



N I T E の生物遺伝資源の産業利用促進事業

独立行政法人製品評価技術基盤機構（NITE）
バイオテクノロジー本部生物遺伝資源開発部門

目 次

1 .	ご挨拶	1
2 .	N I T E との産業利用促進に係る共同研究	1
	改変型S-ヒドロキシニトリルリアーゼを用いた光学活性シアノヒドリン合成技術の開発	1
	[N I T E - 日本触媒チーム：株式会社日本触媒、京都大学工学部]	
	生物学的手法を用いた光学活性非天然型アミノ酸ライブラリー構築法の開発	5
	[N I T E - 早稲田大学チーム：早稲田大学理工学部、チッソ石油化学株式会社]	
	R I T E バイオプロセスによる高効率化学品製造に資する基盤技術要素開発の研究	9
	[N I T E - R I T E チーム：財団法人地球環境産業技術研究機構 (R I T E)、株式会社日本化薬]	
	遺伝子パターンニング化技術を応用した微生物の遺伝子レベルでの品質管理及び安定供給に資する迅速スクリーニング用基盤データベースの作成と基幹検索ソフトウェアの開発研究	13
	[N I T E - ヤマト科学チーム：ヤマト科学株式会社、G&Gサイエンス株式会社]	
3 .	その他	18
	特許出願件数	18
	学会発表	18

- ご 挨拶 -



宮崎正浩
NITEバイオテクノロジー本部長

NITEは、NBRCが保有する生物遺伝資源の産業利用を企業や大学と共同で進めるため、産業利用促進事業を平成15年度から実施してきました。現在までに着手したテーマ4件の内2件が17年6月末で終了し、残る2件の内、1件が18年2月に、残る1件が18年9月で終了する予定であり、4件全てが産業利用に向けた顕著な成果を上げ成功裏に終了しようとしています。本日この「ちばバイオクラスター交流会」の場でこれら4件の研究成果を発表できることを大変喜ばしく思います。これまで本事業に大変な熱意をもって取り組んでいただいた共同研究先の関係者の皆様方に厚く御礼を申し上げますとともに本日の交流会を契機に、産業界、学会、研究機関の皆様が今後一層NITEの生物遺伝資源を利用されることを期待しています。



原山重明
NITEバイオテクノロジー本部生物遺伝資源開発部門長

独立行政法人製品評価技術基盤機構(NITE) バイオテクノロジー本部では、微生物を始めとする多様な生物遺伝資源を収集・保存し、基礎科学および産業での利用を図っています。しかし、多くの資金を費やして魅力ある生物遺伝資源を作っても、それが科学の振興あるいは新規ビジネスとして結実するまでに長い時間を要してしまうならば、その期間は、投資が回収できない「死の谷」となってしまいます。これを防ぐために、当本部では、生物遺伝資源の利用を促進し、また、利用者のニーズを直接のコンタクトで吸収することを目的に、「産業利用促進事業」を実施いたしました。この事業では、生物遺伝資源を用いた新規ビジネス創世を、企業とNITEが共同で実施するプロジェクトを四件、それぞれ二年の期間で実施しています。本事業は幸いにして多大な成果を生み、生物遺伝資源およびその情報の有用性を大いにアピールすることが出来ました。今回、その概要をパンフレットにまとめました。NITEの事業の一端を皆様にご覧いただき、NITEの持つ生物遺伝資源に更なる関心を持って頂ければ幸いです。

改変型S-ヒドロキシニトリルリアーゼを用いた光学活性シアノヒドリン合成技術の開発



市毛栄太 (1)



四十九俊彰 (2)

遠藤眞智子 (3) 北村邦昭 (4)

(1) 株式会社日本触媒 (2), (3), (4) NITE

ヒドロキシニトリルリアーゼは、アルデヒド、ケトン等のカルボニル化合物と青酸から光学活性なシアノヒドリンを生成する反応を触媒する酵素である。光学活性シアノヒドリンはヒドロキシカルボン酸、アミノアルコール、アミノ酸類などへ誘導することができ(図1) 抗菌剤、降圧剤、抗腫瘍剤などの医薬品合成中間体として有用である。

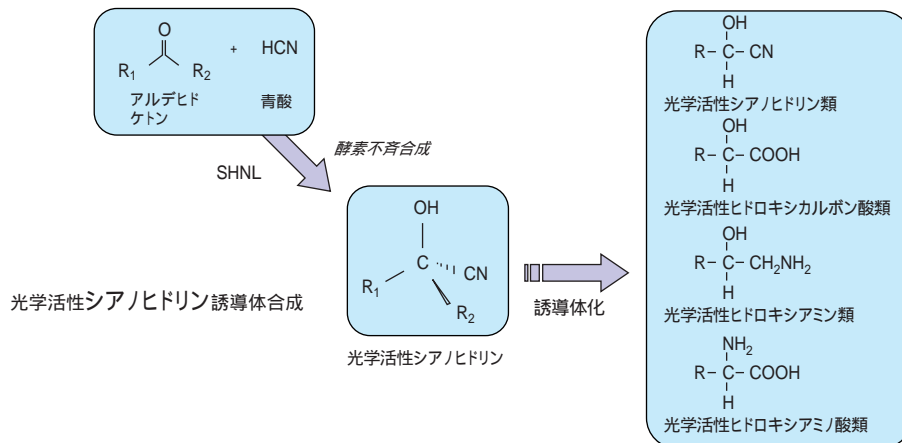


図1 S-ヒドロキシニトリルリアーゼを用いた光学活性シアノヒドリン誘導体生産の概要

しかしながら天然型のS-ヒドロキシニトリルリアーゼ(SHNL)は酵素反応条件下での安定性が不十分であり、工業規模で使用するためには、より安定な酵素の開発が望まれていた。またSHNLは植物体に僅かに含まれるのみであるため、遺伝子組換え菌による大量生産方法の確立が必須であった。そこで我々は、競争力の高い酵素生産プロセスの開発を目指し、1.耐熱性に着目した、改変SHNLの開発、2. SHNL高生産株の構築、および高生産培養条件の確立による、大量生産法の開発を行った。

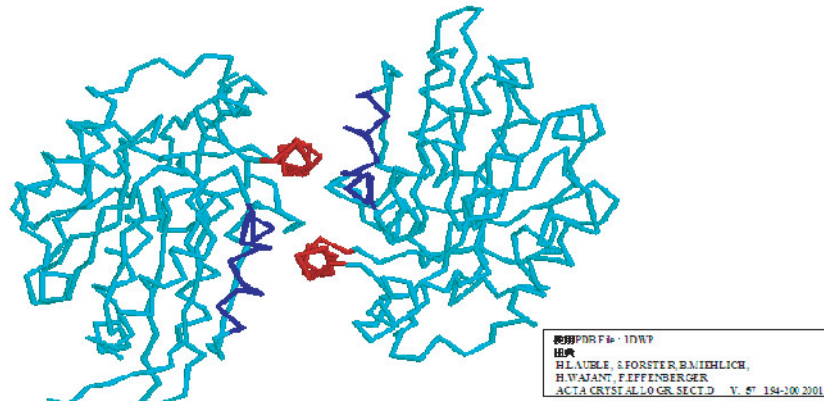
-1. 耐熱化SHNLの開発

一般に耐熱性酵素は通常の酵素に比べ物理化学的安定性に優れているといわれている。そこで酵素の安定性を向上させるためのアプローチとして、SHNLを耐熱化することとした(図2)。本検討は、独立行政法人製品評価技術基盤機構(NITE)及び、京都大学今中研究室との共同研究として実施した。



図2 耐熱化SHNL開発戦略の概要

はじめにerror prone PCRによってSHNL遺伝子にランダムな変異を導入し、未変異酵素に対し有為に熱安定性の向上した変異遺伝子を選抜した。選抜された耐熱化変異酵素遺伝子の配列解析の結果、変異箇所がSHNLのダイマー形成部位付近に集中していることが明らかとなった(図3)。



図中赤:ヘリックスD3' 青:ヘリックスA 共にダイマー形成部位

図3 SHNLのダイマー形成部位

この結果から、変異導入によりダイマー形成部位に新たな結合、相互作用が生じたため、モノマー同士の結合が安定化したことにより耐熱性が向上したと考えられた。

それぞれの変異部位のアミノ酸を最適化し、更に最適化した部位を1つの遺伝子上に複合することで、耐熱性を相加的に向上させることができた。現在のところ10以上の耐熱化に成功している(図4)。

