第70回（平成30年）
日本生物工学会大会

トピックス集

会　期　2018年9月5日（水）～7日（金）

会　場　関西大学　千里山キャンパス

公益社団法人 日本生物工学会

第 70 回日本生物工学会大会　トピックス集　目次

2018 年度　受賞者一覧 …… p. 5

＜トピックス要旨　（一般講演番号/一般講演タイトル/講演者/所属）＞

【脂質工学／食品科学，食品工学】

1Cp12　C 会場　第 1 日　15:54　（第 4 学舎 3 号館 2 階）…… p. 7
In vitro 培養系ヒト腸内細菌叢モデルによる潰瘍性大腸炎患者の代謝プロファイル異常の検出
○佐々木 建吾[1], 井上 潤[2], 星 奈美子[2], 佐々木 大介[1], 福田 伊津子[3], 近藤 昭彦[1], 大澤 朗[3]
([1]神戸大院・科技イノベ, [2]神戸大院・医, [3]神戸大院・農)

【抗体工学】

1Dp01　D 会場　第 1 日　13:30　（第 4 学舎 3 号館 1 階）…… p. 9
N 末端 SKIK ペプチドによるモノクローナル抗体生産量増大と機構解明
○加藤 晃代[1,3], 田村 廣人[2], 中野 秀雄[1,3]
([1]iBody(株), [2]名城大院・農, [3]名大院・生命農学)

【ペプチド工学／核酸工学／植物細胞工学，組織培養，育種工学】

1Ep04　E 会場　第 1 日　14:06　（第 4 学舎 2 号館 1 階）…… p. 11
多孔性シリカゲルを用いた機能性ペプチドの腸デリバリーに適したペプチドの in silico 設計と評価
○今井 健人[1], 清水 一憲[1], 上村 光浩[2], 小川 光輝[2], 本多 裕之[1,3]
([1]名大院・工, [2]富士シリシア化学, [3]名大院・予防早期医療創成セ)

1Ep11　E 会場　第 1 日　15:42　（第 4 学舎 2 号館 1 階）…… p. 13
UV-B LED 照射によるポリフェノールの増産
○鶴本 智大[1], 藤川 康夫[1], 泉田 智史[2], 三島 俊介[3], 太田 大策[4], 岡澤 敦司[4]
([1]日亜化学工業, [2]ヒューマンチップス, [3]大塚電子, [4]阪府大院・生環科)

【生物化学工学／培養工学／バイオプロセス】

1Fp05　F 会場　第 1 日　14:18　（第 4 学舎 2 号館 1 階）…… p. 15
海洋珪藻 *Fistulifera solaris* の代謝改変による高付加価値脂肪酸の効率的生産
○嶋田 礼迪[1], 松本 光史[2], 野島 大佑[1], 前田 義昌[1], 吉野 知子[1], 田中 剛[1]
([1]農工大院・工, [2]電源開発)

2Ep11　E 会場　第 2 日　16:18　（第 4 学舎 2 号館 1 階）…… p. 17
抗菌素材“PGAIC”の生成機構分析とオンサイトコーティングへの応用
○白米 優一[1], 中山 沢水[2], 東内 遥菜[2], 芦内 誠[1,2]
([1]愛媛大院・連合農, [2]高知大・農)

2Fa05　F 会場　第 2 日　9:48　（第 4 学舎 2 号館 1 階）…… p.19
麹菌 *Aspergillus oryzae* の液体培養における菌糸完全分散株の作製とその酵素生産への応用
○宮澤 拳[1], 吉見 啓[2], 古明地 敬介[1], 田畑 風華[1], 佐野 元昭[3], 阿部 敬悦[1,2]
([1]東北大院・農, [2]東北大・未来研, [3]金工大・ゲノム研)
([1]筑波大院・生命環境, [2]フタムラ化学)

2Fp11　F 会場　第 2 日　16:18　（第 4 学舎 2 号館 1 階） …… p. 21
pH 変動培養法を活用した耐酸性微生物や好酸性微生物の高効率なスクリーニング系の開発
○高野 力[1], 村山 晃一[2], 青柳 秀紀[1]

3Ea01　E 会場　第 3 日　9:00　（第 4 学舎 2 号館 1 階） …… p. 23
抗菌性物質が皮膚常在菌の生理活性に及ぼす影響の解析
○菊田 実花, 青柳 秀紀
（筑波大院・生命環境）

【遺伝子工学】

1Gp16　G 会場　第 1 日　16:54　（第 4 学舎 2 号館 2 階） …… p. 25
環状 RNA を用いた miRNA とその前駆体の阻害
○地白 和樹, 立花 亮
（阪市大院・工）

2Ga03　G 会場　第 2 日　9:24　（第 4 学舎 2 号館 2 階） …… p.27
ナノポアシーケンサを用いた遺伝子組換え麹菌ゲノム上の長鎖タンデムリピート構造の解析
○若井 暁[1], 荻野 千秋[2], 堤 浩子[3], 秦 洋二[3], 近藤 昭彦[1]
（[1]神戸大院・科技イノベ, [2]神戸大院・工, [3]月桂冠・総研）

【バイオマス，資源，エネルギー工学】

1Hp09　H 会場　第 1 日　15:18　（第 4 学舎 2 号館 2 階） …… p. 29
生きた植物からの非破壊糖取出し方法の検討
○米倉 円佳[1], 青木 直大[2], 廣瀬 竜郎[3], 近藤 聡[1], 大音 徳[4]
（[1]トヨタ自動車・アグリバイオ事業部, [2]東大院・農生科, [3]農研機構・中央農研, [4]トヨタ自動車・T-フロンティア部）

2Ha06　H 会場　第 2 日　10:00　（第 4 学舎 2 号館 2 階） …… p. 31
廃菌床由来バイオエタノールの発酵生産
○小林 洋介[1], 藤森 一浩[2], 西島 拓人[1], 杉本 直久[1], 藤野 尚人[1], 今井 史規[3],
金松 雅俊[3], 山田 憲治[3], 荒井 進[3], 吉田 浩爾[1], 佐賀 清崇[1], 泉 可也[1]
（[1]Biomaterial in Tokyo, [2]産総研・生物プロセス, [3]三友プラントサービス）

3Ga02　G 会場　第 3 日　9:12　（第 4 学舎 2 号館 2 階） …… p. 33
発酵(*R*)-3-ヒドロキシ酪酸と α-ヒドロキシ酸の共重合体の化学合成と生分解
○常盤 豊[1,4], 中山 敦好[1], 川崎 典起[1], 山野 尚子[1], 伊田 小百合[1], 楽 隆生[2], 世嘉良 宏斗[3]
（[1]産総研, [2]甲南化工, [3]沖縄県工技セ, [4]トロピカルテクノプラス）

【発酵生理学，発酵工学/代謝工学/オミクス解析】

1Jp04　J 会場　第 1 日　14:06　（第 4 学舎 2 号館 3 階） …… p. 35
Target-AID を利用したゲノム編集による高収率ブタノール発酵性クロストリジウム属微生物の育種
○向山 正治[1], 市毛 栄太[1], 田中 勉[2], 西田 敬二[3], 近藤 昭彦[3]
（[1]日本触媒, [2]神戸大院・工, [3]神戸大院・科技イノベ）

1Jp11　J 会場　第 1 日　15:42　（第 4 学舎 2 号館 3 階） …… p.37
大腸菌による L-theanine の発酵生産法の開発
○大野 翔登, 林 幹朗, 田畑 和彦
（協和発酵バイオ・リサーチ&イノベーションセンター）

1Kp10　K 会場　第 1 日　15:30　（第 4 学舎 2 号館 3 階） …… p. 39
乳酸高生産性黄麹菌における乳酸生産フラックス強化による乳酸生産性の向上
○張 斯来[1], 若井 暁[1], 荻野 千秋[2], 堤 浩子[3], 秦 洋二[3], 近藤 昭彦[1]
（[1]神戸大院・科技イノベ, [2]神戸大院・工, [3]月桂冠・総研）

2Jp07　J 会場　第 2 日　15:30　（第 4 学舎 2 号館 3 階） …… p. 41
スクロースを糖源とした乳酸菌培養による乳酸生産抑制
○佐野 杏奈[1], 河合 美桜[1], 土屋 麻美[2], 依田 伸生[2], 山崎 思乃[3], 片倉 啓雄[3]
（[1]関西大院・理工, [2](株) 明治, [3]関西大・化生工・生命生工）

2Ka02　K 会場　第 2 日　9:12　（第 4 学舎 2 号館 3 階） …… p. 43
糖からの直接発酵を目指したエルゴチオネイン高生産放線菌の開発
○仲谷 豪, 嘉悦 佳子, 仲島 菜々実, 山田 佑樹, 野口 祐司, 曽田 匡洋, 劉 暁麗
（長瀬産業）

【バイオセンシング, 分析化学／センサー, 計測工学】

1Lp01　L 会場　第 1 日　13:30　（第 4 学舎 2 号館 3 階） …… p. 45
金ナノ粒子―量子ドットのプラズモン共鳴現象を用いたノロウイルス RNA 検出法
○森田 真広[1], Jaewook Lee[2], Oluwasesan Adegoke[2], 朴 龍洙[1,2]
（[1]静大院・総科研・農, [2]静大・グリーン科技研）

【酵素学, 酵素工学】

1Mp02　M 会場　第 1 日　13:42　（第 4 学舎 2 号館 3 階） …… p. 47
***Streptomyces* sp. NT1 株由来 L-グルタミン酸オキシダーゼのフルコンセンサス設計による耐熱性の向上**
○齋藤 貴広[1], 久保田 瞳[1], 林 優花[2], 中野 祥吾[3], 伊藤 創平[3], 浅野 泰久[4], 酒瀬川 信一[5], 杉森 大助[1,2]
（[1]福島大・共生システム理工, [2]福島大院・理工, [3]静県大・食栄, [4]富山県大・生工研セ, [5]旭化成ファーマ）

1Mp10　M 会場　第 1 日　15:30　（第 4 学舎 2 号館 3 階） …… p. 49
シトクロム P450BM3 と酵素活性化分子を利用した大腸菌内でのベンゼンの直接酸化
○唐澤 昌之[1], 柳澤 颯太[1], 荘司 長三[1,2], 渡辺 芳人[3]
（[1]名大院・理, [2]JST CREST, [3]名大・物国セ）

1Mp14　M 会場　第 1 日　16:30　（第 4 学舎 2 号館 3 階） …… p.51
光化学系 II 再構成メタンモノオキシゲナーゼ膜画分を用いたメタン酸化反応
近藤 龍一, 森 史也, 伊藤 栄紘, ○蒲池 利章
（東工大院・生命理工）

【生体医用工学／セル&ティッシュエンジニアリング】

1Op15　O 会場　第 1 日　16:42　（第 4 学舎 2 号館 4 階） …… p. 53

毛包を有する皮膚組織の作製

○楯 芳樹, 景山 達斗, 福田 淳二

（横国大院・工）

【醸造学, 醸造工学】

2Da07　D 会場　第 2 日　10:24　（第 4 学舎 3 号館 1 階） …… p. 55

ハイビスカス花から採取した酵母の特性と泡盛醸造への応用

○阿部 峻之[1], 渡辺 大輔[2], 高木 博史[2], 塚原 正俊[1]

([1]バイオジェット, [2]奈良先端大・バイオ)

2Da11　D 会場　第 2 日　11:12　（第 4 学舎 3 号館 1 階） …… p. 57

***Saccharomyces arboricola* と醸造酵母の交配株の作成とその醸造特性の解析**

○山本 裕貴[1], 藤丸 裕貴[1], ワイナンス マシュー[2], 五島 徹也[3], 赤尾 健[3], 北垣 浩志[1]

([1]佐賀大・農, [2]ウエストバージニア大学・生科, [3]酒総研)

【タンパク質工学】

2Ia11　I 会場　第 2 日　11:12　（第 4 学舎 2 号館 3 階） …… p. 59

AI はタンパク質進化を導くか?:機械学習支援による GFP の YFP 化検証

○及川 未早来[1], 齋藤 裕[2], 亀田 倫[2], 中澤 光[1], 二井手 哲平[1], 津田 宏治[3,4], 梅津 光央[1,4]

([1]東北大院・工, [2]産総研・人工知能研究セ, [3]東大院・新領域, [4]理研・革新知能統合研究セ)

【糖鎖工学／生合成, 天然物化学】

2La03　L 会場　第 2 日　9:24　（第 4 学舎 2 号館 3 階） …… p. 61

黄ニラ抽出物が示す赤血球凝集素の阻害効果と阻害物質の単離

○大西 優[1], 中島 凌[2], Eltigani Sara[3], 鈴木 菜月[2], 美藤 友博[2], 清水 克彦[4], 畑中 唯史[5], 有馬 二朗[2]

([1]鳥取大院・農, [2]鳥取大・農, [3]鳥取大院・連農, [4]鳥取大・CoRE, [5]岡山県生科総研)

【タンパク質工学／生体情報工学, バイオインフォマティクス／システムバイオロジー】

2Ip10　I 会場　第 2 日　16:06　（第 4 学舎 2 号館 3 階） …… p. 63

代謝情報基盤整備のための多様な微生物資源の活用の可能性

○寺尾 拓馬[1], 細山 哲[1], 土金 恵子[1], 宮澤 せいは[1], 鋤先 まゆ子[1], 白井 智量[2], 川﨑 浩子[1]

([1]NITE・NBRC, [2]理研・CSRS)

日本生物工学会　2018 年度　受賞者一覧　（講演番号，受賞講演日時，会場）

■第 37 回　生物工学賞　**A1Aa02　第 1 日　10:05　A 会場 (第 2 学舎 4 号館 1 階)**
浅野 泰久（富山県立大学工学部・教授）
「微生物から動植物へと展開する酵素利用技術とその基盤開拓」

■第 12 回　生物工学功績賞　**A1Aa03　第 1 日　10:40　A 会場 (第 2 学舎 4 号館 1 階)**
清水 浩（大阪大学大学院情報科学研究科・教授）
「計算機工学に基づく代謝設計とその有効性の実証に関する研究」

■第 12 回　生物工学功労賞　**A1Aa01　第 1 日　9:55　A 会場 (第 2 学舎 4 号館 1 階)**
滝澤 昇（岡山理科大学工学部・教授）
「生物工学および関連分野の JABEE 認定審査への多大な貢献」[a]

■第 51 回　生物工学奨励賞（江田賞）　**A2Cp01　第 2 日　13:30　C 会場 (第 4 学舎 3 号館 2 階)**
浅野 静（アサヒビール(株)酒類技術研究所・主任研究員）
「ビール醸造における微生物検査法の迅速化に関する研究」

■第 54 回　生物工学奨励賞（斎藤賞）　**A2Mp01　第 2 日　13:30　M 会場 (第 4 学舎 2 号館 3 階)**
本田 孝祐（大阪大学大学院工学研究科・准教授）
「好熱性酵素を用いた細胞外人工代謝経路の構築と利用に関する先駆的研究」

■第 41 回　生物工学奨励賞（照井賞）　**A2Fp01　第 2 日　13:30　F 会場 (第 4 学舎 2 号館 1 階)**
井藤 彰（九州大学大学院工学研究院・准教授）
「機能性磁性ナノ粒子の開発と医療技術への応用に関する生物工学的研究」

■第 27 回　生物工学技術賞　**A1Aa04　第 1 日　11:10　A 会場 (第 2 学舎 4 号館 1 階)**
佐藤 俊輔[1]・有川 尚志[1]・小林 新吾[1]・藤木 哲也[1]・松本 圭司[2]（[1](株)カネカ・[2]大阪大学大学院工学研究科）
「微生物による生分解性ポリマー PHBH 製造法の開発」

■第 15 回　生物工学アジア若手賞　**A2Hp01　第 2 日　13:30　H 会場 (第 4 学舎 2 号館 2 階)**
(Young Asian Biotechnologist Prize)
Verawat Champreda (Director, National Center for Genetic Engineering and Biotechnology (BIOTEC), Thailand)
「Exploration of lignocellulose degrading enzymes from hidden bioresource for biorefinery and green industries」

■第 7 回　生物工学アジア若手研究奨励賞 (The DaSilva Award)[b]
Pau-Loke Show (Associate Professor, The University of Nottingham, Malaysia)
「Converting wastewater to bioenergy and bio-products using microalgae technology」

■第 26 回　生物工学論文賞[b]
1）和田 圭介[*]・戸谷 吉博・坂野 聡美[**]・吉川 勝徳[***]・松田 史生・清水 浩（大阪大学, [*]現, 産業技術総合研究所, [**]現, 神戸大学, [***]現, 積水化学）
「^{13}C-metabolic flux analysis for mevalonate-producing strain of *Escherichia coli*」
2）張 斯来[1*]・伴 暁彦[1**]・江原 直樹[1***]・水谷 治[2****]・田中 瑞己[1*****]・新谷 尚弘[1]・五味 勝也[1]（[1]東北大学, [2]酒類総合研究所, [*]現, 神戸大学, [**]現, 中外製薬, [***]現, 味の素, [****]現, 琉球大学, [*****]現, 静岡県立大学）
「Self-excising Cre/mutant *lox* marker recycling system for multiple gene integrations and consecutive gene deletions in *Aspergillus oryzae*」
3）青井 議輝[1]・金子 裕司[2*]・常田 聡[2]（[1]広島大学, [2]早稲田大学, [*]現, キリン株式会社）
「pH-gradient ion-exchange microbial cell chromatography as a simple method for microbial separation」
4）加藤 晃代[1,2*]・永井 里美[1*]・中野 秀雄[1]（[1]名古屋大学, [2]知の拠点あいち, [*]現, iBody 株式会社 / 名古屋大学）
「N-terminal SKIK peptide tag markedly improves expression of difficult-to-express proteins in *Escherichia coli* and *Saccharomyces cerevisiae*」
5）Le Gao[*]・秀瀬 涼太[**]・藤原 伸介（関西学院大学, [*]現, Changchun University of Science and Technology, [**]現, 神戸大学）
「Function of a thermophilic archaeal chaperonin is enhanced by electrostatic interactions with its targets」
6）藤谷 将也[1]・Noor Saika Huddin[2*]・河合 駿[1**]・蟹江 慧[1]・清田泰次郎[2]・清水 一憲[1]・本多 裕之[1]・加藤 竜司[1]（[1]名古屋大学, [2]株式会社ニコン, [*]現, Google Malaysia, [**]現, 大日本住友製薬株式会社）
「Morphology-based non-invasive quantitative prediction of the differentiation status of neural stem cells」
7）Suman C. Nath[*]・堀江 正信[**]・長森 英二[***]・紀ノ岡正博（大阪大学, [*]現, University of Calgary, [**]現, 京都大学, [***]現, 大阪工業大学）
「Size- and time-dependent growth properties of human induced pluripotent stem cells in the culture of single aggregate」

■第 7 回　生物工学学生優秀賞（飛翔賞）
1）上原 千央　**1Ka10　第 2 日　11:00　K 会場 (第 4 学舎 2 号館 3 階)**
（東北大学大学院工学研究科バイオ工学専攻 ）
「酵母のストレス応答に関わる陽イオン輸送体の機能解析」
2）小川 雅人　**3Ia06　第 3 日　9:24　I 会場 (第 4 学舎 2 号館 3 階)**
（早稲田大学大学院先進理工学研究科生命医科学専攻）
「網羅的シングルセルゲノム解析フローの構築に向けた高精度シングルセルゲノム解析ツールの開発」[a]
3）竹村 謙信　**1Lp05　第 1 日　14:18　L 会場 (第 4 学舎 2 号館 3 階)**
（静岡大学大学院自然科学系教育部バイオサイエンス専攻）
「金ナノ粒子-量子ドット間で誘起される局在表面プラズモン共鳴効果による迅速・高感度ウイルス検出に関する研究」[a]
4）上野 大心　**1Ep16　第 1 日　16:54　E 会場 (第 4 学舎 2 号館 1 階)**
（奈良先端科学技術大学院大学先端科学技術研究科バイオサイエンス領域）
「mRNA の内部切断に関わる配列的特徴の解明」
5）堀 采音　**1Dp12　第 1 日　15:54　D 会場 (第 4 学舎 3 号館 1 階)**
（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）
「免疫グロブリン製剤による新たな免疫抑制作用の発見と次世代抗体医薬設計への応用」[a]
6）眞榮田麻友美　**3Ca06　第 3 日　9:48　C 会場 (第 4 学舎 3 号館 2 階)**
（琉球大学大学院農学研究科亜熱帯農学専攻, 現, 鹿児島大学）
「黒麹菌 *Aspergillus luchuensis* 由来フェノール酸脱炭酸酵素に関する研究」[a]

注) a：受賞課題名と本大会での講演題名は異なります.　b：本大会での受賞講演はありません.

In vitro 培養系ヒト腸内細菌叢モデルによる 潰瘍性大腸炎患者の代謝プロファイル異常の検出

佐々木　建吾[1*]・井上　潤[2]・星　奈美子[2]・佐々木　大介[1]・福田　伊津子[3]・近藤　昭彦[1]・大澤　朗[3]
[1]神戸大学大学院科学技術イノベーション研究科
[2]神戸大学大学院医学研究科内科学講座消化器内科学分野
[3]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　電話: 078-803-6462
Fax: 078-803-6462　E-mail: sikengo@people.kobe-u.ac.jp

潰瘍性大腸炎は大腸の粘膜に炎症ができる病気であり、欧米のみならず日本でも患者数が増加してきているが、根治的治療法は確立されていない。発症には環境要因や遺伝的要因が関わっているとされているが、腸内細菌叢の乱れが関連している事が近年、注目されてきている。一方、腸内細菌叢に関する評価は動物給餌試験やヒト介入試験による *in vivo* 系で行われてきたが、コストや倫理的制限の問題点が存在する。しかし、*in vitro* 系による潰瘍性大腸炎患者の代謝プロファイルの再現は困難とされていた。そこで、本研究では *in vitro* 培養系ヒト腸内細菌叢モデル(Kobe University Human Intestinal Microbiota Model [KUHIMM])にて潰瘍性大腸炎患者の腸内細菌叢を模した上でその代謝プロファイルについて検証する事を目的とした。

1. はじめに

ヒト腸管中には多大な細菌が存在しており、大腸では 10^{11}-10^{12} cells/g-大腸に達している。腸管上皮細胞は体内と外界を隔てているだけでなく、腸内共生菌の中でも病原菌・ウイルスに対して免疫応答を誘導して恒常性を維持している。遺伝的要因あるいは環境要因により、腸内細菌叢に乱れが生じて宿主とのバランスが崩れると、腸管に炎症が引き起こされる。潰瘍性大腸炎（Ulcerative colitis : UC）は、炎症性腸疾患の一つであり大腸に限定されて炎症反応が過剰に進行する疾患であり、その発症メカニズムは不明であり根治的治療法は確立されていない。

現在までに *in vitro* 系による UC 患者の代謝プロファイルの再現は困難であった。我々は KUHIMM を構築して、1000 種に及ぶ細菌種の保持や臨床検体（ヒト糞便）中の酢酸・プロピオン酸・酪酸の組成すなわち代謝プロファイルの近似を可能とし、既知のプレバイオティクスへの *Bifidobacterium* 属の応答を評価できる事を報告している [1,2]。本研究では UC 患者の代謝プロファイルを検証する事を目的とした。

2. 解析データおよび方法

(1) 臨床検体の準備と KUHIMM の運転

13 人の健常人ボランティアおよぶ 13 人の潰瘍性大腸炎ボランティアより、臨床検体の提供を受けた。

KUHIMM の運転には 8 連培養装置（Bio Jr. 8; ABLE, 東京）を使用した。運転条件については過去の知見を参照した [3]。

(2) 微生物 DNA の抽出とメタ 16S 解析

臨床検体および発酵液中より DNA 抽出を行った。すなわち、サンプルをフェノール・ドデシル硫酸ナトリウム（SDS）と混合し、ガラスビーズを使用した物理的破砕により抽出した。クリーンアップ後に、DNA は TE buffer に溶出した。

細菌の 16S rRNA 遺伝子 V3-V4 領域を標的としたプライマーを使用して、PCR 増幅した。PCR 産物は MiSeq シークエンサ（Illumina）に供して配列を得た。配列は QIIME version 1.9.1 により解析した。

KUHIMM 中の低級脂肪酸濃度は高速液体クロマトグラフに Aminex HPX-87H column を設置して検出した。

3. 結果と考察

(1) UC 患者における異常な腸内細菌叢の再現

メタ 16S 解析を行った結果、健常人および UC 患者ともに細菌種数は臨床検体中のものが KUHIMM 発酵液中に再現されており、α 多様性（細菌の多様性の指数）も再現されていた。一方、臨床検体における種数や α 多様性について、健常人と UC 患者で有意な差は認められず、この傾向は KUHIMM 発酵液中でも同様であった。全菌量も健常人と患者で有意な差は認められない。

ただし、臨床検体中において、細菌叢の構成は健常人と UC 患者で異なっていた。この腸内細菌叢の違いは、KUHIMM 中に再現されていた。DNA 配列の大部分は、Actinobacteria, Bacteroidetes, Firmicutes, Fusobacteria, Proteobacteria, Verrucomicrobia 門に属していた。科レベルで評価した結果、興味深い事に *Lachnospiraceae* 科に関連する菌の割合が健常人の臨床検体中に比べて UC 患者臨床検体中で減少しており、同様に KUHIMM 培養液中でも *Lachnospiraceae* 科に関連する菌の割合が UC 患者のもので減少していた（図 1）。過去の知見においても *Lachnospiraceae* 科の菌が UC 患者で減少する事が報告されており、我々の結果と一致している。

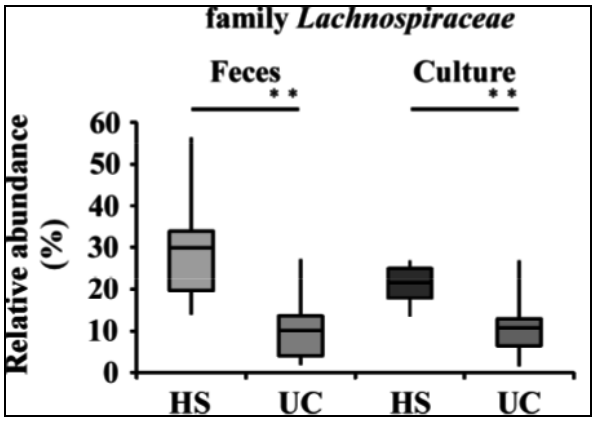


図 1. *Lachnospiraceae* 科の割合
HS: healthy subject。Feces: 臨床検体。Culture: KUHIMM 発酵液。**は統計的に有意な差がある事を示す（P<0.05）。

(2) UC 患者モデルにおける酪酸生成の減少

短鎖脂肪酸は腸内細菌叢と宿主の健康を左右するシグナル物質となる。そのため、KUHIMM 発酵液中における健常人と UC 患者の短鎖脂肪酸の生成を調べた。発酵 30 時間後には酢酸が主要な産物でありプロピオン酸・酪酸が主要な産物であった。興味深い事に KUHIMM 発酵液中において、酪酸生成が UC 患者のもので健常人と比べて有意に減少していた（図 2）。

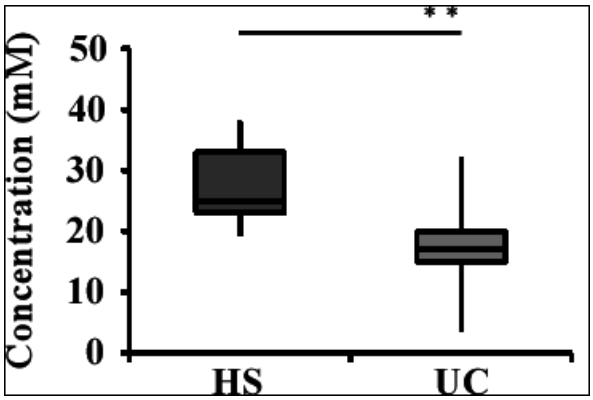


図 2. KUHIMM 発酵液中における酪酸生成
**は統計的に有意な差がある事を示す（P<0.05）。

Lachnospiraceae 科の菌は哺乳動物の腸管内において大部分を占めており、酪酸生成に重要な役割を果たしている。実際に KUHIMM において *Lachnospiraceae* 科の菌の割合と酪酸生成濃度には正の相関が認められた。

4. 今後の展望

本システム KUHIMM は UC 患者のヒト大腸細菌叢における種数や多様性を保持した世界初のモデルである。さらに、今までのシステム、多連式システムでは再現が不可能であった酪酸生成の減少を、KUHIMM は再現している。酪酸生成を実際のヒト腸管内で計測する事は困難である。また、酪酸は制御生 T 細胞の生成を誘導して炎症を抑制する事が知られている。KUHIMM は *Lachnospiraceae* 科の減少とそれに付随する酪酸生成の減少を再現できる系であり、UC 患者の腸内環境を迅速に評価できる系である。

UC の活動指数として Mayo score ないしは Partial mayo score が使用される。しかし、*Lachnospiraceae* 科の割合と活動指数に相関は認められず、本結果は UC 患者腸内に *Lachnospiraceae* 科が少ない状態が維持されているために再発するケースが多い事を突き止めた。今後はこれを是正する投与物を、KUHIMM を用いて探索・評価するつもりである。

参考文献

[1] Takagi R, *et al.*: Plos One, 11, e0160533 (2016)
[2] Sasaki D, *et al.*: Sci. Rep., 8, 435 (2018)
[3] Sasaki K, *et al.*: Plos One, 12, e0180991 (2017)

N 末端 SKIK ペプチドタグによる モノクローナル抗体生産量増大と機構解明

加藤　晃代 [1, 3]・田村　廣人 [2]・中野　秀雄 [1,3]
[1]iBody(株), [2]名城大・農, [3]名大院・生命農
〒464-0814　名古屋市千種区不老町 1 番　名古屋大学インキュベーション施設
電話: 052-753-8654／Fax: 052-753-8654／E-mail: kato.teruyo@ibody.co.jp

機能を有するタンパク質を低コストで簡便に生産することは、バイオインダストリーに欠かせない技術である。我々のグループでは、難発現タンパク質の N 末端に 4 アミノ酸から成る SKIK ペプチドタグ配列を付加することにより、微生物におけるタンパク質発現量を増大可能であることを見出し、応用技術の開発とメカニズム解明に取り組んできた。その結果、タグ付加により、1)大腸菌無細胞タンパク質合成系で活性型 IgG の生産量増大が可能であること 2) 小麦無細胞タンパク質合成系においてはタンパク質生産量に影響を与えないこと、3) 大腸菌無細胞タンパク質合成系では、転写ではなく翻訳効率を向上させていること、が明らかとなった。

1. はじめに

バイオインダストリーにおいて、タンパク質を微生物等により安価・簡単・大量に生産する技術は必要不可欠である。しかし、使用する発現系や目的タンパク質の種類によっては、発現量が少ない「難発現」な場合がある。その原因として、コドンバイアスや mRNA の二次構造などの可能性が囁かれているが未だ明確ではない。そのため、目的タンパク質の発現量が少ない場合は、コドン最適化、他のタンパク質と融合発現、培養条件や培地の最適化、シャペロン因子との共発現などの手間と時間のかかる検討を行い、少しでも発現量を上げるための条件を絞り込んでいくのが一般的である。

筆者らは、そのような難発現タンパク質の発現量を簡単に増大するための一つの手段として、N 末端 SKIK ペプチドタグを考案した[1]。本タグは Ser-Lys-Ile-Lys の 4 アミノ酸からなるペプチドであり、開始 Met に続く 2 番目のコドンが大腸菌のタンパク質発現量に影響することを報告する論文からヒントを得て設計したものである[2]。本ペプチドをコードする DNA 配列を目的遺伝子の開始コドン直後に挿入すると、大腸菌や酵母で難発現であったタンパク質の生産量が増大することが明らかとなった（図 1）。

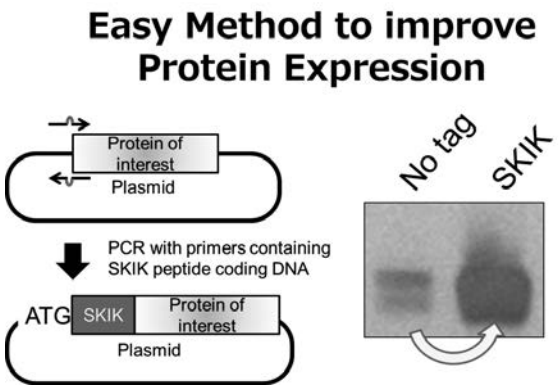


図 1. SKIK ペプチドタグの効果

これまでに、タグを付加することにより mRNA あたりの翻訳効率が向上し、タンパク質生産量増大に寄与している可能性を示す実験結果が得られている。

そこで、本研究においては、ライフサイエンス研究・産業で必須なツールであるモノクローナル抗体(mAb)を対象タンパク質遺伝子とし、大腸菌および植物発現系においてタグ付加がもたらす影響を調べた。

2. 解析データおよび方法

(1) 大腸菌無細胞タンパク質合成系および小麦胚芽無細胞タンパク質合成系による IgG の発現

マウス由来の抗大腸菌 O157 抗体遺伝子を用い、大腸菌および小麦胚芽の無細胞タンパク質合成系において、SKIK ペプチドタグ付加がタンパク質合成量および活性型抗体生産に与える影響を調べた。（図 2）。

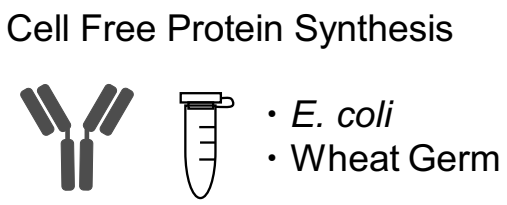


図 2. 本研究で使用したタンパク質合成系

(2) 転写と翻訳の解析

大腸菌無細胞タンパク質合成系において、転写および翻訳反応をそれぞれ独立して行い、SKIK ペプチドタグ有無が mRNA 合成およびタンパク質合成にそれぞれ与える影響を解析した。

