

「微生物機能を活用した高度  
製造基盤技術開発」  
(事後評価) 分科会  
資料 5 - 1

## 「微生物機能を活用した高度製造基盤技術開発」

### 事業原簿【公開】

担当部	独立行政法人新エネルギー・産業技術総合開発機構 バイオテクノロジー・医療技術部
-----	--

## —目次—

概要  
プロジェクト用語集

## I. 事業の位置付け・必要性について

1. NEDOの関与の必要性・制度への適合性…………… I - 1
  - 1.1 NEDOが関与することの意義…………… I - 1
  - 1.2 実施の効果(費用対効果)…………… I - 1
2. 事業の背景・目的・位置づけ…………… I - 1

## II. 研究開発マネジメントについて

1. 事業の目標…………… II - 1
2. 事業の計画内容…………… II - 2
  - 2.1 研究開発の内容…………… II - 2
  - 2.2 研究開発の実施体制…………… II - 16
  - 2.3 研究の運営管理…………… II - 18
  - 2.4 究開発成果の実用化、事業化に向けたマネジメントの妥当性…………… II - 19
3. 情勢変化への対応…………… II - 19
4. 中間評価結果への対応…………… II - 20
5. 評価に関する事項…………… II - 27

## III. 研究開発成果について

1. 事業全体の成果…………… III - 1
2. 研究開発項目毎の成果…………… III - 14
  - 2.1 高性能宿主細胞創製技術の開発…………… III - 14
  - 2.2 微生物反応の多様化・高機能化技術の開発…………… III - 100
  - 2.3 バイオリファイナリー技術の開発…………… III - 163
  - 2.4 総合調査研究…………… III - 220

## IV. 実用化、事業化の見通しについて

1. 実用化、事業化の見通しについて…………… IV - 1

## (添付資料)

- 添付資料 1 イノベーションプログラム基本計画…………… 添付資料 1
- 添付資料 2 プロジェクト基本計画…………… 添付資料 2
- 添付資料 3 技術戦略マップ(分野別技術ロードマップ)…………… 添付資料 3
- 添付資料 4 事前評価関連資料(事前評価書、パブリックコメント募集の結果)…………… 添付資料 4
- 添付資料 5 特許リスト…………… 添付資料 5
- 添付資料 6 論文リスト…………… 添付資料 6
- 添付資料 7 学会シンポジウム(口頭発表)リスト…………… 添付資料 7
- 添付資料 8 プレス発表等…………… 添付資料 8
- 添付資料 9 受賞リスト…………… 添付資料 9
- 添付資料 10 特許数・論文数・プレス発表数リスト…………… 添付資料 10

## 概要

		作成日	平成23年4月12日				
プログラム（又は施策）名	環境安心イノベーションプログラム						
プロジェクト名	微生物機能を活用した環境調和型製造基盤技術開発／微生物機能を活用した高度製造基盤技術開発	プロジェクト番号	P06014				
担当推進部/担当者	バイオテクノロジー・医療技術開発部/渡辺章夫（平成18年4月～平成19年3月） バイオテクノロジー・医療技術開発部/大菅康一（平成19年4月～平成20年3月） バイオテクノロジー・医療技術開発部/吉田准一（平成20年4月～平成20年5月） バイオテクノロジー・医療技術開発部/田辺信吾（平成20年6月～平成21年3月） バイオテクノロジー・医療技術開発部/芝上基成（平成21年4月） バイオテクノロジー・医療技術開発部/林耕造（平成21年5月～平成22年3月） バイオテクノロジー・医療技術部/山下恭平（平成22年4月～平成23年4月）						
0. 事業の概要	近年、資源枯渇やCO <sub>2</sub> 等排出物の環境への影響が懸念されている中、微生物機能を活用した有用物質の生産技術の開発が環境調和型循環産業システムにおける製造技術基盤として必要とされている。本プロジェクトでは、高性能宿主細胞の創製技術、微生物反応の多様化・高機能化技術、及びバイオリファイナリー技術（バイオマスを原料とした高効率生産技術）の開発を通し、バイオプロセスによって効率的に有用物質を生産するために必要な基盤技術を開発することを目的とする。本技術の確立により、エネルギー消費の低減、再生可能な資源であるバイオマスの利用等が達成され、環境調和型循環産業システムへの変革が期待される。						
I. 事業の位置付け・必要性について	本プロジェクトの技術開発は試行錯誤的でリスクの大きい面を持ち合わせているため、民間では開発費用を負担しきれない可能性がある。また、我が国の得意としてきたバイオ産業に欧米の参入の動きが進展しているため、国際競争力を確保し更に高めることが可能な基盤技術開発を国が促進する必要がある。						
II. 研究開発マネジメントについて							
事業の目標	（1）大部分が機能既知となるまでの遺伝子の多重削除により設計どおりに遺伝子改変の効果が引き出される微生物細胞開発及びその機能増強による高性能宿主細胞創製技術の開発 （2）複合酵素系や非水系などにおける反応場制御及び酵素の高機能化による微生物反応の多様化・高機能化技術の開発 （3）草本系ソフトバイオマスの効率的糖化及び高効率糖変換による基幹物質（化学品）の高効率生産体系であるバイオリファイナリー技術の開発、及び （1）（2）の（3）への技術集約によって、環境負荷の少ない微生物機能を活用した高度製造基盤技術を開発する。						
事業の計画内容	研究開発項目	H18fy	H19fy	H20fy	H21fy	H22fy	
	高性能宿主細胞創製						▶
	多様化・高機能化						▶
	バイオリファイナリー						▶
	総合調査研究						▶
開発予算実績額 （単位：百万円）	会計・勘定	H18fy	H19fy	H20fy	H21fy	H22fy	総額
	一般会計	0	0	0	0	0	0
	特別会計（需給）	1,645	1,235	917	892	402	5,091
	総予算額	1,645	1,235	917	892	402	5,091
開発体制	経済産業省 担当原課	産業技術環境局研究開発課、製造産業局生物化学産業課					
	プロジェクトリーダー	東レ株式会社 先端融合研究所 所長 専任理事 京都大学名誉教授 清水 昌					
	サブプロジェクトリーダー	財団法人バイオインダストリー協会 事業企画部長 穴澤秀治 大阪大学大学院工学研究科 大竹久夫 教授 財団法人地球環境産業技術研究機構 理事 湯川英明					
	委託先	（財）バイオインダストリー協会、協和発酵キリン（株）、花王（株）、旭硝子（株）、ダイセル化学工業（株）、メルシャン（株）、日本電気（株）、（株）カネカ、Meiji Seika ファルマ（株）、（独）製品評価技術基盤機構、（財）地球環境産業技術研究機構、東レ（株）、バイオ・エナジー（株）（H19まで）、（株）豊田中央研究所（H19まで）、月桂冠（株）（H19まで）、					

情勢変化への対応	バイオリファイナリー技術開発においては、新エネルギー技術部との連携を図り、実施内容を整理した。	
中間評価結果への対応	グループ間で有用な遺伝子と機能の情報を共有化し、プロジェクトとしての統合的な目標を設定し各グループを連携させるべく、研究者間レベルの合同研究開発委員会及び PL・SPL クラスのテーマ検討会を開催した。	
評価に関する事項	事前評価	平成17年度実施
	中間評価	平成20年8月4日 中間評価分科会 実施
	事後評価	平成23年4月21日 事後評価分科会実施

