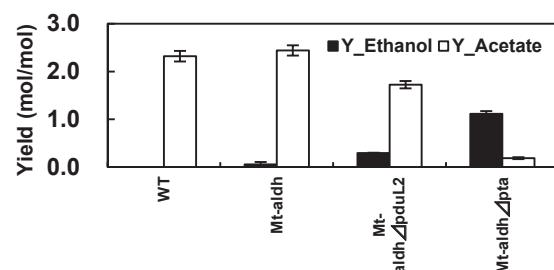


図 2 *M. thermoacetica* 遺伝子組換えによる酢酸発酵からエタノール発酵への転換

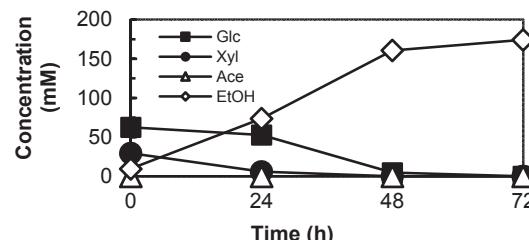


図 3 遺伝子組換え *M. thermoacetica* による模擬リグノセルロース糖化液からのエタノール生産

南極産担子菌酵母 *Makria blollopis* の低温ストレス反応

辻 雅晴¹

¹ 国立極地研究所

*〒190-8518 東京都立川市緑町 10-3

*E-mail: tsuji.masaharu@nipr.ac.jp

南極のような極限環境に生息している菌類は氷点下でも成長が可能であることから、このような地域における物質循環に大きな役割を果たしている。本研究では、低温での成長能の異なる南極産担子菌酵母 *Makria blollopis* を用い、低温ストレスによる細胞内の代謝産物蓄積量の変化を調べてみた。低温での成長に優れた *M. blollopis* SK-4 株は氷点下で細胞分裂や細胞壁合成などの代謝経路が活発になるほか、低温下での成長に関与する芳香族アミノ酸など合成するのに ATP を消費する物質を大量に生産していた。このことから、南極産菌類が氷点下で細胞を凍結させないために多大なコストを支払いながら成長していることを世界で初めて明らかにした。

1. 背景

生物にとって 0 °C 以下の温度による低温ストレスは、生命維持に深刻な影響を及ぼす。このため、南極のような極限環境に生息している菌類では、細胞外多糖や不凍タンパク質などの凍結防止剤を分泌することで細胞やコロニーが凍らないように工夫しながら生存していることが知られている[1]。しかし、南極に生息している菌類が氷点下という低温ストレスに対して代謝全体としてどのような応答をしながら成長しているのかは不明のままであった。

2. 材料と方法

(1) 南極産菌類

これまでの筆者の研究成果により、昭和基地から約 60 km 離れたスカルプスネス露岩域では担子菌酵母 *Makria blollopis* が培養可能な菌類の優占種であることが明らかになっている[2]。そこで本研究では低温での成長能に優れた *M. blollopis* SK-4 株と同種であるものの、低温で効率的に成長できない *M. blollopis* TKG1-2 株という低温での成長能が大きく異なる 2 株の南極産菌類を用い、低温ストレス下での代謝反応の違いを調べてみた。

(2) 低温ストレス試験

M. blollopis SK-4 株と TKG1-2 株は Yeast Peptone Dextrose 液体培地 (YPD, Difco) に植菌し、両株の至適増殖温度である 10 °C で 120 時間、前培養を行った。前培養終了後、菌体は滅菌蒸留水で 2 回洗浄を

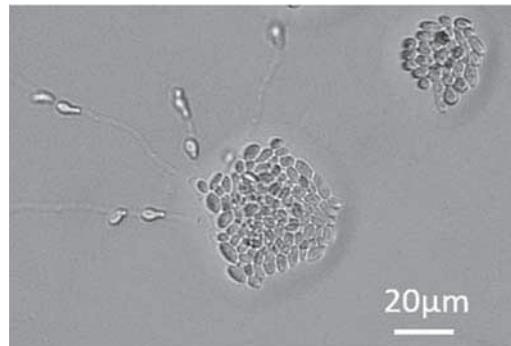


図 1 南極産 *Makria blollopis* SK-4

行い、初期菌体量が OD₆₀₀ = 2 となるように 40 g/L グルコースの YPD 液体培地に植菌し、10 °C と -3 °C で 120 時間培養を行った。

植菌直後をコントロールとし、培養 120 時間目まで 24 時間毎にサンプリングを行った。回収した培養液は上清を HPLC によるグルコース濃度の測定に、沈殿を CE-TOFMS によるメタボローム解析に用いた。代謝産物の抽出は松鹿ら(2012) [3] の方法に従って行い、分析は Human Metabolome Technologies 株式会社 (HMT) に委託した。

ピークの抽出は MASTERHANDS v. 2.16.0.15 で主成分分析 (PCA) と階層的クラスター分析は SAMPLESTAT v. 3.14 と PEAKSTAT v. 3.18 でそれぞれ行った。

3. 結果と考察

CE-TOFMS によるメタボローム解析の結果、計 219

の代謝産物を検出した（カチオン性代謝物質115物質、アニオン性代謝物質104物質）。これらの代謝産物が低温ストレスにより蓄積量に変化が生じたかを調べるため、主成分分析とヒートマップ分析による解析を行った。その結果、低温での成長能に優れたSK-4株は低温ストレスによって劇的に代謝反応を変化させたが、低温で効率的に成長できないTKG1-2株ではこのような変化を確認することはできなかつた（図2）。

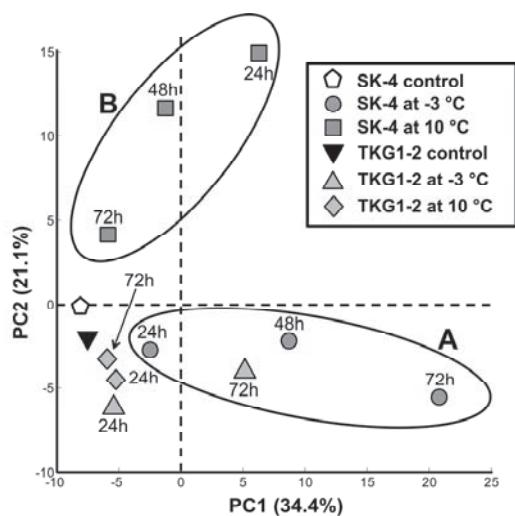


図2 主成分分析

M. blloppis SK-4株は低温ストレス条件下で細胞分裂や増殖に関与しているポリアミン類合成系の中でも特に *S*-adenosylmethionine (SAM) の顕著な蓄積が確認された。SAM はストレス耐性に関連しているエルゴステロール合成に関与していることから、低温での成長能に優れた SK-4 株は SAM を蓄積し、細胞分裂や増殖を促進すると共にエルゴステロールの合成も促進することにより、氷点下による低温ストレスに対抗していると考えられる。また、芳香族アミノ酸も低温ストレスで蓄積量が大幅に増加した物質の1つであった。その中でもヒスチジンはコントロールと比較して42倍、トリプトファンは4倍の濃度になった。芳香族アミノ酸は生合成の際に ATP を必要とする物質で、代謝産物の中では最もコストのかかる物質として知られている。一方、低温で効率的に成長できない TKG1-2 株ではポリアミン類や芳香族アミノ酸の顕著な蓄積は認められなかった。これらのことから、低温ストレスによって蓄積量が大きく変化するポリアミン類や芳香族アミノ酸が氷点下における成長能の違いに大きく関与しており、低温

で優れた成長能を持つ SK-4 株は、その中でも生合成に ATP を必要とする芳香族アミノ酸を大量に細胞内に蓄積している。このことから、南極産菌類が氷点下で細胞を凍結させないために多大なコストを支払いながら成長していることを世界で初めて明らかにした。

4. 今後の展望

今後は昭和基地以外の南極域に生息している様々な菌類についても同様に、低温ストレスによる代謝変化を調査すると同時に、遺伝子の発現がどのように変化するのかについても調査する予定である。

また、*Mrakia* 属菌は、不凍タンパク質の遺伝子を持たず[4]、凍結防止剤もほとんど分泌しないにもかかわらず、-20 °C以下でも細胞内凍結を起さずに生存できるという驚異的な能力を持っている。*Mrakia* 属菌がどのように細胞内凍結を防いでいるのかを解明することで、細胞内凍結が原因となって起こる凍傷の治療法の開発に応用されることが期待できる。

さらに、南極大陸は微生物資源調査における最後のフロンティアとされていることから、この地域に生息している菌類が持つ有用な二次代謝産物も積極的に探索していきたいと考えている。

謝辞

本研究は JSPS 科研費（研究活動スタート支援 15H06825 および若手研究(A) 16H06211）並びに情報・システム研究機構（平成27年度融合シーズ探索）の助成を受けて実施された。

また、本研究で使用した菌株を提供してくださった産業技術総合研究所の星野保グループ長に感謝の意を表します。

参考文献

- [1]. Robinson, CH.: New Phytol., 151, 341–353 (2001)
- [2]. Tsuji, M., et al.: FEMS Microbiol. Lett., 346, 121-130 (2013)
- [3]. Matsushika, A., et al.: J. PLOS ONE, 8, e69005 (2013)
- [4]. Tsuji, M.: Genome Announc. 3, e01454–14 (2015)

ディープラーニングを用いた生体分子解析

三宅 淳*・金下 裕平・浅谷 学嗣・東 侑之介・田川 聖一・新岡 宏彦

大阪大学大学院・基礎工学研究科・機能創成専攻

*〒560-8531 豊中市待兼山町 1-3

*E-mail: jun_miyake@bpe.es.osaka-u.ac.jp

Deep Learning に代表される人工知能が、自動運転技術などで応用され注目を集めている。碁で人間のチャンピオンに圧勝したことでも記憶に新しい。この技術はバイオテクノロジーや医学に大きな影響を与えるポテンシャルを有している。例えば、X 線写真から極微小な癌を見つける技術は実用を目指した開発段階にある。バイオ分子への応用も始まろうとしている。遺伝子やタンパク質の人工知能による分類は、構造から機能を推定するのに大きな役割を果たす。未知タンパク質の機能を推定したり、細胞内の遺伝子や分子の相互作用を示して癌などの疾病的分子的治療が可能となるかもしれない。生体はいわゆるビッグデータの宝庫である。ディープラーニングは解析的な法則性で理解しきれていない対象においても識別が期待できる手法であり、バイオテクノロジーとは相互に強い関係を生じるであろう。特に DNA やタンパク質といった鎖状高分子に関する応用可能性を検討している

1. 緒言

DNA 等鎖状高分子は順列組み合わせの数が極めて大きく、事実上無数と言える多様性がある。ヒトの持つ核ゲノムは約 31 億の塩基対で形成されている。現在、解読にかかる時間は大きく短縮された。必要時間の短縮と費用の低下により個々人の DNA を解読されるようになり、大量の DNA シークエンス情報が入手できるようになった。

タンパク質はもう一つの典型的な生体鎖状高分子である。21 個のアミノ酸の順列組み合わせによって無数と言って良いほどの多様性がある。シークエンスと構造の関係が解明できれば、医薬品などの設計が可能となると期待される。

Deep Learning を用いることで、DNA 塩基配列やアミノ酸配列といった生体分子が潜在的に持つ機能や機能についての理解を進めるべく研究を行っている。Deep Learning が抽出する生体分子の『特徴』がどのようなものであるか、DNA 塩基配列とアミノ酸配列がとりわけ大きな場合の数を持つことに注目して、本質的な特徴抽出が可能か検討している。

2. タンパク質の解析（抗体を例として）

タンパク質は、DNA と同じく鎖状高分子であり、21 種類のアミノ酸が順列をなす、場合の数の極めて大きな分子であるために、分類は簡単ではない。シークエンスそのものから単純な数式を用いて分類を行うことは困難である。統計学的な分類は機

能的な分類に合致するのか明らかではない。この問題も、ディープラーニングを用いることで分離が可能と考えられた。

タンパク質の例として抗体があげられる。抗体は Y 字型の構造をしており、2 つの先端部位で抗原と結合する。アミノ酸シークエンスが得られているヒト抗体約 6000 本の H 鎮可変領域(100 アミノ酸)について、ディープラーニング(スタックドオートエンコーダー)を用いた解析を試み、ウイルス結合抗体の二次元圧縮プロットを得た。対 HIV、Influenza、Rotavirus 抗体 H 鎮について、それぞれ特徴的な分布が得られた。この集合は、シークエンスの類似性を表すが、機能的に重要な部位は保存されるため、ディープラーニングによる集合形成におけるグループ形成のための強い要素（特徴）となると考えられる。

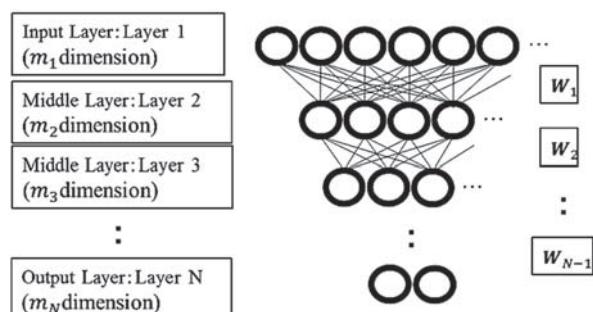


Fig. 1 スタックドオートエンコーダーの構造

3. DNA シーケンスデータの解析（ミトコンドリアを例として）

真核細胞内のミトコンドリアは核 DNA とは別に独自の DNA を持っている。ミトコンドリア DNA(mtDNA)と呼ばれる。mtDNA は、人類の移動と定着の歴史、地域ごとの類似性を示す。人類学では一塩基の変異 (single nucleotide polymorphism: SNP) を基準にしてハプログループと呼ばれる分類がなされており、ミトコンドリア・イヴなどの存在が示唆されてきた。