3. 結果と考察

(1) IgG の生産

ペプチドタグの有無でマウス由来の IgG 遺伝子を大腸菌無細胞タンパク質合成系で発現させた。その結果、タグ無しでは発現量が少なく、ELISA による抗体活性が認められなかった。一方、タグを付加した IgG では優位に発現量が高く、結合活性を有していた。一方、小麦胚芽無細胞タンパク質合成系においては、タグの有無により、タンパク質合成量に変化が認められなかった。このことから、SKIK ペプチドタグは、小麦の発現系では、大腸菌において認められるタンパク質発現量増大効果をもたらさない可能性が示唆された。

(2) ペプチドタグが転写と翻訳に与える影響

SKIK ペプチドタグを付加したウサギ由来抗体遺伝子を鋳型とし、T7 RNA ポリメラーゼによる転写反応を行った。その結果、タグの有無に拘わらず、mRNA 合成量に大差はなかった（図 3A）。

一方、等量の mRNA を鋳型とし大腸菌無細胞翻訳系でタンパク質合成反応を行い Western Blotting で目的タンパク質を検出したところ、SKIK ペプチドタグ付加により、タンパク質合成量が増大していた（図 3B）。

このことから、タグの付加は、無細胞系においては転写効率には影響を与えず、翻訳効率を劇的に上昇させていることがわかった。

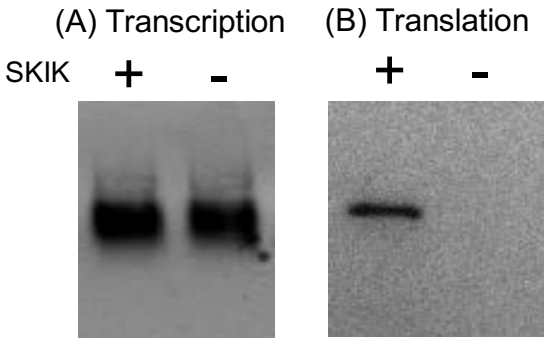


図 3. SKIK ペプチドタグの有無が転写･翻訳に与える影響の解析結果

(A) T7 RNA ポリメラーゼによる mRNA 合成量。アガロースゲル電気泳動後のエチジウムブロマイド染色結果を示す。

(B) 大腸菌無細胞翻訳系におけるタンパク質の合成量。SDS-PAGE 後の Western Blotting 結果を示す。

4. 今後の展望

抗体のみならず、機能のあるタンパク質を安価・簡単・大量に生産する技術は、バイオエコノミーの柱の一つでもあり、その重要性はますます高まっている。N 末端に 4 アミノ酸からなるペプチドを付加するのみでタンパク質発現量を増大可能な本技術は、安価かつ簡単であることが魅力であると考えている。1) 全ての難発現タンパク質において効果があるか、2) タンパク質発現量が増えてもそれが活性型か、は不明であり重要な課題ではあるが、困ったときに手軽に試せる一つの手段として、利用が広がることを期待したい。

今後、様々な発現系での効果や、タグ付加によるタンパク質発現量増大のメカニズムを解明することにより、欲しいタンパク質を自由自在に発現できる技術構築に貢献したいと考えている。

参考文献

[1] Ojima-Kato *et al.*: J. Biosci. Bioeng., 125, 124-130 (2017)

[2] Bivona, L. *et al*., Protein Expr Purif., 74, 248 (2010)

多孔性シリカゲルを用いた機能性ペプチドの腸デリバリーに適したペプチドの *in silico* 設計と評価

今井　健人[1]・清水　一憲[1]・上村　光浩[2]・小川　光輝[2]・本多　裕之[1,3]*
[1]名古屋大学大学院工学研究科　生命分子工学専攻
[2]富士シリシア化学株式会社
[3]名古屋大学　予防早期医療創成センター
〒464-8603　名古屋市千種区不老町　電話: 052-789-3215
Fax: 052-789-3214　*E-mail: honda@chembio.nagoya-u.ac.jp

健康長寿に資する「機能性ペプチド」は機能性食品等の有効成分として注目され、最もよく研究されている生理活性物質のひとつである。しかし、経口摂取したペプチドは消化酵素によって容易に分解されてしまうため、効率よく腸まで届けることが難しい。我々はこれまでに、食品添加物として認可されている多孔性シリカゲルを担体としたペプチド腸デリバリー手法を開発してきた。当該手法ではペプチドの物理化学的な性質を利用しており、特に疎水性かつ負電荷性のペプチドを効率よく腸デリバリーできる。本研究では、当該手法の実用化を目指し、既存の機能性ペプチドの機能性を保持したまま、デリバリーに適した物理化学的特性を付与するためのペプチドの *in silico* 設計と評価を行った。その結果、機能性ペプチドの活性を全く落とすこと無く、腸デリバリー量を飛躍的に向上させることに成功した。本研究で用いた *in silico* 設計指針は、他の機能性ペプチドにも適用可能であるため、これまで実現不可能だった長残基機能性ペプチドを有効成分とした機能性食品の開発に非常に有用であると期待される。

1.　はじめに

健康長寿に資する「機能性ペプチド」は、健康食品や機能性食品の有効成分として注目されており、最もよく研究されている生理活性物質である [1]。しかし、機能性ペプチドは、そのまま経口摂取すると胃の消化酵素によって容易に分解され、腸まで機能性を保持したまま届けることができないという問題がある。この問題を解決するため、これまでに我々は「多孔性シリカゲル」を用いて、ペプチドの分解を抑制しながら腸デリバリーできる方法の開発 (図 1) に成功している。これは、シリカゲルにペプチドなどの小分子は入ることができるが、消化酵素などの高分子は入ることができない細孔を作製できることに基づいており、この方法でペプチドを酵素による分解から守ることができる。また、この方法では疎水性かつ負電荷性のペプチドを、特に効率よく腸デリバリーできることも見出している [2]。そこで今回、この担体の実用化を考え、機能性ペプチドに、機能性を保持したまま、腸輸送特性を付与させる検討を進めた。今回はその検討結果を報告する。

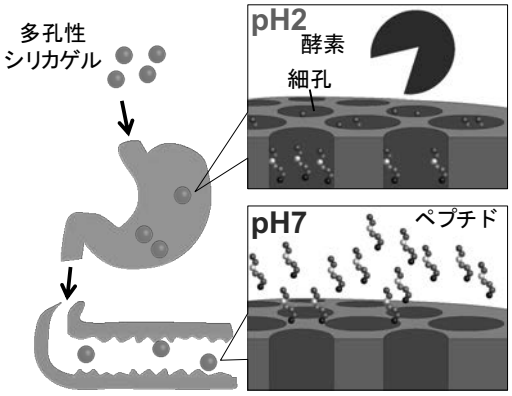


図 1. 本研究の概念図

2.　解析データおよび方法

今回モデルとして、胆汁酸結合ペプチドを用いた。胆汁酸結合活性が高いペプチドは、腸管内で胆汁酸ミセルを崩壊させ、コレステロールの吸収抑制が期待される。これまでに我々は 11 種類の胆汁酸高結合ペプチドを取得している [3, 4]。これらをベースに残基置換を行い、胆汁酸結合活性を保持しつつ、高い腸輸送特性

を付与しようと考えた。そこで、これらのペプチドの全一残基置換配列1265種類を候補ペプチドとして選抜した。次に *in silico* でこれらの候補ペプチドをマップ上にプロットし、我々が前報で定義した腸輸送特性値が20以上の領域にプロットされた配列を最終候補ペプチドとした。最後に、選抜方法の妥当性を検証するために、選抜されたペプチドをペプチドアレイで合成し、胆汁酸結合活性と、腸輸送特性値を *in vitro* で評価した。また胆汁酸ミセル溶液とペプチドを混合し、ミセルの崩壊活性も評価した [5]。

3. 結果と考察

(1) ペプチドの *in silico* スクリーニング

In silico 選抜によって、1265種類の候補ペプチドから78種類が最終候補ペプチドとして選抜された (図2)。

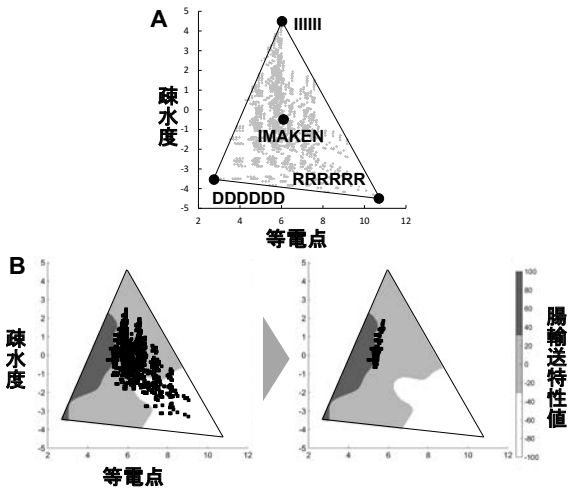


図2. ペプチドのスクリーニングスキーム
(A) 6残基ペプチドの網羅マップ
ペプチドは等電点と疎水度の 2 指標で整理すると図のような三角形の内部に全てまとめることができる
(B) ペプチドのスクリーニング結果
■1つ1つは候補ペプチドを示す

(2) ペプチドの *in vitro* 評価

これらのペプチドを、ペプチドアレイを用いて合成し、胆汁酸結合活性と腸輸送特性値を *in vitro* で評価した。その結果、78 種類中 6 種類が既報 [3]の胆汁酸高結合ペプチド VAWWMY とほぼ同等の胆汁酸結合活性を示した。また、そのうちの 5 種類は腸輸送特性値をVAWWMYの1.5倍以上に向上させられていることが示された (図3 A)。最後に、これらのペプチドと胆汁酸ミセル溶液を混合し、ミセルの崩壊活性を評価した。その結果、5種類すべてのペプチドでミセル崩壊活性が確認された (図3 B)。また5種類の中でもIYWEMYは特に強力なミセル崩壊活性を保持していることも明らかになった。

A

配列	胆汁酸結合活性	腸輸送特性値
PYWFDM	1.14	1.56
PYWFEM	1.11	2.25
MPFFFS	1.06	0.32
IYEYMY	0.97	4.90
DPFYFS	0.94	2.77
IYWEMY	0.94	3.32
VAWWMY	1.00	1.00

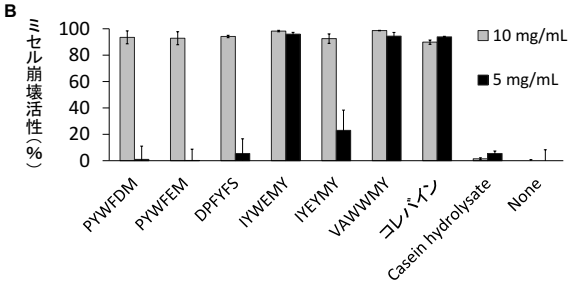


図3. ペプチドの *in vitro* 評価の結果
(A) ペプチドの胆汁酸結合活性と腸輸送特性値
(B) ペプチドの胆汁酸ミセル崩壊活性

4. 今後の展望

今回の結果から、機能性ペプチドの機能を保持したまま、腸輸送特性を向上させられる設計指針を作成することに成功した。また、この方法は胆汁酸結合ペプチド以外の機能性ペプチドにも適応可能である。

今後は、より実用化に向けた設計プログラムの改良を行う予定である。機能性ペプチドを食品応用する場合、食品タンパク質を加水分解して取得する。そのため設計したペプチド配列が天然の貯蔵タンパク質中などに存在しなければ、実際に機能性食品として利用することは難しい。そこで、今回開発した設計指針に、天然タンパク質のデータベース情報を加味した新たなプログラムの開発を行うことで、より実用的なスクリーニングプログラムの開発を目指していく予定である。

謝辞

本研究の一部は、JSPS 科研費基盤研究 B (16H04575)、および公益財団法人 科学技術交流財団 (17J6401b)の助成で実施した。

参考文献

[1] Agyei D, *et al.*: Food Bioprod. Process., 98, 244-256 (2016)
[2] 特願 PCT/JP2018/017676
[3] 特開 2010-222300
[4] Takeshita T, *et al.*: J. Biosci. Bioeng., 112(1), 92-97 (2011)
[5] 長岡利他　大豆たん白質研究　13 (2010)

UV-B LED 照射によるポリフェノールの増産

鶴本 智大[1]，藤川 康夫[1]，泉田 智史[2]，三島 俊介[3]，太田 大策[4]，岡澤 敦司[4*]

[1]日亜化学工業株式会社　横浜技術センター，[2]ヒューマン・チップス有限会社
[3]大塚電子株式会社，[4]大阪府立大学大学院生命環境科学研究科　応用生命科学専攻
〒599-8531　堺市中区学園町 1-1　電話: 072-254-7341
Fax: 072-254-7341　E-mail: okazawa@plant.osakafu-u.ac.jp

植物由来のポリフェノールには機能性を有するものが多く，それらは機能性分子として市場のニーズが高い。ポリフェノールの一種であるアントシアニンは抗酸化作用を持つとともに，農作物の色づきとして，その品質や価値にも大きな影響を与える。植物中のアントシアニンの合成は UV-B (280-315 nm) によって誘導されることが知られている。本研究では，波長の異なる UV-B 発光ダイオード (LED) を用いることによって，シロイヌナズナのアントシアニン含量が 280 nm UV-B LED の短時間照射で波長特異的に増加することを明らかにした。トランスクリプトーム解析の結果から，この応答には UV-B 受容体シグナル伝達経路が関わっていることが確認され，さらに，これまで知られていないシグナル伝達因子の存在も示唆された。この 280 nm UV-LED 照射の効果はチャなどの実用植物でも確認されたことから，本研究の成果は，農作物の高品質，高付加価値化や，植物による物質生産の高効率化を簡便に可能にする技術として応用展開が期待される。

1. はじめに

本研究は，関西地域の光技術の発展と光ビジネスの創出を図る NPO 法人日本フォトニクス協議会関西支部（JPC 関西）で，特にアグリバイオ分野に特化したプロジェクトを推進するために設置されたアグリバイオフォトニクス産業化研究会（ABPI 研）で進められている課題の一つである。

紫外線の中でも UV-B として知られる光（280–315 nm）は，地表に届く太陽光の中では最も波長が短く高エネルギーであるため，生体分子と反応して DNA の損傷といったような悪影響を及ぼす。一方，骨密度の維持などに重要なビタミン D_3 の生合成には UV-B が必要であるなど，生物は UV-B をうまく利用することで陸上生活に適応進化してきたと考えられる。植物においても，ごくわずかな UV-B に対する生理応答が確認され，変異体のスクリーニングによって UVR8 と呼ばれる UV-B 受容体タンパク質の存在が明らかになった[1]。その後，UV-B 応答についてのメタボローム解析などによって，ポリフェノールの一種であるアントシアニンの生合成が UVR8 によって制御されていることが明らかにされた[2]。筆者らは ABPI 研にて，フォトニクス技術を植物の物質生産に応用するために議論を重ねており，日亜化学工業（株）が波長の異なる UV-B 発光ダイオード（LED）を準備可能であったことから，UV-B LED を用いた植物由来機能性化合物の生産研究に着手した。

2. 解析データおよび方法

(1) 波長の異なる UV-B LED がシロイヌナズナのアントシアニン含量に与える影響の解析

これまでの UV-B 応答についての研究は，波長域の広い UV-B ランプを用いて行ったものがほとんどあり，特にアントシアニンなどのポリフェノールの代謝に対する波長毎の影響についての解析事例はなかった。そこで，270, 280, 300, および, 310 nm にピーク波長をもつ LED を用いて（図 1），これらの光源がシロイヌナズナのアントシアニン含量に与える影響を調べた。なお，照射デバイスや電源の設計は，その性能評価も含め，プロジェクトのメンバーで独自に行った。

その結果，280 nm にピーク波長をもつ UV-LED の 15 分間の照射によって著しいアントシアニン含量の増加が確認された。興味深いことに，この効果は他の UV-LED の照射によっては得られず，UV-B の中でも 280 nm に特異的であることが示された（図 2）。

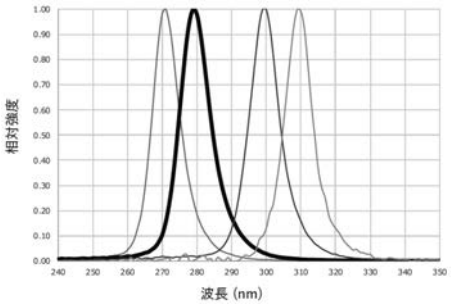


図1. 本研究で用いた UV-LED 光源のスペクトル

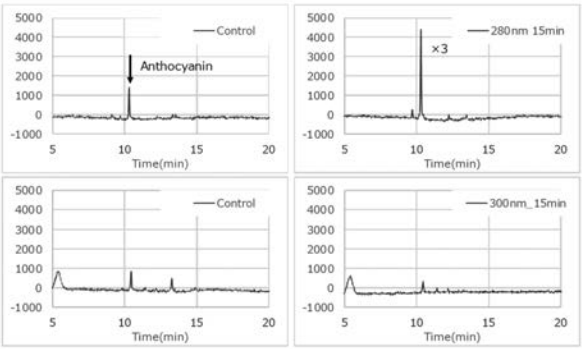


図2. 280 nm UV-LED 選択的なアントシアニン含量の増加
下段の 300 nm UV-LED 照射ではアントシアニン含量の
変化は見られなかった.

(2) 280 nm UV-LED 照射に対するシロイヌナズナの応答のトランスクリプトーム解析

波長の異なる UV-LED を用いることでシロイヌナズナのアントシアニン含量が 280 nm 特異的に増加することが明らかになったため，この際の遺伝子発現変動について RNA-Seq を用いて網羅的に解析した。

UV-B のシグナル伝達では, UV-B の照射によって生じる UVR8 のモノマーが COP1 ユビキチンリガーゼと結合することで, 転写因子 HY5 を活性化し, 下流の UV-B 応答性遺伝子の発現を誘導する。これらの遺伝子には，ポリフェノールの前駆体の合成に関わる PAL や CHS, フラボノイド，アントシアニンなどのポリフェノールの合成に関わる DFR や配糖体化酵素（UGT）などが含まれる（図 3)。

トランスクリプトーム解析の結果，280 nm UV-LED の照射によって，COP1, HY5, PAL, CHS, DFR, UGT などポリフェノールの生合成に関わる遺伝子の発現量がいずれも 2 倍以上増加することが改めて確認できた。一方，310 nm UV-LED の照射では COP1, HY5, PAL, CHS などの遺伝子発現は同様に誘導されていたものの，生合成の下流に位置するアントシアニンの合成に関わる遺伝子の発現は誘導されなかった。このことは，植物が UV-B に含まれる光においてもわずか 10–20 nm の波長の違いを感知しており, UV-B シグナル伝達経路には，これまでに知られていない 280 nm に特異的に応答する因子が存在することを示唆する。

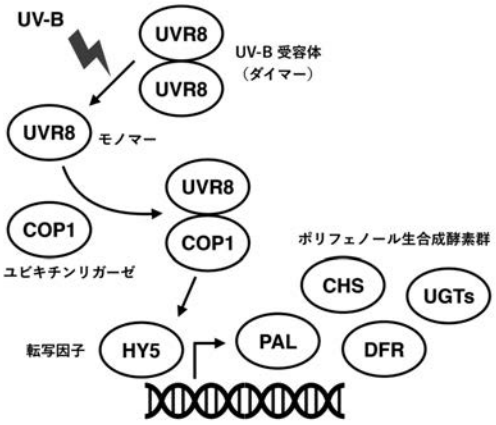


図3. UV-B による UVR8 受容体を介した
ポリフェノール生合成酵素の発現誘導

(3) 280 nm UV-LED 照射が実用植物のアントシアニン含量に与える影響

UVR8 は陸上植物に普遍的に存在していると考えられており, 本研究で得られた結果は, 実用植物にも応用できると考えた。そこで, チャ, スダチ, ダイズ（枝豆），ポドフィルムなどに同様に 280 nm UV-LED を短時間照射したところ，いずれも顕著なポリフェノールの増加が確認された。なお, スダチや枝豆などは収穫後のものを用いた。

4. 今後の展望

ポリフェノールは機能性分子として，市場のニーズが高い。また，アントシアニンは色づきとして，作物の品質や価値に大きな影響を与える。本研究で確立した 280 nm UV-LED の短時間照射によるポリフェノール含量増加技術（特許出願中）は，収穫後の作物でも適用可能であったことから，作物の品質や価値を高めるポストハーベスト処理技術や，植物による物質生産の高効率化技術として展開可能と期待される。今後，食品加工業者などと共同で本技術の実用化を進め，分野横断型産学連携による科学的根拠に基づいたオープンイノベーションの好例としたい。

参考文献

[1] Favory J-J, *et al.*: EMBO J., 28, 591–601 (2009)
[2] Kusano M, *et al.*: Plant J., 67, 354–369 (2011)

海洋珪藻 *Fistulifera solaris* の代謝改変による高付加価値脂肪酸の効率的生産

嶋田 礼迪[1]、松本 光史[2]、野島 大佑[1]、前田 義昌[1]、吉野 知子[1]、田中 剛[1]
[1]東京農工大学大学院・工・生命工、[2]電源開発株式会社・若松研究所
〒184-8588 東京都小金井市中町 2-24-16 電話: 042-388-7401
Fax: 042-385-7713　E-mail: tsuyo@cc.tuat.ac.jp

オイル生産株として得られた海洋珪藻 *Fistulifera solaris* を用い、健康食品や医薬品などの原料となるエイコサペンタエン酸 (EPA)の生産性を評価した。代謝改変の結果、*F. solaris* の EPA 生産性が 3.3 倍に向上することが可能であった。また、本株の高密度培養の結果、光独立栄養性の微生物の中で最も高い EPA 生産性を示した。以上のことから、本株は高付加価値脂肪酸生産において有用な生産ホストであることが示された。

1. はじめに

オメガ 3 脂肪酸は α-リノレン酸 (C18:3)、エイコサペンタエン酸 (EPA、C20:5)、ドコサヘキサエン酸 (DHA、C22:6)を含む多価不飽和脂肪酸であり、生体内で重要な役割を担う。オメガ 3 脂肪酸には脳や眼の発達に効果があると考えられており、医薬品原料に加えて健康食品やサプリメントとして需要が増加している。現在、オメガ 3 脂肪酸は主に魚油を原料として生産されている。魚油は、天然魚・養殖魚から合わせて年間約 100 万トン生産されているが、その内の約 75%が養殖用の魚餌に利用されているのが現状である。そのため、オメガ 3 脂肪酸生産等、魚餌以外の目的に利用できる魚油には限りがあることが問題となっている。この問題は“フィッシュオイル・ジレンマ”と呼ばれ、魚油以外からのオメガ 3 脂肪酸の供給源が求められている。

光合成微生物である微細藻類は、生育が速く、オメガ 3 脂肪酸を含む脂質を大量に蓄積できることから、魚油に代わるオメガ 3 脂肪酸供給源として期待されている。実際に海洋微細藻類から抽出したオメガ 3 脂肪酸を含む商品が流通しており、動物性食品を口にしないベジタリアンやヴィーガンでも摂取できるサプリメントとして注目されている。

当研究室ではこれまでに、海洋微細藻類のカルチャーコレクションからオイル生産株として海洋珪藻 *Fistulifera solaris* JPCC DA0580 株を単離し、バイオ燃料生産への応用に向けた研究を推進してきた。本株は乾燥重量あたり最大 65%のオイルを蓄積し、既存の微細藻類の中でも、最も高いオイル含量を持つ株の一つである。加えて、本株ではゲノム解析[1]をはじめとするオミクス解析による脂肪酸・脂質代謝経路の解明や人為的な代謝改変を行う上での基盤技術である遺伝子導入法が確立されている[2]。代謝改変等により本株のオイル画分に含まれる脂肪酸をオメガ 3 脂肪酸に置き換えることができれば、オメガ 3 脂肪酸の飛躍的な生産性向上が見込める。そこで本研究では、*F. solaris* による効率的な EPA 生産プロセスの構築を目指し、本株の高密度培養条件を検討した。また、遺伝子組み換えにより、本株の EPA 生産のボトルネックとなる反応を触媒するオメガ 3 デサチュラーゼを過剰発現し、EPA 生産性の更なる向上を試みた。

2. 解析データおよび方法

(1) 代謝改変による EPA 生産性の向上

F. solaris の脂肪酸の代謝経路解析と遺伝子発現データから、EPA 合成経路内で EPA 合成を触媒する内在性オメガ 3 デサチュラーゼを同定し、EPA 生産向上に向けた代謝改変のターゲットとした。

この目的遺伝子にマーカー遺伝子として GFP を付加し、内在性プロモーターで強発現させるベクターを構築した。この発現ベクターをパーティクルガン法を用いて *F. solaris* に導入した。

(2) EPA 生産性向上に向けた培養条件の最適化

F. solaris を、m-271 培地を含む 500 ml の培地に初期

濃度を 1.0×10^7 cells・ml^{-1} となるように添加し、通気量 0.8 l・l^{-1}・min^{-1}、CO_2 濃度 2 % (v/v) で通気培養した。光量子束密度は 100 または 500 µmol photons・m^{-2}・s^{-1} とし、連続光照射下で培養した。また、培養温度は 15、20、25、30°C、塩濃度は 0.44、0.88、1.75、3.50 %にて培養条件検討を行った。

3. 結果と考察

(1) 代謝改変による EPA 生産性の向上

パーティクルガンによる遺伝子導入後、抗生物質耐性スクリーニングを経て、蛍光顕微鏡により GFP の緑色蛍光を示す株を 5 クローン獲得した。このクローンをリアルタイム PCR に供し、導入遺伝子の発現量を解析したところ、野生株の 4-5 倍の遺伝子発現量が確認された。したがってオメガ 3 デサチュラーゼを高発現する形質転換体の作製が示された。

作製した最も高い遺伝子発現量を示す形質転換体及び野生株を窒素枯渇条件で培養し、その脂肪酸組成を比較した結果、形質転換体の総脂肪酸中で EPA の蓄積が 14%向上した。この時、野生株と比較して、EPA 生産性は 3.3 倍向上し、36 mg・l^{-1}・day^{-1} となった (図 1)。この結果から、内在性オメガ 3 デサチュラーゼの強発現により EPA 生産が向上したことが示され、オメガ 3 デサチュラーゼが EPA 生産の律速因子の一つであることが示唆された。以上より、*F. solaris* において内在性オメガ 3 デサチュラーゼの強発現は EPA 生産向上に有効であることが示唆された。

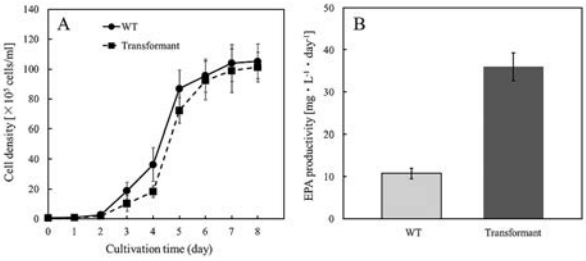


図 1. 野生株及び形質転換体の (A)生育速度、(B)EPA 生産の比較

(2) EPA 生産性向上に向けた培養条件の最適化

最適な培養条件を検討した結果、光量子束密度 500µmol photons・m^{-2}・s^{-1} において、温度 25 °C, 塩濃度 0.44 %の条件下で培養したときが最も EPA 生産性が高いことが確認された (表 1)。この生産性は、これまでに報告された光独立栄養性の藻類ホストの約 3 倍であり、従属栄養性の真菌類と同等の EPA 生産性であった (図 2)。

表 1. 各培養条件における *F. solaris* の EPA 生産性[7]

Photon flux density [µmol photons/(m²·s)]	Temperature [°C]	Salinity [% (w/v)]	EPA productivity [mg/(L·day)]
100	25	0.88	44.2 ± 1.4
100	25	1.75	49.9 ± 11.1
500	15	0.88	14.5 ± 1.3
500	15	1.75	27.6 ± 4.9
500	20	0.88	129.2 ± 2.1
500	20	1.75	109.9 ± 21.1
500	25	0.44	135.7 ± 10.0
500	25	0.88	132.3 ± 51.8
500	25	1.75	88.7 ± 2.2
500	25	3.50	79.2 ± 28.0
500	30	0.88	63.2 ± 6.0
500	30	1.75	46.2 ± 34.2

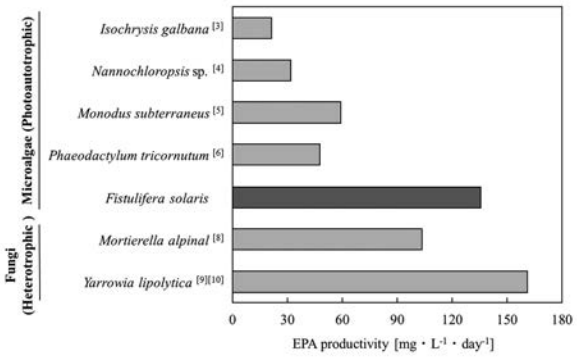


図 2. 微生物を用いた EPA 生産の比較

4. 今後の展望

本研究で作出した形質転換体では、EPA 含量は 19%まで向上することができた。このことから、EPA 含量は、*F. solaris* が有するオイル含量 (65%)の 6.5%にしか達していないのが現状である。このことから、オイルボディ内への EPA 蓄積を効率化できれば、さらなる EPA の生産性の向上が見込めるものと考えている。この実現に向け、関連酵素のオイルボディへの局在化など、代謝改変の最適化を試みている。

参考文献

[1] Ta anaka T, *et al.*: Plant Cell, 27, 162-176 (2015).

[2] Muto M, *et al.*: Mar. Biotechnol., 15, 48-55 (2013).

[3] Fernández S, *et al.*: Appl. Microbiol. Biotechnol., 50, 199-205 (1998).

[4] Graziella C. Z, *et al.*: J. Biotechnol, 70, 299-312 (1999).

[5] Qiang H, *et al.*: Eur. J. Phycol., 32, 81-86 (1997).

[6] Molina G, *et al.*: Biotechnol. Appl. Biochem., 20, 279-290 (1994).

[7] Tanaka T, *et al.*: Bioresour Technol 245, 567 (2017).

[8] Sakayu S, *et al.*: J. Am. Oil Chem. Soc., 66, 342-347 (1989).

[9] Ethel N. J, *et al.*: E I du Pont de Nemours and Company, Wilmington, DE (US) US (2012)

[10] Zhixiong X, *et al.*: Nat. Biotechnol., 31, 734-740 (2013).