### Ⅲ. 研究開発成果について

#### 1. 事業全体

本事業の研究開発は計画どおり順調に進捗し、最終目標とする事項に対して達成できた。

#### 2. 個別テーマ

##### (1) 高性能宿主細胞創製

①大腸菌 DGF の研究開発では、野生株と同等以上の生育特性を示す DGF-298 株(ゲノムの 35%削除)の作製に成功した。染色体縮小化株群の ATP 供給能力は、野生株に比べ大幅に向上した。実験的な評価から、残存する削除できない機能未知遺伝子の割合は、目標の 10%以下(3.1%程度)であると結論した。また 4 つの重要機能未知遺伝子の機能解明を完了した。タイリングアレイ解析から、有用プロモーター群を見出した。成果を総合的に活用し、複数の化合物について、既報値を超える生産株育種に成功した。

②枯草菌 RGF の研究開発では、枯草菌細胞において、有用酵素生産に不要な遺伝子領域を 1.5Mbp 削除した株を構築する事に成功した。また、有用酵素分泌生産に関わる制御が窒素および炭素代謝制御により可能である事の特徴とする特異的遺伝子発現制御技術の構築にも成功した。細胞膜・壁の人工改変による溶菌抑制、分泌装置の増強を特徴とするユートリティー機能増強技術の確立に成功した。これらの技術を創製枯草菌 RGF 株(924 株)に適用し、モデル酵素として採用したセルラーゼの生産性をプロジェクト開始時の世界最高値の 2.5 倍向上させる事に成功した。

③分裂酵母 IGF の研究開発では、野性株と増殖性能が遜色ない 657.3kbp の染色体大規模削除株を完成し、この株の異種タンパク質生産性向上をヒト成長ホルモンおよびヒトトランスフェリンをモデルとして確認するとともに、そのメカニズムを解析した。さらに多座組込・誘導発現・分泌強化・糖鎖改良に関する技術開発を終了し、合わせて異種タンパク質生産性向上例を示した。

④発現タンパク質解析による微生物機能利用のための技術基盤の研究開発(独立行政法人製品評価技術基盤機構)では、高性能宿主細胞 DGF について、網羅的・定量的プロテオーム解析を実施した。結果として、解析対象菌株の代謝変化や有機溶媒耐性機構の解明につながるタンパク質の発現状況を捉えることに成功した。これらの成果は、解析対象菌株の新規バイオプロセスの実現に向けた基礎的なデータとなる。

##### (2) 多様化・高機能化

①非水系反応場におけるバイオプロセスの構築では、有機溶媒耐性 *K. rhizophila* DC2201 株(以下 DC2201)の発現系の開発、外来酵素遺伝子の発現検討、有機溶媒-水二相系反応場における物質生産検討を実施した。DC2201 の宿主ベクター系を開発し、ニトリラーゼ、不斉還元酵素、補酵素再生系酵素遺伝子の発現に成功した。医薬品中間体として有用な (R)-マンデル酸(RMA)、(S)-4-クロロ-3-ヒドロキシ酪酸エチル(ECHB)の生産に関して検討を行ない、大腸菌と比較して飛躍的に生産性が上がり、蓄積量(RMA 211 g/L、ECHB 355 g/L)も世界最高レベルであった。

②酸素添加酵素の高機能化・多様化技術の研究開発では、進化工学的手法、酵素結晶解析情報による機能改変したビタミンD水酸化酵素遺伝子を育種最適化した放線菌宿主に導入することで現行プロセス変換菌の数倍の STY の向上を達成した。

③酵素反応シミュレーション技術の開発では、構築したシミュレーション技術により一連の酵素反応のメカニズムを解析することが可能になった。本プロジェクトでは、P450 VDH 系に対して基質結合過程、水酸化反応、反応生成物解離過程を含む一連の流れに対するシミュレーションを実施し、反応メカニズムに関する多くの知見を得た。メルシャン社保有の P450 において、新規基質に対する変異部位予測を行い、水酸化反応の副反応を 1/3 に低減することに成功。シミュレーション技術の有効性が示された。

④補酵素再生系を含む複合酵素系による生産プロセスの開発では、複数の酵素の組み合わせや、補酵素の再生系、補欠因子族等を複合して使用する産業用触媒の創製によって、非天然L体アミノ酸類、キラルアルコール類において 100g/Lレベルの、またキラルアミン類、リン酸化糖類、ヒドロキシアミノ酸類、共役脂肪酸類、水酸化脂肪酸類などにおいて 30~50g/Lレベルでの生産が可能な各種の酵素的生産プロセスを開発した。

⑤非天然型抗生物質生産の基盤技術となる人工遺伝子クラスター法の開発では、人工遺伝子クラスター法技術を用いて非天然型抗生物質Bの発酵生産に成功した。その後、種々の生産性向上検討を実施し、約 50 倍に生産性を向上させることができた。その際の生産速度は 175mg/L/D-培養液であり、最終目標をほぼ達成できた。

⑥発現タンパク質解析による微生物機能利用のための技術基盤の研究開発(独立行政法人製品評価技術基盤機構)では、有機溶媒耐性菌 *R. opacus* B4 株、*K. rhizophila* DC2201 株について、網羅的・定量的プロテオーム解析を実施した。結果として、解析対象菌株の代謝変化や有機溶媒耐性機構の解明につながるタンパク質の発現状況を捉えることに成功した。これらの成果は、解析対象菌株の新規バイオプロセスの実現に向けた基礎的なデータとなる。

##### (3) バイオリファイナリー

①好気性工業微生物(コリネ型細菌)による高機能セルラーゼ(人工セルロソーム)の生産に成功した。

②酵素再利用法による連続糖化システムを構築、リグニン含有古紙の糖化で糖化率 80%を維持したまま、長時間連続糖化を確認し、糖化酵素コスト大幅低減の可能性を示した。

③糖代謝速度向上、細胞内酸化還元バランスの調整、代謝遺伝子発現レベルの最適化などの要素技術を確立、各種化合物(D-乳酸、L-アラニン、キシリトール、バリン)の高効率生成(10 g/L/h 以上)を示した。

④バイオマス由来混合糖(グルコース、キシロース、アラビノース、マンノース、セロビオース)完全同時利用こいいを確立、D-乳酸、キシリトール、バリンの高効率生成を確認した。

⑤膜利用発酵プロセスのパイロットスケール試験装置を開発し、D-乳酸発酵で STY10g/L/h を達成。高純度 D-乳酸が得られる NF/RO 膜を用いた膜利用精製プロセス基本技術を確立した。