我々は、全体としても各領域としてもそれぞれ意味を持つ mtDNA に対して、ディープラーニングによる解析を検討した。mtDNA 塩基配列全体の意味を解析する手法として、塩基対全体を対象として分類することが可能かどうか検討した。オートエンコーダー法により次元圧縮を行ったところ、mtDNA の相対的な関係が表現できるとわかった。即ち、16560 次元 (塩基対の数) から 3 次元あるいは 2 次元まで次元圧縮を行い、プロットを行ったところ、ハプログループ毎に分散位置が異なり、また分散の大きさが異なったが、分散領域には多くの重なりが見られた。これらの特徴は、mtDNAにおいては、人類として多くの共通の遺伝子配列領域を持つために、同じ集合に属するものの、ハプログループ毎に異なった中心位置と分散の大きさを有することが表されている、と考えられた。

参考文献

- [1]. Kaneshita et al. Deep Learning を用いた mtDNA 分類 SI2015Nagoya pp1267-70
- [2]. 篠田健一: 日本人になった祖先たち—DNA から解明するその多元的構造, NHK ブックス (2007)

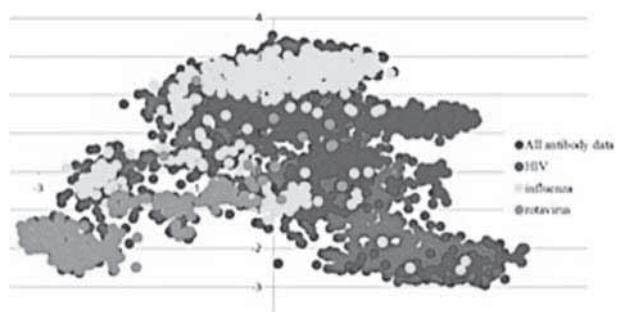


Fig. 2 ヒト抗体のオートエンコーダーによる分布

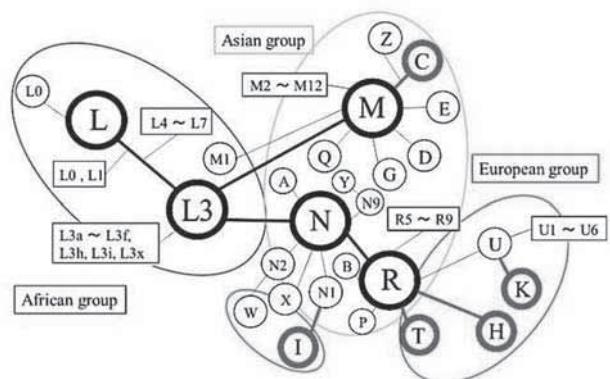
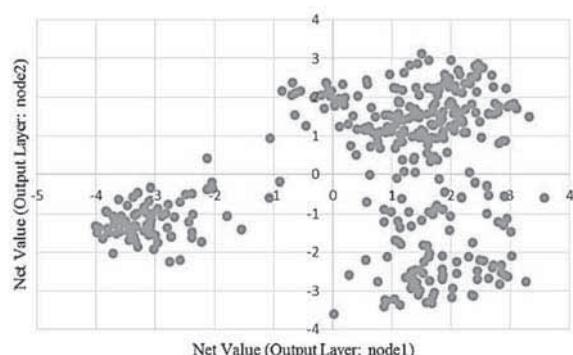


Fig. 3 人類ハプログループ (篠田 2007 より改



変)

Fig. 4 mtDNA のオートエンコーダーによる分布

GC×GC-TOFMS で取得した揮発性成分プロファイルと清酒の「押し味」の相関解析

玉田 佳大¹・西村 泰央²・大東 功承¹・西本 遼¹・浅井 拓也¹・山下 伸雄¹・明石 貴裕^{1*}¹白鶴酒造株式会社 研究室²LECO ジャパン合同会社

〒658-0041 兵庫県神戸市東灘区住吉南町4-5-5

*E-mail: akashi@hakutsuru.co.jp

「押し味」とは後味にごく味があつてしつかりした感じの味わいのことであり、灘酒の特長とされる味わいの一つである。我々は、基本的な醸造方法や一般分析値がほぼ同一の製成酒であっても、「押し味」の強度に違いが見られることを経験的に把握している。これまでに我々は、不揮発性成分のプロファイルと「押し味」の相関解析を行ってきたが、明瞭な相関を見出すことはできなかった。そこで本研究では、GC×GC-TOFMS を用いた揮発性成分のノンターゲット分析を実施し、揮発性成分プロファイルと「押し味」の強度の相関解析を行った。PLS 回帰分析の結果、高い精度のモデルが構築でき、「押し味」の強度と相関の高い成分が複数抽出可能であった。

1. 背景

「押し味」とは後味にごく味があつてしつかりした感じの味わい¹⁾のことであり、灘酒の特長とされる味わいの一つである。我々は、基本的な醸造方法や一般分析値がほぼ同一の製成酒であっても、「押し味」の強度に違いが見られることを経験的に把握している。こうした酒質の違いに関連する成分が把握できれば、おいしさの追求や品質管理に有用であると期待される。

これまでに我々は、不揮発性成分のプロファイルと「押し味」の強度の相関解析を行ってきたが、明瞭な相関を見出すことはできなかった。そこで本研究では、GC×GC-TOFMS を用いた揮発性成分のノンターゲット分析により、揮発性成分プロファイルと「押し味」の強度の相関解析を試みた。

2. 材料と方法

基本的な醸造方法や一般分析値がほぼ同一であるが、「押し味」の強度に違いがある清酒サンプル9点を用いた（表1）。なお、「押し味」の強度付けは清酒の官能評価に熟練したパネル7名で、2（あり）、1（ややあり）、0（なし）の3段階で評価し、7名の平均値をそれぞれのサンプルの「押し味」の強度とした。

各清酒サンプルは文献²⁾を参考にC18固相抽出

表1. サンプル一覧

No.	NS(-)	Alc.(%)	T.A.(mL)	A.A.(mL)	「押し味」
1	-0.6	20.5	1.9	1.5	2.00
2	-0.2	20.6	1.9	1.5	1.29
3	-0.4	20.5	1.9	1.3	0.14
4	-0.9	20.8	1.9	1.5	1.86
5	-0.8	20.8	1.9	1.6	1.14
6	±0.0	20.7	1.9	1.4	0.14
7	-0.4	20.7	1.9	1.5	2.00
8	-0.6	20.5	1.9	1.5	1.57
9	-0.4	20.6	1.9	1.4	0.57

カートリッジ（Waters）で濃縮・固相抽出し、GC×GC-TOFMS Pegasus[®]4D (LECO) に供した。1次カラムには Pure-WAX (GL Sciences)、2次カラムには InertCap-1 (GL Sciences) を用いた。なお、各サンプルについて3回の繰り返し分析を行った。

クロマトグラムの解析には ChromaTOF ソフトウェア (LECO) を使用し、ライブラリー検索は NIST (ver.14) 及び Wiley (ver.10) を用いて行った。

得られた全てのピークについて、検体間の再現性から計算される有意差の指標である FR 値

(Fisher Ratio=検体間分散値/検体内分散比) を算出した。FR 値が 10 以上であることを指標にサンプル間の違いを評価するのに有用なピークを抽出し、それらのピークの分析値を主成分分析 (PCA) 及び PLS 回帰分析に供した。

3. 結果と考察

GC×GC-TOFMS による分析の結果、1686 ピークが検出され、FR 値が 10 以上であることを指標に、サンプル間の違いを評価するのに有用なピークとして 121 ピークを抽出した。

抽出されたピークの分析値を PCA に供した結果、同一サンプル間で再現性良く分析できていることとサンプル毎にプロットの位置が異なる傾向が確認された（図 1）。

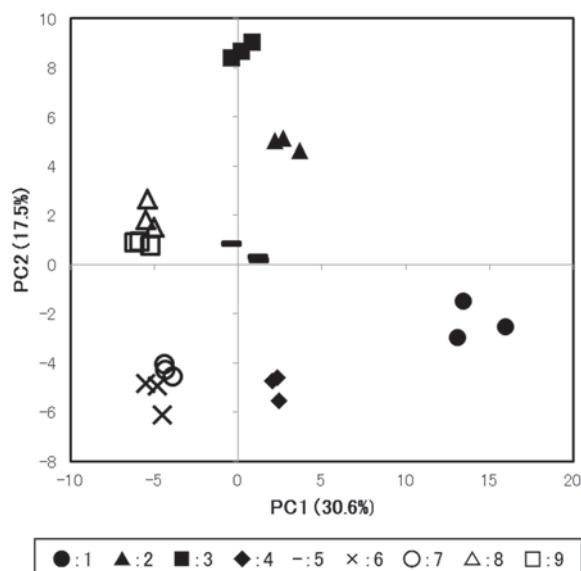


図 1. PCA で得られたスコアプロット

続いて、これらの分析値を説明変数、「押し味」の強度（2-0）を目的変数とした PLS 回帰分析を行った。その結果、モデルの直線性の指標である R^2 値が 0.989、予測性能の指標である Q^2 値が 0.947 となり、高精度な予測モデルを構築することができた（図 2）。

これまでに我々は、今回と同一のサンプルについて GC/MS を用いた親水性不揮発性成分（アミノ酸、有機酸、糖、糖アルコール等）の一斉分析を実施している。それらの分析値を説明変数、「押し味」の強度を目的変数とした PLS 回帰分析の結果、 Q^2 値が 0.640 と低い値であった。このことからも、揮発性成分のプロファイルと「押し味」の強度にいかに高い相関があるかが読み取られる。

また、モデルの構築への寄与度を示す VIP 値を指標に「押し味」と相関の高かつたピークの抽出を試みた。その結果、ヘキサデカン酸エチル、1-ウンデカノール等が正の相関の高い成分として

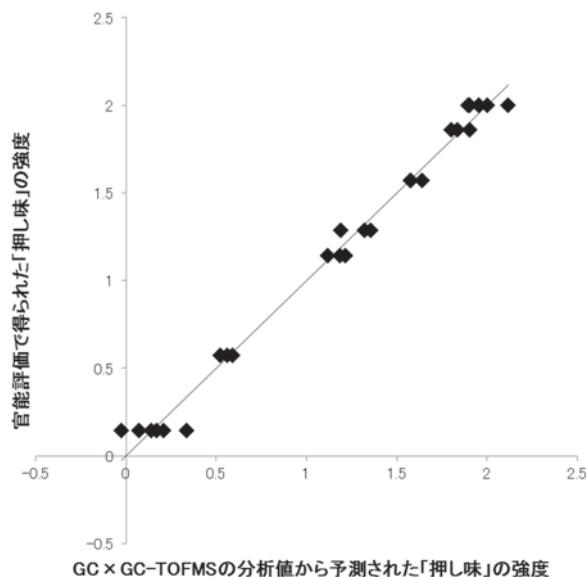


図 2. PLS 回帰分析で構築された予測モデル

抽出された。また、「押し味」の強度に負に寄与しているピークと比較して正に寄与しているピークの方が圧倒的に多い（VIP 上位 20 ピークのうち、正に寄与していたピークは 16）ことから、ある種の揮発性成分が多いほど「押し味」の強度が高くなる可能性も考えられた。

4. 今後の展望

本研究により、「押し味」の強度には揮発性成分のプロファイルが重要である可能性が示された。また、「押し味」の強度と相関の高い成分が複数抽出できた。この結果は、「押し味」の構成要素の解明の一助となると期待される。今後はこの結果をもとに「押し味」の構成要素をより詳細に把握し、「押し味」の強度を高めるような醸造方法の開発や「押し味」の強度を担保するような品質管理方法の開発に繋げていきたいと考えている。

参考文献

- [1]. 瀧酒研究会：改訂 瀧の酒用語集 (1997)
- [2]. Takahashi, K., et al.: J. Agric. Food. Chem., 62, 8478-8485 (2014)

pH 非調整型の 培養系ヒト腸管モデルの確立

佐々木 建吾^{1*}・佐々木 大介¹・近藤 昭彦¹・大澤 朗²

¹ 神戸大学大学院科学技術イノベーション研究科

² 神戸大学大学院農学研究科

*〒657-8501 兵庫県神戸市灘区六甲台町 1-1

E-mail: sikengo@people.kobe-u.ac.jp

100兆、100種に及ぶ細菌で構成されるヒト腸内フローラは、宿主の健康や疾病に密接に関係していることが明らかになり^[1]、腸内フローラのバランスを改善するための機能性食品が注目されるようになってきた。食品成分の機能性評価は動物給餌試験やヒト介入試験による *in vivo* 系で行われきたが、前者は腸内細菌叢や消化物の腸内滞留時間がヒトと異なること、後者は倫理的制限が指摘されている。そこで我々は、反復実験や時系列での評価が可能となる *in vitro* 培養系ヒト腸管モデルを構築してきた。本会では、ヒト大腸内の pH 変動を再現する培養系ヒト腸管モデルの構築、さらにタウリンの添加効果について報告する。

1. 背景

生きた腸内マイクロバイオームの役割や代謝を研究するために、*in vitro* モデルは有用であるが、ヒトの腸内の環境を再現し、シミュレートすることは難しい。我々は以前に高度に嫌気的な状態を保つことで、細菌叢構成の種レベルでの多様性や酢酸・プロピオン酸・酪酸の組成がヒト糞便のものと近似している培養系ヒト腸管モデルを構築し、既知のプレバイオティクスを添加することで *Bifidobacterium* 属の生育促進効果を評価できることを報告している。しかし、大腸内の盲腸から下行結腸に至るヒト腸管下部において pH が 5.6 から 6.6 に徐々に増加することが知られている^[2]。そのため *in vitro* モデルの培養条件はできるだけ、pH 変動の環境に近付けることが望ましい。本研究では、ヒト大腸内の pH 変動を再現する培養系ヒト腸管モデルを構築することを目的とした。

2. 材料と方法

培養系ヒト腸管モデルの運転は 8 連培養装置 (Bio Jr. 8; ABLE, 東京) を使用した。培養器に Gifu anaerobic medium (GAM; 日水製薬株式会社、東京) 培地を基礎培地として投入して、使用前に 115°C で 15 分間オートクレーブした。嫌気条件については各培養器に N₂:CO₂=80:20 の混合ガスを通気攪拌して形成した。初期 pH を 6.5 に調整して、健常人 8 人の