抗菌素材“ＰＧＡＩＣ”の生成機構分析とオンサイトコーティングへの応用

白米　優一[1]・中山　沢水[2]・東内　遥菜[2]・島田　幸育[2]・芦内　誠[1,2]
愛媛大学大学院連合農学研究科　生物資源利用学専攻
高知大学　農林海洋科学部
〒783-8502　南国市物部乙 200　電話: 088-864-5144
Fax: 088-864-5200　E-mail: ashiuchi@kochi-u.ac.jp

極限環境微生物の生産する立体規則性ポリγグルタミン酸（L-PGA）を利用して実用化に適う抗菌コーティング超分子材料（PGA イオンコンプレックス：PGAIC）の開発に成功した。今回、新たに開発した強化型 PGAIC（PGA/DEQ）を中心に、画期的なコーティング手法の確立と圧倒的な化学的耐久性に基づいた持続的な抗菌性能について詳解する。

1.　はじめに

近年、微生物による感染症を防止する目的から、コーティング機能を備えた抗菌性ポリマーの需要が高まっている。実際、感染性微生物に侵された表面・表層は重大な媒介要因になること、なかでも、感染に対する抵抗力が低下した患者への影響は甚大とされている。例えば、第四級アンモニウム化合物（QA）は、高い安全性と広域抗菌スペクトルを長所として化粧品の保存剤から一般公衆衛生の目的に適う除菌剤まで様々な社会領域で利用されている［1］。ただし、基材表面への接着性や化学的耐久性に乏しく、持続的な抗菌性を発揮することは困難であった。そのため、含 QA 超分子材料の開発が望まれていたが、目的に適うほど高性能化された例は報告になかった。

筆者らは極限環境微生物が生産する立体規則性ポリγグルタミン酸（L-PGA）と歯磨き粉の薬用 QA 剤でもあるヘキサデシルピリジニウム（HDP+）を用いて超分子材料 L-PGA イオンコンプレックス（PGAIC）の開発にはじめて成功している［2］。続いて、二頭型 QA（具体的にはデカリニウムカチオン : DEQ^{2+}）を導入することで、飛躍的に強靭化された PGAIC の作製に成功した。より優れた耐熱性・化学的耐久性を示したキノリニウムタイプの PGAIC（PGA/DEQ）を強化型とし、従来型（PGA/HDP）と比較検討することでコーティング能について実用的な知見を取得したので報告する。

2.　解析データおよび方法

さて、本研究を進展させた画期的な合成法と定量法について具体的に述べていく（図 1）。PGA/DEQ コーティング層を基材表面上で直接合成する汎用かつ簡便な本手法をオンサイト合成法と名付けた（A）。まず、PGA 溶液を基材にコーティングし（a）、PGA 由来の高度な接着性を基材表面上に付与させた（b）。次いでパートナー分子となる第四級アンモニウム塩 DEQ^{2+}溶液を添加し、瞬時に該基材表面上で PGA/DEQ を形成させることに成功している（c）。最後に、余分な DEQ^{2+}をメタール洗浄で取り除いた（d）。一方で、筆者らは基材表面上にコーティングした PGA/DEQ の定量法も確立している（B）。色素試薬ブロモフェノールブルー（BPB）

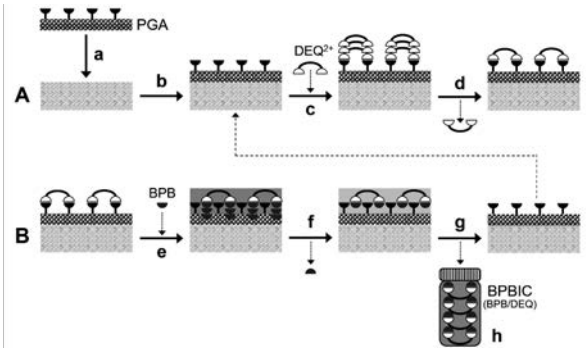


図 1. PGA/DEQ のオンサイト合成（A）とその定量法（B）

溶液に該コーティング基材を浸漬し（e）、余分な BPB を除去すると同時に BPB/DEQs を形成させた（f）。形成させた BPBIC を抽出し（g）、吸光度計を用いて基材表面上の最終的な PGA/DEQ 量を算出した（h）。

また、定量法を確立したことと併せて、アルコール洗浄後の PGAIC コーティング不織布（直径 12 mm）を用いた抗菌性試験を実施した。試験対象には大腸菌、黄色ブドウ球菌、枯草菌の 3 株を選択し、PGAIC コーティング基材を投入した LB 液体培地で培養を行なった。

3. 結果と考察

(1) PGAICs 合成の分子機構の解析

オンサイト合成のプロセスを築くにあたり、PGAIC 合成時の分子機構を探ることが求められた。図 2 には、PGA カルボキシル基あたりの QA パートナー分子モルの比率を 0～100%に設定し、合成反応を行なった様子を示した。いくつかの吸着（結合）モデルを参考に速度論解析を展開したところ、PGAIC 合成反応は一般的なラングミュアモデル（酵素学における“ミカエリス-メンテンの式”に相当）には合致しない一方、NICA モデル（“ヒルの式”に相当）には合致していた。この結果から PGAIC の合成反応には有意な“協同性”が存在することが初めて明らかとなった。協同性は“*n*”で表し、1 より大きな値で協同性を備えている。また興味深いことに、いかなる QA 濃度条件下であろうとも回収可能な PGAIC はカルボキシル基が全て封鎖された完全修飾型であることが NMR 分析により示唆されている。該特性と PGAIC のもつ材質不問の接着性を組み合わせることで、上記のオンサイト合成が可能になった。

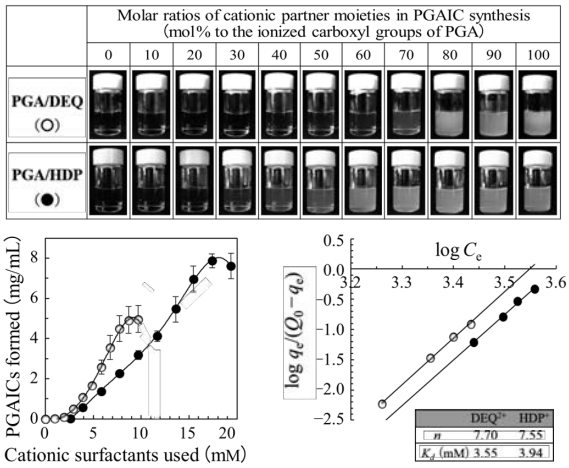


図 2. PGAICs の速度論的解析

(2) PGAICs の持続的な抗菌性調査

図 3 には培養 24 時間後の菌濁度を示した。PGAIC をコーティングされていない不織布では抗菌効果は観察されない（a）。一方、無洗浄の PGAIC コーティング不織布では顕著に抗菌性を発揮した（b）。ただし、従来型コーティング不織布の場合、アルコール洗浄により抗菌能が喪失することが分かっていた。従って強化型コーティング不織布で抗菌能が保持されていたことは特筆に値する。定量法を用いてアルコール洗浄後の両コーティング不織布における PGAIC 残存量を算出した結果、従来型はほぼすべて剥がれ落ちていたのに対し、強化型は初期値の 8 割が残存していた。

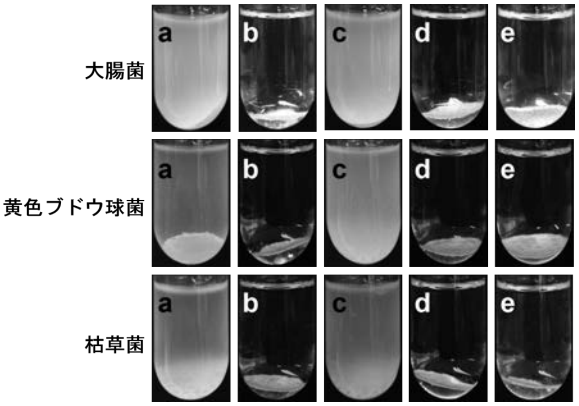


図 3. PGAICs の持続的な抗菌性能

4. 今後の展望

極限環境微生物が生産する多機能かつサスティナブルなポリマーを利用することで、新たな高性能コーティング基材の創製に成功した。今回は割愛したが、この強力なコーティング基材を特定の条件下で剥離させることにも成功している。極端な化学的安定性と簡易な方法による条件剥離性を併せ持つ架橋材料は筆者らの知る限り例がない。

PGAIC は抗菌コーティングの利用ばかりか、多用途化に適うナノ繊維加工にも適していることが分かってきた。今後、重篤な感染症の発生・拡大を防ぐ高度公益材料の開発はますます重要になってくる。本研究が実践研究の一助になることを期待する。

参考文献

[1] Sauvet G, *et al.*: J. Polym. Sci. A: Polym. Chem., 41, 2939-2948 (2003)

[2] Ashiuchi M, *et al.*: ACS Appl. Mater. Interfaces, 5, 1619-1624 (2013)

麹菌 *Aspergillus oryzae* の液体培養における菌糸完全分散株の作製とその酵素生産への応用

宮澤　拳[1]・吉見　啓[2]・古明地　敬介[1]・田畑　風華[1]・佐野　元昭[3]・阿部　敬悦[1,2,*]
[1]東北大学大学院農学研究科　生物産業創成科学専攻
[2]東北大学　未来科学技術共同研究センター
[3]金沢工業大学　ゲノム生物工学研究所
*〒980-8572　宮城県仙台市青葉区荒巻字青葉 468-1
電話: 022-757-4355　E-mail: kabe@niche.tohoku.ac.jp

糸状菌は一般的に液体培養において菌糸が塊を形成しながら生育する。これまで菌糸塊の形成メカニズムはあまり理解されていなかった。筆者らは麹菌 *Aspergillus oryzae* において菌糸塊形成には細胞壁多糖 α-1,3-グルカンと細胞外分泌多糖ガラクトサミノガラクタンが関与していることを見出した。すなわち，両多糖の完全欠損株の菌糸は全く塊を形成せず，液体培地中に完全分散することが明らかとなった（初の麹菌完全分散株）。さらに，この完全分散形質は高密度培養に好適であり，従来株よりも高いタンパク質生産性を示すことから，現在，工業生産を見据えた応用研究が進行中である。

1.　はじめに

糸状菌は産業用酵素や医療用タンパク質，低分子化合物の生産宿主として世界中で用いられている。これらの生産量は出荷額で 1 兆円にも及び，微生物を用いて生産される生体関連物質の中で極めて重要な位置を占める。糸状菌は，細菌や酵母と比較してタンパク質や複雑な低分子化合物の生産能力が高く，糸状菌での高効率な物質生産技術の新規需要は非常に高い。糸状菌を用いた物質生産は世界的に数十～数百 kL 規模の大型発酵槽を用いた液体培養で行われている。糸状菌は，単細胞で均一に分散する細菌や酵母とは異なり，多細胞の菌糸同士が絡まりペレット状の形態となることから，菌糸形態の制御は困難で高密度培養ができないとされてきた。

ところで，糸状菌の細胞壁は α-1,3-グルカン（AG）や β-1,3-グルカン，キチン，ガラクトマンナンなどの多糖から構成されており，その外層が細胞外マトリクスで覆われている（図 1）。筆者らは以前，モデル糸状菌 *Aspergillus nidulans* の二種の AG 合成酵素遺伝子 *agsA*, *agsB* の破壊株を作製し，糸状菌 AG の機能解析を行った。その結果，*A. nidulans* の AG は主に AgsB によって合成されていることが明らかとなった[1]。また，興味深いことに，*A. nidulans* の AG 欠損株を液体培養すると，菌糸が液体培地中に均一分散する形質を示した[1]。すなわち，AG は菌糸同士の接着因子として機能していることが明らかとなった。さらに *A. nidulans* の AG 欠損株の液体培養時の菌体生育量は，野生株に比べて約 1.5 倍に増加していた[2]。筆者らは，この菌糸分散性と良好な菌体生育が糸状菌の高密度培養に適するのではないかと考えた。

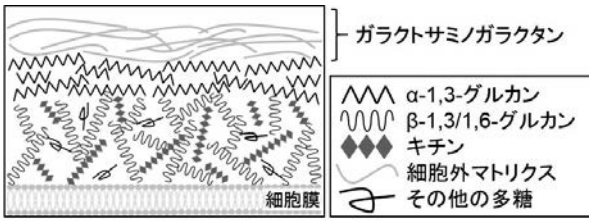


図 1. 糸状菌の細胞表層構造

そこで筆者らは，産業用糸状菌（麹菌）*Aspergillus oryzae* の AG 欠損株を用いてモデルタンパク質の生産性を評価した。麹菌の AG 欠損株は，*A. nidulans* の AG 欠損株とは異なり，野生株に比べて小さな菌糸の塊を形成しながら生育した（図 2）[2]。また，AG 欠損株は野生株に比べてタンパク質生産性が向上していた[2]。しかしながら，麹菌においては AG 欠損のみでは完全分散に至らなかったことから，麹菌には未知の菌糸接着因子が存在していると考えられた。筆者らは，その

因子を欠損させると更なる物質生産性の向上が達成できるのではないかと考え，麹菌における AG 以外の菌糸接着因子を同定し，その欠損株の表現型解析および物質生産性を評価することを本研究の目的とした。

2. 結果と考察

(1) 麹菌の第二の菌糸接着因子の発見

麹菌における菌糸接着性は細胞表層の物性によって変化すると考えられる。そこで筆者らが着目したのが細胞外分泌多糖ガラクトサミノガラクタン（GAG）である。GAG は病原性糸状菌 *Aspergillus fumigatus* において宿主への感染プロセスに関与していることが報告されており，その生合成は 5 遺伝子から成る遺伝子クラスターにより制御されている[3]。筆者らは，GAG が第二の菌糸接着因子であるとの仮説を立て，麹菌の野生株および AG 欠損株を親株として，*A. fumigatus* の GAG 生合成遺伝子の麹菌オルソログ遺伝子を破壊し，GAG 欠損株および AG-GAG 二重欠損株を作製した。その結果，AG-GAG 二重欠損株は菌糸が液体培地中に完全分散した（麹菌では初となる菌糸完全分散株の造成; 図 2 上中）[4]。加えて，両 GAG 欠損株においては，細胞表層の粘着性の構造が消失し（図 2 下），細胞壁ガラクトサミン量が顕著に減少した。このことから，麹菌においては AG に加えて GAG も菌糸接着因子として機能することが明らかとなった。

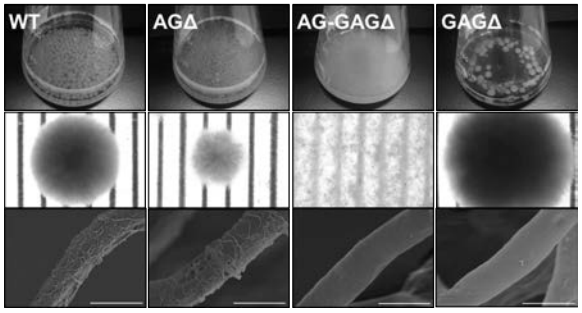


図 2. AG-GAG 二重欠損株の培養性状
上, 培養終了後の三角フラスコ写真
中, 培養後の菌糸の実体顕微鏡像（目盛間隔 ＝1 mm）
下, 菌糸表面の走査型電子顕微鏡像（目盛 ＝5 μm）

(2) フラスコ培養レベルでの組換え酵素生産

次に，各株の物質生産性を評価するため，麹菌の野生株，AG 欠損株および AG-GAG 二重欠損株に対し，ポリエステル分解酵素であるクチナーゼ CutL1 を高発現させるベクターを 1 コピーゲノム上に導入し，培養上清に分泌される CutL1 を SDS-PAGE により定量した。その結果，AG-GAG 二重欠損株では菌体生育量，CutL1 分泌生産量ともに AG 欠損株よりも有意に増加していた（図 3）[4]。このことから，AG-GAG 二重欠損株は酵素生産に好適な宿主株であることが明らかとなった。

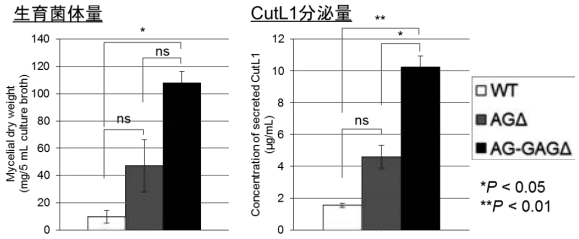


図 3. フラスコ培養時の生育菌体量と CutL1 分泌生産量

(3) ジャーファーメンターを用いた組換え酵素生産

さらに筆者らは，AG-GAG 二重欠損株の産業への応用展開を見据え，工業培養を模倣した 5 L ジャーファーメンターを用いて酵素生産好適性を検証することとした。工業培養で想定される各種培養条件において AG-GAG 二重欠損株は野生株よりも生育菌体量の増加傾向が認められ，CutL1 分泌生産量は培養 48 時間目以降，野生株比約 2 倍に到達した。すなわち，AG-GAG 二重欠損株は攪拌回転によりせん断ストレスを受けつつも旺盛に生育し，高い酵素生産性を維持していることが明らかとなった。

3. 今後の展望

本研究により，麹菌の液体培養では，AG と GAG が協調的に作用して菌糸塊を形成することが明らかとなった。また，麹菌の AG-GAG 二重欠損株が工業スケールを想定した条件においても高い酵素生産性を維持することが明らかとなった。本研究は AG, GAG の特性を利用した汎用性の高い高密度培養技術であり，糸状菌を用いた工業培養の革新となり得る新技術である。今後は，AG-GAG 二重欠損株の酵素生産向上の要因について解析を進める。また，糸状菌の菌糸塊形成に至るメカニズムを理解し，液体培養時の菌糸の接着性を制御してさらなる高密度培養技術の発展につなげたい。

参考文献

[1] Yoshimi A. et al., ***PLoS ONE***, (2013) 8:e54893
[2] Miyazawa K. et al., ***Biosci. Biotechnol. Biochem.***, (2016) 80:1853−1863
[3] Sheppard D.C. and Howell P.L., ***J. Biol. Chem.***, (2016) 291:12529−12537
[4] 阿部敬悦ら，特願 2017-91734 (PCT/JP2018/17474)

pH 変動培養法を活用した耐酸性微生物や好酸性微生物の高効率なスクリーニング系の開発

高野 力[1]・村山 晃一[2]・青柳 秀紀[1*]
[1]筑波大学大学院 生命環境科学研究科 生物資源科学専攻
[2]フタムラ化学（株）
〒305-8572　つくば市天王台 1-1-1　Tel：029-853-7212
Fax : 029-853-4605　E-mail : aoyagi.hideki.ge@u.tsukuba.ac.jp

様々な特殊環境に存在する、未培養微生物を培養化するための汎用スクリーニング系構築の一環として、強酸性環境に着目した。Specialized Cellulose Film（SCF）法を用いて、従来法では困難な、pH 1 の条件下での長期間培養や、培養条件の変動操作（pH 変動培養法）により、効率的かつ簡便な好酸性、耐酸性微生物スクリーニング系を構築した。今後、本スクリーニング系を他の特殊環境に適用し、様々な特殊環境条件に耐性を持つ未培養微生物の培養化を試みる。

1. はじめに

メタゲノム解析などの進歩により、環境中に存在する微生物の 99%以上が、未だに培養化されていないことが明らかとなった [1]。特に、特殊環境に存在する微生物は、培養化、利用されていないものが多い。微生物の単離培養法は寒天平板培養（AP）法が主流となっているが、使用が困難な培養条件も多い。また、寒天自体（あるいは寒天成分由来の副生成物など）による細菌の生育阻害、酸加水分解による培地の強度低下など、培養を行う上での諸問題が指摘されている。この現状を打破するために、AP 法の様々な代替法が開発されてきた [2, 3] が、汎用性や操作性などに難がある。

我々は、AP 法の問題点を排除した、簡便な微生物培養法として､培養中に培養条件を変換可能な Specialized Cellulose Film（SCF）法の開発研究を実施してきた[4, 5]。

本研究では特に、寒天などのゲル化剤が酸加水分解してしまう強酸性の条件に着目した。メタゲノム解析により、強酸性の環境中には有用な未培養微生物が多数存在し、中性の環境中にも、酸性条件下で生存する有用な耐酸性微生物や、耐酸性酵素が存在することが明らかにされている [6, 7]。こうした微生物の探索において従来法は、強酸性条件での長期間培養や、耐酸性を持たない菌体の排除が困難であった。我々は、SCF 法を用いて、培地交換による長期間の培養系や、培養中に培地を pH 1 の培地に変換する“pH 変動培養法”を考案、構築し、好酸性、耐酸性微生物の効率的スクリーニング系の構築を試みた。

2. 材料と方法

(1) 好酸性菌培養系の構築

種々の強酸性環境から採取した土壌試料を、pH 1 の液体培地で振盪培養（30℃, 200 rpm）し、培養液を同組成の SCF 培地に植え継ぎ、適宜、新鮮な培地に交換しながら、30℃で培養を行った。SCF 上に形成されたコロニーを単離し、菌種の同定を行った。

(2) 耐酸性菌培養系の構築

SCF 法を用いて、中性の土壌試料を、pH 7 の培地で前培養し、pH 1 で 48 h 酸処理した後、pH 7 に戻して後培養を行う pH 変動培養法を考案、構築した（**図 1**）。

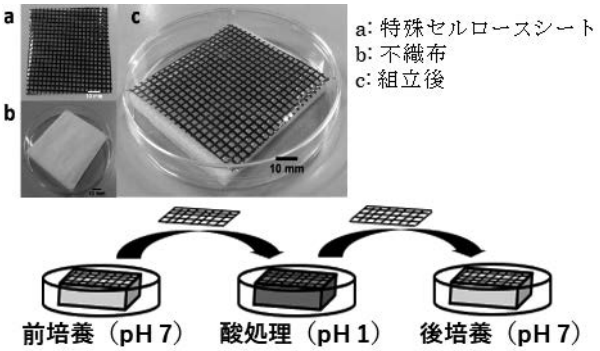


図 1.　SCF 法と pH 変動培養法の概念図.

pH 変動培養法を用いた耐酸性菌スクリーニング系を最適化するため、下記の（A）から（D）の 4 項目について検討した。

（A）各培養段階の培養菌叢を PCR-DGGE 法を用いて比較し、耐酸性を持たない菌体を排除可能な各培養段

階（**図 1**）の培養期間を設定した。

（B）pH 1 の培地の成分が微生物の耐酸性に及ぼす影響を配慮し、酸処理段階に 0.36 N 硫酸を用いて pH 変動培養を行い、得られた培養菌叢を比較した。

（C）耐酸性微生物スクリーニング系としての効率を定量的に評価するため、変動培養の各段階における培養菌体を回収し、AP 培地を用いて生菌数の計数を行った。変動前後の生菌数を比較することで、スクリーニング効率を定量的に評価した。

（D）最適化した系を用いて、実際に耐酸性微生物の探索を行った。

3. 結果と考察

(1) 好酸性菌培養系の構築

群馬県草津町の土壌を NBRC802 培地で培養したサンプルで、SCF 法を用いた pH 1 の培地で微生物コロニーの形成および単離に成功した。pH 1, 3, 7 に調整した同組成の AP 培地では菌体の増殖がみられなかったことから、SCF 法で単離培養できた菌体は、AP 法による単離が困難な、難培養微生物の可能性があり、現在、菌種の解析中である。

(2) 耐酸性菌培養系の構築

pH 変動培養の各段階の培養期間について、中性土壌を試料として種々検討した結果、後培養の長さが DGGE 法で検出されるバンドの数に大きく影響していた。前培養および後培養をそれぞれ 48 h とする系において、pH の変動による顕著な菌叢の変化が確認された。そこで、以降の実験では前培養、酸処理、後培養いずれも 48 h とする系を用いた。

pH 1 の培地と 0.36 N 硫酸でスクリーニングした培養菌叢を比較した結果、0.36 N 硫酸を用いた系で *Bacillus* 属由来のバンドが消失した（**図 2**）。*Bacillus* 属は芽胞を形成することで耐酸性を獲得するため、強酸性条件下では活動を停止する。本研究では強酸性条件下で活動可能な有用微生物の探索を目的とすることから、以降の実験では 0.36 N 硫酸を用いたスクリーニング系に焦点を絞り検討をおこなった。

pH 変動培養の各段階における生菌数を、AP 培地を用いて計数した結果、中性土壌試料において、pH 7→ pH 1→ pH 7 と変動することにより、菌体濃度が 4.9 x 10^8 →1.0 x 10^5→2.2 x 10^5 cells/ml と変化した。

同様に、中性土壌試料からの耐酸性菌の探索を行った結果、複数の *Enterobacter* 属が優占化し、単離培養に成功した。単離培養した菌を用いて pH 変動培養前後の生菌数を計測した結果、変動により菌体濃度が 1.1 x 10^8 →2.0 x 10^4→5.8 x 10^7 cells/ml と変化し、後培養の段階で耐酸性をもつ菌種が優占化した。以上の結果から、pH 変動培養法により強酸性を選択圧とした、耐酸性微生物の効率的スクリーニングを実現できることが示唆された。

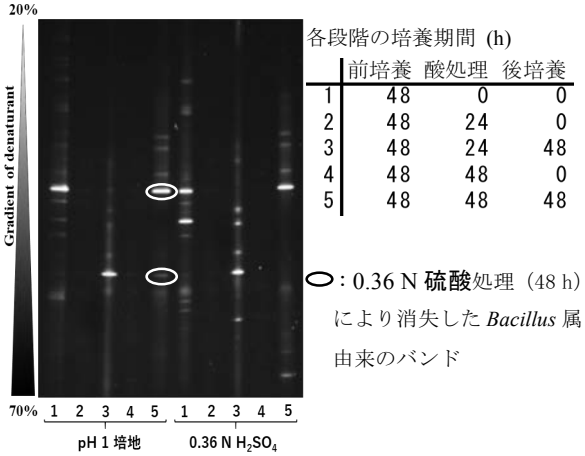


図 2. pH 変動培養法の酸処理（0.36 N 硫酸, 48 h）が培養菌叢に及ぼす影響.

4. 今後の展望

本研究では、pH 変動培養法を用いた耐酸性微生物のスクリーニング系を構築した。今後、本法を実用的な耐酸性微生物スクリーニング系として広く普及させるため、汎用性や操作性の向上に取り組む。また、培養期間の設定の目安として、菌体増殖のマーカーとなる物質の添加による変動培養中の菌体の増減の可視化や、シート上のコロニーの視認性を向上させるためシートや不織布の改良を行う。本研究を基に、強塩基性、塩分濃度など、強酸性以外の条件について変動培養法を適用し、様々な環境条件に耐性を持つ微生物を効率的にスクリーニングできる汎用培養法を構築し、未培養微生物の培養化を試みる。

参考文献

[1] Amann R, *et al.* : *Microbiological Reviews.*, 59 (1), 143-69 (1995)

[2] Tamaki H, *et al.*: *Environ Microbiol.,* 11 (7), 1827-34 (2009)

[3] Colin J, *et al.* : *Proc Natl Acad Sci* U.S.A., 104 (46), 18217-22 (2007)

[4] 高野ら： 第 68 回生物工学会大会, 2P-2p136 (2016)

[5] 高野ら： 第 69 回生物工学会大会, 2P-J189 (2017)

[6] Aliaga G, *et al.* : *ISME J.*, 9 (4), 1014-23 (2015)

[7] Hayatsu M, *et al.* : *ISME J.,* 11 (5), 1130-41 (2017)

抗菌性物質が皮膚常在菌の生理活性に及ぼす影響の解析

菊田 実花[1]・青柳 秀紀[1,2]*

[1]筑波大学大学院 生命環境科学研究科 生物資源科学専攻
[2]筑波大学 生命環境系
〒305-8572 茨城県つくば市天王台 1－1－1
* E-mail: aoyagi.hideki,ge@u.tsukuba.ac.jp

化粧品や消毒剤に含まれた抗菌性物質の肌への塗布は、日常的に行われている。これらの抗菌性物質は製品の品質管理や病原菌への対策が目的とされ、それらの対象となる微生物に及ぼす影響は研究が進んでいる。しかしながら、私たちの皮膚に存在する常在菌に及ぼす影響については十分な研究がなされているとは言い難い。この現状を踏まえ本研究では、代表的な抗菌性物質の一つであるトリクロサンが皮膚常在菌（***Staphylococcus epidermidis*** と ***S. aureus***）の生理活性に及ぼす影響を解析した。種々検討した結果、今回、使用した皮膚常在菌 2 菌株でトリクロサンへの耐性の獲得が認められた。また、一度、獲得したトリクロサン耐性が安定したものである可能性が示唆された。

1. はじめに

私たちの皮膚は日常的に、抗菌性物質（防腐剤、抗菌剤、抗生物質等）と接触する機会が数多くある。化粧品や消毒剤といった製品に添加されている抗菌性物質は、品質管理などの観点から製品中の微生物の防除（静菌や殺菌など）と病気予防の観点から病原菌の防除を目的としており、その対象となる微生物に及ぼす影響に関する知見は数多くある。しかしながら、これらの抗菌性物質が皮膚常在菌に及ぼす影響は十分に解析されているとは言い難い。皮膚常在菌は、侵入する微生物から肌を守るバリア機能や肌の保湿などの様々な役割を果たしている [1]。そのため、抗菌性物質が皮膚常在菌に与える影響の解析は、抗菌性物質を安全に使用するうえで重要である。トリクロサンは代表的な抗菌性物質のひとつであり、石鹸やオーラルケア製品などの数多くの抗菌製品に使用されている。しかしながら、近年、EU やアメリカを始め、日本でもその安全性が疑問視されている。本研究では、抗菌性物質のモデルとしてトリクロサンを対象に、皮膚常在菌の生理活性に及ぼす影響の解析を試みた。

2. 材料と方法

トリクロサン添加培地を用いた皮膚常在菌の培養

本研究では、皮膚常在菌の善玉菌のモデルとして表皮ブドウ球菌（*Staphylococcus epidermidis*）を、悪玉菌のモデルとして黄色ブドウ球菌（*S. aureus*）を実験に使用した。802 培地（Hipolypepton 10 g/L、Yeast extract 2 g/L、$MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 1 g/L）と 50 nM のトリクロサンを添加した 802 培地を用いて、L 字管で *S. epidermidis* あるいは *S. aureus* を 37°C、40 strokes/min で培養し、1 h 毎に $O.D._{660}$ を測定した。

トリクロサン添加培地を用いた皮膚常在菌の継代培養

802 培地、50 nM のトリクロサンを添加した 802 培地を用いて、*S. epidermidis* または *S. aureus* を L 字管で培養（37℃、40 strokes/min）し、定常期の菌をそれぞれの新鮮培地に播種した。1 h 毎に $O.D._{660}$ を測定し、培養経過をモニターし、誘導期の長さと増殖速度を算出した。また、50 nM のトリクロサン添加培地を用いて皮膚常在菌の継代培養を行う系（**図 1A**）と、トリクロサン無添加培地（コントロール）を用いて継代培養を複数回繰り返した後、50 nM トリクロサン添加培地を用いて培養をおこなう系（**図 1B**）について検討をおこない、皮膚常在菌の増殖特性を比較した。

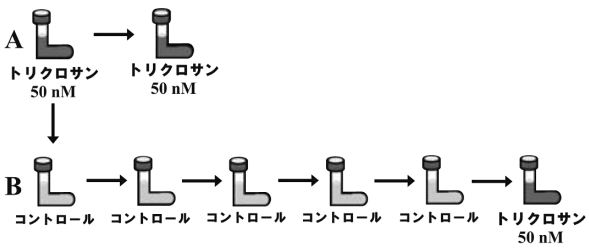


図 1. 皮膚常在菌の継代培養実験の概念図.

3. 結果と考察

トリクロサンが皮膚常在菌の増殖特性に及ぼす影響

トリクロサン添加培地を用いて、*S. epidermidis* または *S. aureus* の培養経過をモニターした結果、トリクロサン無添加条件（コントロール）と比べて、*S. epidermidis* では誘導期の長さが 5.3 h から 25.6 h、*S. aureus* では 3.3 h から 23.5 h に変化し、両菌株ともに誘導期の長さの増加がみられた（**図 2**）。

定常期に達した *S. epidermidis* あるいは *S. aureus* を同濃度のトリクロサン添加新鮮培地に播種し、継代培養を行った（**図 2** の点線は継代培養開始点）。その結果、両菌株ともに誘導期の長さがコントロールの誘導期とほぼ等しい時間にまで短縮された（**図 2**）。以上の結果から、トリクロサンに曝されることで、*S. epidermidis* と *S. aureus* がトリクロサンへの耐性を獲得したことが示唆された。

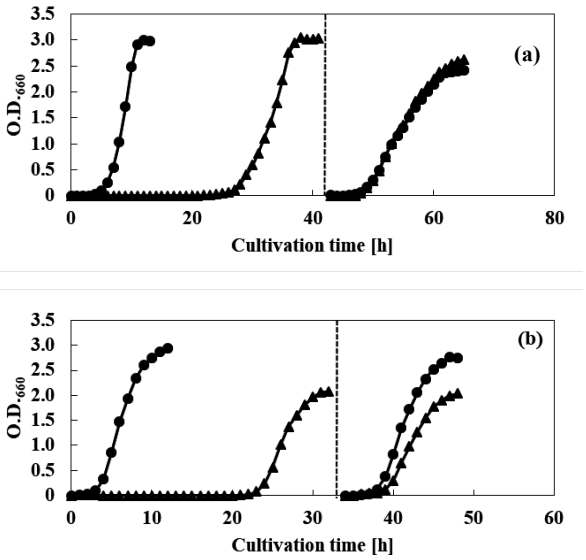


図 2. トリクロサンが *S. epidermidis* (a)と *S. aureus* (b) の増殖に及ぼす影響.

●：コントロール　▲：トリクロサン 50 nM

皮膚常在菌が獲得したトリクロサン耐性の持続性の評価

S. epidermidis および *S. aureus* が獲得したトリクロサン耐性の持続性を評価するため、50 nM トリクロサンを添加した培地で培養後、トリクロサン無添加培地（コントロール）を用いて任意の回数、継代培養をおこなった後、50 nM トリクロサン添加培地を用いて培養をおこない、それぞれの増殖特性を比較評価した（**表 1**）。その結果、トリクロサン無添加培地を用いて継代培養を繰り返しても、*S. epidermidis* と *S. aureus* を再び 50 nM トリクロサン添加培地で培養をおこなうと、増殖特性はほとんど変化しなかった（**表 1**）。この結果、*S. epidermidis* と *S. aureus* が獲得したトリクロサン耐性は、安定して維持されることが示唆された。

また、抗生物質へ対する応答性を評価した結果、*S. epidermidis* と *S. aureus* ともに、トリクロサン耐性を獲得した菌とコントロール（トリクロサン耐性を持たない）の菌では抗生物質へ対する応答性が異なった。

表 1. *S. epidermidis* と *S. aureus* が獲得したトリクロサン耐性の持続性.

菌株	*S. epidermidis*		*S. aureus*	
培養条件*	A	B	A	B
誘導期 [h]	3.64	4.62	4.10	3.69
増殖速度 [$O.D._{660}$/h]	0.25	0.21	0.31	0.45

***　図 1A、図 1B に示した培養条件で培養**

4. 今後の展望

本研究の結果は、皮膚常在菌（*S. epidermidis* と *S. aureus*）がトリクロサン含有製品などの使用を介してトリクロサン耐性を獲得した場合、その耐性が維持される可能性があることを示唆している。また、トリクロサンの使用を止めるだけでは、皮膚常在菌のトリクロサン耐性を消失させることが難しい可能性があることを示唆している。

現在、(ⅰ)トリクロサンが *Propionibacterium acnes* の生理活性に及ぼす影響の解析、(ⅱ) 皮膚常在菌の複合系における影響評価、などについても検討中である。

参考文献

[1] Belkaid, Y, and Tamoutounour, S,: *Nat. Rev. Immunol.*, 16, 353-366 (2016).

