

中央大学博士論文

新規機能性生体物質の創製研究

井出 輝彦

博士（理学）

平成28年度

2017年1月

目次

序論.....	1
本論.....	7
第1章 大腸菌 H7 抗原認識ペプチドの単離および細菌検出.....	7
第1節 大腸菌フラジェリン・タンパク質の調製.....	7
1.1.1 緒言.....	7
1.1.2 実験材料および方法.....	7
1.1.3 結果.....	8
1.1.4 考察.....	9
第2節 大腸菌フラジェリン認識ペプチドの作製.....	9
1.2.1 緒言.....	9
1.2.2 実験材料および方法.....	10
1.2.3 結果.....	13
1.2.4 考察.....	16
第3節 フラジェリン認識ペプチドによる大腸菌の検出.....	18
1.3.1 緒言.....	18
1.3.2 実験材料および方法.....	18
1.3.3 結果.....	19
1.3.4 考察.....	20
第4節 要約・総括.....	20
第2章 自然界からの酵素遺伝子単離法開発.....	22
第1節 ハロペルオキシダーゼ遺伝子単離法の構築.....	22
2.1.1 緒言.....	22
2.1.2 実験材料および方法.....	23
2.1.3 結果.....	28
2.1.4 考察.....	31
第2節 海洋性細菌のハロペルオキシダーゼ遺伝子の単離.....	31

2.2.1 緒言.....	31
2.2.2 実験材料および方法.....	32
2.2.3 結果.....	34
2.2.4 考察.....	38
第3節 要約・総括.....	39
第3章 <i>Paracoccus</i> 属細菌のカロテノイド生産性の改良.....	40
第1節 <i>Paracoccus</i> 属細菌のカロテノイド生産性評価.....	40
3.1.1 緒言.....	40
3.1.2 実験材料および方法.....	41
3.1.3 結果.....	44
3.1.4 考察.....	45
第2節 変異育種法による <i>Paracoccus</i> 属細菌のカロテノイド生産性の改良....	46
3.2.1 緒言.....	46
3.2.2 実験材料および方法.....	47
3.2.3 結果.....	48
3.2.4 考察.....	51
第3節 遺伝子組換え法による <i>Paracoccus</i> 属細菌のカロテノイド生産性の改良..	52
3.3.1 緒言.....	52
3.3.2 実験材料および方法.....	53
3.3.3 結果.....	59
3.3.4 考察.....	70
第4節 要約・総括.....	71
結論.....	73
参考文献.....	75
本論文に関する報告.....	78
謝辞.....	80

序論

バイオテクノロジーとは、生物が有する様々な機能を利用し、人類の様々な意図実現に役立たせようという技術・学問である。バイオテクノロジーの利用範囲は、発酵食品や抗生物質などの医薬品に留まらず、遺伝子組換え技術導入などにより急速に裾野を広げている。このようにバイオテクノロジーの応用範囲は広範であるが、それを支える要素機能は限られている。主要な要素機能としては、(1) 酵素、種々のレセプター、抗体などのタンパク質、あるいは DNA や RNA などの核酸に特徴的に見られる「特定分子の識別能」と、(2) 酵素や一部の核酸に認められる「触媒能」の二つが挙げられるであろう。

近年、機能性生体物質としての核酸が注目されているが、核酸による特定分子の識別能の研究はまだ緒についたばかりであり、安定性、反応速度、特異性などに係わる特性については多くの課題を残している。短期間で商品開発を行う必要のある企業が、識別能や触媒能を持つ機能性生体物質の開発を目指す場合、現状においては、タンパク質あるいはオリゴペプチドを主に選択することになるであろう。

過去のバイオテクノロジーにおいては、自然界に存在する機能性生体物質をそのまま利用する事が多かった。しかし、天然の生体物質の機能性は、産業利用には必ずしも十分ではなく、また、性状が不安定であることがしばしばであった。そこで、近年のバイオテクノロジーにおいては、天然の生体物質を巧みに利用することに加え、既存の機能性生体物質を改良し、あるいは全く新たに設計することによって、より産業利用に適した機能を有する物質を作り出す努力が続けられている。

タンパク質などの機能性生体物質は、既存の無機、有機素材を構成する化学品よりもはるかに複雑な構造を有する場合が多い。この構造の複雑さゆえ、多様かつ高機能な物質創製が可能であると考えられる。一方、目的とする機能を持つ生体物質の構造を過去の情報から合理的に設計することは、ほぼ、不可能に近い。そこで、バイオテクノロジーにおいては、既存の機能性生体物質に変異を導入することによって、多様な類似物質群のライブラリーを構築し、そのライブラリーの中から目的とする生体物質を選抜することが重要な課題となる。

本研究は、産業利用できる新規な機能性生体物質を、三つの異なるレベルで創製することを目的として実施した。三つの中で一番単純な機能性生体物質は、オリゴペプチドであり、特定のタンパク質を認識できるオリゴペプチドを探索した。第二の機能性生体物質と

して、酵素を選択し、自然界からの新規酵素遺伝子を直接単離する技術の開発を試みた。第三のレベルとしては、アスタキサンチンを数 10 倍に生合成できる“細胞工場”の性能アップを目指した。

これらの三つの研究は、共通した二段の戦略を用いて行った。初段の戦略とは、多様な誘導体（突然変異体）ライブラリーの作製・使用である。特定のタンパク質を認識できるオリゴペプチドを探索するために、人工的に作られた 10^8 種類以上の配列を含む多様性の高いペプチド・ライブラリーを用い、その中から目的とする機能を有するペプチドを探索した。新規酵素遺伝子の単離のためには、自然界に存在する多様な遺伝子を 1 つのライブラリーに見立て、そこから、カセット PCR 法¹⁾により目的酵素遺伝子の単離を行った。また、アスタキサンチン高生産株の分離のためには、伝統的な化学的突然変異誘発によって作製した突然変異体ライブラリーから、目的とする突然変異体をスクリーニングした。

戦略の第二段とは、目的とする機能性ペプチド・タンパク質・細胞を分離するための選抜法の最適化である。本研究では、ファージ・ディスプレイ法によるパニング、カセット PCR 法、あるいは、細菌コロニーの呈色反応による検出の最適化を実施した。

（第 1 章）

第 1 章では、細菌検出への利用を目的に、分子量 1,000 程度のオリゴペプチドによる抗原認識分子の創製に取り組んだ。細菌検出には様々な原理に基づく方法が開発され、それぞれの特徴に則した方法で利用されている^{2, 3)}。なかでも抗体による細菌検出は、抗体の抗原に対する特異性と簡便な操作性から、広範囲な分野で使われている⁴⁾。特に注目したい点は、細菌表層を認識する抗体によって、特異性の高い検出が達成されている点である⁵⁾。

抗体の作製では、特定の抗原による動物の免疫、その動物の飼育、動物からの血清の回収、血清からの抗体精製および類似凝集物質の吸収といった工程を必要とする。また、一度作製した抗血清を使い切ってしまうと、再度、同じプロセスを経て抗血清を作り直す必要だけでなく、しかもその作り直した抗血清が前回の抗血清と全く同じ物である保証はなく、均一な品質の抗体を繰り返し得るのが困難な事が多い。

この欠点を補うため、抗体をハイブリドーマ技術で作製する技術が開発された。すなわち、精製した抗原をマウスに免疫し、数ヶ月後、抗原に対して結合能を有する抗体の産生量がマウス血清内に高まっていることを確認した後脾臓を取り出し、脾臓細胞をマウスミ

エロマー細胞と融合させ、ハイブリドーマを作製する。その後、当該抗原を認識する抗体を産生している融合細胞をクローン化し、その細胞を培養するかマウス腹腔内に移植することで、抗体認識において均一な性能を有するモノクローナル抗体を安定的に作製することができる。しかし、モノクローナル抗体を作製する場合でも、動物実験を必要とし、また、自己抗原や毒素に対する抗体など、抗体作製が困難な場合も多い。

そこで、我々は、分子認識能を有するペプチド（以下、「認識ペプチド」と記載する）を動物免疫系に頼らず作製するファージ・ディスプレイ法に注目した。ファージ・ディスプレイ法は免疫系の分子進化過程を模倣した選択技術で、 10^8 を超えるペプチド・ライブラリーの中から標的物質に結合するペプチド分子を選択し単離する技術である。この選択・単離のプロセスは動物免疫とは異なる “*in vitro*” の反応であり、異物として認識されにくいタンパク質、病原体、毒素など、従来の方法では抗体作製が困難とされていた物質を認識するペプチド分子を単離することも可能と考えられる。そこで、12 個のランダムなアミノ酸残基からなる 10^8 種類のペプチド・ライブラリーの中から、大腸菌 O157:H7 の作るべん毛繊維タンパク質（フラジェリン）を特異的に認識するペプチドを単離することとした⁶⁾。免疫グロブリンの相補性決定領域（complementarity-determining region: CDR）が数個から 10 数個のアミノ酸残基から構成されることから考えて、12 個のアミノ酸残基からなるペプチドであれば特異的な認識能を獲得できるであろうと考えた。

第 1 節では、検出対象とした大腸菌のフラジェリン（以下、「H 抗原」と記載）の調製方法について述べる。フラジェリンは細菌の代表的な表面抗原の 1 つで、サルモネラ菌やヘリコバクター菌などでは非常によく研究され、フラジェリンをコードする遺伝子も多数同定されているが、大腸菌においてはあまり研究が進んでいないのが現状である⁷⁻⁹⁾。大腸菌のフラジェリンとしては、少なくとも 100 種類以上の血清型が知られ、それらは 12 の血清型に大別されるが、その遺伝子がクローン化されているものはほとんどなく、またフラジェリンをコードする遺伝子の塩基配列も 5 種類の菌株から報告されているだけであった¹⁰⁾。本研究では、クローン化された 5 種類の H 抗原をコードする遺伝子が大腸菌の中で発現させ、フラジェリンを調製した。

第 2 節では、H 抗原の 1 つである H7 抗原を認識するペプチドの単離およびその抗原認識特性について述べる

第 3 節では、病原性大腸菌 O157:H7 の H7 抗原を認識するペプチドを使用した細菌検出について述べる。第 2 節で得られた H7 認識ペプチドの配列に基づいて、実際にペプチ

ドを化学合成した。そして化学合成したペプチドによる H7 抗原発現大腸菌の蛍光検出を検討した。

(第 2 章)

第 2 章では、産業的に利用する酵素を改良する上で必要な、新規酵素遺伝子ライブラリーの作製について述べる。対象としたハロペルオキシダーゼ (E. C. 1. 11. 1. 7) は、過酸化水素に依存して、有機物質にハロゲンを導入する反応を触媒する酵素である。ハロペルオキシダーゼは、自然界に広く存在すると考えられ、微生物や藻類等の生体内において有機物質にハロゲンを導入する反応を触媒することが知られている¹¹⁻¹³⁾。

これまでに、細菌、菌類、藻類等の生物からハロペルオキシダーゼが単離され、機能解析が進められてきた。細菌においては、クロラムフェニコール、ピロールニトリン等の有機ハロゲン抗生物質の生産菌にハロペルオキシダーゼが検出され、これらの抗生物質の生産にハロペルオキシダーゼが関与していると考えられている。また、海洋環境中には、ブロモフェノール類やハロゲン化テルペン類等多種類のハロゲン化合物が含まれているが、これらの物質の多くも、ハロペルオキシダーゼを利用して生産していると考えられている。

一方、ハロペルオキシダーゼの研究例は少なく、同定されている遺伝子の種類も必ずしも多くはない。本研究は、自然界の微生物群を DNA ライブラリーに見立て、そこから直接的に遺伝子を単離する方法の確立を目指した。

第 1 節では、自然界からの微生物 DNA を調製する方法およびカセット PCR 法について述べる。カセット PCR 法は PCR を主体とする技術であり、従来の遺伝子単離技術に比べてより効率的に遺伝子を単離することができる。本研究では、この方法を、新規ハロペルオキシダーゼの単離に適用した。

第 2 節では、ハロペルオキシダーゼ遺伝子を自然界から直接的に単離する方法の構築およびその解析結果について述べる。

(第 3 章)

第 3 章では、微生物を用いたカロテノイドの生合成技術の改良について述べる。

カロテノイドは自然界に広く存在する天然色素であり、現在、600 種類以上が単離・同定されている^{14, 25, 26)}。多くのカロテノイドは古くから利用・摂取されており、安全な物質として認識されている。

カロテノイドを生産する微生物は数多く知られており、なかでも、*Phaffia* 酵母¹⁵⁾、*Haematococcus* 藻¹⁴⁾が代表的なカロテノイド生合成微生物である。藻類や酵母とは別に、カロテノイドを生合成するユニークな細菌が、1990年代に相次ぎ発見された^{17, 18)}。なかでも沖縄海域から発見された海洋性の *Paracoccus* 属細菌は、アスタキサンチンを最終生産物とするカロテノイド生合成細菌として報告された¹⁸⁾。本細菌は Misawa らによって詳細に検討され、アスタキサンチン生合成経路は遺伝子レベルで解明された^{19, 20)}。これらの報告によれば、アスタキサンチンは、メバロン酸経路により生合成されたイソペンテニルピロリン酸およびジメチルアリルピロリン酸を基にフィトエンが生合成され、さらに β -カロテンの酸化反応を経て生合成されるとされている。

このように、*Paracoccus* 属細菌はアスタキサンチンへの生合成経路も解明されており、また、細胞構造が単純なため技術課題の一つであるカロテノイド抽出においても、*Haematococcus* 藻等より簡便に抽出できる可能性があった。さらに、*Haematococcus* 藻の様に増殖に光を必要することなく通常の装置で培養が可能であることから、本研究では、*Paracoccus* 属細菌のカロテノイド生産性の向上に焦点を当て、アスタキサンチン生合成に関わる研究に取り組んだ。

本研究では、*Paracoccus* 属細菌のアスタキサンチンの生産性を向上させるために、突然変異育種技術と遺伝子組換え技術をそれぞれ適用した。そして、それらの技術を用い、アスタキサンチン生産性が実用化レベルにまで向上した遺伝子組換え変異株を獲得することができた。

第1節では、微生物菌株保存機関から入手した *Paracoccus* 属細菌を含めたカロテノイド生合成細菌の培養および生産性評価の結果について述べる。分譲細菌はいずれも一般的な培地を用いて簡単に培養することができ、報告通りの生産性でカロテノイドを生合成した。これらの細菌のなかでカロテノイド合成量が最も高く、カロテノイド生合成の最終生産物としてアスタキサンチンを生産する *Paracoccus* sp. N81106 株を研究対象として選択した。

第2節では、*Paracoccus* sp. N81106 株のカロテノイドの生産性向上を図るために実施した突然変異育種の結果について述べる。突然変異誘起剤である N-メチル-N'-ニトロ-N''-ニトロソグアニジンの処理条件を詳細に検討し、*Paracoccus* 属細菌への突然変異導入を最適化した。変異処理を繰り返すことにより、*Paracoccus* sp. N81106 株に由来するアスタキサンチン生産性が向上した突然変異株を取得した。

第3節では、突然変異育種法で改良された *Paracoccus* 属細菌突然変異株の機能をさらに活かすために、遺伝子組換え技術によるカロテノイド生合成の改良を行った結果について述べる。*Paracoccus* 属細菌のカロテノイド生合成遺伝子を、突然変異株に導入し大量発現させることにより突然変異育種のみでは達成し得なかった生産性向上を果たすことができた。以上の通り、本研究では、カロテノイド生合成細菌である海洋性の *Paracoccus* 属細菌のカロテノイド生合成を産業利用するために、(i) 同細菌に適用可能な突然変異育種法および遺伝子組換え技術を開発し、(ii) 開発した突然変異育種法により生産性を改良し、(iii) さらに、遺伝子組換え技術を用いて同細菌の有するカロテノイド生合成遺伝子を同細菌内で大量発現させることにより、カロテノイド生産性をさらに向上させることに成功した。

本論

第1章 大腸菌 H7 抗原認識ペプチドの単離および細菌検出

第1節 大腸菌フラジェリン・タンパク質の調製

1.1.1 緒言

細菌の表層には、強い抗原性を示すいくつかの高分子が存在する。表面抗原と呼ばれるこれらの高分子は、O 抗原、H 抗原、莢膜(Kapsel: K) 抗原 および線毛(fimbriae; F) 抗原の4種類に大別される。O 抗原の実体は細菌の外膜に存在するリポ多糖(lipopolysaccharide: LPS)であり、H 抗原の実体はべん毛繊維を構成するタンパク質のフラジェリンである。O 抗原は、それを構成する糖の種類や配列によって、異なる抗原性を示す。一方、H 抗原では、フラジェリンの一次構造や三次構造によって抗原性が異なってくる。細菌のO 抗原およびH 抗原を組み合わせたものを血清型と呼び、免疫型的な違いによる細菌の判別に用いている。今日までに、大腸菌は、173のO 抗原、56のH 抗原に分類されている^{7,8)}。

本研究では、この細胞表層に存在するフラジェリンをターゲットとして、それを特異的に認識するペプチドを動物免疫系に頼らず作製することを目指した。そして、その第一段階として、異なる抗原性を示すフラジェリンを調製する方法を検討した。

1.1.2 実験材料および方法

(1)大腸菌の培養

Escherichia coli K-12 由来の YK4130 株 (*fliC4130*, *araD139 lacΔ U169*, *rpsL*, *thi*, *pyrC46*, *gyrA*, *thyA*) に異なる H 抗原遺伝子を導入した以下の H 抗原発現株¹⁰⁾を使用した。

- ・大腸菌 H1 抗原発現株 *E. coli* YK4130: H1
- ・大腸菌 H5 抗原発現株 *E. coli* YK4130: H5
- ・大腸菌 H7 抗原発現株 *E. coli* YK4130: H7

- ・大腸菌 H12 抗原発現株 *E. coli* YK4130: H12
- ・大腸菌 H23 抗原発現株 *E. coli* YK4130: H23

これらの株を、50 µg/ml のアンピシリン、25 µg/ml のカナマイシンを含む LB 培地 [1% (w/v) トリプトン、0.5% (w/v) イーストイクストラクト、0.5% (w/v) NaCl] で培養した (30°C, 18 hr)。

(2)大腸菌フラジェリンの調製

大腸菌培養液を遠心分離 (10,000 ×g, 20 min) により上清と菌体に分けた。次いで、PBS (Phosphate Buffered Saline) で洗浄後、大腸菌ペレットを PBS に再溶解させ、シリンジに菌体ペレットを通すことを繰り返し、フラジェリンを大腸菌から脱離させた。さらに、遠心分離 (10,000 ×g, 20 min) により菌体を除き、上清中の脱離させたフラジェリンを 5% グリセロール、1 mM phenyl methyl sulfonyl fluoride を含む PBS に対して透析した。この透析したサンプルを精製フラジェリンとした。フラジェリンは、Bovine serum albumin を標準タンパク質として Coomassie Brilliant Blue 染色によるブラッドフォード法により定量した。

1.1.3 結果

(1)大腸菌の培養

大腸菌 H 抗原発現株は何れも LB 培地で良好に増殖し、各 H 抗原を発現した。発現については、光学顕微鏡で大腸菌の運動性を観察し評価した。

(2)大腸菌フラジェリンの調製

フラジェリンはシリンジ針を通す操作により、大腸菌から簡単に脱離させることができ、図 1-1 の通り、電気泳動的に均一にまで精製することができた。

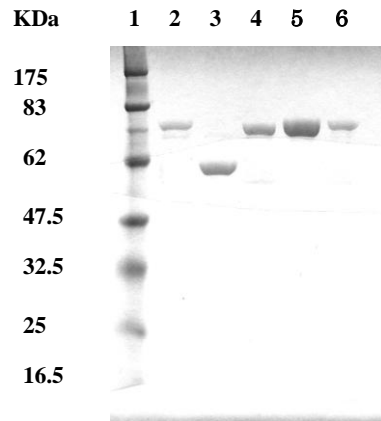


図 1-1. 精製フラジェリンの SDS-PAGE による純度検定

1: マーカータンパク質 (New England Biolabs 社製) [MBP- β -galactosidase (175 kDa), MBP-paramyosin (83 kDa), glutamic dehydrogenase (62 kDa), aldolase (47.5 kDa), triosephosphate isomerase (32.5 kDa), β -lactoglobulin A (25 kDa), lysozyme (16.5 kDa)、2: H1 抗原、3: H5 抗原、4: H7 抗原、5: H12 抗原、6: H23 抗原.