	投稿論文	「査読付き」312件、「その他」96件
	特許	「出願済」152件(うち国際出願15件、PCT出願26件)
	その他の外部発表 (プレス発表等)	701件
IV. 実用化、事業化の見通しについて	<p><b>(1) 高性能宿主細胞創製</b></p> <p>①大腸菌DGFの研究開発では、作製した染色体縮小化株群は自社での利用以外にも他社へのライセンスアウトを交渉中である。また更に活用範囲を広げるため、アカデミアのグループへの分与を計画中である。2～3年後には、実用化の具体的な事例が出てくるように普及活動に努めている。実用化の事例がでてくれば、そこから2年以内には事業化に結びつくものと考えられる。</p> <p>②枯草菌 RGF の研究開発では、得られた高機能性宿主細胞を用いて、セルラーゼ、プロテアーゼなどの産業用酵素ならびに異種生物由来蛋白質の微生物工業生産技術を確立し、経済的生産性アップとコストダウンを実現する。また、得られた研究成果は国内外の学会発表及び論文発表として公開し、条件が合えば幅広くライセンスアウトし、実用化を加速する。</p> <p>③分裂酵母 IGF の研究開発では、旭硝子における異種タンパク質生産受託ビジネスへのIGF宿主ならびに技術の提供、および社外への積極的なライセンスアウトを行う。また公的・民間菌株分譲機関を活用し、宿主ならびに周辺ライブラリーを恒久的に保管・分譲し、かつ同様の技術移転機関を活用し、開発成果の普及を図る。</p> <p>④発現タンパク質解析による微生物機能利用のための技術基盤の研究開発(独立行政法人製品評価技術基盤機構)では、高性能宿主細胞 DGF は、代謝変化により、効率的な増殖を行うことで製薬分野における利用が推進される。</p> <p><b>(2) 多様化・高機能化</b></p> <p>①非水系反応場におけるバイオプロセスの構築では、有機溶媒耐性 <i>K. rhizophila</i> DC2201 に各種の反応を触媒する酵素遺伝子を導入することによって有機溶媒反応場で難水溶性化合物を原料にした医薬品中間体等の生産を3～5年後の実用化を目指して、検討して行く。</p> <p>②酸素添加酵素の高機能化・多様化技術の研究開発では、プロジェクトで達成した成果をビタミンD類水酸化体の製造に活用を検討するほか、独自に保有するP450水酸化酵素遺伝子ライブラリーを活用して、同様な開発手順で医薬としての新たな有用水酸化化合物の製造開発の展開を図ってゆく。</p> <p>③酵素反応シミュレーション技術の開発では、将来的には、製薬企業や化学関連企業に向けた解析サービスやコンサルティングが事業として有望であるが、まずは、弊社内での実用化を検討する。具体的には、自社内で事業化に向けて研究開発を行っている抗体や酵素を利用した分子センサの高度化に利用する。</p> <p>④補酵素再生系を含む複合酵素系による生産プロセスの開発では、非天然アミノ酸生産プロセス等の実用化レベルに達した生産プロセスについては、プロジェクト終了後数年以内での工業規模使用に向けて、製品の市場調査とコスト評価、及び技術導入時の経済的妥当性の検証を進め、必要に応じて製品化や設備取得に向けた工業化技術検討に移行する。</p> <p>⑤非天然型抗生物質生産の基盤技術となる人工遺伝子クラスター法の開発では、非天然型抗生物質Bの培養生産性についてはほぼ目標を達成し実用化可能なレベルにある。一方、実用化のためには、本物質が新規物質であるため培養液からの精製プロセスの開発が必要である。また、本物質は医薬品原体の合成中間体として利用されるため、合成工程への適用確認、得られた原薬の不純物プロファイル等の確認も必要である。</p> <p>⑥発現タンパク質解析による微生物機能利用のための技術基盤の研究開発(独立行政法人製品評価技術基盤機構)では、有機溶媒耐性株の非水系バイオプロセス中の酵素の発現状況が判明。物質変換可能な反応系が見いだされた。非水系バイオプロセスによる物質変換系が可能となった。</p> <p><b>(3) バイオリファイナリー</b></p> <p>①国内企業との共同により増殖非依存型バイオプロセスによる各種化学品・燃料の工業化研究を開始した。</p> <p>②本技術の実用化、事業化促進のため、有機酸以外の有用物質製造への適用実証、実用システム構築に重要な発酵・精製システムの運転技術開発、および汎用発酵システムとしての既存発酵システムとの優位性の明確化を行うことにより、高効率な微生物発酵プロセスの実用化・事業化に目処をつける。</p>	
V. 基本計画に関する事項	作成時期	平成18年1月、制定
	変更履歴	平成19年2月改訂、対象物質範囲拡大のため研究開発の目標の最終目標および達成目標の改定。 平成20年7月改訂、イノベーションプログラム基本計画の制定により、「(1)研究開発の目的」の記載を改訂

## プロジェクト用語集

用語	用語の解説
A-factor	Streptomyces griseus からストレプトマイシン産生を制御する物質として発見されたもので、放線菌による抗生物質の生産を調節する低分子ホルモン研究の先駆けとなった物質
CASSCF 法	Complete Active Space Self Consistent Field。シュレーディンガー方程式の解法のひとつ。鉄などのスピンの複雑な反応系を高精度で扱えて強力だが、計算量が 대규모である。
DFT 法	Density Functional Theory(密度汎関数法)。シュレーディンガー方程式の解法のひとつ。電子相関を取り込むエネルギー項に工夫があり、高い計算精度を比較的少ない計算量で達成できる。
error-prone PCR 法	エラープローン PCR 法の項に記載。
GFP 遺伝子	Green Fluorescent Protein(緑色蛍光タンパク質) 遺伝子
IS	インサーショナルシーケンス。長くても 2 kbp の転移する DNA 配列であり、染色体上の転移に必要なトランスポゼース(transposase) 遺伝子の両端にトランスポゼースが結合する配列を有している。栄養飢餓状態などで活性化し、複製して、染色体上の他の位置に挿入し、変異を引き起こす。
Latour 法	染色体上の特定の領域を、外来の配列を残存させずに削除する方法。特に長い領域を削除するときの効率が高い。分裂酵母において最初に開発されたが、糸状菌や担子菌での応用例が近年増えている。
LB 培地	トリプトン、酵母エキス、塩化ナトリウムを基本処方とする細菌用富栄養培地の一種
MD 法	Molecular Dynamics(分子動力学)。分子系を Newton の運動方程式に従って動かして熱的に揺らがせ、安定構造やダイナミクスを計算で調べる。通常は分子力学モデル(バネ・ビーズ)を使用する。
ORF	open reading frame。ゲノム上に存在するタンパク質の翻訳位置をいう。ゲノム上ではタンパク質の N 末端方向から翻訳される。タンパク質の N 末端からアミノ酸配列を解析することで、ゲノム上の翻訳開始位置を知ることができる。
PDI	Protein Disulfide Isomerase。適切な酸化還元剤存在下で、タンパク質のジスルフィド結合による架橋の組換えを促進する酵素。遺伝子組換えで生産されたタンパク質は、本来のジスルフィド結合が形成できずに不活性型になる場合が多いため、本酵素を用いてジスルフィド結合を正しくか

	け換えることで、タンパク質の高次構造形成と機能の発現が促進されると推定されている。
PTS	phosphoenolpyruvate-carboxylate phosphotransferase system。細菌に広く保存されている主要な糖類取り込み機構。解糖系の中間代謝物である phosphoenolpyruvate からのリン酸基転移と共役してグルコース、フルクトース、スクロースなどが取り込まれる。
SD 配列	Shine-Dalgarno sequence。原核生物の mRNA において、開始コドンの上流に見られる共通配列。5' 側に存在しリボソームの結合部位。ここにリボソームが結合することで、遺伝子の翻訳が進む。
アラニンスキャンニング	活性中心近傍のアミノ酸残基をアラニン残基に置換した変異体の活性を評価し、分子機能にとって重要な残基か否かを判断するツール。活性が低下した場合は活性発現に重要な残基であり、置換は好ましくないと推測できる。
イメージング質量分析計	TOF-SIMS。イオン照射により物質の表面から発生させた二次イオンの質量スペクトルから、材料表面の化学種が極微量 (ppm オーダー) の面分解能で得られる。表面の原子や分子を同定し、キャラクタリゼーションを行う。
エドマン分解法	プロテオーム解析に用いるタンパク質同定法の一つ。タンパク質を化学的に処理して N 末端方向から一つずつアミノ酸を生成させる。反応を繰り返すことでタンパク質のアミノ酸配列を測定する。
エラープローン PCR 法	試験管内で特定の遺伝子を進化させて高機能化を図る進化学的手法の一つで、DNA ポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) の DNA 増幅時に複製の厳密度の低い条件を選択することにより塩基の変異を導入する方法
エンドスタチン	内因性の抗血管新生ペプチドで、内皮細胞の増殖、遊走、管腔形成を阻害する。その構造は、XVIII 型コラーゲンの C 末端フラグメントである。
オペロン	複数の遺伝子からなる単一の転写単位。原核生物において、機能的に関連性がある複数の遺伝子が、単一の転写単位を構成することにより合理的な調節を可能にしている。
オリゴ糖	単糖類同士がグリコシド結合によって結合した化合物の中で、多糖類というほどは分子量が大きくないものを指す。
グローバルレギュレーター	複数の異なる代謝系・細胞機能遺伝子群の発現制御に関わる単一 (システム) の因子。
コンピテントセル	形質転換受容性細胞。外来 DNA を細胞内に取り込める状態の細胞。
コンビナトリアル生合成技術	生物の代謝産物の生合成に関与する酵素を組み合わせることにより、人工的にデザインされた新しい化合物を生合成させる技術
ジオキシゲナーゼ	分子状酸素を基質に二原子の酸素をもう一方の基質に化合させる反応