環状 RNA を用いた miRNA とその前駆体の阻害

地白 和樹・立花 亮
大阪市立大学大学院 工学研究科 化学生物系専攻
〒558-8585　大阪市住吉区杉本 3-3-138　電話: 06-6605-2702
E-mail: tatibana@bioa.eng.osaka-cu.ac.jp

microRNA (miRNA) はゲノムにコードされており、遺伝子の発現を制御している。miRNA の中にはがんの発生や悪性化に関わっているものがあり、それらを阻害するとがんの増殖が抑制されることから、miRNA 阻害剤は新たな医薬品として期待されている。 今回私達は、高い生体内安定性を持つ環状 RNA を利用して miRNA とその前駆体の両方を阻害する、これまでにない新しい miRNA 阻害剤を開発した。

1. 諸言

miRNA は前駆体 (pri-miRNA) として転写された後、二段階のプロセシングを経て成熟 miRNA となる。成熟 miRNA は RISC と呼ばれる複合体を形成し、標的の mRNA と配列相補的に結合することでその翻訳を抑制する[1,2]。既存の miRNA 阻害剤は、RISC 中の miRNA と結合し阻害する[3,4]。

今回私達は、成熟 miRNA だけでなく pri-miRNA にも相補的な配列を持つことで成熟 miRNA 及び pri-miRNA の両方に作用する miRNA 阻害剤を開発した (Fig. 1)。またこの miRNA 阻害剤は、高い生体内安定性を持つことが知られている環状 RNA[5]として発現するよう設計されている。このような miRNA 阻害剤を、pri-miRNA を標的とする「RNA inhibitor for gene transcripts」の意味で「pRING」と名付けた。

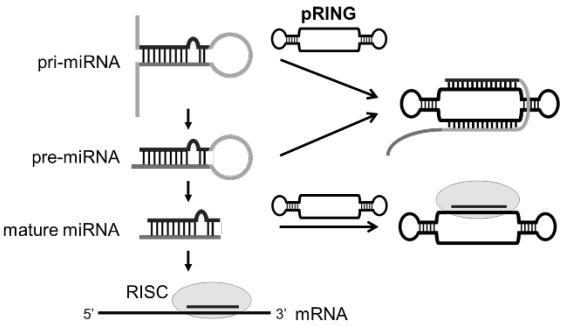


Fig. 1 pRING の作用機構

2. 方法と結果

(1) pRING の環状化確認

pRING 発現ベクターを HEK293T 細胞へトランスフェクションし、72 時間後に total RNA を回収して RT-PCR を行った。環状化されないと PCR がかからないプライマーセット (Div)においても所定のサイズの PCR 産物が

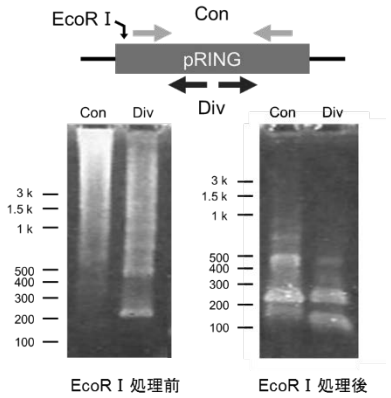


Fig. 2 RT-PCR による pRING の環状化確認

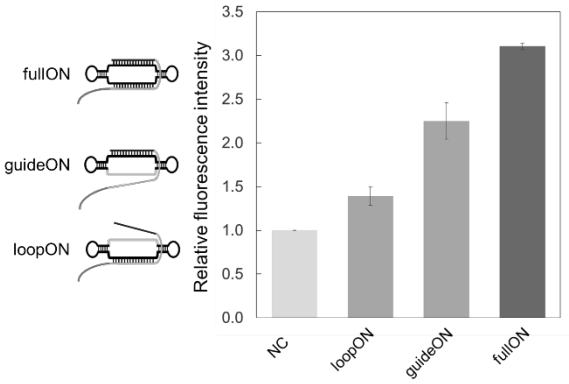


Fig. 3 pRING の miR-21 阻害活性

確認され、pRING が環状 RNA として発現していることが確認できた (Fig. 2)。

(2) pRING の活性測定

pRING の活性を評価するため、レポータージーンアッセイを行った。miR-21 のターゲットサイトを組み込んだ DsRed2 発現ベクターと pri-miR-21 発現ベクター及び pRING 発現ベクターを HEK293T 細胞にトランスフェクションし、72 時間後に DsRed2 の赤色蛍光を測定することで pRING の阻害活性を評価した。その結果、pRING はコントロールに比べて有意に高い阻害活性を示した。また、miR-21 の guide 鎖にのみ相補的な配列をもつ pRINGguideON、loop 部分にのみ相補的な配列を持つ pRINGloopON を作製し、レポータージーンアッセイにより pRING との活性を比べた結果、guide 鎖と loop 部分の両方に相補的な配列を持つ pRING が最も高い阻害活性を示した (Fig. 3)。

これらのことから、今回作製した pRING は細胞内で環状 RNA として発現しており、成熟 miRNA だけでなくその前駆体も阻害していることが示唆された。

3. 今後の展望

従来の miRNA 阻害剤は RISC に含まれる成熟 miRNA に結合するものであるが、pRING はさらに前駆体にも結合、阻害したことから、miRNA の活性を根源的に阻害するものと期待される。現在、pRING のデリバリーシステムの構築を検討している。

参考文献

[1] Kawamata T., Tomari Y. : Trends Biochem. Sci. 35, 368-376 (2010).

[2] Kawamata T., Seitz H., Tomari Y. : Nat. Struct. Mol. Biol. 16, 953-956 (2009).

[3] Haraguchi T., Ozaki Y., Iba H. : Nucleic Acids Res. 37, e43 (2009)

[4] Haraguchi T. *et al.* : Nucleic Acids Res. 40, e58 (2012)

[5] Lu Z. *et al.* : RNA 21,1554–1565 (2015)

ナノポアシーケンサを用いた遺伝子組換え麹菌ゲノム上の長鎖タンデムリピート構造の解析

若井　暁[1]・荻野　千秋[2]・堤　浩子[3]・秦　洋二[3]・近藤　昭彦[1]
[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　工学研究科
[3]月桂冠株式会社　総合研究所
〒657-8501　神戸市灘区六甲台町 1-1　電話: 078-803-6462
Fax: 078-803-6462　E-mail: wakaists@pegasus.kobe-u.ac.jp

黄麹菌は酵素分泌生産能が非常に高く、古くから発酵食品分野や産業用酵素生産の分野で活躍してきた。加えて、本菌に他生物由来の遺伝子を導入した有用な遺伝子組換え体も数多く構築されている。この黄麹菌の遺伝子組換えにおいて、一度に複数の遺伝子を染色体上に組み込み強力な能力を獲得させる技術を確立してきたが、染色体上に新たな遺伝子が組み込まれた時の、挿入箇所やコピー数について明らかにできていなかった。そこで、本研究では、核酸配列を長く解読可能なナノポアシーケンサを用いることで、その数万塩基対から成る長い繰り返し配列構造を明らかにすることに成功した。

1.　はじめに

黄麹菌（*Aspergillus oryzae*）は、1000 年以上前から発酵食品分野で利用されてきた日本を代表する微生物である。本菌が発酵食品分野で大きく活躍した機能の一つとして、細胞外に著量の酵素を生産するという能力があり、この能力は生物界でもトップクラスである。そのため、発酵食品の分野だけでなく、産業用酵素生産の分野においても大いに活躍している。天然に持っている強力なタンパク質分泌生産能力を利用することで、著者らはこれまでに、多数の有用な遺伝子組み下記麹菌の開発に成功してきた。

この背景には、麹菌の染色体上に複数コピーで遺伝子を導入する技術であるコトランスフォーメーションがある。通常 1 コピーである遺伝子を複数個染色体上に備えさせることで、その遺伝子を強力に発現させることが可能になる（図 1）。

一方で、この手法には問題も残っており、染色体上のどの位置にどういう形で、またどういうメカニズムで導入されているのかは体系的に調べられていなかった。これらの点を明らかにしなければ、技術としての不安定性や、創出した遺伝子組み換え体の機能欠損などが危惧され、効率的な組み換え体の創出の妨げにもなる。

本研究では、近年急速に技術開発が進んでいる長鎖 DNA 解析技術であるナノポアシーケンサを用いた全ゲノム構造の解析を試み、染色体上での導入遺伝子の構造を明らかにしたので報告する。

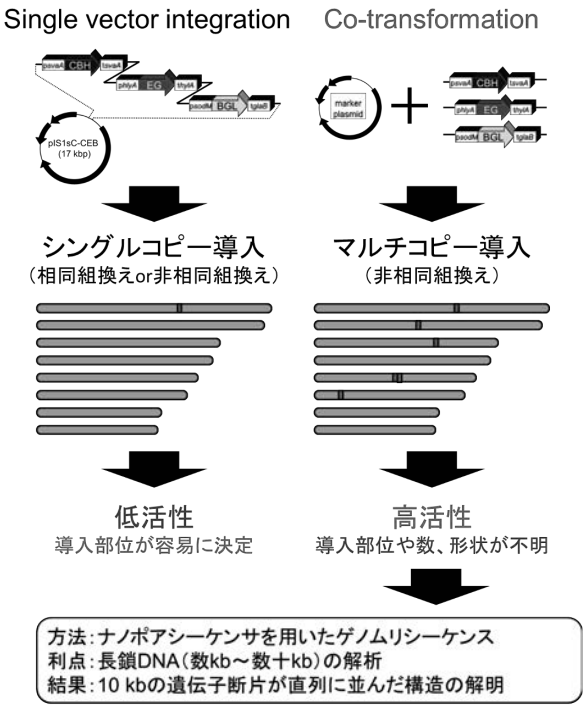


図 1. 黄麹菌遺伝子組換え技術と研究概要

2. 結果と考察

(1) 遺伝子組み換え黄麹菌の遺伝子コピー数の定量

三種セルラーゼを高発現させるために創出した遺伝子組み換え黄麹菌の細胞から DNA を抽出し、定量 PCR により、染色体上の三種セルラーゼ遺伝子のコピー数を推定した。染色体上に 1 コピーで存在する遺伝子を基準とした結果、三種セルラーゼ遺伝子は、それぞれ約 5 コピー導入されていることが分かった。

三種セルラーゼ高発現黄麹菌のセルロース分解活性は、それぞれ 1 コピーずつしか持っていない黄麹菌と比べると約 10 倍も高く、これは遺伝子が複数コピー入っていることで説明できる。一方で、これらのセルラーゼ遺伝子の挿入位置や挿入方向については、定量 PCR では明らかにできない。

(2) ナノポアシーケンス解析

黄麹菌のゲノム再解析には、超並列型次世代シーケンサ（MiSeq など）を用いた方法が一般的だが、約 300 塩基程度のショートリードを幾ら並べても、約 10 kb の長さを持つ遺伝子カセットの導入状態をゲノム上に並べて可視化することは不可能である。そこで、長鎖 DNA 分子の解析が可能なナノポアシーケンサを本実験に導入することとした。

長鎖 DNA 解析のためには、長い DNA 分子の割合が高く、夾雑物を含まない良質な DNA 溶液を調製することが必要である。今回、糸状菌細胞からの DNA 抽出法として詳細に検討したので発表では紹介するが、本原稿では省略する。得られた良質な DNA 溶液を用いて、再度ナノポアシーケンサ（MinION）により解析を行った。その結果、合計鎖長 1.6 Gb の配列を決定した。

DNA アライメントツールとして Minimap2 を用いて、全リードをセルラーゼ遺伝子に対してマッピングし、マッピングされた配列のみを抽出した後、黄麹菌 *A. oryzae* RIB40 のゲノム配列に対して再マッピングを行い、ゲノム上でセルラーゼ遺伝子が導入されている場所を特定した(図 2)。

解析前は約 10 kb のセルラーゼ遺伝子カセットが分散して導入されていると予想していたが、特定の場所に集積されている構造が見えてきた。特に、ゲノム上のある場所では、逆向きに 2 セット以上のセルラーゼ遺伝子カセットが導入されており、特殊な折り返し構造が見つかった。また、三つ以上のカセットが直列に並んだと思われる構造も確認されており、30 kb 強の巨大な構造が見えてきた。このような構造を超並列型次世代シーケンサでの解析結果から導き出すのはほぼ不可能であり、長鎖 DNA に特化したナノポアシーケンサの強みが出る結果となった。

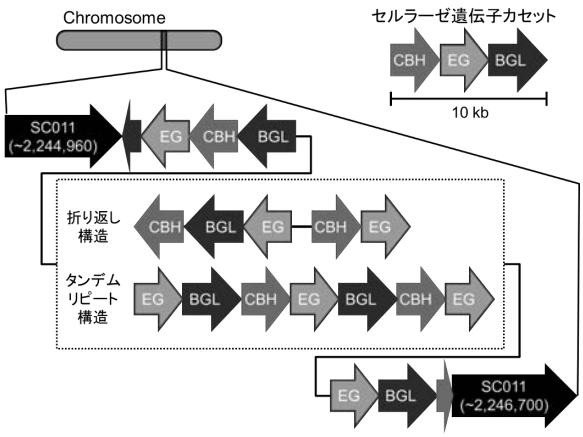


図 2. 導入遺伝子のゲノム上の構造

3. 今後の展望

コトランスフォーメーションにより複数遺伝子断片が導入されたゲノム構造を解析する技術が確立できたので、これまでに作成した形質転換体を用いた比較解析を行い、ゲノム上での外来遺伝子断片の導入メカニズムを明らかにする。例えば、遺伝子導入されやすいゲノム上のホットスポットの解析など、この様な理解は遺伝子組み換え体の不安定性の回避に繋がると考えられる。

今回、予想外な構造として、ゲノム上の一カ所に数十 kb を越える全長で複数コピーの遺伝子が並んで導入されていることが明らかである。このメカニズムが解明できると、複数の外来 DNA 断片を連結した長鎖 DNA を構築することが可能となる。近年、合成生物学分野で求められている新たな長鎖 DNA 合成技術として開発することが期待される。

4. 謝辞

本研究は文部科学省先端融合領域イノベーション創出拠点形成プログラム、および、科研費・挑戦的萌芽 16K14887 の支援を受けて行われたものです。

研究のポイント

（背景）多重遺伝子導入による黄麹菌の遺伝子組換え
（問題）組換え後のゲノム構造とメカニズムの不理解
（トライ）ナノポアシーケンサの適用
（成果）長い繰り返し配列構造と導入部位の解明
（発展性 1）マルチコピー導入メカニズムの解明研究
（発展性 2）新しい長鎖 DNA 断片作成技術の開発

生きた植物からの非破壊糖取出し方法の検討

米倉　円佳 [1]*、青木　直大 [2]、廣瀬　竜郎 [3]、近藤　聡 [1]、大音　徳 [4]
[1] トヨタ自動車・アグリバイオ事業部、[2] 東大院・農生科、[3] 農研機構・中央農研、[4] トヨタ自動車・T-フロンティア部
*〒470-0201　愛知県みよし市黒笹町丸根 1099 番地　トヨタ　バイオ・緑化研究所　電話: 0561-36-8416
Fax: 0561-36-8469　E-mail: madoka_yonekura@mail.toyota.co.jp

[要旨] 著者らはこれまでに糖トランスポーターの一種である SWEET（Sugars Will Eventually be Exported Transporter）の過剰発現と葉の排水現象とを利用して、生きたシロイヌナズナやイネから非破壊で糖を取り出せることを報告した。中でもシロイヌナズナの *AtSWEET12* を、カリフラワーモザイクウイルス(CaMV) 35S プロモーター制御下に過剰発現すると、高濃度の糖（単糖当量で平均 10.2 mM）を含む排水液が得られたが、この過剰発現体では顕著な生育阻害が見られた。そこで *AtSWEET12* を発現する最適プロモーターの検討を行った。その結果 *CAB1* プロモーターを用いると、高糖濃度の排水液が得られ、その生育は野生型とほぼ同等であった。このことから、プロモーターの最適化により、生育の遅延を回避しつつ、非破壊で植物から糖を取り出すことが可能であることが示された。

1.　はじめに

植物の光合成産物である糖類（ショ糖、デンプン、セルロースなど）をバイオプラスチックやバイオ燃料の原料として利用する際には、収穫した植物体からの搾汁・抽出や収穫物の分解・発酵などが必要である。また、糖類の分解・発酵には微生物が資化しやすいショ糖、グルコース、フルクトースなどの可溶性糖が望ましい。したがって、植物から可溶性糖を非破壊で連続的に取り出すことが可能になれば、製造コストの低減技術につながると思われる。そこで我々はこれまでに、①糖トランスポーターの一種である SWEET（Sugars Will Eventually be Exported Transporter） [1, 2] を用いて、葉組織内の糖を細胞外（アポプラスト）に放出させ、それを②葉の排水現象 [2]を利用してアポプラストから植物体外に排水液として排出させることを試み、非破壊での糖取り出しに成功した（図 1）[3]。

モデル植物シロイヌナズナでは Clade I からⅣに分類される全 17 種類の *AtSWEET* 遺伝子が知られるが [1]、中でも CladeⅢに属する *AtSWEET12* を、カリフラワーモザイクウイルス(CaMV) 35S プロモーター制御下で過剰発現すると、最も高濃度の糖（単糖当量で平均 10.2 mM）を含む排水液が得られた。しかしこの過剰発現体では顕著な生育阻害が見られた。そこで *AtSWEET12* を過剰発現するプロモーターについて検討し、生育阻害を回避しつつ糖を取り出す可能性を探った。

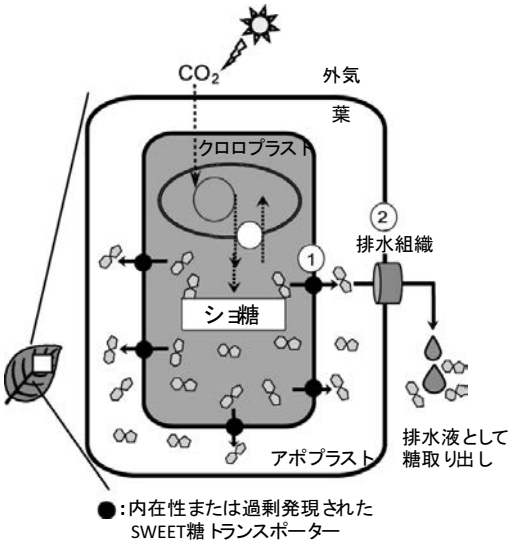


図 1. 植物からの非破壊糖取り出し方法の概要

2.　解析データおよび方法

(1)　組換え体の作出

発現部位や時期、発現量が異なると考えられる、4 種類のプロモーター（クロロプラスト RNA ポリメラーゼをコードする *AtSIG1* 遺伝子、ショ糖トランスポータ

ーをコードする *AtSUC4* 遺伝子、集光性クロロフィルタンパク質Ⅱのサブユニットをコードする *CAB1* 遺伝子、ヒートショックタンパク質をコードする *HSP18.2* 遺伝子のプロモーター）を用いて、*AtSWEET12* のシロイヌナズナ過剰発現体を作出した。

(2)　排水液の採取と分析

植物体をプラスチックバットに並べ、排水液を回収する前日の暗期開始前に 2,000 倍希釈ハイポネックス液で潅水し、湿度を高く保つためにラップフィルムをかけた（ラップ法、図 2A）。翌朝ラップフィルムを外し、葉の縁に生じた排水液（図 2B）を速やかにマイクロピペットにより回収し、排水液中の糖（ショ糖、グルコース、フルクトース）を HPLC で定量分析した。

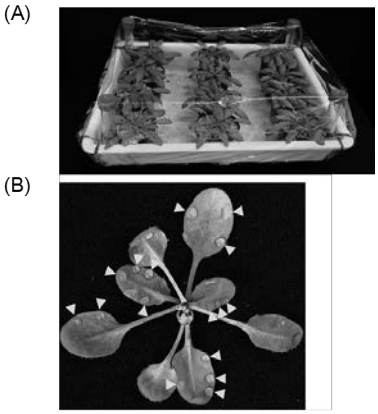


図 2. 排水液採取方法(A) と排水液(B) の様子

3.　結果と考察

***AtSWEET12* を過剰発現する最適プロモーターの検討**

発現部位や時期、発現量が異なると考えられる、*AtSIG1*、*AtSUC4*、*CAB1*、*HSP18.2* の 4 種類のプロモーターで *AtSWEET12* を過剰発現させたシロイヌナズナの葉からラップ法により排水液を採取して糖濃度を分析した。野生型のシロイヌナズナの排水液には、ショ糖 1.9 ± 0.8 μM、グルコース 2.0 ± 0.3 μM、フルクトース 2.1 ± 1.0 μM、これらの合計では 7.9 ± 2.0 μM（単糖換算）の糖が含まれていた。*AtSIG1*、*AtSUC4*、*HSP18.2* プロモーターを用いた場合、糖濃度は野生型と同程度で、過剰発現の効果は見られなかった。一方、*CAB1* プロモーターを用いた場合には、それぞれショ糖 1.1 ± 0.2 mM、グルコース 1.8 ± 0.4 mM、フルクトース 2.6 ± 0.5 mM、合計 6.6 ± 1.2 mM（単糖換算）の糖を含んでおり野生型や他のプロモーターによる過剰発現体よりも高濃度であった（図 3A）。また、*CAB1* プロモーターによる過剰発現体の生育は、野生型とほぼ同等であった（図 3B）。

これらのことから、プロモーターの選択は排水液中の糖濃度や過剰発現体の生育に強く影響する要因であることがわかった。

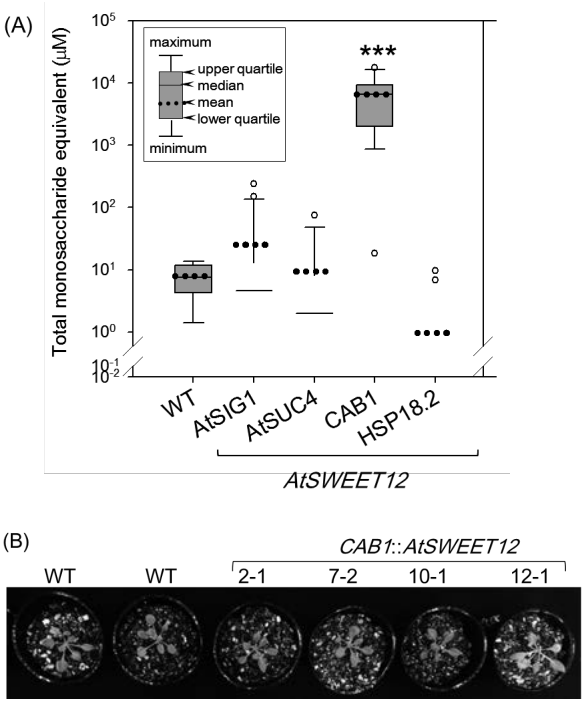


図 3. 排水液中の糖濃度比較(A)と生育比較(B)

***WT（野生型）に対して有意差あり(P<0.001,Mann-Whitney U-test)

4.　今後の展望

本技術は植物が光合成した糖をいわゆる「横取り」する技術であるため、植物の生育阻害を極力回避しつつ、より多くの糖を取り出すことが課題となる。そうしたなか、本研究によりプロモーターの最適化が課題解決の鍵となりうることが示された。今後、プロモーターの最適化に加えて、糖の合成能力や排水液採取の効率性、栽培コストなども加味してより好適な植物種を選定していくことで、より高濃度の糖の取り出しが可能となり、実用化に繋がることが期待される。

参考文献

[1] Chen, LQ., *et al*.: Nature, 468, 527-532 (2010).
[2] 青木　直大 他.: 化学と生物, 56 (1), 33 – 38 (2017)
[3] Singh, S.: Aust. J. Bot., 61, 497-515 (2013).
[4] 米倉　円佳 他.: 生物工学誌, 96 (3), 129-136 (2018)

廃菌床由来バイオエタノールの発酵生産

小林 洋介 [1], 藤森 一浩 [2], 西島 拓人 [1], 杉本 直久 [1], 藤野 尚人 [1],今井 史規 [3], 金松 雅俊 [3],

山田 憲治 [3], 荒井 進 [3] , 吉田 浩爾 [1], 佐賀 清崇 [1], 泉 可也 [1]

1(株)Biomaterial in Tokyo, 2 産総研・生物プロセス, 3 三友プラントサービス（株）

〒277-0872 千葉県柏市十余二 572-58　電話: 04-7135-5201

Fax: 04-7135-5201　E-mail: kobayashi.y@biomt.onmicrosoft.com

食用キノコの栽培に用いられた菌床 (廃菌床)は、バイオ燃料へ転換可能な未利用バイオマスの一つである。しかし、廃菌床は糖化および発酵効率に影響する阻害物を多く含むため、その利用は困難であると考えられてきた。また、廃菌床は他のバイオマスに比べて Xylose の含有率が高いため、高い Ethanol 収率を得るには Xylose を Ethanol に変換可能な発酵微生物が必要不可欠である。本研究では、廃菌床から Ethanol を生産する技術の確立を目指し、糖化・発酵条件の検討を行った。

国内初の連続水蒸気爆砕装置を用いて廃菌床を爆砕し、糖化後、Xylose を資化しない非組換え酵母の培養液を 1/10 量加えて発酵を試みたが、Glucose ですら資化できず、Ethanol をほとんど生産することができなかった。しかし、発酵開始時 pH を 5.5 以上にすると、Ethanol 生産が可能であることが分かった。さらに、C5C6 糖同時発酵遺伝子組換え酵母を用いて発酵試験を行った結果、Glucose 及び Xylose のほとんどを 72 h 以内に消費し、全糖から Ethanol への変換効率は 90%以上に到達した。本研究により、廃菌床はセルロース系エタノール生産に適した原料であることを初めて明らかにした。

1. はじめに

近年の CO2 排出量増加などの環境対策として、第二世代バイオエタノール製造が行われている。海外では、第一世代バイオエタノール製造プラントの設備を併用し、未利用バイオマスを大規模に収集・運搬することで調達コストを低減しつつ、第二世代バイオエタノールを製造している。しかし、日本では一区画当たりの圃場面積が小さいことに加え、第一世代バイオエタノール製造プラントがほとんど稼働していないため、このような海外のシステムを適用することができない。そのため、国内でバイオエタノールを生産するためには、安定かつ安価に収集可能なバイオマス資源の確保が重要な課題である。

廃菌床は、食用キノコ生産にともない年間数十万トンが残渣として生じている [1]。廃菌床の主原料はコーンストーバーであり、重量ベースで 50%程度のホロセルロースが含まれていることから、第二世代バイオエタノール生産の原料として高い可能性を秘めている。しかし、廃菌床に多く含まれる糖化および発酵効率に影響する阻害物質のためエタノール発酵が困難であり、その利用に関してこれまで十分な研究が進んでいなかった。また、廃菌床は他のバイオマスに比べて Xylose の含有率が高いため、高い Ethanol 収率を得るには Xylose を Ethanol に変換可能な発酵微生物が必要不可欠である。このような課題に対して、我々は世界では主流になっている連続水蒸気爆砕装置を国内で初めて導入し、その運用試験を行っている[1]。本研究では、廃菌床から Ethanol を生産する技術の確立を目指し、糖化・発酵条件の検討を行った。

2. 解析データおよび方法

連続水蒸気爆砕装置で 200℃、10 min 間の条件で処理した廃菌床を全糖濃度が 120 g/L 以上になるように糖化を行い、それを用いて 38℃で発酵試験を行った。

3. 結果と考察

(1) pH 調整による発酵阻害の軽減

発酵開始前の pH が 4.5、5.0、5.5、6.0 になるように調整後、非組換え酵母を用いて 38℃で発酵試験を行った。その結果、pH5.5、6.0 のサンプルでは、48 h 以内にほぼ全量の Glucose を消費し、Ethanol を生産することが可能であることを明らかにした (図 1)。

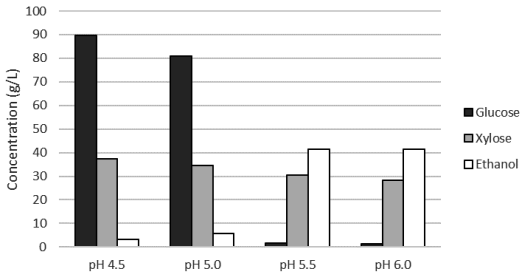


図 1. 発酵開始時 pH の発酵性能への影響 (48 h)

この結果から、廃菌床を用いた発酵では pH5.5 以上にすることで、Glucose を基質とするエタノール発酵が可能であることが分かった。しかし、酵母は pH5.5 以下でも発酵することが知られているため[2]、酵母の pH 感受性ではなく、発酵開始時の pH を高くすることによって、廃菌床に含まれる何らかの阻害物質の影響が低減されるものと考えられる。

(2) 組換え酵母を用いた C5 糖からの Ethanol 生産

廃菌床を原料とするエタノール発酵において、開始時の pH が重要であることが分かり、実際に廃菌床から Ethanol を生産することが可能になった。そこで、組換え酵母を用いた Xylose からの Ethanol 生産の検討に着手した。使用した組換え酵母は Xylose 代謝酵素として Xylose isomerase を導入し、副生成物の生産を抑えた株で、Xylose を含む合成培地だけでなく、サトウキビバカスを原料とした同時糖化並行複発酵においても、全糖から Ethanol への変換効率は 90%以上を達成しているものである[3]。この組換え酵母を用いて、同様に発酵試験を行った結果、廃菌床に含まれるほぼ全量の Xylose を Ethanol に変換し、全糖から Ethanol への変換効率 90%以上を達成した (図 2)。

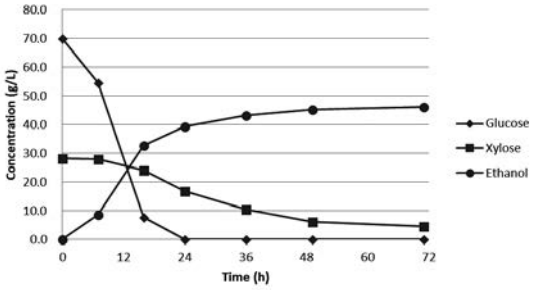


図 2. 組換え酵母を用いた発酵試験の結果 (C15 株)

以上の結果から、廃菌床は阻害物質を多く含むため、従来、セルロース系エタノール生産には適していないと考えられてきたが、Ethanol を生産可能な有望な原料であることをはじめて明らかにした。

4. 今後の展望

本研究では、廃菌床からバイオエタノールを効率的に生産することが可能であることを示したが、同時に新たな課題も見えてきた。発酵微生物については、pH5.5 を境に、急激に発酵性能が向上する原因は不明であり、この現象に関与する廃菌床に含まれる物質、酵母の阻害物質耐性、そして Carbon catabolite repression との関係を明らかにする必要があるだろう。発酵プロセスについては、今回行った廃菌床の前処理 (爆砕)条件は、C6 糖を多く回収できるが、C5 糖を含めた全糖の回収率としてはやや低い非組換え酵母に適した条件であった。そのため、組換え酵母に適した全糖回収率の高い爆砕条件とその爆砕条件に適した糖化酵素の検討、さらにスケールアップ試験等の実用化に向けた研究に、現在、取り組んでいるところである。

バイオエタノールに関する研究は、長年、産学官連携により多くの企業、大学、研究機関で進められてきたが、実用化に結びついた例は少ない。我々はこれまでに培ってきた技術を集約し、国内において安定したバイオエタノール生産の事業化にむけた研究開発および環境整備を進めている。また、上記のような課題を関係各所と協力して解決し、産学官連携のモデルケースになることを目指している。

本研究はバイオマスエネルギー技術研究開発／セルロース系エタノール生産システム総合開発実証事業／パルプを用いた水蒸気爆砕法によるバイオエタノール生産に関する技術開発および事業性評価 (NEDO)による成果である。

参考文献

[1] 佐賀 清崇他.: 第 26 回日本エネルギー学会大会, (2017)

[2] Neelakantam V. et. al.: Appl. Environ. Microbiol., 71: 2239–2243 (2005)

[3] 藤森 一浩他.: 第 68 回日本生物工学会大会, (2017)

発酵(*R*)-3-ヒドロキシ酪酸と α-ヒドロキシ酸の共重合体の化学合成と生分解

常盤 豊[1,4]・中山敦好[1]・川崎典起[1]・山野尚子[1]・伊田小百合[1]・楽 隆生[2]・世嘉良宏斗[3]
（1 産総研、2 甲南化工、3 沖縄県工技セ、4 トロピカルテクノプラス）
〒563-8577　大阪府池田市緑丘 1-8-31　電話: 072-751-9522
Fax: 072-751-8370　E-mail: y.tokiwa@ aist.go.jp

パイロットスケールで発酵生産した高純度(*R*)-3-ヒドロキシ酪酸を主成分とする、L-フェニル乳酸、L-ロイシン酸、インドール乳酸、L-リンゴ酸、L-マンデル酸との共重合体を化学合成して、酵素および海水による分解性を評価した。共重合体は PHB 分解酵素および海水による試験で高い分解性を示した。α-キモトリプシンはポリ-L-フェニル乳酸、ポリ-L-ロイシン酸を分解した。

1. はじめに

最近、マイクロプラスチック汚染が海洋生態系への脅威だとして注目されている。微生物が作るポリ-3-ヒドロキシ酪酸（PHB）は、海洋でも分解しやすい生分解性プラスチックとして知られている。しかし、微生物が作る PHB やその共重合体は、微生物由来の不純物を含むなどの問題があり、未だ広く普及していない。

私たちは、沖縄で分離された *Halomonas* sp. OITC1261 株を用いてパイロットスケールで生産し、高純度に精製された(*R*)-3-ヒドロキシ酪酸（R3HB）の用途開発を行っている（R3HB は PHB の構成単位である）[1]。

トロピカルテクノプラスを代表企業として、甲南化工、金秀バイオ、産総研、九工大の 5 機関でグリーンマテリアル生産技術事業共同体を形成し、沖縄県工業技術センターと共同で、R3HB からの機能性樹脂、機能性食品・化粧品などの開発に取り組んでいる。

R3HB は生分解性プラスチックなどの機能性樹脂の原料だけでなく、抗生物質や医薬品の原料でもある。また、R3HB はヒトの血液中にも常に存在する重要なエネルギー源の一つでもある。

すでに、R3HB を主成分とする、グリコール酸、L-乳酸、ラセミ体 3HB との共重合体やポリウレタンを化学合成して、酵素や海水、活性汚泥を用いてそれらの分解特性を解明してきた（図 1）。その結果、海水や活性汚泥による分解性に優れ、マイクロプラスチック汚染の防止に役立つと思われる素材が得られたことを報告した（第 69 回日本生物工学大会講演要旨集、2P-J196）。

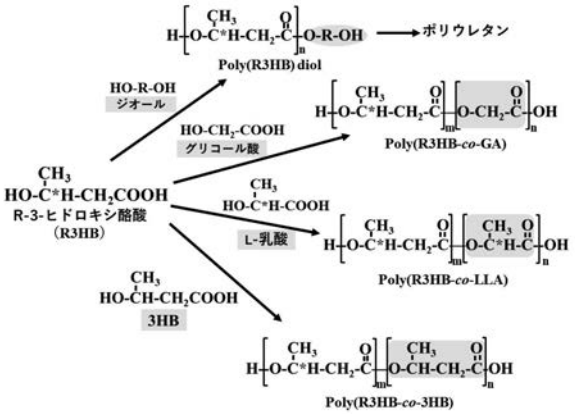


図 1 (*R*)-3-ヒドロキシ酪酸を用いた共重合体等の合成

乳酸やグリコール酸は α-ヒドロキシ酸の一種であり、それらを重合させたポリ乳酸やポリグリコール酸は α-エステル結合からなる特殊なポリエステルである。ポリ乳酸、ポリグリコール酸およびその両者の共重合体は、すでに工業生産されておりプラスチック素材としてだけでなく、抜糸しなくてもよい手術用の糸などとして医療分野でも広く使用されている。