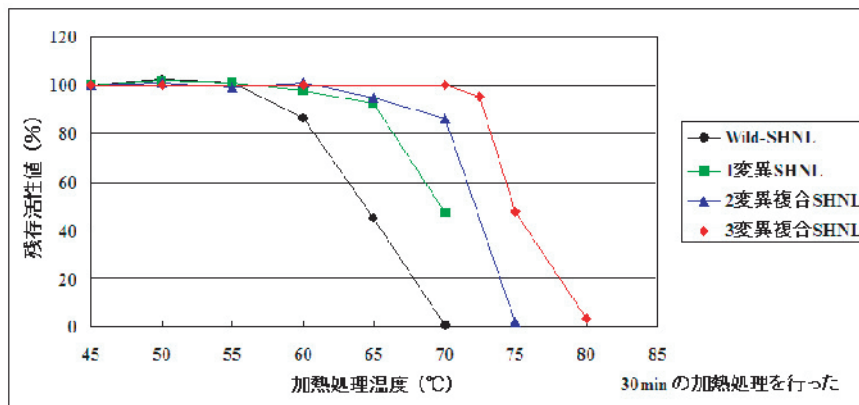


図4 変異箇所の複合が耐熱性に及ぼす影響

本検討で開発した耐熱化SHNLはアルコール、酢酸エチル等の有機溶媒に対する耐性も向上していることがわかった。これらの結果から耐熱性と有機溶媒耐性等の環境ストレスに対する耐性には相関があることが示された。本耐熱化SHNLは組換え大腸菌により生産することができ、菌体破砕物を加熱すると大腸菌由来のタンパク質のみを選択的に不溶化できるため容易に精製できた。このことは酵素の大量生産プロセスにおいて非常に有利である。(図5)。

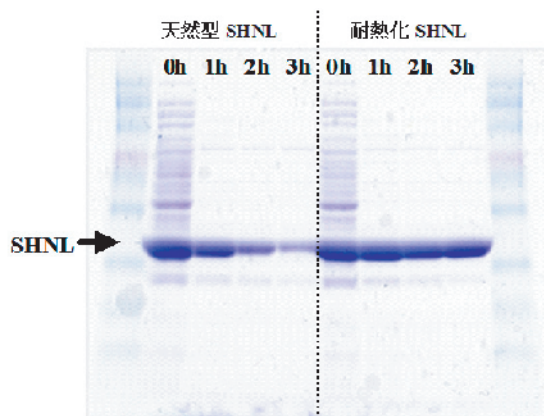


図5 熱処理によるSHNLの精製

本耐熱性SHNLを用いて光学活性シアノヒドリン合成を実施したところ、期待通りに反応の安定性が向上した。また変異導入による立体選択性の低下は生じなかった。

-2 S-ヒドロキシニトリルリアーゼ大量生産法の開発

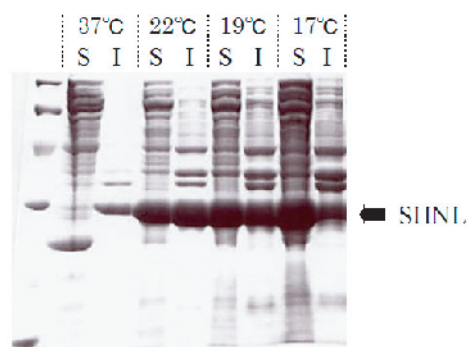
天然型SHNL遺伝子が大腸菌に組換えて発現試験を実施したところ、十分なSHNLの生産性を得ることができなかった。そこで、SHNL高生産株の構築及び高生産培養条件の検討によるSHNL大量生産法の開発を行うこととした。

・SHNL高生産株の構築

SHNL遺伝子が大腸菌体内で効率よく発現させるための方策として、遺伝子配列中のレアコドンの改変を行った。公開されている大腸菌のコドン使用率情報を元に、使用頻度が低いコドンをより高頻度のものへ変更した配列をデザインし、大腸菌型SHNL遺伝子を全合成した。この合成遺伝子での発現を行った結果、SHNLの生産性は3倍程度に向上した。しかしSDS-PAGE解析の結果、生産されたSHNLのほとんどが不溶性画分に存在していることが分かった。この結果から、実際にはコドン改変により顕著にSHNL生産性が向上しているものの、そのほとんどが封入体として生産されていることが示された。従って、封入体の形成を抑制する方法を見出すことにより、更なるSHNL生産性の向上が期待された。

・高生産培養方法の開発

培養条件の最適化からSHNL生産性向上を図るため、培養温度の検討を行った。培養温度を通常よりも低く設定し培養を行ったところ、SHNL活性が大幅に増加した。SDS-PAGE解析の結果から、培養温度を下げたことで可溶性のSHNLの割合が増加していることが分かった。培養温度を更に下げることによって可溶性のSHNLの割合は大きく増加する傾向を示し、17℃では、ほとんどが可溶性のSHNLであることがわかった(図6)。この結果から、低温で培養することにより、生産された酵素のフォールディングが正常に行われ、活性型のSHNLの割合が増加していると考えられた。



S; Soluble fraction, I; Insoluble fraction

図6 培養温度が封入体形成に及ぼす影響

本低温培養では封入体形成が抑制されるばかりでなく、菌体収量も大幅に増加することがわかった。低温下での培養では、代謝速度が低下する。従って酸素消費速度が低下することにより酸素供給律速になりがちな培養系がより長期間好気的環境に保たれ、栄養源が好気的に代謝された結果、菌体収量が増加したと考えられた。本検討の結果、低温培養法は高活性な菌体を高密度で培養できる優れた方法であり、単位培養液当りのSHNLの生産性を飛躍的に増加させることができた(図7)。

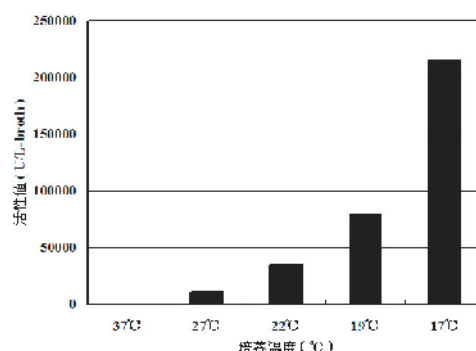


図7 低温培養法によるSHNL生産性の向上

まとめと展望

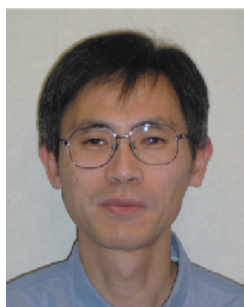
我々は天然型SHNLの耐熱化改変を行うことにより、安定かつ精製の容易な耐熱性SHNLの開発に成功した。更にコドンの改変と低温培養法によるSHNL大量生産法を構築することができた。本検討で得られた成果は現在実用化研究段階にあり、光学活性シアノヒドリン誘導体合成プロセスへ応用していく予定である。酵素触媒は優れた反応選択性を有する触媒として化学工業への応用が大いに期待されている。しかし触媒調製コストが高い上に耐久性が低いという弱点があり、膨大な種類の酵素反応が知られている割に実用化されている例は少ない。本成果はSHNLの生産ばかりでなく他の酵素への適用も可能であると考えられ、未使用酵素の化学工業への利用促進に寄与できると期待される。



今中 忠行

工学博士、京都大学工学研究科教授

生物学的手法を用いた光学活性非天然型アミノ酸ライブラリー構築法の開発



澤井俊哉 (1)



駒大輔 (2)

橋本絢子 (3)

(1) 早稲田大学チーム (2),(3) NITE

研究目的

化合物多様性 (Chemical Diversity) は、新規機能物質創製の産業技術基盤となる。有機化合物を得るには化学合成法が主流になっているが、位置選択性や立体特異性を制御できる生物反応の特徴を利用しつつそこに新たな技術を導入することで、多様な化合物を精密かつ効率的に合成することが可能となり、多彩な化合物ライブラリーを整備することができる。

アミノ酸は分子内にアミノ基とカルボキシル基を持つために反応性が高く、医薬品合成における重要な原料として利用されている。なかでも、非天然型アミノ酸 (生体内でタンパク質を構成する20種類のアミノ酸以外のものの総称とする) を部分構造に持つ医薬品は、天然型アミノ酸を用いた場合では得られない効果を発現することがあるため、非天然型アミノ酸含有医薬品は増加傾向にある。また、非天然型アミノ酸を有するオリゴペプチドには特異な生理活性を有するものが多いことから、医薬品開発への非天然型アミノ酸導入の有用性がうかがえる。実際に、エイズプロテアーゼの阻害剤や整腸剤など、非天然型アミノ酸を利用したさまざまな医薬品が開発されている。