	を触媒する酵素。α-ケトグルタル酸を補因子とするものがある。
シグマ因子	遺伝子転写開始信号(プロモーター)を認識し RNA 合成を開始させるのに必要なタンパク質因子。同一生物種で様々なタイプのプロモーターを認識する複数の種類のシグマ因子が存在し、それぞれが RNA ポリメラーゼと結合して特定の遺伝子転写調節に関わる。
シトクロムP450モノオキシゲナーゼ	様々な有機化合物に一原子酸素を添加することによる水酸化やエポキシ化等の反応を触媒するヘム酵素群。微生物から植物、高等生物まで広く分布し、天然物、ホルモン合成、薬物代謝、解毒等にかかわる。酵素種や機能に広範な多様性をもつことで産業利用上でも注目されている。高コレステロール血症治療薬プラバスタチンは放線菌の本酵素による水酸化プロセスを経て生産されている。
シャペロン	タンパク質の立体構造形成(フォールディング)が困難な環境下で、タンパク質のフォールディングを援助する一連のタンパク質の総称。原核生物では、主に GroE システムと DnaK システムが知られている。
ショットガン法	プロテオーム解析に用いるタンパク質処理の一つ。混合タンパク質を消化酵素で分解し、含有するタンパク質に固有のペプチドを生成させる。後で生成したペプチド断片を分離し、アミノ酸配列を測定してタンパク質を同定する。
スーパーオキシドジスムターゼ	スーパーオキシドアニオンと水素イオンを反応させ三重項酸素と過酸化水素を生成する反応を触媒する酵素。活性の中心の金属によって、Cu/Zn-, Fe-, Mn-SOD がある。
ステレオコンプレックス PLA	ポリ L-乳酸とポリ D-乳酸を混合し、結晶化した樹脂。ポリ L-乳酸あるいはポリ D-乳酸単独より融点を 50℃程度向上することができ、PLA の課題とされる耐熱性を改善することができる。
ステレオブロック PLA	PLA1分子中に L-乳酸セグメントと D-乳酸セグメントをブロック状に配置した共重合体。ステレオコンプレックス同様、L 体あるいは D 体単独の PLA と比較して耐熱性を向上することができる。
セルラーゼ	セルロースなどの β-1,4-グルカンの β-1,4-グルコピラノイド結合を加水分解する酵素。植物、菌類、細菌など生物界に広く存在する。衣料用洗剤添加、バイオマス糖化、繊維処理などに有用である。Endo 型のエンドグルカナーゼや Exo 型のセロビオハイドラーゼなどが含まれる。
セルロース	分子式 (C <sub>6</sub> H <sub>10</sub> O <sub>5</sub> ) <sub>n</sub> で表される炭水化物(多糖類)である。植物細胞の細胞壁および繊維の主成分で、天然の植物質の 1/3 を占め、地球上で最も多く存在する炭水化物である。自然状態においてはヘミセルロースやリグニンと結合して存在する。
セルロソーム	セルラーゼ、キシラナーゼ等、多種類の多糖分解酵素と骨格タンパク質

	との高次構造複合体。絶対嫌気性細菌の <i>Clostridium</i> 属細菌等の細胞表層に見出され、高いセルロース分解活性を示す。
タイリングアレイ	タイリングアレイとは、解読済みのゲノムデータから等間隔に(タイル状に)抜き出した塩基配列を検出用プローブとして搭載した DNA チップのことである。タイリングアレイを用いた転写解析では、原理的にはゲノムから転写されたすべての RNA を検出することが可能である。
タイリングアレイ	ゲノム塩基配列情報をもとに、高密度に設計されたプローブを用い作製されたマイクロアレイ。転写解析では、転写単位の同定や未知の遺伝子、低分子 RNA の探索を行うこともできる。また、転写因子など DNA 結合タンパク質の結合部位の特定にも用いることができる。
トキシシン-アンチトキシシン	活性化すると細胞活動を阻害するトキシシンタンパクと、そのインヒビタータンパク(アンチトキシシン)からなるタンパクペアである。ストレス状態下で、アンチトキシシン不活化によるトキシシンタンパク活性化がおきて、細胞を死滅させることも報告されている。通常二つのタンパクをコードする遺伝子はオペロンを形成している。大腸菌には少なくとも 8 つのトキシシン-アンチトキシシン遺伝子ペアが存在している。
ドッキング法	化合物と標的タンパク質の複合体構造が不明や曖昧な場合に、化合物の大凡の配座を予測する計算手法。エネルギー的安定性や類縁タンパク質の複合体情報を活用する。
トランスクリプトーム	生物の細胞中に存在する全ての RNA の総体を指す。実際には DNA マイクロアレイを用いることによって、様々な条件下における転写された個々の RNA の動態の解析を示す。
トランスポゾンTf2	トランスポゾンは転位性の遺伝因子として知られており、真核生物のゲノムのかかなりの部分を占めている。分裂酵母の染色体上に 13 個存在している Tf2 と呼ばれるトランスポゾンは、CENP-B 相同体によって構成される核内構造の働きで、その機能が停止させられている。
ナノろ過膜	1nm前後のサイズをもつ分子の除去に用いる分離膜。限外ろ過膜と逆浸透膜の中間に位置し、分離対象は分子量数百までの低分子有機物質、マグネシウム、蒸発残留物などである。
ビタミンD水酸化酵素(Vdh)	<i>Pseudonocardia autotrophica</i> から精製された酵素で、ビタミンD3の1 $\alpha$ 位および25位を水酸化して活性化ビタミンD3を生成する。反応に空気酸素と電子伝達系を必須とするシトクロムP450モノオキシゲナーゼの一種
ヒト血清トランスフェリン(hTF)	鉄と結合する分子量 75,000 の糖タンパク質。血清中に存在する分子の1/3が鉄と結合している。鉄は1分子に2個と結合する。ジスルフィド結合が20か所、N-結合型糖鎖付加部位が2か所、分子内に存在する。
ヒト成長ホルモン(hG)	下垂体前葉で生産される成長促進作用を持つペプチドホルモン。191ア