一般に、脂肪族ポリエステルはリパーゼにより分解される[2]が、ポリ乳酸はリパーゼで分解されず、プロテイナーゼ K、エラスターゼなどのセリンプロテアーゼで分解される[3]。酵素による分解特性からは、ポリ乳酸はアラニンやグリシンを多く含む絹糸やエラスチンなどの蛋白質に似ていると考えられる。アラニンとグリシンに化学構造が対応する α-ヒドロキシ酸が乳酸とグリコール酸である。

今回、フェニルアラニン、ロイシン、トリプトファン、アスパラギン酸などのアミノ酸の化学構造に対応するフェニル乳酸、ロイシン酸、インドール乳酸、リンゴ酸などの α-ヒドロキシ酸に注目して、R3HB との共重合体および単独重合体の化学合成を行い、それらの酵素や海水による分解性を評価した（図２）。

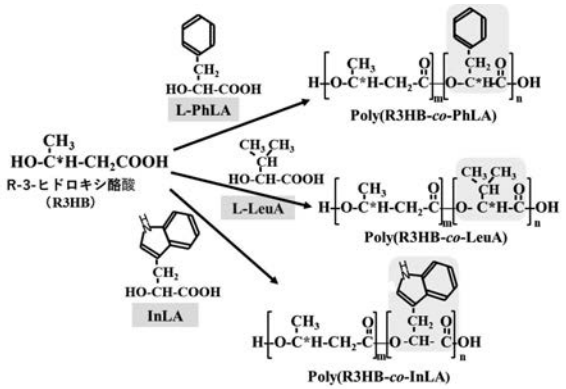


図２ R3HB とα-ヒドロキシ酸との共重合体の合成

2. 方法

(1) 重合体の化学合成と物性評価

光学純度 99%ee の発酵 R3HB と種々の α-ヒドロキシ酸を *p*-トルエンスルホン酸を触媒に用いて、トルエン中で脱水重合することにより重合体を得た。重合体の分子量は 1,1,1,3,3,3-ヘキサフルオロ-2-プロパノールを溶媒とした GPC により、融点は DSC により求めた。共重合体の組成は、NMR データの解析により求めた。

(2) 重合体の生分解性の評価

重合体の生分解性は、*Streptomyces* sp. MG 株の PHB 分解酵素[4]、プロテイナーゼ K、α-キモトリプシンおよび BOD テスターを用いて海水により評価した。

3. 結果と考察

(1) R3HB と α-ヒドロキシ酸からなる高分子の合成

モル仕込み比 90:10 で、R3HB と L-フェニル乳酸および R3HB と L-ロイシン酸を反応させた場合、それぞれ組成比 91.6:8.4（分子量 *M*w 3600、*T*m 118℃）、組成比 90.6: 9.4（分子量 *M*w 11600、*T*m 119℃）の重合体が得られた。

また、R3HB とインドール-3-乳酸および R3HB とリンゴ酸を同様に反応させた場合、それぞれ *M*w 2880、*M*w 8070 の共重合体が得られた。また、R3HB と芳香環を持つ L-マンデル酸をモル仕込み比 90:10 で反応させた場合、組成比 95.2:4.8、分子量 *M*w 8610 の共重合体が得られた。

一方、α-ヒドロキシ酸の単独重合体として、ポリ L-フェニル乳酸（*M*w 8180、*T*m 47.4℃）、ポリ L-ロイシン酸（*M*w 6800、*T*m 119℃）、ポリインドール乳酸（*M*w 1780、*T*m 130℃）、ポリ L-リンゴ酸（*M*w 8220）およびポリ L-マンデル酸（溶媒不溶）が得られた。

(2) 酵素による分解性試験

PHB 分解酵素は、モル仕込み比 90:10 のそれぞれの共重合体に対して、高い分解性を示した。しかし、プロテイナーゼ K は、共重合体をほとんど分解しなかったが、単独重合体のポリ L-ロイシン酸とポリ L-リンゴ酸に対して分解活性を示した。一方、α-キモトリプシンは、単独重合体のポリ L-フェニル乳酸、ポリ L-ロイシン酸およびポリ L-リンゴ酸に対して比較的高い分解活性を示した。これは α-キモトリプシンが蛋白質の L-フェニルアラニンや L-ロイシンのカルボキシル基側のペプチド結合を切ることと関係があると考えられた。

(3)海水による分解性試験

海水による 27℃、3 週間の分解性試験では、酵素による分解性が認められたポリ L-フェニル乳酸とポリ L-ロイシン酸の分解性は認められなかったが、R3HB との共重合体は高い分解性を示した。また、R3HB と L-マンデル酸との共重合体も、ポリカプロラクトンと同等の生分解性を示した。

4. 今後の展望

R3HB をベースとした各種 α-ヒドロキシ酸との共重合体は、R3HB をベースとしたポリウレタンと同様に、海水中でも分解しやすい高分子素材であることが明らかになってきた。

今後、海水での分解性とともに、用途に応じて求められる物性をもった素材の創出に注力する。

参考文献

[1] Yokaryo H, *et al.*: *Biotechnol. J.* 13 (2). DOI: 10.1002/biot.20170343 (2018)

[2] Tokiwa Y and Suzuki T: *Nature* 270, 76-78 (1977)

[3] Tokiwa Y and Calabia B P: *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 72, 244-251 (2006)

[4] Calabia B P and Tokiwa Y: *Biotechnol. Lett.* 28, 383-388 (2006)

Target-AID を利用したゲノム編集による 高収率ブタノール発酵性クロストリジウム属微生物の育種

向山　正治[1]・市毛　栄太[1]・田中　勉[2]・西田　敬二[3]・近藤昭彦[2,3]
[1] 株式会社日本触媒　研究センター
〒654-0034　吹田市西御旅町 5-8　電話: 06-6317-2219
Fax: 06-6317-2219　E-mail: masaharu_mukoyama@shokubai.co.jp
[2] 神戸大学大学院工学研究科　応用化学専攻
[3] 神戸大学大学院科学技術イノベーション研究科

ゲノムを切らないゲノム編集技術 Target-AID を用いて *Clostridium saccharoperbutylacetonicum* ATCC27021 の酢酸生成系、酪酸生成系遺伝子を破壊しブタノール収率 79mol%の菌株を作成した。またアセトン生成系遺伝子を併せて破壊することによってアセトン生成がない実質的にホモブタノール発酵性の菌株を作成した。

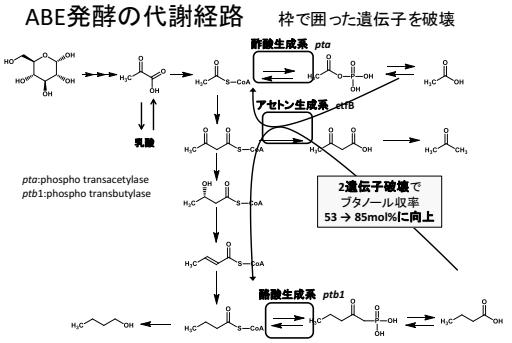
○はじめに

n-ブタノール（ブタノール）は化学品として広く使用されており、自動車向けの燃料としても利用可能であることから、近年、再生可能資源からの化学品生産の一環としてアセトン・エタノール・ブタノール（ABE）発酵が再検討されている。ABE 発酵ではブタノール以外にアセトン、エタノールが著量生成するためブタノール収率が低い問題がある。

日本触媒では n-ブタノールをアクリル酸エステル用のアルコールとして使用しており日本最大のユーザーの一つであることから、石油に依存しない持続可能な原料への転換、温暖化抑制の観点で再生可能資源からの製造方法の確立を目指して n-ブタノールを高収率で生産する菌株の開発を行った。

日本で分離された *Clostridium saccharoperbutylacetonicum* ATCC27021 株はアセトン : ブタノール : エタノールを 3:6:1 の重量比で生成する。 この株を用いて GoupII イントロンを利用した遺伝子破壊により、酢酸生成系 pta 遺伝子、酪酸生成系 ptb1 遺伝子、さらにアセトン生成系 ctfB 遺伝子を破壊することで実質的に n-ブタノールのみを生成するブタノールホモ発酵菌株を構築したことを 2014 年度日本生物工学会大会において報告した。[1]　（図―1）また 2017 年度日本生物工学会大会においてゲノムを切らないゲノム編集技術 Target-AID[2] を用いて上記の pta、ptb1 遺伝子の改変を試みた結果について報告した。[3]

今回はこれらの改変を組み合わせることで n-ブタノールを高収率で生産する菌株の作成に成功したので報告する。

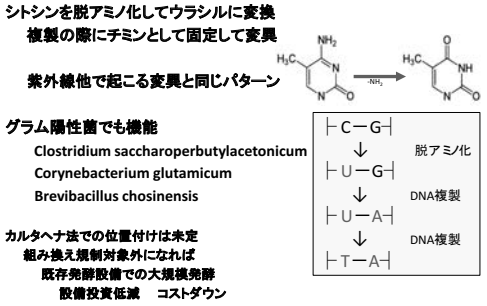


ABE発酵の代謝経路

○Target-AID とは

Target-AID は神戸大学西田らによって開発されたゲノム編集技術である。CRISPR では特定の配列を認識する g-RNA に導かれて CAS9 タンパク質がゲノム DNA と結合し 2 本鎖 DNA を切断するがその修復過程において欠失挿入が生じることで変異が導入される。それに対して Target-AID ではゲノムを切断しない変異型の dCAS9 とヤツメウナギ由来のシチジンデアミナーゼの融合タンパク質がゲノム DNA に結合した後、認識配列の 5'側に存在するシトシン（C）のアミノ基を脱アミノ化してウラシル（U）に変換する。この変換された塩基がゲノム DNA の複製によってチミン（T）として固定されることにより変異が生じる。

Target-AIDによるゲノム編集の仕組み 1

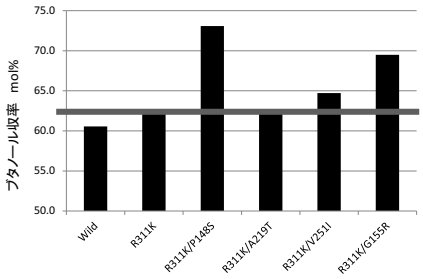


Target-AIDの仕組み 2

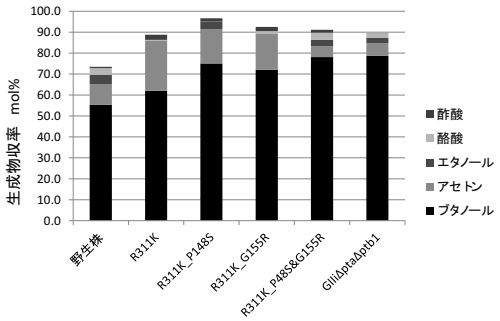
細菌などの原核微生物は切断されたゲノム DNA の末端を連結して修復する能力が低いため CRISPR でゲノムが切断されると死滅してしまう。そのため CRISPR では効果的にゲノム編集を行うことが困難である。Target-AID はゲノムを切断しないので原核生物でも死滅することなく効率的なゲノム編集を行うことができる特徴を有している。

○Target-AID を用いた菌株育種

大腸菌と Clostridium の両方で使用可能な pKNT19 プラスミドに Target-AID を構成する dCAS9-PmCDA と g-RNA を発現する遺伝子断片を挿入したクロストリジウム用のゲノム編集用ベースプラスミドを作成した。このプラスミドに①酵素タンパク質の合成を途中で停止する終止コドンを形成する②酵素タンパク質の活性中心を改変する、③酵素タンパク質の構造を改変するアミノ酸変異を導入する g-RNA をデザインし、ゲノム編集用ベースプラスミドに挿入してゲノム編集用プラスミドを作成した。これらプラスミドで *C. saccharoperbutylacetonicum* ATCC27021 ⊿ *pta* 株（Target-AID によって PTA の活性中心を破壊した株 R311K）を形質転換し、得られた形質転換体を継代培養した後、単一コロニーを形成させ、目的の遺伝子配列を解析しゲノム編集された株の分離を行った。この操作を繰り返して複数個所の編集を行った。③のタンパク質の構造の変えることを狙って酪酸生成系の ptb1 遺伝子の単一個所を改変し PTB1 タンパク質の P148S、G155R、V251I を改変した株は有意にブタノール収率が向上した。



P148S と G155R の改変を二重に導入した株はアセトンの生成量が非常に少なくなり、GroupII イントロンで作成した Δ pta Δ ptb1 株と同等の高いブタノール収率を示した。



さらに上記の株のアセトン生成系遺伝子 ctfB を改変し CTFB タンパク質に P121L の改変を導入することによってアセトン生成を完全になくすことができた。

	野生株	P80S	P85S	P121L	親株
アセトン生成 g/L	7.1	5.1	0.3	0.0	3.0
pta		R311K	R311K	R311K	R311K
ptb1		P148S G155R	P148S G155R	P148S G155R	P148S G155R
ctfB		P80S	P85S	P121L	

○今後の展開

今回の Target-AID を用いて作成した株はゲノムの切断すらない遺伝子組み換えしていない産業用発酵菌株にあたる。これらのブタノール高収率株を用いた大規模ブタノール発酵によってバイオマス原料からのブタノール生産を実現し、再生可能資源からの化学品製造を推進していきたい。

○参考文献

[3] Keiji Nishida, Takayuki Arazoe, Nozomu Yachie, Satomi Banno, Mika Kakimoto, Mayura Tabata, Masao Mochizuki Science 2016:Vol. 353, Issue 6305, aaf8729

[1] 向山、中之庄、市毛、土橋、中山、田中、近藤 2014 年度日本生物工学会大会要旨集

[2] 向山、市毛、田中、西田、近藤 2017 年度日本生物工学会大会要旨集

大腸菌による L-theanine の発酵生産法の開発

大野　翔登*・林　幹朗・田畑　和彦
協和発酵バイオ・R&I センター
〒747-8522　山口県防府市協和町　電話: 0835-22-2518
E-mail: syoto.ohno@kyowa-kirin.co.jp

L-theanine（以下、テアニン）は緑茶の旨味成分として知られるグルタミン酸誘導体の一種である。集中力向上効果やリラックス効果、快眠効果等の作用が報告されており、国内外で健康食品素材として使用されている。これまでにエチルアミン、L-glutamine（以下、Gln）を原料とした酵素法によるテアニンの工業的製法が開発されている。しかしながら、酵素法の基質であるエチルアミンは引火性のある危険な化合物であり、工業原料として用いるには特殊な設備を必要とするため製造コストが高い。そこで、我々はアセトアルデヒドに新規アミノトランスフェラーゼを作用させてエチルアミンを供給し、さらに生成したエチルアミンと L-glutamate（以下、Glu）からテアニンを合成する人工経路を設計し、*in vitro* 酵素反応で実証した。基質となるアセトアルデヒド、L-alanine（以下、Ala）、Glu は生物に広く存在する生化学物質である。そこで、大腸菌 K-12 株を宿主としてこれらの基質の生合成を強化する育種を実施し、テアニンの人工合成経路を導入した。結果、グルコースとアンモニアを原料として、テアニンを大量に発酵生産することに成功した。

1. はじめに

テアニンは緑茶の旨味成分として知られるグルタミン酸誘導体の一種であり、集中力向上効果やリラックス効果、快眠効果、更年期障害改善効果等の作用が謳われている。現在、国内外で健康食品素材として使用されており、1964 年には日本で食品添加物として指定された。

テアニンはその特徴的な機能から産業界の関心は高く、これまでに複数の製造法が報告されている。
その 1 つ目は抽出法であり、テアニンを含有する玉露の生産用茶園において得られる茶葉乾燥物から抽出する製法が開発されている。しかし、本製法ではテアニンは茶葉乾燥物あたりわずか 1.5%前後しか蓄積されないことから実用的ではないとされている[1]。2 つ目が有機合成法であり、ペプチド合成を用いた製法等が開発されているが、収率が低く、未反応原料や副生成物との混合溶液から目的生成物の分離精製等において煩雑な操作を必要とするという問題が指摘されている[2]。3 つ目が酵素を用いた製造法である。エチルアミンと Gln を基質に γ-glutamyltransferase 活性を有する酵素(glutaminase, γ-glutamyltransferase)を反応させるか、もしくはエチルアミンと Glu を基質に γ-amidation 活性を有する酵素(glutamine synthetase, γ-glutamylmethylamide synthetase)を反応させる製法が報告されている[3]。

2. 方法

酵素法のうち、Gln とエチルアミンを原料にした *Pseudomonas* 属細菌の固定化菌体を用いた glutaminase 反応によるテアニンの生産が現在報告されている最も効率的な製造方法である。しかし、本製法では添加するエチルアミンの沸点が 16.6℃と非常に低く、製造工程で揮発したエチルアミン蒸気が作業員や環境に悪影響を及ぼす可能性があり、また反応効率向上を目的として特別な設備が必要になる等の問題があるとされている[4]。

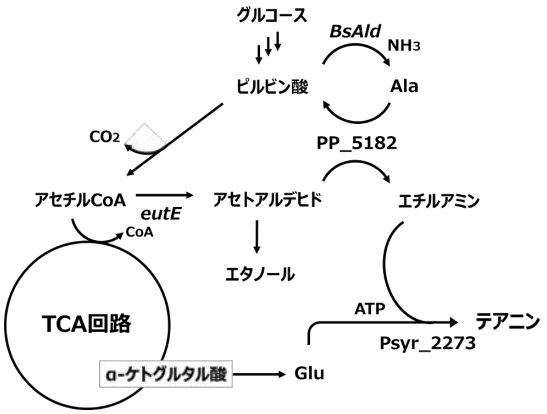


図 1. テアニンの人工合成経路

そこで、我々は糖代謝で合成されるアセトアルデヒドのアミノ化によりエチルアミンを供給する経路を利用したテアニンの直接発酵生産を考案した(図 1)。

この経路によりエチルアミンを供給することで、危険なエチルアミンの添加を回避することができる。また、グルコースとアンモニアを原料にテアニンを直接発酵することにより安価かつ高純度なテアニンを生産することができると考えた。

3. 結果と考察

(1) アセトアルデヒド→エチルアミンを触媒するアミノ基転移酵素の探索

アセトアルデヒドを基質にエチルアミンを生成するアミノ化酵素は報告がなかったため、アルデヒド末端をアミノ化することが知られている ω-トランスアミナーゼを候補として所望の反応を触媒する酵素を探索したところ、*Pseudomonas putida* 由来の PP_5182 が本反応を触媒することが明らかとなった。また、PP_5182 はアミノ基供与体として Ala を好むことも分かった(図 2)。

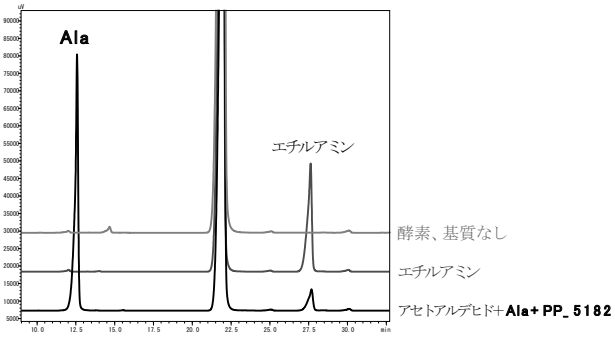


図 2　PP_5182 を用いたエチルアミンの合成

(2) テアニン合成酵素の探索

テアニンを合成する酵素としては、エチルアミン及び Glu から ATP 依存的にテアニンを合成する *Methylovorus mays* 由来 γ-glutamylmethylamide synthetase (GMAS) が報告されている[5]。本酵素は本来、Glu とメチルアミンを縮合し γ-glutamylmethylamide を合成する反応を触媒する酵素であり、微生物における窒素代謝の一躍を担っていると言われている。そこで、本酵素のホモログで活性の高い酵素を探索したところ、*Pseudomonas syringae* 由来 Psyr_2273 が本反応を効率的に触媒することを見出した。

(3)テアニン人工合成経路の設計及び *in vitro* での検証

本検討において見出した PP_5182 および Psyr_2273 を用いて、アセトアルデヒドおよび Glu からテアニンを合成する経路を想定し、*in vitro* で ATP および PLP、アミノ基供与体 Ala、アセトアルデヒド、Glu を大腸菌で組換え発現、精製した PP_5182 と Psyr_2273 と混合して反応させた。生成物を分析した結果、テアニンの蓄積を確認し、この人工合成経路が機能することが明らかとなった。

(4) 大腸菌によるグルコールからのテアニン生産検討

このテアニン人工合成経路において基質となるアセトアルデヒド、Ala、Glu は大腸菌の代謝活性で供給できる。そこで大腸菌 K-12 株を宿主に糖からのテアニンの発酵生産を試みた。まず、アセトアルデヒドの供給量を増加させるため、アセチル CoA→アセトアルデヒド＋CoA の反応を担う acetaldehyde dehydrogenase (*eutE*) を、また、PP_5182 のアミノ基供与体 Ala の供給量を増加させるため、ピルビン酸→Ala の反応を担う *Bacillus subtilis* 由来 alanine dehydrogenase (*BsAld*) の発現強化を実施した。上記の *eutE* および *BsAld*、さらにテアニン生産に関わる PP_5182、Psyr_2273 をプラスミド上で発現させた株を、糖源をグルコースとして試験管で培養したところ、テアニンの蓄積が確認された。また、本株をジャーファーメンターにて fed-batch 培養を実施したところ、20 g/L 以上のテアニンの蓄積が確認された。

4. 今後の展望

本研究では、テアニンの基質であるエチルアミンをアセトアルデヒドのアミノ化により合成する新規人工合成経路を設計した。各種実験の結果、アセトアルデヒドのアミノ化を担うアミノトランスフェラーゼ PP_5182 を見出すことに成功し、組換え大腸菌によりグルコースを原料にテアニンを生産することができた。本経路によるテアニン生産では基質となるエチルアミン添加の必要がないため、従来の製法よりも安全面・コスト面で優れていると考えられる。当社では本製法について特許出願済みであり、今後事業化に向け、本製法のさらなる研磨を継続していく。

参考文献

[1] 特開 2007-008865
[2] 特開 2006-083155
[3] Mu *et al.,* Biotechnol Adv 2015;33:335-342
[4] 特開 2009-225705
[5] Yamamoto *et al.,* Biosci Biotechnol Biochem 2007;71:545-52

乳酸高生産性黄麹菌における乳酸生産フラックス強化による乳酸生産性の向上

張斯来[1]・若井暁[1]・荻野千秋[2]・堤浩子[3]・秦洋二[3]・近藤昭彦[1]
[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　工学研究科
[3]月桂冠株式会社　総合研究所
〒657-8501 神戸市灘区六甲台町 1-1　電話: 078-803-6462
Fax: 078-803-6462　E-mail: zhangsilai@people.kobe-u.ac.jp

麹菌 (*Aspergillus oryzae*) は細胞外に様々な糖化酵素を大量に分泌することが可能であり、植物バイオマスから有用物質を生産する宿主微生物として期待されている。我々は、従来のプラスチックの代替品となるポリエステル系のプラスチックであるポリ乳酸の原料となる物質である乳酸の生産に着目した。乳酸は解糖系各代謝（TCA 回路、エタノールやアミノ酸生産）への分岐点となるピルビン酸から生産されるので、効率的な生産のためにはピルビン酸代謝を意識した代謝改変が必要である。本研究では、ピルビン酸ミトコンドリアキャリアタンパク質 (Mpc) を欠損させることでピルビン酸のミトコンドリアへ流れを抑制し、ピルビン酸を効率的に乳酸に変化させることに成功した。また、その際に、ピルビン酸が培地中に蓄積したため、乳酸生産フラックス強化を同時に行い乳酸生産性のさらなる向上にも成功した。

1. はじめに

麹菌はデンプン分解酵素アミラーゼを大量に分泌生産することで植物バイオマスの一つであるデンプンからの様々な物質生産に利用されている。我々はこれまでに栄養要求性株 *A. oryzae* NSPlD1 株に牛(*Bos taurus*) 由来 lactate dehydrogenase (LDH) 遺伝子を導入し、エタノール生合成経路でのピルビン酸デカルボキシラーゼ (PDC) を破壊したことで、100 g/L グルコースから約 49 g/L、100 g/L デンプンから 42 g/L の乳酸生産に成功している[1]。この際、TCA 回路の中間代謝産物であるリンゴ酸、コハク酸等の有機酸の生産も認された。そのため、ピルビン酸のミトコンドリアへの流れを抑制することが必要であると考えた。

酵母では、ピルビン酸がピルビン酸キャリアタンパクと呼ばれるタンパク質複合体によりミトコンドリアに運ばれており、この複合体が三つのタンパク質 (Mpc1, Mpc2, Mpc3) から構成されている[2]。麹菌ゲノム中から、二つの *mpc* 遺伝子が見つかり、それぞれの産物を MpcA および MpcB と命名した。本研究では、これらの遺伝子を欠損させることでピルビン酸の TCA 回路への流れを抑制することによる乳酸の生産性向上を目指した。また、乳酸経路を強化することで乳酸生産を更に高生産することを試みた。

2. 解析データおよび方法

BtLDH-Δ*pdc* 株を宿主株として、*mpcA* と *mpcB* の単独破壊・二重破壊株を作成した。また、乳酸生産経路を強化するため、*B. taurus* 由来の LDH (BtLDH) より

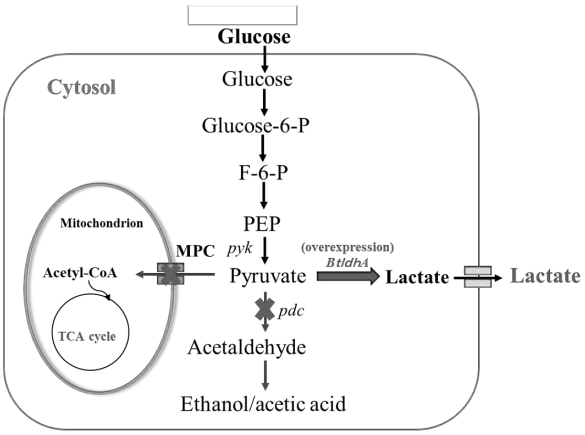


Fig 1. 麹菌における乳酸生産経路

活性が高い乳酸菌 (*Lactococcus lactis*) 由来の LDH をコードした遺伝子を*Δpdc-ΔmpcA* 株に導入した。構築した株を $CaCO_3$ を含む YPD 培地(10% glucose, 1% peptone, 0.5% yeast extract) に培養し、それぞれのグルコース消費量、乳酸・有機酸生産量を HPLC で調べた。

3. 結果と考察

(1) MPC 欠損における乳酸生産

BtLDH-*Δpdc* を宿主株とし、*mpc* の単独破壊株を作製し、乳酸生産を調べたところ、*mpcA* の単独破壊株では 100 g/L グルコースから約 81 g/L、*mpcB* の単独破壊株では約 67 g/L の生産が確認された(Fig 2)。また、グルコースから高い乳酸生産を示した*ΔmpcA* は 100 g/L デンプンから約 61 g/L の乳酸を生産した。その際、*mpcA* 破壊により、リンゴ酸、コハク酸及び酢酸の蓄積が著しく低下したが、ピルビン酸が *mpcA* 破壊により培地中に 20 倍以上に分泌されていた(Fig 3)。以上の結果から、*mpcA* 破壊によりピルビン酸のミトコンドリアへの輸送が抑制され、ピルビン酸が細胞質内に蓄積し、乳酸生産に効率的に利用されたと考えられる。

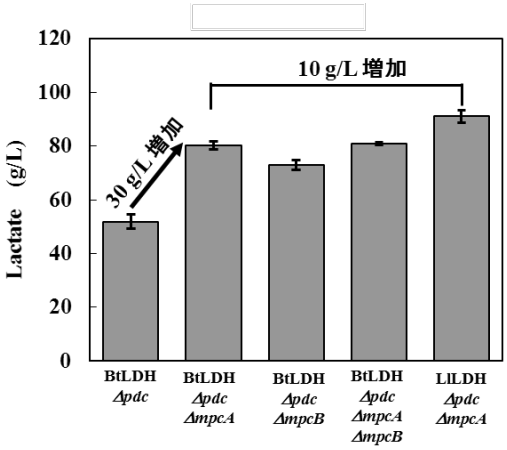


Fig 2. MPC 欠損やLlLDH 導入における乳酸生産性

(2) 乳酸経路の強化

これまでは酵母で高い乳酸生産性が確認されている BtLDH を麹菌に導入していた。MpcA 破壊により乳酸生産量が向上した一方で、MPC 非破壊株よりも培地中にピルビン酸が 20 倍以上漏れ出していたことから、乳酸生産経路を強化する必要があると考える。BtLDH より活性が高い乳酸菌由来の LlLDH をコードする遺伝子を *ΔpdcΔmpcA* 株に導入した結果、100 g/L グルコースからの乳酸生産量は約 92 g/L に向上し、培地中のピルビン酸濃度が BtLDH*ΔpdcΔmpcA* 株により著しく低下した(Fig 2, 3)。この結果から、MPC 欠損による細胞質に蓄積したピルビン酸が基質親和性の高い LlLDH により効率的に変換されていると言える。

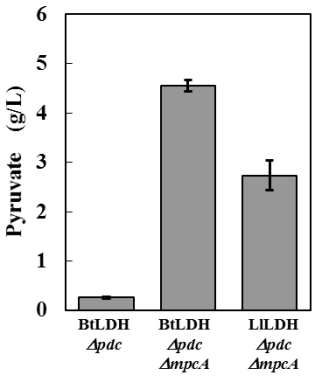


Fig 3. ピルビン酸の分泌生産

4. 今後の展望

現在、多くの産業・生活関連製品が石油系で作られており、それが地球温暖など様々な環境への影響になっている。また、将来化石資源の枯渇が懸念され、それに代わり、植物資源などの再生可能資源から作られるバイオリファイナリーが注目されている。その中で乳酸は重要なバイオプラスチックの原料であり、糖，アミノ酸，脂肪酸代謝のすべてに関与する代謝経路の交差点に位置する重要な物質であるピルビン酸から合成されている。麹菌は好気性微生物であり、解糖系の最終産物であるピルビン酸がミトコンドリアに取り込まれて TCA 回路により酸化される。本研究では、ピルビン酸のミトコンドリアへの輸送を抑制することによりグルコースや植物バイオマスの一つであるデンプンから乳酸の高生産に成功した。また、我々の研究室では、植物バイオマスの分解に必要とする 3 種類のセルラーゼの共高発現によるセルロース基質からの物質生産が可能になっている[3]。今後、遺伝子組み換えを用いて麹菌の高いタンパク質分泌能力を活かし、セルロースなどのバイオマスからの直接乳酸生産が期待される。また、ピルビン酸ミトコンドリアキャリアタンパク質の欠損によるピルビン酸を出発物質とする他の有用化合物の高生産の目指した新規なバイオプロセスの開発も期待される。

謝辞

本研究は文部科学省先端融合領域イノベーション創出拠点形成プログラムの支援により行われたものです。

参考文献

[1] 笹倉ら:第 16 回糸状菌生物学コンファレンス大会講演要旨(P-78)

[2] Sébastien, H., et al. : Science., 337, 93-96 (2012)

[3] Yamada, R., et al. : Microbial Cell Factories., 13:71(2014)

スクロース（ショ糖）を糖源とした乳酸菌培養による乳酸生産抑制

佐野 杏奈[1], 河合 美桜[1], 土屋 麻美[2], 依田 伸生[2], 山崎 思乃[3], 片倉 啓雄[3]
[1]関西大学 大学院理工学研究科 化学生命工学専攻
[2]株式会社明治 乳酸菌研究所 基盤微生物研究部 代謝工学 G
[3]関西大学 化学生命工学部 生命・生物工学科
〒564-8680 吹田市山手町 3-3-35 電話: 06-6368-0809
E-mail: katakura@kansai-u.ac.jp

乳酸菌に乳酸を作らせない研究．プロバイオティクスとしても注目される乳酸菌は，増殖に伴って乳酸が蓄積するので高濃度まで培養できない．本研究では，スクロース（ショ糖）を糖源にして好気的に培養すれば，乳酸生産を伴わないエネルギー生産経路が活性化し，さらに，酸素を供給することによっても乳酸の生産を抑制できることを見出した．将来的には乳酸菌を高濃度に培養できるようになり，生産コストの削減につながるだろう．

1. はじめに

乳酸菌は与えた糖の半分以上を乳酸に変える微生物と定義されており，その名の通り増殖に伴って著量の乳酸を生産する．しかし，乳酸の生産は，乳酸菌にとって好ましいことではなく，乳酸が蓄積すると次第に増殖できなくなり，ついには死に至る．このため，乳酸菌を高濃度まで培養することは困難で，効率よく培養できないことが課題になっている．これに対して，乳酸菌はなぜ自滅につながる乳酸をつくるのだろう，と考えたのが本研究のきっかけである．

乳酸菌が乳酸を生産するのは，糖を代謝することによって増殖に必要なエネルギーを得るためである．糖が代謝される時には NAD^+※が NADH に還元されるが，細胞の中にある NAD^+は有限なので，NADH を酸化して NAD^+にリサイクルしなければ糖を代謝できなくなってしまう．そこで乳酸菌は，ピルビン酸から乳酸を作ることによって NADH を酸化して NAD^+を再生しているのである．従って，NAD^+の還元を伴わずにエネルギーを得る経路を利用するか，乳酸生産以外の方法で NAD^+を再生できれば，乳酸の生産を抑制することができる．しかし，培地にブドウ糖があると，これらの経路の多くは抑制されることが知られており，乳酸菌は乳酸を生産せざるを得ない状態になってしまう．

※ 代謝反応において水素を一時的に受け取る役割をする補酵素の 1 種．

乳酸菌が自然界で生育する環境は，動物の腸内や果実・穀類などで，ブドウ糖が高濃度に存在することは稀であるため，実は，これらの経路を活用して，乳酸生産による自滅を回避しているのかもしれない．

そこで本研究では，上述の経路が抑制されないよう，糖源をブドウ糖からショ糖（砂糖）に代える培養を検討するとともに, NAD^+を再生する別の経路として膜呼吸を利用するため，好気的な培養を検討し，乳酸菌に乳酸を作らせない培養を目指した．

2. 材料と方法

プロバイオティクスとしても使用される乳酸菌 *Lactobacillus reuteri*, *Leuconostoc mesenteroides*, *Lb. plantarum* について, それぞれ JCM1112 株, NBRC100496 株, NCIMB8826 株を用いて検討した. 糖源として 6 g/L のブドウ糖またはショ糖を含む合成培地で，静置培養または酸素が供給される振盪培養を行った．菌体濃度は濁度で，乳酸・糖・エタノールなどの濃度は酵素法または液体クロマトグラフィーで測定した．

菌体および乳酸濃度の経時変化のデータから，それぞれ，単位時間あたり単位菌体量あたりの菌体および乳酸の生産量である比増殖速度 μ と乳酸比生産速度 ρ を算出し，対数増殖している区間で増殖菌体量当たりの乳酸生産量 $Y_{L/X}$（=ρ/μ）を求めた．この値が小さいほど，乳酸を生産せずに増殖できたことになり，この値をできる限り小さくすることが本研究の目的である．

3. 結果と考察

実験した 3 菌株全てにおいて，糖源をブドウ糖からショ糖に変更することで乳酸の生産が抑制され，また，静置培養よりも振盪培養した方が乳酸の生産が抑制された（図 1）.