糞便をそれぞれ投入して 37°C で 30 時間培養した。サンプリングについては培養器側部の突起部から速やかに行い、サンプルは -20°C で保存した。

短鎖脂肪酸は高速液体クロマトグラフィー(島津、京都)で測定した。ゲノム DNA はフェノール・ドデシル硫酸ナトリウム (SDS) 入りの溶媒中でガラスビーズによる物理的破碎方法で抽出した。DNA 精製後に細菌 (Bacteria) のリボソーム 16S rRNA 遺伝子の V3-V4 可変領域に特異的なプライマーで PCR 増幅を行った。增幅産物は次世代シークエンサー (Miseq; Illumina, San Diego, CA, USA) に供して配列データを得て QIIME を用いて配列解析を行った。

3. 結果と考察

(1) pH 変動型の培養系ヒト腸管モデルの開発

特徴的な pH の推移を示す(図 1)。M39(性別、年齢)の糞便を使用した結果、初期 pH 6.5 から徐々に減少し 6.0 に達した後に、増加して 6.5 に戻る傾向を示し、ヒト大腸内の pH 変動を再現していると考えられる。

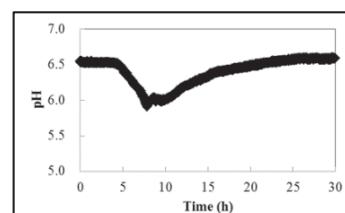


図 1 培養系ヒト腸管モデルにおける pH の推移

(2) 短鎖脂肪酸の推移

発酵初期に微量の乳酸生成が認められたものの消費されて、発酵後期には酢酸、プロピオン酸、酪酸が優先化しており、中でも酢酸濃度が最も高かった(図2)。植菌源となる糞便中においても酢酸が優先化しており、プロピオン酸と酪酸は同程度の濃度で存在しており、培養系ヒト腸管モデル中の短鎖脂肪酸の組成は糞便中に近似していた。

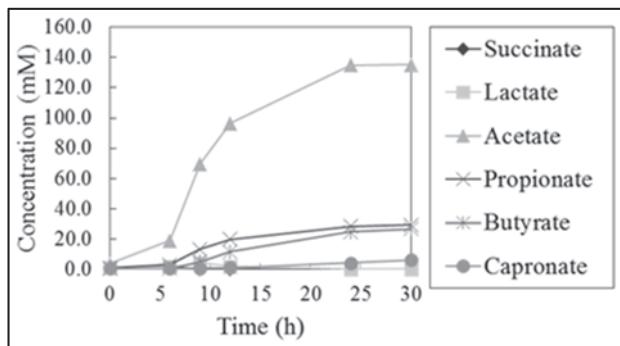


図2 短鎖脂肪酸の推移

発酵後期においては短鎖脂肪酸濃度が増加しているにも関わらず、pHが増加していた。この理由は、発酵後期にアンモニアが生成していることが挙げられる。ヒト腸内においてもアンモニアが生成することが知られている^[3]。培養系モデルは吸収システムを有していないため、ヒト腸管内に比べると高い濃度の短鎖脂肪酸・アンモニアが検出されていた。

(3) 細菌叢の構成

8人の健常人の糞便および培養系ヒト腸管モデルで培養した30時間後の発酵液中の細菌叢を解析した。また、タウリンは抗酸化作用を有し炎症性腸疾患に対して炎症を抑制することが知られている^[4]。そこで、タウリンを添加した培養系ヒト腸管モデル内に形成された細菌叢についても同様に発酵30時間後のものを解析した。その結果、全てのサンプルについて、細菌叢の大部分はBacteroidetes、Firmicutes、Actinobacteria、Proteobacteriaの4門に属する菌種から構成されており、過去のヒト腸内についての知見と一致していた^[5]。

これらの細菌叢データについて主座標分析を行った結果(図3)、細菌叢の組成については個人間の多様性が認められ、そのばらつきは培養系ヒト腸管モデル中において維持されていることが明らかとなつた。

また、タウリンは培養系ヒト腸管モデル中において消費されずに残存していたことより、ヒト大腸内に達することができれば腸内細菌叢に消費されることなく腸管上皮に達すると考えられる。本結果より、

炎症性腸疾患者に対してタウリンを大腸まで行きつかせることができれば、有効的に大腸の抗炎症作用を示すと考えられる。

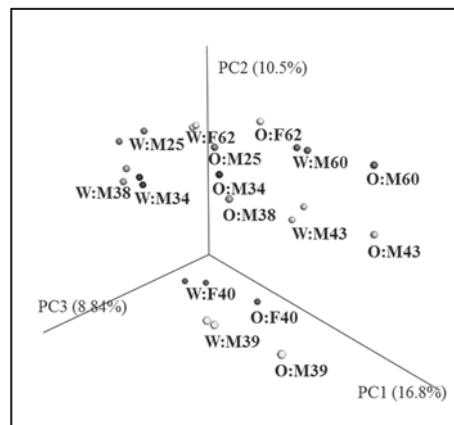


図3 細菌叢の主座標分析結果 O:糞便 W:培養後 (O:性別、年齢、W:性別、年齢、を記載)

4. 今後の展望

pH変動型の培養系ヒト腸管モデルを確立することにより、ヒト大腸内のpH変動に近い環境を再現した。また、本方式の培養系ヒト腸管モデルはヒトの多様性を維持したまま、ヒト大腸内マイクロビオータを再構築していた。このモデル腸内細菌叢を利用することにより、*in vitro*系にてタウリンに対する腸内細菌叢の応答について新規の知見を得ることができ、タウリンの大腸内での有効性を示すに至った。以上より培養系ヒト腸管モデルは*in vivo*系に先立つ評価系として利用できると考えられ、今後は機能性食品の評価や医療応用としての展望が期待される。

本研究はバイオプロダクション次世代農工連携拠点の支援を得て行われた。トピックスにご推薦頂きました先生方に深く感謝申し上げます。またご指導頂きました研究機関・企業の諸先生方、研究員、技術補佐員の皆様に深く感謝申し上げます。

参考文献

- [1]. Lozupone, C.A., et al.: Nature., 489, 220-230 (2012)
- [2]. Cummings, J.H., et al.: Gut., 28, 1221-1227 (1987)
- [3]. Molly, K., et al.: Appl. Microbiol. Biotechnol., 39, 254-258 (1993)
- [4]. Shimizu, M., et al.: Adv. Exp. Med. Biol., 643, 265-271 (2009)
- [5]. Tyakht, A. V., et al.: Nat. Commun., 4, 2469 (2013)

人工プロモーターを用いたセルロース系バイオエタノール生産に資する遺伝子組換え酵母の開発

藤森 一浩*, 小林 洋介, 佐原 健彦, 扇谷 悟, 鎌形 洋一

国立研究開発法人産業技術総合研究所・生物プロセス研究部門

*〒305-8566 茨城県つくば市東1-1-1

*E-mail: k-fujimori@aist.go.jp

本研究開発では、プロモーター工学の観点から、長期のストレス下において効率よく遺伝子発現可能な人工プロモーター pSynSR480 をデザインし、このプロモーターにより *xylose isomerase* を発現する遺伝子組換え出芽酵母は、効率的に *xylose* を資化・エタノール生産が可能であることを実証した。目的とする有用物質を「より多く、より速く」生産する「バイオものづくり」技術の一案として、生産プロセスに適合した人工プロモーターのデザインと利用について提案する。

1. 背景

微生物を用いた各種有用物質の工業生産プロセスを確立する上で、目的とする有用物質を「より多く、より速く生産する技術」、すなわち、収率・生産性の向上が、最も重要な課題である。出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* を宿主とする場合、遺伝子組換え技術・ゲノム編集技術等を適用し、外来の代謝遺伝子を導入することにより、本来 *S. cerevisiae* が生産できない物質を生産可能にすることは比較的容易である。しかし、目的とする有用物質の収率・生産性を最大にするためには、鍵となる外来・内在性代謝遺伝子発現を刻一刻変化する生産プロセスに合わせて最適化することが必要かつ重要であるにも係わらず、実際には、適当な内在性プロモーターを利用することが多く、十分に検討されているとは言いたい。

本研究開発では、glucose/xylose 同時糖化併行複発酵 (SSCF) プロセスを想定し、xylose 代謝遺伝子の遺伝子発現のためのプロモーターとしてデザインされたストレス応答人工プロモーターの利用可能性について、セルロース系バイオマスエタノール生産プロセスを題材として、以下の研究開発を行った。

2. 材料と方法

(1) 人工プロモーター pSynSR480 のデザイン

本研究開発では、*S. cerevisiae* が本来利用できない *xylose* を外来の *xylose isomerase* (XI) 遺伝子の発現によって強制的に資化させること、酸素制限下でのエタノール発酵であること、糖化速度によって *S. cerevisiae* が発酵を行う際に必要な糖の供給が律速になること、*S. cerevisiae* にとって高温の条件で発酵を行うこと、72 時間以上という長時間の発酵プロセスであること等を考慮して、各種ストレスによって長時間活性化しうる 480 bp の人工プロモーターをデザインした。この塩基配列を pSynSR480 と名づけ、人工合成した(図 1)。pSynSR480 の下流に、*Clostridium phytofermentans* 由来 XI 変異体 (CpXI) 及び ADH1 terminator、さらに *S. cerevisiae*において発現が弱いとされている *Xylulokinase* 遺伝子を pPGK1 と TEF1 terminator を pAUR101 プラスマドベクター (タカラバイオ) に構築した。*StuI* により直鎖化したプラスマドを導入し、相同組換え形質転換株を *Aureobasidin A* (タカラバイオ) により選択した (KEF206 株)。宿主は、産総研で取得した工業用出芽酵母 *S. cerevisiae* の isogenic haploid 株 IR-2id 由来 KEF180 (*MATa hoΔ::loxP gre3Δ::kanMX*) を用いた。コントロールとして pSynSR480 の代わりに、好気増殖条件で最も強い発現が可能であることが知られている *S. cerevisiae* 由来 pPGK1 を配置したベクターを構築し、同様に相

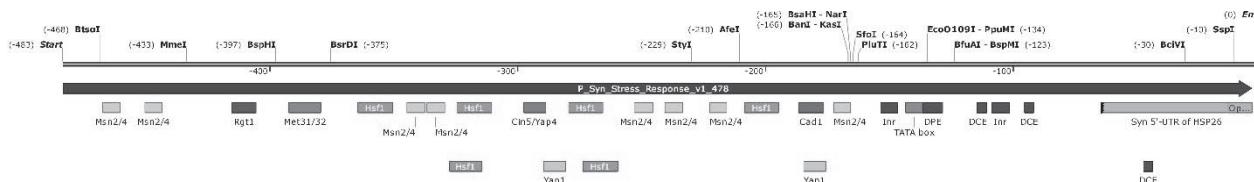


図 1 pSynSR480 の cis-elements

同組換えにより KEF205 株を取得した。

(2) YPDX 擬似発酵試験

KEF205/KEF206 株を用いて以下の条件で発酵試験を行った。サトウキビバガスに含まれるであろう glucose/xylose 量を考慮した YPDX 培地 (D-glucose 85 g/L (SIGMA)、D-xylose 35 g/L (SIGMA)、BactoTM Yeast Extract 10 g/L (Difco), BactoTM Peptone 20 g/L (Difco))を用いて、70 mL 培地/100 mL フラスコ、38°C、最大 120 時間、初期植菌量 OD₆₀₀=3、無通気シリコンキャップ、通気は 21G 針による微好気条件の条件で発酵試験を行った。サンプリングはキャップに通したサンプリング針を経時的に行つた。

(3) アルカリ処理バガス同時糖化併行複発酵試験

最大 141 g/L の glucose/xylose が供給されうる量 (糖化率が 85%時に生成される総糖量は YPDX と同じ 120 g/L) のアルカリ処理サトウキビバガス (日揮株式会社提供) を 20 w/v%スラリーで投入し、糖化酵素 8.7 mg/g-dry バイオマス (花王株式会社提供)、初期植菌量 OD₆₀₀=3、初期 pH=5、嫌気性バッグに封じ込め、途中、発生した二酸化炭素のガス抜きを行いながら発酵試験を行い、72h 及び 120h にサンプリングを行つた。(2)(3)いずれも、HPX-87H カラム (BioRad) を用いて発酵溶液上澄に含まれる成分濃度を HPLC (Jasco systems)により測定した。

3. 結果と考察

(1) pSynSR480 を用いた KEF206 株は、YPDX 擬似糖化液を用いたエタノール発酵において、優れた xylose 資化速度、エタノール生産性を示す

擬似糖化液 YPDX を用いたエタノール発酵試験において、72 時間時点における KEF205 のエタノール生産量 50.6 g/L、生産性 0.70 g/L/h、エタノール変換効率 82%に対し、KEF206 はエタノール生産量 56.5 g/L、生産性 0.78 g/L/h、エタノール変換効率 91%であった (図 2)。いずれの指標も 11-12%向上した。本結果から、pSynSR480 は、YPDX 擬似糖化液を用いた微好気エタノール発酵プロセスにおいて高い発現活性を有し、このプロセスに適したプロモーターであることが明らかになった。

(2) pSynSR480 を用いた KEF206 株は、アルカリ処理バガスを用いた SSCF エタノール発酵試験において、エタノール生産量が向上

アルカリ処理バガスを用いた SSCF では、72 時間時点における KEF205 のエタノール生産量 46.8

g/L、推定エタノール変換効率 91%に対し、KEF206 のエタノール生産量 51.6 g/L、推定エタノール変換効率 91%であった。エタノール濃度が向上した理由は、酵母による糖消費速度の違いによる生成物阻害解除 (糖化速度向上) 効果、エタノール変換効率が同じである理由は、遺伝子組換え酵母の性能に比べて、酵素糖化性能が未だ律速になつておらず、残 xylose がそれぞれ 2.29 g/L、1.68 g/L とほぼ同程度、つまり、いずれにおいても、発現した XI は供給された xylose を十分効率的に代謝していることによると考えられる。