非天然型アミノ酸を医薬品原料として使用するには、その光学純度の高さが重要であるため、生体触媒を用いる合成法は極めて有効である。その代表的な方法として、 α -アミノ酸アミノトランスフェラーゼを用いる方法が挙げられる (Fig.1)。 α -アミノ酸アミノトランスフェラーゼは α -ケト酸のカルボニル基にアミノ基を転移させ、 α -ケト酸を対応するアミノ酸に変換する酵素である。本酵素を用いることにより、光学活性を持たない α -ケト酸から、光学純度がほぼ100%の非天然型アミノ酸を合成することが可能である。本法の特徴は、L-アミノ酸アミノトランスフェラーゼとD-アミノ酸アミノトランスフェラーゼを使い分けることにより、一つの原材料から選択的にL体とD体の両方の非天然型アミノ酸を合成できることである。また、アミノトランスフェラーゼの基質特異性が比較的低いことも非天然型アミノ酸を合成する上で有利な点であると考えている。原料となる非天然型 α -ケト酸の効率的な化学合成法が共同研究チームである早稲田大学清水功雄研究室で開発されているため、基質特異性の異なるさまざまな酵素を使いわけて用いることで、任意にデザインした多種多様な非天然型アミノ酸を効率的に合成することが可能となる。

本研究では、生合成ルート上にはない多様な α -ケト酸を化学合成し、アミノ酸アミノトランスフェラーゼを作用させて目的の非天然型アミノ酸を効率的に合成する手法の開発を検討した。より具体的には、NITEが有する微生物遺伝資源ライブラリーの中から、これらの反応に適した生体触媒を探索し、医薬品などの機能性物質創製のために有用な光学活性非天然型アミノ酸の化合物ライブラリーを構築する方法を確立した。

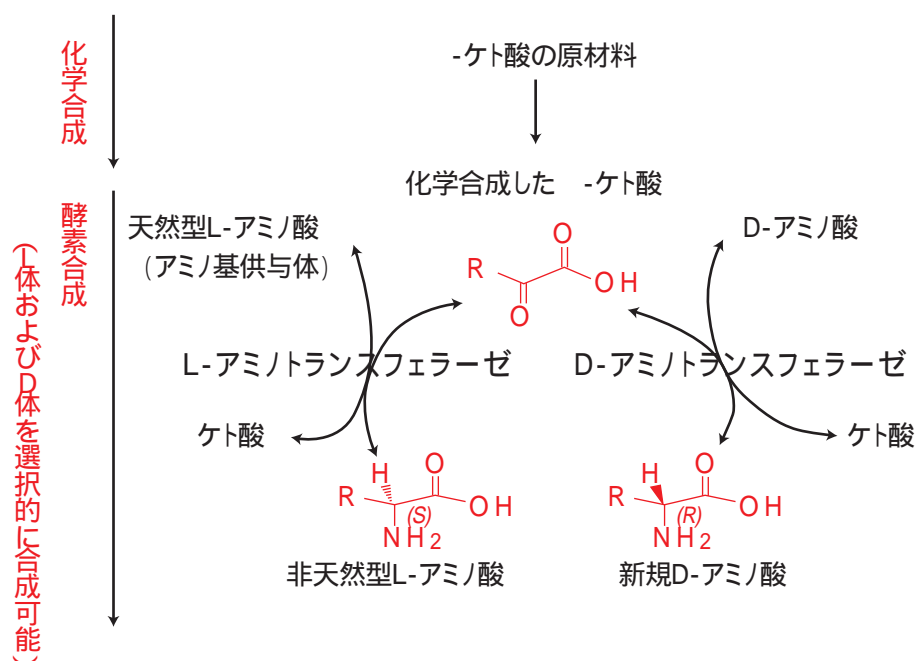


Fig.1 化学酵素合成法を用いた非天然型アミノ酸の合成スキーム

研究結果

1. α -アミノ酸アミノトランスフェラーゼ遺伝子ライブラリーの構築

ゲノム解析の行われた15種類の微生物より、遺伝子情報に基づいて、104種類の α -アミノ酸アミノトランスフェラーゼ遺伝子が大腸菌にクローニングした。工業的な利用も視野に入れ、好熱性菌を中心に遺伝子のクローニングを行った。また、アミノトランスフェラーゼは、その一次構造に基づいて ~ までの5つのクラスに分類されるが、本研究では各クラスの遺伝子を洩れなくクローニングした。

2. α -アミノ酸アミノトランスフェラーゼ遺伝子の大腸菌での発現(酵素ライブラリーの構築)

pETシステムを用いて、各アミノトランスフェラーゼ遺伝子が大腸菌Rosetta株で発現させた。好熱性菌の遺伝子は大腸菌では封入体を形成するケースが多いことが知られており、それを改善するために、本研究では遺伝子発現時に大腸菌の培養温度を工夫することで、好熱性菌由来の遺伝子を効率的に発現させる手法を開発した(特願2005-58193、農芸化学会2004年度大会要旨集)。大腸菌Rosetta株の生育限界温度付近となる46℃で遺伝子を発現させた場合に、89種類の好熱性菌由来遺伝子のうち18種類が可溶性タンパク質として発現しやすくなった (Fig.2)。

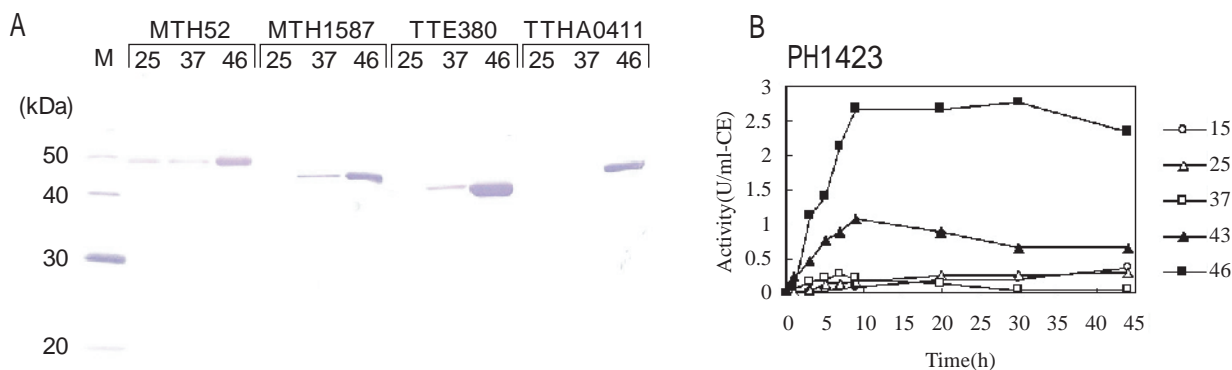


Fig.2 培養温度に依存した好熱性菌由来遺伝子の発現のSDS-PAGE解析(A)と活性測定 (B)

3. 酵素のキャラクタリゼーション(酵素カタログ作成)

大腸菌で可溶性タンパク質として発現したアミノトランスフェラーゼの活性を測定した。2-オキソグルタル酸をアミノ基アクセプター、さまざまな天然型アミノ酸をアミノ基ドナーとして、グルタミン酸を生成する反応活性を測定することで評価を行った。この評価系において十分な活性(10U/mg)を有する酵素 39 種類について、それぞれ基質特異性、反応温度およびpHの至適値を求めて、カタログ化した。

基質特異性の解析の過程で、いくつかの酵素が疎水性アミノ酸全般に対して非常に高い活性を有していた(Fig.3)。これらはクラス に属する酵素であったが、系統樹上では、本クラスの代表的な酵素であるアスパラギン酸アミノトランスフェラーゼや芳香族アミノ酸アミノトランスフェラーゼとは別のクラスターを形成した。また、クラス やクラス に属する酵素からも、従来とは基質特異性の大きく異なる酵素を発見した(生物工学会2005年度大会要旨集)。例えば*Sulfolobus*由来のST1217はクラス に属する酵素であるが、多種類の疎水性アミノ酸と親水性アミノ酸を認識する全く新しいタイプの酵素であった。

