

## 1. 研究の目的

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。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。しかしながら、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。この構造の複雑さから、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、目的とする機能を有する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としてオリゴペプチドに注目し、本研究では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、自然界からの酵素遺伝子を直接単離する方法を構築した。第三のレベルとして、細菌を対象に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。

## 2. 内容

### 2-1.大腸菌 H7 抗原認識ペプチドの単離および細菌検出

#### (1)背景・目的

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、オリゴペプチドによるターゲットの特異的検出を目指した。

表層抗原には、べん毛繊維を構成するタンパク質（フラジェリン）である H 抗原やリポ多糖である O 抗原が知られている<sup>1)</sup>。本研究では、構造情報が豊富な H 抗原をターゲットとした。なかでも、近年問題となっている病原性大腸菌 *E. coli* O157:H7 が持つ H7 抗原を認識ペプチドの創製に取り組んだ。

#### (2)方法・結果

H7 抗原をコードする H7 フラジェリン遺伝子を、フラジェリン合成欠損株である *Escherichia coli* K-12 YK4130 株に導入することによって、K-12 株中で H7 抗原を発現させた。この株を培養後、H7 フラジェリンを高純度に調製した。H7 抗原を認識するペプチドの単離は、ファージ・ディスプレイ法を用い、 $10^8$  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、なかでも、最も結合性の高かった H7 結合性ペプチド (LHIHRPTLSIQG) は  $EC_{50}$  値が  $1.9 \mu\text{M}$  であった。また、他の H 抗原 (H1, H5, H12, H23) との競合的 ELISA 法によって、本ペプチドは H7 抗原に選択的に結合することが示された。

蛍光標識の H7 結合性ペプチドを用いて H7 抗原発現大腸菌の検出を試みたところ、H7 抗原発現大腸菌は蛍光標識され、H7 抗原非発現大腸菌は蛍光標識されなかった。

### (3)成果

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。本技術を他の表層抗原認識ペプチドの創製に展開する事により、広く、病原性細菌等の検出に利用することができる。また、抗体作製に求められる動物免疫、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することができた。

## 2-2.自然界からの酵素遺伝子単離法開発

### (1)背景・目的

タンパク質の改良には、立体構造を基にして変異すべきアミノ酸残基を同定し、部位特異的変異導入法によって改良タンパク質を取得するタンパク質工学的手法が多用されている。しかしながら、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機会が多い。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。

一方、PCR によるランダムな変異導入により作られた変異遺伝子ライブラリーの中から、求める特性を有するタンパク質を選択・単離する方法が開発され、多くの成功例が報告されてきた。これらの事例は、遺伝子ライブラリーの多様性が、酵素改良に係わるタンパク質改良の根幹であることを示している。ランダム変異した遺伝子ライブラリーの課題は、好ましくない変異が導入される確率が好ましい変異が導入される確率よりも圧倒的に高いという点にある。本研究では、より良質な酵素遺伝子ライブラリーを作製するために、自然界に存在する多様な微生物の持つ酵素遺伝子を、培養を介することなくカセット PCR 法<sup>2)</sup>によって直接分離することを試みた。ターゲットとする酵素遺伝子は、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) とした。

### (2)方法・結果

まず、HPO を有する *Pseudomonas putida* ATCC11172 からゲノム DNA を調製し、PCR 法により HPO 遺伝子の単離を行った。大腸菌発現ベクターに同遺伝子を挿入し大腸菌に導入したところ、粗酵素抽出液に HPO 活性を有することを確認した。次に、*P. putida* ATCC11172 の HPO 遺伝子を解析し、Blast 法により HPO 遺伝子の 5'末端側および 3'末端側にある 2 箇所の保存領域を同定し、両保存領域それぞれをコードする縮重プライマーを設計した。この縮重プライマーを用いることにより、両保存領域に挟まれた多くの HPO 遺伝子の中央部分を PCR 増幅できると考えられる。そこで、海水から細菌由来と考えられる DNA を調製し、縮重プライマーを用いて PCR を行ったところ、HPO 遺伝子の中央部分と考えられるサイズに DNA が増幅された。

*P. putida* ATCC11172 の HPO 遺伝子の 5'末端断片と 3'末端断片、および上記の HPO 遺伝子中央部分断片とを混合し、カセット PCR 法<sup>2)</sup>により完全長 DNA を作製し、発現ベクターに挿入後、大腸菌に導入した。形質転換された任意のコロニーをピックアップし、粗酵素抽出液を用いて HPO 活性を測定した。大腸菌約 600 クロンの抽出液を評価したところ、HPO 活性を示すクローンを、高い割合で同定できた。HPO 活性を示した大腸菌の保有するプラスミド中の HPO 遺伝子解析の結果から、約 18 個の新規遺伝子を同定することに成功した。

### (3)成果

カセット PCR 法により、自然界から直接 HPO 遺伝子の単離に成功した。HPO 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 18 個の新規遺伝子から、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 シャプ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。