1.1.4 考察

細菌検出のターゲットとして、LP 多糖からなる O 抗原などより構造情報が多いことから、H 抗原を選択した。H 抗原の調製は大腸菌 *E. coli* K-12 YK4130 株を組み換えた 5 種類の株を用いて行った。いずれも良好に増殖し、また、カラム・クロマトグラフィなどの操作をせず、精製タンパク質を調製することができた。

第 2 節 大腸菌フラジェリン認識ペプチドの作製

1.2.1 緒言

抗体 (免疫グロブリン) は H 鎖と L 鎖に存在するアミノ酸可変部位である CDR 領域により抗原を認識する。それぞれに 3 種類の CDR 領域があり、抗体の FR 領域を介して、CDR 領域間が複雑な立体構造をとり特異性の高い認識特性を獲得している。CDR のうち、特に特異性を決定している CDR3 領域はアミノ酸数として数個から 10 数個である。すなわち、10 数万の分子量を有する抗体であっても、この一部のアミノ酸配列が抗原に対して認識特性を有していると考えられる。

細菌 H 抗原を特異的に検出するシステムとして、抗体による方法が知られているが、序論で述べたとおり、抗体作製や抗体の安定性には依然として課題が多い。そこで本研究では、アミノ酸数 10 数個からなるペプチドを H 抗原認識分子として使用する可能性について、ファージ・ディスプレイ法を用いて検討することとした。認識ペプチドのターゲットとしては、食中毒原因菌である *E. coli* O157:H7 の検出に利用できる H7 抗原とした。

1.2.2 実験材料および方法

(1)ファージ・ディスプレイ法による認識ペプチドの単離

①ファージ・ディスプレイ・スクリーニング

M13 ファージのコートタンパク質上に 12 のアミノ酸残基よりなるペプチドを提示した市販のランダム・ペプチド・ライブラリー (Phage Display Peptide Library Kit, Ph. D.-12, New England Biolabs 社製) を用いて、H7 抗原に結合する能力のあるファージをセレクションした。このライブラリーには、 2×10^8 種以上のペプチドを作る M13 ファージが含まれている。選択はパニング法を用いて行った。パニング法とは、固定化した標的タンパクに M13 ファージ・ライブラリーを接触させ、結合しなかった M13 ファージを洗浄により除去した後、結合したファージを溶出し大腸菌に感染させて増殖させるという操作を数回行うことで、標的タンパクに特異的に結合できる M13 ファージを濃縮する方法のことである。

H7 抗原を PBS に 10 $\mu\text{g/ml}$ の濃度になるよう溶解させ、市販のイムノチューブ (マキシソープ, Nunc 社製) に 1.0 ml ずつ添加し、一晩放置した。翌日、チューブの溶液を除去した後、ブロックエース (大日本製薬社製) を 1.0 ml ずつ加え、室温で 1 時間放置し、ブロッキングした。

次に 4×10^{10} 個のファージ相当分の M13 ファージ・ライブラリーを含む 0.1% Tween20 を含む PBS 溶液 (1 ml) を加え、30 分間放置し、固定化された H7 抗原に結合性を示す M13 ファージをイムノチューブ表面に結合させた。溶液を除去した後、同溶液で 10 回洗浄することにより結合しなかったファージを除去し、10 $\mu\text{g/ml}$ の H7 抗原を含む PBS (0.1% Tween20, 10% ブロックエース) を 10 ml 加え、特異的に結合したファージを遊離させた。これを定法により大腸菌 ER2738 株 [*F' proA⁺B⁺ lacI^q Δ (lacZ)M15 zzz⁺:Tn10(Tet^R)/fhuA2 glnV Δ (lac-proAB) thi-1 Δ (hsdS-mcrB)5*] に感染させることでファージを増殖させ、次の

スクリーニング用のライブラリーとした。

上述の操作を1つのサイクルとして、同様な操作を3サイクル行った。1から3サイクル目での結合時間は30分としたが、4サイクル目での結合時間は10分とした。4サイクル目で単離されたファージを *E. coli* K-12 ER2738 株に感染させた後、LB 寒天プレートに播種した。翌日、100 以下のプラークができたプレートから任意の約 48 のクローンを選び、これをそれぞれ別個に *E. coli* K-12 ER2738 株に再感染させ、モノクローン化されたファージを調製した。ファージ・ディスプレイ法のセレクションの概要を図 1-2 に示した。

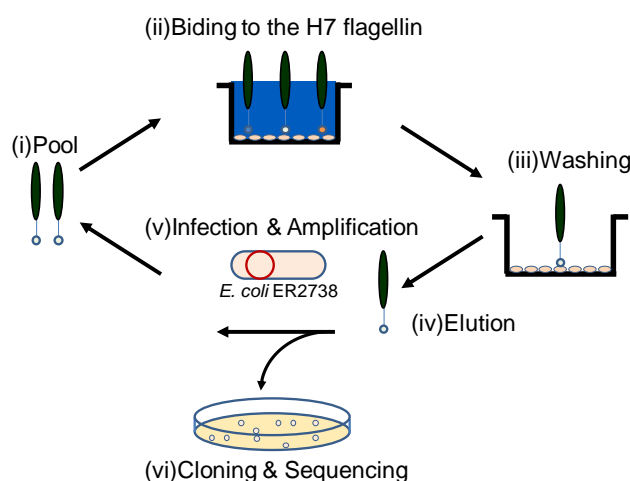


図 1-2. ファージ・ディスプレイ法による抗原認識ファージの濃縮法

イムノチューブに H7 抗原を固定化し、ブロックエースを添加後、ファージ・ライブラリー (i) を加え室温で反応させた (ii)。界面活性剤入りの PBS で洗浄後 (iii)、H7 抗原に結合したファージを H7 抗原入りの PBS により溶出させた (iv)。回収したファージについては、再度、同様な操作を行い、H7 抗原結合性ファージを濃縮した。

②ファージ・クロンの結合性評価

単離したファージの中から、H7 抗原に結合性を示したクローンを選別した。具体的には、H7 抗原を PBS に 10 $\mu\text{g/ml}$ の濃度になるように溶解させ、この溶液を市販の 96 ウェルマイクロタイター・プレートの左半分には 0.1 ml ずつ加え、右半分には対照として PBS を 0.1 ml ずつ加え一晩放置した。翌日、ウェルの溶液を除去した後、PBS で 3 回洗浄し、すべてのウェルにブロックエースを 0.2 ml ずつ加えて 37°C で 1 時間放置し、ブロッキングした。その後 0.1% Tween 20 を含む PBS で 3 回洗浄した後、①で調製したファージ溶液 0.1 ml を H7 抗原固定化ウェルと対照ウェルに加えた。37°C で 1 時間反応後、0.1% Tween 20 を含む PBS で 3 回洗浄した。その後、horse radish peroxidase (HRP) で標識

された抗 M13 抗体(GE ヘルスケア社製)を加え、プレート上で反応させ、HRP 用の発色試薬で発色させ、405 nm における吸光度を測定した。

③ファージ提示ペプチドのアミノ酸配列

H7 結合性を確認することができたファージ・クローンから、定法により DNA を抽出した。抽出した DNA の塩基配列を決定することにより、ファージが呈示しているペプチドのアミノ酸配列を決定した。塩基配列の解析は以下のシーケンスプライマーを用いて行った。

Sequencing primer: 5'-gtatgggattttgctaaacaac- 3'

(2)H7 認識ペプチドの化学合成

H7 抗原を認識するファージ提示ペプチドの配列を基に、H7 を認識するペプチドを化学合成した。ペプチドの C 末側には、構造上自由度の高いグリシン・セリンのリンカーおよびビオチン標識のためのリジンが付加し、ストレプトアビジンによる検出系を利用するためにビオチンを結合させた。この合成ペプチドを H7 認識ペプチドと命名した。

H7 認識ペプチド: LHIHRPTLSIQG-GGGSK-biotin (MW: 1,982)

(3)H7 認識ペプチドのフラジェリンに対する反応性の評価

H7 認識ペプチドと H7 抗原との反応性については、固定化された H7 抗原に結合した H7 認識ペプチドに、HRP 標識したストレプトアビジンを結合させ、HRP による発色を測定することで評価した。

また、H7 認識ペプチドと H7 抗原との結合特異性を調べるために、20 µg/ml の H7 認識ペプチドと 40 µg/ml の H1 抗原、H5 抗原、H7 抗原、H12 抗原、H23 抗原とをそれぞれ反応させた (30°C, 1 hr)。反応後、反応液を 10 µg/ml の H7 抗原固定化ウエルと対照ウエルに加えた。37°C で 1 時間反応後、PBS で 3 回洗浄した後未反応の H7 認識ペプチドを除去し、固定化 H7 抗原に結合した H7 認識ペプチドを上述の方法により検出した。

1.2.3 結果

(1)ファージ・ディスプレイ法による認識ペプチドの単離

12 個のアミノ酸からなるペプチドのファージ・ディスプレイ・ライブラリーから H7 抗原に対する結合性ファージの単離を行った。H7 抗原は、市販のスチレンを基材とするイムノチューブに固定した。H7 抗原はスキンミルクによるブロッキング後もチューブ溶液中に解離することなく良好に固定化された。

ファージ・ディスプレイ・ライブラリーからの H7 抗原認識ファージの単離は 3 サイクルのセレクションにより行った。非特異的に結合するファージの洗浄は、緩衝液中に界面活性剤を添加することにより行った。さらに、洗浄緩衝液に H7 抗原を添加することにより、通常の緩衝液では洗浄できない H7 抗原に弱い結合性を示すファージを洗浄・溶出させた。

3 サイクル後のセレクションにより、ポリクローナルな状態のファージで、結合性が向上していることが確認された。このセレクションの結果を表 1-1 に示した。

表 1-1. H7 抗原結合性ファージの濃縮

Round	Input Phage (pfu)	Eluted Phage (pfu)	Yield
First	1.5×10^{12}	1.1×10^5	7.3×10^{-8}
Second	6.5×10^{12}	4.6×10^6	7.1×10^{-7}
Third	4.1×10^{12}	6.2×10^7	1.5×10^{-5}
Fourth	4.7×10^{12}	7.5×10^7	1.6×10^{-5}

注) Yield= Eluted Phage 数 / Input Phage 数

ファージ数の計測は、以下のように行った。対数増殖期の大腸菌 *E. coli* K-12 ER2738 株に、連続的に希釈したファージを感染させ約 60 分間静置した。次いで、3 ml の Agarose top (5 g/L Yeast extract, 10 g/L Tryptone, 10 g/L NaCl, 7 g/L Agar) を加え攪拌し、それを IPTG Xgal を含む LB 寒天培地に添加した。寒天培地を 37°C で 18 hr 培養し、現れたプラークをカウントしファージ数とした。

表 1-1 の通り、4 回のセレクションを行うことにより、H7 結合性ファージを約 200 倍

濃縮することができた。このファージの集団から任意にクローンを選択し、個別のクローンの H7 結合性を評価した。結合性の評価結果を図 1-3、提示ペプチドのアミノ酸配列を表 1-2 に示した。

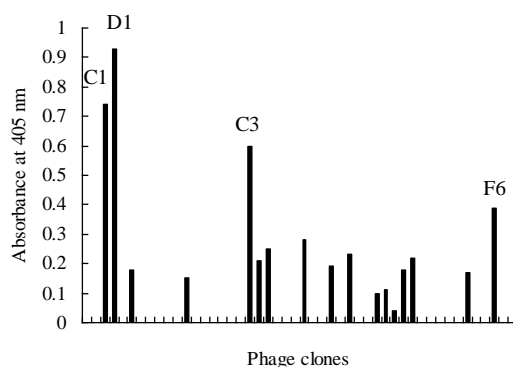


図 1-3. ファージ・クローンの結合性評価結果

縦軸は、H7 抗原固定化ウエルと対照ウエルの HRP 試薬の 405 nm における吸光度の差を示している。横軸は、任意に選抜した 47 のファージ・クローンであり、クローン名は表 1-2 に示している。本図では、結合性の強かったファージ・クローンのみについて、それらのクローン名を示した。

表 1-2. ファージ・クローンの提示するペプチドのアミノ酸配列

Phage clone	Amino acid sequence
C1	YALGSNPLRLPW
D1	LH IHRPTLS IQG
F1	QDVHLTPQSRYT
D2	HEAI TQINARLD
C3	MLYPSPGALRNP
D3	SFQKTTSSWALR
E3	LLADTTHHRPWT
A4	SSS I R PPF PPAV
D4	HLQTVSFRPHTL
F4	I PQVQFPHSTRL
A5	TMGFTAPRFPHY
B5	VPTLSTVRSLQT
C5	WHQTYTSSLWES
D5	MEGQYKSNLLFT
E5	GVM TYPYSRAYH
C6	MPDSILLRNLS S
F6	LI S SPRPVLTTPP

なかでも結合性の高かった 4 種類 of フェージ(クローン名:C1, C3, D1, F6)について H7 抗原に対する結合の濃度依存性を評価したところ、何れのフェージも固相に固定した H7 抗原濃度に依存して反応した。結果を図 1-4 に示した。

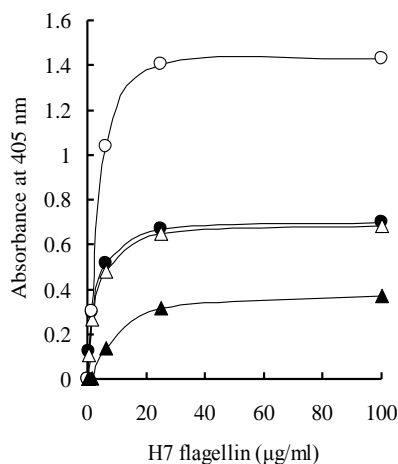


図 1-4. フェージ・クローンの H7 抗原に対する結合濃度依存性

0~100 µg/ml の H7 抗原をマイクロタイター・プレートに固定化し、ブロッキング後、フェージ・クローンを加え ELISA により反応性を評価した. ○: D1, ●: C1, △: C3, ▲: F6.

(2) H7 認識ペプチドの反応性の評価

ELSA 法を用いて、H7 認識ペプチドと H7 抗原との結合を評価した。H7 認識ペプチドは H7 抗原に対して濃度依存的に反応した (図 1-5)。ELISA の系における EC₅₀ 値は約 1.9 µM であった。

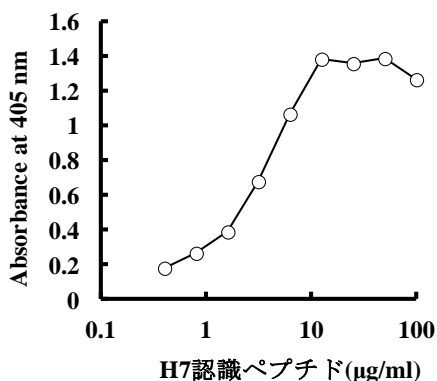


図 1-5. H7 認識ペプチドの H7 抗原に対する結合の濃度依存性

10 µg/ml の H7 抗原をマイクロタイター・プレートに固定化し、ブロッキング後、PBS で段階的に希釈した H7 認識ペプチドを加え反応させた。EC₅₀ 値は、H7 抗原認識部位である LHIHRPTLSIQG の分子量 (1,371) から算出した。

H7 抗原と H7 認識ペプチドとの結合の特異性について評価した。まず H7 認識ペプチドを、種々の H 抗原 (H1, H5, H7, H12, H23) と PBS 中で反応させた。次いで、この反応液を、H7 抗原を固定化したウエルに加え、ウエルに固定化された H7 への H7 認識ペプチドの結合が、PBS 中の H 抗原によって阻害されたかについて評価した。図 1-6 に示したように、H7 認識ペプチドと H7 との結合は、H7 によって最も強く阻害された。この結果から、H7 認識ペプチドは H7 に対して最も高い結合性を示すことが明らかになった。

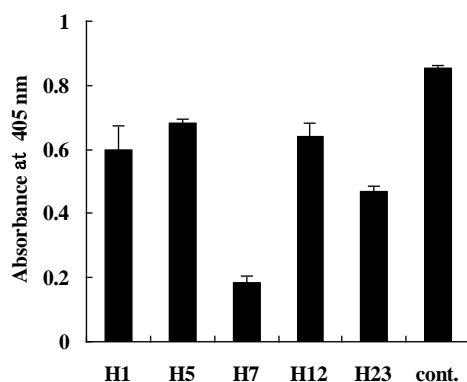


図 1-6. H7 認識ペプチドの H 抗原認識特異性

20 $\mu\text{g/ml}$ の H7 認識ペプチドと 40 $\mu\text{g/ml}$ の各抗原を PBS 中に添加し反応させ (37°C, 1 hr)、10 $\mu\text{g/ml}$ の H7 抗原を固定化したマイクロター・プレートに加えて ELISA により反応性を評価した。図中、cont. の表記は 1 段階目の反応を PBS で行った結果である。

1.2.4 考察

ペプチドによる細菌検出の系を構築するためにファージ・ディスプレイ・ライブラリーから大腸菌 H7 抗原に対する認識ペプチドの単離を試みた。ペプチド・ライブラリーからの単離は、精製した H7 抗原をイムノチューブに固定化し、それに結合するファージを濃縮するというシステムを構築して行った。イムノチューブに対する H7 抗原の固定化は、H7 抗原を所定濃度に調製し緩衝液添加の状態イムノチューブ内に静置することにより行った。この方法で、H7 抗原に対して特異的に反応するファージが得られ、この方法の有効性が示された。ファージ・ディスプレイ・ライブラリーは 12 mer のペプチドが 10^8 を超えるレパートリーで構成されている系を使用した。ライブラリーから H7 抗原結合性ファージの濃縮は、固定化された H7 抗原にファージを結合させ、非結合性ファージを洗浄して除くことで行った。結合させる工程は、最初のサイクルでは 30 分、最終の 4 サイ

クル目では 10 分間で行った。初期の段階ではライブラリー中に結合性ファージの割合は少ないが、4 サイクル目では、結合性ファージ割合が増加すると考えられるので、短めの結合反応時間に設定した。

洗浄工程は、イムノチューブあるいはブロッキング剤であるスキムミルクに非特異的に結合するファージを溶出させるため、界面活性剤入りの緩衝液を用いて行った。洗浄回数については一定としたが、結合性ファージを単離し難い場合は、最初のサイクルでは少なめにすることで単離が可能であると考えられる。また、本研究では洗浄緩衝液に H7 抗原を添加し、固相に固定された H7 抗原に対して弱い反応性の結合性ファージを洗浄させる工程を設けた。

洗浄後の結合性ファージの溶出は H7 抗原を含む PBS で行った。これにより、結合性ファージを十分溶出できたと考えられる。溶出された結合性ファージは、その後、大腸菌に感染させ増幅させた。大腸菌への感染は、温度を 37°C 以上で培養することにより、ファージのレセプターである F-繊毛が十分に発現する条件で行った。その結果、ファージを良好に増殖させることができた。

以上の、結合反応、洗浄および溶出の工程の組み合わせを 1 サイクルとし、合計 3 サイクル処理することによりポリクローナル状態のファージの H7 抗原に対する反応性が向上した。なかには非特異的に反応するファージの存在も考えられたが、結合性ファージの割合が増加したと判断できることからモノクローナルな状態でのファージの H7 抗原に対する反応性を評価した。

96 穴フォーマットでファージ感染大腸菌を培養し個別に反応性を評価したところ、H7 抗原に対して 4 つのファージ・クローンが高い反応性を示した。また、見かけ上高い反応性を示したが、H7 抗原に対しての特異性の低いファージの存在も確認された。特異性の高い結合性ファージの単離割合を上げるためには、さらに、洗浄回数を増やすかブロッキング剤を変更する必要があると考えられる。

4 種類の結合性ファージについて提示ペプチドのアミノ酸配列をファージ DNA の塩基配列を解析することにより解析した。4 種類のファージはそれぞれ個別のペプチド配列を有していた。4 種類のファージのうち最も結合性の高い D1 ファージ・クローンから解析したアミノ酸配列をもとにしてペプチドを化学合成した。化学合成された H7 認識ペプチドは、N 末端側に認識部位、C 末端側にアミノ酸グリシンおよびセリンからなるリンカーペプチドを持ち、さらに、リンカー配列の後にビオチンが結合している。

この H7 認識ペプチドの反応性を評価したところ、ターゲットである H7 抗原に対して濃度依存的に反応した (EC₅₀ 値 : 1.9 μM)。すなわち、抗体に比べて非常に小さな 12 mer ペプチドであるにもかかわらず、大腸菌 H7 抗原に対して高い特異性を有する分子の創製に成功することができた。H 抗原を特異的に認識できるペプチドを取得したのは、本研究が初めてであると考えられる。

第 3 節 フラジェリン認識ペプチドによる大腸菌の検出

1.3.1 緒言

大腸菌 O157:H7 の特異的検出を目的に、細菌表層に存在する H 抗原を認識するペプチドの創製を行い、H7 抗原に対して高い特異性で反応する H7 認識ペプチドを創製することに成功した。そこで、この H7 認識ペプチドを用い H7 抗原を持つ細菌を検出できるか、すなわち、H7 抗原を発現し H7 フラジェリンで構成されているべん毛繊維を、蛍光標識した H7 認識ペプチドによって蛍光染色できるかについて検討した。

1.3.2 実験材料および方法

(1)大腸菌の培養

大腸菌の培養を第 1 節と同様な方法で行った。大腸菌株は、H 抗原の遺伝子が欠損し、べん毛繊維を作らない(すなわち H 抗原を発現しない) *E. coli* K-12 YK4130 株と H7 抗原を発現している *E. coli* K-12 YK4130: H7 株を使用した。

これらの大腸菌をそれぞれ培養後 (30°C, 4 hr)、培養液 1.0 ml をサンプリングし、遠心分離 (5,000 ×g, 5 min) により菌体と培養上清に分け、菌体を 1.0 ml の PBS にけん濁した。この操作を 2 回繰り返した。次いで、PBS にけん濁した菌体溶液を 100 μl サンプリングし、終濃度 10 μg/ml の H7 認識ペプチドと反応させた (4-8°C, 18 hr)。反応後、遠心分離 (5,000 ×g, 5 min) により未反応の H7 認識ペプチドを除いた。再度、菌体を 100 μl の PBS にけん濁し、Cy3 標識のストレプトアビジン (GE ヘルスケア社製) を終濃度 20 μg/ml 添加し反応させた (37°C, 1 hr)。その後、遠心分離 (5,000 ×g, 5 min) によって上清を除き、菌体を調製した。さらに、PBS により菌体を洗浄し、未反応の Cy3 標識スト

レプトアビジンを除去した。併せて、DNA 染色のために、DAPI

(4, 6-Diamidino-2-phenylindole) を添加し反応させた。

(2)FISH 法によるフラジェリン発現大腸菌の検出

1.3.2 の方法で得られた菌体調製液を 0.2 μm のポリカーボネートろ紙でろ過し、蛍光顕微鏡観察に供した。蛍光顕微鏡観察 (G 励起 : Cy3 認識ペプチド画像、UV 励起 : DAPI 画像) では、DAPI 染色像が全細菌を表し、Cy3 による蛍光シグナルは H7 抗原発現細菌と H7 認識ペプチドとの結合を示すものである。

1.3.3 結果

H7 抗原が発現している *E. coli* K-12 YK-4130:H7 株の画像では、DAPI によるシグナルと重なるように Cy3 のシグナルを認めることができた (図 1-7a)。これに対して、H7 抗原非発現細菌の *E. coli* K-12 YK4130 株では DAPI のみのシグナルが検出された (図 1-7b)。

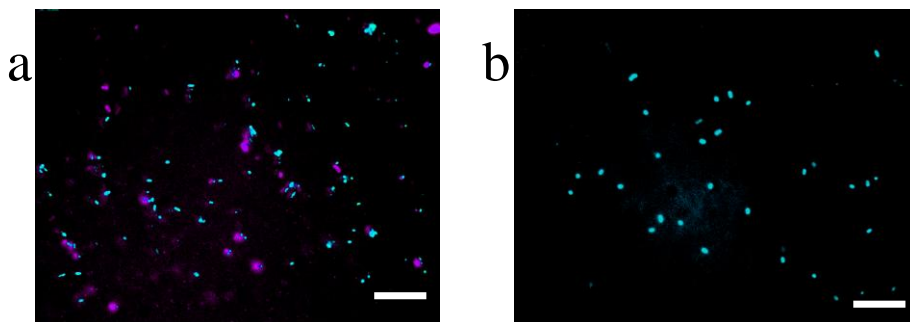


図 1-7. H7 認識ペプチドによる H7 抗原発現大腸菌の検出

a: *E. coli* K-12 YK4130:H7 株、b: *E. coli* K-12 YK4130 株の蛍光顕微鏡像。Cy3 標識したストレプトアビジンにより検出した H7 認識ペプチド (C 末端にビオチンを付加) の蛍光を赤で表し、DAPI 染色による蛍光を青で示した。5 μm の長さをバーで示した。