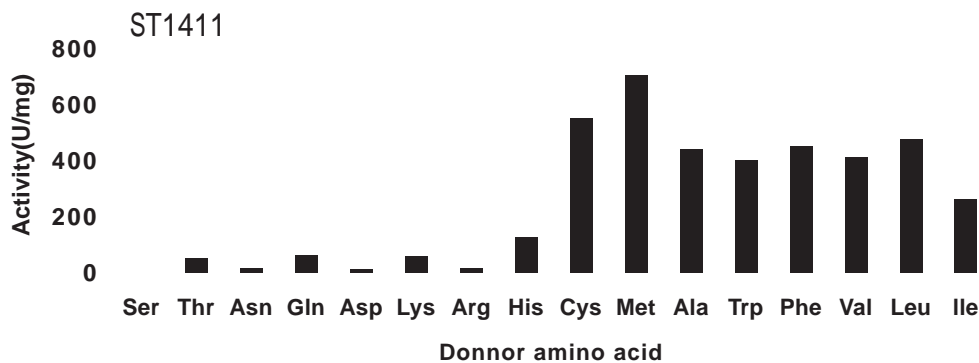


Fig.3 疎水性アミノ酸全般に対して高活性を有する広基質特異性アミノトランスフェラーゼ

4. α -アミノ酸アミノトランスフェラーゼのスクリーニングシステムの構築

本研究で構築した酵素ライブラリーから、任意の非天然型アミノ酸を合成可能な酵素をハイスループットにスクリーニングできるシステムの構築を検討し、Fig.4に示す呈色反応系を考案した。このスクリーニングシステムの特徴は、 α -アミノ酸アミノトランスフェラーゼが非天然型アミノ酸に対して活性を有する場合には、NAD(P)Hが生成し、最終的にテトラゾリウムを還元して呈色性のあるホルマザンを生じることである。本反応系に適した酵素をゲノム解析終了株から探索し、10種類の α -アミノ酸アミノトランスフェラーゼ遺伝子と14種類のアルデヒドデヒドロゲナーゼ遺伝子が大腸菌にクローニングし、発現させた。これらの中から目的の活性を有するもの選別し、酵素の基質特異性、至適温度、至適pH、および反応阻害の程度を解析し、さらにカイネティクスパラメーターの測定を実施して最適な酵素を組み合わせた。その結果、呈色反応により活性測定も可能なハイスループットスクリーニングシステムの構築に成功した(特願2005-58194、農芸化学会2004年度大会要旨集、生物工学会2005年度大会要旨集)。

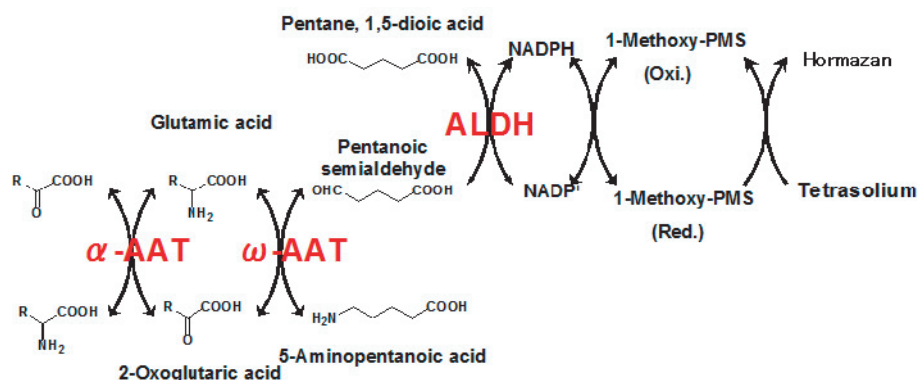


Fig.4 スクリーニングシステムの反応スキーム

5. 非天然型アミノ酸ライブラリーの構築

構築した酵素ライブラリーとスクリーニングシステムを用いて、フェニルグリシン誘導体に属する非天然型アミノ酸合成に有用な酵素の探索を行い、非天然型アミノ酸ライブラリーの構築と中規模スケールでの合成を実施した。34種類の非天然型ケト酸から29種類の非天然型アミノ酸が合成可能であった。7種類の非天然型アミノ酸については数百mg単位で合成し、精製して純度検定等を行った。

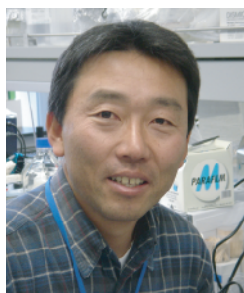
今回確立した画期的な技術を用いて、任意の非天然型アミノ酸を合成できる酵素の迅速な探索が可能となった。また、多彩な化合物ライブラリーの構築も可能となり、これらを原料とする医薬品候補化合物の創製など、ダウンストリーム研究の進展に大きく貢献するものと考えている。



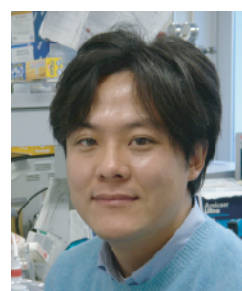
木野 邦器

工学博士、早稲田大学理工学部教授

R I T E バイオプロセスによる高効率化学品製造に資する基盤技術要素開発の研究



吉岡秀樹 (1)



白桑好 (2)

富木亜紀 (3)

(1) RITEチーム (2), (3) NITE

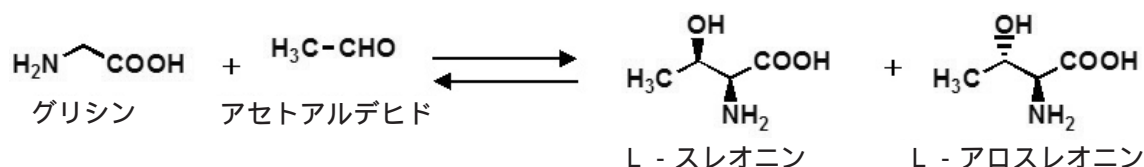
「酵素による光学活性 α-ヒドロキシアミノ酸の一段階合成」

α-ヒドロキシアミノ酸は、医薬品や医薬品の合成中間体としての用途が期待される有用な化合物である。この化合物には不斉炭素が二つ以上存在することから化学合成法で製造した場合、通常四種類以上の光学異性体が生成し、光学活性体を得る為に高価な分割剤や保護・脱保護を必要とする。すなわち、化学合成法で α-ヒドロキシアミノ酸を製造する場合、工程が複雑となり、製品は非常に高価なものとなる。一方、スレオニンアルドラーゼを用いた酵素法は、C2位の立体は厳格に制御でき、C1位の立体は曖昧なことから二種類のジアステレオマーが生成してくるものの、保護基を導入することなくアルデヒドとグリシンから一段階で目的の化合物を合成することができることから、安価な合成法と言える。

我々は、L-スレオ型の α-ヒドロキシアミノ酸をターゲットに、立体選択性の高い L-スレオニンアルドラーゼのスクリーニングを行い、得られた酵素遺伝子を高発現させた組換え微生物を創製し、工業的なプロセスの検討を行なった。

1. 高立体選択性L-スレオニンアルドラーゼのスクリーニング

L-スレオニンアルドラーゼは下記に示した様に、L-スレオニンをグリシンとアセトアルデヒドに分解する酵素で、又、同時にその逆反応も触媒する酵素である。この逆反応を旨く利用すれば、種々のアルデヒドとグリシンから、対応する α-ヒドロキシアミノ酸が一段階で合成することが可能となる。



我々は、本スレオニンアルドラーゼでL-スレオ型を選択的に合成する酵素をNITE保存微生物からスクリーニングする計画を立てた。しかし、NITE保存微生物から全ての菌株をスクリーニングにかけるのは多大な時間と労力を必要とする。そこで、効率的スクリーニングを実施する為、まずは土壌等から

L-スレオニンやその他のL-α-ヒドロキシアミノ酸を単一炭素源とした集積培養を試みた。集積培養により得られた菌株を同定し、それらと同属の菌株をNITE保存菌から検索した結果、*Ensifer arboris* NBRC 100383 株が最もスレオ型を優先的に合成する能力のある L-スレオ型特異的アルドラーゼをもつことがわかった。

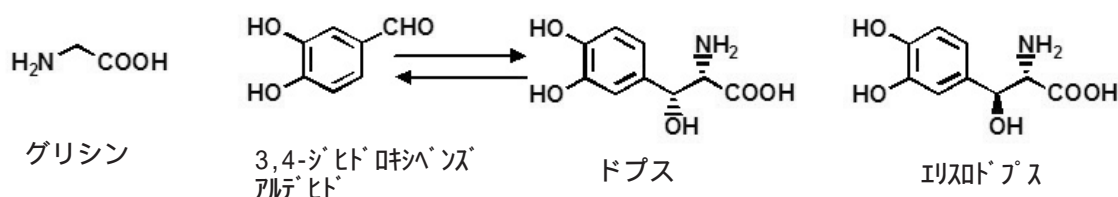
また一方で、NITEが構築した遺伝子データベース(DOGAN)に登録された *Streptomyces avermitilis* NBRC 14893 等の遺伝子情報に基づいてプライマーを設計し、放線菌 *Streptomyces coelicolor* NBRC 12854 株由来のL-スレオニンアルドラーゼ遺伝子を得た。本放線菌酵素の L-スレオ立体選択性は約 20 % d. e. であり、*Ensifer* 由来酵素の約 70 % d. e. よりも劣っていた。