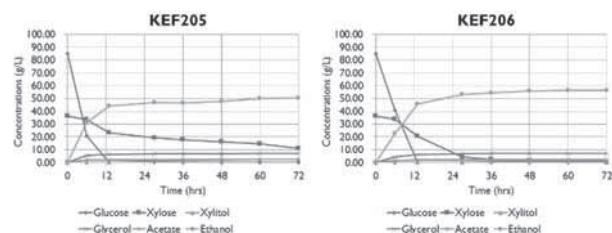


図 2 エタノール発酵プロファイル

4. 今後の展望

本研究開発では、pSynSR480 という論理的にデザインされた人工プロモーターの SSCF プロセスによるセルロース系バイオマスエタノール生産における有用性を示した。Xylose 資化速度については、48 時間時点で pSynSR480 を用いた KEF206 は 35 g/L の xylose をほぼ消費しているが、glucose に比べると未だに 10 倍も遅い。なお、KEF206 は、pSynSR480 による XI 発現以外エタノール収率・生産性の向上のための手段は何ら加えていないので、さらなる向上が期待できる。今後、このような人工プロモーターの利用がバイオエタノール以外の有用物質生産プロセスにおいても有効であることを実証するすることで、「より多く、より速く生産するためのバイオものづくり技術」の確立、微生物による有用物質生産の商業化に向けて貢献していきたいと思う。

謝辞

本研究開発は、国立研究開発法人新エネルギー・産業技術総合開発機構 (NEDO) 「バイオマスエネルギー技術研究開発／バイオ燃料製造の有用要素技術開発事業／有用微生物を用いた発酵生産技術の研究開発」における研究成果の一部である。

酵母における酸耐性・塩耐性付与遺伝子の解析 と分子育種による耐性強化

松鹿 昭則^{1,2*}・鈴木 俊宏¹・根宜 香奈子¹・橋本 智代¹・五島 徹也³・星野 保^{1,2}

¹産業技術総合研究所 機能化学研究部門 バイオ変換グループ

²広島大学大学院先端物質科学研究科 分子生命機能科学専攻

³酒類総合研究所 酿造微生物研究部門 酵母研究グループ（現所属）

*〒739-0046 広島県東広島市鏡山 3-11-32

*E-mail: a-matsushika@aist.go.jp

酵母を用いたエタノールや乳酸等の有用物質生産において、前処理・糖化工程で使用される酸により培養液の pH が低下し、中和するために投入する高濃度の塩によって、酵母の発酵性が低下するため、酸や塩に対して耐性が向上した酵母の開発が重要となる。そこで我々は、酸や塩などのストレスに高い耐性を示す酵母 *Issatchenkia orientalis* から酸耐性・塩耐性に関わる遺伝子を単離し、出芽酵母等に酸耐性・塩耐性を向上させる育種技術の開発を進めている。

1. 背景

草本、木質由来のリグノセルロース系バイオマスを原料として、エタノールや乳酸など CO₂ 排出削減効果が大きい有用物質を生産する発酵技術の確立と普及が求められている[1]。これら有用物質生産に関して、前処理・糖化工程で使用される酸や中和で生成する塩が環境ストレスとして酵母に負荷されるため、酸や塩に対して耐性が向上した酵母を育種することが中和・脱塩コストの低減化や雑菌汚染の防止、ひいてはエタノールや乳酸などの生産効率向上から生産コストの低減化に繋がると期待される。

Issatchenkia orientalis は耐酸性、耐塩性に優れた酵母として知られている。例えば、酸性温泉から単離された *I. orientalis* MF-121 株は、醸造用酵母では発酵できなかった 5% の硫酸塩を含む pH 2.0 の条件下でもエタノール発酵が可能である[2]。このように、*I. orientalis* は低 pH や高濃度塩に対する耐性機構の解明に適した材料のみならず、新たな遺伝子資源として活用し、産業利用を促進するという観点からも重要である。しかしながら、*I. orientalis* から耐酸性や耐塩性などストレス耐性および発酵阻害耐性に関連する有用遺伝子を同定し、通常の環境条件下でしか増殖や発酵ができない酵母に耐性能を付与する検討はこれまでほとんど行われていない。

本研究では、*I. orientalis* から単離した酸耐性・塩耐性に関わる遺伝子および *Saccharomyces cerevisiae* 由来の相同遺伝子の発現解析を行うとともに、これら遺伝子をそれぞれ *S. cerevisiae* において高発現させ、エタノール生産性への効果を検討した。

2. 材料と方法

(1) 酸耐性候補株のスクリーニング

I. orientalis NBRC1279 株から抽出したゲノム DNA を制限酵素でランダムに切断後、3~5 kp 以上の DNA 断片を分画した。分画した DNA の末端を平滑化してベクター (pPGK) に挿入し、プラスミドライブラーを作製した。これを *S. cerevisiae* BY4742 株に形質転換し、pH 2.0 の SCD 寒天培地において 30°C で培養し、20 日後に生育可能な株として 1 クローン取得した。

(2) RNA の抽出とリアルタイム RT-PCR 実験

NBRC1279 株および BY4742 株を様々な pH に調整した YPD 培地 (pH 2.0-6.0) で嫌気的に培養し、それぞれの株から total RNA を抽出した。total RNA 1 μg を鋳型として QuantiTect Reverse Transcription Kit (Qiagen) による逆転写反応を行った。得られた cDNA 100 ng を鋳型として、各プライマーセットおよび iQ SYBR Green Supermix (Bio-Rad) を用い、*IoGASI* および *ScGASI* を標的としたリアルタイム PCR 反応を行い、増幅効率をもとに mRNA 発現量の相対定量を行った。

3. 結果と考察

(1) 耐酸・耐塩性遺伝子 *IoGASI* の単離・同定

スクリーニングで得られたクローンが保持する *I. orientalis* のゲノム領域をシークエンス解析した結

果、2種類の遺伝子 (*IoPXR1* 及び *IoGAS1*) が含まれていることを確認した(図1A)。これらの遺伝子をそれぞれ単離し、BY4742 株に形質転換したところ、*IoGAS1* 遺伝子の形質転換体は低 pH (pH 2.0) および高塩濃度 (pH 2.5, 7.5% Na₂SO₄) の条件下で耐性を示したことから、*IoGAS1* は酸耐性・塩耐性に寄与する遺伝子であることが判明した(図1B)。

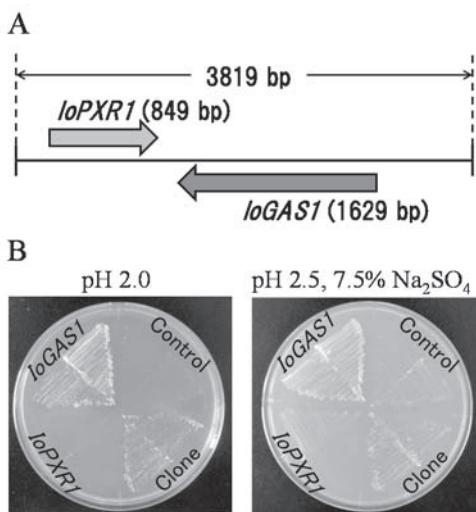


図1.(A)耐酸性・耐塩性酵母株が保持していたゲノム領域、(B)低pH・高塩濃度条件における増殖能

IoGAS1 の塩基配列より推定されるタンパク質(542 アミノ酸)は、出芽酵母において細胞壁の構成要素である β1,3-グルカンの合成に関与する GPI アンカー型タンパク質 Gas1 との高い相同性(60% の同一性)がみられた。

(2) *IoGAS1* および *ScGAS1* の遺伝子発現解析

リアルタイム RT-PCR による遺伝子発現解析の結果、*IoGAS1* の発現は pH 依存性を示し、pH 4.0 から 2.0 にかけて段階的に発現量が増加し、pH 2.0 で最大となった。一方、出芽酵母由来の *ScGAS1* は pH 3.0 の条件で発現量が最大になった(図2)。ま

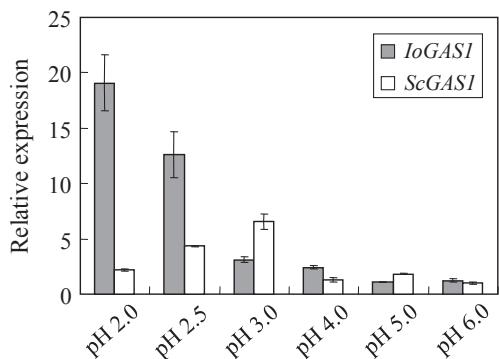


図2. *IoGAS1* および *ScGAS1* の遺伝子発現

た硫酸塩存在下では塩非添加の場合と比べて、いずれの遺伝子も pH 値に関わらず発現量が上昇した。

(3) エタノール生産性への効果

IoGAS1 および *ScGAS1* を BY4742 株に形質転換してそれぞれ *IoGAS1* 高発現株および *ScGAS1* 高発現株を構築した。これらの株を低 pH 又は高濃度硫酸塩の条件下でグルコースからのエタノール発酵能を比較した結果、いずれの形質転換株もコントロール株と比べてグルコースからのエタノール生産性が顕著に向上了(図3)。しかし、pH 2.1 の条件では、*ScGAS1* 高発現株は *IoGAS1* 高発現株に比べてエタノール生産性が 21% 低下した。このように、*ScGAS1* は *IoGAS1* と比べて耐性効果は低いが、酵母の酸耐性・塩耐性に寄与することが示された。

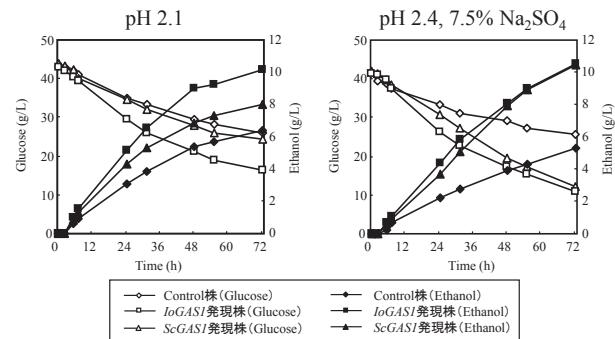


図3. 低pH・高塩濃度条件下でのエタノール生産

4. 今後の展望

本研究で単離した *IoGAS1* および *ScGAS1* を酵母において高発現することにより酸耐性・塩耐性の付与が可能であり、増殖阻害や発酵阻害を回避して生産性の向上が見込める。また本技術は、エタノールのみならずポリ乳酸プラスチックの生産コスト低減にも効果を發揮すると期待される。このように、本技術は様々な有用物質の製造工程に適用可能であり、実用化が期待できる技術シーズと考えている。

一方で、*IoGAS1* の発現量は pH 依存性を示すものの、その耐性機構は謎に包まれている。今後、これらの耐性機構を解明することにより、さらなる耐性能の強化を目指し、物質生産革命に繋げたい。

参考文献

- [1]. 星野保, et al.: 日本エネルギー学会誌, Vol.93, No.7, 573-579 (2014)
- [2]. Hisamatsu, M., et al.: J. Appl. Glycosci., 53, 111-113 (2006)

Rhodococcus sp. Br-6 による複数の酸化還元メディエーターを介した臭素酸還元

藤屋 寛子・玉井 奈生子・天知 誠吾

千葉大学園芸学部

*〒271-8510 千葉県松戸市松戸 648

*E-mail:amachi@faculty.chiba-u.jp

臭素酸(BrO_3^-)は浄水場で行われるオゾン処理により臭化物(Br)が酸化され発生する副生成物の一種で、発がん性が報告されている。現状では、処理水中の有機物濃度に応じてオゾン注入量を制御するなどの対策法があるが、完全な除去は困難である。当研究室では、微好気条件下において既知細菌と比較して 100 倍以上速い臭素酸還元速度を示す土壤細菌 *Rhodococcus* sp. Br-6 株の分離に成功している。本研究は、Br-6 株による臭素酸還元メカニズムの解明を目的とした。その結果、ジクロロインドフェノール(DCIP)と鉄イオンがそれぞれ酸化還元メディエーターとして機能しており、酢酸由来の電子は NADH/ジアホラーゼより DCIP に移り、DCIPH₂ が Fe(III)を還元、最終的に Fe(II)が臭素酸を還元することが明らかになった。

1. 背景

臭素は、水道原水中では臭化物(Br)として存在し、酸化されると発がん性のある臭素酸(BrO_3^-)が生じる。これまで飲料水に含まれる臭素酸は問題にならなかつたが、水処理にオゾン(O_3)が使用されるようになり、処理水中の臭化物が O_3 により酸化されて臭素酸が生じるようになった。そのため、臭素酸濃度が規制値(10 $\mu\text{g/L}$)を超える危険があり、対策が義務付けられている。現状では、処理水中の有機物濃度に応じて O_3 注入量を制御するなどの対策法があるが、完全な臭素酸除去は困難である。

一方近年、脱窒菌など臭素酸還元能を有するいくつかの微生物の存在が確認されている[1, 2, 3]が、その還元速度は非常に遅く、還元メカニズムにも不明な点が多い。当研究室では、微好気条件下で既知細菌と比較して 100 倍以上速い臭素酸還元速度を示す土壤細菌 *Rhodococcus* sp. Br-6 株の分離に成功しており、酢酸を電子供与体、レソルフィンや DCIP を酸化還元メディエーターとした臭素酸還元機構が推定されている。そこで、本研究は Br-6 株による臭素酸還元メカニズムの完全解明を目的とした。

2. 材料と方法

Br-6 株は、酢酸を電子供与体とした無機塩培地を用い、密栓バイアル中において微好気条件で培養した。微好気条件とは、培養開始時には気相および液

相中に酸素が十分に存在するが、微生物自身の呼吸によって酸素が消費され、好気条件から徐々に嫌気条件に移行する培養条件を示す。

3. 結果と考察

(1) 生育菌体による臭素酸還元

酸化還元メディエーターであるレサズリン、レソルフィン、DCIP のいずれかを 4 μM 含む培地を用いて Br-6 株の臭素酸還元能を検討した。その結果、メディエーターを添加しない条件でも 100 μM 程度の臭素酸が還元されたものの、メディエーターを添加した培地ではいずれも 4 日間で 250 μM の臭素酸がほぼ完全に還元された(図 1)。