1.3.4 考察

H7 認識ペプチドの有用性を評価するために、H7 抗原発現大腸菌を蛍光標識した H7 認識ペプチドと結合させ、その結合を蛍光顕微鏡で観察した。抗原を発現している *E. coli* K-12 YK-4130:H7 株では H7 認識ペプチドに由来する蛍光シグナルを示す細胞が多く観察された。蛍光シグナルを示さない細胞も *E. coli* K-12 YK4130:H7 株培養液の中に認められたが、これらの細胞では、べん毛が形成されていないものと思われる。通常の大腸菌でも、べん毛繊維を持たない細胞が高い頻度で出現することは良く知られている。実際、電子顕微鏡観察でも、べん毛繊維を形成しない細胞が同程度の頻度で存在していた(データを示さず)。これに対して、H7 抗原を発現していない *E. coli* K-12 YK4130 株では、DAPI によるシグナルは認められるものの、H7 認識ペプチド由来のシグナルは観察されなかった。これらの結果から、H7 認識ペプチドによって、大腸菌表層に存在する H7 抗原が特異的に認識されたと結論した。

以上、ファージ・ディスプレイ法で単離した H7 抗原結合性ファージの解析により創製された H7 認識ペプチドが、H7 フラジェリンを作る大腸菌の検出に有用であることを確認することができた。このことから、分子量 1,000 程度の分子であっても、タンパク質を特異的に認識することができるという実例を示すことができた。

第 4 節 要約・総括

細菌の検出・同定には、目的あるいは検出対象に応じて、培養法、遺伝子検出法、抗体検出法などが開発されている。本研究では、表層抗原をターゲットとし、低分子ペプチドによるターゲットの特異的検出を目指した。表層抗原としては、本研究で対象とした H 抗原の他に細胞表層の抗原 (O 抗原、K 抗原) が知られている。H 抗原の実体はタンパク質であるフラジェリンであり、多糖から構成される抗原よりも構造情報が豊富であることから、これをターゲットとして選択した。また、近年問題となっている病原性大腸菌の検出の要望が高いこともあり、H 抗原なかでも *E. coli* O157:H7 の表層に存在する H7 抗原を念頭において研究を実施した。

第 1 節では、表層抗原の 1 つである大腸菌 H 抗原の調製について述べた。H 抗原は、それらをコードする遺伝子をフラジェリン合成欠損株である *E. coli* K-12 YK4130 株に組

み換えるることによって、良好に発現させることができた。非病原性大腸菌 K-12 株を用い、簡便・安全な培養を行い、簡易に 5 つの H 抗原を精製することができた。

第 2 節では、H7 抗原を認識するペプチドの単離法、および単離したペプチドの特性について述べた。ファージ・ディスプレイ法により H7 抗原認識ペプチドを提示したファージを選択し、数種類の H7 抗原結合性ファージを単離することができた。ファージ DNA の塩基配列を決定することにより、提示されたペプチド配列を推定した。その結果、それぞれは異なったアミノ酸配列を持つペプチドを提示していた。

これらのペプチド配列が、ファージ表面に提示された形態ではなくペプチド単独であっても H7 抗原と反応性を有するか否かを調べるために、合成ペプチドを作製した (H7 認識ペプチド)。このペプチドは、H7 抗原に濃度依存的に反応し、また、競合 ELISA による反応性評価によって、H7 抗原に対する反応性は、他の H 抗原 (H1, H5, H12, H23) に対する反応性よりも顕著に高いことが示された。

低分子のペプチドが、H7 抗原に対して特異的に反応できるかは実験開始前では不明であったが、特異性を持つ認識ペプチドの単離が可能であることを示すことができた。

第 3 節では、H7 認識ペプチドによる細菌検出について検討した。H7 認識ペプチドと H7 フラジェリンべん毛を持つ大腸菌を反応させることにより、ペプチドが表層抗原を特異的に認識することを示すことができた。

以上、分子量 1,000 程度の分子であっても、高分子や細胞に対し、特異性を以って反応することを示すことができた。

第2章 自然界からの酵素遺伝子単離法開発

第1節 ハロペルオキシダーゼ遺伝子単離法の構築

2.1.1 緒言

タンパク質の改良の手段として、立体構造を基にして置換すべきアミノ酸残基を特定し、遺伝子組換え技術を用いてその残基を置換するという方法（部位特異的変異導入法）が、1970年代後半から利用されるようになってきた。そして、数100のアミノ酸残基からなるタンパク質においても、1箇所のアミノ酸置換のみで、熱安定性の向上や、基質特異性の変更が可能である事が示されてきた²¹⁾。一方、部位特異的変異導入法は万能ではない。まず、立体構造が明らかになっているタンパク質の種類と数は非常に限られているし、立体構造が解かれていても、どのアミノ酸を置換すれば目的の表現型が得られるかが、依然として予測できない場合がほとんどである。また、特定のアミノ酸を置換することにより思わぬ構造変化が起こり、タンパク質の機能が損なわれる事もしばしばある。この問題を解決するために、PCRによりターゲット遺伝子に変異をランダムに導入し（限定域ランダム突然変異）、得られた変異体ライブラリーからベストの特性を持つ変異体を淘汰・選択する方法が開発された。また、複数の変異体に存在する複数の変異を様々に組み合わせた変異体ライブラリーを作製し、その中から、ベストの特性を示す変異体を淘汰・選択するDNAシャフリング法も開発された²²⁾。DNAシャフリング法では、多くの場合、PCRを用いてターゲット遺伝子にランダムに変異を導入し、さまざまな変異を持つヘテロなPCR産物を得る。次いでこのPCR産物をDNaseによりランダムに断片化し、得られたDNA断片をPCRによりつなぎ合わせることにより、さまざまな変異の組合せを持つ全長遺伝子を合成する。しかしながら、PCRによるランダム変異導入では、タンパク質の機能を損なうなどの好ましくない変異が導入される確率の方が、好ましい変異が導入される確率よりもはるかに高く、その結果、改良されたタンパク質が得られる確率は必ずしも高くない。

他方、自然界には、様々なアミノ酸置換を有する酵素が存在し、酵素ファミリーを形成している。天然に存在するアミノ酸置換は、タンパク質の立体構造を著しく損なわないという淘汰を受けて固定されたものである。通常、自然界から微生物由来の酵素遺伝子を単離するためには、目的とする酵素活性を持つ微生物を入手し、それを培養した後に酵素活

性等を基に酵素を精製し、そのアミノ酸配列を同定後、その酵素遺伝子の単離が可能となる。

本研究では、微生物を培養することなく微生物由来の酵素遺伝子を単離する技術の構築を目指した。細菌に限らず、培養できる微生物は全微生物種の 1%程度であり²³⁾、培養を介さない技術を使うことにより、より多様な酵素遺伝子を単離できる可能性が開ける。本研究では、産業上の有用性の高いハロゲン化反応を触媒するハロペルオキシダーゼの中でも、安定性の高い non-metal 型に分類されるハロペルオキシダーゼを対象を絞り、カセット PCR 法²⁴⁾による遺伝子単離を行った。

カセット PCR とは、環境サンプルなどの遺伝子混合物から未知酵素遺伝子断片を PCR 増幅し、*in vitro* で機能を持つ遺伝子に再構築する方法である。この方法では、2 段の PCR 増幅を行う。まず、既知酵素遺伝子（本研究では、*Pseudomonas putida* ATCC11172 株由来のハロペルオキシダーゼ）の 5'末端および 3'末端に存在する保存領域の配列を用いて PCR プライマーを設計し、サンプル中から抽出した DNA を鋳型に PCR を行うことで、サンプル中に含まれる未知遺伝子の保存領域に挟まれた部分(セントラル・フラグメント)を増幅する。次に、このセントラル・フラグメントを既知遺伝子の相当部分に PCR によって組み込むことで、全長遺伝子のライブラリーを構成する方法である。*P. putida* ATCC11172 株保存領域は、ターゲットとするタンパク質のアミノ酸配列と、タンパク質データベースに含まれる近縁タンパク質のアミノ酸配列とを比較することによって簡単に同定でき、その配列をもとに縮重プライマーを設計することにより、多くの近縁遺伝子のセントラル・フラグメントが増幅できるようになる。その後、テンプレート遺伝子の 5'末端から 5'側保存領域遺伝子断片（以下、「5-arm」）と 3'側保存領域からと 3'末端側遺伝子断片（以下、「3-arm」）とセントラル・フラグメントを混合し、PCR を行うことにより活性発現可能なハイブリッド遺伝子を作製することができる。図 2-1 に、新規ハロペルオキシダーゼ遺伝子を環境サンプルから単離する手順を示す。

2.1.2 実験材料および方法

(1) ハロペルオキシダーゼ遺伝子のクローニング

Non-metal 型ハロペルオキシダーゼを保有すると考えられる *Pseudomonas* 属細菌から、

その酵素遺伝子を以下の方法でクローン化した。まず、*P. putida* ATCC11172 株を LB 培地で培養後 (30°C, 18 hr)、ゲノム DNA を抽出した (Puregen DNA Isolation Kit, Gentra 社製)。得られた抽出 DNA を鋳型に、*P. putida* IF-3 株のハロペルオキシダーゼ配列¹¹⁾ をもとにして作製した下記の PCR プライマーを用いて、ハロペルオキシダーゼがコードされる DNA フラグメントを PCR で増幅した。PCR は、DNA ポリメラーゼ KODplus (東洋紡社製) を用いて、サプライヤーのマニュアルに従って実施した。

Primer 1: 5'-acaggagaccggaccatgagctacgtcac-3',

Primer 2: 5'-tcaactacgaatgaacgcgaccaaatccgc-3'

(2)ハロペルオキシダーゼの精製

増幅の確認は 2% (w/v) のアガロース電気泳動で行った。想定される長さ (約 0.9 kb) の DNA をアガロースゲルから切出し精製した (QIAquick Gel Extraction Kit, Qiagen 社製)。この精製 DNA を制限酵素 Hinc II 処理の pUC119 クローニン・グベクター (タカラバイオ社製) にライゲーション (Ligation High, 東洋紡社製) し、クローン化した。*P. putida* ATCC11172 株由来の DNA フラグメントが挿入されたプラスミドを pHPO11172 とした。このプラスミドを用いて、定法に従い、*E. coli* K-12 JM109 株を形質転換した。次いで、形質転換体を、100 µg/ml のアンピシリン (和光純薬社製) を含む 1 ml の LB 培地で培養後、pHPO11172 を定法により形質転換体から調製 (QIAprep Spin Miniprep Kit, Qiagen 社製) し、DNA 塩基配列を決定した。塩基配列は、以下の 2 種類のプライマー

Primer3 : 5'-ggaaacagctatgaccatgattac-3'

Primer4 : 5'-cgccagggttttcccagtcacgc-3'

を使用し、チェーンターミネーター法に基づく Big Dye Terminator Cycle Sequencing FS Ready Reaction Kit (PE アプライドバイオシステム社製) を用いてサイクルシーケンス反応に供し、ABI Prism 3700 DNA Analyzer (PE アプライドバイオシステム社製) を用いて解析することにより決定した。

クローン化された遺伝子からの機能発現を確認するために、pHO11172 で形質転換した *E. coli* K-12 JM109 株を培養した (30°C)。培養は 100 µg/ml のアンピシリン (和光純薬

社製)を含む 1.6 L の LB 培地で行い、対数増殖期に達したところで、IPTG を終濃度 0.2 mM となるように添加し、引き続き培養した (30°C, 16 hr)。培養終了後、遠心分離 (10,000 ×g, 15 min)により菌体を集菌し、BugBuster Protein Extraction Reagent (Novagen 社製)を用いて粗抽出液 (48 ml, 総蛋白質量 47.3 mg)を調製した。この粗抽出液を、5% (v/v)グリセロール、1 mM PMSF を含む 50 mM Tris-HCl (pH8.0) 緩衝液 (以下「THG 緩衝液」と記載)で 10 倍に希釈し、さらに、精密ろ過フィルター (セルロース系メンブレン・フィルター、孔径 0.8 μm、直径 47 mm、ミリポア社製)でろ過し、ろ液を THG 緩衝液で平衡化されたイオン交換カラム TSKgel DEAE-5PW (21.5 mm I. D. × 15 cm, 東ソー社製)に添加した (流速 5.0 ml/min)。平衡化緩衝で洗浄後、THG 緩衝液をベースにした、NaCl 濃度 0-500 mM NaCl のリニアグラジェントによりハロペルオキシダーゼを溶出させた。次いで、ハロペルオキシダーゼ活性画分を THG 緩衝液で平衡化された TSKgel G3000SW (21.5 mm I. D. × 30 cm, 東ソー社製)に添加し (流速 5.0 ml/min)、5 ml 毎に溶出液を分画した。各画分をブロモフェノールブルーの発色によるハロペルオキシダーゼ活性測定法により測定し (後述)、精製ハロペルオキシダーゼを取得した。

(3)ハロペルオキシダーゼ活性測定法

10 mM 酢酸ナトリウム緩衝液 (pH5.0) に、10 μmol の過酸化水素、20 μmol の KBr、1 μmol のフェノールレッドから構成される 1 ml の反応液を作製した。次いで、酵素液を 100 μl を反応液に添加し反応させた (37°C, 10 min)。ブロモフェノールブルーの青紫色は 595 nm の吸光度で定量した。

なお、遺伝子単離のスクリーニングの際は、反応液 100 μl を 96 穴プレートの各ウェルに添加し、酵素溶液を 2 μl 添加した評価した。

(4)ハロペルオキシダーゼ遺伝子群へのカセット PCR の適用

ある酵素ファミリーをコードする遺伝子群にカセット PCR を適用し、多くのハイブリッド酵素遺伝子を作製するためには、その酵素ファミリーのアミノ酸配列中に、良く保存された領域が少なくとも 2 つ存在しなければならない。*P. putida* ATCC11172 株由来のハロペルオキシダーゼを含む non-metal 型ハロペルオキシダーゼファミリーに保存されたアミノ酸配列を特定するために、種々の non-metal 型ハロペルオキシダーゼの遺伝子配列 (NCBI アクセション番号:G83304、AF361470、F98143F、AF41633、B95986、AD2986、AE007908、AG3207、JN0828、A55211、AL591790、AF31153、AE012324、AE010765、AE11839、F95848、AF2982、AF335493、AF3167、S59929、S27614、H69838、H97230)

から予測されたアミノ酸配列をアライメントし、アミノ酸配列が良く保存された領域を同定した。その結果、N-末端の保存配列として FHHGWP が、C-末端側の保存配列として DDQIVP が同定された。

N-末端と C-末端側の保存配列をコードする塩基配列を境界として、ハロペルオキシダーゼ遺伝子を3つ部分に分けた。すなわち、遺伝子の5'側のフラグメント(以下、「5-arm」)、3'側のフラグメント(以下、「3-arm」)および、arm間のセントラル・フラグメントである。5-armの3'末端塩基配列とセントラル・フラグメントの5'末端塩基配列は、ともにN-末端の保存配列(FHHGWP)をコードする配列であり、同一である。また、セントラル・フラグメントの3'末端塩基配列と3-armの5'末端配列とは、ともにC-末端の保存配列(DDQIVP)をコードする配列であり、同一である。これら3つのフラグメントを混合してPCRを行うことにより、ハロペルオキシダーゼ遺伝子の全長を得ることができる(図2-1)。

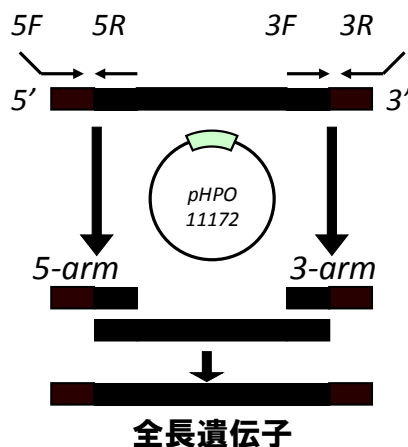


図 2-1. カセット PCR 法によるハロペルオキシダーゼ遺伝子作製

テンプレート遺伝子である pHPO11172 の5'末端から増幅させる 5F と保存領域を増幅させる 5R プライマーにより 5-arm を増幅した。全長遺伝子を作製するために 5F には pHPO11172 に挿入されている *P. putida* ATCC11172 株由来のハロペルオキシダーゼ遺伝子の5'末端側を増幅させる領域を設計した。同様に、3F と 3R プライマーを用いて、3-arm を増幅させた。各 arm 断片を調製した後、セントラル・フラグメントと保存領域部分でハイブリダイズさせるよう PCR を行い、最後に、5F と 3R により全長遺伝子を作製した。なお、第2節では、海水から調製したセントラル・フラグメントを用いて、カセット PCR を行った。

本節では、カセット PCR の予備検討として、3つのフラグメントそれぞれの PCR 増幅を、pHPO11172 をテンプレートとして行った。使用した DNA ポリメラーゼは KODplus (東洋紡社製) であり、PCR はサプライヤーのマニュアルに従って実施した。使用した

PCR プライマーは以下の通りである。なお、セントラル・フラグメント用のプライマーは、多様なセントラル・フラグメントを増幅させるために縮重プライマーを設計した。

(i)5-arm 用プライマー

5F: 5'-ggaaacagcatgattac-3'

5R: 5'-aactggatcacccggtgcatc-3'

(ii)セントラル・フラグメント用プライマー (下線部：縮重)

2CF: 5'-gatgcaccggtgatccacttycaycatggntggcc-3'

2CF2: 5'-gatgcaccggtgatccacttycaycatgggtggcc-3'

2CR: 5'-caccgccgagttttcatanggnacdatygrtrtc-3'

2CR2: 5'-caccgccgagttttcatasggnacdatygrtrtc-3'

2CR3: 5'-caccgccgagttttcatasggsacdatygrtrtc-3'

(iii)3-arm 用プライマー

3F: 5'-ttcaccgaagacctcaaaggcataaac-3'

3R: 5'-cgccagggttttccagtcacgac-3'

5-arm、セントラル・フラグメント、3-arm を PCR 増幅後、これら 3 種類の DNA 断片を混合し、PCR プライマーとして 5F および 3R プライマーを加え、さらに DNA ポリメラーゼ KODplus を用いて、全長遺伝子を PCR 増幅した。反応液組成および PCR 条件は以下の通りである。

(i) 全長遺伝子作製 PCR 反応液 (液量 50 μ l)

KODplus	1.0 unit
PCR 反応液 (10 \times)	5 μ l
25 mM MgSO ₄	4 μ l
2 mM dNTP	5 μ l
100 pmol/ μ l 5F primer	1 μ l
100 pmol/ μ l 3R primer	1 μ l
セントラル・フラグメント	100 ng

5-arm フラグメント	5 ng
3-arm フラグメント	5 ng
純水	適量

(ii) PCR 反応

反応は 94℃、4 分の熱変性後、94℃で 15 秒、52℃で 30 秒、68℃で 1 分を 1 サイクルとし、これを 25 サイクル行い、最後に 68℃で 10 分間反応させた。

2.1.3 結果

(1)ハロペルオキシダーゼ遺伝子のクローニング

P. putida ATCC11172 株からゲノム DNA を調製し、ハロペルオキシダーゼ遺伝子を pUC119 にクローニングした。DNA 塩基配列およびアミノ酸配列を図 2-2 に示した。配列解析の結果、ハロペルオキシダーゼ遺伝子は 276 個のアミノ酸から構成されるタンパク質をコードし、細菌型の non-metal ハロペルオキシダーゼに特有なグリシン・セリンモチーフ (Gly-X-Ser-X-Gly : 95 番グリシンから 99 番目グリシン間) および活性部位を構成するセリン (97 番)、アスパラギン酸 (227 番)、ヒスチジン (256 番) の 3 アミノ酸²⁴⁾の存在を確認することができた。また、これらの DNA 塩基配列は報告されている *P. putida* IF-3 株のそれと 87%同一であった。

性画分.