H)	ミノ酸よりなり、分子量 22,000。2 か所のジスルフィド結合が存在する。血中濃度は 5ng/ml 以下、半減期 20 分。糖鎖修飾はされない。
プロテオーム解析	生物や細胞に発現している全てのタンパク質の集合をプロテオーム (proteome) という。細胞に含まれるタンパク質を網羅的に発現状況や性質を研究することをプロテオーム解析という。プロテオミクス (proteomics) ということもある。
プロモーター	プロモーターとは、転写開始に関与する DNA 上の特定領域のことで、バクテリアでは遺伝子の 5' 上流側に近接して存在する。この領域に RNA ポリメラーゼが結合し、転写が開始される。またプロモーター周辺には転写強度やタイミングを制御するレギュレーターとの結合領域が存在することも多い。
ペプチドマス・フィンガープリント法	プロテオーム解析に用いるタンパク質同定法の一つ。タンパク質を消化酵素で分解すると、アミノ酸配列の特定の部位で分解され、タンパク質に固有のペプチドが生成することを利用してタンパク質を同定する。
メタゲノム手法	微生物を分離・培養することなく、土壌や活性汚泥、海水などの環境サンプルから多種多様な微生物ゲノムの混合 DNA を抽出し、DNA ライブラリーを作製して、酵素活性や特定の遺伝子配列を指標に目的の遺伝子を分離する手法
メタボローム	細胞・組織・器官・個体の代謝産物を網羅的に測定し、個々の代謝物の動態を調べる。これら代謝産物はタンパク質、RNA などを介してネットワークを形成する。このネットワークの総体をバイオインフォマティクスの手法を用い研究を行う。
モバイルエレメント	染色体上への挿入や、脱離を行う DNA 配列のことを示す。溶原化ファージやインサーショナルシーケンス (IS)、トランスポゾンなどが含まれる。モバイルエレメントが活性化すると、染色体への組込み、染色体からの離脱などが生じて、遺伝形質が不安定化する。
ラセミ体	光学活性化合物の2種類の鏡像異性体 (エナンチオマー) が等モル混合した状態の化合物をいう。光学活性化合物のもつ性質である旋光性を示さない。
リパーゼ	トリグリセリドを分解する加水分解酵素。油脂の改変や衣料用洗剤添加で使用される他、エステル合成や光学分割剤に使用される。
リボスイッチ	mRNA の 2 次構造変化により転写調整を行う制御機構構造のひとつ。主に、mRNA の 5' UTR に位置し、直接リガンドと結合して遺伝子の転写終結や翻訳を制御する。
亜臨界水	水の温度・圧力を 374°C、22MPa 以上まで上げると、水 (液体) でも水蒸気 (気体) でもない状態となる。この点を水の臨界点といい、臨界点より上

	の領域を超臨界水と呼ぶ。臨界点よりもやや低い近傍の領域を亜臨界水と呼ぶ。
遺伝子クラスター	機能の関連した遺伝子が遺伝子群として染色体上で隣接して存在する場合、このような遺伝子群のことを遺伝子クラスターと呼ぶ。特に、抗生物質の生合成に関わる遺伝子群はクラスターを形成していることが多い。
逆浸透膜	濃厚溶液側に浸透圧以上の圧力を加えることにより、溶媒だけを希薄溶液側に移動させ、溶媒と溶質を分離するために使用する分離膜。分離対象は分子量数十から数百程度の低分子量物質やイオンである。
共役リノール酸	リノール酸の異性体のうち、炭素－炭素間の二重結合が2個共役した形の部分構造をもつ不飽和脂肪酸で、反芻動物の消化管内で微生物が産生する。抗癌効果、抗肥満効果、免疫賦活作用などがあるとされている。
光学活性	右手と左手の関係のように成分は同じなのに対称的な構造を持つ2種類の化合物のうち、一方の化合物(エナンチオマー)をいう。アミノ酸や糖などの生体成分の多くは光学活性であり、各々のエナンチオマーの生体内における性質は異なる場合が多い。
進化工学的手法	タンパク質(ここでは酵素)の機能向上を目的として、それをコードする遺伝子に対し、1.多数のランダム変異体の調製、2.簡便な機能アッセイ、3.所望の機能をもつ変異点の同定といった一連の操作を繰り返し、さらに有効変異の最適化、統合の結果、高機能化タンパク質を獲得する実験的手法
進化分子工学	変異、選択淘汰、増幅の3つの単位操作を繰り返すことで、生物進化(自然淘汰)を試験管内で人為的に加速させる手法であり、変異タンパク質ライブラリーから目的の機能を有する個体のみを効率的に選抜する方法
増殖非依存型バイオプロセス	RITE 提案の新規プロセス。菌体を反応槽に高密度充填し無通気で反応させることで、細胞増殖非依存的に糖変換を行う。コリネ型細菌が還元条件下で増殖を停止しながら高い糖代謝活性を維持する性質を利用している。
糖化	糖の高分子ポリマー(例えば、セルロース)を酵素(セルラーゼ)や化学薬品(酸)で分解し、グルコースなどの単糖あるいはオリゴ糖にまで分解すること。
発酵阻害物質	セルロース系バイオマス酵素糖化の前処理過程で、過分解により生じるアルデヒド類、フェノール類、有機酸などで、発酵プロセスを阻害する物質。該バイオマス利用技術開発の大きな障壁となっている。
反応場	触媒(ここでは酵素)を用いて基質物質から目的の生産物に変換する反応において酵素、基質、生産物の局在、アクセス・反応様式、濃度、機能因子、促進因子等からなる反応制御因子が作用する場の総称を言う。反

	応槽、細胞、タンパク質レベルでの観点がある。
補酵素	酵素の蛋白質部分(アポ酵素)と可逆的に結合して酵素の作用発現に寄与する補欠分子族のこと。ふつうアポ酵素のみあるいは補酵素のみでは活性をもたないが、両者が結合すると複合体を形成し酵素作用を示すようになる。
無細胞タンパク質合成	cell-free protein synthesis system。生細胞を用いずに、細胞内の転写・翻訳に関わる因子を利用して試験管内でタンパク質合成を行う方法

## I. 事業の位置付け・必要性について

### 1. NEDO の関与の必要性・制度への適合性

#### 1.1 NEDO が関与することの意義

微生物を利用した物質生産技術は伝統的に我が国の得意としてきた領域であるが、米国では微生物のゲノム解析等を精力的に進めており、欧州では White biotechnology として環境負荷の少ない生物を利用した工業プロセスを活用する動きが進展している。そこで、本分野の国際的な優位性を確保し更に高めるために、ゲノム情報等の最新の知見を適用した基盤技術の開発を強化・発展させる必要がある。

本事業の技術開発は複雑かつ基盤的であるが故に、試行錯誤的でリスクの大きい面を持ち合わせているため、民間企業等単独では実施することが困難である。従って、NEDO が積極的に関与する必要があると考えられる。

#### 1.2 実施の効果(費用対効果)

本事業により得られる高度製造基盤技術により、バイオプロセスを利用した化学品や医薬原料など有用物質の生産の拡大やエネルギー消費の低減、再生可能資源であるバイオマス利用など、環境調和型循環産業システムへの変革が期待でき、実現した場合の波及効果は製造産業全般に及ぶ。

研究開発項目毎の予算配分は以下の通りである。

表 1.2.1 研究開発項目毎の予算実績（単位：百万円）

研究開発項目	H18fy	H19fy	H20fy	H21fy	H22fy	計
高性能宿主細胞創製技術	304	275	188	182	82	1,031
多様化・高機能化技術	430	340	279	251	113	1,413
バイオリファイナー技術	879	594	429	439	198	2,539
総合調査研究	32	27	21	20	9	109
計	1,645	1,235	917	892	402	5,091