2. 組換え菌の創製

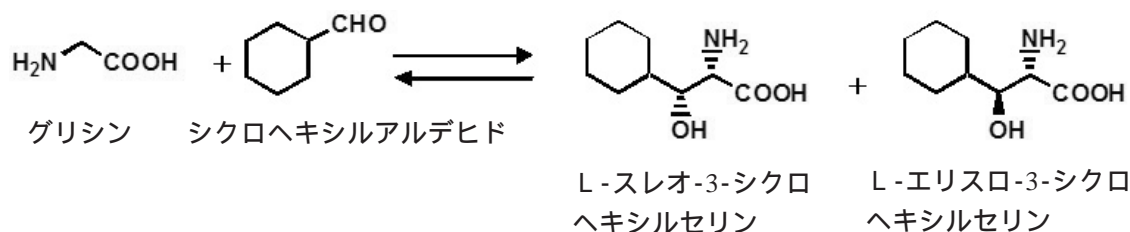
得られた酵素遺伝子が大腸菌あるいは RITE 微生物研究グループが所有するコリネ型細菌 *Corynebacterium glutamicum* R 株に導入した組み換え菌の創製を試みた。*E. arboris* NBRC 100383 株由来の L-スレオニンアルドラーゼ遺伝子は、近縁の *Mesorhizobium loti* や *Sinorhizobium meliloti* のスレオニンアルドラーゼの遺伝子配列を参考に設計したプライマーから、PCRにより増幅することができた。この遺伝子が大腸菌高発現用ベクターpTrc99A に連結し、大腸菌に導入することにより高発現組換え大腸菌を創製した。同様に、コリネ型細菌 *C. glutamicum* R 株には、大腸菌とコリネ菌を宿主とするシャトルベクターpCRB1 に上述の遺伝子を連結後導入し組換えコリネ菌を創製した。

3. 変換条件の最適化

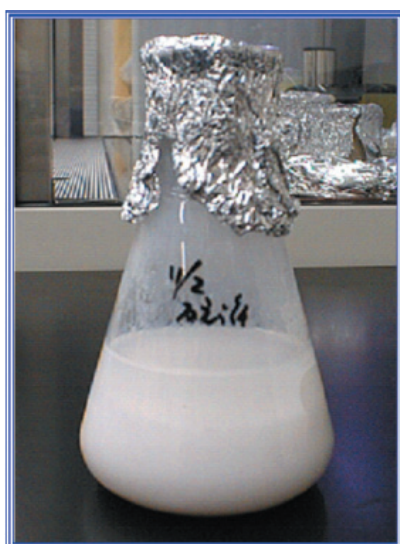
L-スレオニンアルドラーゼ高発現組換え菌の休止菌体を用いて、グリシンと3,4-ジヒドロキシベンズアルデヒドを基質として医薬品であるドプス(L-threo-3,4-ジヒドロキシフェニルセリン)の合成反応条件の検討を行った。



反応には基質の透過性を促進する界面活性剤のTriton X-100が必要であった。又、反応温度は10-15℃と低温が合成反応には良好であった。触媒として用いる菌体量は、それぞれ、*Ensifer* 酵素組換え菌の場合は反応液と等量～2倍量、*Streptomyces* 酵素組換え菌の場合は10倍量の培養液量から得られた菌体が必要であった。又、反応の最適pHは6.5付近であった。至適反応条件化でのドプスの一段階合成反応では、グリシン150 g/L、3,4-ジヒドロキシベンズアルデヒド20 g/Lからドプスが約8 g/Lの濃度で得られた。反応時間を延長してもこれ以上の濃度には上がりず平衡となった。



一方、アルデヒドとしてシクロヘキシルアルデヒドを用いた場合、3,4-ジヒドロキシベンズアルデヒドと同様の条件で、20 g /Lの3-シクロヘキシルセリンが得られた。更に、アルデヒドを途中添加すると最高で40 g /Lの濃度にまで高めることができた。この時の反応液には3-シクロヘキシルセリンの結晶が観察され(写真1)、このことが高濃度の蓄積に繋がったものと考えられる。又、本反応におけるL-スレオ選択性は90% d. e.を越える結果となった。



4. 連続反応システムを用いた大量合成

組換えコリネ菌を用いて連続的なドプスの合成反応を行った。システムは1Lのリアクター、フォローファイバー型膜モジュール、冷却ユニット、循環ポンプ、基質添加ポンプ、濾液抜き取りポンプから構成されている。スタート時の反応液量は500 mLとし、連続反応時の新鮮な基質溶液の添加速度は約20~40 mL/Hとして、反応液量を一定となるように添加速度と同じ速度で反応濾液を抜き取った。ドプスの濃度は70時間の反応の間約2.5 g /Lが維持された。

← 写真1. 結晶化した3-シクロヘキシルセリンの合成反応液

5. 精製プロセスの開発

連続反応によって得られたドプスの合成反応液には基質の残存であるグリシン、3,4-ジヒドロキシベンズアルデヒド、合成生成物のドプスが含まれている。三つの成分から生成物ドプスの分離精製を試みた。第一段階として吸着樹脂のSP-207(三菱化学社製)に反応液を通液すると、3,4-ジヒドロキシベンズアルデヒドが特異的に樹脂に吸着された。通過液を第二段階として、活性炭カラムに通液した。グリシンは活性炭カラムを通過し、目的物のドプスは活性炭カラムに吸着された。ドプスは50%メタノールにより活性炭カラムから溶出された。二種類のカラムクロマトにより三成分を効率良く分離することができた。

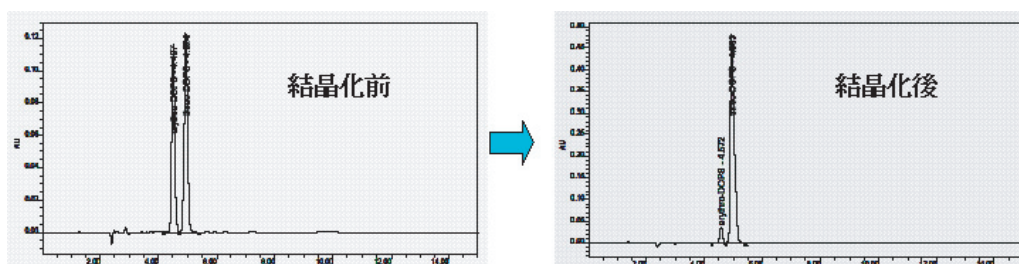
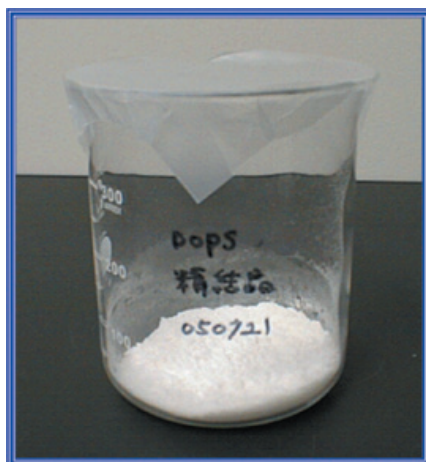


図1. 結晶化による異性体の除去

6. 放線菌酵素の改変

先に述べた様に放線菌 L-スレオニンアルドラーゼは、グリシンと3,4-ジヒドロキシベンズアル



デヒドを基質とした場合、生成してくるドプスの立体配置は L-スレオ体過剰率約 20% d. e. であった。我々は、本放線菌酵素の立体選択性の改変を試みた。放線菌酵素遺伝子にエラープローン PCR の手法を用いて変異を導入した組換え大腸菌ライブラリーを構築した。その中からハイスループットスクリーニングにより、選択性の向上した変異体を選択した。これまでの所、立体選択性は 50% d. e. 以上にまで向上させることができた。又、同様に手法を用いて、酵素の熱安定性を大幅に向上した変異酵素を取得することができた。



写真2. バイオプロセスにより合成された医薬品ドプス

7. おわりに

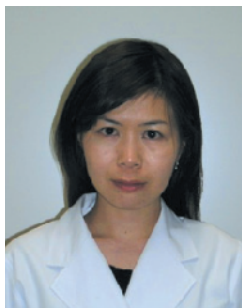
我々が見出した立体選択性の高い *Ensifer arboris* NBRC 100383 株由来の L-スレオニンアルドラーゼを用いて、現在、種々のアルデヒドとの基質特異性を調査中である。ドプスの合成反応では、生成物濃度は最高で約 8 g / L で、基質からの変換率も非常に低く、実用化には更なる検討が必要である。一方、シクロヘキシルアルデヒドとグリシンとの反応に見られた様に、生成物が反応液中に結晶として沈殿して高濃度に蓄積する反応生成物が幾つか見出されている。我々は、これらのアルデヒドの場合、沈殿化した反応生成物の精製は簡単な工程で実施できると考えられることから、実用化は比較的容易ではないかと考えている。



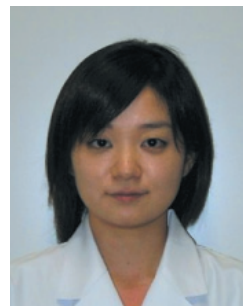
湯川 秀明

農学博士、(財)地球環境産業技術研究機構
微生物研究グループ グループリーダー
主席研究員

遺伝子パターンニング化技術を応用した微生物の遺伝子レベルでの品質管理及び安定供給に資する迅速スクリーニング用基盤データベースの作成と基幹検索ソフトウェアの開発研究