ブロモフェノールブルー法¹¹⁾で精製酵素の活性を測定 (37°C, 10 min) したところ、フェノール・レッドは pH5.0 の酸性下では、黄色を呈するが KBr 由来の Br が導入されるとブロモフェノールブルーに変化し、青紫色を示した。図 2-4 に、96 穴プレートの一部を用いて、基質であるフェノールレッド量を変えたブロモフェノールブルーの生成変化を示した図を載せた。

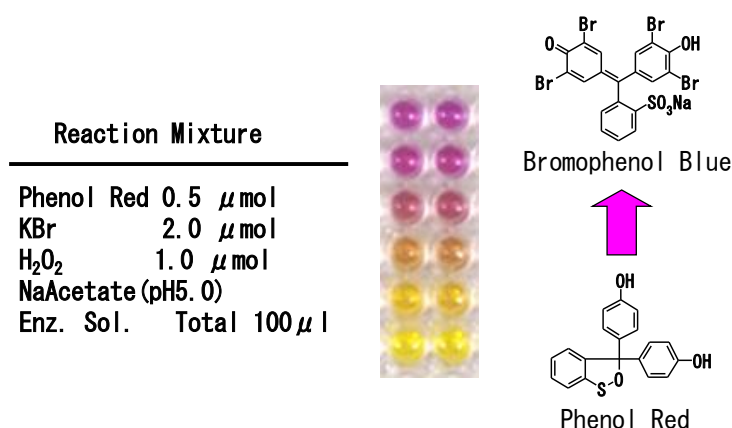


図 2-4. 精製画分の酵素活性評価

ブロモフェノールブルー法による、ハロペルオキシダーゼ反応における基質濃度の依存性を評価するために、フェノールレッドの添加量を任意に変えて反応させた結果を示した。下段は、フェノールレッドを無添加区とし、上段は 0.5 μ mol 添加した際の反応結果 (37°C, 10 min)。

(3)カセット PCR 用 DNA フラグメントおよび全長遺伝子の作製

カセット PCR 法を用いて多様なハロペルオキシダーゼ遺伝子をクローン化するための PCR プライマーを設計し、PCR 条件を設定した。この設定された条件でカセット PCR 法を適用することで、実際に全長ハロペルオキシダーゼ遺伝子を取得できるかを確認するために、pHO11172 DNA を鋳型として 3 つのフラグメントを PCR 増幅した。そして、この 3 つのフラグメントを混合し、ハロペルオキシダーゼの全長遺伝子を作製した。2%アガロースの電気泳動により、想定通りの約 1.0 kb の長さの DNA が増幅された。この DNA 断片を、pUC119 にクローン化し、大腸菌に導入した。この形質転換体を培養後、前項と同じようにハロペルオキシダーゼ を精製し活性を測定したところ、フェノール・レッドをブロモフェノールブルーに変換する活性を確認することができた。この結果から、カセット PCR によって、ハロペルオキシダーゼ遺伝子を再構築できると結論した。

2.1.4 考察

本研究では、*P. putida* ATCC11172 株の non-metal 型ハロペルオキシダーゼ遺伝子を先ず単離した。次に、この遺伝子の塩基配列から予測されたアミノ酸配列と既知の non-metal 型ハロペルオキシダーゼのアミノ酸配列をアライメントすることにより、non-metal 型ハロペルオキシダーゼファミリーで保存されているアミノ酸配列を 2 領域で特定した。そして、この 2 領域をコードする塩基配列を境界としてハロペルオキシダーゼ遺伝子を 3 つの領域 (5-arm、セントラル・フラグメント・3-arm) に分けて増幅する縮重 PCR プライマーを設計した。ここで設計した縮重 PCR プライマーを用いたカセット PCR によって全長ハロペルオキシダーゼ遺伝子が再構築できることを確認するために、*P. putida* ATCC11172 株の non-metal 型ハロペルオキシダーゼ遺伝子を鋳型に、5-arm、セントラル・フラグメント、3-arm を PCR 増幅した。そして、これら 3 種類の DNA フラグメントを混合し、全長遺伝子を増幅させるための PCR を行ったところ、想定通りの長さの DNA フラグメントを取得することができた。この DNA フラグメントをプラスミドに挿入し大腸菌を形質転換したところ、この形質転換体はハロペルオキシダーゼを発現した。すなわち、多様なハロペルオキシダーゼ遺伝子の取得を目指して設計した縮重カセット PCR 法は有効であり、この方法を利用すれば、自然界から新規なハロペルオキシダーゼ遺伝子を単離できることが強く示唆された。

第 2 節 海洋性細菌のハロペルオキシダーゼ遺伝子の単離

2.2.1 緒言

海洋性生物由来のハロゲン化合物が数多く報告されていることから、様々な生物が生体内でハロゲン化合物を生合成していると考えられる。本節では、生物のなかでも多様性がある海洋性細菌に的を絞り、カセット PCR を用いた新規ハロペルオキシダーゼ遺伝子を単離・解析した結果について述べる。

2.2.2 実験材料および方法

(1)海洋性細菌ゲノム DNA の調製

釜石湾（岩手県）から採取した海水（20 L）を、フィルターろ過（GV type : 1 μm 孔, 直径 47 mm, ミリポア社製）し、夾雑物・微細藻類等を取り除いた後、再度、ろ液をろ過（GV type : 0.22 μm 孔, 直径 47 mm, ミリポア社製）することにより、海水中の細菌を選択的に濃縮した。このろ過フィルター1枚あたりに、5 ml の 10 mM Tris-HCl 緩衝液（pH8.0 : 1 mM EDTA, 0.35 M sucrose）および 10 mg/ml のプロテイナーゼ K [Tris-HCl 緩衝液（pH8.0）に溶解] 200 μl を加え、37°C で 30 分間インキュベートした。沈殿物を、上述 0.22 μm 孔のフィルターで除いた後に、lysing solution [100 mM Tris-HCl 緩衝液（pH8.0）: 0.3 M NaCl, 20 mM EDTA, 2% (w/v) SDS] 7.5 ml を加え激しく攪拌した。さらに 10 ml の phenol : chloroform : isoamyl alcohol （50 : 49 : 1）を加えた。5 分後、遠心分離（3,000 $\times g$, 15 min）を行い、上層（DNA 溶解層）を回収した。これを 3 回繰り返して、DNA 溶液を調製した。次いで、2 倍量の 99% (v/v) ethanol を添加・攪拌後、冷却（-80°C, 2 hr）した。遠心分離操作（10,000 $\times g$, 15 min）により DNA を沈殿させ、冷却 70% (v/v) ethanol を加え、さらに遠心分離（10,000 $\times g$, 15 min）を行い精製した。

(2)ハロペルオキシダーゼ活性を示す形質転換体のスクリーニング

第 1 節に記載した縮重 PCR プライマーを用いて、海洋性細菌から調製した DNA を鋳型にハロペルオキシダーゼ遺伝子のセントラル・フラグメントを増幅した。この後、第 1 節に記載した 5F および 3R プライマーを用いて全長遺伝子を増幅し、PCR 産物を精製した後に、制限酵素 BamHI および HindIII で処理した。この DNA 断片を、同様に処理した pUC119 にライゲーション（Ligation High）し、*E. coli* K-12 JM109 を形質転換した。

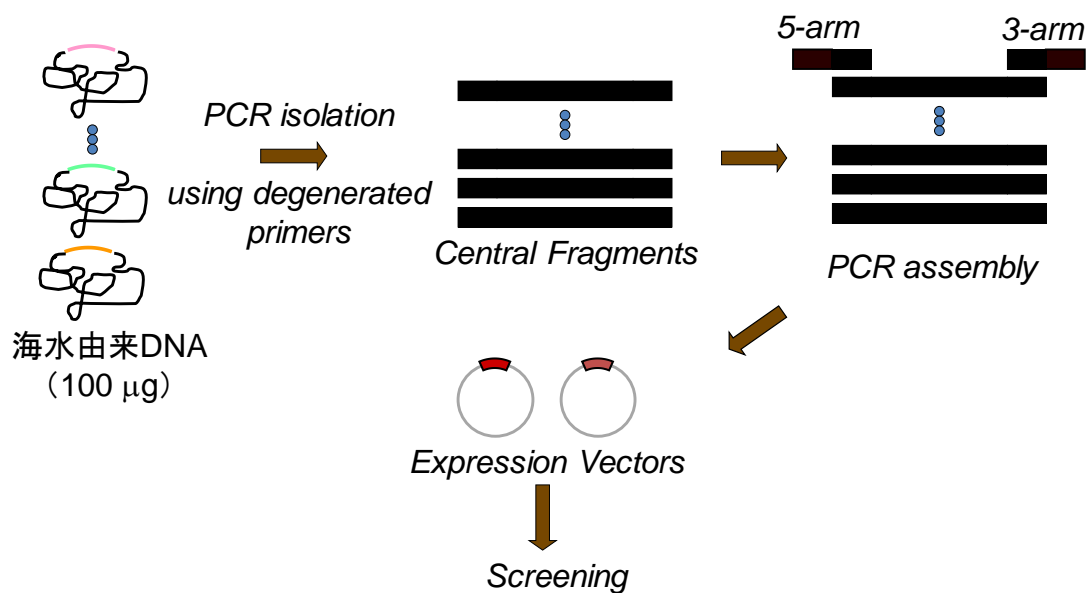


図 2-5.ハイブリッド・ハロペルオキシダーゼ遺伝子の作製法

海水から調製した DNA をテンプレートにセントラル・フラグメントを増幅調製した後、カセット PCR 法により全長遺伝子を作製し pUC119 に挿入した。

100 $\mu\text{g/ml}$ のアンピシリンを含む LB プレート上に出現した *E. coli* K-12 JM109 株コロニーをランダムに 600 個選抜し、100 $\mu\text{g/ml}$ のアンピシリンを含む 2.0 ml の LB 培地にそれぞれ接種・培養した (30°C)。対数増殖期に達したところで、IPTG を終濃度 0.2 mM となるように添加し、引き続き培養した (30°C, 16 hr)。培養終了後、遠心分離 (10,000 $\times g$; 15 min) により集菌し、BugBuster Protein Extraction Reagent (Novagen 社製) により粗抽出液 (各 100 μl) を調製した。また、ハロペルオキシダーゼ活性を測定するために、0.5 mM の酢酸ナトリウム緩衝液 (pH5.0)、1 μmol の過酸化水素、2 μmol の NaBr、1 M のフェノールレッドからなる反応液を調製し、酵素抽出液にそれぞれ 2 μl 添加し、酵素活性の有無を評価した。

(3) セントラル・フラグメントの遺伝子解析

ハロペルオキシダーゼの活性を確認できた大腸菌クローンからプラスミドを定法により調製し、セントラル・フラグメントの DNA 塩基配列を決定した。塩基配列の決定は、第 1 節に記載した方法で行った。

2.2.3 結果

(1) 海洋性細菌ゲノム DNA の調製

乾燥 DNA を TE 緩衝液に溶解させ、20 L の海水から、微生物由来と考えられる DNA が約 100 μg 得られた。

(2) 新規ハロペルオキシダーゼ遺伝子のスクリーニング

海水から調製した DNA をテンプレートに、縮重 PCR プライマーを用いてセントラル・フラグメントを増幅させたところ、図 2-6 に示した通り、想定する長さの DNA バンド (約 0.6 kb) を確認することができた。

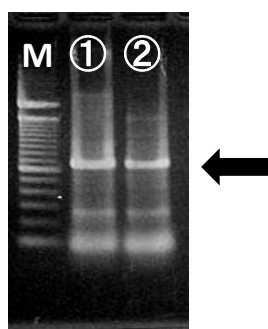


図 2-6. セントラル・フラグメントの増幅

M: 100 bp DNA ladder (NEB 社製)、①および②は増幅 DNA サンプル.

セントラル・フラグメントの増幅を確認することができたことから、カセット PCR の 5-arm および 3-arm の DNA フラグメントを使用して、ハロペルオキシダーゼ全長遺伝子の増幅を行った。図 2-7 の通り、想定するサイズ (約 1 kb) の DNA バンドの増幅を確認することができた。

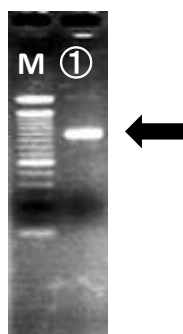


図 2-7. 全長遺伝子の増幅

M: 1 kbp DNA ladder (NEB 社製)、①は増幅 DNA サンプル.

増幅させた全長遺伝子を pUC119 に挿入し、第 1 節に記載した方法により *E. coli* K-12 JM109 株を形質転換し、アンピシリンを含む LB 寒天プレートに播種した。培養後、任意のコロニーを釣菌し、96 穴プレートに接種した。培養後、遠心分離により上清を取り除き、菌体から粗酵素抽出液を調製した。

粗酵素抽出液を、ブロモフェノールブルーを用いたハロゲン化反応を指標に 96 穴プレートを用いてスクリーニングを行ったところ、600 ウェルのうち 113 ウェルに、ハロペルオキシダーゼ活性によるブロモフェノールブルー（フェノールレッドのブロモ化）の青紫色を確認することができた。ブロモフェノールブルーの生成を、595 nm の吸光度で確認した結果の一部を図 2-8 に示した。図 2-8 に示す通り有意なブロモフェノールブルーの生成を確認することができた。

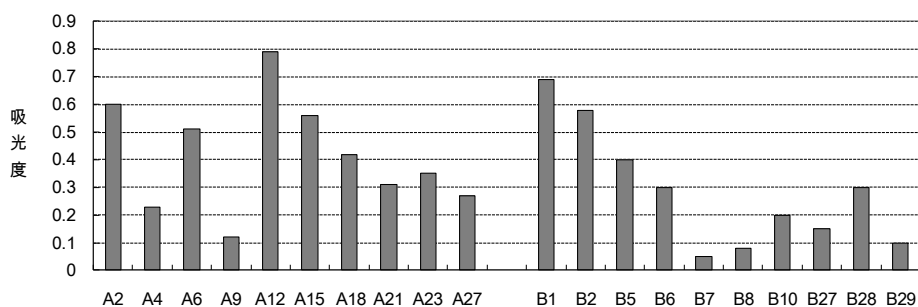


図 2-8. スクリーニング結果

縦軸：ブロモフェノールブルーへの生成量を示す 595 nm における吸光度。横軸は任意のクローン名。

(3) セントラル・フラグメントの配列解析

第 1 節に記載した方法により、セントラル・フラグメントの塩基配列解析を行い、そこから予想されたアミノ酸配列を決定した。113 の陽性クローンを解析したところ、同一の遺伝子をコードしていたクローンもあったが、新規な遺伝子を 18 種類取得することができた。結果を図 2-9 に示した。図中、クローン名ハロペルオキシダーゼ_A2 と A23、ハロペルオキシダーゼ_B1 と B6 は同一のアミノ酸配列をコードしていた。

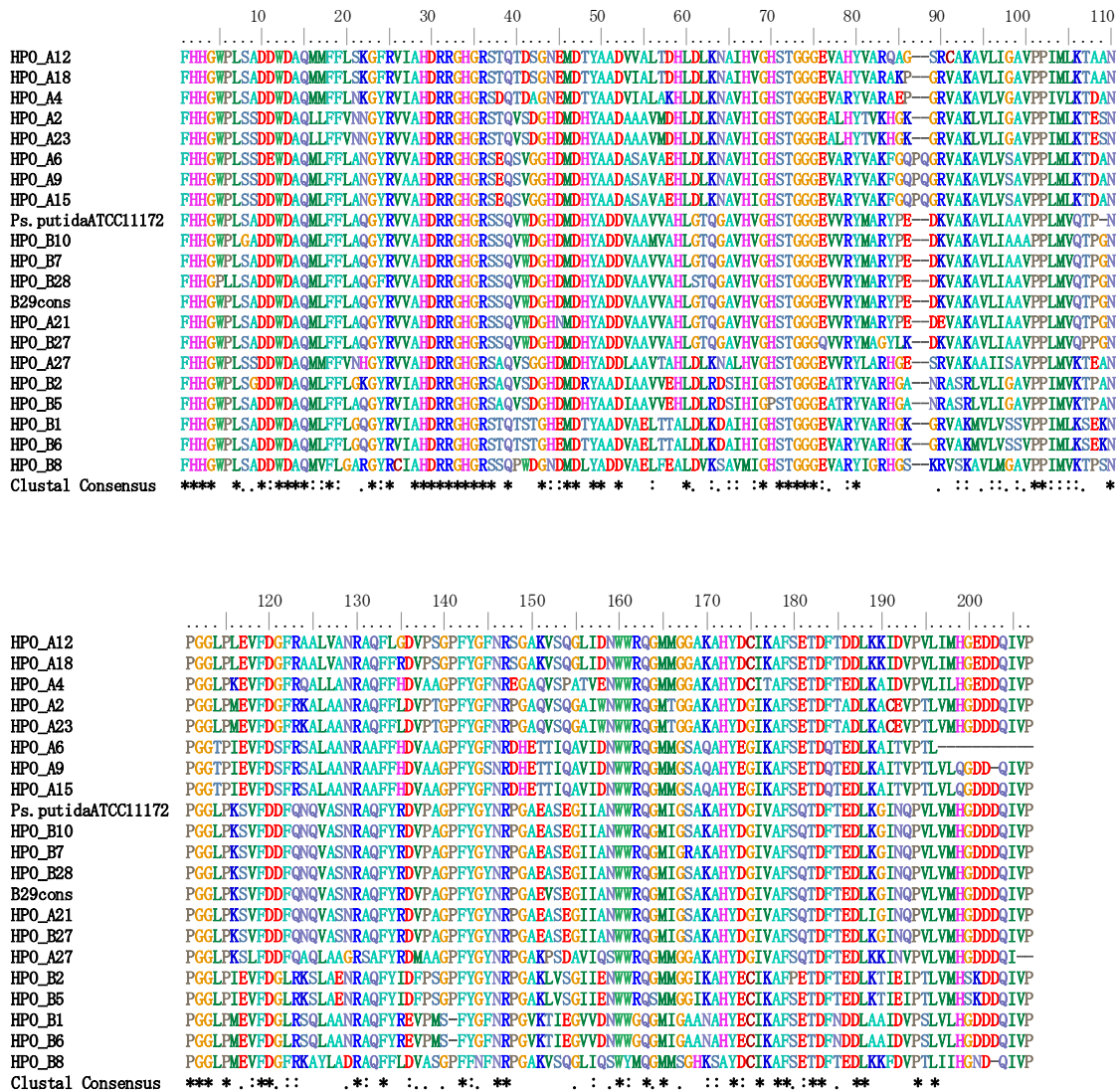


図 2-9. 単離セントラル・フラグメントのアミノ酸配列比較

左側のハロペルオキシダーゼ_A2 等の標記は単離クローン名。また、それぞれ下段の「*」は同一のアミノ酸、「:」は類似特性を有するアミノ酸を示す。

図 2-9 で得られたアミノ酸配列を、既知のハロペルオキシダーゼのアミノ酸配列と比較した。配列比較はアライメントソフト Clustal_W (<http://clustalw. Genome. ad. jp>) を用いて行った。既知のハロペルオキシダーゼのアミノ酸配列は米国 NCBI の Blast 検索を行うことにより得た。配列比較の結果を図 2-10 に示した。

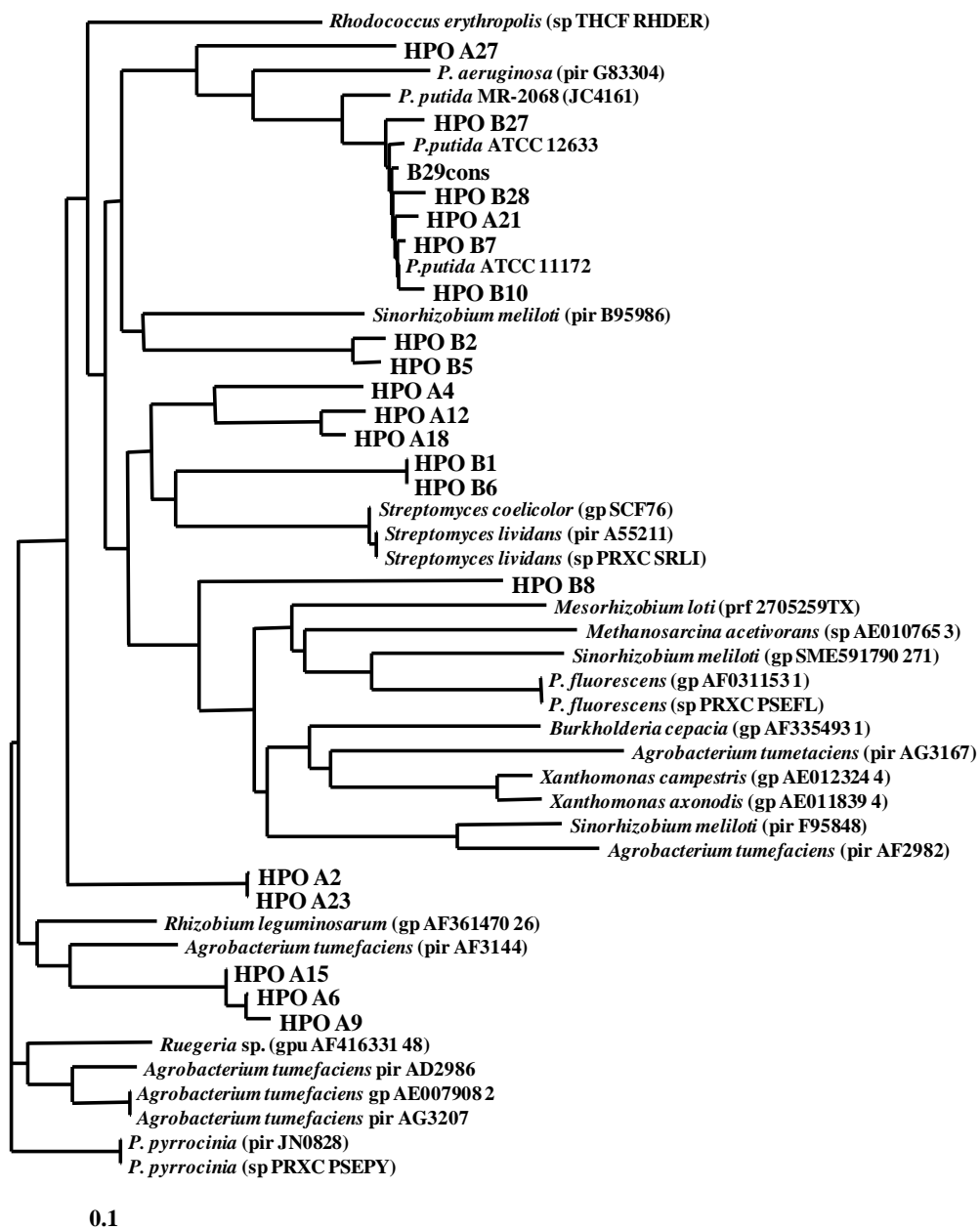


図 2-10. 配列比較

18 種類のアミノ酸配列を比較すると、図 2-10 の上段部分に分類される *Pseudomonas* 属細菌由来のハロペルオキシダーゼ、中段の *Streptomyces* 属細菌由来のハロペルオキシダーゼ、下段の *Agrobacterium* 属細菌に大きく大別することができた。

2.2.4 考察

海水から、夾雑物質を除去し、その後精密ろ過法により微生物を単離した。約 20 L の海水から 100 µg の DNA を調製する事に成功し、海水中に存在する微生物から簡便に DNA を調製することを証明できたと考えている。

構築したハロペルオキシダーゼのセントラル・フラグメントを単離するために設計した、ハロペルオキシダーゼ保存領域を含む縮重プライマーにより海水 DNA を鋳型にし、想定されるサイズの DNA を増幅することができた。増幅 DNA の塩基配列を解析していないが、ほとんどの DNA はハロペルオキシダーゼ由来の遺伝子であると考えられる。海水由来のセントラル・フラグメントを解析するために、第 1 節で構築したハロペルオキシダーゼのカセット PCR 法により完全長遺伝子を作製した。第 1 節の結果通り、ハロペルオキシダーゼ由来と考えられるセントラル・フラグメントと *P. putida* ATCC11172 株から作製した 5-arm と 3-arm 断片のハイブリッドにより、これも想定されるサイズの DNA を増幅することができた。完全長の DNA を pUC119 ベクターに挿入し、大腸菌に形質転換した。その後、粗酵素液を調製し、ブロモフェノールブロモ法によるスクリーニングに供したところ、高頻度で陽性クローンを得ることができた。約 10 分間の呈色スクリーニングであり、600 個の形質転換体のスクリーニングも簡便に行うことができた。

約 600 個のクローンのうち、18 種類のハロペルオキシダーゼ遺伝子セントラル・フラグメントを同定することができた。同定されたアミノ酸配列を比較すると、カセット PCR 構築時に利用した *P. putida* が属する *Pseudomonas* 属タイプのハロペルオキシダーゼ、*Streptomyces* 属タイプのハロペルオキシダーゼ、*Agrobacterium* 属タイプのハロペルオキシダーゼに大別することができた。カセット PCR を用いることにより、類似性の高いアミノ酸配列の同定が可能であることを示すことができた。本研究の目的である、自然界の DNA を利用して産業利用する観点においては、目的酵素の遺伝子と類似性の高い遺伝子の方が、有用性が高いと考えている。大きく異なる遺伝子の場合は、例えば、DNA ショッピングにおいても遺伝子間のハイブリダイズが起こらず、結果として酵素活性を有する完全長遺伝子を作製する事ができないからである。

Okuta らのカセット PCR 法の報告は¹⁾、自然界から調製した細菌を集積培養した後に、カセット PCR 法により catechol 2, 3-dioxygenase を単離した研究である。これに対して本研究は、海水から調製した DNA から直接的に遺伝子の単離を試みた手法に係わるもの

