

## 論文の内容の要旨

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された。その第一は、細菌べん毛繊維を構成するタンパク質であるフラジェリンを認識するオリゴペプチドの単離である。その第二は、自然界に生息する多様な細菌から、培養を介することなく新規なハロペルオキシダーゼ遺伝子を単離することである。その第三は、アスタキサンチンを生産する細菌の生産性の改良である。

### 1. 大腸菌 H7 抗原認識ペプチドの単離および細菌検出

細菌の検出・同定は、細菌表層抗原である O 抗原（リポ多糖）や H 抗原（べん毛繊維を構成するタンパク質であるフラジェリン）をターゲットとして行われることが多い。本研究では、近年問題となっている病原性大腸菌 *E. coli* O157:H7 が作る H7 フラジェリン抗原を認識できる人工ペプチドを、ファージ・ディスプレイ法を用いて、 $10^8$ を超えるペプチド・ライブラリーの中からスクリーニングした。その結果、4種類のペプチドの単離に成功し、最も結合性の高かった 12 アミノ酸から構成される H7 フラジェリン結合性ペプチドの  $EC_{50}$  値は  $1.9 \mu\text{M}$  であった。このペプチドは、他の H 抗原（H1, H5, H12, H23）には強く結合しなかった。

### 2. 自然界からの酵素遺伝子単離法開発

ハロペルオキシダーゼは、過酸化水素の働きによりハライドイオンをハロニウムカチオンに活性化し、さまざまな有機化合物をハロゲン化する酵素であり、化学品合成に頻繁に利用されている。本研究では、海洋細菌の持つ多様なハロペルオキシダーゼを、培養を介することなく直接クローン化することを試みた。20 L の海水中の海洋細菌を捕集し、DNA を抽出し、この DNA を鋳型として、ハロペルオキシダーゼ遺伝子断片を PCR 増幅した。このようにして得られたハロペルオキシダーゼ遺伝子をクローン化した大腸菌約 600 クロオンを評価したところ、ハロペルオキシダーゼ活性を発現する 18 個の新規ハロペルオキシダーゼ遺伝子を同定することに成功した。

### 3. *Paracoccus* 属細菌のカロテノイド生産性の改良

アスタキサンチンは、その高い抗酸化作用や特色のある色調から、健康食品や養殖魚の色揚げ剤に利用されている。アスタキサンチンを合成する細菌として、*Paracoccus* 属 N81106 株が知られている。この株に突然変異を誘起し、アスタキサンチンの生産性が親株に比べて約 17 倍向上した NG5 株を分離した。アスタキサンチンの生産性をさらに改良するために、N81106 株に適用できる遺伝子組換え技術を構築し、カロテノイド合成全遺伝子を挿入したプラスミド（CRT プラスミド）を導入したところ、N81106 株に比べてアスタキサンチンの合成量が約 50 倍向上した遺伝子組換え株が得られた。

## 論文審査の結果の要旨

### I. 論文の主題

近代のバイオテクノロジーにおいては、天然の生体物質を改良し、あるいは全く新たに設計することによって、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。その戦略の 1 つとして、目的とする機能を有する生体物質を過去の情報から合理的に設計する *rational design* がある。一方、より伝統的な戦略として、既存の生体物質にランダムに変異を導入して作られた多様な類似生体物質ライブラリーを構築し、そのライブラリーから目的とする生体物質を選抜する方法がある。井出輝彦氏は、長く企業のバイオテクノロジー開発研究に携わってきた経験をもとに、バイオテクノロジー研究においては、後者の方がより高い成功率を得られるとの考えを持つに至った。

バイオテクノロジーへの応用を目指して生体物質を改良する場合、その目的によって異なるレベルの高分子組織体が対象となる。しかし、異なる階層にある高分子組織体に対しても、バイオテクノロジーの伝統的な戦略、すなわち多様な類似生体物質ライブラリーの構築とそのライブラリーからベストな生体物質の選抜、が常に適用できることを、井出輝彦氏は実証してきた。

井出輝彦氏は、この経験をベースに、バイオテクノロジーにおける伝統的な戦略が、ペプチド、タンパク質、細胞という 3 つのレベルで適用でき、また有効であったことを主張する論文を執筆しようという思いに至った。この主題については、過去に多くの総説等で議論されているが、アカデミアでの仮想的な議論はなく、実用化を見据えた企業研究の中から生まれた結論であり、本博士論文の主題とその主張は説得性に富んでいる。

### II. 当該研究分野における位置づけ

本博士論文は、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した研究で構成されている。その第一は、オリゴペプチドに注目し、大腸菌 O157 のべん毛タンパク質（フラジェリン）を認識するオリゴペプチドを探索した（大腸菌 H7 抗原認識ペプチドの単離および細菌検出）。その第二は、タンパク質レベルでの研究で、自然界から新規酵素遺伝子を直接単離する方法を構築した（自然界からの酵素遺伝子単離法開発）。その第三は、細菌細胞を対象にして、機能性物質であるアスタキサンチンの生産性改良に取り組んだ（*Paracoccus* 属細菌のカロテノイド生産性の改良）。

第一の研究は、2000 年前後に行われ、論文として 2002 年に発表されている。比較的低分子のオリゴペプチドが構造的に類似した大腸菌のべん毛タンパク質を識別できるという結果は興味深く、発表後 15 年を経過した今日でも、この論文は引用されている。