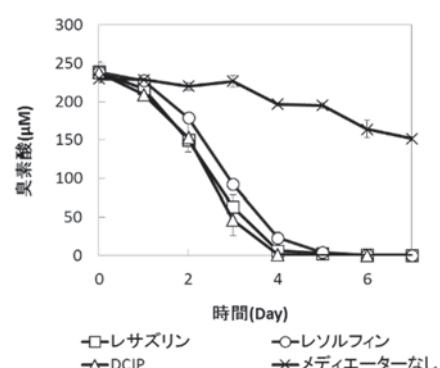


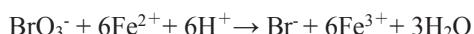
図 1. Br-6 株の臭素酸還元はメディエーターにより促進される

(2) ジアホラーゼ活性の測定

Br-6 株の無細胞抽出液を調製し、レサズリンや DCIP を NADH 依存的に還元する酵素ジアホラーゼの活性を測定した。その結果、レサズリン、レソルフィン、DCIP を基質とした反応液において酵素活性が確認された。

(3) メディエーターとしての Fe(III)/Fe(II) の検討

ジアホラーゼによる酵素反応により生成した還元型 DCIP は臭素酸を直接還元しなかった。これに対し、無機塩培地存在下では臭素酸還元が進行したことから、DCIP 以外にも培地に含まれる何らかの成分が臭素酸還元に必須であると考えられた。既往研究により、Fe(II)と臭素酸が化学的に反応し、Fe(III)と臭化物を生じることが知られている[4]。



そこで、還元型 DCIP と塩化鉄(III)の両方を添加したところ臭素酸還元が確かに進行した。さらに、還元型 DCIP と Fe(III)、また Fe(II)と臭素酸がそれぞれ非生物的に酸化還元反応することも確認された。

(4) Native-PAGE による活性検出

Native-PAGE により、ジアホラーゼ活性、臭素酸還元活性、NADH 依存的な Fe(III)還元活性の検出を試みたところ、すべての活性で一致するバンドが 1 つ確認された(図 2 の矢印)。Br-6 株が DCIP などのメディエーター非存在下でも臭素酸を還元できる(図 1)のは、ジアホラーゼが NADH 依存的に Fe(III)を還元することで Fe(III)/Fe(II)がメディエーターとして機能するためと推察され、そこに DCIP を添加することで Fe(III)の還元速度が上昇し、その結果臭

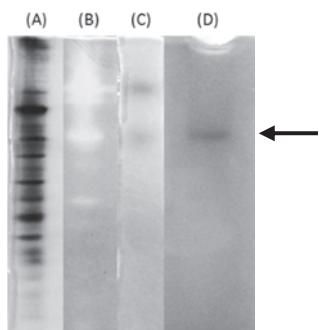


図 2. Native-PAGE による各種酵素の活性の検出

(A)CBB 染色、(B)ジアホラーゼ活性染色、(C)鉄還元活性染色、(D)臭素酸還元活性染色の結果を示す。

素酸還元速度も著しく上昇するものと考えられる。

(5) Br-6 株による臭素酸還元メカニズム

以上の結果より、Br-6 株による臭素酸還元は酢酸由来の電子がジアホラーゼにより NADH を経て DCIP などの酸化還元メディエーターに渡され、さらに Fe(III)、臭素酸と電子が授受されることで最終的に臭素酸を還元していることが示された(図 3)。



図 3. Br-6 株の臭素酸還元メカニズム

4. 今後の展望

本研究において明らかになった Br-6 株による臭素酸還元(図 3)は、これまでに報告例のない新規な臭素酸還元機構である。Br-6 株のような微生物を臭素酸処理に応用するには、実際の処理水に近い反応系やより環境負荷の少ない反応系の確立、また連続的処理方法の検討などが必要であり、今後の研究による実用化に向けた更なる進展が期待される。

参考文献

- [1]. W. A. M. Hijnen, R. Voogt, H. R. Veenendaal, H. van der Jagt, D. van der Kooij, Bromate reduction by denitrifying bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 61, 239-244 (1995).
- [2]. K. J. Martin, L. S. Downing, R. Nerenberg, Evidence of specialized bromate-reducing bacteria in a hollow fiber membrane biofilm reactor. *Wat. Sci. Technol.* 59, 1969-1974 (2009).
- [3]. A. N. Davidson, J. Chee-Sanford, H. Y. Lai C. Ho, J. B. Klenzendorf, M. J. Kirisits, Characterization of bromate-reducing bacterial isolates and their potential for drinking water treatment. *Wat. Res.* 45, 6051-6062 (2011).
- [4]. L. Xie, C. Shang, Role of humic acid and quinone model compounds in bromate reduction by zerovalent iron. *Environ. Sci. Technol.* 39, 1092-1100 (2005).

抗体精製用プロテインAクロマトグラフィー担体の高機能化

西八條正克*・鴻池史憲・荻原侑莉恵・中野喜之・船木正大・水口和信

(株) カネカ バイオテクノロジー開発研究所
(次世代バイオ医薬品製造技術研究組合)

*〒676-8688 兵庫県高砂市高砂町宮前町 1-8

*E-mail: Masakatsu.Nishihachijo@kaneka.co.jp

抗体医薬品製造における培養工程の抗体発現量は、近年の技術革新により飛躍的に向上している。高発現培養液は高濃度の抗体だけでなく、多くの不純物を含むため精製工程の負担が大きい。そこで、我々は抗体の効率的な精製を目的にプロテインAクロマトグラフィー担体(PA 担体)の高機能化に取り組んだ。新たに開発した PA 担体は従来品よりも抗体結合容量が高く、優れた抗体溶出特性と不純物除去能を示した。また、従来品と同等のアルカリ耐性と圧力／流速特性も兼ね備えており、抗体精製工程の生産性向上とコスト削減に寄与すると期待される。

1. 背景

近年の抗体発現量の向上は製造コスト削減に貢献しているが、不純物量の増加を伴うことがあり、精製工程の負担が大きくなっている。PA 担体は抗体発現培養上清から 1 回のクロマトグラフィーで抗体を高純度に精製できることから、抗体医薬品製造の初期精製工程に必要不可欠な精製資材である。これまでの PA 担体の改良は、高結合容量化や繰り返し使用のためのアルカリ耐性化を中心に進められてきた [1]。最近では高発現培養液に対応したさらなる高結合容量化や不純物除去能の向上、抗体の酸性変性による凝集体形成を低減する穏和な酸性 pH での抗体溶出等の高機能化が求められている。

2. 材料と方法

計算化学と遺伝子工学的手法を用いた PA リガンドの改変及びハイスループットなりガンド性能評価により、溶出特性と不純物除去性能が向上した新規リガンドを取得した。また、高結合容量と低リガンドリークを指標に配向性を制御したリガンド単点固定化技術を開発した。新規 PA 担体の基本性能評価として、市販抗体医薬品を用いて抗体結合容量や抗体溶出特性を調べた。さらに、モノクローナル抗体発現細胞培養上清を用いて不純物除去能を評価した。なお、比較対照には既存製品であるセルロース担体 (KANEKA KanCapATM) 及び市販の高結合容量型アガロース担体(Agarose Resin)を用いた。

3. 結果と考察

(1) 新規 PA 担体の基本性能

ヒトポリクローナル抗体を用いて動的結合容量を測定した結果、新規 PA 担体(Kaneka New Resin)は既存製品に比べて滞留時間 4~8 min の範囲で高い結合容量を示した(図 1)。また、0.1 M の NaOH 水溶液を用いた定置洗浄工程 (CIP) を含む多回使用評価において、既存のセルロース担体と同等のアルカリ耐性を有していることを確認した。さらに、既存製品と同じ基材を使用しているため、大径カラムでも高流速で使用可能である(内径 60 cm、ベッド高 20 cm、流速 500 cm/h で背圧 0.2 MPa 以下) [2]。

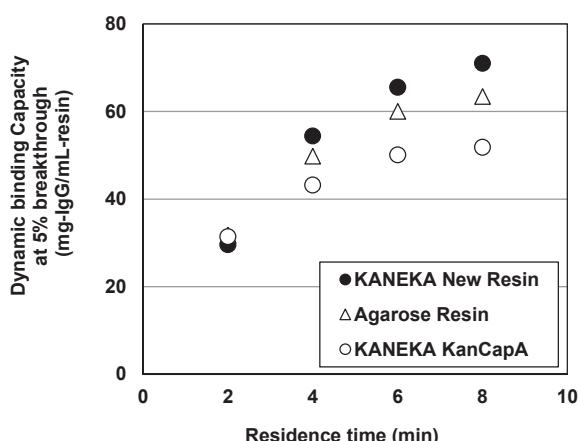


図 1 抗体に対する動的結合容量

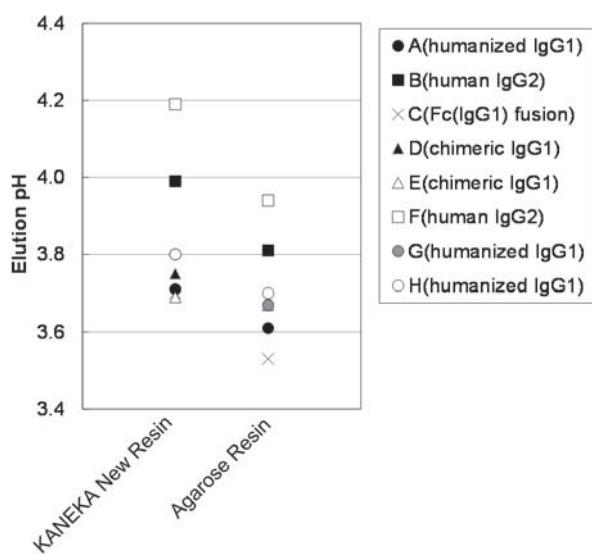


図 2 各種抗体医薬品の溶出 pH 評価

pH グラジエント溶出にて各種モノクローナル抗体の溶出 pH を調べた結果、評価したいずれの抗体でも新規 PA 担体は既存製品に比べて、より高い pH で抗体を溶出できた（図 2）。この特性は、酸性溶出工程における抗体の凝集体形成の低減だけでなく、溶出緩衝液の使用量削減を可能とする。

（2）細胞培養液を用いた性能評価

モノクローナル抗体発現細胞培養上清を用いて不純物である宿主由来タンパク質（HCP）の分離挙動を調べた（図 3）。その結果、既存製品と比較して新規 PA 担体は抗体溶出液中の HCP 量が少なかつた。また、新規 PA 担体は抗体凝集体の除去能も高いことを確認した。新規 PA 担体の優れた不純物除去能は後工程の精製負荷を低減し、精製工程全体の生産性や収率向上に寄与できる。

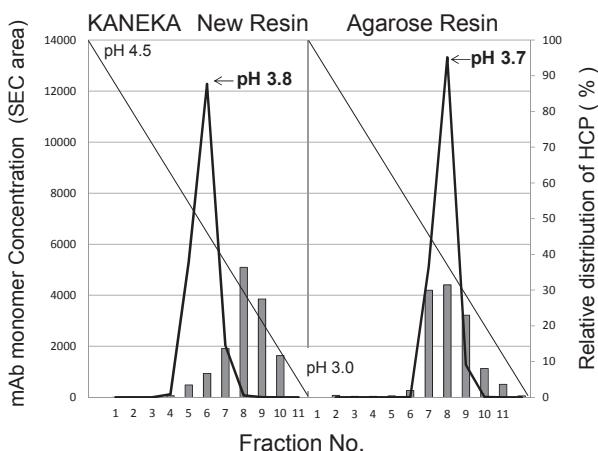


図 3 抗体と宿主由来タンパク質の分離挙動

今後の展望

製薬会社は各社独自の抗体精製プラットフォーム技術を保有しており、PA 担体による初期精製工程を含む 3 ステップのクロマト工程からなる技術が主流となっている[3]。我々が開発した新規 PA 担体は、不純物除去能が優れているため、後工程の負荷が小さく、プロセスの簡略化（2 ステップのクロマト工程）が可能になると期待している。今後、新規 PA 担体とイオン交換クロマトグラフィー担体やミックステムモードクロマトグラフィー担体を組み合わせた 2 ステップの抗体精製法を評価する予定である。また、最近では、抗体医薬品製造の初期投資を抑えるために、高価な PA 担体の使用量の最小化を狙った連続クロマトグラフィー技術が注目されている。我々も、新規 PA 担体を用いた小径カラムでの連続クロマトグラフィーによる生産性向上の検討を進めていきたい。

謝辞

本研究の一部は、経済産業省の「平成 25 年度産業技術実用化開発事業費補助金（個別化医療に向けた次世代医薬品創出基盤技術開発（国際基準に適合した次世代抗体医薬等製造技術））」及び平成 26 年度産業技術実用化開発事業費補助金（次世代医療・診断実現のための創薬基盤技術開発事業（国際基準に適合した次世代抗体医薬等製造技術））、及び国立研究開発法人日本医療研究開発機構（AMED）の「次世代医療・診断実現のための創薬基盤技術開発事業」の支援によって行われた。

参考文献

- [1]. Minakuchi, K., et al.: Protein Sci., 22, 1230-1238 (2013)
- [2]. Iritani, K., et al.: BioProcess International Industry Yearbook 2013-2014, 78-79(2013)
- [3]. Shukla, AA., et al.: J. Chromatography B., 848, 28-39 (2007)

バイオ医薬品生産を目指したチャイニーズハムスター肺組織からの無血清馴化不死化細胞株樹立

山野範子^{1,2}, 大政健史^{2,3*}

¹徳島大学大学院生物資源産業学研究部 応用生物資源学分野

²MAB 組合, ³大阪大学大学院工学研究科 生命先端工学専攻

*〒565-0871 大阪府吹田市山田丘 2-1 U1E 棟 801

*E-mail: omasa@bio.eng.osaka-u.ac.jp

チャイニーズハムスター (*Cricetulus griseus*) の卵巣由来細胞 (CHO) 細胞は、組換えタンパク質の高度な翻訳後修飾が可能、無血清馴化培養が可能などの理由により、タンパク質医薬品生産宿主細胞として多用されている。CHO 細胞を宿主細胞としたバイオ医薬品は、現在の売上世界上位 10 医薬品の中の 6 品目抗体医薬品など多数の品目が上市され、CHO 細胞に基づく培養方法、無血清培地、工業生産、安全性確認のプラットフォームが確立している。本研究は、従来の CHO 細胞よりさらに高増殖、かつ高生産性のチャイニーズハムスター由来の新規高生産宿主細胞の開発を目的とし、肺由来の細胞株を樹立した。