である。集積培養の有無に係わらず、カセット PCR 法の有用性を示すことができた。

第3節 要約・総括

タンパク質の改良を行うためには、立体構造を基にして変異すべきアミノ酸残基を同定し、部位特異的突然変異導入法によって目的とするタンパク質を取得すれば良いという大きな誤解が存在している。この **rational protein design** という方法を用いたタンパク質改良については、既に多くの成功例が報告されているが、世に現れない失敗例も数多くあることは個人的経験も含めて事実である。タンパク質工学のこの弱点には多くの理由がある。まず、コンピュータによる立体構造予測の技術は日進月歩であるが、例えば、酵素反応での各段階でのタンパク質原子の位置・移動を、基質特異性を判定できるレベルで決めることなどは遠い将来の課題である。すなわち、タンパク質工学が現在できることは、「アミノ酸置換をすれば何か起こりそうな部位を見つける」ことくらいで、あとは実際に置換してみても結果を見るというのが現状である。よって、思わぬ変異効果が現れ活性を損ねることも日常茶飯事なのである。また、タンパク質工学では、その方法論に起因するさまざまな制約から、活性部位付近のアミノ酸残基の置換効果のみをシミュレーションする場合が多い。活性部位付近のアミノ酸置換によってその部位の構造はデジタル的（例えばメチル基が挿入される）に変化する。そして、そのような粗い活性部位の変化によって、新たなあるいはより有益な機能がもたらされるチャンスはそれほど多くないと思われる。

本研究では、**rational protein design** ではアミノ酸置換の効果をほとんど予測できないという立場に立ち、産業的に有用なハロゲン化反応を触媒するハロペルオキシダーゼ酵素の改良を念頭において、進化工学の出発材料となる多様なハロペルオキシダーゼ酵素配列を収集することを目指した。

その結果、従来、報告例が限られていた同酵素の遺伝子に対して 18 個の新規な遺伝子の部分配列の同定に成功し、かつ、その部分配列と *P. putida* ATCC11172 株のハロペルオキシダーゼ遺伝子とのハイブリッド遺伝子は、活性を持つ酵素を合成できることを示した。酵素の改良には、依然として、自然界に存在する遺伝子を組み合わせやランダムに変異を導入する事が有用であると考えら、その意味で、この様にして得られた、多様な遺伝子群を利用することにより、さらに、有用性の高い酵素を創製できると考えられる。

第3章 *Paracoccus* 属細菌のカロテノイド生産性の改良

第1節 *Paracoccus* 属細菌のカロテノイド生産性評価

3.1.1 緒言

カロテノイドを生合成する微生物は多岐にわたり、カビ、細菌、藻類においてカロテノイド生産性を有するものが単離・同定され^{25,26)}、さらに、遺伝子レベルでの解析を終えた株も数多く報告されている^{19, 20)}。その中でも、真核生物である緑藻の *Haematococcus pluvialis*¹⁴⁾ や酵母の *Phaffia rhodzyma*^{15,16)} によるアスタキサンチン (図 3-1) 生産が注目されている。カロテノイドの中でも、アスタキサンチンは高い抗酸化作用の特性から、食品添加物や健康食品素材に利用されている。また、近年では、養殖魚の色揚げ剤としても利用され、その価値が高まっている。

実際 *Haematococcus* 藻に関しては、アスタキサンチンの生産技術が確立され、健康食品素材などに利用され、実用化にまで至っている。しかしながら、藻類の場合は培養時に光が必要なことや、カロテノイドとクロロフィルの分離が難しいなど技術的な課題が依然として残されている。また酵母については細胞壁が硬く、カロテノイドを抽出するためには細胞破壊が工程として必要であり、生産プロセスを煩雑にしている。

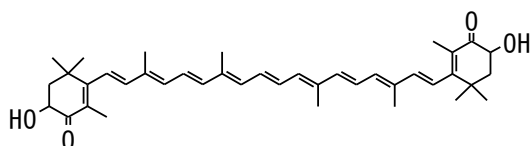


図 3-1. アスタキサンチンの化学構造

そこで、本研究では、増殖に光を要求しない従属栄養生物あり、かつ、カロテノイドを抽出し易い細胞構造の単純な細菌類によるキサントフィル類の生産を目指した。

キサントフィル類を生合成する細菌として *Paracoccus* 属に属する細菌が知られている。なかでも沖縄海域で発見された *Paracoccus* sp. N81106 株は機能性カロテノイドであるアスタキサンチンを最終生産物として生合成することが報告された^{18,27)}。また、*Paracoccus* 属細菌には、配糖体としてアスタキサンチンを生合成する株や、さらに、ゼアキサンチンを選択的に生合成する *P. zeaxanthinifaciens* などが報告されている¹⁷⁾。他にも、

Brevundimonas 属細菌や *Erythrobacter* 属細菌もキサントフィル類を生合成することが知られている²⁵⁾。

この様にキサントフィル類を生合成する細菌は比較的多く、発酵生産に適した細菌株も存在すると考えられた。本節では、発酵生産の技術構築における最初のステップとなるキサントフィル類生産微生物の評価結果について述べる。

3.1.2 実験材料および方法

(1)カロテノイド生合成細菌

カロテノイド生合成細菌は、(株)海洋バイオテクノロジー研究所の微生物保存機関 (MBIC) から分譲を受けて使用した。表 3-1 に、MBIC から分譲を受けた分譲株の一覧を示した。なお、MBIC はその活動を停止したので、他の微生物保存機関である NITE Biological Resource Center (NBRC) から入手可能なものについては、その保存菌株番号も付記した。表中のカロテノイド合成量は保存機関が報告した数値を記載した。

表 3-1. 分譲を受けたカロテノイド生合成細菌の一覧

MBIC番号 ¹⁾	分譲株	生産カロテノイド	生産性 (μg/l)
1143 (NBRC 101723)	<i>Paracoccus</i> sp. N81106	アスタキサンチン	340
3024	<i>Paracoccus</i> sp. PC1	アスタキサンチン カンタキサンチン	330
3966	<i>Paracoccus zeaxanthinifaciens</i>	ゼアキサンチン	—
3018 (NBRC 101024)	<i>Brevundimonas</i> sp. SD212	アスタキサンチン	560
3033	<i>Brevundimonas</i> sp. YH907	—	632
3035	<i>Erythrobacter</i> sp. PC4	ゼアキサンチン	363

注：表中の生産性は分譲機関が公表した数値を記載した。

(2)カロテノイド生合成細菌の培養

分譲細菌を、分譲機関のマニュアルに従って復元した。復元されたカロテノイド生合成細菌を、表 3-2 の成分組成の培地 (以下、OEG 培地と略記する) を用いて 25°C にて培養した。無機塩およびグルコースは和光純薬社製特級試薬を用いた。トリプチケースペプトン

および酵母エキスは、ベクトンディッキンソン社製を用いた。

アスタキサンチン生合成は溶存酸素濃度に影響されることから、形態が同一の 100 ml 容量のバッフル付フラスコ（イワキ硝子社製）に統一し、60 ml の OEG 培地を添加後、180 rpm のレシプロ型振とう装置(BR-3000、タイテック社製)を用いて培養した。

以下、断りがない限り本条件において培養を行った。

表 3-2. OEG 培地の組成

培地成分	重量/濃度
リン酸2カリウム	3.6 g
リン酸1カリウム	1.4 g
塩化ナトリウム	8.8 g
硫酸マグネシウム・7水和物	0.73 g
トリプトチケースペプトン	2 g
酵母エキス	1 g
塩化カルシウム	0.6 mM
硫酸第一鉄・7水和物	0.1 mM
グルコース	10 g

※1 literあたりの培地組成

(3)カロテノイドの抽出および定量

カロテノイド生合成細菌の培養液各 1.0 ml をそれぞれ 1.5 ml のエッペンドルフ・チューブに添加し、遠心分離(10,000 ×g, 5 min)により菌体ペレットを調製した。これに、純水 20 µl を添加・懸濁し、次いで、200 µl のジメチルフォルムアミドおよび 500 µl のアセトンを加え、10 分間の振とう後、カロテノイドを抽出した。この抽出液を遠心分離(10,000 ×g, 5 min)後、その上清をメンブラン・フィルター(マイシヨリ・ディスク 0.2 µm, 東ソー社製)に通して残渣を除去し、HPLC により抽出カロテノイドを定量した。HPLC 解析の条件は以下の通りである。

HPLC 条件

カラム：TSK gel ODS 80TM (4.6 mm I. D. × 7.5 cm、東ソー社製)

検出波長：470 nm 流速：1.0 ml/min

溶離液：A 液； 水：メチルアルコール=5：95

B 液； メチルアルコール：テトラヒドロフラン=70：30

溶出条件 0 - 5 min : A液 100%
5 - 10 min : B液 100%へのリニアグラジエント
10 - 15 min : B液 100%

温度 : 25℃

検出器 : UV-8011 (東ソー社製)

ポンプ : CCPM (東ソー社製)

カラムオープン : CO-8020 (東ソー社製)

検量線は下記の試薬を標準物質として用いて作成した。

- ・ アスタキサンチン ; 和光純薬社製 (品番 013-18661)
- ・ β -カロテン ; 和光純薬社製 (品番 032-17991)
- ・ ゼアキサンチン ; 和光純薬社製 (品番 514-24011)
- ・ カンタキサンチン ; 和光純薬社製 (品番 516-23851)
- ・ リコペン ; 和光純薬社製 (品番 125-04341)

溶離液はナカライテスク社製の HPLC グレードの溶媒を調製して使用した。

3.1.3 結果

(1)各種カロテノイド生合成細菌のカロテノイド生産性の評価

カロテノイド生合成細菌を、OEG 培地を用いて培養温度 25°C で培養した。培養液は黄色からオレンジ色を呈色し、5 日間の培養後、菌体から生産されたカロテノイドを有機溶媒により抽出し、総カロテノイド量を HPLC 法により定量した。結果を表 3-3 に示した。

表 3-3. 各種細菌のカロテノイド合成量

MBIC番号	分譲株	A ₆₆₀	総カロテノイド (µg/l)
1143	<i>Paracoccus</i> sp. N81106	7.6	4,085
3024	<i>Paracoccus</i> sp. PC1	5.7	1,543
3966	<i>Paracoccus zeaxanthinifaciens</i>	7.1	3,990
3018	<i>Brevundimonas</i> sp. SD212	5.9	1,742
3033	<i>Brevundimonas</i> sp. YH907	5.0	1,336
3035	<i>Erythrobacter</i> sp. PC4	2.8	1,408

表 3-3 の通り、分譲菌株は何れもカロテノイドを生産し、生合成量は約 1.3 mg/l から 4 mg/l であった。増殖については *Erythrobacter* sp. PC4 の増殖性が若干低いものの、概ね OEG 培地において良好であった。

カロテノイドの生産性を比較すると表 3-3 の通り、*Paracoccus* sp. N81106 株のカロテノイド合成量が他の株より高かった。また、カロテノイド生合成特性が異なるとされていた *P. zeaxanthinifaciens* については、報告通りゼアキササンチンを選択的に生合成していた。

(2)*Paracoccus* sp. N81106 株が蓄積するカロテノイドの組成分析

最も良好な生産性を示した *Paracoccus* sp. N81106 株のカロテノイド生合成特性を解析するために、HPLC 法により抽出カロテノイドの組成分析を行った (図 3-2)。

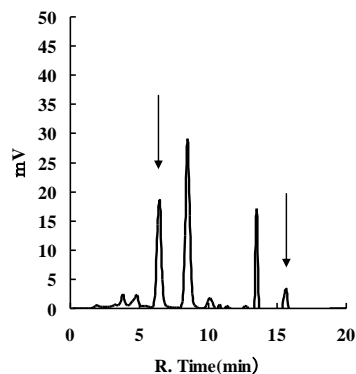


図 3-2. *Paracoccus* sp. N81106 株の蓄積するカロテノイドの組成分析

横軸がクロマトグラフィの保持時間、縦軸は 470 nm における吸光度を示す。リテンションタイム約 6 分のピークがアスタキサンチン、約 16 分のピークが β -カロテンであった (質量分析の結果)。これらのピークに挟まれる各ピークが β -カロテンからアスタキサンチンまでのゼアキサンチン、カンタキサンチン等の中間体である。

図 3-2 の結果から、*Paracoccus* sp. N81106 株は、報告通り、アスタキサンチンを最終生産物として各種カロテノイドを生合成することが確認できた。カロテノイド生合成量の定量結果は表 3-4 に示す通りであり、総カロテノイドに占めるアスタキサンチンの割合は約 30% であり、培養液あたり約 1 mg/l 生合成した。

表 3-4. *Paracoccus* sp. N81106 株のカロテノイド合成量

A ₆₆₀	アスタキサンチン (mg/l)	総カロテノイド (mg/l)
6.0	0.9	3.1

また、*Paracoccus* sp. N81106 株は、5 日間を越える、7 日目あるいは 9 日目の培養においても、 β -カロテンからのアスタキサンチンへの酸化反応が進まず、カンタキサンチン、ゼアキサンチンなどの機能性カロテノイドを含めた各種中間体が蓄積することが判明した。

3.1.4 考察

発酵生産法による機能性カロテノイドの技術を確立するために、微生物保存機関よりカロテノイド生合成細菌の分譲を受けた。具体的には (i) *Paracoccus* 属細菌、(ii)

Brevundimonas 属細菌、(iii) *Erythrobacter* 属細菌である。

何れの細菌も通常の微生物培養で利用される培地成分により良好に増殖し、各種カロテノイドを生合成した。カロテノイドの生合成は *Paracoccus* sp. N81106 株が最も高く、培養液あたり約 3 mg/l で、*Paracoccus* sp. N81106 株はアスタキサンチンを最終生産物として生合成した。*P. zeaxanthinifaciens* はゼアキサンチンを選択的に生合成し総カロテノイドに占めるゼアキサンチンの割合は 90%を超えていた。β-カロテンケト化酵素の活性が低く、ケト化が起き難くなっているものと考えられる。*Brevundimonas* 属細菌と *Erythrobacter* 属に属する細菌においては全般的にカロテノイドの生産性が低い結果であった。

Paracoccus sp. N81106 株は、沖縄海域の海水から分離された細菌¹⁸⁾であったため、培養には高い塩濃度を要求する可能性もあったが、高濃度の NaCl 等の塩が存在しなくとも生育・増殖できることを確認した。同細菌は、数日間の培養でカロテノイドを蓄積し、培養液は除々にオレンジ色を呈色した。

培養後、何れの細菌も遠心分離により菌体と培養上清に分離することができた。菌体ペレットは扱い易く、カロテノイド抽出は有機溶媒により簡便に行うことができた。カロテノイドの菌体中での分布・存在箇所は不明であるが、有機溶媒により効率よく抽出できることから細胞表層に蓄積しているものと考えられる。

Paracoccus 属は、取り扱い、抽出、培養などの一連の操作において簡便であり、藻類等に対してメリットがあると判断することができた。一方で、カロテノイドの生産性については改良の余地があることから、本研究では以降、*Paracoccus* sp. N81106 株を対象に改良研究を実施することとした。

第2節 変異育種法による *Paracoccus* 属細菌のカロテノイド生産性の改良

3.2.1 緒言

機能性物質を実用化するためには、培養液当たりの生産性を評価し、それを向上させることが求められる。生産性は菌体中の機能性物質の含量と培養液中の菌体密度で定義することができる。ここでいう菌体密度とは、通常のフラスコ培養程度の密度（例えば、660 nmでの濁度 A₆₆₀、において 10 前後）ではなく、発酵槽を用いて行われる高密度培養（例え

ば A₆₆₀ の濁度において数 100) における菌体量を指す。菌体の高密度化のためには、培養培地成分の添加量、添加タイミング、培養条件の精密制御等のエンジニアリング的要素の比重が大きい。本研究における生産性の改良は、上述の菌体密度の改良（すなわち培養の最適化）とは別のファクターであり、細菌のカロテノイド含量の改良に焦点をあてて取り組んだ。

第 1 節で述べた通り、*Paracoccus* sp. N81106 株は機能性カロテノイドであるアスタキサンチンを最終生産物として生合成することができ、また、工業的に実績のある培地成分で良好に増殖し、他の菌株より高い生産性でアスタキサンチンを生合成した（約 1 mg/l 培養液）。

しかしながら、実用化されている微細藻類では数 10 mg/l 培養液の生産性の報告があり、*Paracoccus* sp. N81106 株のアスタキサンチン生産性をさらに改良する必要があると考えられた。そこで、微生物の形質を変えるために一般的に用いられる突然変異誘起法を用いて、アスタキサンチンの生産性の改良研究を開始した。突然変異誘起法とは、突然変異誘起物質、紫外線、放射線などを用いて突然変異を誘導する方法であり、これらの処理によってゲノム遺伝子に突然変異を起こさせた後、求める形質を獲得した突然変異体を取得する方法である。この方法では、特定の遺伝子の特定の箇所に突然変異を起こさせることは困難であるが、従来から産業微生物の改良に広く用いられている方法であり有効であると考えられた。また、*Paracoccus* sp. N81106 株はカロテノイドを生産すると、プレート上のコロニーがオレンジ色を呈色することがわかっている。突然変異育種では、効率よいスクリーニング法の開発がポイントであり、コロニーの色調で突然変異の有無を識別することは非常に有利な特性である。すなわち、ランダムな突然変異処理にも対応することができると考えられることから、カロテノイド合成量の改良として採用し、突然変異育種処理の最適化から検討に着手した。

3.2.2 実験材料および方法

(1) 使用した細菌

突然変異育種対象の親株として、アスタキサンチンを最終生産物として生合成する *Paracoccus* sp. N81106 株を選択した。

(2) N-メチル-N'-ニトロ-N-ニトロソグアニジンによる突然変異処理

Paracoccus sp. N81106 株を 5 ml の OEG 培地を含む試験管に植菌し、25°C、18 時間

培養した。培養後、培養液 1 ml を 1.5 ml のエッペンドルフ・チューブに移し、10 分間の遠心分離操作により菌体を調製した。この菌体を 100 mM のリン酸カリウム緩衝液 (pH7.0) 1.0 ml に懸濁し、次いで、突然変異を導入するために 3 mg/ml の N-メチル-N'-ニトロ-N-ニトロソグアニジン (NTG ; 和光純薬社製) 水溶液 10 μ l を添加した。30 分間の静置後、遠心分離により上清を除去し、先の緩衝液を用いて菌体を再懸濁する操作を 3 回繰り返して NTG を除去した。最後に、0.5 ml のリン酸緩衝液に再懸濁し OEG 寒天培地に塗布した。

(3)突然変異株の培養・評価

第 1 節の方法に準じて実施した。すなわち、25°C、5 日間の OEG 寒天培地上での培養後、赤色の強いコロニーを選別し、前培養後、60 ml の OEG 液体培地を添加した 100 ml 容のバッフル付三角フラスコに接種し、5 日から 7 日間、フラスコ培養を実施しカロテノイド生産性が向上した突然変異株を取得した。次いで、取得した生産性向上株を親株として、再度突然変異を導入し、より生産性が向上した株の分離を行うというように、突然変異の導入と、生産性向上株のスクリーニングを繰り返し行った。

3.2.3 結果

(1)突然変異処理と一次スクリーニング

カロテノイド合成量および増殖性が良好な *Paracoccus* sp. N81106 株を親株として、NTG を用いた突然変異の導入を行った。NTG は、最も頻繁に用いられている突然変異誘起剤である。*Paracoccus* 属細菌は、30 μ g/ml の濃度の NTG に晒されると生存率が大幅に減少した (生存率 : 約 1/1000)。この致命的効果から、この濃度で十分な突然変異導入が起こると考えられたので、突然変異誘起は、終濃度 30 μ g /ml の NTG 処理 (30 min) により行った。

突然変異株の一次評価は、OEG 寒天プレート (直径約 10 cm) 上のコロニーの色調の変化を目視で判断することにより行った。具体的には、約 10^9 個の菌体を NTG により処理し、約 10^6 個の *Paracoccus* 属細菌が生存した条件下で、約 10^4 個のコロニーを評価した。これを 1 サイクルとして NTG 処理を繰り返した。シャーレ上では平均して 500 個のコロニーが出現するように調整してスプレッドした。コロニー間が密になると見かけ上色調が濃くなる現象が起こるため、コロニー間隔が均一となるようスプレッドした。

25°C の培養後、3 日目から目視でコロニーの出現を確認できた。その後、コロニーが大きくなるとともにカロテノイド合成に伴うコロニーの色調の変化が起こり始めた。プレート上のコロニーを注意深く観察し、濃い赤色を示すコロニーをそれぞれピックアップし、二次評価を実施した。

(2)突然変異株のカロテノイド合成量評価（二次スクリーニング）

二次評価は、液体培養で行った。β-カロテンからアスタキサンチンへの酸化反応は溶存酸素濃度に影響されるため、フラスコ形状、振とう速度および添加培地液量を同一条件としカロテノイド合成量を評価した。二次評価のためにピックアップした株の中には、液体培養では増殖しない株もあったが、約 1,000 株に数株の割合で親株に対して 2 倍程度生産性が向上した株を得ることができた。図 3-3 に、突然変異株の一部について、同一の親株から突然変異させた際の増殖性およびカロテノイド生産性を評価した結果を示した。親株の A₆₆₀ の吸光度は約 6、カロテノイド合成量は約 38 mg/l（培養液）であった。これに対して、NTG により突然変異を導入すると、ほとんどの突然変異株において増殖性が落ち、カロテノイド生産性も向上しなかったが、例外的に一部の株では生産性が向上した。

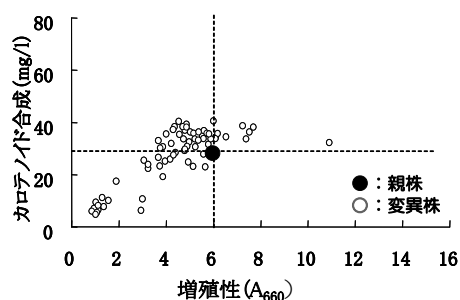


図 3-3. 突然変異株における増殖性とカロテノイド生産性

増殖性は培養 5 日目の A₆₆₀ における吸光度、カロテノイド合成は培養 5 日目の培養菌体中の総カロテノイドを示した。

変異導入とスクリーニングの手順を繰り返すことにより、すなわち、生産性向上株を次世代の突然変異株取得をするための親株とし、さらに、突然変異導入を繰り返すことにより、*Paracoccus* sp. N81106 株の生産性を段階的に向上させることができた。生産性が向上した代表的な株である NG5 株と NG9 株のカロテノイド生産性評価結果を表 3-5 に示した。

表 3-5. 突然変異株の増殖とカロテノイド生産性

Strain	OD ₆₆₀	Ax (mg/l)	TC (mg/l)	Ax/TC (%)
N81106	6	0.9	3.1	29.0
NG5	8.5	16	29	55.1
NG9	7	15	22	68.1

注) Ax / TC(%) : 培養 5 日の総カロテノイド (TC) に占めるアスタキサンチン (Ax) の割合.