## 2. 事業の背景・目的・位置付け

### 2.1 事業の背景・目的

微生物を利用した工業原料等有用物質の製造プロセスは、一般に原油に由来しない原料を使用し、廃棄物も少ないといった特徴を有している。このため、近年、資源枯渇や CO<sub>2</sub>等排出物の環境への影響が懸念されている中、微生物機能を活用した有用物質の生産(バイオプロセス)技術の開発が環境調和型循環産業システムにおける製造技術基盤として必要とされている。こうした中で政府は、次項に記す通り、生物機能を活用した物質生産の発展の重要性を示している。他方、微生物を利用するバイオプロセス技術については、我が国は伝統的に強みを有するもの

の、米国では微生物のゲノム解析等を精力的に進めており、欧州では White biotechnology として環境負荷の少ない生物プロセスを活用する動きが進展している。このため、我が国の強みを一層強化するとともに、微生物機能を活用した有用物質の製造技術基盤の開発を強化・発展させる必要がある。

このような背景の下、本事業では、高性能宿主細胞の創製技術、微生物反応の多様化・高機能化技術やバイオマスを原料とした高効率生産技術（バイオリファイナリー技術）の開発を通し、バイオプロセスによって効率的に有用物質を生産するために必要な基盤技術を開発することを目的とする。

本技術の確立により、エネルギー消費の低減、再生可能な資源であるバイオマスの利用等が達成され環境調和型循環産業システムへの変革が期待される。

## 2.2 科学技術基本計画および分野別推進戦略

ライフサイエンス分野は、第2期科学技術基本計画（2001年3月閣議決定）および第3期科学技術基本計画（2006年3月閣議決定）において、国家的・社会的課題に対応した研究開発の重点推進分野とされている。

第2期分野別推進戦略（2001年9月総合科学技術会議）においては「生物機能を高度に活用した物質生産・環境対応技術開発」が重点領域に位置付けられ、バイオプロセスによる有用物質生産技術の競争力強化のためには、ゲノム情報やバイオインフォマティクス等のゲノム関連技術を活用し、生物の持つ多様な機能を高度に活用する必要があると謳われている。また、第3期分野別推進戦略（2006年3月総合科学技術会議）においても、戦略重点科学技術のひとつとして「生物機能活用による物質生産・環境改善科学技術」が選定されている。

## 2.3 生物機能活用型循環産業システム創造プログラム／環境安心イノベーションプログラム

経済産業省では、研究開発プロジェクトを政策目標ごとに分類し、成果の市場化に必要な関連施策（規制改革、標準化等）と一体的に推進することを目指して、平成13年度より「研究開発プログラム」制度を導入している。

そのひとつである「生物機能活用型循環産業システム創造プログラム」は、工業プロセスや環境関連分野へのバイオテクノロジーの利用を促進することにより、生物機能を活用した高度ものづくり社会の構築を図りつつ、廃棄物、汚染物質等の生分解・処理技術の高度化を通して、環境に調和した循環型産業システムの創造を図るものである。

本事業は上記プログラムの一環として、微生物機能を活用した環境負荷の少ない高度製造基盤技術を開発するものとして立案された。

なお、17件策定されていた研究開発プログラムは、平成20年4月に再編され7件となった。これに伴い、上記プログラムは「地球温暖化防止新技術プログラム」、「3Rプログラム」および「化学物質総合評価管理プログラム」と統合され、「環境安心イノベーションプログラム」と改称された。

また、本事業はエネルギー需給構造の高度化への寄与という観点から、総合エネルギー効率

の向上や新エネルギーの開発等を掲げた「エネルギーイノベーションプログラム」にも再掲されている。

## II. 研究開発マネジメントについて

### 1. 事業の目標

#### 1.1 事業全体の目標

##### (最終目標)

高性能宿主細胞創製技術については、大部分が機能既知となるまでの遺伝子の多重削除により、設計どおりに遺伝子改変の効果が引き出されるように恒常性維持機能を低減させた微生物細胞への特異的遺伝子発現制御機能付与及び補酵素供給等のユートイリティー（主要代謝系補助）機能増強によって、プロジェクト開始時における世界最高値の2倍以上の生産性を達成する。

微生物反応の多様化・高機能化技術については、複合酵素系や非水系などにおける反応場制御技術の開発と、遺伝子改変等による酵素の高機能化技術の開発を行い、既にバイオプロセスにより生産できることが知られている物質については STY (Space/Time/Yield: 反応容器の時間あたりの生産量) 数 g/L/h 以上、バイオプロセスによって生産できることが知られていない物質についてはその10分の1以上（医薬品等の高付加価値品については実用化に十分な STY の数倍以上）の生産を行うことにより、バイオプロセスの実用化適用範囲を拡大する。

バイオリファイナリー技術については、草本系のソフトバイオマスについて、原料濃度 10% にて 1 日で 90% の糖化を行える技術を開発する。また、糖から新たに6種の基幹物質を STY10g/L/h 以上で継続的に生産することのできる技術を開発する。これにより実用的に利用可能なバイオマスを原料として高効率で糖化し、各種化成品等生産のための基幹物質を、生成した糖から高効率で生産するバイオプロセス体系を開発・構築する。

これらの研究開発によって、環境負荷の少ない微生物機能を活用した高度製造基盤技術を開発する。

##### (中間目標)

平成 20 年度末までに、以下のことの達成を目標とする。

高性能宿主細胞創製技術については、物質生産性の向上するゲノム改変例を示す。微生物反応の多様化・高機能化技術については、実用化に向けた手法を確立し、その実証例を示す。バイオリファイナリー技術については、糖化効率達成に向けての見通しを示し、糖からの STY10g/L/h 以上で3種の基幹物質を継続的に生産する新規な実例を示す。

## 2. 事業の計画内容

### 2.1 研究開発の内容

上記目標を達成するために、以下の研究開発項目について、研究開発計画に基づき研究開発を実施する。

#### 2.1.1 高性能宿主細胞創製技術の開発

遺伝子の大部分が機能既知となるまでの遺伝子の多重削除により、遺伝子強化・削減の効果が設計どおりに最大限に引き出されるように生物のもつ恒常性維持機能を低減させ、さらに、遺伝子発現制御機能付与及び補酵素供給等のユーティリティー機能増強によって物質生産に最適化された高性能宿主を創製する。

##### (1) 特異的遺伝子発現制御技術

システムバイオロジー技術の利用や遺伝子機能解明等に基づき、増殖から物質生産への切り替えや代謝フラックスの切り替え等の生産性向上に寄与する特異的遺伝子の発現制御技術を開発する。

##### (2) ユーティリティー機能増強技術

補酵素供給機能増強やオルガネラ機能増強など、物質生合成速度向上につながる機能を付与した宿主細胞を開発する。

#### 2.1.2 微生物反応の多様化・高機能化技術の開発

バイオプロセスの実用化適用範囲と有用性拡大のための微生物反応の多様化・高機能化として以下の研究を行う。

##### (1) 反応場制御技術の開発

取り扱い・制御の難しさから実用化の遅れている複合酵素系や、化成品の生産には適しているが酵素反応の難しかった非水系などの反応場について新規酵素のスクリーニング・人為的複合酵素系構成等の制御技術の開発を行い、バイオプロセスの適用範囲の拡大を行う。

##### (2) 酵素の高機能化技術の開発

極限微生物の遺伝子や進化工学の利用等の酵素の高機能化にとって重要と考えられる技術により、酵素の基質特異性の改変や耐熱性の獲得・向上等を行い、酵素の活性、効率、安定性等における高機能化を行う。