Lb. reuteri，*Leu. mesenteroides*，*Lb. plantarum* それぞれにおいて，ブドウ糖を用いて静置培養した場合の $Y_{L/X}$ は 5.6，7.8，5.3 g-lactate/g-cell であったのに対して，振盪した場合はそれぞれ 4.8，4.0，5.2 g-lactate/g-cell に低下した．また，ショ糖を用いて静置培養すると $Y_{L/X}$ は，それぞれ 3.7, 3.0, 4.9 g-lactate/g-cell に低下し，さらに，振盪培養すると 2.5, 2.2, 4.0 g-lactate/g-cell に低下した．即ち，通常の培養条件である糖源をブドウ糖とした静置培養に比べて，糖源をショ糖に代えて振盪培養すると $Y_{L/X}$ はこれら 3 菌株でそれぞれ 45，29，75%に低下した．言い換えると，通常の培養と同じ濃度の乳酸が蓄積するまで増殖させると仮定すれば，それぞれ，通常培養の約 2.3，3.5，1.3 倍の菌体を獲得できることになる．

それぞれの菌株において，代謝産物を分析して炭素の物質収支を取り，乳酸生産が抑制された機構を推定した．その結果，*Lb. reuteri* ではアルギニンを利用してエネルギーを獲得するとともに，ショ糖からマンニトールを生産する経路で NAD^+を再生することによって乳酸生産が抑えられていた．*Leu. mesenteroides* では物質収支が 42%と低かったことから，未知の代謝物によるエネルギーの獲得または NAD^+再生が行われていると考えられた．*Lb. plantarum* では，消費糖当たりの増殖菌体量が大きくなっており，呼吸による効率的な炭素の利用が示唆された．

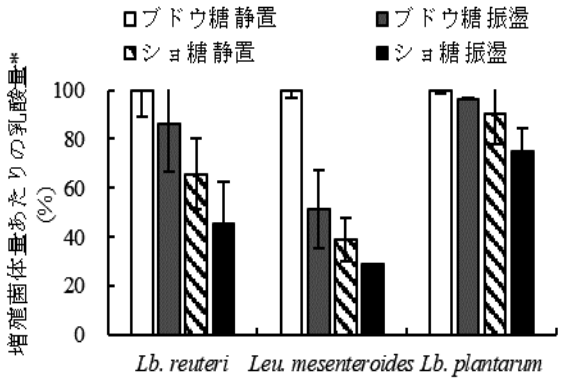


図 1. 増殖菌体当たりの乳酸生産量
*ブドウ糖を糖源として静置培養した場合を100%とした相対値

4. 今後の展望

乳酸菌に与える糖をブドウ糖からショ糖に変えると，本研究では何れの乳酸菌でも乳酸生産が抑制された．特に，*Lb. reuteri* の場合，糖としてショ糖を与えると乳酸の代わりにマンニトールを作ることによって NAD^+を再生し，増殖できることがわかった．他の乳酸菌においても，乳酸生産以外の手段で NAD^+を再生する経路を持っていると考えられ，ショ糖など，ブドウ糖以外の糖を用いればこれらを活用できると考えられる．

ブドウ糖は生物にとって最も利用しやすい糖であるため，私達研究者は微生物を培養する時，慣習的にブドウ糖を用いてきた．しかし，これは私達の勝手な思い込みであり，乳酸菌にとっては，エネルギーを得るために乳酸を作らざるを得ないブドウ糖を与えられるのは，実は迷惑なのかもしれない．

乳酸菌は通性嫌気性菌であり，酸素が苦手な微生物として認識されてきたが，少なくとも今回用いた 3 種類の乳酸菌では，何れも振盪培養して酸素を与えた方が増殖は速くなり，乳酸生産も抑制された．

ところで，酵母は糖を代謝する時にピルビン酸からエタノールを作って NAD^+を再生するが，酸素を利用した呼吸によっても NAD^+を再生することができる．酵母はこのように呼吸によって効率よくエネルギーを得ることができるが，呼吸系の能力を超える糖を与えると，例え酸素が十分にあってもエタノールを作ってしまい収率が低下する．パン酵母の工業生産においては，これらを考慮して，通気撹拌をしながら，菌体の増殖にあわせて徐々に糖を供給することにより，迅速に高濃度まで高収率で培養する方法が確立されている．乳酸菌においても，酸素を与えて糖を徐々に供給すれば高効率な培養ができるだけでなく，乳酸の蓄積を回避して高濃度まで培養できるはずである．

乳酸菌には様々なタイプがあり，呼吸ができるもの，一部の成分を補えば呼吸できるもの，呼吸ができないもの，さらには，呼吸はできても酸素が苦手なものもいる．また，*Lb. reuteri* のマンニトール生産など，乳酸以外の NAD^+再生系を持っているものも，持っているが能力が十分ではないものもある．

本研究で示したように，糖をショ糖に代えて乳糖以外の NAD^+再生系を活用するとともに，呼吸ができる乳酸菌には呼吸でエネルギーが得られるように培養条件を設定すれば，パン酵母のように，高濃度まで高効率で乳酸菌を培養できる可能性は十分にあり，乳酸菌そのものの生産や乳酸菌による有用物質の生産に貢献できると考えられる．

糖からの直接発酵を目指した エルゴチオネイン高生産放線菌の開発

嘉悦 佳子・仲島 菜々実・山田 佑樹・野口 祐司・仲谷 豪
長瀬産業株式会社
〒651-2241　兵庫県神戸市西区室谷 2-2-3　電話: 078-992-3164
Fax: 078-992-3192　E-mail: takeshi.nakatani@nagase.co.jp

エルゴチオネイン（EGT）は、近年、食品、化粧品、医薬品等の用途として利用が期待される抗酸化アミノ酸であり、当社の主要な生産ホストである *Streptomyces* 属細菌は、EGT を元来生合成する数少ない細菌の一種である。これまでに EGT の主要前駆体であるヒスチジンを原料とした発酵法が報告されているが、本研究ではより安価な「糖からの直接発酵法」の開発を目指し EGT 高生産放線菌の育種を行った。

1. はじめに

エルゴチオネイン（EGT : 図 1）は、一部の微生物のみが生合成可能な含硫アミノ酸であり、キノコなどに含まれている。ヒトは体内で EGT を合成できないが、2005 年に EGT に特異的な取り込み輸送体がヒトで発見されたことで、その生理機能に関する研究が精力的に行われた[1-3]。その結果、経口で接種した EGT は上記輸送体依存的に表皮、眼、心臓など、各種臓器に蓄積し、細胞を酸化から保護していることが動物実験等により明らかとなった[4]。最近では、EGT が血液脳関門を通過し、脳で神経新生を誘導することが報告されており、その特徴的な生理機能が注目されている[5]。

これまで EGT は有機合成法やキノコ類からの抽出により製造されてきたが、反応剤の安全性、価格および安定供給に課題を抱えている。当社では *Streptomyces* 属放線菌を用いた物質生産プラットフォーム N-STePP® を開発しており、本菌が元来保有する EGT 生合成系（図 2）を強化することで、従来の製法より安価に製造可能な微生物発酵法の開発に取り組んできた。これまでに、主要前駆体となるヒスチジン（His）を培地添加し EGT を生産させるバイオコンバージョン法開発に関する報告は、大腸菌等において複数存在する。しかし、より安価な糖から His を生産させ EGT へと変換する、直接発酵法に関する開発は知られていない。本研究では、放線菌を用いた「糖からの EGT 直接発酵法」の開発を目指し、生産菌の育種を行った。

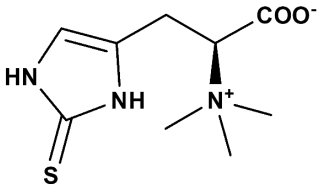


図 1.　L -エルゴチオネイン（EGT）
ヒスチジンに、チオン（C=S）とベタイン骨格が含まれる特徴的な構造をもつ。水溶性であるが酸化されにくく安定である。

2. 材料と方法

(1) EGT 生合成系の強化

まず N-STePP®のホストである *Streptomyces lividans* TK64 の EGT 生合成遺伝子の発現を強化し、EGT の合成能の増強と、生産された EGT の局在を確認した。また、前駆体となる His の分解を弱化する目的で、ヒスチジンアンモニアリアーゼ（HAL）遺伝子 SLI_5205 の破壊による EGT 生産への影響を調べた。

(2) His のフィードバック制御系の解除

次に、糖から His を高生産させる必要があるため、His を過剰に生産させない機構であるフィードバック制御（FBR）を解除させた株の構築を目指した（図 2）。しかし、*Streptomyces* 属細菌は一次代謝に関する知見が乏しく、His の FBR 解除に有効な知見はなかった。そこで、アミノ酸の FBR 解除株の取得に広く用いられるアミノ酸アナログ法を用いたスクリーニングにより、TK64 の His アナログ耐性株の取得を試みた。本研究で

は、あえて NTG などの変異剤を使用せず、アナログ添加と実験室進化手法を組み合わせ、自然変異に依存した His アナログ耐性変異株の取得を行った。自然変異を適用することで、ゲノムに導入される変異を格段に抑えることができ、取得した変異株の次世代シーケンス（NGS）解析から、FBR の解除に関連する有効変異の同定が容易となる。さらに、同定した His の FBR 解除に有効な変異を EGT 生産株に集積することで、効率的な His の FBR 解除株の育種を目指した。

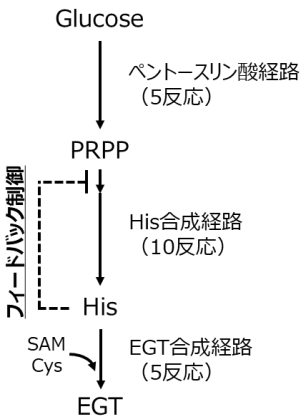


図 2.　EGT の生合成経路

糖から EGT を高生産するには、前駆体である His のフィードバック制御（転写制御を含む）を解除する必要がある。PRPP: 5-Phosphoribosyl diphosphate, SAM: *S*-Adenosylmethionine, Cys: cysteine

3.　結果と考察

(1) EGT 生合成系の強化

S. lividans TK64 由来 EGT 生合成遺伝子クラスター *egtABCD* を高コピーベクターに連結し本菌に導入し、EGT 生産株を取得した。さらにプロモーター検討、及び培養条件の検討を行った。その結果、His 無添加条件下のフラスコ培養においても、約 600 mg/L と親株に対して 10 倍以上の EGT を生産した（図 3）。さらに、His の分解に働く HAL 遺伝子破壊株で生産を行った結果、有意に EGT 生産量が向上することが確認され、細胞内 His の増加に寄与する改変が有効であることを確認した。また、産生された EGT の約 80%が培養液中に蓄積しており、本菌が高い EGT 排出能をもつことが明らかとなった。*S. avermitilis* を宿主とした EGT 遺伝子クラスター強化株でも、EGT の約 80%が菌体外に蓄積し、*Streptomyces* 属細菌が EGT エクスポーターを用いて効率よく EGT を分泌生産可能であることが示された。[6]

(2) His のフィードバック制御系の解除

スクリーニングの結果、His アナログを含む最少培地でも生育可能なアナログ耐性変異株、約 80 株を取得した。取得した 80 株の His 及び EGT の生産性を評価した結果、23 の変異株が親株より優位に生産性が向上していた。

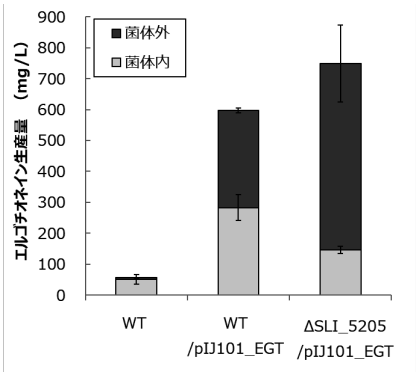


図 3.　EGT 生産株の評価

TK64（WT）でも高い EGT 生産性を示すが、合成遺伝子の発現強化、His 分解系の弱化（ΔSLI_5205）により生産性が向上し、培地中に EGT が分泌される。

4.　今後の展望

現在、NGS により同定した変異点の有効性を検証し、EGT 生産株に有効変異を集積することで、FBR の解除を進めている。これと並行し、TK64 株の代謝モデルを用い、EGT 生産時のフラックスバランス解析（FBA）を行うことで、EGT 生産性の向上に有効な代謝改変をシミュレーションしている。FBA から得られた代謝改変についても、上記 FBR 解除株に導入していくことで、His だけでなく、システインや *S*-アデノシルメチオニンの供給についての最適化を行い、糖からの EGT 直接発酵法の実現を目指していきたい。

（本研究は NEDO スマートセルプロジェクトの支援を受けて行われました。）

参考文献

[1] Grundemann D, *et al.*: PNAS., 102, 5256-5261 (2005)
[2] Paul BD, *et al.*: Cell Death Differ., 17, 1134-1140 (2010)
[3] Kato U, *et al.*: Pharm. Res., 27, 832-840 (2010)
[4] Irwin K, *et al.*: Biochim. Biophys. ACTA, 1822, 784-793 (2012)
[5] Nakamichi N, *et al.* : Brain Behav., 6, e00477 (2016)
[6] 仲谷豪 他 : 特許 第 6263672 号 (2017)

金ナノ粒子—量子ドットのプラズモン共鳴現象を用いたノロウイルス RNA 検出法

森田　真広[1]・Jaewook Lee[2]・Oluwasesan Adegoke[2]・朴　龍洙[1,2]
[1]静岡大学大学院　総合科学技術研究科　農学専攻
[2]静岡大学　グリーン科学技術研究所
〒422-8529　静岡市駿河区大谷 836
E-mail: park.enoch@shizuoka.ac.jp

ガラス基板上に金ナノ粒子（AuNP）を修飾し、その AuNP の表面にはノロウイルスの GⅡ.17 型 RNA の相補的な DNA の 10 塩基を修飾し AuNP-DNA プローブ１とした。さらに、ノロウイルスの GⅡ.17 型 RNA のうち 10 塩基を量子ドット（QD）に修飾し検出用 QD-DNA プローブ２とした。DNA プローブ２とターゲット遺伝子を加えることで、QD が基板上に固定され、AuNP と QD の間の局在表面プラズモン共鳴現象により蛍光を発する。蛍光顕微鏡で観察した結果、10 fM までの DNA の有無を識別することができた。この研究成果は、ウイルスの有無を簡易的に判別可能にし、また複数の QD-DNA プローブを用いることで複数のウイルスを同時に検出することを可能とする。

1.　はじめに

近年、我が国では食品媒介疾患の原因である病原体による感染者が急増している。特にノロウイルスは、強い感染力を持ち、乳幼児から成人まで広範囲に感染性胃腸炎を引き起こす。食品の安全を脅かすノロウイルスを迅速に高感度で検出できれば、感染拡大前に適切な安全対策が取れる。現在、ノロウイルスの診断は、イムノクロマト法によって行うが、低感度や特異性に問題があり新たな検出法の開発が求められている。近年、我々はナノ粒子の持つ特異な性質を用いて、インフルエンザウイルスをはじめとしたデング、ジカウイルスなどの新興・再興感染症原因ウイルスを高感度で検出した[1–3]。本研究では、高い蛍光特性を有する量子ドット（QD）と局在表面プラズモン共鳴効果（LSPR）により蛍光を増強することができる金ナノ粒子（AuNP）を用いてノロウイルス RNA の検出法の開発を行った[4]。

2.　方法

(1) スライドガラス側の DNA プローブ１と検体側のプローブ２の作製

本研究では、layer by layer 法によって AuNP を一定の間隔で修飾したスライドガラス（検出の基板）を作制した[5]。AuNP は HEPES によって金イオンを還元して作製し、粒子の大きさは 40 nm であった。ヒドロキシ基によって負に帯電しているガラス表面は、polydiallyldimethylammonium chloride（PDDA）と静電気的に結合させた。ここで、PDDA によって正に帯電している表面に、負に帯電している AuNP を静電的に結合させた。AuNP のチオール基を利用して、ノロウイルス GⅡ.12 株の RNA の相補的な DNA の 10 塩基を AuNP の表面に修飾し、AuNP-DNA プローブ 1 とした。

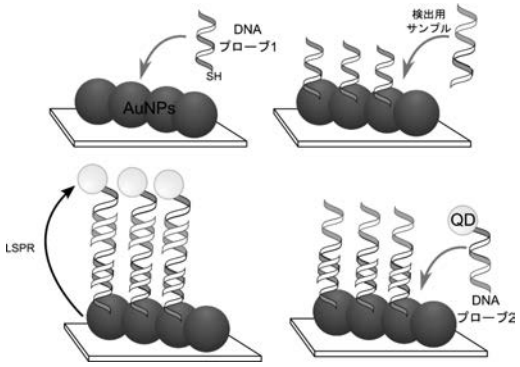


図１．ターゲット DNA 配列の検出方法

一方、本研究室で合成した CdZnSeS QD（量子効率は 84 %、584 nm 付近に蛍光ピークを有する 4 nm の球形の粒子）には、DNA プローブ 1 と異なる配列のターゲット DNA を修飾し、QD-DNA プローブ 2 とした。

（2）サンプル DNA の検出

ノロウイルス GⅡ.12 株の RNA の一部を DNA 断片としてターゲット DNA として用いた。QD-DNA プローブ 2 とサンプル DNA を反応させた後、基板上にスポットした。AuNP-DNA プローブ 1 と QD-DNA プローブ 2 はそれぞれ異なる配列のターゲット DNA と二本鎖を形成するため、2 つのプローブを介して QD は基板上に固定される。未反応の QD-DNA プローブ 2 を洗浄する。ターゲット DNA が AuNP-DNA プローブ 1 と QD-DNA プローブ 2 に結合することで、AuNP と QD の間の LSPR（図 1 参照）により、QD の蛍光が増強し DNA の有無を判別できる。

3. 結果と考察

（1）表面プラズモン共鳴効果による蛍光増強効果

AuNP の表面プラズモン共鳴効果による QD の蛍光増強効果を確認した（図２）。溶液中で作製した AuNP-DNA プローブ１、QD-DNA プローブ２、サンプルを反応させたところ、蛍光強度は、サンプルの濃度に比例して増加しており、三種類の DNA がサンドイッチ構造を形成したことで QD の蛍光が AuNP の LSPR によって増強されていることが確認できた。

（2）ガラス基板上でのサンプルの検出

AuNP-DNA プローブ 1 を表面固定した基板を用いてターゲット DNA の検出を行った。まず、等量の QD-DNA プローブ 2 と検体サンプルをハイブリダイゼーションさせた。30 分間反応させた後、反応液を基板上に加え、さらに 30 分間反応させた。30 分後、未反応の DNA を洗浄して取り除き、蛍光顕微鏡で QD の蛍光を観察した。図 2 に各サンプル DNA 濃度における蛍光イメージの画像を示す。サンプル DNA を加えていないときに比べ、10 fM 以上の DNA サンプルを用いた場合、有意な蛍光強度の差を確認することができた。また、非相補的な DNA 断片（NC）を用いた場合の蛍光強度は、相補的な DNA 断片に比べ、有意な蛍光強度の差が確認できた。このことから、本検出系は、高いウイルス DNA の選択性を有していることが示唆された。これらの結果から簡易的な方法で DNA を検出の定量性が確認できる簡易ウイルス検出系の作製に成功した（図３）。また、DNA の足場として AuNP を用いることで LSPR 効果による蛍光が増幅され、検出をより優位に行うことが可能になった。

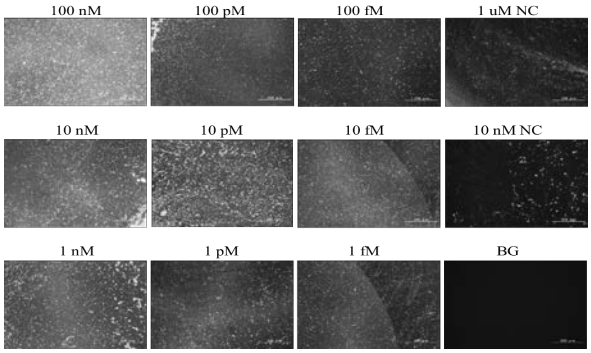


図 2. 各サンプル DNA 濃度における蛍光イメージ

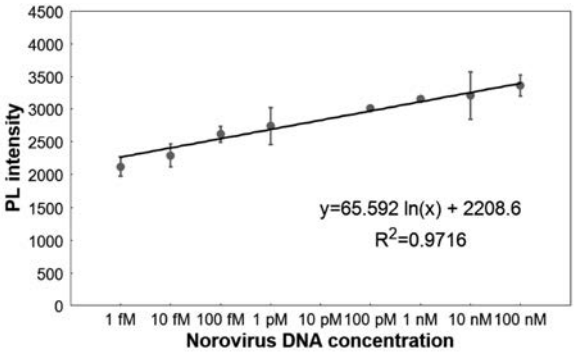


図 3. LSPR による蛍光増強効果

4. 今後の展望

本研究では、ノロウイルス GⅡ.17 株の DNA 配列を簡便に検出することに成功した。今回の結果から選択性に関しても十分な差異が確認できたため、複数のウイルスを同時に検出することが可能となる。今後、デングウイルスの検出法とデングウイルスの 4 種類の血清型を同時に判別できる検出系を開発し、本検出系の実用性を検証する。S/B 比の改善に取り組み、最終的には簡易的な励起装置であっても、ウイルスの検出が可能なオンサイトでの検出法の確立を目指す。

参考文献

[1] Adegoke. O, *et. al*, ACS. Omega, 3, 1357–1366 (2018)
[2] Adegoke. O, *et al*, Biosens. Bioelectron, 94, 513–522 (2017)
[3] Takemura. K, *et al*, Biosens. Bioelectron, 89, 998–1005 (2017)
[4] Eliza. H, *et al.*, Adv. Mater., 16, 1685–1706 (2004)
[5] Sudhanshu S, *et al.*, Acc. Chem. Res., 41(12), 1831–1841 (2008)

Streptomyces sp. NT1 株由来 L-グルタミン酸オキシダーゼのフルコンセンサス設計による耐熱性の向上

齋藤 貴広[1], 久保田 瞳[1], 林 優花[2], 中野 祥吾[3], 伊藤 創平[3],
浅野 泰久[4], 酒瀬川 信一[5], 杉森 大助[1,2*]
[1]福島大学・共生システム理工学類
[2]福島大学大学院・共生システム理工学研究科
[3]静岡県立大学・食品栄養科学部
[4]富山県立大学・生物工学研究センター
[5]旭化成ファーマ（株）・診断薬製品部 開発研究グループ
*〒960-1296　福島市金谷川 1 番地　電話: 024-548-8206
*Fax: 024-548-8206　E-mail:sugimori@sss.fukushima-u.ac.jp

L-グルタミン酸オキシダーゼ（LGOX）は食品や生体試料中の L-グルタミン酸定量に利用されている有用な産業用酵素である。既存酵素では比活性、耐熱性、生産工程に関して課題を抱えている。そこで本研究では、人工タンパク質設計法により 690 アミノ酸からなる酵素の 104 カ所にアミノ酸置換を施したフルコンセンサス型 LGOX（Fc-LGOX）を設計した。大腸菌組換え発現 Fc-LGOX は 70℃、30 min のインキュベートでも活性は一切低下せず、酵素発現量、比活性、生産性も飛躍的に向上させることに成功した。

1.　背景

L-グルタミン酸オキシダーゼ（LGOX）は、L-グルタミン酸（Glu）定量用酵素として産業上有用であり、食品分野や肝機能診断（GOT/GPT 測定）に広く利用されようとしている。現在、製品化されている LGOX は 1983 年に国内グループが放線菌 *Streptomyces* sp. から見出したものであり、その耐熱性と比活性は既知 LGOX のなかで最も高いレベルにある[1]。それでもなお、耐熱性、比活性、生産工程に関する課題の解決が強く望まれていた。そこで我々は、既存 LGOX と同等以上の性能を持つ LGOX をスクリーニングにより取得し、既存 LGOX よりも耐熱性に優れた LGOX に改変させることを目標とした。我々は、比活性や基質特異性などの機能を一切低下させずに耐熱性のみを大幅に向上させるには従来の分子進化工学的手法では限界があると考え、人工タンパク質設計法を導入することにした。

2.　方法

(1) 人工タンパク質設計

我々がスクリーニングにより見いだした放線菌 *Streptomyces* sp. NT1 株由来 LGOX（$LGOX_{NT1}$）のアミノ酸配列をクエリーとして BLAST サーチし、機能および配列類似タンパク質として 4919 配列を入手した。4919 配列から独自のアルゴリズムにより $LGOX_{NT1}$ に特徴的なアミノ酸部位を Ec 値（conservation energy の総和）[2]により同定、配列の絞り込み（精選）を行った。精選した配列情報からコンセンサス設計を行い、結果、$LGOX_{NT1}$ と比較し 104 カ所に変異が入った完全コンセンサス型 LGOX（Fc_LGOX）を設計した（図 1,2）。

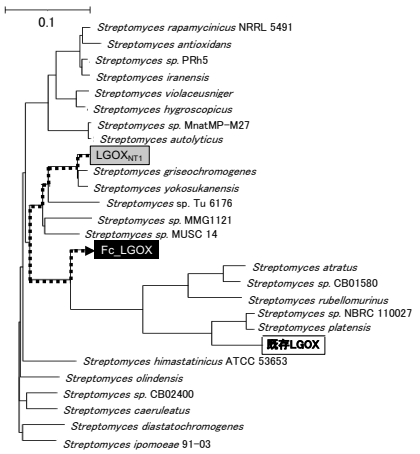


図 1. $LGOX_{NT1}$ のアミノ酸配列と類縁（進化）関係を持つホモログと Fc_LGOX の分子系統樹

配列設計したFc_LGOX遺伝子を全合成し、pET24aと*E. coli* BL21(DE3)を用いて菌体内に可溶性発現させた。

3. 結果と考察

(1) Fc_LGOXの組換え生産

フラスコ培養・発現では、培地100 mLあたり約1.8 g wet cellsの組換え大腸菌が得られ、その菌体内の可溶性画分に40 U/mL（37℃, pH 7）、比活性7 U/mg-proteinのFc_LGOXを得ることができた。この比活性は既存酵素（0.346 U/mg-protein）の約20倍にも達し、Fc_LGOXは耐熱性のみならず、酵素生産性の面においても格段に向上したといえる（表1）。また、Fc_LGOXは60℃、30 min処理により大腸菌由来タンパク質を大幅に変性除去することができ、比活性を25.5 U/mg-protein（約3.7倍）まで向上させることができた。さらに、陰イオン交換クロマトグラフィーにより高純度酵素（比活性55 U/mg-protein at 37℃）を得ることも可能である。

表1. 組換え生産WTとFc_LGOXの活性と耐熱性

$LGOX_{NT1}$	活性[a] (U/mL)	比活性 (U/mg-protein)	耐熱性[b] (℃)
WT	10	2	55
Fc	40	7	70

[a] 大腸菌可溶性画分の酵素活性を37℃、pH 7で測定。
[b] 30 minインキュベート後、活性が100%残存した温度。

(2) 耐熱性および酵素機能評価

WT、既存酵素の耐熱性が各々55℃、60℃（30 min）であったのに対し、Fc_LGOXの耐熱性はWTに比べ15℃も向上し、70℃、30 min一切活性が低下しなかった（表１）。Fc_LGOXの至適温度はWTと同じ60℃、至適pHは6から7にシフトした。基質特異性には変化が認められず、Glu以外のアミノ酸には一切活性を示さない高い基質選択性のままであることが確認できた。

(3) 耐熱化メカニズム

今回、我々は$LGOX_{NT1}$の690 アミノ酸のうち104カ所に変異を導入した。WTとFc_LGOX間のアミノ酸配列相同性は86%と比較的高い方であるが、図1に示すように分子系統的には独立した末端節（ターミナルノード）を形成するように人工設計を施している。さらに、注目すべきはアミノ酸置換部位が酵素分子の外縁部（溶媒露出表面）とランダムコイルに集中している点である（図2）。WTとFc_LGOXの立体構造モデルを比較するとFc_LGOXではランダムコイルが少なくなるとともに、分子全体がよりコンパクトにフォールディングしており、それによって変性しにくい構造をとることで耐熱化したと考えている。従来の耐熱化では salt bridgeの形成や疎水パッキングなど、主にタンパク質内部に変異を導入する rational design であったのに対し、今回我々は従来とは全く異なるコンセプト、変異導入部位により大幅な耐熱化に成功した点がオリジナルといえる。

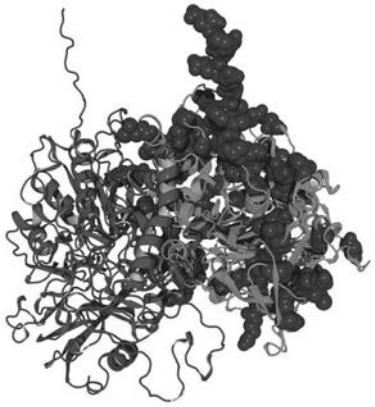


図 2. WT（ホモ 2 量体）の立体構造モデル上における104カ所のアミノ酸置換点（一方のサブユニットのみ置換点をボール表示した）

4. 今後の展望

本研究では人工タンパク質設計法により酵素の約15%にあたるアミノ酸に置換を導入し、大幅な耐熱性向上に成功した。ここで注目すべきは、酵素機能（比活性、基質特異性）を一切低下させることなく大幅な耐熱化に成功した点である。今後、CDスペクトル解析やX線結晶構造解析などの物理化学的解析を進めることにより耐熱化メカニズムを解明したいと考えている。

今回、高比活性かつ高耐熱性LGOXが創製できたことにより、酵素生産コストと酵素価格を大幅ダウンさせることが可能になると考えられる。その結果、GOT/GPT測定（反応生成物：Glu）用酵素やGlu定量用バイオセンサー、チップの開発など、その応用範囲が広がることが期待できる。さらに、近年Gluは供給過剰となっているため、医薬中間体等の原料として有用なα-ケトグルタル酸（α-KG）をGluからバイオ法で製造することが検討されており、耐熱性Fc_LGOXを利用したα-KG生産も可能となるかもしれない。

参考文献

[1] Kusakabe H, *et al.*: Agric. Biol. Chem., 47, 1323-1328 (1983)

[2] Nakano S, *et al.*: Biochem., 57, 3722–3732 (2018)

シトクロム P450BM3 と酵素活性化分子を利用した大腸菌内でのベンゼンの直接酸化

唐澤　昌之・Joshua Kyle Stanfield・柳澤　颯太・荘司　長三・渡辺　芳人
名古屋大学大学院理学研究科　物質理学専攻　化学系
〒464-8602　名古屋市千種区不老町　電話: 052-789-2955
Fax: 052-789-3557　E-mail: shoji.osami@a.mbox.nagoya-u.ac.jp

巨大菌由来のシトクロム P450BM3(P450BM3)は，常温・常圧の温和な条件下で不活性な C-H 結合を水酸化できる強力なヘム酵素であるが，基質選択性が高く長鎖脂肪酸以外の基質との反応効率は非常に低い。P450BM3 は，対象とする基質が活性部位に取り込まれることを「トリガー」として反応が進行する巧妙な仕掛けが施された酵素であるため，対象とする基質とは構造が大きく異なる有機分子では，P450BM3 のスイッチは「ON」の状態とはならず，それらの酸化反応はほとんど進行しない。P450BM3 のスイッチを「ON」の状態とするために，対象とする基質と構造が似た擬似基質（デコイ分子）を P450BM3 に取り込ませることで，反応のスイッチを強制的に常に「ON」状態にすることができ，ベンゼンなどの様々な有機基質を酸化可能になることを利用する反応系を開発した。

1.　はじめに

酵素は生体内で必要とされる物質変換を行う生体触媒で，特定の化合物を正確に認識して反応するように設計されている。酵素反応は，鍵と鍵穴の関係で説明されるように，通常は酵素の鍵穴に合致する基質のみを対象とした物質変換を行うため，それ以外の化合物に対する活性は低い。酵素の基質特異性の変換には，活性部位を構成するアミノ酸を他のアミノ酸に置換する変異導入が有効で，ランダムに変異導入を行う進化分子工学的手法を含めて，酵素変異体の作成が現在の主流である。我々は，本来の対象基質に構造がよく似た「擬似基質」（デコイ分子）を酵素に取り込ませて，酵素の誤作動状態を意図的に創り出すと，本来の基質とは構造が全く異ことなるベンゼンなどの「第二の基質」が反応することを明らかにした。さらに，デコイ分子を用いる手法は，菌体内反応にも有効であることを実証した。

2.　結果と考察

(1) 擬似基質による P450BM3 の誤作動誘起と「第二の基質」の水酸化反応

P450BM3 の酸化活性種生成反応では，長鎖脂肪酸の取り込みが反応を開始するトリガーになっていて，長鎖脂肪酸が P450BM3 の適切な位置に取り込まれた場合にのみ酸化活性種を生成するように設計されている。長鎖脂肪酸の末端を含めたすべての水素原子がフッ素原子に置換されたパーフルオロアルキルカルボン酸を擬似基質(デコイ分子)として取り込ませると P450BM3 が誤作動し，ベンゼンやプロパンなどの長鎖脂肪酸とは構造が大きく異なる基質を酸化できることを明らかにした（図 1）[1, 2, 3]。