親株である *Paracoccus* sp. N81106 株の総カロテノイドの合成量は培養液あたり約 3 mg/l、アスタキサンチンは約 1 mg/l であった。これに対して、NG5 株では、総カロテノイドにおいて約 8 倍、アスタキサンチンにおいて約 17 倍まで合成量が向上していた。

また、*Paracoccus* sp. N81106 株の培養 5 日目の A₆₆₀ における吸光度は約 6 であることから、NG5 株においては約 1.4 倍にまで増殖性を向上させることができた。

アスタキサンチンの合成量が最も高かった突然変異株である NG5 株が生合成したカロテノイドの組成を HPLC 法により分析した。結果を図 3-4 に示した。

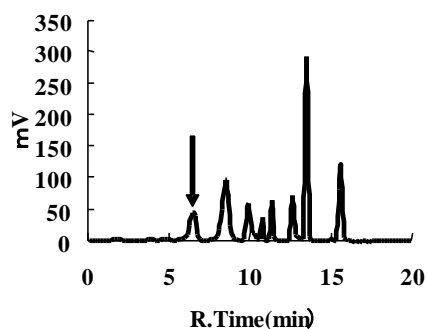


図 3-4. NG5 株が蓄積したカロテノイドの組成

5 日間の培養終了後、有機溶媒によりカロテノイドを抽出し、逆相クロマトグラフィにより分析した。図中、矢印がアスタキサンチンのピーク位置。

カロテノイド高生産株である NG5 株のカロテノイド組成は図 3-4 の通りであり、アスタキサンチンの生産性は大幅に向上したものの、依然として β -カロテンを含む様々な中間体が存在することがわかった。

3.2.4 考察

Paracoccus 属細菌のアスタキサンチン生産性を向上させるために、*Paracoccus* sp. N81106 株を親株として突然変異育種法による改良を行った。突然変異育種法は、微生物の改良に一般的に用いられる方法であり数多くの成功例がある。

突然変異誘起剤については様々な化合物で有効例が報告されている。本研究では、もっとも強力で、もっとも頻繁に用いられている突然変異誘起剤である NTG に絞って突然変異導入条件を検討した。*Paracoccus* 属細菌は、30 µg/ml の濃度の NTG 処理に 30 分間晒されることにより 99.9% が死滅し、この致命的効果から、この濃度で十分な変異導入が起こると考えられた。この処理条件で、約 1,000 株に数株の割合で親株に対して 2 倍程度生産性が向上した株を得ることができた。さらに、突然変異導入を繰り返すことにより、カロテノイド高生産株である NG5 株では、野生株である *Paracoccus* sp. N81106 株に対して約 17 倍までにアスタキサンチン合成量が向上した。

Phaffia 酵母や *Haematococcus* 藻において、アスタキサンチン含量を向上させることに成功したとの報告例がある。真核微生物では細胞中のオルガネラ等の構造により、アスタキサンチン等の脂溶性物質の蓄積が可能と考えられる。これに対して、単純な膜構造しか持たない細菌では数倍の生産性向上を望めない可能性もあったが、本研究において初めて、アスタキサンチン生産性向上を突然変異育種によって達成できることが示された。

アスタキサンチン高生産株である NG5 株の生産カロテノイドのパターンを分析すると、アスタキサンチンの含量は増加しているものの、依然として、β-カロテンからアスタキサンチンへの変換の際の代謝中間体が蓄積していた。β-カロテンからアスタキサンチンへの変換は、β-カロテンケト化酵素と β-カロテン水酸化酵素が担っている^{19,20)}。これらの酵素に係わる遺伝子あるいは調節遺伝子等に突然変異を導入することができれば、さらに、アスタキサンチンの合成量向上を果たすことができると考えられる²⁵⁻²⁷⁾。

第3節 遺伝子組換え法による *Paracoccus* 属細菌のカロテノイド生産性の改良

3.3.1 緒言

Paracoccus sp. N81106 株 に突然変異処理を施し、アスタキサンチンおよび総カロテノイドの合成能が大幅に改良されたカロテノイド高生産株を分離することができたが、アスタキサンチンに至るまでの β -カロテン等のカロテノイド中間体が依然として蓄積した。

Misawa らによって、*Paracoccus* sp. N81106 株におけるアスタキサンチンの生合成経路が遺伝子レベルで解析された¹⁹⁾。図 3-5 に *Paracoccus* sp. N81106 株のアスタキサンチン生合成経路を示した。

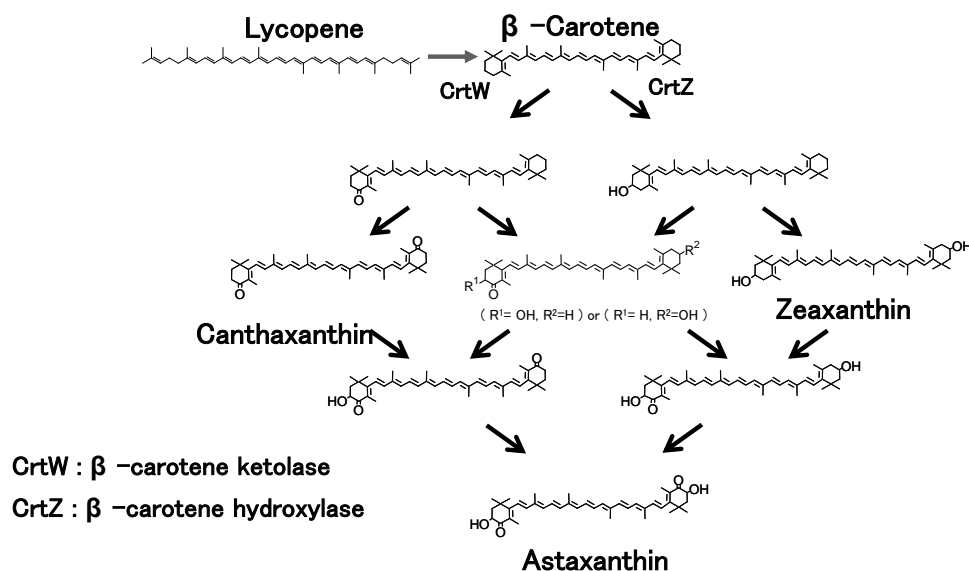


図 3-5. アスタキサンチン生合成経路

この生合成経路によれば、アスタキサンチン生合成の最終段階は β -カロテンの酸化反応である。カロテノイド高生産株である NG5 株のカロテノイド分析結果から、この株においてはイソプレノイド代謝が増加し、カロテノイド量を増加させることができたが、 β -カロテン以降の酸化反応活性が依然として不十分であるため、 β -カロテンなどの中間体が蓄積すると考えられた。

β -カロテン以降の酸化反応は二段階で、 β -カロテン水酸化酵素と β -カロテンケト化酵素によって触媒されている。これらの 2 つの酵素の酵素量を増加させることによって、 β -カロテンの酸化反応を高めることができ、アスタキサンチンの生産量の更なる増加が達成さ

れると予想された。

カロテノイド生合成遺伝子を利用したカロテノイド生合成系の改良は、非カロテノイド生合成細菌である *E. coli* の報告例がある^{19, 31)}。これらの研究では、上述のβ-カロテンの酸化酵素を含むカロテノイド生合成遺伝子群を導入し、大腸菌に各種カロテノイドを生合成させることに成功し、培養液あたり数 10 mg/l の生産性が報告されている。これは、*Paracoccus* sp. N81106 株由来のカロテノイド高生産株と同等の生産性であるが、フェーマンターによる高密度化培養による生産など実用化に向けた研究の報告はなく、非カロテノイド生合成細菌を宿主としたアスタキサンチン生産が実用化できるかは予測困難である。

前節において、*Paracoccus* sp. N81106 株由来の突然変異株は、高密度化培養が可能であることを示した。本節では、カロテノイドを高濃度に蓄積し、かつ高密度化培養も可能な *Paracoccus* sp. N81106 株を宿主とする遺伝子組換え技術を構築するとともに、*Paracoccus* sp. N81106 株および変異株のカロテノイド合成量を、さらに向上させた結果を述べる。

3.3.2 実験材料および方法

(1) 培地無機塩類等

培地は、前節に示したと同様に調製した。抗生物質類および IPTG は、タカラバイオ社製のものを使用した。

(2) 遺伝子導入法

① 抗生物質感受性試験

広宿主域ベクター pBBR1MCS2^{32, 33)} によって *Paracoccus* sp. N81106 株を形質転換する準備として、同細菌の抗生物質感受性試験を実施した。併せて、接合伝達のドナーとなる *E. coli* K-12 S17-1 株の感受性試験も行った。抗生物質は、carbenisillin、ampicillin、defazolin、fosfomycin、piperacillin、gentamicin、streptomycin、neomycin、amikacin、tetracycline、erythromycin、lincomycin、rifampicin、nalidixic acid、novobiocin を用いた。

② 遺伝子導入

広宿主域ベクターである pBBR1MCS2 を *E. coli* K-12 S17-1 株に保持させ、S17-1 株の保持するこの広宿主域ベクターを *Paracoccus* sp. N81106 株あるいは NG5 株に接合伝達によって導入した。pBBR1MCS2 の構造、配列をそれぞれ図 3-6、接合伝達の概略を図 3-7

フィルターを用いてろ過した。ろ過後、2種類のバクテリアをトラップしたメンブランを取り出し、OEG寒天培地上で接合伝達のための培養を実施した(25°C, 4 hr)。その後、細菌細胞をメンブランから剥ぎ取るため OEG 培地内で激しく攪拌した。このようにして得られた細胞懸濁液中の形質転換体 (transconjugants) 選択のため、50 µg/ml のカナマイシンと 15 µg/ml のアミカシン(図 3-8)を含む OEG 寒天培地にスプレッドし、25°C で培養した。カナマイシンは pBBR1MCS2 を持つ細胞を選抜し、アミカシンは *Paracoccus* を選抜する(後述)。

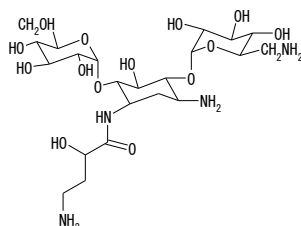


図 3-8. アミカシン(Amikacin)の化学構造

(3) カロテノイド生合成遺伝子発現プラスミドの作製

Paracoccus sp. N81106 株を OEG 培地で培養し(25°C, 3 日間)、ゲノム DNA を Qiagen 社製キット(Puregen Genomic DNA isolation kit)を使用して調製した(約 50 ng/ml)。*Paracoccus* sp. N81106 株のカロテノイド生合成遺伝子群を構成している遺伝子(*crtW*, *crtZ*, *crtY*, *crtI*, *crtB*, *crtE*)の塩基配列は公表されている。カロテノイド生合成遺伝子群と、そのオペロン構造をそれぞれ、表 3-6 および図 3-9 に示した。この塩基配列を基にして、各遺伝子を PCR 増幅するプライマーを設計した。*Paracoccus* sp. N81106 株の DNA をテンプレートにして、表 3-7 に示したプライマーを用いて PCR を行い、以下に示すカロテノイド生合成遺伝子を増幅し、さらにその PCR 産物を pBBR1MCS2 に導入した。

表 3-6. カロテノイド生合成遺伝子(AB206672)

番号	塩基配列番号	遺伝子名	酵素名
1	631-1713	<i>Idi</i>	IPP isomerase
2	1744-2742	<i>crtW</i>	β -carotene ketolase
3	2469-2957	<i>crtZ</i>	β -carotene hydroxylase
4	2954-4144	<i>crtY</i>	lycopene cyclase
5	4111-5616	<i>crtI</i>	phytoene desaturase
6	5613-6527	<i>crtB</i>	phytoene synthase
7	6524-7405	<i>crtE</i>	geranylgeranyldiphosphate synthase
8	7571-8818	<i>crtX</i>	carotenoid glucosyltransferase

※表中の塩基配列番号は、AB206672 のカロテノイド生成遺伝子に塩基配列番号に対応。

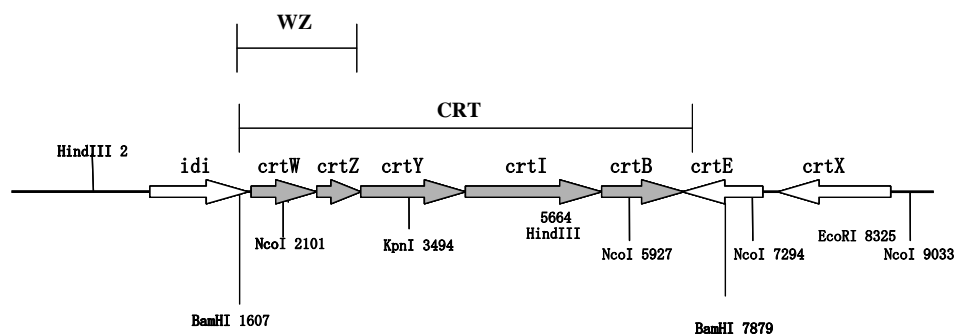


図 3-9. カロテノイド生成遺伝子群構造

WZ: β-カロテンケト化酵素遺伝子 *crtW* および β-カロテン水酸化酵素遺伝子 *crtZ* からなる遺伝子群。CRT: β-カロテンケト化酵素遺伝子 *crtW*、β-カロテン水酸化酵素遺伝子 *crtZ*、リコペンサイクラーゼ遺伝子 *crtY*、フィトエンデサチュラーゼ遺伝子 *crtI* およびフィトエン合成酵素遺伝子 *crtB* からなり、オペロンを構成する遺伝子群。

表 3-7. PCR プライマーの配列一覧表

配列番号	塩基配列	説明
1	5'-gcgatccggcgaccttgcggcgctg-3'	<i>crtW</i> 上流にプライミング
2	5'-cgggatccaggcgatcagcccgttgccaagg-3'	<i>crtZ</i> 下流にプライミング
3	5'-cgggatcctgtcgcggtccctgggg-3'	<i>crtB</i> 下流にプライミング
4	5'-taatacgactcactataggg-3'	シークエンス用プライマー

pBBR1MCS2WZ

Paracoccus sp. N81106 株のゲノム DNA をテンプレートにし、表 3-7 に示す配列番号 1 と配列番号 2 の PCR プライマーを用いて、β-カロテンケト化酵素遺伝子 *crtW* および β-カロテン水酸化酵素遺伝子 *crtZ* を含む領域を増幅した。PCR 反応の反応液組成を表 3-8 に示した。

表 3-8. PCR 反応液組成

テンプレートDNA	1 μl
2×High GC 緩衝液 (タカラバイオ社製)	25 μl
dNTP	5 μl
10 pmol/μl の配列番号1のプライマー	2 μl
10 pmol/μl の配列番号2のプライマー	2 μl
exTaqDNAポリメラーゼ (タカラバイオ社製)	0.5 μl

反応は、94°C・30秒の第1ステップ、次いで、60°C・30秒の第2ステップ、そしてポリメラーゼによる伸張反応の72°C・2分間の第3ステップを1サイクルとして30サイクル行った。

PCR 反応終了後、PCR 増幅された DNA を電気泳動にてサイズを確認後、アガロースゲルより抽出した。使用した2つのプライマーの5'末端には BamHI サイトがあるので、精製した DNA を制限酵素 BamHI で消化し、同じく BamHI で消化した pBBR1MCS2 のマルチクローニングサイトに挿入した。作製したプラスミドを pBBR1MCS2WZ とした。そのプラスミド構造を図 3-10 に示した。pBBR1MCS2WZ の塩基配列は表 3-1 配列番号 4 のプライマーを使用して確認した。

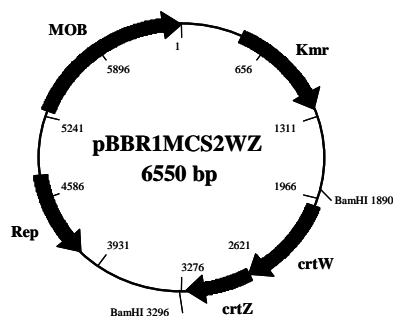


図 3-10. pBBR1MCS2WZ の構造

なお、配列番号 1 の PCR プライマーを使用することにより、下記の *crtWZ* オペロンのプロモータと推定できる TTGCT(-35)および GCCAATG(-10)配列を含む領域も併せて増幅できた (図 3-11)。

```

1 GGCGGCGCCGTTCCACGACTGGGGCATCCCCACGACCGCGTCTGCGCGCCATCGCGCC 60
61 GATGATGGGGCCCGaCCGGATTCTGGTTCGGGTCGGGCGGGGTGCGTCACGGACTGGACGC 120
121 CGCGCGGGCCATCCGCCTTGCGCGGACCTCGTGGGGCAGGCGGCCCGCGCTCTGCCCGC 180
181 CGCGCGCCACAGCGCCGAGGCCCTGTCCGATCACCTGTCCGACGTGGTGACCCAGCTGCG 240

⇒Cloning 5'end          TTGCT

241 CATCGCGATGTTCTGCACGgatcggcgaccttggcgctgcggcgccctttgct 300
    G(-35)          GCCAATG(-10)

301 ggtgctgggcccgggtggccaatggtcgcaagcaacgggatggaaccggcgatgcggg 360

```

⇒ crtW ORF

361 actgtagtctgcgcgatgccgggtccgggggacaagatgagcgcacatgcctgcceaa

図 3-11. β-カロテンケト化酵素遺伝子 *crtW* 上流に存在する推定プロモータ領域

小文字表記がクローニングした領域の上流部位. 市販の配列解析ソフト GENETYX を用いてプロモータ解析を行ったところ、プロモータ機能を有する可能性がある配列として番号 296 から 301 の ttgctg、318 から 324 の gccaatg が検出された。

pBBR1MCS2CRT

上述の *crtW*, *crtZ* の他に、β-カロテン合成に関わる 3 つの遺伝子、*crtY*, *crtI*, *crtB*, を挿入したプラスミドを、pBBR1MCS2WZ の作製と同様に、PCR により該当領域を増幅することにより行った。PCR プライマーは表 3-7 の配列番号 1 および 3 を使用して増幅した。プライマーの 5'末端には制限酵素 BamHI サイトがあり、pBBR1MCS2WZ 作製の場合と同様にして、PCR 増幅 DNA を BamHI にて切断し、BamHI で切断した pBBR1MCS2 に挿入した。作製した発現プラスミドを pBBR1MCS2CRT とした (図 3-12)。

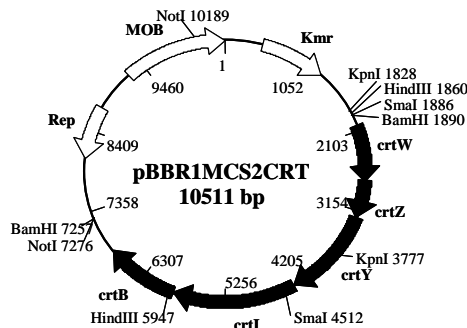


図 3-12. pBBR1MCS2CRT の構造

(4) 遺伝子組換え株の作製と培養・評価

作製した発現プラスミドを、接合伝達用の *E. coli* K-12 S17-1 株にエレクトロポレーション法により導入し、接合伝達法により *Paracoccus* sp. N81106 株および N81106 株由来の突然変異株 (NG5、NG9) に導入した。

メンブラン・フィルター上での接合伝達終了後、形質転換体選択のため、メンブランを OEG 培地内で激しく攪拌し、メンブランから剥がれ落ちた菌体を 50 μg/ml のカナマイシン、15 μg/ml のアミカシンを含む OEG 寒天培地にスプレッドし、25°C で培養した。プ

プレート上に現れた任意のコロニーをピックアップし、OEG 培地を用いて 25°C にて培養した。

3.3.3 結果

(1) 遺伝子導入

① 抗生物質感受性試験

Paracoccus 属細菌のカロテノイド生合成に関わる形質を変えるために、広宿主域ベクターである pBBR1MCS2 にカロテノイド生合成遺伝子を挿入し、*Paracoccus* sp. N81106 株および NG5 株および NG9 株への導入を図った。そのための準備として、*Paracoccus* sp. N81106 株および *E. coli* K-12 S17-1 株の抗生物質感受性試験を実施した。感受性試験は、抗生物質をそれぞれ段階的に希釈して、事前に OEG 培地を満たした 24 穴プレートに添加した。3 日間の培養後、660 nm における吸光度を評価し、試験抗生物質の最小生育阻止濃度 (MIC) を求めた。

Paracoccus sp. N81106 株と *E. coli* K-12 S17-1 株とでは、抗生物質に対する MIC 値が異なっていた (表 3-9)。それぞれの抗生物質の MIC 値の比 [(*Paracoccus* sp. N81106 株の MIC 値) / (*E. coli* K-12 S-17 株の MIC 値)] は、1 以下から数十まで幅広かった。接合伝達を成功させるためには、接合が完了した *Paracoccus* 属細菌のみを選択する必要がある。また、*E. coli* K-12 S-17 株の生育を抑えるが *Paracoccus* sp. N81106 株の増殖に影響を与えない抗生物質を見出す必要がある。本研究においては、表 3-9 の結果から、抗生物質アミカシンを選択することとした。

表 3-9. 抗生物質に対する最小生育阻止濃度 (µg/ml)

番号	抗生物質	<i>Paracoccus</i> sp. N81106 (a)	<i>E. coli</i> S17-1 (b)	比 : (a)/(b)
1	carbenicillin	12.5	>50	—
2	ampicillin	12.5	50	0.25
3	cefazolin	>200	3.2	>64
4	fosfomycin	>200	3.2	>64
5	piperacillin	>200	200	>1.0

6	gentamaicin	25	12.5	1
7	streptomycin	50	50	1
8	neomycin	50	50	1
9	amikacin	50	6.25	8
10	tetracycline	0.78	>50	0.02
11	erythromycin	50	100	0.5
12	lincomycin	>200	>200	1
13	rifampicin	6.25	50	0.13
14	nalidixic acid	1.56	12.5	0.12
15	novobiocin	0.78	>200	—

②大腸菌から *Paracoccus* へのプラスミドの接合伝達

E. coli K-12 S-17 株に pBBR1MCS2 を保持させ、メンブラン・フィルター上でメイティングさせ接合伝達を行った。メイティング時間は数時間が好ましく、それ以上になると *Paracoccus* sp. N81106 株の接合伝達による形質転換体を取得する事はできなかった。

接合終了後、50 µg/ml のカナマイシンおよび 15 µg/ml のアミカシンを含む OEG 寒天培地を使用することにより、効率良く形質転換体を選択できた。

OEG 培地上の任意のコロニーをピックアップし、50 µg/ml のカナマイシンを含む OEG 培地で培養したところ、良好に増殖した。培養液からプラスミドを調製したところ、導入した pBBR1MCS2 が抽出された (図 3-13)。

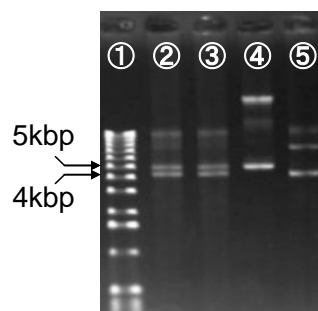


図 3-13. 抽出プラスミド DNA のアガロース電気泳動像

レーン 1 : マーカー DNA (1 kb ラダー、NEB 社製)、レーン 2・3 : 任意の形質転換体から抽出したプラスミド、4 : プラスミド非導入株 (対照)、5 : pBBR1MCS2.