第二の研究は、化学品合成に頻繁に利用されるハロゲン化反応を触媒するハロペルオキシダーゼ（HPO）遺伝子を、天然の海洋細菌より、培養という過程を経ずに分離しようと

いう研究である。この方法は、広くメタゲノムのアプローチと呼ばれていて、多くの研究が行われている。特に近年は、ゲノム解析技術が格段に進歩し、さまざまな環境中に生息する微生物のメタゲノム情報が得られている。しかし、メタゲノム情報から得られた酵素遺伝子配列をもとに、例えば大腸菌内でその酵素活性を発現させようという試みは、高い確率で失敗している。これに対して、本研究で使用されたカセット PCR 法では、高い確率で、酵素活性を示す遺伝子を回収できており、将来、より注目されて良い技術と考えられる。

第三の研究では、細菌によって、強い抗酸化作用を持つアスタキサンチンを製造する研究である。海洋細菌である *Paracoccus* sp. N81106 株はアスタキサンチンを生産するが、その生産性は、緑藻類などに比べ圧倒的に低かった。本研究では、商業化が可能となるレベルまでアスタキサンチンの生産性を上昇させることを目指し、生産性を 50 倍にすることでその目的を達成した。応用研究の模範となる研究成果である。

### III. 論文の構成（目次と各章の概要）

本論文は以下の構成となっている。

序論

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 2 章 自然界からの酵素遺伝子単離法開発

第 3 章 *Paracoccus* 属細菌のカロテノイド合成能の改良

結論

序論の前半では、バイオテクノロジーの研究の方法論に対する井出輝彦氏の哲学が述べられている。また、序論の後半では、本論のレジюмеが書かれている。本論は 3 章から構成され、それぞれが、ペプチド、タンパク質、細胞という 3 つのレベルでの新規機能性生体物質の創製について述べられている。各章に、緒言、実験材料および方法、結果、考察、要約と総括という項が設けられており、読みやすい。

結論では、既存の化学合成プロセスを生物機能を利用したプロセスで代替する、いわゆる「グリーン化プロセス」あるいは「ホワイト・バイオテクノロジー」への期待が述べられている。バイオ燃料生産など直接的に環境調和を目指すバイオテクノロジーに加え、生物材料の機能の探求・改良により環境調和型の産業創出を目指すべきという主張が述べられている。

### IV. 論文の成果

本論文の成果は、広くバイオテクノロジーに展開できる可能性を秘めている。

病原性大腸菌 *E. coli* O157:H7 を検出するオリゴペプチドの創製に成功した研究では、動物免疫、ハイブリドーマー作製等の煩雑な工程を経ることなく、認識分子の創製が可

能であることを実証した。この技術は、病原性細菌等の検出のみならず、より広範な応用に添加できると思われる。

本研究の第二の成果は、カセット PCR 法により自然界から直接、新規なハロペロキシダーゼ遺伝子を 18 種類単離することに成功したことである。ハロペロキシダーゼは化学品合成の中間体に利用されるハロゲン化反応を触媒する酵素であるが、今回分離に成功した新規遺伝子から、新規なハロゲン化反応を触媒する酵素が発見されることが期待できる。また、DNA シャフリング等の酵素改良技術と合わせることで、より、好ましい酵素の創製が可能であると考えられる。

海洋細菌である *Paracoccus* sp. N81106 株によるアスタキサンチンの生産性改良が第三の成果である。この研究を通して、*Paracoccus* に適用でき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し、その基礎研究的成果を利用して *Paracoccus* sp. N81106 株の課題であった生産性を大幅に改善することができた。この研究の特徴として、その前半において、企業の研究にはめずらしく、基礎研究に時間をかけたことが挙げられる。また、後半では企業の研究にふさわしく、商業化に必要なアスタキサンチン生産性を算出し、それを目標値として研究を進め、最終的に目標値を達成した。目標値を設定して研究を進めるというアプローチは、将来企業で働く研究者を育成するアカデミアにおいても、もっと取り入れられても良いと思われる。

## V. 論文の課題

本論文の第二の成果であるカセット PCR 法による新規なハロペロキシダーゼ遺伝子の単離についてであるが、単離された遺伝子にコードされたハロペロキシダーゼの基質特異性等についてより踏み込んだ解析をすれば、この研究のインパクトがさらに上昇したと思われる。試問を行った結果、そのような解析は既に実施され、ハロペロキシダーゼによる塩素化合物合成は、ケミカルプロセスによる生産効率を凌駕しなかったそうである。企業内研究の多くは論文として公開されない場合が多いが、アカデミックには興味ある結果であり、近い将来、その内容が論文として公開されることを期待している。

## VI. 論文の評価

多様な類似生体物質ライブラリーを構築し、そのライブラリーから目的とする生体物質を選抜するという伝統的な生体物質改良技術が、ペプチド・酵素・細胞という 3 つのレベルでの新規生体物質材料・触媒を開発するうえで有効であることが、本論文の成果によって明快に示された。この 3 つのレベルでのそれぞれの研究は、学術的貢献度が高いことに加え、上記の生体物質改良技術がバイオテクノロジー開発研究における最も信頼性の高い技術であるという井出氏の主張を裏付けている。このことから、本論文が博士（理学）の学位論文として価値あるものであることを認める。