#### 2.1.3 バイオリファイナリー技術の開発

実用的に利用可能なバイオマス为原料とし、それから生産される糖、さらに糖から各種化成品等に至る過程にある基幹物質を、主にバイオプロセスで生産する総合的生産体系を開発・構築するために以下の研究を行う。

##### (1) バイオマス糖化技術の開発

リグニン含量の少ない草本系のソフトバイオマス等のバイオプロセスによる糖化技術を確立す

る。

## (2) 高効率糖変換技術の開発

バイオマスから生産される糖を原料に、各種化成品等を製造するための一連の基幹物質（C3からC6の有機酸等）を生産することが可能で、且つ STY が高い実用的な総合的バイオプロセス技術の開発を、増殖非依存型バイオプロセスの利用などにより行う。

### 2. 1. 4 個別研究テーマの計画内容の詳細

#### 2. 1. 4. 1 高性能宿主細胞創製技術の開発

以下の研究開発を実施する。

- ①大腸菌DGF (Designed Genome Factory) の研究開発 (協和発酵キリン株式会社)
- ②枯草菌RGF (Refined Genome Factory) の研究開発 (花王株式会社)
- ③分裂酵母高性能宿主細胞創製技術の研究開発 (旭硝子株式会社)
- ④発現タンパク質解析による微生物機能利用のための技術基盤の研究開発  
(独立行政法人製品評価技術基盤機構)

#### ①大腸菌DGFの研究開発 (協和発酵キリン株式会社)

平成13～17年度まで実施された「生物機能を活用した生産プロセスの基盤技術開発」においては、大腸菌K-12株を出発材料として、不要・有害遺伝子の削除を中心とした染色体の大規模加工を行い、より機能性の高まった宿主細胞(ゲノム縮小MGF株)を作製した。本研究開発では、MGF株を出発材料としてさらなる染色体大規模加工を行い、より高性能な宿主細胞を作製することを目的とする。具体的な目標としては、野生株とほぼ同等の生育特性を示し、かつ2.8 Mbp長以下の染色体を持つ株を構築する。遺伝子機能解析を進め、縮小化染色体上の排除不可能な機能未知遺伝子の割合が全遺伝子の10%程度にまで減らす。染色体縮小化株の加工・改良を進め、ユーティリティー供給機能を強化する。また物質性生産系の精密な発現制御が行えるシステムを構築する。これらを統合化して、プロジェクト開始時の世界最高値の2倍以上の物質生産性が発揮できる技術開発を行う。

#### ②枯草菌RGFの研究開発 (花王株式会社)

枯草菌細胞において、細胞増殖とタンパク質分泌生産に関わる基本遺伝子セットを有し、タンパク質分泌生産に関わる制御がプロモーター改変や低分子RNA等により可能であることを特徴とする特異的遺伝子発現制御技術、並びに細胞膜・壁の人工改変、翻訳装置の専有化、分泌装置の増強および集約化、代謝活動の持続及び細胞溶解阻止を特徴とするユーティリティー機能増強技術を確立する。これらの技術を創製枯草菌 MGF 株に適用し、工業酵素及び異種生物由来タンパク質についてプロジェクト開始時における世界最高値の2倍以上の生産性を達成する。

#### (1) 遺伝子機能解析(ゲノム縮小化技術/オミックス解析技術)

「生物機能を活用した生産プロセスの基盤技術研究」の成果を踏まえ、次世代型高機能宿主

の構築に向け、これまでに創製した宿主および研究成果を基盤として、さらに生育および物質生産に必要な基本的な遺伝子セットを残しつつ物質生産に不要な代謝や制御に関連する遺伝子を削除した枯草菌の創成を目指す。ゲノム縮小株のトランスクリプトーム、メタボローム動態の解析を行い、物質生産に最適な代謝系のデザインを行う。

#### (a) リパーゼ生産系の検討

H18 年度はリパーゼ評価系を構築し、取得変異株による生産性評価を行い、不要遺伝子と有用遺伝子の峻別を行う。H19 年度はリパーゼ生産性に必須な遺伝子の強化および不要遺伝子の削除に着手し、生産性向上の可能性を検証する。

#### (b) ゲノムの縮小化及びメタボローム、トランスクリプトーム解析

H18 年度はこれまでの研究成果を引き継ぎ、1~1.5Mbp 削除株創製のための削除技術の構築を目指す。H19 年度は構築した株を用いてトランスクリプトーム、メタボローム解析技術の構築を進める。H20 年度は 1~1.5Mbp 削除株を構築し、H21 年度は構築した株を用いてトランスクリプトーム、メタボローム解析を行う。H22 年度はオミックス解析技術を駆使して、大規模削除株の酵素高生産化メカニズムを明らかにすることを目指す。

#### (2) 特異的遺伝子発現制御(遺伝子制御技術/代謝最適化技術)

枯草菌の生産反応効率の改善を目指し、細胞の各種プロセスおよびパスウェイに関与する遺伝子の単一オペロンへの再配置を検討する。また、物質生産を人為的に制御する事を目指し、生育およびタンパク質生産に関連する遺伝子発現のスイッチングを人工的に制御できる様にデザインを行う。

#### (a) 遺伝子的人為的制御システムの検討

H18 年度は孢子形成シグナル伝達系における制御系の解析を行う。H19 年度は各種プロセス、パスウェイに関する遺伝子の単一オペロン化を目指す。H20 年度はプロモーターライブラリーを構築し、遺伝子の発現時期や強弱による制御システムの構築を目指す。H21 年度はプロモーターライブラリーによる制御システムを用いた酵素高生産化技術の確立を目指す。H22 年度は構築した技術のゲノム縮小化株への統合を目指す。

#### (b) MGF 株の生理機能評価及び物質生産効率の向上を目指した株のデザイン

H18 年度は MGF874 株の生理機能解析を行い、構築株の問題点や課題を明確にする。H19 年度はシグマ因子に対応したプロモーター構築や改変を行い、孢子形成中~後期での生産性向上の可能性を検証する。H20 年度は窒素代謝効率の向上を目指し、代謝経路のデザインを行い、生産性向上の可能性を検証する。H21 年度は糖代謝効率の向上を目指し、代謝経路のデザインを行い、生産性向上の可能性を検証する。H22 年度は構築した技術のゲノム縮小化株への統合を目指す。

#### (c) タンパク質生産を制御する遺伝子発現スイッチングのデザイン

H18 年度はリボスイッチおよび低分子 RNA を中心に人工的に制御可能なアテニューエーター構築の検索およびメカニズムの解析を検討する。H19 年度はシグナルとなる物質の検索および解析を行う。その上で、シグナル物質に特異的なスイッチングプロモーターのデザインを行い、より効率

的な物質生産の制御機構を目指す。H20年度はシグナルとなる物質の検索および解析から得られた情報をもとに、特異的なスイッチングプロモーターのデザインを試みる。H21年度はデザインしたスイッチングプロモーターを用いた酵素高生産化技術の確立を目指す。H22年度は構築した技術のゲノム縮小化株への統合を目指す。

### (3) ユーティリティ機能増強(高生産化技術)

枯草菌の代謝活動の持続化を目指し、細胞膜安定化技術およびヌクレアーゼ解析技術の構築に着手する。更に、タンパク質の分泌性向上を目指し、細胞壁組成の改変や転写・翻訳・分泌装置の改変および強化等を検討する。また、異種生物由来タンパク質の分泌生産律速に関与する遺伝子群の解析とシャペロンの強化等に着手する。