図 3-13 中、②および③のレーンが pBBR1MCS2 形質転換株から抽出した DNA であり、約 4 kbp のサイズのところに導入した pBBR1MCS2 由来のバンドを確認することができた。また、約 5 kbp のサイズにあるバンドは、非導入株にも確認されていることから、*Paracoccus* sp. N81106 株が保有している内在のプラスミドと推定した。さらに、抽出した pBBR1MCS2 の制限酵素処理による断片サイズや部分的な塩基配列の解析により、pBBR1MCS2 は *Paracoccus* sp. N81106 株内で安定的に複製される事を確認することができた。

(2) 遺伝子組換え技術を用いたカロテノイド高生産株の樹立および生産性評価

① ゲノム DNA の調製

Paracoccus sp. N81106 株を OEG 培地で培養し、菌体を遠心分離操作により回収後、ゲノム DNA を調製した。調製は菌体をリゾチームで処理後、DNA を抽出しイソプロパノール沈殿により行った。

図 3-14 に調製したゲノム DNA の電気泳動の結果を示した。図の通り、*Paracoccus* sp. N81106 株からゲノム DNA は効率よく高純度に調製することができた。

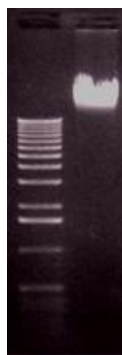


図 3-14. *Paracoccus* sp. N81106 株から調製したゲノム DNA のアガロース電気泳動像
電気泳動は 0.9%アガロースを使用して行った。図中、左側のレーンがマーカー DNA (1 kb ラダー)、右側が調製 DNA を泳動したレーン。

② β-カロテンケト化酵素遺伝子 (*crtW*) および β-カロテン水酸化酵素遺伝子 (*crtZ*) を導入するためのプラスミドの作製

β-カロテンケト化酵素遺伝子と水酸化酵素遺伝子をコードする遺伝子である *crtW* と *crtZ* は、カロテノイド生合成遺伝子オペロン内の先頭部分に並んでいる。これらの遺伝子を PCR により増幅し、pBBR1MCS2 に挿入した。このようにして得られた組換えプラス

ミド中の *crtW* および *crtZ* 塩基配列部分については、塩基配列を決定し、突然変異が導入されていないことを確認した後使用した。構築した組換えプラスミドを pBBR1MCS2WZ とした。次いでエレクトロポレーション法により、接合伝達のドナーとなる *E. coli* K-12 S-17 株に pBBR1MCS2WZ を導入した。任意の形質転換体から pBBR1MCS2WZ を抽出し制限酵素地図を作ることによってその構造を確認した。pBBR1MCS2WZ は、配列の再編成などの構造変化を起こすことなく大腸菌内で、安定的に複製・保持されることを確認した。

Paracoccus sp. N81106 株に pBBR1MCS2WZ を導入するため、対数増殖期の *Paracoccus* sp. N81106 株と、pBBR1MCS2WZ を保持する *E. coli* K-12 S-17 株をメンブラン・フィルター上でメイティングさせた。25°C、4 時間のメイティング後、アミカシンおよびカナマイシンを含む培地を用いて *Paracoccus* sp. N81106 株の形質転換体を選択した。アミカシンによって大腸菌を排除し、カナマイシンによって、*Paracoccus* sp. N81106 株の形質転換体を選択した。形質転換体のコロニーの出現に必要な培養時間は、通常の *Paracoccus* 属細菌のコロニーの出現に必要な培養時間と同程度であり、培養 3 日目位から形質転換体コロニーが現れた。出現した任意のコロニーをピックアップし、カナマイシンを含む培地で再度培養した。形質転換体と考えられるコロニーは、この植え継ぎ後、正常に増殖した。このことから、pBBR1MCS2WZ は *Paracoccus* sp. N81106 株内で、安定に複製・保持されると考えられた。

野生株である *Paracoccus* sp. N81106 株の他、その突然変異体である NG5 株および NG9 株についても、接合伝達による pBBR1MCS2WZ の導入を実施した。カロテノイド高生産株においても、接合伝達により遺伝子導入が良好に起こることを確認することができた。図 3-15 に形質転換体のコロニー PCR の結果を示した。図の通り、形質転換体からは、pBBR1MCS2 内のカナマイシン耐性遺伝子由来の DNA 領域が増幅された。対照である図 3-16 中①の *Paracoccus* sp. N81106 区において PCR 産物の増幅が起こっていたが、これらは、非特異的に増幅された PCR 産物であると考えられる。

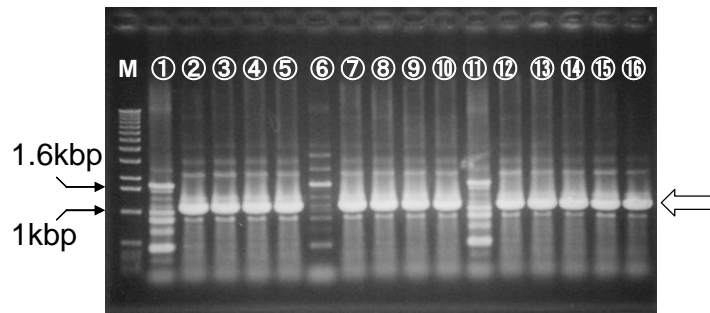


図 3-15. 形質転換体 DNA を鋳型にしたカナマイシン耐性遺伝子の増幅

M: 1 kbp ラダーマーカー、①: *Paracoccus* sp. N81106 株、②~⑤: N81106 株に対して pBBR1MCS2WZ を導入した任意のコロニー、⑥: NG5 株(ベクター導入なし)、⑦~⑩: pBBR1MCS2WZ を導入した NG5 株の任意のコロニー、⑪: NG9 株、⑫~⑬: pBBR1MCS2WZ を導入した NG9 株、矢印がカナマイシン耐性遺伝子増幅断片. PCR は、5'-cggaattcgatgaatgtcagctgctgggctatctg-3'および 5'-cggaattccgtgatggcaggttgggcg tcgcttgg-3'の塩基配列を有するプライマーを用いて行った.

対照である図 3-16 中①の *Paracoccus* sp. N81106 区において PCR 産物の増幅が起こっていたが、これらは、非特異的に増幅された PCR 産物であると考えられる。

③カロテノイド生産性評価

Paracoccus sp. N81106 株由来のカロテノイド高度生産株の一つである NG5 株に pBBR1MCS2WZ を導入し、この形質転換体を、50 µg/ml のカナマイシンを含む OEG 培地で培養した。pBBR1MCS2WZ を導入することにより、NG5 株のアスタキサンチン合成は、培養 3 日目から明らかに向上した。この培養 3 日目において、対照である *crtW*、*crtZ* 遺伝子を挿入していない pBBR1MCS2 を保持する NG5 株ではアスタキサンチンの生合成量が 5 mg/l であるのに対して、*crtW* および *crtZ* 遺伝子が挿入されたプラスミドを保有する NG5 株では、β-カロテンの酸化反応が大幅に進み、総カロテノイドのうち 6 割がアスタキサンチンに変換され、その生合成量は約 18 mg/l に達した。

培養を継続すると、*crtW*、*crtZ* 遺伝子が導入された NG5 株では、さらに、アスタキサンチンの生合成量は増加し、培養 5 日目で約 23 mg/l に達した。これに対して pBBR1MCS2 を保持した NG5 株においては、アスタキサンチン生合成量は増加するものの培養 5 日目においても約 17 mg/l であり、*crtW* と *crtZ* 遺伝子を導入した株のアスタキサンチン生産性に追いつくことはなかった。一方で、総カロテノイドは、培養 3 日目では両者の生合成量は約 30 mg/l と同程度であり、その後、培養を継続しても、有意な生産量の差は現れなかった。培養経過を図 3-16 に示した。

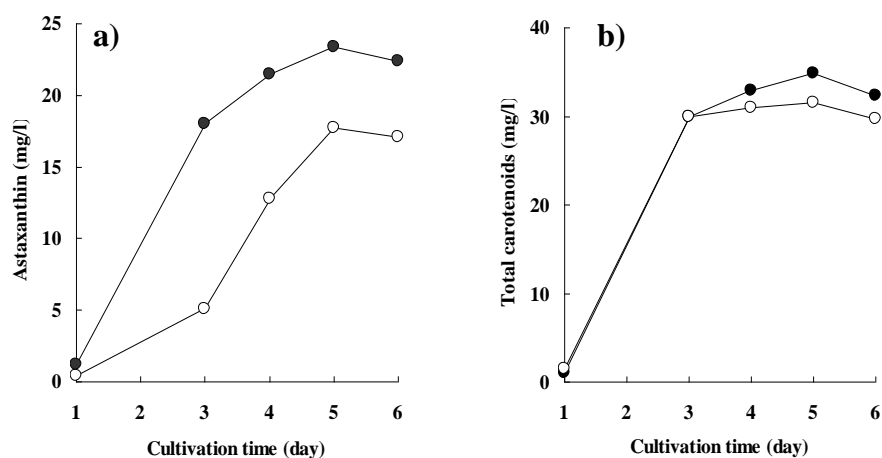


図 3-16. pBBR1MCS2WZ を導入した NG5 株のカロテノイド生産性

a) がアスタキサンチン、b)は総カロテノイドの定量結果。●は β -カロテンを酸化する酵素の遺伝子である *crtW*と *crtZ*遺伝子を挿入した pBBR1MCS2WZ を導入した NG5 株、○は *crtW*、*crtZ* 遺伝子を挿入していない pBBR1MCS2 を導入した NG5 株。

pBBR1MCS2 に挿入された *crtW* および *crtZ* 遺伝子の導入の効果により、課題であった β -カロテンの酸化反応が大幅に進み、総カロテノイドに占めるアスタキサンチンの存在割合が有意に向上した。一方、pBBR1MCS2WZ を導入しても、カロテノイド総量の有意な増加は認められなかった。

カロテノイド生合成の生産性をさらに向上させるために、pBBR1MCS2 に *crtW*、*crtZ*、*crtY*、*crtI*、*crtB* 計 5 つのカロテノイド生合成遺伝子を挿入した pBBR1MCS2CRT を作製した（以下、「CRT プラスミド」と記載）。このプラスミドは 10 kbp を超えるサイズであるが、*E. coli* K-12 JM109 株内において、欠失などの構造変化を示すことなく良好に保持された。また、接合伝達のために使用した *E. coli* K-12 S-17 株内においても安定に保持・複製された。さらに、遺伝子挿入のない pBBR1MCS2 と同程度の頻度で、接合伝達によって、*Paracoccus* sp. N81106 株の形質転換体を取得することができた。

CRT プラスミドについては、*Paracoccus* sp. N81106 株由来で、カロテノイド生産性が改良された NG5 株および NG9 株にも導入した。CRT プラスミドは *Paracoccus* sp. N81106 株と同様の効率で、NG5 株および NG9 株にも導入させることができた。

形質転換体を選択した OEG 寒天培地上の任意のコロニーをピックアップし、50 μ g/ml のカナマイシンを含む OEG 培地に接種し、25°C で培養した。培養経過を図 3-17 に示し

た。

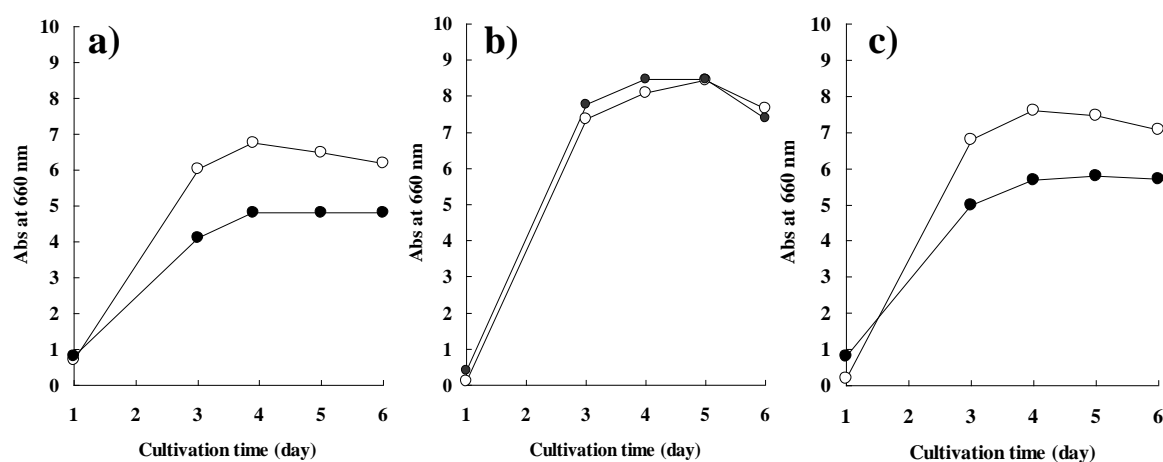


図 3-17. CRT プラスミド導入 *Paracoccus* sp. N81106 株、NG5 株および NG9 株の増殖
a) が野生株である N81106 株、b) が NG5 株、c) が NG9 株で、それぞれ、○がプラスミド非導入株、●が導入株。

図 3-17 に示したように、*Paracoccus* sp. N81106 株および NG9 株では CRT プラスミドを導入することにより、増殖性が若干悪くなる傾向にあった。これに対して、NG5 株では CRT プラスミドの導入の有無に関わらず A₆₆₀ を指標とした増殖性に差は現れなかった。

次いで、実際、プラスミドが複製維持されているかどうか、培養液からプラスミドを調製して確認した。プラスミドの抽出は、市販の DNA 調製キットを用いて行った。図の通り、*Paracoccus* sp. N81106 株、NG5 株および NG9 株においても、大腸菌と同様に CRT プラスミドを簡便に抽出・精製することができた。

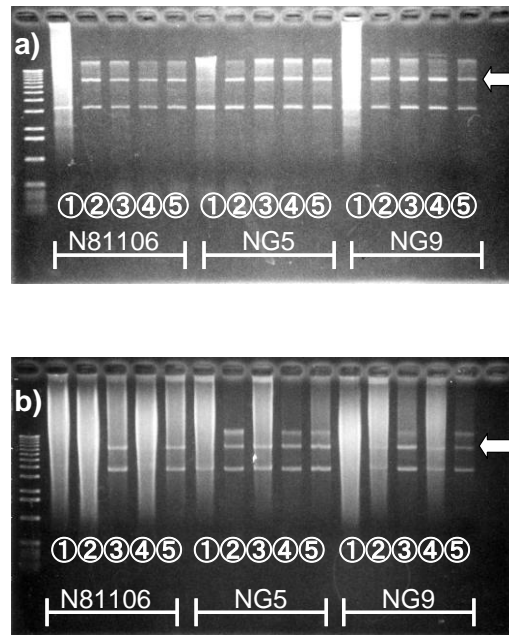


図 3-18. 遺伝子導入株からの抽出プラスミドのアガロース電気泳動像

a)が培養 3 日目 b)が培養 7 日目の培養菌体から抽出したプラスミドの電気泳動像. 各区の①がベクター非導入株(対照)、②から⑤が任意のクローン. 図中の矢印が、導入した CRT プラスミドを示す. 約 3 kbp の位置の DNA は *Paracoccus* sp. N81106 株の内在プラスミド. 図中、左端は 1 kbp ラダーマーカー.

培養 3 日目および培養 7 日目の培養菌体から CRT プラスミドを抽出したところ、培養 3 日目においては、*Paracoccus* sp. N81106 株、NG5 株および NG9 株ともに導入した CRT プラスミドの存在を確認することができた。培養 7 日目においては、フラスコのバッチ培養では溶菌が起こっているため、一部の区では CRT プラスミド自体抽出することができなかつたが、抽出された区ではその存在を確認することができた。

CRT プラスミドを導入した *Paracoccus* sp. N81106 株、NG5 株、NG9 株の培養 3 日目から 6 日目までのカロテノイド量の生産量を定量した。培養に伴うカロテノイド量の変動を図 3-19 に示した。

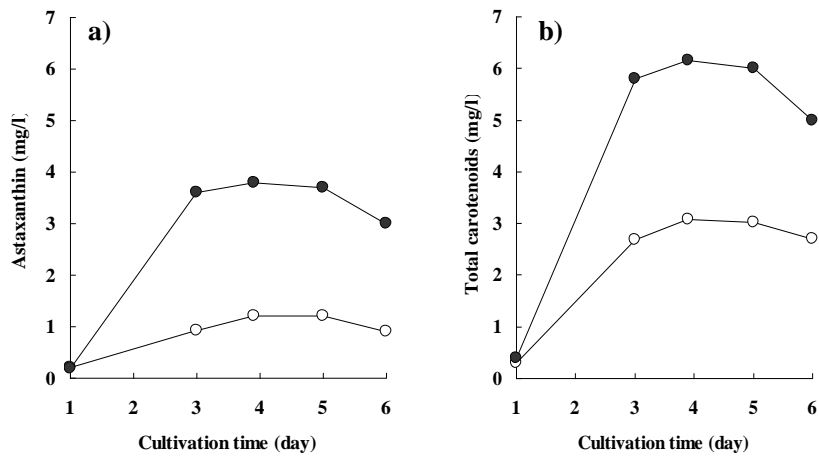


図 3-19. CRT プラスミドを導入した *Paracoccus sp.* N81106 株のカロテノイド生産性

a)がアスタキサンチン、b)は総カロテノイドの定量結果。●はカロテノイド合成遺伝子群である *crtW*、*crtZ*、*crtY*、*crtI*、*crtB* 遺伝子を挿入した CRT プラスミド導入株、○は同プラスミドを導入していない *Paracoccus sp.* N81106 株。

Paracoccus sp. N81106 株では培養 3 日目からアスタキサンチン生産量および総カロテノイド生産量が CRT プラスミド導入株において向上していた。アスタキサンチンにおいては、培養 4 日目の約 4 mg/l が最大の生産性であった。総カロテノイドは培養 3 日目で約 6 mg であった。野生株であるため全体的に生産量は低い、CRT プラスミドの導入により生産量はともに向上した。

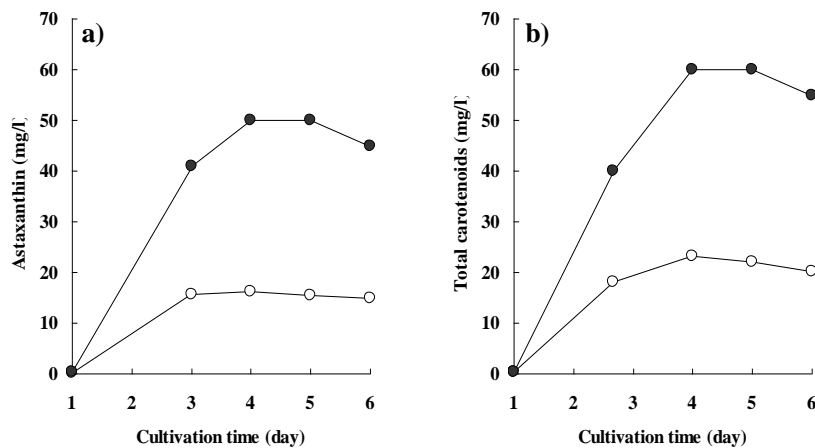


図 3-20. CRT プラスミドを導入した NG5 株のカロテノイド生産性

a)がアスタキサンチン、b)は総カロテノイドの定量結果。●はカロテノイド合成遺伝子群である *crtW*、*crtZ*、*crtY*、*crtI*、*crtB* 遺伝子を挿入した CRT プラスミド導入株、○は同プラスミドを導入していない NG5 株。

Paracoccus sp. N81106 株由来のカロテノイド高生産菌である NG5 株に CRT プラスミドを導入することにより、カロテノイド生産量を改良することに成功した。NG5 株は CRT プラスミドの導入効果が顕著に現れ、培養 4、5 日目でアスタキサンチンの生産は非導入株の約 3 倍以上である 50 mg/l を超えた。総カロテノイドについても同様に生産性は向上しており、約 60 mg/l を超えていた。

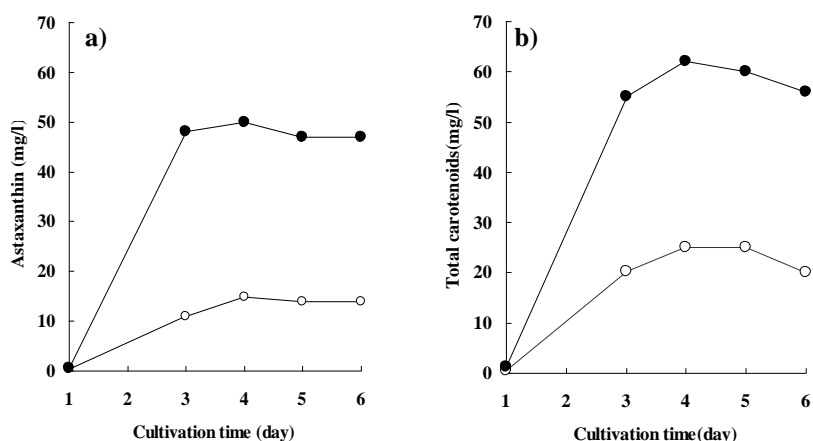


図 3-21. CRT プラスミドを導入した NG9 株のカロテノイド生産性

a) がアスタキサンチン、b) は総カロテノイドの定量結果。●はカロテノイド生合成遺伝子群である *crtW*、*crtZ*、*crtY*、*crtI*、*crtB* 遺伝子を挿入した CRT プラスミド導入株、○は同プラスミドを導入していない NG9 株。

NG9 株においても CRT プラスミドを導入することにより生産性を改良することに成功した。培養 4、5 日目でアスタキサンチンの生産は非導入株の約 4 倍以上である 50 mg/l を超えることができた。総カロテノイドについても同様に生産性は向上しており、約 60 mg/l を超えていた。