円岡瞳 (1)



赤坂真理子 (2)

岡本真由美 (3)

柴田浩臣 (4)

藤城圭輔 (5)

(1),(3),(4) ヤマト科学チーム (2),(5) NITE

< 背景 >

産業界においては、その活動の様々な現場で、微生物の判別・同定検査が行われている。例えばそれは製薬会社や食品会社における品質管理のためであったり、河川・湖沼の環境汚染調査のためであったりと目的は様々であり、それらの目的に対して数多くの微生物判別・同定法が考案され、利用されている。しかし、それらの既存の手法で判別・同定できる微生物は限定されている場合が多く、また、その精度も必ずしも高くない。一方、微生物研究で多く用いられている16S rRNA遺伝子配列による系統分類手法は、多様なニーズに応えることができるものの、迅速性、簡便性やコストなどの面から、産業活動における様々な微生物検査に利用することは困難である。これらの理由から、従来法に代わる微生物の判別・同定法の開発が望まれていた。

< 共同研究の目的 >

機器メーカーであるヤマト科学株式会社は、日本のベンチャー企業である株式会社アドジーン(現G&Gサイエンス株式会社)において開発された遺伝子パターンニング化技術(ジェノパターン法)という遺伝子解析手法を用いて微生物を判別・同定する解析装置を開発したが、実用化にあたっては、多種多様な微生物に適用できるかの検証、ジェノパターン法の解析原理の分子メカニズムの実証、さらには解析精度を明らかにするための検証が必要であった。

そこで我々は、上記の問題を解決するため、NITEが保有する多種多様な微生物を用いて、ジェノパターン法を利用した微生物の判別・同定手法を確立させるとともに、実用化のためのデータベースを構築することを目的とした共同研究事業を、平成16年10月より開始した。

< 成果 >

我々は、以下に述べるように、本事業の中でジェノパターン法の原理や判別能力、解析精度を検証した。

<ジェノパターン法の原理>

当初より、ジェノパターン法の原理については仮説が提唱されていたが、その実験的根拠は十分ではなかった。そこで我々は、微生物のジェノパターン産物を用いて様々な検証を行い、その原理の一端を明らかにした。

ジェノパターン法は、DNA増幅反応と蛍光強度測定との2つのステップで構成される方法である。

まず、微生物から抽出したDNAを特定のプライマーを用いて *in vitro* で増幅させる。プライマーは、検体となるDNA上の複数の配列とアニーリングし、複数領域のDNAが増幅される。その結果得られた増幅産物は、DNA上の様々な領域の配列を含む様々な長さのDNA断片の混合物で構成され、その構成は検体となるDNAの配列ごとに異なる。

次に、DNA断片の二本鎖部分に取り込まれて蛍光を発する物質(インターカレータ)を用いて蛍光強度測定を行う。

DNAは温度を上昇させると二本鎖が解離して一本鎖になる性質があること

ことから、増幅産物の温度を上昇させていくと、産物中のDNA断片が徐々に解離し、蛍光が消光するにつれ蛍光強度が減少していく。

この蛍光強度の減少曲線を微分すると、急激な蛍光の減少が起こる温度がピークとして示される波形が得られる。この波形は、増幅産物を構成するDNA断片の違いによって様々なパターンを形成することから、このパターンによって、検体となるDNAの違いを確認することができる。

以上の増幅反応から蛍光強度測定までの一連の作業を自動化し、さらに波形パターンの違いを解析できるソフトウェアをパッケージ化したシステムが、ヤマト科学株式会社製のジェノパターン法波形解析装置GP1000であり、本共同研究における検証については、本装置を用いて行った。

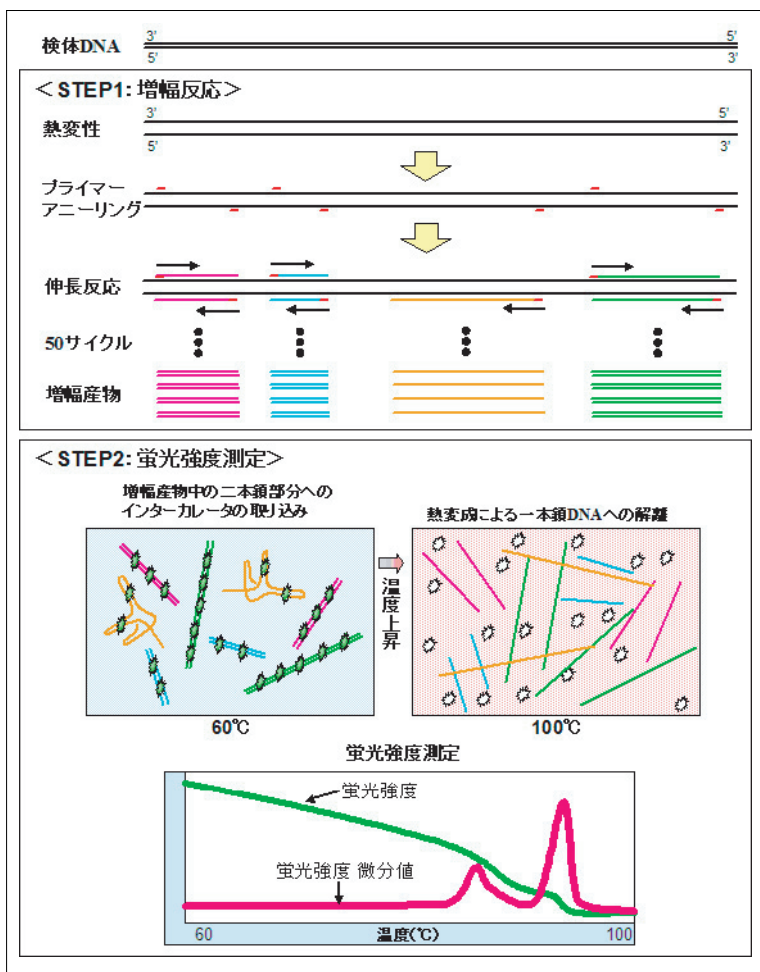


図1. ジェノパターン法の原理



<細菌群についての判別能力>

NITE保有微生物の中から、系統的に多様な分類群を持つ *Flexibacter* 属、市場ニーズの高い *Bacillus* 属及び *Staphylococcus* 属の菌株約150株を選定し、ジェノパターン法を用いて波形を取得し、属、種、株レベルでの判別能力を確認した。

図2は *Flexibacter* 属の波形の一部である。16SrRNA遺伝子配列による系統樹と比較すると、種や種内の系統関係の遠近に関わらず株ごとに異なる波形が得られていることが判った。