### 2-3. *Paracoccus* 属細菌のカロテノイド生産性の改良

#### (1)背景・目的

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機能性カロテノイドである。カロテノイドを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合成能を有するものが単離・同定され、さらに、遺伝子レベルでの解析を終えた微生物も数多く報告されている。なかでも、藻類由来のアスタキサンチンの産業化が先行しているが、光を供給する培養法や煩雑な抽出工程に課題を残している。本研究では、シンプルな設備によるカロテノイド生産を目指し、増殖に光を要求しない従属栄養生物であり、かつ、細胞構造が単純でカロテノイドを抽出し易い細菌類に焦点をあてて研究を行うこととした。

カロテノイドを合成する細菌として、*Paracoccus* 属に属する細菌が知られている<sup>3)</sup>。なかでも沖縄海域で発見された *Paracoccus* sp. N81106 株において、機能性カロテノイドであるアスタキサンチンが最終生産物として合成されることが報告された。そこで、*Paracoccus* sp. N81106 株を対象に、アスタキサンチンの生産性改良を行った。

#### (2)方法・結果

突然変異誘発剤である NTG により *Paracoccus* sp. N81106 株に変異処理を施し、コロニーの色調変化から突然変異株を選択した。突然変異とスクリーニングを繰り返して、変異株 NG5 を樹立する事に成功した。NG5 株は、*Paracoccus* sp. N81106 株に比べて約 17 倍、アスタキサンチンの生産性が向上していた。

さらに、改良するために *Paracoccus* 属細菌の遺伝子組換え技術の構築を試みた。大腸菌の遺伝子組換えで利用される pUC 系のベクターではこの細菌を形質転換することができなかったことから、グラム陰性細菌の広宿主域ベクターである pBBR 系を用いて遺伝子組換えを行った。併せて、組換えプラスミドの導入を高頻度で実現するために、大腸菌 *E. coli* K-12 S17-1 を使用して、接合伝達法の条件を最適化した。

組換えプラスミドとしては、アスタキサンチン合成の律速段階である  $\beta$ -カロテンの酸化反応に係わる 2 つの酵素遺伝子を挿入したプラスミド (pBBR1MCS2WZ) と、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) とを作製した。pBBR1MCS2WZ が導入された NG5 株では *Paracoccus* sp. N81106 株に比べてアスタキサンチンの合成量が約 20 倍向上し、さらに、CRT プラスミドが導入された NG5 株では約 50 倍向上した。

#### (3)成果

海洋細菌である *Paracoccus* sp. N81106 株のカロテノイド、特に、抗酸化作用等の機能性から注目されているアスタキサンチンの生産性改良について検討した。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することができた。

## 3. 結論

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る。自然界に存在する生物素材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。しかし、生物素材は既存の化学品である無機、有機素材より複雑な構造を有し、この構造を部分的に改変することで、機能性や安定性が向上した生物素材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「創製技術の構築」に取り組んだ。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、上記 2 つの技術を組合せ、機能性生物材料の大量生産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。オリゴペプチドについては、抗体代替を見据え、ペプチドによる *E.coli* O157:H7 の抗原マーカーとなる H7 抗原を認識する分子の創製に取り組んだ。10<sup>8</sup> 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) の取得に至った。抗体(分子量約 150 kDa)に対する分子量比が約 6%であっても、他の H 抗原に対して交差性を示さな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細菌検出を行ったところ、H7 抗原を特異的に認識できることを確認した。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持つことができ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 HPO の産業利用を目指して、自然界から多様な HPO 遺伝子を単離する方法の構築に取り組んだ。HPO 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、HPO 遺伝子の報告例も少なかった。

カセット PCR 法による海洋性の細菌からの、HPO 伝子の直接単離を行ったところ、18 個の新規な遺伝子を同定することに成功した。ゲノム配列が知られていない細菌から特定の酵素遺伝子を単離する一般的な方法では、その細菌から酵素を抽出し、カラムクロマトグラフィ等により精製し、アミノ酸部分配列を決定する必要があった。その上で、解明し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、コロニー・ハイブリダイゼーション法などによって、目的の遺伝子がクローニングされた遺伝子組換え体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、自然界から直接、多様な酵素遺伝子を単離できる。

微生物については、抗酸化作用の点で注目を浴びているカロテノイドを合成する *Paracoccus* sp. N81106 株を用いて生産性の改良について検討した。本研究では、変異育種による突然変異法と遺伝子組換え技術の 2 つを併用することにより *Paracoccus* sp. N81106 株の生産性改良を行った。

*Paracoccus* sp. N81106 株に変異育種を繰り返すことにより、カロテノイド含量が向上した変異体を取得することはできたが、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。アスタキサンチン前駆体である 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からである。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。

CO<sub>2</sub>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。

#### 4. 参考文献

- 1) Riley, L. W., *et al.*, Hemorrhagic colitis associated with a rare *Escherichia coli* serotype. *N. Engl. J. Med.* 308, 681 (1983).
- 2) A. Okuta, *et al.*, PCR isolation of catechol 2, 3-dioxygenase gene fragments from environmental samples and their assembly into functional genes. *Gene*, 212, 221 (1998).
- 3) A. Yokoyama, *et al.*, Production of astaxanthin and 4-ketozeaxanthin by the marine bacterium. *Agrobacterium aurantiacum*. *Biosci. Biotech. Biochem.* 58, 1842 (1994).