1. 背景

Chinese hamster ovary (CHO) 細胞は、1957 年に Puck 氏らにより樹立された、上皮細胞様の細胞株である[1]。CHO 細胞は、無血清培地に馴化し、浮遊培養が可能であることから、動物由来成分を用いない、大規模培養が可能となっている。また、組換えタンパク質の高度な翻訳後修飾が可能である点で、大腸菌や酵母などの他宿主と比較して有利であり、タンパク質医薬品生産宿主細胞として多用されている。タンパク質医薬品に代表されるバイオ医薬品は、近年、医薬品市場においてますますシェアを伸ばしており、それに伴い、CHO 細胞の需要も増している[2, 3]。そこで本研究は、従来の CHO 細胞に代わる高生産宿主細胞の開発を目的とし、チャイニーズハムスター肺組織の初代培養から、新規細胞株の樹立を行った。

2. 材料と方法

初代培養は、1 mm 角に刻んだ雌のチャイニーズハムスターの肺組織を IMDM 培地 (20% 血清) 中に静置し、行った。増殖してきた細胞を継代により維持し、血清濃度を順次低下させることにより、市販の CHO 無血清培地に馴化させ、バイオリライアンス社による純度試験を行った。樹立した無血清馴化浮遊培養細胞への GFP 発現ベクターの導入効率は、フローサイトメーター (BD 社 BD FACSVerse) により評価した。また、IgG1 抗体発現ベクターを導入し、

抗体安定発現株を構築した。培養上清中の抗体濃度は、Octet QKe システム (Pall ForteBio 社) を用いて測定した。さらに、培養上清中のグルコース、乳酸、グルタミン、グルタミン酸、アンモニウムイオン濃度を、BioProfile 400 (Nova Biomedical 社) を用いて測定した。コントロール細胞として、ATCC 社より購入した、CHO-K1 CCL61 細胞株を用いた。

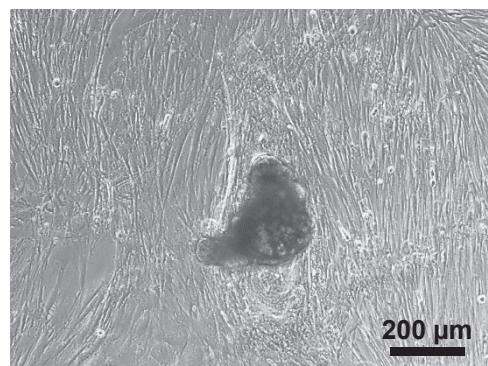


図 1 培養 10 日目の様子

3. 結果と考察

(1) チャイニーズハムスター肺組織からの無血清馴化不死化細胞株の樹立

チャイニーズハムスター肺組織より取得した初代培養細胞は、主に線維芽細胞様の形態を示した。細胞は 400 日以上の継続培養、また、凍結融解が可能であることを確認した。動物由来成分を含まない完全合成培地による無血清浮遊馴化培養に成功し、

CHO-K1 細胞よりも非常に増殖の速い、 0.066 h^{-1} の比増殖速度（倍加時間 10.5 時間）を得た。樹立した細胞株は、無菌試験、マイコプラズマ否定試験、in vitro ウィルス試験を通過し、その安全性を確認した。樹立した細胞株は、Chinese hamster lung (CHL)-YN 株と名付けた。

(2) 遺伝子導入効率の検討

市販の遺伝子導入試薬を用いた、遺伝子導入効率の検討を行った。検討の結果、非脂質性ポリカチオニンである Polyethylenimine (PEI) を用いることで、50%以上の効率で CHL-YN 株に GFP 発現ベクターが導入された。一定以上の遺伝子導入効率を得たことにより、CHL-YN 株において、遺伝子操作を容易に行うことが可能となった。

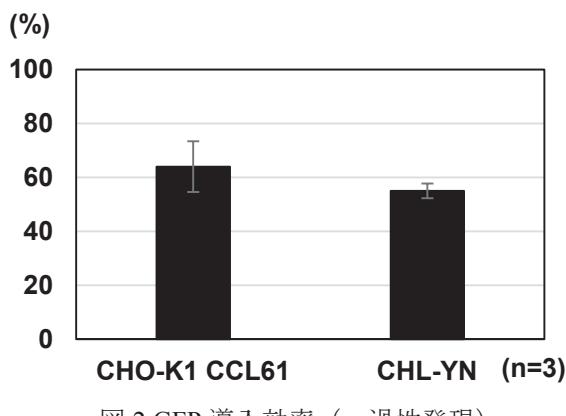


図 2 GFP 導入効率（一過性発現）

(3) 抗体生産株の樹立と生産性の評価

CHL-YN 株および CHO-K1 株に、IgG1 抗体発現ベクターを導入し、Puromycin による薬剤選択を行った。薬剤選択を開始して 2-3 週間で生存率が 98% 以上に回復し、抗体安定発現株を構築した。現在、このヘテロセルプールでの抗体生産性の評価を、バッチ培養により行っている。生存率が約 80% に落ちた時点での培養液中の抗体濃度は、現時点で CHO-K1 株が 27.8 mg/L、CHL-YN 株が 13.3 mg/L の結果が得られている。通常、CHO-K1 株においては、培養後期になると比生産速度が低下してくるが、CHL-YN 株では、反対に比生産速度が増加してくる特徴がみられ、その特徴を生かすための培養方法の改善が求められる。また、CHL-YN 株において、培養上清中のグルコース、乳酸、グルタミン、グルタミン酸、アンモニウムイオン濃度の経時変化に、CHO-K1 細胞とは異なる特徴が観察されている。

4. 今後の展望

CHO 細胞の産業利用において、近年、灌流培養が再び注目を浴びており、高密度培養時における酸素の供給法が話題となっている。肺由来線維芽細胞の低酸素への応答はクローニングによって異なり不均一ではあるものの、低酸素環境下において、一部の細胞で増殖性が上がるという報告がある[4]。また、ヒトにおいて、肺で線維芽細胞が異常に増殖・沈着する肺線維症は、炎症や血流障害等をきっかけとして起こる疾患である。CHL-YN 株は、細胞の最高密度到達後の生存率の低下が、CHO-K1 株と比較して緩やかな傾向が得られており、低酸素や栄養不足条件に強い細胞である可能性が高い。今後、シングルセルクローニングや、培養液中の培地有機成分をターゲットとした成分分析等を通して、より良い細胞の選別、ならびに、CHL-YN 株に適した培養方法を確立することで、新たな生産宿主細胞としての展開が期待される。また、権利関係にとらわれない、日本発のオリジナル株であること、大きな魅力の一つである。

謝辞

IgG1 抗体発現ベクターをご提供下さいました、徳島大学の鬼塚正義先生、ならびに、実験をサポート頂きました、上田瞳様、天羽宏枝様に厚く御礼申し上げます。

本研究は、経済産業省の「個別化医療に向けた次世代医薬品創出基盤技術開発（国際基準に適合した次世代抗体医薬等の製造技術）」、「次世代治療・診断実現のための創薬基盤技術開発（国際基準に適合した次世代抗体医薬等の製造技術）」、および、独立行政法人日本医療研究開発機構（AMED）の「次世代治療・診断実現のための創薬基盤技術開発」の支援によって行われています。

参考文献

- [1]. Puck, T. T., et al.: J. Exp. Med., **108**, 945-956 (1958)
- [2]. Walsh, G.: Nat. Biotechnol., **28**, 917-924 (2010)
- [3]. Walsh, G.: Nat. Biotechnol., **32**, 992-1000 (2014)
- [4]. Das, M., et al.: Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol., **282**, L976-L986 (2002)

ボツリヌス菌由来 Hemagglutinin を用いたヒト iPS 細胞の高密度懸濁培養法の確立

山本 陸¹, 都倉 知浩^{1,2}, Nath Suman Chandra¹, 金 美海¹, 紀ノ岡 正博¹

¹ 大阪大学大学院工学研究科生命先端工学専攻 ² 藤森工業株式会社

〒 565-0871 大阪府吹田市山田丘 2-1

E-mail: kino-oka@bio.eng.osaka-u.ac.jp

Home page: <http://www.bio.eng.osaka-u.ac.jp/ps/indexj.html>

ヒト人工多能性幹細胞 (hiPSCs) を用いる再生医療において細胞の大量培養技術が必要とされている。大量培養に適した三次元懸濁培養中では hiPSCs は球状の集塊を形成して増殖を行う。その際、大きくなりすぎた集塊は、内部において未分化からの逸脱や細胞死を引き起こすため、適度に細胞集塊を分割し、分散された細胞を再播種して、培養を継続する。いわゆる継代操作では、酵素処理や遠心分離処理などの操作中に、細胞死を引き起こし、細胞の収率を低下させる。そこで本研究では細胞間接着のみを特異的に阻害するボツリヌス菌由来ヘマグルチニン (HA) を利用した集塊分割操作を行うことで良好な増殖が得られる新規継代手法を提案した。さらに、遠心操作の省略によるプロセスの簡略化により、hiPSCs の高密度培養を達成した。

1. はじめに

hiPSCs は再生医療における重要なツールとして期待され、実用化に向けた多くの研究が進められている。装置体積当たりの生産できる細胞数が高く、培養環境の制御が容易な三次元懸濁培養法は、実生産に適した大量培養手法として、広く研究が行われている。三次元懸濁培養では、単分散された hiPSCs を容器内に播種した後、細胞同士の合一、E-カドヘリンを介した細胞間接着による球状の細胞集塊の形成[1]、その後、集塊を維持しながらの細胞分裂と、この一連の経過にて増殖がなされる。その際、単分散時における細胞はアポトーシスが生じ[2]、細胞数が減少することや、形成された集塊が大きくなると、集塊内部において未分化からの逸脱や細胞死を引き起こすことが知られている。よって、適度に、細胞集塊を分割し、分散された細胞を再播種して、培養

を継続することが必要となる[3]。この継代操作では、酵素処理や遠心分離処理などの操作中、さらには細胞播種後において、細胞死を引き起こし、結果、細胞の収率を低下させることが問題となる。

本研究では、酵素処理を伴わない、E-カドヘリン結合阻害剤であるボツリヌス菌由来のヘマグルチニン (HA) [4]を用いた継代操作の確立および簡便化、さらには高密度培養への適用を検討する。

2. 結果と考察

(1) HA による細胞間接着阻害作用の検討

hiPSCs は主として、細胞間の E-カドヘリンの結合にて球状の集塊形態を維持する。そこで本研究では hiPS 細胞集塊の継代操作において、E-カドヘリンを介した結合を特異的に阻害する HA を利用することで、細胞間接着のみの細胞集塊崩壊を試みた。

三次元懸濁培養により形成した hiPS 細胞集塊に対

して、HA 添加を行い時間経過における細胞間接着阻害作用を目視にて確認した。図1に示すように、HA 添加中、時間経過に伴いピッティング操作による集塊の分割が確認され、添加後9 hにおいて細胞集塊は全体的に小さく分割されている様子が確認された。一方で添加18 h以降では細胞集塊の分割が確認されなかった。このことからHAは培地中に添加後、細胞間接着阻害作用を示すが、時間経過によりその効果が減衰することが示唆された。

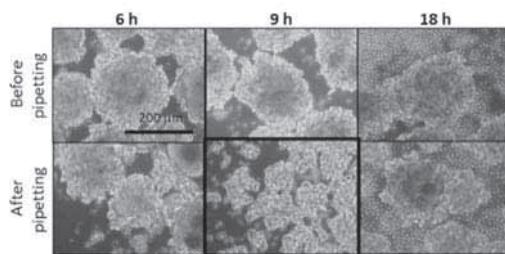


図1. HA 添加による細胞集塊の崩壊

(2) HAを用いた継代培養における細胞増殖

図2に示すように、酵素処理を伴う継代手法またはHA添加を伴う新手法により一連の培養を行った。ここで、両法とも添加された酵素またはHAの除去のための遠心分離を伴う洗浄を行っている。培養96 hにおいて、1回目の培養を終了し、継代を行った。酵素処理を伴う継代操作後での細胞増殖は、培養120 hにおいて、ラグタイムを生じ、増殖が遅れることが分かった。一方、HA添加を伴う継代操作後の細胞増殖は、迅速に対数増殖を示し、細胞集塊の崩壊後の単分散時においてアポトーシスを防ぎ速やかに増殖期への移行を実現できることが分かった。また、継代操作時にHAの除去を行わない場合においても、HAの除去操作を行った場合と同様、良好な増殖を示すことが分かった。よって、HAの洗浄操作の有無が細胞の増殖に影響を与えないことが確認され洗浄操作の省略（無洗浄での培養）が可能であることが示唆された。

(3) HAを用いた高密度培養への展開

無洗浄での細胞集塊分割操作が提案されたことで、無継代培養における高密度培養への応用が期待された。図3に示すように、HAを添加しない培養にお

いては、集塊径の増大に伴い増殖速度の低下が確認された。一方、培養96 hにhiPS細胞集塊をHA添加し、物理的分割操作を行ったところ、分割後、ラグタイムを経ずに良好な増殖を示し、培養196 hにおいては、HAを添加しない培養と比べ、2.5倍の最終到達密度を示し高密度培養が達成された（図3）。

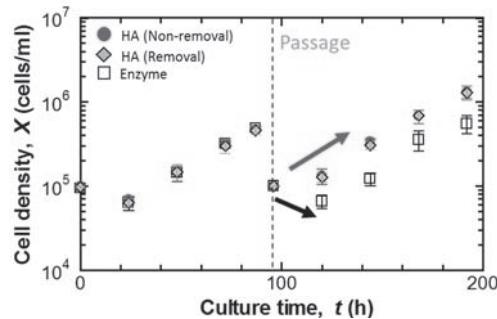


図2. HA 添加による継代培養

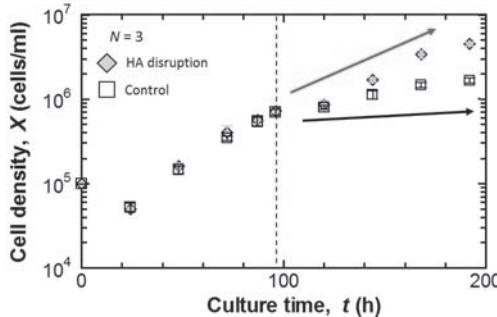


図3. HA 添加による無継代培養による高密度培養

4. 今後の展開

提案した新規継代操作は培養規模の拡大に伴いより大きな意義を示す。継代操作を繰り返すことにより細胞増幅を行う大量培養プロセスでは、継代操作時の細胞数減少を回避することが重要である。また洗浄操作の省略によるプロセスの簡便化は操作が複雑化するラージスケールほど重要となる。現在はまだ実験室スケールでの研究であることから、拡大した規模でのプロセス構築の検討を行い、実用化に堪えうるhiPSCsの大量培養技術の構築を目指す。