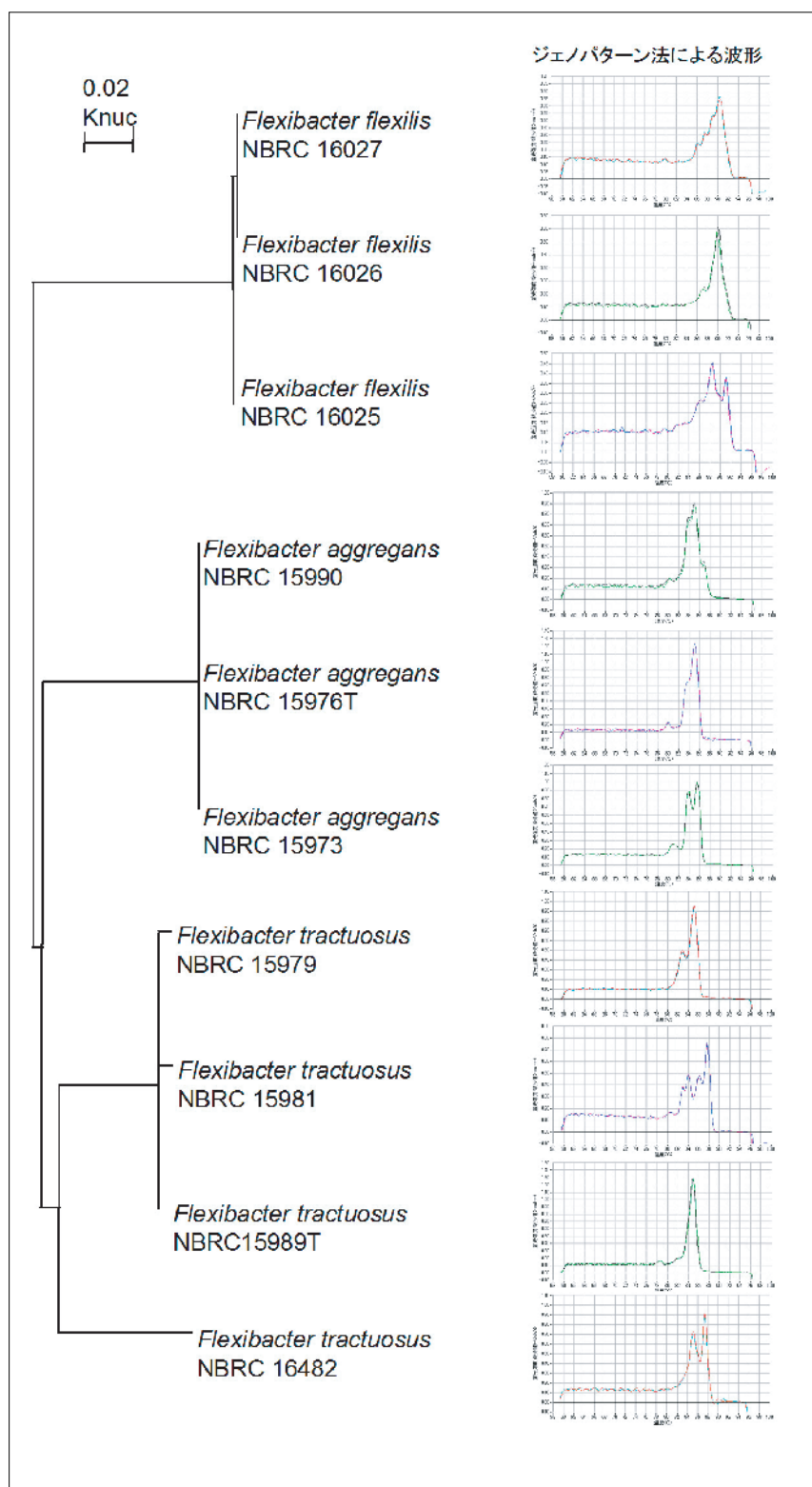
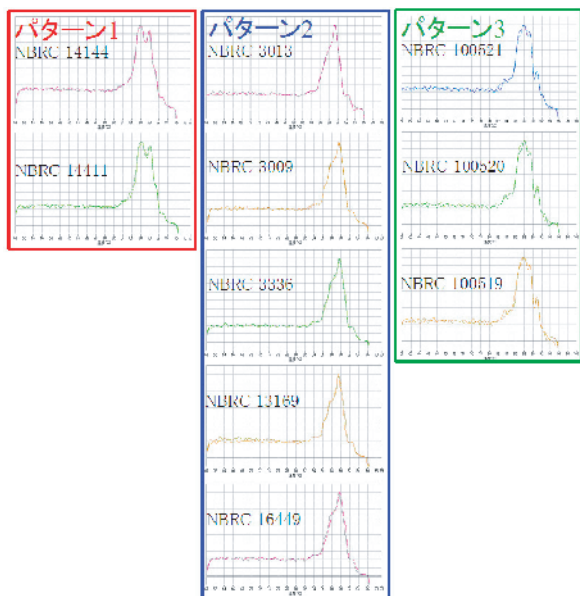


図2. *Flexibacter* 属細菌の16S rRNA遺伝子配列に基づく系統樹及びジェノパターン法による波形

また、図3は *Bacillus subtilis* subsp.*subtilis* 亜種に属する系統的に近縁な株(16SrRNA遺伝子配列99%以上) 相同の波形及び波形解析ソフトウェアによる解析結果の一部である。波形パターンは目視によってほぼ3つのグループに分けられ、波形解析ソフトウェアによる解析でもほぼ同様の3つのグループに分けられた。このことから、亜種内の近縁な株については、異なる株で同一の波形が得られる場合もあることが判った。



		マスターデータ									
		14144	14411	3013	3009	3336	13169	16449	100521	100520	100519
検体	14144-1	95.4	94.5	62.0	55.7	62.6	56.6	64.4	56.5	57.0	56.3
	14144-2	97.7	90.4	67.6	57.7	61.6	62.1	61.1	66.7	60.4	64.0
	14411-1	89.6	97.3	60.6	56.5	59.3	60.7	63.3	56.5	59.5	59.2
	14411-2	86.1	97.3	57.8	59.6	61.6	61.9	70.0	44.9	48.1	50.7
	3013-1	50.9	56.9	97.2	84.3	81.2	89.5	75.3	53.6	49.4	53.5
	3013-2	49.7	55.6	97.2	87.4	82.4	84.2	77.5	53.6	49.4	54.9
	3009-1	57.5	63.0	90.1	96.9	93.8	93.1	92.2	46.4	43.0	47.9
	3009-2	57.5	61.6	91.6	99.0	95.5	93.1	93.3	46.4	43.0	47.9
	3336-1	56.1	60.3	94.4	95.9	95.5	95.4	93.3	44.9	41.8	46.5
	3336-2	53.8	60.3	93.1	95.9	98.6	94.2	91.1	43.5	41.8	45.1
	13169-1	52.9	61.6	93.0	87.6	90.7	95.4	95.6	44.9	46.8	47.9
	13169-2	56.3	60.3	90.1	97.6	93.0	97.7	96.7	43.5	41.8	45.1
	16449-1	56.3	64.4	89.0	86.6	91.9	90.8	94.4	42.0	40.5	46.5
	16449-2	60.9	68.5	88.7	91.8	93.0	90.6	95.6	46.4	43.0	47.9
	100521-1	61.4	59.7	63.4	36.1	38.8	39.2	36.0	97.1	100.0	95.0
	100521-2	61.4	54.2	62.0	39.3	40.0	40.4	37.1	97.1	91.1	95.0
100520-1	62.6	54.2	59.2	36.1	37.7	42.7	34.8	91.3	97.5	87.3	
100520-2	59.1	59.7	50.7	36.1	40.0	39.2	37.1	84.1	93.7	83.1	
100519-1	54.4	56.9	60.6	40.3	42.4	45.0	39.2	94.2	88.8	95.8	
100519-2	57.9	56.9	54.9	36.2	38.8	41.5	34.9	90.4	90.6	91.6	

図3. *Bacillus subtilis* subsp.*subtilis* 亜種の波形及びソフトウェア解析結果

< 波形再現性 >

ジェノパターン法は、波形によって判別を行う手法であることから、同一菌株については、常に同一の波形が得られる必要がある(再現性の確保)。しかし、15の異なる属の菌株を用いて検証を行ったところ、再現性が得られない場合があることが判明した。そこで我々は、再現性に影響を及ぼす因子を明らかにするとともに、再現性確保のための対策の検討を行った。

再現性に影響を及ぼすことが明らかになった主な因子は、使用する機器の誤差や、培養条件、DNA抽出法、プライマー配列、検体DNAのGC含量、および人為的誤差であった。そして、これらが個別であるいは複合して波形の再現性を損なうことが判明した。そこで我々は、それぞれの因子がどのように再現性に影響を与えるのかについての傾向を明らかにし、再現性を確保するための対策を検討した。

まず、機器の誤差については定期的なキャリブレーションやメンテナンス体制の構築により問題を解消できることを明らかにするとともに、培養条件の違いや人為的誤差の影響を最小限に抑えるDNA抽出法を確立した。また、検体DNAのGC含量あるいは他の様々な因子による影響についても、反応液の組成や反応条件により改善できることを明らかにした。現在、最適な条件設定について検討を進めており、プライマー配列についても、その規則性およびプライマーを選定するための指標の設定について検討を行っているところである。

<まとめ>

ジェノパターン法は、亜種よりも詳細なレベルで菌群を判別できる技術であり、16SrRNA遺伝子配列による判別よりも判別能力が高いことから、ある株が特定の株と同一あるいは分類学的に非常に近縁であるかを見極めるのに適している。

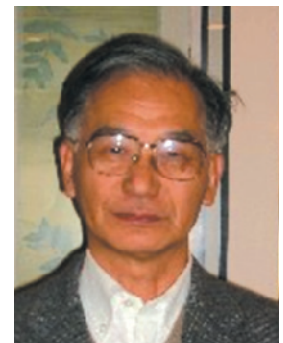
ジェノパターン法と同程度の判別能力を持つであろうものとして、Random amplified polymorphic DNA (RAPD) 法が挙げられる。ゲノム情報が存在しない菌群についても、特定のプライマー群からプライマーを選択するのみで解析を行うことが可能である点で両者は共通しているが、簡便性についてはジェノパターン法の方がはるかに優れている。更に、RAPD法の場合、そのゲル電気泳動の結果を数値化し過去のデータと比較することは困難であるが、波形パターンは数値データであることから蓄積が容易であり、過去のデータとの比較が容易に行えること等のメリットがある。