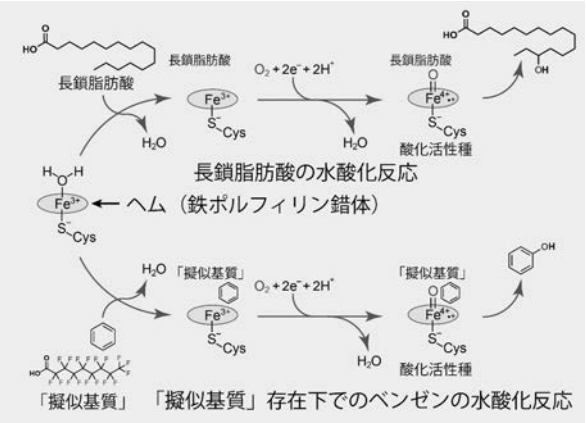


図 1.　シトクロム P450BM3 による長鎖脂肪酸の水酸化反応（上）と擬似基質存在下でのベンゼンの水酸化反応（下）

さらに，パーフルオロアルキルカルボン酸のカルボキシル基をアミノ酸で修飾した第二世代のデコイ分子では活性が大幅に向上することを見出した[4]。修飾するアミノ酸の側鎖構造の違いにより，酸化活性が大きく変化し，パーフルオロノナン酸をフェニルアラニンで修飾した PFC9-L-Phe の場合にはベンゼンの水酸化は毎分 157 回転で進行した。パーフルオロノナン酸をトリプトファンで修飾した PFC9-L-Trp を取り込んだ状態の

P450BM3 の結晶構造解析にも成功し，擬似基質の末端のパーフルオロアルキル鎖は，活性部位には届いていないことなどを明らかにした（図 3）。

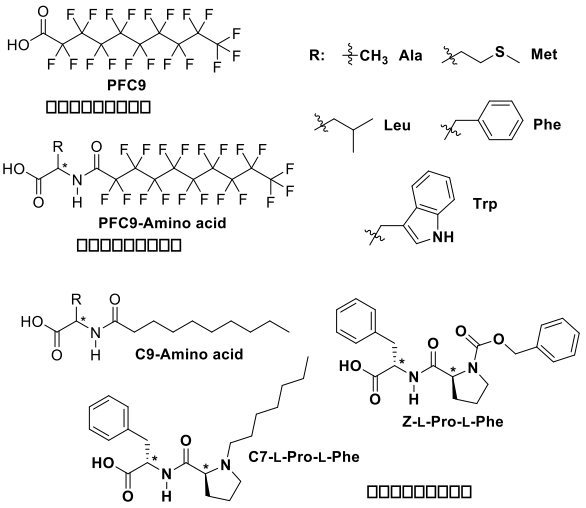


図 2.　デコイ分子の構造

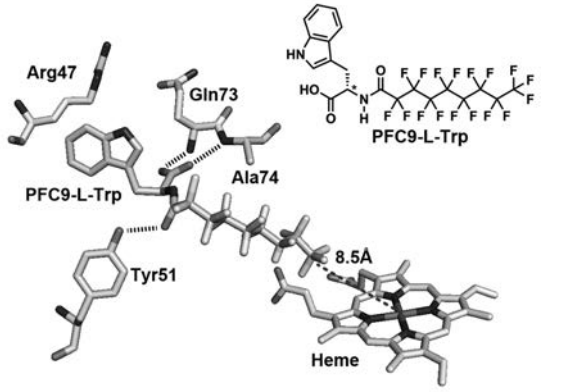


図 3.　PFC9-L-Trp を取り込んだ P450BM3 の活性部位の構造

(2) フッ素原子を含まない第三世代デコイ分子

パーフルオロアルキルカルボン酸のカルボキシル基をトリプトファンで修飾した第二世代デコイ分子と P450BM3 複合体の結晶構造解析（図 3）により，カルボキシル基をアミノ酸で修飾した場合には，アルキル鎖の末端が活性部位のヘムの鉄原子から十分に離れており，フッ素原子で置換しなくとも，P450BM3 によって水酸化されないと考えられた。そこで，アルキルカルボン酸のカルボキシル基をアミノ酸で修飾した第三世代のデコイ分子（図 2）を合成し，ベンゼンの水酸化反応を検討したところ，フッ素原子を含まないデコイ分子であっても P450BM3 を活性化可能で，第二世代デコイ分子よりも高い酸化活性を示した[5]。フッ素原子を有するカルボン酸を利用しなくてはならない制限が外れたことで，構造の異なる多くのデコイ分子を利用可能になった。結晶構造解析により，第三世代デコイ分子が長鎖脂肪酸と同じ基質結合部位に取り込まれることも明らかにした。ベンゼンの水酸化反応では，フェニルアラニンとプロリンを連結した二量体のプロリンをアルキル鎖で修飾した C7-L-Pro-L-Phe が高い酸化活性を示し，ベンゼンは毎分 259 回転で水酸化され，P450BM3 一分子あたりで 4 万回転を超える触媒活性を示した。

(3) 大腸菌内でのベンゼン水酸化

シトクロム P450BM3 を発現させた大腸菌の培養液に，第三世代デコイ分子を加えるとベンゼンがフェノールへと変換されることを明らかにした（図 4）[6]。5 時間の反応でフェノールの収率は 59%に達する。フェノールがさらに酸化されたヒドロキノンも 16%の収率で得られ，ベンゼンの転換効率は 75%に達した。C7-L-Pro-L-Phe が最も高い活性を示すとともに，5μMの濃度で十分に高い活性を示した。

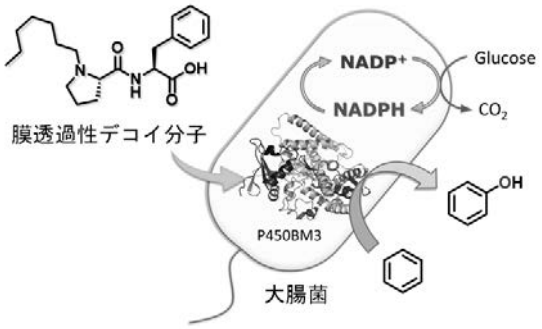


図 4. 大腸菌内でのベンゼンの水酸化反応

3.　今後の展望

デコイ分子を利用する反応では，デコイ分子の構造の違いによって酵素活性が大きく変化するため，デコイ分子をうまく設計することで，新たなバイオ触媒開発が可能である。デコイ分子を用いる反応は，菌体内での物質変換にも適用可能なため，実用化が可能な環境に配慮した物質変換系の開発に貢献できると考えている。現在は，天然ガスの主成分であるメタンをメタノールに変換する反応系の確立を目指して，新規デコイ分子の開発を続けている。

参考文献

[1] N. Kawakami, *et al.:* Angew. Chem. Int. Ed., 50, 5315 (2011).
[2] N. Kawakami, *et al.:* Chem. Sci., 4, 2344 (2013).
[3] O. Shoji, *et al.*: Angew. Chem. Int. Ed., 52, 6606 (2013).
[4] Z. Cong, *et al.:* ACS Catal., 5, 150 (2015).
[5] O. Shoji, et al.: Angew. Chem. Int. Ed., 56, 10324(2017).
[6] K. Masayuki, et al.: Angew. Chem. Int. Ed., *in press.*

光化学系 II 再構成メタンモノオキシゲナーゼ膜画分を用いたメタン酸化反応

近藤　龍一・森　史也・伊藤　栄紘・蒲池　利章
東京工業大学　生命理工学院　生命理工学系
〒152-8550　東京都目黒区大岡山 2-12-1 M6-7　電話: 03-5734-3123
Fax: 03-5734-3357　E-mail: tkamachi@bio.titech.ac.jp

天然ガス主成分であるメタンの有効利用に向けて、メタンからメタノールへの選択的酸化反応が注目されている。メタン資化細菌由来メタンモノオキシゲナーゼは常温常圧下、一段階の反応でメタン/メタノール変換が可能である。しかし、この反応には電子供与体が必要である。そこで本研究では、メタンモノオキシゲナーゼと好熱性シアノバクテリア由来光化学系 II (PSII)を組み合わせて、光駆動型酸化反応系を構築した。PSII は光照射下、水から電子を受容し、キノンを還元することができる。この PSII をメタン資化細菌の膜画分に再構成し、光照射することで、水から得た電子が膜中のキノンを介してメタンモノオキシゲナーゼへ伝達され、酸化反応が進行することが分かった。本研究により、無尽蔵な光エネルギーを利用した低エネルギーのメタノール生産が可能になることが期待される。

1.　はじめに

近年のシェール革命により、天然ガスの主成分であるメタンの有効利用が世界中で求められている。メタンの酸化物であるメタノールは、次世代のエネルギー・炭素資源として注目されているが、現在の工業的な生産には非常に多量のエネルギーを必要とする。メタンを唯一の炭素源とするメタン資化細菌は、代謝の第一段階でメタンモノオキシゲナーゼという酵素を用いてメタンをメタノールへ変換する。この反応は、常温常圧、一段階の低コストな反応であるが、図 1 のように電子が不可欠である。生体内では NADH から得られた電子を利用するが、高価な電子供与体は実用化の大きな課題であった。そこで我々は、電子供与の問題を解決するために、光エネルギーを利用して水から電子を得る光合成に注目した。以前の研究で、ホウレンソウ由来の葉緑体と膜結合型メタンモノオキシゲナーゼ(pMMO)含有膜画分を混合した反応溶液で、光照射により NADH をリサイクルしメタン/メタノール変換反応を達成した[1]。本研究では、好熱性シアノバクテリア由来光化学系 II (PSII)を精製し、これを pMMO を含む膜画分に再構築し(PSII-pMMO 膜画分、図 1)、光駆動型酸化反応系を構築した。PSII は光照射下、水から電子を受容し、キノンを還元することができる。この還元型キノンが pMMO を還元できれば、光照射で水から得た電子によるメタン選択的酸化反応が構築できるといえる。

2.　材料と方法

PSII-pMMO 膜画分は、*Thermosynechococcus elongatus* BP-1 由来 PSII (30 μg-Chl/mL)および、*Methylosinus trichosporium* OB3b 由来 pMMO 含有膜画分 (2.0 mg-protein/mL)を 0.01%(w/v) dodecyl-β-D-maltoside, 25%(v/v) glycerol, 10 mM $MgCl_2$ and 20 mM $CaCl_2$ 含有 25 mM MOPS-KOH buffer (pH7.0)で懸濁して調製した。この PSII-pMMO 膜画分懸濁液を密栓したスクリューバイアル中で攪拌し、気相に基質を添加して、光照射 (20 μE/m^2·s)することで光駆動酸化反応を開始した。酸化反応生成物はガスクロマトグラフ(FID)で定量した。

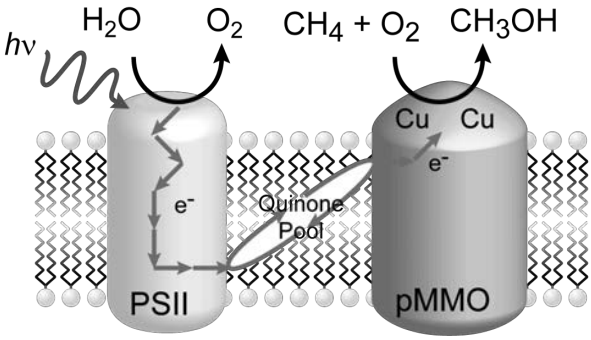


図 1. PSII-pMMO 膜画分による光駆動酸化反応の概要

また、反応系内の過酸化水素(H_2O_2)の定量には、ペルオキシダーゼとヒドロキシフェニルフルオレセイン(HPF)を使用した[2]。PSII-pMMO 膜画分に、ジュロキノール添加または光照射 (100 μE/m^2·s)後の各時間における H_2O_2 を定量した。

3. 結果と考察

(1) PSII-pMMO 膜画分による光駆動メタン酸化反応

PSII-pMMO 膜画分を用いた反応において、光照射下でのみメタンおよびプロピレンの酸化反応が進行した(図２)。以前の葉緑体－pMMO 含有膜画分の反応系と比較して、PSII-pMMO 膜画分では生成物の収量がおよそ 2 倍に増加した。また、Mn クラスターを除去した PSII を用いた PSII-pMMO 膜画分では、光照射しても酸化反応は進行しなかった。したがって、PSII-pMMO 膜画分では、光エネルギーを用いて PSII が水から得た電子によって pMMO による酸化反応が進行することがわかった。

PSII-OB3b 膜画分の電子伝達経路を解明するために、膜画分に含まれている NADH キノンオキシドレダクターゼ(NQO)阻害剤であるロテノンの添加効果を調べた[3]。その結果、ロテノンの添加による酸化反応への影響はなかったため、PSII-OB3b 膜画分系の光酸化反応に NQO が関与しないことが示された。すなわち、PSII から供給された電子が膜中のキノンを直接還元し、還元型キノンから供給された電子が pMMO へと電子伝達されることがわかった。以上の結果から、補酵素を添加せず、光を利用した新たな pMMO 反応系の構築に成功したといえる。

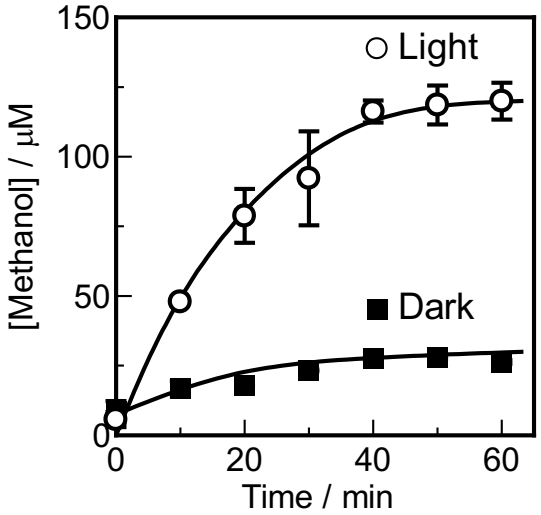


図 2. PSII-pMMO 膜画分による光駆動メタン酸化反応

(2) PSII-pMMO 膜画分で生成される過酸化水素の定量

以前の研究で、pMMO への過剰な電子供与により H_2O_2 が生成し、pMMO を失活させることがわかっている [4]。そこで、PSII-pMMO 膜画分で生成される過酸化水素を定量した。pMMO への電子供与能を持つジュロキノールを PSII-pMMO 膜画分へ添加した結果、最大で 700 μM の H_2O_2 が生成した。一方、光照射した PSII-pMMO 膜画分では、H_2O_2 はほとんど生成しなかった。したがって、PSII-pMMO 膜画分では H_2O_2 による pMMO の失活は起こらないことが分かった。

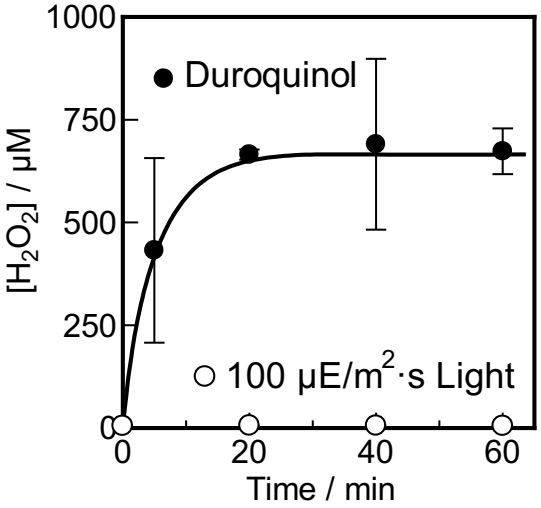


図 3. PSII-pMMO 膜画分で生成される過酸化水素量

4. 今後の展望

本研究で構築した PSII-OB3b 膜画分は、再構成した PSII が光エネルギーを用いて水から電子を得て、膜内のキノンプールを介して pMMO へ電子伝達され、pMMO の酸化反応が進行する。この反応系により、無尽蔵な光エネルギーと水から得た電子を利用した低エネルギーのメタノール生産や他の酵素反応が今後期待される。

参考文献

[1] Ito H, *et al.*: RCS Advances, 4, 8645-8648 (2014)

[2] Setsukinai K, *et al.*: J. Biomol. Chem., 278, 3170-3175 (2003)

[3] Tormo R. J, *et al.* : Arch. Biochem. Biophys., 381, 241-246 (2000)

[4] Miyaji A, *et al.*: J. Mol. Catal. B. Enzym., 57, 211-215 (2009)

毛包原基を用いた皮膚組織の作製

楯　芳樹・景山達斗・福田淳二
横浜国立大学大学院理工学府　化学・生命系理工学専攻
〒240-8501　横浜市神奈川区常盤台 79-5　電話: 045-339-4008
Fax: 045-339-4008　E-mail: fukuda@ynu.ac.jp

培養皮膚モデルは、従来の平面培養では実現できなかった薬物透過性や刺激性を、簡潔に予測できる *in vitro* 評価ツールとして期待されている。しかし、現在の培養皮膚モデルは、表皮一層、もしくは表皮と真皮の二層からなるものが主流であり、皮膚に存在すべき毛髪や皮脂腺などの皮膚附属器が備わっていないため、予測精度や評価できる項目が少ないことが課題であった。本研究では、毛包の原基を生体外培養により調製し、これを培養皮膚に組み込むことで、皮膚附属器を有する皮膚組織の構築を目指した。

1.　はじめに

我々の表面を覆う皮膚は、外界から体を守る役割を担っており、小さな擦り傷であれば、数日で治癒するほどの高い再生能力を有している。そのため、再生医療の分野では、数十年前から、培養細胞を用いて皮膚を再生するアプローチが提案されてきた。すでに培養表皮は国内初の再生医療製品として販売され、治療を目的とした臨床応用に加え、医薬品や化粧品の開発におけるスクリーニングモデルとして利用されている。また近年では、より生体再現性の高い培養皮膚として、表皮と真皮、皮下脂肪を備えた積層化皮膚の構築も進められている。しかしながら、現状の培養皮膚は、備わるべき毛髪や皮脂腺など皮膚附属器が存在せず、構造が不完全であるため、皮膚の主要な機能である外界からのバリア機能や体温・水分調節機能が十分に再現されず、創薬試験において大きな制約となっている。

近年、我々は細胞の自己組織化現象を利用することで、毛包原基に類似した組織を一度に大量に調製する技術を開発し、皮膚附属器の一つである毛包を効率よく再生できることを示した[1]。すなわち、毛包原基をヌードマウスに移植すると、毛周期を繰り返す毛髪が再生された。本研究の最終目標は、毛包などの皮膚付属気を含む培養皮膚モデルを構築することである。今回は、毛包原基を組み込んだ培養皮膚を構築し、ヌードマウスの皮下に埋め込んだシリコーンチャンバー内で組織構造が再構築されるか評価した。

2.　実験方法

(1) 毛包原基の調製

マウス胎児皮膚から採取した 2 種類の毛髪の幹細胞（上皮系細胞と間葉系細胞）を 1 : 1 の比率で培養液に混合し、細胞非接着性コーティングを施した丸底ウェル培養器で 3 日間培養を行った。

(2) 毛包原基を有する培養皮膚の移植

ヌードマウスの背部皮膚を丸く切りとり、ホストの皮膚の自己再生を妨げるように設計したシリコーン製の円筒チャンバー（直径 7.0 mm、高さ 7.5 mm、図 1）を取り付けることで移植床を形成し、調製した毛包原基と表皮角化細胞、真皮線維芽細胞を用いた皮膚前駆体をこの移植床に張り付けるように移植した。

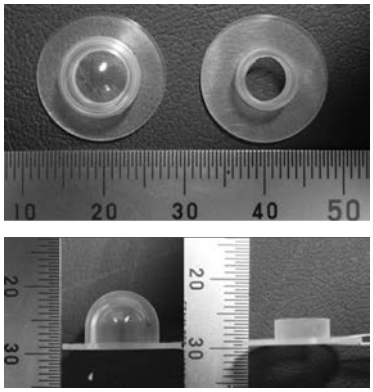


図 1　設計したシリコーンチャンバー

移植 28 日後に再生した毛髪を採取し、走査型電子顕微鏡を用いて、毛髪の表面構造を観察した。さらに、移植 28 日後の皮膚を移植床から取り出し、組織切片を作製したのち、ヘマトキシリン・エオジン（HE）染色、オイルレッド染色を行った。

3. 結果と考察

(1) 毛包原基の調製

培養器に播種した 2 種類の細胞は 1 日目に 1 つの凝集体を形成した後、3 日間の培養で 2 種類の細胞が凝集体内で分離した毛包原基構造を自発的に形成する様子が観察された（図 2）。発生過程の毛包原基は、毛包形成マーカーであるアルカリフォスファターゼ（ALP）が間葉系細胞において発現することが知られている。作製した毛包原基で ALP の発現を評価した結果、発生初期と同様に、間葉系細胞において ALP の発現が確認された。

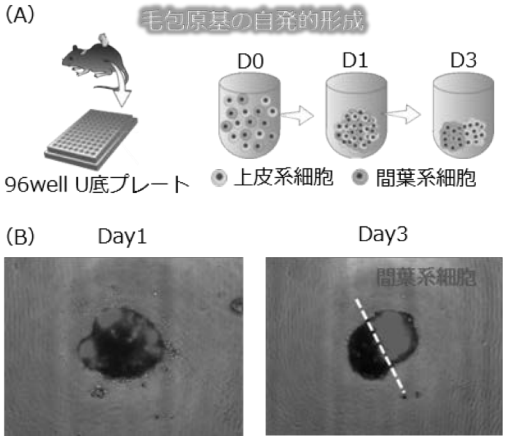


図 2　上皮系細胞と間葉系細胞の自己凝集を用いた毛包原基形成

(2) チャンバー内での附属器を有する皮膚の再生

マウス皮下に埋め込んだチャンバーに、毛包原基と表皮角化細胞、真皮線維芽細胞を移植した結果、移植 21 日目には皮膚の再生とともに、毛髪の形成が確認され、移植 28 日目には数十本の毛髪が再生していた（図 3A）。また、再生した毛髪の電子顕微鏡像を取得したところ、毛髪に特徴的なキューティクル構造が観察された（図 3B）。再生した皮膚の組織切片の HE 染色より、皮膚の表皮層及び真皮層の積層構造が形成し、さらに表皮が真皮側に陥入し毛包が形成している様子が確認された（図 3C）。また、皮脂腺から産生される皮脂をオイルレッド染色で観察したところ、毛穴に沿って皮脂の存在が確認された（図 3D）。今回毛包原基に用いた細胞は、マウス胎児由来の未分化性の高い細胞を用いている。そのため、毛包原基を培養皮膚に組み込むことで、毛包だけでなく皮脂腺も形成されたと考えられる。

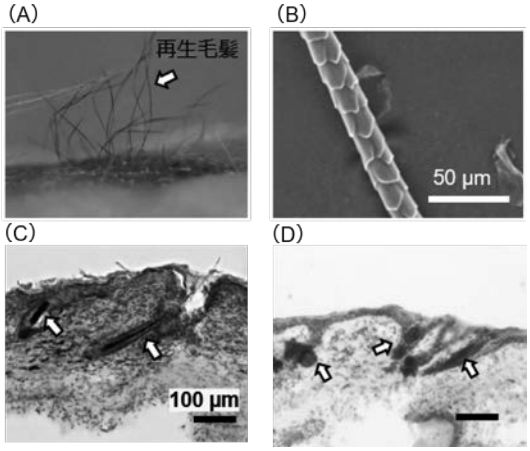


図 3　再生した附属器を有する皮膚
（A）再生した毛髪を有する皮膚、（B）再生毛髪のキューティクル構造、（C）再生毛髪皮膚切片の HE 染色、（D）オイルレッド染色

4. 今後の展望

本研究では、毛包原基を含む培養皮膚が、毛髪や皮脂腺を有する皮膚組織を再生する能力を有していることを示した。この組織は、創薬スクリーニングの精度向上に貢献するのみならず、毛髪再生や皮脂分泌の制御に関わる創薬開発への応用も期待できる。今後は、皮膚附属器を有する培養皮膚を *in vitro* の培養環境で実現することで、完全な皮膚組織の再生を実現したい。そのためには、マウスチャンバー内で皮膚附属器が形成する際に重要な因子を同定することで、*in vitro* の培養条件を最適化する必要があるだろう。近い将来、製薬企業で皮膚附属器をモデルが用いられるよう、本技術をより一層発展させていきたい。

参考文献

[1] T. Kageyama et al., ***Biomaterials***, 154, 291-300, 2018

ハイビスカス花から採取した酵母の特性と泡盛醸造への応用

阿部　峻之[1]・渡辺　大輔[2]・高木　博史[2]・塚原正俊[1*]
[1]株式会社バイオジェット、[2]奈良先端科学技術大学院大学　バイオサイエンス領域
〒904-2231　沖縄県うるま市塩屋 315　電話: 098-979-3515
Fax: 098-979-3515　E-mail: tsuka@ biojet.jp

沖縄県の泡盛は、600 年を超える日本最古の蒸留酒である。我々は、泡盛風味のバラエティー化を目指した取り組みとして新たな泡盛酵母の確立とその応用を目指し、南国イメージを有する「ハイビスカス」から優良菌株 HC02-5-2 を取得した。小仕込み試験の結果、ハイビスカスの花から採取した酵母 HC02-5-2 株を用いると、従来酵母とは異なる新たな風味となることが確認された。また、既知酵母との比較ゲノム解析により HC02-5-2 株はワイン醸造に用いられる酵母と近縁で、一般的な泡盛醸造に用いられている 101 号酵母とは異なるグループに含まれることが分かった。さらに、本株を親株として複数の育種株を取得することで、バラエティーに富んだ泡盛醸造が可能な酵母の取得を進めている。これまでに、ハイビスカス酵母 HC02-5-2 株およびこの育種株である C14 株を用いて泡盛の商品化に成功している。

1.　はじめに

全麹仕込みの単式蒸留酒である泡盛はその酒質が麹や酵母に大きく左右される。以前は、それぞれの酒造所で独自の微生物を保持し活用していたが、太平洋戦争の沖縄戦で酒造所が壊滅的な戦禍を受けたことでそのほとんどを焼失し、その後、多くの方々の努力により泡盛復興につながったという歴史的背景がある。

泡盛酵母については、沖縄国税事務所の玉城らによるアルコールを高生産する泡盛 1 号酵母の単離 [1]、さらに泡を作らない泡盛 101 号酵母の単離 [2] などの成果により、泡盛の生産が安定した。現在、沖縄県のほとんどの酒造所が泡盛 101 号酵母を用いている。

我々は、近年の嗜好の多様化に対応するため琉球泡盛の風味バラエティー化につながる技術確立に取り組んでいる。これまでに、泡盛 101 号酵母を親株とした研究開発により吟醸香を高生産する酵母を作出し、商品化に至っている [3]。

今回、泡盛のブランド化戦略として沖縄らしいイメージを持つハイビスカスに着目し、ハイビスカスの花より泡盛醸造に応用可能な酵母の単離を目指した。単離された「ハイビスカス酵母」の泡盛は実験室での発酵試験、実機での試作を経て商品化された（図 1）。

2.　結果と考察

(1) ハイビスカス花由来醸造用酵母の単離

沖縄県に自生するハイビスカスの花から、スクリー

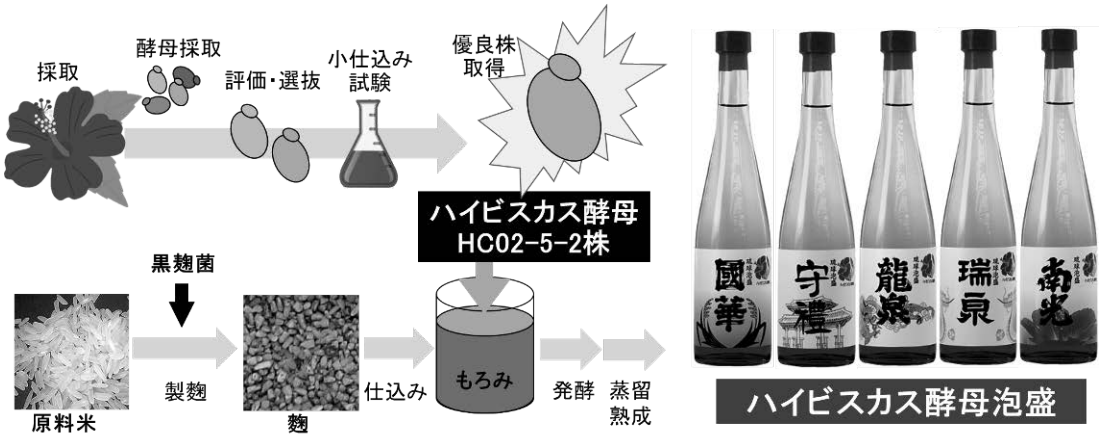


図 1.　ハイビスカス酵母の単離と泡盛への応用

ニングにより高いアルコール生産能を持つ菌を単離した。このアルコール産生菌（HC02-5-2）のゲノム DNA を次世代シーケンサーに供したところ、出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* に特異的な配列を検出することができた。

HC02-5-2 株が泡盛醸造に適した酵母であるか検証するために小仕込み試験を行った。その結果、仕込み開始から 14 日後の最終もろみ中のアルコール濃度は 101 株と HC02-5-2 株では同等であった。このことは実用化を目指す上で、実機においても十分なアルコール収得が見込まれることを示す。また、泡盛の重要な香気成分である vanillin の前駆体 4-vinylguaiacol は、HC02-5-2 株を用いたもろみでは 101 号酵母と比べて 4 倍以上含まれていた。以上の結果から、HC02-5-2 株は泡盛製造に用いられる新たな酵母株としての可能性が示された。

(2) ハイビスカス花由来酵母 HC02-5-2 の系統解析

HC02-5-2 株が出芽酵母の中でどのようなグループに属するか明らかにすることを試みた。系統解析により DNA の配列を比較することで、株間で配列がどの程度類似しているかを図示できるため、文献[4, 5]を参考に系統樹の作成を行った。酵母のゲノム DNA 領域に着目した解析を行ったところ、泡盛 101 号酵母は清酒製造に用いられる協会酵母のグループに含まれるのに対して、HC02-5-2 株はワイン製造に用いられる酵母のグループに含まれた（図 2）。HC02-5-2 株は清酒・焼酎・泡盛酵母とは異なり、系統的にワイン酵母に近い株であることが強く示唆された。101 号酵母との距離を考えると、HC02-5-2 株を用いることで従来の酵母とは異なる風味を有する泡盛の開発が期待された。

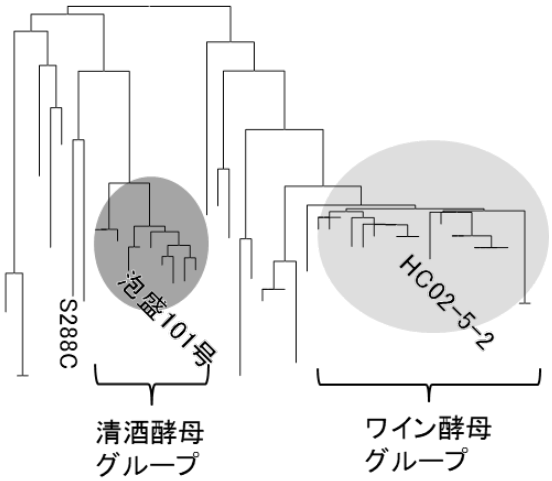


図 2　酵母の系統樹解析

(3) 育種による酵母改良の試み

HC02-5-2 株を用いた泡盛については、実機試験を経て実用化に至った（図 1）。また、ハイビスカス酵母が実用株として有用であったことから、さらなる改良を目指し育種を行った。その結果、これまでに複数の育種株を取得し、その中の 1 つ C14 株については泡盛の商品化に成功している (図 3)。また、特定のアミノ酸代謝をターゲットとすることで、親株より吟醸香を多く生産する育種株を作出した。現在、この株の吟醸香高生産の分子メカニズムについて解析している [6]。

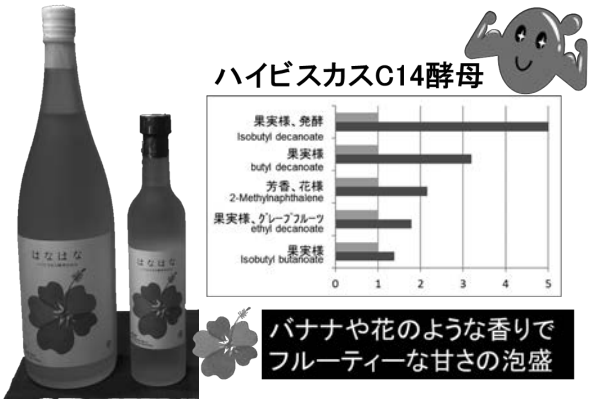


図 3 育種株を用いた泡盛の実用化

3. 実用化への取り組み

HC02-5-2 株を用いた泡盛の商品開発は、一斉販売による相乗効果を狙った新規な試みとして複数の酒造所で同時に進め、5 銘柄が同時に発売された（図 1）。ハイビスカスのイメージに合った華やかな風味の泡盛として各メディアにて紹介された。C14 株以外のハイビスカス酵母の育種株についても商品化を目指している。

我々は、今後も琉球泡盛振興を目指し、沖縄県の酒造所や酒造関係機関を含めた産学官の連携を深め、様々な研究成果を社会に還元していく取り組みを進めている。本取り組みが琉球泡盛の産業振興にとどまらず、沖縄県の文化的価値向上の一助となることを願う。

参考文献

[1] 玉城 武: 日本醸造協会誌, 77, 74-77 (1982)
[2] 新里 修一ら: 日本醸造協会誌, 84, 121-123 (1989)
[3] Takagi *et al*., J. Biosci. Bioeng., 119, 140-147 (2015)
[4] Fay *et al*., PLoS Genet., 1, 66-71 (2005)
[5] Futagami *et al*., Yeast, 34, 407-415 (2017)
[6] 豊川 洋一ら：第 70 回日本生物工学会大会発表