参考文献

- [1] Chen T., et al.: Stem Cells, **28**, 1315-1325 (2010)
- [2] Ohgushi M., et al.: Cell Stem Cell, **7**, 225-239 (2010)
- [3] Amit M., et al.: Stem Cell Rev. and Rep., **6**, 248-259 (2010)
- [4] Lee K., et al.: Science, **344**, 1405-1410 (2014)

培養上清成分のインプロセス・モニタリングによる細胞非侵襲的なヒト iPS 細胞の未分化性の評価

豊田 健一^{1*}・鈴木 崇¹・畠林 邦忠²・平丸 大介¹・高橋 雅俊¹・加川 健一²

¹株式会社 島津製作所

²東京エレクトロン株式会社 革新技術企画室

*〒604-8511 京都府京都市中京区西ノ京桑原町 1

*E-mail: tkenichi@shimadzu.co.jp

再生医療や創薬応用に向けて、非侵襲的に細胞の品質を評価する手法が求められている。著者らは、培養上清の多成分分析による非侵襲的な細胞評価手法の確立を目指し、液体クロマトグラフ質量分析計を用いた培養上清成分の一斉分析手法を開発した。本稿では開発した手法を用いて、ヒト iPS 細胞の未分化性の評価が可能か検討した。その結果、未分化維持された iPS 細胞と各胚葉系の培養上清において特徴的な継時変化を示す複数の化合物を見出すことができた。更に多変量解析の結果、分化誘導の初期段階から細胞の分化状態を区別できる可能性が示された。以上のように、本手法は新規なヒト iPS 細胞の未分化性評価手法となる可能性が示された。

1. 背景

多能性幹細胞を再生医療や創薬応用へ応用するためには、高品質且つ大量に細胞を調製し供給する技術開発が必要不可欠である。細胞の品質評価法として、遺伝子発現解析、免疫染色など種々の方法が確立されている。一方、これらの手法は細胞侵襲的であるため、細胞を傷つけずに評価する手法の開発が求められている。このような背景のもと、未分化ヒト iPS/ES 細胞に特徴的な O 型糖鎖をもつ H3+ ポドカリキシンが培養液中に分泌されることが報告された[1]。本糖鎖に結合するレクチンを用いたアッセイ手法は、移植用細胞中の未分化ヒト iPS/ES 細胞の残存評価法として極めて優れた手法である。

著者らは、未分化維持培養中に意図せずに生じた逸脱細胞を評価する新規手法の確立を目指し、液体クロマトグラフ質量分析計 (LC-MS) を用いた培養液の多成分一斉分析技術の適用を検討している。本稿では、開発した培養液の多成分一斉分析手法を用いて、ヒト iPS 細胞の未分化性が評価可能か検討した。

2. 材料と方法

ヒト iPS 細胞 PFX#9 株を用い、mTeSR1 または TeSR-E8 により未分化維持培養を行った。未分化状態を逸脱したサンプルは、サイトカインや低分子化

合物などの液性因子を播種翌日の未分化維持培養液に添加し調製した（内胚葉、中胚葉、外胚葉それぞれ調製）。24 時間毎に培地交換を行い、使用済み培養上清を回収し測定サンプルとした。

回収した培養上清はアセトニトリルで除蛋白した後、トリプル四重極型質量分析計 LCMS-8050 と細胞培養プロファイリングメソッドパッケージ（島津製作所製）を用いて分析し、サンプル間の培養経過に伴う各成分の継時変化を比較した。尚、細胞培養プロファイリングメソッドパッケージは、アミノ酸、糖、ビタミンなどの基礎培地成分および分泌代謝物計 95 成分を 17 分間で一斉分析するための分析条件が収録されたソフトウェアである。

多変量解析ソフトウェア (R version 3.1.2) を用いて培養日毎の分析データの主成分分析を行った。

表 1 測定対象成分の概要

分類	登録数	補足
糖類	5	
アミノ酸	38	アミノ酸代謝物含む
ビタミン	17	
核酸関連	18	塩基およびその代謝物も含む
その他	17	有機酸、ポリアミンなど
内部標準	1	2-イソプロピルリンゴ酸

3. 結果と考察

(1) 培養上清成分の継時変化比較

95成分を対象とした多成分一斉分析により、ヒトiPS細胞の培養上清から約60成分検出することができた。培養上清の採取日を横軸に各化合物の強度を縦軸にプロットし、培養経過に伴う各化合物の継時変化を比較した。その結果、未分化維持培養の上清サンプルと各胚葉系に分化誘導刺激を加えた逸脱モデルとの間で明確な差異を示す化合物が複数認められた。例えばトリプトファン代謝中間体であるキヌレニンは未分化維持培養サンプルにおいてのみ顕著なシグナル強度の増加が認められた。中胚葉分化細胞ではクエン酸が、外胚葉分化細胞では2-アミノアジピン酸が、それぞれシグナル強度の増加傾向を示した。内胚葉分化細胞において、培養2日後以降、デオキシシチジンの急激なシグナル強度減少が観察された。以上のように未分化維持培養サンプル、各逸脱モデルの細胞サンプルそれぞれについて、特徴的な継時変化を示す化合物が認められた。ヒト多能性幹細胞では、高いメチオニン要求性を有しており、その代謝中間体であるホモシステインが培養液中に分泌されることが報告されている[2]。本稿に示した代謝物は上述のMethylation回路とは異なる代謝経路上の物質であり、培養上清における新規未分化性評価マーカー候補を見出すことができた。

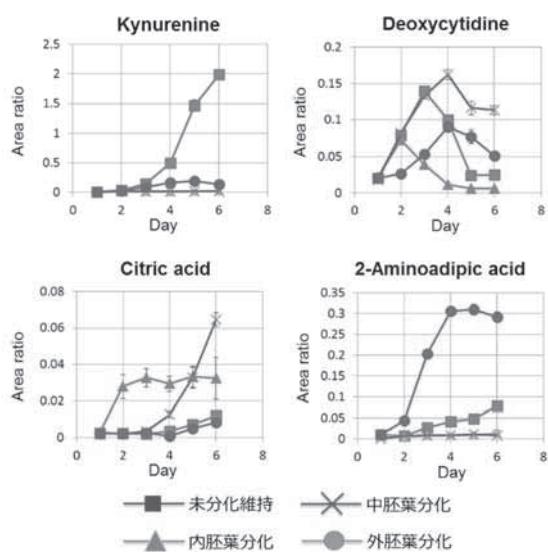


図1 特徴的な継時変化を示す培養上清成分

(2) 分析データの主成分分析

著者らは培養早期に逸脱細胞を検出しうる技術の確立を目指している。前述の化合物を含む各細胞サンプルにおいて特徴的な継時変化を示した8化合物

について、それぞれの培養日で取得した分析データを主成分分析に供した。その結果、分化誘導刺激の翌日（Day2）のサンプル（TeSR-E8）において、未分化維持培養サンプルと分化誘導サンプルを明確に区別することができた（図2）。mTeSR1で培養したサンプルにおいても、Day3以降、未分化維持サンプルと分化誘導サンプルを明確に区別できることを確認した。以上のように、本手法は培養の早期段階において細胞非侵襲的にヒト多能性幹細胞の未分化性を評価できる可能性を示すことができた。

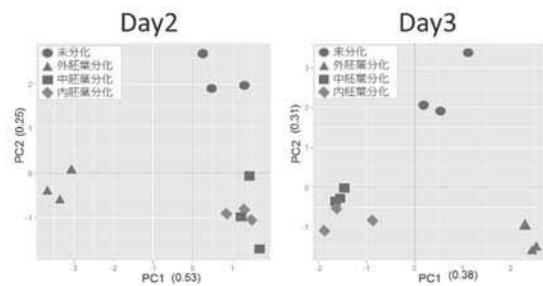


図2 TeSR-E8で培養したサンプルの主成分分析

4. 今後の展望

LC-MSを用いた培養液の多成分一斉分析により、細胞非侵襲的にヒトiPS細胞の未分化性が評価可能であることを未分化維持培養サンプルと逸脱モデルサンプルの比較により確認した。今後は細胞非侵襲な手法による未分化性評価技術の確立に向け、より実用的な評価系の中でのデータ蓄積を進めていく予定である。

参考文献

- [1]. Tateno, H., et al.: Sci. Rep., 4, 4069 (2014)
- [2]. Shiraki, N., et al.: Cell Metabolism., 19, 780-794 (2014)

LC-TOFMS を用いた非誘導体化アミノ酸鏡像体の高速一斉分析法の開発

紺屋 豊・谷口 百優・福崎 英一郎
大阪大学大学院工学研究科 生命先端工学専攻
〒565-0871 大阪府吹田市山田丘 2-1
E-mail: fukusaki@bio.eng.osaka-u.ac.jp

タンパク質やペプチドの構成成分、あるいは遊離体として自然界に存在するアミノ酸のほとんどは L-アミノ酸である。近年、ヒトを含む様々な高等生物においても D-アミノ酸の存在が明らかとなり、食品や医療をはじめ様々な分野で D-アミノ酸が注目・研究されるようになった。それに伴い、簡便かつ堅牢な D-アミノ酸分析法が求められているが、従来の分析法は誘導体化処理が必要であったり、分離能やスループットの面で問題がある。そこで我々は新規分析法の開発に着手し、誘導体化が不要でありながら、従来法に比べ簡便で高速・高分離能を有し、さらに非タンパク質構成アミノ酸や他のアミン類の同時測定も可能な LC-TOFMS 法を確立した。

1. 背景

Glycine を除くタンパク質構成アミノ酸はいずれも不斉炭素を持ち、鏡像体（L-体と D-体）が存在するが、自然界での存在比は L-体に大きく偏っている。両者は旋光性以外の物理化学的性質が全く同一なため、L-アミノ酸の大量存在下、微量の D-アミノ酸を分離・検出することは技術的に難しい。そのため過去には、高等生物の生体内から D-アミノ酸は検出されず、L-アミノ酸のみが存在すると長い間考えられてきた。

しかし近年の分析技術の進歩に伴い、ヒトを含む高等生物においても D-アミノ酸の存在が明らかとなり、食品や医療をはじめ様々な分野で D-アミノ酸が注目・研究されるようになった。だが、従来の分析法では誘導体化処理が必要であったり、鏡像体分離能やスループットが不十分といった問題があり、簡便で高速・高分離能を有する分析法の開発が期待されている。

20 種類のタンパク質構成アミノ酸の側鎖は、性質が多岐（親水/疎水性、酸/塩基性、環状等）にわたるため、鏡像体分離を考慮しなくとも、一斉分析を行うには高いクロマト分離技術が要求される。よって、それに加えて鏡像体分離も同時に達成することは、非常に高難度の課題といえる。そのような状況の中、我々は誘導体化処理を必要としないアミノ酸鏡像体の一斉分析法の開発を試みることにした。

2. 材料と方法

キラルカラム (CROWNPAK CR-I(+): ダイセル CPI) と LC-TOFMS (Nexera : 島津、TripleTOF 5600 : AB SCIEX) を用い、タンパク質構成アミノ酸鏡像体の混合標準液を分析して、良好な鏡像体分離が得られる LC 条件を検討した。次に、食品サンプルへの応用を目指し、LC 条件と抽出条件の最適化を行った。さらに、タンパク質構成アミノ酸以外のアミノ酸・アミン類に関しても測定可能であるかを調べた。

(流速 : 0.4 mL/min, カラムオーブン : 30 °C)

3. 結果と考察

(1) 標準液を用いた LC 条件の検討 [1]

鏡像体の混合標準液を通常用いられる逆相モード (ACN/Water/TFA=50/50/0.5, Isocratic 条件) で分析したところ、鏡像体の半数以上は共溶出あるいは分離不良であった (図 1)。このような場合、移動相の有機溶媒 (ACN) 比率を下げて分離の改善を目指すのが一般的な戦略であり、我々もそれを試みたが、良好な結果は得られなかった。ところが逆に ACN 比率を上げ、HILIC モードで分析すると、分離が劇的に改善されることを発見した (ACN/Water/TFA=50/50/0.5 ~ 98/2/0.5) (図 2) (Glycine および二級アミンである Proline を除く)。また、LC 移動相中の有機溶媒比率が増したことにより、ピーク強度も 10 倍以上向上した。

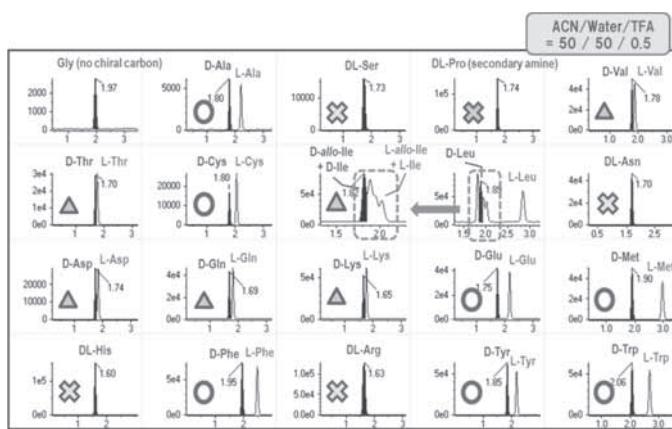


図1. タンパク質構成アミノ酸鏡像体のマスクロ
マトグラム（逆相モード）
移動相 : ACN/Water/TFA = 50/50/0.5

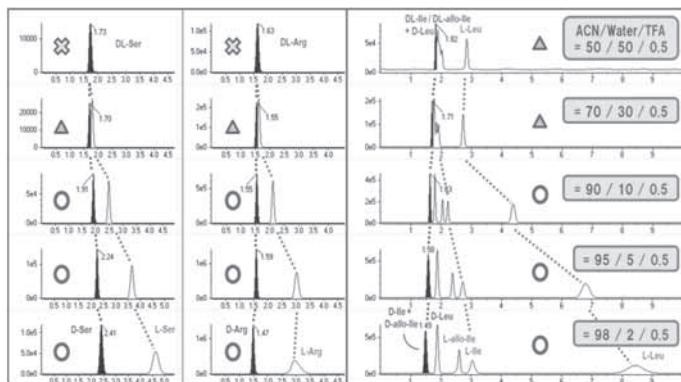


図2. 移動相中アセトニトリル比率の変更に伴う
鏡像体分離の改善例 (Ser, Arg, Ile & Leu)
(逆相～HILIC モード)
移動相 : ACN/Water/TFA = 50/50/0.5~98/2/0.5