ジェノパターン法は、熟練や知見がなくとも、誰もが簡単な操作で解析を行うことができることや、解析時間が3時間弱と、高い判別能力に対して比較的短時間で結果が得られる方法であることから、企業の生産ラインにおけるルーチン的な品質管理や、微生物が混入した場合の汚染経路の特定、あるいは研究所などにおける微生物のコンタミネーションチェック等の品質管理等に利用できると考えている。

また、ジェノパターン法は、微生物のみならず、遺伝子を有するあらゆる生物に活用できる可能性があることから、利用対象がさらに拡大することも想定される。

本共同研究事業においては、既にジェノパターン法の有用性・優位性を示すことに成功しているが、微生物の同定手法としてより確実な技術に仕上げるため、本年9月のプロジェクト終了までにさらなる検討を進める予定である。

ジェノパターン法の分子的メカニズムについては、更なる解析を実施中である。これについてはG&Gサイエンス株式会社 池田日出男先生他の研究者の方々よりアドバイスをいただいている。



池田 日出男
薬学博士、基盤技術研究所 所長
G & Gサイエンス株式会社

3.その他

(1)特許出願件数(平成17年12月末出願済みのもの。)

微生物酵素触媒を用いた不斉分子製造技術開発の研究;

3件

生物学的手法を利用する光学活性非天然型アミノ酸及びヒドロキシカルボ酸の合成ライブラリー構築法の研究;

2件

RITEバイオプロセスによる高効率化学品製造に資する基盤技術要素開発の研究;

5件

遺伝子パターンニング化技術を応用した微生物の遺伝子レベルでの品質管理及び安定供給に資する迅速スクリーニング用基盤データベースの作成と機関検索ソフトウェアの開発研究;

無し

(2)学会発表(平成17年12月末発表済みのもの。)

(発表の標題、発表の場、発表月)

微生物酵素触媒を用いた不斉分子製造技術開発の研究;

・S-ヒドロキシニトリルリアーゼの耐熱化に関する研究

日本農芸化学会、2005年3月

生物学的手法を利用する光学活性非天然型アミノ酸及びヒドロキシカルボン酸の合成ライブラリー構築法の研究;

・超好熱菌由来酵素遺伝子の*E. coli*における発現

日本農芸化学会、2004年3月

・D-アミノ酸に対しアミノ基転移活性を有する酵素のスクリーニング法の開発

日本農芸化学会、2004年3月

・L-アミノ酸アミノトランスフェラーゼのライブラリー構築と解析

日本生物工学会、2005年11月

・D-アミノ酸アミノトランスフェラーゼを用いた非天然型アミノ酸合成

日本生物工学会、2005年11月

R I T E バイオプロセスによる高効率化学品製造に資する基盤技術要素開発の研究；

・放線菌由来L-スレオニンアルドラーゼの立体選択性の改変

日本生物工学会平成17年度大会、平成2005年11月16日

遺伝子パターンニング化技術を応用した微生物の遺伝子レベルでの品質管理及び安定供給に資する迅速スクリーニング用基盤データベースの作成と機能検索ソフトウェアの開発研究；

・無し

NITE保有生物遺伝資源の産業利用の可能性に関する 共同事業先の公募について

平成17年4月1日

独立行政法人製品評価技術基盤機構

1 趣旨

独立行政法人製品評価技術基盤機構(NITE)では、バイオテクノロジー及びその産業化の技術基盤となる生物遺伝資源とその情報を整備することを目的として、産業上有用な微生物を中心とした生物遺伝資源の収集・保存・提供、微生物のゲノム解析、関連情報の蓄積、提供等を行っています。

新製品開発のためのスクリーニング源として未知の微生物を活用したいとの産業界のニーズに応じるため、昨年度に引き続いてNITEが保有している微生物をスクリーニング材料として提供することにより、その産業利用の可能性を解析するための共同事業を実施することといたしました。

つきましては、本事業に参加を希望する企業は、次の要領に従いご応募ください。

2 共同事業の概要

()詳細についてはNITEホームページをご覧ください。

http://www.bio.nite.go.jp/nbdc/collabo_en_masse_distribution050401.html

(1) 目的

NITEが保有する生物遺伝資源について機能解析のためのスクリーニングを行うことにより、微生物の産業利用の可能性に関するデータを取得し、微生物の付加情報として公開する。

(2) 共同事業期間

共同事業期間は、共同事業契約書締結日から2年以内とし、延長可能とします。

(3) 対象とする生物遺伝資源

(ア) インドネシアで収集した菌類及び放線菌 約1,800株

(イ) ベトナムで収集した菌類 約500株

(ウ) ミャンマーで収集した菌類及び放線菌 約1,600株

(エ) 国内由来の菌類 約5,000株

(オ) 国内で収集された分類学的に新規な細菌等 約1,000株

上記(ア)から(オ)の生物遺伝資源は、将来NITEが同定を行いコレクションとして一般に公開、分譲する場合があります。

(4) 生物遺伝資源の取扱い条件

共同事業者は、提供を受けた生物遺伝資源について共同事業期間中利用できる権利を得ます。ただし、(ア)から(ウ)の生物遺伝資源の移転に当たっては、別途植物防疫所の許可が必要になります。

提供した生物遺伝資源は、共同事業期間が終了した段階で、その派生物等を含めて処分していただきます。継続して使用する希望がある場合は、改めて共同事業契約の継続若しくは分譲可能なものについては必要な株の分譲依頼手続をしていただきます。

その他詳細は共同事業契約書で協議して定めます。

(5)共同事業実施場所

原則共同事業者の研究施設で実施していただきます。

(6)共同事業の実施体制

共同事業の実施に当たっては、NITEと共同事業契約書を締結していただきます。共同事業契約内容等の詳細については、当該契約書において取り決めます。

共同研究の実施に当たりNITEは、上記(3)の保有生物遺伝資源の提供を行います。

(7)共同事業費用の分担()

(8)成果の公開等()

(9)知的財産関係()

(10)その他()

3 共同事業先の公募

(1) **ア イ ウ**:平成17年4月1日(金)から平成17年5月31日(火)まで

これらの菌株は手続き等に時間を要することから年2回の提供が限度となります。第2回目の公募日は平成17年夏頃を予定しておりますが、詳細は追ってホームページ等で連絡致します。

(**エ オ**):平成17年4月1日(金)から平成18年3月31日(金)まで

毎奇数月の最終日(最終日が土、日、祝日等の場合にはその直前の平日)を締切日として、その期間に応募のあった分について審査を実施する予定です。

(2)応募資格

応募資格として次の要件を満たすことが必要です。

()応募者は、日本国内に研究施設を有し、共同事業を希望する企業であること。

()当該技術又は関連技術についての研究開発の実績を有し、かつ、上記2 (1)の目的の達成及び計画の遂行に必要な研究開発の人員並びに設備を有していること。

()当該事業を円滑に遂行する際に必要な経営基盤を有していること。

(3)応募方法

応募者は、公募期間内に提案書等を郵送又は持参にて提出してください。

なお、応募要領等の書類が下記よりダウンロードできますのでご参照ください。

応募要領

【PDF】MS-Word】

4 共同事業先の決定等

(1)共同事業先の決定

受理した提案書をもとに審査を行い、共同事業先を決定します。必要に応じて応募者による口答説明をお願いします。

概ねのスケジュールは以下のとおりです。採択の後共同事業契約書の締結手続き等に移ります。提供は、採択後共同事業契約書等が締結された後となります。

締切日	審査	採択	対象
平成17年5月31日(火)	6月	7月上旬	全て
平成17年7月29日(金)	8月	9月上旬	(エ)(オ)
平成17年9月30日(金)	10月	11月上旬	(エ)(オ)
平成17年11月30日(水)	12月	18年1月上旬	(エ)(オ)
平成18年1月31日(火)	18年2月	18年3月上旬	(エ)(オ)
平成18年3月31日(金)	18年4月	18年5月上旬	(エ)(オ)

(2) 選考基準

- ()共同事業に関する提案書の内容が、NITEが保有する生物遺伝資源に関する情報に付加価値を加えるものであり、かつ、得られた付加価値が原則としてNITEで公開できること。
- ()共同事業に関する分野について研究開発実績を有していること。
- ()その他当該事業等を行う体制が整っていること。

5 提案書等の提出先及び問い合わせ先

〒292-0818 千葉県木更津市かずさ鎌足2-5-8

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本部 資源開発課

担当 塩谷 俊 あて

電話:0438-20-5764 FAX:0438-20-5766 E-mail:shioya-shun@nite.go.jp

応募を希望する方は、担当者までまず、ご一報ください。



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本部

〒292-0818 千葉県木更津市かずさ鎌足 2-5-8

Tel. 0438-20-5760 Fax. 0438-20-5766

<http://www.nite.go.jp/>