Saccharomyces arboricola と醸造酵母の交配株の作成とその醸造特性の解析

○山本裕貴[1]、藤丸裕貴[1]、Matthew Winans[2]、五島徹也[3]、赤尾健[3]、北垣浩志[1*]

([1]佐賀大学農学部、[2]米国・ウエストバージニア大学、[3]酒類総合研究所)
〒840-8502　佐賀市本庄町 1
*E-mail: ktgkhrs@cc.saga-u.ac.jp

伝統醸造酵母の多くは *Saccharomyces cerevisiae* に属するが、有性生殖能を失っているため醸造特性に悪影響を与える遺伝子を長年の培養で蓄積しまっていると考えられる。そこで本研究では、醸造酵母の遺伝的な改良を目的として、近年自然界で発見された *S. cerevisiae* と同属異種の *S. arboricola* [1]を清酒酵母と交配させ、その醸造特性を調べた。その結果、ミトコンドリア代謝活性の向上など有用な特性変化が交配株で見られた。この研究成果は、遺伝子組換技術を使わずに異種交配により伝統醸造酵母の遺伝的改良が可能であることを示唆するものである。

1.　背景

Hansen が 1883 年に発表して以来、アルコール飲料の製造に使われる醸造酵母は *Saccharomyces cerevisiae* と信じられてきたが、*S. cerevisiae* 以外の *Saccharomyces* 属酵母と *S. cerevisiae* との種間交雑体もアルコール飲料の製造に関わっていたことが近年報告されている。例えば *S. cerevisiae* と *S. eubayanus* と交配してビール下面発酵酵母になったこと[2]や、*S. cerevisiae* と *S. kudriavzevii* が交配した株がワイン酵母に含まれており、この株は、低温での香気成分の合成量が増加していること[3]などが報告されている。一方、伝統醸造酵母は有性生殖を長年行っておらず、無性生殖を行ってきた。このため染色体の相同組換が起きておらず、醸造に悪影響を与える遺伝子も蓄積していると考えられ、遺伝的な改良の余地があると考えられる。

そこで本研究では伝統醸造酵母の遺伝的な改良を目的として、近年発見された、*S. cerevisiae* と同属異種である *S. arboricola* を使って、清酒酵母と交配させその育種への利用の可能性を調べた。

2.　材料・方法

交配試験の際の選択マーカーとして薬剤耐性の *KanMX* プラスミド *pGS39* を清酒酵母 K7 一倍体に、*natMX* プラスミド *pGAL-HO-NAT1* を *S. arboricola 350* に形質転換した。

次に *S. arboricola 350* の薬剤耐性株の胞子形成を酢酸カリウム含有培地にて促した。顕微鏡にて胞子形成を確認後、Zymolyase による細胞壁溶解、超音波による胞子の解離処理を行った。K7 一倍体の薬剤耐性株を混合し 4 時間培養後選抜培地 YPD+0.5 mg/mL G418+0.05 mg/mL Nourceothricin に播種した。形成されたコロニーのゲノム DNA を抽出し種特異的なプライマーを用いた PCR により、*S. cerevisiae* と *S. arboricola* の DNA の有無を確認した。

両親株の DNA の存在を確認した交配株を用いて清酒の小仕込み試験を行った。そして回収した清酒を 13.3 mg/mL メトキシアミンと MSTFA で誘導体化し、GC-FID による成分分析に供した。分析の結果同定された 26 成分の面積値と炭酸ガス減量を説明変数として主成分分析を行った。

3. 結果と考察

(1) 交配株の取得

S. arboricola 350 と清酒酵母 K7 一倍体の交配試験後に選抜培地で形成されたコロニーの DNA を、*S. cerevisiae, S. arboricola* に特異的なプライマーで増幅し、電気泳動を行った。

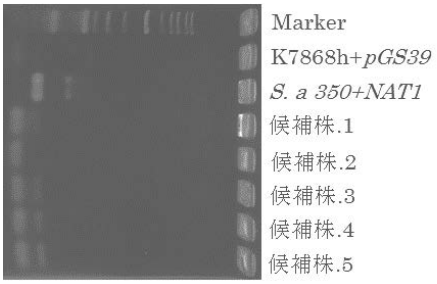


図 1 交配株の PCR 電気泳動による確認
K7868h は清酒酵母を、S.a 350 は *S. arboricola* を表す

図 1 より 4 個のコロニーでは両方の親株と同じ位置にバンドが現れ、交配株であることが分かった。以後交配株.1 を小仕込み試験に用いた。

(2) 主成分分析

次に得られた交配株.1 の特性を調査するために、取得した交配株.1 と清酒酵母 K7-4, *S. arboricola 350* を用いて小仕込み試験を行い、回収した清酒成分をメタボローム解析に供した。この結果検出された 26 個の成分と炭酸ガス減量を説明変数として主成分分析を行った。

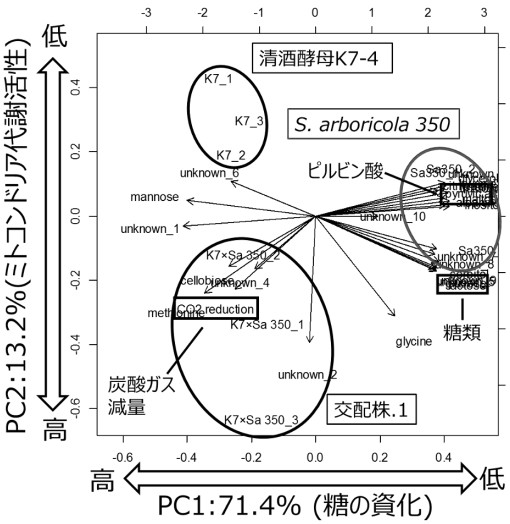


図 2 醸造酵母と交配株のメタボロームの主成分分析（Score plot+Loading Plot）

図 2 の第一主成分に対して糖類、ピルビン酸が正に寄与した。発酵の指標となる炭酸ガス減量は負に寄与した。第一主成分軸は発酵における糖の資化能を表していると推察した。

また第二主成分に対して、炭酸ガス減量が負に、ピルビン酸が正に寄与した。以前の報告によりミトコンドリアの活性が向上した清酒酵母を用いて仕込んだ清酒のピルビン酸量は、親株の K7 と比較して減少したことが明らかになっている [4]。このことから第二主成分軸はピルビン酸を取り込むミトコンドリアの代謝活性を表していると推察した。

交配株は親株よりもピルビン酸との相関は低く、炭酸ガス減量との相関は高かった。そのためピルビン酸を取りこむミトコンドリアの代謝活性が向上し、エタノール発酵が促進されていることが考えられた。

4. 今後の展望

今回の実験結果から、*S. arboricola* と *S. cerevisiae* の清酒酵母との種間交配により得られた交配株は、ミトコンドリアの代謝変化により親株とは異なる有用な醸造特性を持つ可能性が示唆された。他の醸造酵母に対しても、同属異種の酵母と交配させることにより遺伝子組換技術を使わずに遺伝的な改良が可能であると考えられる。*S. arboricola* はこれまで *S. cerevisiae* との異種交配に使われた報告がなく、伝統醸造酵母の遺伝的改良を目指した異種交配相手として今後検討に値すると期待される。

参考文献

[1] Naumov G. et al, *Anton. van Leeuwenhoek* 103.1: 217-228 (2013).
[2] Hebly M. et al, *FEMS Yeast Research* 15.3 (2015).
[3] González S. et al, *International Journal of Food Microbiology* 116.1, 11-18 (2007).
[4] Kadowaki M et al, *Appl. Env. Microbiol.*, 83, 24, e01620-17 (2017).

AI はタンパク質進化を導くか？

：機械学習支援による GFP の YFP 化検証

及川　未早来・齋藤　裕・亀田　倫史・中澤　光・二井手　哲平・津田　宏治・梅津　光央
東北大学大学院工学研究科 バイオ工学専攻 生体機能科学講座タンパク質工学分野
〒980-8579　仙台市青葉区荒巻字青葉 6-6-11-607
電話: 022-795-7274　Fax: 022-795-7276　E-mail: mitsuo@tohoku.ac.jp

大規模な変異体ライブラリーの作製技術やスクリーニング操作の発展は、変異研究の黎明期とは隔世の感がある確率でタンパク質の機能改変を可能としている一方、目的変異体の迅速・確実な取得にはそれなりの設備と資金が必要にもなってきている。本研究では、変異体ライブラリーの作製に機械学習による機能予測を導入し、目的変異体を含む確率が飛躍的に向上している小規模な変異体群(スマートホットライブラリー)を構築することで、設備と資金の規模を必要としない高機能性分子の創出法を提案する。

1.　はじめに

タンパク質の構造と機能の情報化は、合理的な変異導入によるタンパク質の機能改変へ大きな一歩を与え、変異を導入する残基をある程度限定できるようになってきている。そして、変異体群(ライブラリー)も 10^{10} 程度まで調製できるようになると共に、その規模に見合ったスクリーニング技術も提案されつつあり、産業界においても変異導入によるタンパク質の利用拡大に期待が高まってきている。しかし、10^{10} 規模のライブラリーでも 8 残基程度の変異で飽和に達してしまうため、ライブラリー中に最適変異体が含まれる保証はなく、変異導入を繰り返すことが多い。また、それなりの設備と資金を必要とすることが多い。

そこで本研究では、変異体ライブラリーの作製に人工知能である機械学習を利用することで、目的変異体を高い確率で含む小規模なライブラリー(スマートホットライブラリー)を設計し、大規模なスクリーニングを必要としないタンパク質進化工学プロセスを開発した。この手法は、タンパク質の進化を飛躍的に加速でき、食品・環境・医薬品など幅広い分野での応用が期待できると考えている。

2.　解析データおよび方法

(1)　機械学習支援によるタンパク質進化工学

本研究では、緑色蛍光タンパク質(GFP)を黄色蛍光タンパク質(YFP)へ機能改変する系をモデルとして、機械学習支援プロセスを開発した (図 1)。まず、GFP の YFP 化に重要な 4 残基を同時に飽和変異させた GFP 変異体遺伝子をもつ発現ベクター群を用いて大腸菌を形質転換した。そして、生じたコロニーを 200 個程度選択して微量培養し、配列解析と機能評価をした。そして、これらの結果を学習データとして、全変異体(20^4=1.6×10^5)の黄色蛍光性を、機械学習手法の 1 つであるベイズ最適化により予測した。この予測から高機能な上位変異体を含むライブラリー(スマートホットライブラリー)を設計し、スクリーニングすることで最適変異体の取得を目指した。

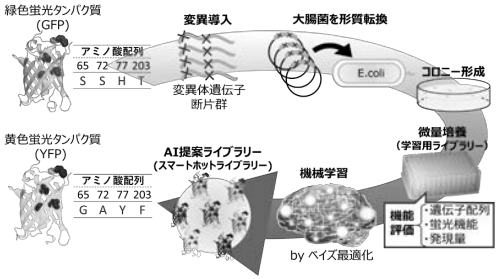


図 1. 機械学習支援によるタンパク質進化工学プロセス

(2)　迅速な変異体群の作製とスクリーニング法の系開発

機械学習の導入に先立ち、変異体群の作製から機能評価までを機械学習に対応した速さで迅速に完遂できる系の構築を行った。まず、効率的に 1 残基に飽和変

異を導入できる 22c-trick 法[1]を応用して、4 残基を同時に飽和変異させた変異体群作製した。また、遺伝子配列解析と機能評価を同時並行で行えるようにすることで、AI の学習に必要な 200 程度のデータを最短 5 日で収集可能となった。

(3) ベイズ最適化に基づく機械学習

上記のスクリーニング系から得られる機能評価データを学習データとして、未知変異体に対してアミノ酸配列からその機能評価値を予測する機械学習手法を開発した。機械学習モデルにはベイズ最適化を用い、予測システムの開発には高速なベイズ最適化ソフトウェアである COMBO[2]を使用した。この予測手法により、配列空間中の全変異体に対して機能評価値を予測することが可能となる。

3. 結果と考察

(1) 機械学習からの全変異体の機能予測

まず、4 残基を同時飽和変異した機械学習用の変異体ライブラリーを発現する大腸菌を生育させた培地プレートから 186 個のコロニーを選択し、遺伝子配列を解析すると共に、微量培養した大腸菌の破砕液から各変異体の蛍光の黄色度と蛍光強度を測定した。その結果、153 種の変異体配列が収集され、そのうち黄色蛍光を発する変異体は 3 種となり、配列既知の既存 YFP の結果も含めれば、有望変異体の存在は全体の 3%程度であった(表 1, 図 2 中の白丸)。

しかし、この学習用データで機械学習し、配列空間中の全変異体(1.6×10^5)について黄色蛍光性の順位付けを行ったところ、配列既知の YFP が上位 1%(1313 位)に入った。この結果から、学習用データ中の有望変異体の存在率が 3%程度であっても、機械学習結果は有効であることが示唆された。

(2) 機械学習利用によるスマートホットライブラリーの構築とその有効性評価

そこで次に、機械学習で提案された変異体ランキング中の高機能な上位変異体群だけからなるスマートホットライブラリーを調製し、機能評価を行った。その結果、学習用データに用いた変異体群(図 2 中の白丸)と比較して、黄色蛍光を示す変異体の存在率が 70%程度まで大幅に増加しており(表 1, 図 2 中の黒丸)、目標としていた既存 YFP を超える黄色蛍光を示す変異体も数多くあった。

表 1. 学習用ライブラリーと機械学習提案ライブラリーにおける黄色変異体割合の比較

	学習用ライブラリー	機械学習提案ライブラリー
Total	155[1)]	63
黄色	4[2)]	44
緑	19[3)]	4
消光	132	15
黄色の割合	2.58%	69.8%

1) GFP及び配列既知の既存YFPを含む 2) 配列既知の既存YFPを含む
3) GFPを含む

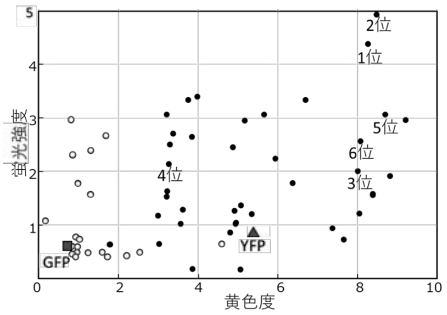


図 2. 学習用ライブラリー(白丸)と機械学習提案ライブラリー(黒丸)の比較
(数値は機械学習でのランキング順位を示す)

機械学習で提案された変異体群の配列を見ると、上位 78 位の変異体までは各残基で推測されたアミノ酸の特徴に偏りがあった。そこで既報のデータから検討したところ、各残基において黄色蛍光を示すことが報告されているアミノ酸が多くランキングされていた。また、Venus と呼ばれる強い黄色蛍光を示す配列が 2 位にランキングされていることも分かった。

これらの結果から、小規模で、かつ、有望変異体の存在が 3%程度の学習用データであっても、本手法を用いることにより、有望変異体の存在率を大幅に増加させることができるだけでなく、学習データに用いた有望変異体を超える高機能な変異体も予測できていることが示唆された。以上から、従来のライブラリー法よりも小規模・確実・迅速にタンパク質を進化できるプロセスを開発できたと考えている。

4. 今後の展望

本研究で開発した機械学習支援によるタンパク質進化工学プロセスの開発は、GFP に限らず酵素などの機能改変や耐熱性の向上にも応用の幅を広げられると考えており、現在その実証を行っている。

参考文献

[1] Sabrina K.,*et al.*,*ACS Synth.*Biol., 2, 83-92 (2013)

[2] Ueno T., *et al*., *Mater. Discov*., 4, 18-21 (2016).

黄ニラ抽出物が示す赤血球凝集素の阻害効果と阻害物質の単離

大西　優[1]・中島　凌[2]・Sara Ahmed Eltigani Ebrahim[3]・鈴木　菜月[2]・美藤　友博[2]・清水　克彦[4]・畑中　唯史[5]・有馬　二朗[2]
[1]鳥取大学大学院持続性社会創成科学研究科　農学専攻、[2]鳥取大学農学部　生命環境農学科、[3]鳥取大学大学院連合農学研究科　生命資源科学専攻、[4]鳥取大学地域価値創造研究教育機構、[5]岡山県農林水産総合センター　生物科学研究所
〒680-8553　鳥取市湖山町南 4-101　電話: 0857-31-5363
Fax: 0857-31-5347　E-mail: arima@tottori-u.ac.jp

Porphyromonas gingivalis は、偏性嫌気性グラム陰性の歯周病原菌であり、糖を資化出来ないため、様々なペプチダーゼや赤血球凝集素を産生して、ヘムやペプチド、アミノ酸を栄養源として取得する。従って、これらの阻害は菌の生育や歯周組織・赤血球破壊の抑制につながる。本研究では、黄ニラ抽出物から青ニラよりも強い *P. gingivalis* の赤血球凝集阻害活性が見出されたため、赤血球凝集抑制物質の性質検討と単離・同定を試みた。性質検討の結果、黄ニラ抽出物には複数の阻害物質の存在が示唆され、全体的に比較的不安定な低分子であることが考えられた。最も強い凝集阻害活性を示す物質の単離を試みた結果、抽出物よりも 90 倍程度高い阻害活性を持つ画分が得られたが、分画後のサンプルからはアルデヒドやケトン、ベンゼン環を持つ化合物が複数混在していた。

1.　はじめに

歯周病は、虫歯と並んで歯を失う二大原因の内の一つであり、主な歯周病原菌として *Porphyromonas gingivalis* が知られている。*P. gingivalis* は、糖を資化できず、ペプチドやアミノ酸、ヘムを栄養源として要求する偏性嫌気性細菌であり[1]、歯周ポケット奥深くに存在して、栄養源を取得するために様々なタンパク質分解酵素や赤血球の凝集素を産生する。これらの機能により、歯肉コラーゲンや赤血球が分解され、歯周病につながるため、上記タンパク質機能の阻害によって、菌の生育や歯周組織、赤血球の破壊を抑制できると考えられている[2,3]。

黄ニラは青ニラを遮光軟化栽培したもので、淡い香りと柔らかい食感が特徴の食材であり、出荷の際には根元や先端を切断し、切断個所は廃棄物として捨てられる。栄養面では青ニラに劣るとされているが、これまでの予備実験により黄ニラからは青ニラより強いグラム陰性細菌の生育抑制活性や抗酸化機能が観察されている。この性質は、黄ニラ廃棄部の、付加価値向上や機能性物質の原料としての利用展開につながる。本研究では、黄ニラの廃棄部から機能性を見出すことを目的として、グラム陰性細菌である *P. gingivalis* の赤血球凝集や溶血作用、タンパク質分解酵素に対する阻害を指標として、黄ニラ抽出物に存在する歯周病原因子抑制物質の探索を行った。

2.　方法

(1) 黄ニラ水抽出液の調製

5 品種（海南、ハイパーグリーンベルト、ミラクルグリーンベルト、スーパーグリーンベルト、ワンダーグリーンベルト）の黄ニラ及び 1 品種（ワンダーグリーンベルト）の青ニラの重量を測定し、等量の蒸留水を添加した。次にミキサーを用いて破砕した後、遠心して残渣を除き、抽出物として使用した。

(2) 歯周病原因子の評価

P. gingivalis を平板培地上で嫌気的に 48~72 時間培養した後、菌体を回収した。続いて菌体の 10 倍量の PBS で懸濁後、超音波ホモジナイザーで破砕し、遠心上清を *P. gingivalis* 菌体サンプルとして用いた。

歯周病原因子として溶血、赤血球凝集、タンパク質分解活性を取り上げた。溶血や赤血球凝集は、ウマの脱線維血液に *P. gingivalis* 菌体サンプルを加えて評価した。タンパク質分解活性は、Bz-DL-Arg-pNA やコラー

ゲン酸性溶液を基質として選択し、*P. gingivalis* 菌体サンプルと混合して生じる黄色色素や、コラーゲン凝固の阻害を見ることで評価した。また、歯周病原因子に対する阻害は、*P. gingivalis* 菌体サンプルにおける上記活性の減少をみることで評価した。

(3) 赤血球凝集阻害物質の単離工程

黄ニラ抽出物から溶媒抽出を行った後、順相カラムクロマトグラフィー及び Sep-Pak C18 に供した。赤血球阻害活性を示すフラクションについては TLC や MS を使って評価を行った。

3. 結果と考察

(1) 黄ニラ抽出物が示す歯周病原因子阻害活性

5 品種の黄ニラと青ニラ（計 6 サンプル）の抽出物を調製し、それぞれについて *P. gingivalis* の溶血、赤血球凝集、及びタンパク質分解活性における阻害を評価した。その結果、いずれも青ニラより黄ニラが強い阻害活性を示した。特に黄ニラ品種の 1 つであるミラクルグリーンベルトで、赤血球凝集に対する強い阻害活性が確認された（表 1）。

表 1　青ニラ及び黄ニラ水抽出物が示す歯周病ゲイン因子阻害活性　nd : not detectable、活性は強い順に++、+、±と示した。黄ニラの品種；K：海南、H：ハイパーグリーンベルト、M：ミラクルグリーンベルト、S：スーパーグリーンベルト、W：ワンダーグリーンベルト

歯周病原因子	青ニラ	黄ニラ				
		K	H	M	S	W
溶血	nd	++	++	++	++	++
赤血球凝集	nd	+	++	++	+	+
Bz-DL-Arg-pN 分解	nd	±	+	++	+	±
コラーゲン分解	nd	nd	+	+	nd	nd

(2) 赤血球凝集阻害物質の性質

ミラクルグリーンベルトが示す強い赤血球凝集阻害活性に焦点を当て、その性質を知るための初期検討を行った。抽出物を 95℃で 30 分処理を行うと赤血球凝集阻害活性の減少が確認されたが、80℃まで処理温度を下げると阻害活性が失われなかった。また、凍結乾燥を行っても活性の減少が確認されたことから、比較的熱や凍結に対して不安定な物質であることが考えられた。一方で、酸処理では阻害活性は失われず、透析によって阻害活性が失われたことから、阻害物質はある程度 pH に対して安定な低分子化合物であることが示唆された。溶媒抽出や限外濾過、逆相クロマトグラムによる単離工程を検討した結果、複数の画分にわたって阻害活性が確認されたことから、阻害に関与している物質が複数存在していることが示唆された。

(3) 赤血球凝集阻害物質の単離

最も強い阻害活性を示す物質の同定を目的として、最小阻害濃度が最も低い画分を回収しながら、酢酸エチルによる溶媒抽出、順相カラムクロマトグラフィー、Sep-Pak C18 により分画を行った。その結果、抽出物よりも 88 倍高い活性を持つ画分が得られた。しかし分画後のサンプルを LC/MS により解析を行ったところ、各画分それぞれ異なるピークを示し、TLC 分析からも、分画後のサンプルにはアルデヒド、ケトン基やベンゼン環を持つ化合物が複数混在していることが示唆されたため（図 1）、単離にはまだ工程が必要であることが分かった。現在は阻害物質の単離に向けて更なる抽出方法を模索している。

図 1. Sep-Pak C18 により分画後の活性画分における TLC 分析。A：ジニトロフェニルヒドラジンによる検出、B：リンモリブデン酸による検出、C：アニリンジフェニルアミンによる検出、D：ニンヒドリンによる検出、E：UV 照射による検出。各パネル、レーン 1：素通り画分、レーン 2：0% AcCN、レーン 3：5% AcCN、レーン 4：10% AcCN、レーン 5：20% AcCN

4. 今後の展望

黄ニラは青ニラよりも高級な食材として知られているが、収穫・出荷において、多くの箇所が切り捨てられて廃棄される。本研究によって、青ニラにはない機能性の 1 つとして歯周病原因子である赤血球凝集作用が黄ニラから見出され、その性質が評価された。現段階では物質の単離には至っていないが、黄ニラ廃棄部分の、口腔内疾病予防に関連する機能性材料としての利用が望まれる。今後は物質の単離と赤血球凝集阻害メカニズムについて追及していきたい。

参考文献

[1] Shah H.N. and Collins M.D.: J. Syst. Bacteriol. 38, 128-131 (1988)

[2] Kadowaki T., *et al.*: J. Biol. Chem. 269: 21371-21378 (1994)

[3] Xu Y., *et al.*: J. Mol. Biol. 375,708-719 (2008)

代謝情報基盤整備のための多様な微生物資源の活用の可能性

寺尾拓馬[1]・細山哲[1]・土金恵子[1]・宮澤せいは[1]・鋤先まゆ子[1]・白井智量[2]・川﨑浩子[1]
[1]独立行政法人製品評価技術基盤機構バイオテクノロジーセンター (NITE･NBRC)
[2]国立研究開発法人理化学研究所環境資源科学研究センター (理研･CSRS)
*〒292-0818　千葉県木更津市かずさ鎌足 2-5-8　電話: 0438-20-5764
*Fax: 0438-20-5582　E-mail: bio-sangyo-inquiry@nite.go.jp

スマートセルインダストリーの研究開発支援を目的として、カルチャーコレクションが保有する微生物約 700 株を対象に、工業原料となり得る数十種類の有用化合物について HS-GC/MS で一斉分析を行ったところ、既知の合成酵素遺伝子を保有していないにも関わらず、合成ゴム原料などの有用化合物を生産している微生物の存在が複数確認された。本結果は、コレクションに保存されている微生物資源には未知の代謝経路や未知の酵素が存在する可能性を示唆するものであり、スマートセル構築においても多様な生物資源の有効活用が期待される。

1.　はじめに

2009 年に OECD から“Bioeconomy”が提唱され、欧米各国を中心に脱石油化学に向けてバイオ技術による物質生産産業を推進する政策が打ち出された。国内でもスマートセルインダストリーにより、化石燃料に依存しない工業プロセスや化学合成では生産困難な有用物質の創製などが期待されている。スマートセルインダストリーとは、CRISPR/Cas9 などに代表されるゲノム編集技術とそれをサポートする次世代シーケンス技術、オミックス技術、情報解析技術により、高度に機能がデザインされ、機能の発現が制御された生物細胞「スマートセル」を用いたバイオ産業のことである[1]。

効率的なスマートセル構築のために利用されている人工代謝経路設計ツール（M-Path [2]など）は、基本的には公知の化合物情報や酵素情報に基づいて設計されている。新規代謝経路の推定を行うためには、予測精度の向上と、多様な基盤情報の拡充が必要不可欠である。現在、研究が進んでいる生物資源は限られた種であることを考えると、基盤情報を拡充するためには、多様な生物資源が有する未知の代謝経路情報の取得と情報の整理が必要である。そこで本研究では、NBRC が保有する多様な微生物を対象に、工業原料となり得る有用な汎用化合物の生産能を評価し、未知の代謝経路の存在について可能性調査を行った。

2.　実験方法

NBRC が保有する微生物 7 門 158 属 714 株（表 1）を対象に、密栓したガラスバイアル瓶を用いて、NBRC が指定する液体培地 1～5 mL および培養温度で、5～14 日間静置培養を行った。続いてヘッドスペースガスクロマトグラフィー質量分析計（HS-GC/MS）にて約 70 種類の揮発性化合物を標的として、スキャンモードにて気相成分の一斉分析を行った。得られたクロマトグラムのピーク面積から培地成分由来のピーク面積を差し引くことにより、各菌株における化合物生産能を評価した。生産性が確認された菌株については、KEGG [3] および BRENDA [4]のデータベースで、各化合物の合成に関与するとされる酵素遺伝子の有無を判別することで、合成経路の新規性を調査した。

表 1 解析対象とした微生物

Domein	Phylum	Class	Order	Family	Genus	Strain
Bacteria	Actinobacteria	3	14	34	48	206
	Bacteroidetes	4	4	5	10	19
	Deinococcus -Thermus	1	1	1	1	1
	Firmicutes	2	3	13	29	228
	Proteobacteria	4	15	31	62	244
Archea	Euryarchaeota	4	4	4	5	5
Eukaryota	Ascomycota	2	2	2	3	11
Total		20	43	90	158	714

3.　結果と考察

(1) 全体的な傾向

714 株を対象に一斉解析した結果、特定の種に限って検出された化合物、多くの菌株が生産しており分類学的な傾向が見られないものなど、その特徴は化合物によって様々であった。例えば、アセトン・ブタノール・

エタノール発酵（ABE 発酵）で知られる *Clostridium* 属では、報告のとおり、アセトンや n-ブタノールの生産が確認された。一方で、化合物によっては、生合成経路および合成酵素が知られていないにもかかわらず、検出されたものも存在した。以下、産業上有用と思われる化合物 3 種（イソプレン、酢酸エチル、1,3-ブタジエン）を例に、情報調査を行った結果と未知の合成経路が存在する可能性について紹介する。

(2) イソプレン (Isoprene)

イソプレンは、イソプレンゴムやブチルゴムなどの原料として重要であり、工業的にはナフサや軽油を熱分解することで主に生産されている。生合成経路としては、メバロン酸経路または非メバロン酸経路を経由して DMAPP から Isoprene synthase により合成される経路が既知反応として知られている（図 1, 表 2）。しかし、KEGG Orthology の情報では、Isoprene synthase を遺伝子的に保有していないと判別される Actinobacteria 門や Alphaproteobacteria 綱に属する菌株で、イソプレンが検出されたことから、これらの菌株には未知の合成経路が存在する可能性が示唆された。

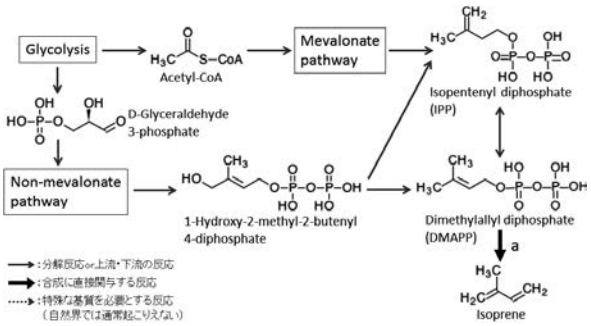


図 1 KEGG･BRENDA に基づくイソプレン合成経路図

表 2 KEGG･BRENDA に基づくイソプレン合成酵素

経路	EC 番号	酵素名	酵素遺伝子保有生物 論文報告）
a	4.2.3.27	isoprene synthase	植物

(3) 酢酸エチル (Ethyl acetate)

酢酸エチルは、印刷インキや塗料、接着剤、除光液、香料などの用途で利用される化合物で、工業的には硫酸を触媒に酢酸とエタノールを縮合重合する方法などで合成されている。生合成経路としては解糖系からピルビン酸を経由して、アセチル CoA、酢酸、エタノールを基質とする合成経路が一般的に知られている（図 2, 表 3）。しかし、KEGG Orthology の情報では、表 3 に記載されている酵素を遺伝子的に保有していないと判別される Firmicutes 門に属する菌株で、酢酸エチルが検出されたことから、これらの菌株には未知の合成経路が存在する可能性が示唆された。

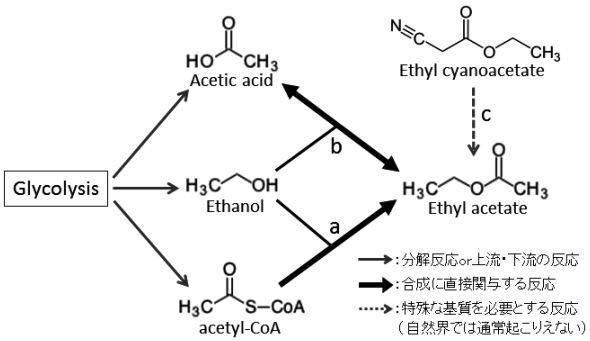


図 2 KEGG･BRENDA に基づく酢酸エチル合成経路図

表 3 KEGG･BRENDA に基づく酢酸エチル合成酵素

経路	EC 番号	酵素名	酵素遺伝子保有生物 論文報告）
a	2.3.1.268	ethanol O-acetyltransferase	*Wickerhamomyces anomalus*
a	2.3.1.84	alcohol O-acetyltransferase	植物、真菌
a, b	3.1.1.1	carboxylesterase	植物、哺乳類、真菌、細菌、古細菌
c	3.5.5.7	aliphatic nitrilase	植物、真菌、細菌

(4) 1,3-ブタジエン (1,3-butadiene)

1,3-ブタジエンは、自動車のタイヤの素材として多用されるスチレン・ブタジエンゴムなどの各種合成ゴムや、代表的なプラスチックである ABS 樹脂の原料として重要な化合物である。天然の生合成経路は知られていないが、本研究にて Firmicutes 門に属する一部の菌株から 1,3-ブタジエンが検出されたことから、これらの菌株には未知の合成経路が存在する可能性が示唆された。

4. 今後の展望

前述の化合物 3 種以外でも未知の合成経路を有する可能性を持つ微生物が複数確認された。これら未知とされる代謝経路情報はスマートセルインダストリーに貢献できるものと考えられる。今後は、これまであまり注目されてこなかった難培養微生物や絶対嫌気性菌を対象にメタボローム情報の更なる充実化を目指す。また、これらの情報は NBRC から提供することを検討しており、8 月頃に HP※でお知らせする予定である。

※https://www.nite.go.jp/nbrc/industry/index.html

参考文献

[1] 経済産業省 (2016) バイオ小委員会中間報告書「バイオテクノロジーが生み出す新たな潮流〔スマートセルインダストリー時代の幕開け〕」

[2] Araki, M., Cox, RS. 3rd, Makiguchi, H., Ogawa, T., Taniguchi, T., Miyaoku, K., Nakatsui M., Hara, KY., and Kondo, A.: *Bioinformatics*, 31(6): 905-911 (2015).

[3] Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes., https://www.genome.jp/kegg/kegg.html

[4] BRENDA Comprehensive Enzyme Information System., http://www.brenda-enzymes.org

第 70 回日本生物工学会大会講演トピックス集

2018 年 8 月 21 日発行

発行所　公益社団法人　日本生物工学会
〒 565-0871 大阪府吹田市山田丘 2-1
大阪大学工学部内
TEL. 06-6876-2731　FAX. 06-6879-2034
E-mail: info@sbj.or.jp
https://www.sbj.or.jp

編　集　第 70 回日本生物工学会大会実行委員会