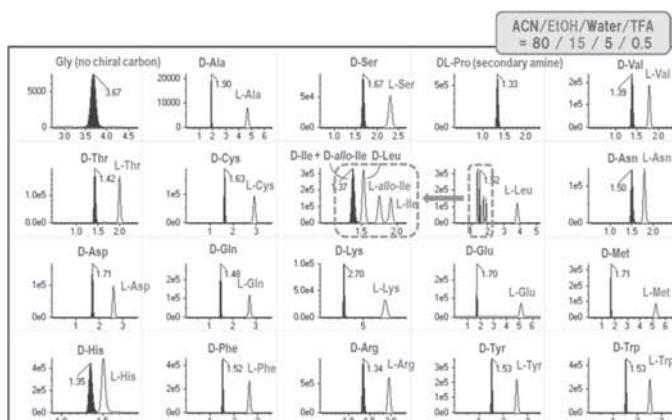


図3. タンパク質構成アミノ酸鏡像体のマスクロ
マトグラム（HILIC モード）
移動相 : ACN/EtOH/Water/TFA = 80/15/5/0.5

(2) 食品サンプルへの応用（抽出条件およびLC条件の最適化）[2]

食品や生体試料中のD-アミノ酸を分析するには、サンプルの前処理が必要となる。標準液と異なりサンプル抽出液（液液抽出）をそのままLCに注入した場合、数種類のアミノ酸のピーク形状が悪くなつた。そこで、移動相にエタノールを添加したところピーク形状が改善した（図3）。さらに、分析時間の短縮化（10分以内）も同時に達成することができた。

(3) 測定対象化合物の拡張 [2]

従来のアミノ酸分析法の多くは蛍光誘導体化処理を伴い、蛍光検出器を用いてピークの検出・同定を行っている。ただしその方法では分子量が異なる化合物を同じ蛍光波長で検出するため、全ての化合物ピークがクロマトグラム上で分離されていかなければならない。また、未知ピークが存在した場合の化合物同定は、分子量情報が不明なため非常に難しい。

一方、我々の分析法は高分解能のTOFMSを用いて検出するため、測定対象の拡張や同定には非常に有利である。これまでに100種類以上のアミノ酸・アミン類の分析に成功している。

4. 今後の展望

本分析法はキラル分析という点を考慮しなくとも従来のアミノ酸・アミン類の分析法に比べ、分離能や処理速度の面で優れている。よって、誘導体化せずにIsocratic条件でありながら10分以内で鏡像体分離まで行える本法は、画期的な分析法と言える。

さらに、クロマト分離の面だけでなく、サンプルの前処理についても簡便かつ高回収率、低コストとなっており、既に食品や生体試料への適用が可能であることを確認済みである。

簡便かつ堅牢なアミノ酸・アミン類の分析が求められている幅広い分野において、本法が今後応用されていくことを期待したい。

参考文献

- [1]. Konya, Y., et al.: J. Biosci. Bioeng., 121, 349-353 (2016)
- [2]. Konya, Y., et al.: J. Biosci. Bioeng., in press.

休眠型天然物生合成遺伝子を利用した機能性新規物質の探索とその生合成解明

○恒松 雄太*, 山本 剛, 横山 葵, 岸本 真治, 渡辺 賢二

静岡県立大学薬学部

*〒422-8526 静岡県静岡市駿河区谷田 52-1

*E-mail: tsunematsu@u-shizuoka-ken.ac.jp

天然物は創薬の探索源として重要な役割を担ってきたが、現在、新規物質の獲得は困難な状況にある。一方、次世代シーケンサーにより生合成遺伝子情報、すなわち「天然物の設計図」が簡単に得られるようになり、同時に、多くの遺伝子が休眠型であるために有効利用されていないことが明らかにされた。我々はこの「天然物の設計図」をもとに、遺伝子工学を利用して新規天然物を生産させること、加えてその代謝経路を解明し、新規物質生産への応用を目指して研究を行った。糸状菌 *Aspergillus niger* のゲノム中に眠る生合成遺伝子を人為的に覚醒させ、新規天然物 pyranonigrin 類を獲得した。遺伝子破壊、大腸菌等による異種発現系を駆使してその生合成経路を解明するとともに、類縁化合物を一網打尽に獲得することに成功した。

1. 背景

1929 年、フレミングによる抗生物質ペニシリンの発見を皮切りに、自然界に生息する微生物、植物、海産生物などを対象にして、これまでに数多くの天然物(天然有機化合物、あるいは二次代謝産物とも言われる)が発見されてきた。天然物そのものはもちろん、その合成誘導体など天然物を基盤とした様々な有機化合物が古くから医薬品やサプリメントとして幅広く使用されており、多くの人々の健康的な生活を支えている。天然物が人類に与えてきた恩恵は大きく、今後も次々と新規有用天然物が発見されることに期待が寄せられている。

一方、現在では容易に獲得できる天然物は既に取り尽くされたといつても過言ではない状況にあり、実際に多数の製薬企業が天然物をリード化合物とした創薬研究部門を縮小廃止している。その原因として、新規天然物の獲得には多大な時間と労力が費やされること、獲得効率が悪いこと、生産性が低いなどの理由が挙げられる。これらの問題点を解決した「次世代型の天然物獲得法」が望まれている。

ところで、次世代シーケンサーによる塩基配列解読技術の革新により、現在では様々な微生物のゲノム配列を短時間、低コストにて解読可能になった。Cyclosporine A など様々な医薬品を輩出してきた糸状菌についても数多くの種のゲノムが解読されてきた。その結果、たった一種の糸状菌のゲノム中に数十種類もの天然物生合成遺伝子が含まれていることが明らかにされた。ところが、実験室内における一

般的な培養条件において、実際に代謝産物として単離、同定される天然物の数はそれよりも遥かに少数である。近年のトランスクリプトーム解析により、これら天然物生合成遺伝子の多くが不活性化状態、すなわち休眠状態であることが示された¹。つまり、我々人類は微生物のもつ天然物生産能力のうち、氷山の一角のみを利用していたに過ぎないのかも知れない。一方で、このような生合成遺伝子を人為的に制御し、発現させることができれば、これまでに発見されてこなかった天然物の獲得が期待できる。本研究では、糸状菌に対して遺伝子操作を施すことにより、本来は休眠状態であった天然物生合成経路を覚醒させ、新規天然物を獲得することを目指した。

2. 結果

i. 天然物生合成遺伝子の *in silico* 解析

黒麹菌 *Aspergillus niger* のゲノム中には 33 個のポリケタイド合成酵素(PKS)、15 個の非リボソーム性ペプチド合成酵素(NRPS)および 9 つの PKS-NRPS hybrid 型酵素(HPN)を有することが報告されている²。一般的に、これらの酵素は天然物の炭素骨格形成の機能を担っている。一方、これら骨格形成酵素遺伝子の周辺には「修飾酵素」と呼ばれる酵素遺伝子が多数存在している。修飾酵素は出来上がった炭素骨格に対して、酸化還元反応、メチル基やプレニル基などの転移反応など多種多様な変換反応を触媒する。実は天然物の原料はアミノ酸や有機酸等の単純な物質であるが、修飾酵素による多彩な変換反応により

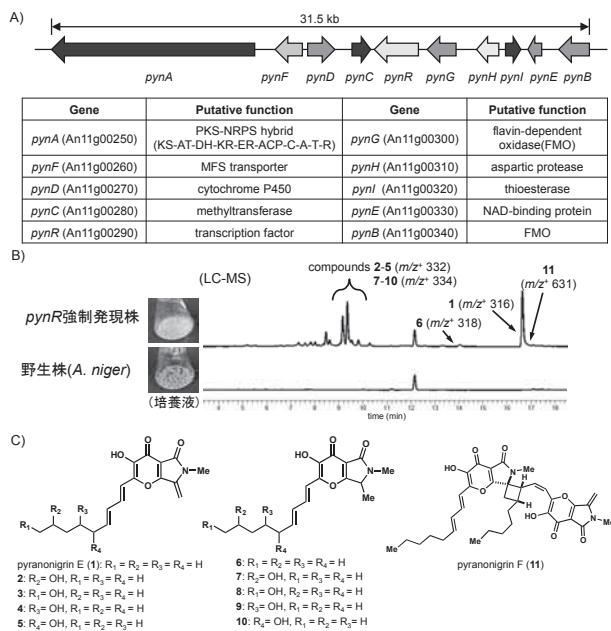


図 1. *A. niger* 休眠型遺伝子の覚醒による新規天然物の発見 A)休眠型生合成遺伝子 *pyn* クラスター、B) 転写因子 *pynR* 強制発現株と野生株における代謝産物解析、C) *pynR* 強制発現株から得られた 11 種の新規化合物の化学構造

その複雑な化学構造が生み出されている。このように、天然物生合成は酵素によって緻密に制御されており、すなわち、それをコードする遺伝子は天然物の設計図と捉えることができる。我々の研究対象はその生合成産物が予測不可能な遺伝子であり、なおかつ休眠型の遺伝子である。そこでバイオインフォマティクス解析、RT-PCR 法による発現解析をもとに、上記の条件を満たす生合成遺伝子を探索した。

ii. 休眠型生合成遺伝子クラスターの覚醒

上記の方法により選び出した HPN 酵素遺伝子 *pynA* はその近傍にメチル基転移酵素、酸化酵素、転写因子など天然物生合成に関与すると推定される酵素遺伝子を有していた(図 1. A)。特に転写因子 *pynR* については、その近傍の生合成遺伝子クラスターの転写を正に制御する例が知られており、本クラスターにおいても同様の機能が推測された。そこで、*pynR* のプロモーター領域をスターチ存在下にて強制発現可能な *glaA* プロモーターへと置換させた変異体を作成した。続いてスターチを含有した改変 CD 培地にて振盪培養を行ったところ、その培養液は黄色を呈し、LC/MS にて解析したところ新規物質と考えられる複数の代謝産物の生産が認められた(図 1. B)。

iii. 休眠型遺伝子クラスターの覚醒により得られた代謝産物の構造解析

得られた形質転換体を大量培養し、その酢酸エチル抽出物について各種クロマトグラフィーにて精製することで新規天然物 pyranonigrin E (1) の獲得に成功した。その他にも、エキソメチレン部分が還元された pyranonigrin G (6)、1 や 6 のそれぞれの側鎖脂肪鎖部分が異なる位置で酸化を受けた 2-5 および 7-10、ならびに 1 が二量化して形成されたと考えられるシクロブタン構造を有する pyranonigrin F (11) の生産を確認し、その化学構造を決定した(図 1. C)。この他にも数多くの類縁体、例えば 1 の三量体のような化合物の存在を示すデータが得られている。

iv. pyranonigrin 類の生合成経路解明

続いてこれら pyranonigrin 類の生合成経路の解明を目指し研究を展開した。特に γ -ピロン環やエキソメチレン構造が如何にして形成されるのか、また 1 の多量化の機構については興味が持たれた。まず、各修飾酵素遺伝子の機能を推定するため、生合成遺伝子破壊株を作成し、その代謝産物を解析した。続いて各修飾酵素の機能を証明するため、組み換えタンパク質を用いた *in vitro* 反応系、あるいは出芽酵母や他種糸状菌を異種発現宿主として利用した *in vivo* 反応系を利用して解析を行った³。詳細については本発表にて述べるが、(1)PKS-NRPS hybrid と stand-alone 型 thioesterase によるテトラミン酸骨格形成、(2) フラビン酵素と P450 の連続的反応による γ -ピロン環形成、(3) プロテアーゼ様酵素によるエキソメチレン構造の形成、(4) 酸化酵素、還元酵素による 1 と 6 の相互変換、など既存の天然物生合成には見られない、特殊な変換反応により 1 が生成されていることを明らかにした。

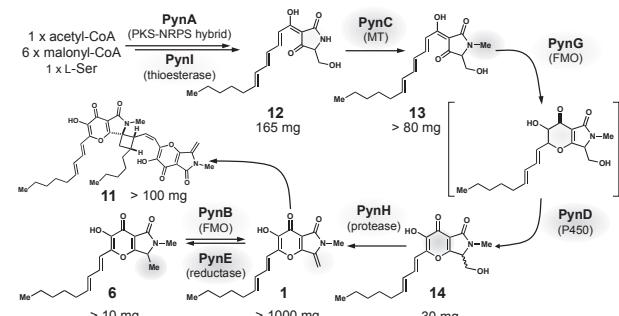


図 2. Pyranonigrin 類生合成経路

参考文献

- [1]. Y.-M. Chiang *et al.* *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2011**, 15, 137.
- [2]. R. H. Cichewicz *et al.* *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **2009**, 36, 1199.
- [3]. T. Yamamoto *et al.* *Org. Lett.* **2015**, 17, 4992.

 **memo** 

 **memo** 

第 68 回 日本生物工学会大会トピックス集

発行日 2016 年 8 月 25 日

発 行 公益社団法人 日本生物工学会
〒565-0871 吹田市山田丘2番1号
大阪大学工学部内 (C3-433)
TEL : 06(6876)2731 FAX : 06(6879)2034
E-mail : info@sbj.or.jp

編 集 第 68 回日本生物工学会大会実行委員会