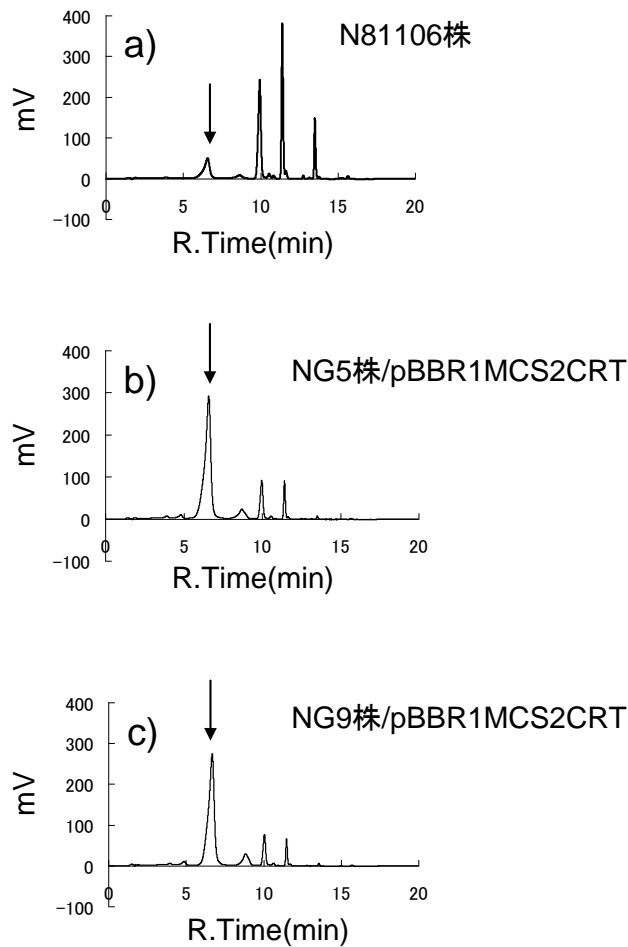


図 3-22. CRT プラスミド導入株のカロテノイド組成解析

CRT プラスミド導入株の培養 3 日目のカロテノイド生産パターンを逆相クロマトグラフィで分析した結果。a) *Paracoccus* sp. N81106 株、b) CRT プラスミドを導入した NG5 株、c) NG9 株であり、図中矢印はアスタキサンチンを示す。縦軸は 470 nm における吸収の強度、横軸は保持時間。

CRT プラスミドを導入することにより総カロテノイドの生合成量向上のみならず、*crtW* および *crtZ* 遺伝子の挿入効果により、アスタキサンチンへの変換率が大幅に向上させることができた(図 3-22)。

Paracoccus sp. N81106 株のみならず、カロテノイド生産性を改良した突然変異育種株においても CRT プラスミドによるカロテノイド生合成遺伝子群の同種発現の効果を確認することができた。すなわち、*crtY*、*crtI*、*crtB* により β-カロテンが効率よく生合成され、

さらに、pBBR1MCS2WZ の効果と同様に *crtW* および *crtZ* により酸化酵素の発現酵素量が増加し、突然変異処理では達成し得なかったアスタキサンチン効率高生産株を樹立することができた。

3.3.4 考察

第 2 節で述べた様に、突然変異育種法により *Paracoccus* sp. N81106 株カロテノイド生産性改良に取り組んだ。カロテノイド生合成の改良は、寒天培地プレート上のコロニーの色で判別できるため比較的簡単に生産性の向上を図ることができたが、技術課題の一つとなったアスタキサンチンの最終反応である β -カロテンの酸化反応を直接亢進させた突然変異株を取得するには至らなかった。

特定の反応を直接的に改良・改変するには遺伝子組換え技術が有効であると考え、*Paracoccus* sp. N81106 株の遺伝子導入技術の構築から検討した。*Paracoccus* 属細菌で機能するプラスミドの報告例がないことから、広宿主域ベクターを選択し、同細菌内で複製・保持されるか検討した。当初、エレクトロポレーションによりこのベクターの導入を試みたが、*Paracoccus* sp. N81106 株が形質転換されることはなかった。エレクトロポレーションによる遺伝子導入に課題があると考え、物理的な導入とは異なる大腸菌による接合伝達法を検討した。

広宿主域ベクターのドナーとなる *E. coli* K-12 S-17 株と受容菌となる *Paracoccus* 属細菌の抗生物質感受性試験を行うことにより、抗生物質アミカシンの有用性を見出し、形質転換体の特異的に選別することができた。受容側となる *Paracoccus* 属細菌は、*Paracoccus* sp. N81106 株の他に第 2 節で述べたカロテノイド高生産株すべてにおいて利用することができた。また、導入された広宿主域ベクターを解析したところ、ベクター構造の再編成や欠失なしに複製されていた。カロテノイド生産性を有する *Paracoccus* 属細菌への遺伝子導入技術の構築は本研究が初めてであると考えられる。

遺伝子導入技術および *Paracoccus* sp. N81106 株内で複製できるプラスミドを見出したことから、同細菌のカロテノイド生合成遺伝子を挿入した組換えプラスミドを作製し、カロテノイド生産性の向上を検討した。最初に、突然変異育種法では克服できなかった β -カロテンの酸化反応を検討するために酸化酵素であるケト化酵素および水酸化酵素の遺伝子を挿入した pBBR1MCS2WZ を作製し接合伝達により、突然変異育種法で取得したアスタ

キササンチン高生産株である NG5 株等に導入した。pBBR1MCS2WZ は遺伝子挿入のない pBBR1MCS2 と同様に同細菌株に導入された。カナマイシン存在下で培養したところ、導入した遺伝子がコードする酵素の発現量が向上し、突然変異育種株では困難であった β-カロテンの酸化反応が高進することを確認することができた。

NG5 株等においてカロテノイド生合成遺伝子の同種発現の有用性を確認することができたことから、次いで、クラスターを形成しているカロテノイド生合成遺伝子 (*crtW*, *crtZ*, *crtY*, *crtI*, *crtB*) 群をすべて挿入した pBBR1MCS2CRT (CRT プラスミド) を作製した。サイズが 10 kbp を超えるプラスミドであったが、接合伝達により同プラスミドを *Paracoccus* sp. N81106 株およびそれ由来のカロテノイド高生産株に導入することができた。カナマイシン存在下で培養したところ、増殖性を大きく損なうことなく増殖した。pBBR1MCS2WZ 形質転換株とは異なり、*crtY*, *crtI* および *crtB* の遺伝子が付加されたことにより、β-カロテンの生合成量が高まり、さらに、*crtW*, *crtZ* の効果により総カロテノイド量が増加するとともにアスタキササンチンの生産量が大幅に向上した。

カロテノイド生合成遺伝子の同種発現は *Paracoccus* sp. N81106 株と同様に各種カロテノイド高生産株においても確認することができた。カロテノイド高生産株においては、イソプレノイド等、カロテノイド骨格となる基質を過剰に供給する突然変異が存在していると思われる。その株に、遺伝子組換え技術により、カロテノイド生合成酵素を多量発現させることにより、さらに、カロテノイド生産性の向上を図ることができたものと考えられる。突然変異育種法により生産性を向上させ、突然変異育種法では克服できない反応を遺伝子組換え技術により補完することによって更に生産性を向上させるという戦略は、バイオテクノロジーを一般に利用することができると考えられる。

第 4 節 要約・総括

Paracoccus sp. N81106 株を宿主とした遺伝子組換えを可能とするため、*E. coli* K-12 S-17 株を用いた接合伝達法によって広宿主域ベクター pBBR1MCS2 を *Paracoccus* sp. N81106 株に導入した。このベクターは、*Paracoccus* sp. N81106 株内で、欠失などの構造再編成を起こすことなく安定的に保持された。すなわち、接合伝達および広宿主域ベクターを用いることにより、*Paracoccus* sp. N81106 株およびその株から由来したカロテノイド高生産株に、広宿主域ベクターを導入する技術を構築することができた。これにより、

Paracoccus sp. N81106 株およびそれ由来のカロテノイド高生産株を宿主として、それらの株にクローン化されたカロテノイド生合成遺伝子を導入し、同種発現させることが可能となった。

この遺伝子組換え技術により、アスタキサンチン生合成の律速であった β -カロテンの酸化反応を、この反応を触媒する 2 種類の酵素の遺伝子の発現量を増加させることによって克服することが可能となった。実際、形質転換されたカロテノイド高生産株を培養すると、導入された遺伝子からの発現により 2 種類の酵素の量は増加したものと思われ、 β -カロテンからアスタキサンチンに変換する過程の代謝中間体であるカロテノイド類が、ほとんど蓄積しなくなり、アスタキサンチンに効率良く変換されるようになった。

さらに、アスタキサンチン生合成量を増加させるためにカロテノイド生合成遺伝子群を導入したところ突然変異育種法では達成し得ない生産性を達成することができた。

突然変異育種法の思わぬ突然変異効果と遺伝子組換え技術の補完により、従来にない高い生産性のカロテノイド生合成細菌の樹立に成功した。

本研究では、海洋細菌である *Paracoccus* sp. N81106 株のカロテノイド、特に、アスタキサンチンの生産性改良について検討したものである。突然変異育種法および遺伝子組換え法による改良技術をそれぞれ構築することができ、*Paracoccus* sp. N81106 株の課題であった生産性を大幅に改善できたと考えている。冒頭で述べたように、消費者の意識の変化から天然物志向が高まり微生物による発酵カロテノイドの生産に期待が寄せられている。本研究は、天然型のカロテノイドを提供する技術の構築を目指したものであり、その目的を十分に達成したと考えられる。

結論

生物機能を利用して「新規な生物材料の創製」および「創製技術の構築」に取り組んだ。生物素材は医療、食品、化学産業を中心に広く利用されている機能性物質であり、既存の化学品である無機、有機素材より複雑な構造を有する物質として、新規な機能を創出することが可能である。構造の複雑さと機能性を直接的に結びつけることはできないが、高度な機能性を付与するためには一定の複雑さを基に構造を形成させる必要があると考えている。

本研究では、新規な生物材料の創製および創製技術に焦点を当てて研究を進めた。自然界に存在する物質をそのまま利用することも可能であるが、機能性が十分ではなく、また、性状が不安定であることが多い。さらに、産業利用の観点においては生産性を担保する必要があることから、生物機能を利用した生合成技術の構築についても取り組んだ。

生物材料として分子量約 1,000 のペプチド、分子量数万の酵素タンパク質、生物そのものである微生物を対象とした。

ペプチドについては、抗体代替を見据えた、ペプチドによる *E.coli* O157:H7 の抗原マーカーとなる H7 抗原認識分子の創製に取り組んだ。10⁸ を超えるペプチド・ライブラリーからファージ・ディスプレイ法による選択・濃縮を施すことにより、H7 抗原を特異的に認識するペプチドのアミノ酸配列(LHILRPTLSIQG)を取得するに至った。抗体(分子量約 150 kDa)に対して分子量比約 6%であっても、他の H 抗原に対して交差性が低いペプチドを創製することができた。また、創製ペプチドによる FISH 法による細菌検出を行ったところ、H7 抗原を特異的に認識することを確認した。特異性の高い立体構造を形成し難い 12 mer 程度のペプチドであっても十分認識能を有することを示すことができた。

酵素タンパク質については、ハロゲン化酵素の一つであるハロペルオキシダーゼの産業利用を目指して自然界から多様なハロペルオキシダーゼ遺伝子を単離する方法の構築に取り組んだ。ハロペルオキシダーゼは過酸化水素存在下でも機能する安定性の高い酵素特性を有している。一方、研究例が少なく、ハロペルオキシダーゼ遺伝子の報告例も少なかった。

カセット PCR 法により、海洋性の細菌からの直接遺伝子単離を行ったところ、22 個の新規な遺伝子を同定することに成功した。従来の遺伝子単離技術は、酵素を保有する生物から酵素を抽出し、その後、カラム・クロマトグラフィにより精製し、アミノ酸配列を決

定させる必要があった。その上で、解明できたアミノ酸配列を基にして、オリゴヌクレオチドのプローブを作製し、ハイブリダイズする遺伝子を特定する等の非常に煩雑な工程が求められた。それに対して、本技術は、PCRを主体とする方法であり、生物からの酵素抽出等の工程を経ずに直接的に遺伝子を単離できる。非常に簡便な方法であり、自然界からの多様な酵素遺伝子を単離できる技術である。

微生物については、抗酸化作用の点で注目を浴びているアスタキサンチンを生合成する *Paracoccus* sp. N81106 株を用いて生産性の改良について検討した。野生株である *Paracoccus* sp. N81106 株は、培養液 1 L あたり約 1 mg のカロテノイドを生合成するが、産業利用の観点から、更なる生産性の改良が必要であった。本研究では、従来から用いられている変異育種による突然変異法と遺伝子組換え技術の 2 つの技術を併用することにより *Paracoccus* sp. N81106 株の生産性改良を行った。

変異育種を繰り返すことにより *Paracoccus* sp. N81106 株から由来した変異株において、カロテノイド含量を向上させることに成功したが、目的の最終生産物であるアスタキサンチンへの変換を特異的に向上させることはできなかった。その理由として、得られた突然変異体においては、アスタキサンチンの前駆体である β -カロテンのケト化と水酸化反応を亢進させることができなかったことが考えられた。そこで、律速となる反応を触媒する酵素を遺伝子組換え技術により発現させたところ、変異育種法では実現することができなかったアスタキサンチン高生産株の樹立に成功した。細菌の増殖機能、生合成機能を活用することにより複雑な構造を有するカロテノイドを効率良く生産する技術を構築することができたと考えている。

上述の通り、生物材料に生物機能を利用して改良を施すことで、簡便に、機能性を付与・改善することが可能である事を示すことができたと考えている。

CO₂削減の例を出すまでもなく、環境調和型の産業創出が求められている。既存の生産プロセスを、生物機能を利用して代替する、いわゆる「グリーン化プロセス」が進められ所定の成果が上がっている。本研究は、直接的に環境調和を目指すものではないが、生物材料が既存化学品に置き換わることができれば、自ずと環境調和型の物質代替および生産プロセスへの移行がスムーズに進むと考えている。生物材料の機能の探求・改良により 21 世紀型の産業創造が可能である。

参考文献

- 1) A. Okuta, K. Ohnishi, S. Harayama, PCR isolation of catechol 2, 3-dioxygenase gene fragments from environmental samples and their assembly into functional genes. *Gene*, 212, 221-8 (1998).
- 2) K. Kleinjung, S. Klussmann, V. A. Erdmann, F. W. Scheller, J. P. Furste, F. F. Bier, High-affinity RNA as a recognition element in a biosensor. *Anal. Chem.*, 70, 328-31 (1998).
- 3) J. G. Bruno, J. L. Kiel, *In vitro* selection of DNA aptamers to anthrax spores with electrochemiluminescence detection. *Biosens. Bioelectron.*, 14, 457-64 (1999).
- 4) G. Schoenhals, C. Whifield, Monoclonal antibodies against serotype specific and conserved epitopes in morphotype *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol. Lett.*, 72, 117-22 (1990).
- 5) H. Yongsheng, J. E. Keen, R. B. Westerman, E. T. Littledike, J. Kwang, Monoclonal antibodies for detection of the H7 antigen of *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 62, 3325-32 (1996).
- 6) G. P. Smith, Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface. *Science*, 228, 1315-7 (1985).
- 7) L. W. Riley, R. S. Remis, S. D. Helgerson, H.B. McGee, J. G. Wells, B.R. Davis, R. J. Herbert, E. S. Olcott, L. M. Johnson, N. T. Hargrett, P. A. Blake, M. L. Cohen, Hemorrhagic colitis associated with a rare *Escherichia coli* serotype. *N. Engl. J. Med.*, 308, 681-5 (1983).
- 8) A. O. Carter, A. A. Borezyk, J. A. Carlson, B. Harvey, J. C. Hockin, M. A. Karmali, C. Krishnan, H. Lior, A severe outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 associated hemorrhagic colitis in a nursing home. *N. Engl. J. Med.*, 317, 1496-500 (1987).
- 9) M. A. Karmali, M. Petric, C. Lim, P. C. Fleming, G. S. Arbus, H. Lior, The association between idiopathic hemolytic uremic syndrome and infection by verotoxin-producing *Escherichia coli*. *J. Infect. Dis.*, 151, 775-82 (1985).
- 10) K. Ishioka, K. Ohnishi, T. Mathuba, S. Harayama, *Japan Kokai Tokkyo Koho*, 2000-279176 (Oct. 10, 2000).

- 11) N. Itoh, T. Kawanimi, J. Q. Liu, T. Dairi, M. Miyakoshi, C. Nitta, Y. Kimoto, Cloning and biochemical characterization of Co²⁺-activated bromoperoxidase-esterase (perhydroxase) from *Pseudomonas putida* IF-3 strain. *Biochim. Biophys. Acta.*, 1545, 53-66 (2001).
- 12) R. Jannun, E. L. Coe, Bromoperoxidase from the marine snail, *Murex trunculis*. *Comp. Biochem. Physiol.*, 88, 917-22 (1987).
- 13) C. D. Murphy, New frontiers in biological halogenation. *J. Appl. Microbiol.*, 94, 539-48 (2003).
- 14) R. T. Lorenz, G. R. Cysewski, Commercial potential for *Haematococcus pluvialis* as a natural source of astaxanthin. *Trends Biotechnol.*, 18, 160-7 (2000).
- 15) M. J. Lewis, N. Ragot, M. C. Berlant, M. Miranda, Selection of astaxanthin-overproducing mutants of *Phaffia rhodozyma* with β-ionone. *Appl. Environ. Microbiol.*, 56, 2944-5 (1990).
- 16) J. C. Verdoes, G. Sandmann, H. Visser, M. Diaz, M. van Mossel, A. J. van Ooyen, Metabolic engineering of the carotenoid biosynthetic pathway in the Yeast *Xanthophyllomyces dendrorhous* (*Phaffia rhodozyma*). *Appl. Environ. Microbiol.*, 69, 3728-38 (2003).
- 17) M. Humbelin, A. Thomas, L. Junying, L. Juan, A. Berry, Genetics of isoprenoid biosynthesis in *Paracoccus zeaxanthinifaciens*. *Gene*, 297, 129-139 (2002).
- 18) A. Yokoyama, H. Izumida, W. Miki, Production of astaxanthin and 4-ketozeaxanthin by the marine bacterium, *Agrobacterium aurantiacum*. *Biosci. Biotech. Biochem.*, 58, 1842-4 (1994).
- 19) N. Misawa, Y. Satomi, K. Kondo, A. Yokoyama, S. Kajiwara, T. Saito, T. Ohtani, W. Miki, Structure and functional analysis of a marine bacterial carotenoid biosynthesis gene cluster and astaxanthin biosynthetic pathway proposed at the gene level. *J. Bacteriol.* 177, 6575-84 (1995).
- 20) P. D. Fraser, Y. Miura, N. Misawa, *In Vitro* Characterization of Astaxanthin Biosynthetic Enzymes. *J. Biol. Chem.*, 272, 6128-35 (1997).
- 21) V. Tiwan, *In vitro* engineering of novel bioactivity in the natural enzymes. *Front. Chem.*, 4, 39-48 (2016).

- 22) W. P. Stemmer, Rapid evolution of a protein in vitro by DNA shuffling. *Nature*, 370, 389-91 (1994).
- 23) R. I. Amann, W. Ludwig, K. H. Schleifer, Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiol. Rev.*, 59, 143-169 (1995).
- 24) I. Pelletier, J. Altenbuchner, A bacterial esterase is homologous with non-haem haloperoxidases and displays brominating activity. *Microbiology*, 141, 459-68 (1995).
- 25) P. Bhosale, P. S. Bernstein, Microbial xanthophylls. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 68, 445-55 (2005).
- 26) E. A. Johnson, W. A. Schroeder, Microbial carotenoids. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.*, 53, 119-178 (1995).
- 27) M. Hoya, T. Ide, T. Tanaka, K. Murayama, Improvement of carotenoids production in marine bacterium *Paracoccus* sp. strain N81106 by genetic engineering. *Carotenoid Sci.* 11, 56-58 (2007).
- 28) L. Pasamontes, D. Hug, M. Tessier, H. P. Hohmann, J. Schierle, A. P. Loon, Isolation and characterization of the carotenoid biosynthesis genes of *Flavobacterium* sp. strain R1534. *Gene*, 185, 35-41 (1997).
- 29) N. U. Frigaard, J. A. Maresca, C. E. Yunker, A. D. Jones, D. A. Bryant, Genetic manipulation of carotenoid biosynthesis in the green sulfur bacterium *Chlorobium tepidum*. *J. Bacteriol.*, 186, 5210-20 (2004).
- 30) R. Barkovich, J. C. Liao, Metabolic engineering of isoprenoids. *Metab. Eng.*, 3, 27-39 (2001).
- 31) C. S. Dannert, D. Umeno, and F. H. Arnold, Molecular breeding of carotenoid biosynthetic pathway. *Nat. Biotechnol.*, 18, 750-3 (2000).
- 32) M. E. Kovach, P. H. Elzer, D. S. Hill, G. T. Robertson, M. A. Farris, R. M. Roop II, K. M. Peterson, Four new derivatives of the broad-host-range cloning vector pBBR1MCS, carrying different antibiotics-resistance cassettes. *Gene*, 166, 175-6 (1995).
- 33) M. E. Kovach, R. W. Phillips, P. H. Elzer, R. M. Roop II, K. M. Peter, pBBR1MCS: a broad-host-range cloning vector. *Biotechniques*, 16, 800-2 (1994).

本論文に関する報告

学術誌発表論文

T. Ide, S-H. Baik, T. Matsuba, and S. Harayama.

Identification by the phage-display technique of peptides that bind to H7 flagellin of *Escherichia coli*.

Biosci. Biotechnol. Biochem., Vol. 67, No. 6, 1335-1341 (2003).

T. Ide, T. Tanaka, M. Hoya, and S. Harayama.

Enhanced production of astaxanthin in *Paracoccus* sp. strain N-81106 by using random mutagenesis and genetic engineering.

Biochem. Eng. J., Vol. 65, 37-43 (2012).

H. J. Gwon*, T. Ide*, S. Harayama and S. H. Baik.

Identification of novel non-metal haloperoxidases from the marine metagenome.

J. Microbiol. Biotechnol., Vol. 24, No. 6, 835-842 (2014).

*These authors contributed equally to this work.

国際会議発表分

T. Ide, T. Tanaka, K. Murayama, and M. Hoya.

Improving astaxanthin productivity by application of metabolic engineering techniques to a marine bacterium.

106th American Society for Microbiology General Meeting (2006・5).

S. Hanzawa, T. Ide, S. ooe, T. Toyoshima, N. Imaizumi, T. Tanaka, and K. Murayama.

Highdensity cultivation of astaxanthin-overproducing mutant of a marine bacterium, *Paracoccus* sp. N-81106.

Aqua 2006 (2006・11).

T. Ide, S. Ooe, A. Noguchi, K. Murayama.

Towards the industrial production of astaxanthin by marine bacterium, *Paracoccus*
sp.

International Symposium of Biotechnology and Biocatalysis 2010 (2010·11).

謝辞

本研究は中央大学理工学研究科（応用化学科専攻および生命科学科専攻）原山重明教授のもとで行われた研究であり、本研究に対してご懇篤なるご指導を賜り、心より感謝申し上げます。

また、有益なご助言とご鞭撻を賜りました三澤典彦博士に深く感謝致します。

本研究を遂行するにあたり、ご協力下さいました東ソー株式会社の田中亨氏、公益財団法人相模中央化学研究所の穂谷恵氏および微生物工学グループの皆様に感謝申し上げます。

最後に、本研究の遂行にあたり、惜しみないご協力、励ましを頂きました妻、井出美香に心より感謝致します。