#### (a) 枯草菌の代謝活動の持続化の評価解析

H18年度はこれまで取得した変異株ライブラリーにおける枯草菌の代謝活動の持続化の評価を行う。H19年度は得られた知見から、代謝活動の持続化を引き起こす因子を明らかにし、生産系に結びつける。H20年度は代謝の持続化を引き起こす因子を明確にし、定常期以降の生産に結びつける。

#### (b) 細胞膜・壁の人工改変技術の構築

H18年度は細胞膜及び壁の構築に関連する遺伝子の強化及び削除と酵素生産性評価を行う。H19年度は18年度の知見を基に細胞膜・壁の人工改変技術の構築を目指す。H20年度は細胞表層電荷の人工改変技術の構築を目指す。H21年度は細胞表層電荷の人工改変によるセルラーゼ・アミラーゼ・プロテアーゼの各種酵素の生産性向上の可能性を検討する。H22年度は、各種細胞膜脂質合成関連遺伝子欠失によるセルラーゼ、アミラーゼ、プロテアーゼの生産性向上の可能性を検討する。

#### (c) プラスミド DNA の安定化

H18年度はヌクレアーゼのザイモグラム技術を構築する。H19年度は構築した技術を用いてヌクレアーゼ欠損によるプラスミド DNA の分解抑制を検証する。H20年度は構築した技術をゲノムサイズ縮小株に導入し、ヌクレアーゼ欠損によるプラスミド DNA の分解抑制を検証する。

#### (d) 転写・翻訳・分泌装置の改変及び強化による酵素及び異種生物由来タンパク質高生産化技術の構築

H18年度は、異種生物由来タンパク質の生産性向上の見られたゲノム縮小株を用いて酵素及び異種生物由来タンパク質の分泌生産律速因子(遺伝子群)の解析を行う。さらに、シャペロン因子及び翻訳と共役した分泌タンパク質分泌装置因子の増強および改変した評価用株を作成し、酵素および異種生物由来タンパク質の分泌生産性を検討する。H19年度は、H18年度の知見を元にシャペロン因子を含む分泌装置の増強、改変ならびに集約化した株を作成し、菌体外分泌の分泌効率の向上化を目指す。さらに、枯草菌ゲノム上に存在する10個のrRNAオペロンの一つを標的タンパク質生産用に改変し、リボソームを専有化する事による分泌効率の向上化を検討する。H20年度は、H19年度の知見を元にシャペロン装置ならびに分泌装置(SRP-Sec系およびTat系分泌輸送経路)の増強および改良を行い、蛋白質の菌体外分泌効率の向上化を目指す。さら

に、翻訳装置の標的酵素生産用への専有化を目指し、rRNAオペロンの一つを標的タンパク質生産用に改変する事で分泌効率の向上化を目指す。また、翻訳装置の定常期以降における安定化を目指す。H21年度はタンパク質分泌輸送装置構成因子(Ffh)に変異を導入し、セルラーゼ生産性向上の可能性を検討する。H22年度は、上記で構築した技術を用いヒト由来タンパク質の生産性向上検討を行う。

#### (4) ゲノム縮小株への高生産化技術の統合

ゲノム縮小株に、種々開発した酵素高生産化技術を統合し、セルラーゼ生産性を開発当初の2倍以上に向上した枯草菌 RGF の創製を目指す。

H21年度は枯草菌全ゲノムから 1.3Mb 以上の遺伝子領域を削除したゲノム縮小株をベースに、分泌装置 (*secY*) の高発現化およびアルギニン分解関連オペロン (*rocDEF*) 復帰技術を統合した株を開発し、セルラー生産性が向上するか検討する。H22年度は、開発した種々の酵素高生産化技術を更に統合し、セルラーゼ生産量を開発当初の2倍以上を目指す。

#### ③ 分裂酵母高性能宿主細胞創製技術の研究開発 (旭硝子株式会社)

高度に染色体を縮小した分裂酵母を宿主細胞として造成し、翻訳後修飾が活性発現や安定性に重要な蛋白質や生産に多段階反応を必要とする物質を効率的に生産させることを目的とする。そのために次の研究開発を行う。「特異的遺伝子発現制御技術の開発」として、同時に複数箇所に導入可能な形質転換法の開発と外部信号による制御可能な複数の特異的配列の特定を行い、ヒト成長ホルモンや翻訳後修飾が活性発現や安定性に重要な蛋白質ならびに乳酸や生産に多段階反応を必要とする工業材料原料の物質生産性が向上することを示す。また「ユーティリティー機能増強技術の開発」として、分裂酵母全遺伝子の網羅的解析を行い、エネルギー供給系としての細胞内ミトコンドリア含有量の調節・異種蛋白質生産時の構造維持に必要な分子シャペロン群・異種蛋白質の活性発現や安定性に重要な翻訳後糖鎖修飾・分泌生産能や生産物の比活性に影響する小胞体内品質管理のそれぞれに関わる主要遺伝子の絞り込みとその増強を行う。

最終目標として、遺伝子の大部分が機能既知となるまでの遺伝子多重削除により恒常性維持機能を低減させた分裂酵母宿主細胞に対する外来遺伝子機能安定導入・遺伝子発現制御機能付与などの特異的遺伝子発現制御技術開発やエネルギー供給系・分子シャペロン群・翻訳後修飾系・小胞体内品質管理に関するユーティリティー機能増強技術開発により、翻訳後修飾が活性発現や安定性に重要な蛋白質や生産に多段階反応を必要とする物質の生産性がプロジェクト開始時における世界最高値の2倍以上の生産性を達成する。

#### ④ 発現タンパク質解析による微生物機能利用のための技術基盤の研究開発 (独立行政法人製品評価技術基盤機構)

高性能宿主細胞創製技術の開発に必要な基盤技術を収集するため、協和発酵キリン株式会社が開発した大腸菌 DGF 中で、MGF-01 株及びその親株である *Escherichia coli* K-12 W3110

株(以下、「*E. coli* K-12 W3110 株」という。)を対象として、網羅的プロテオーム解析を実施した。大腸菌ゲノムに存在する遺伝子の約 40%が機能未知であり、その多くはゲノムから削除しても大腸菌の生育に影響を及ぼさないと推定されている。しかし、MGF-01 株にも生育に必須でありながら機能未知遺伝子が残存しており、高性能化のためには、残存遺伝子の更なる削除、残存機能未知遺伝子の機能解明、MGF-01 株と *E. coli* K-12 W3110 株との代謝の比較が必要である。本事業では、網羅的プロテオーム解析により(1) MGF-01 株及び *E. coli* K-12 W3110 株の培養条件の検討、(2)ショットガン法による網羅的プロテオーム解析、(3)ペプチドマスマーフィンガープリント法による網羅的プロテオーム解析、(4)エドマン分解法による機能未知遺伝子翻訳開始位置の決定、(5)データ解析及び提供を実施する。

#### 2. 1. 4. 2 微生物反応の多様化・高機能化技術の開発

以下の研究開発を実施する。

- ①非水系反応場におけるバイオプロセスの構築(ダイセル化学工業株式会社)
- ②酸素添加酵素の高機能化・多様化技術の研究開発(メルシャン株式会社)
- ③高効率酵素設計のための酵素反応シミュレーション技術の研究開発(日本電気株式会社)
- ④微生物複合酵素系の産業用触媒としての研究開発(株式会社カネカ)
- ⑤放線菌の活用による新規二次代謝産物の開発(明治製菓株式会社)
- ⑥発現タンパク質解析による微生物機能利用のための技術基盤の研究開発

(独立行政法人製品評価技術基盤機構)

#### ①非水系反応場におけるバイオプロセスの構築(ダイセル化学工業株式会社)

本事業では、化石資源非依存型、低環境負荷型の化学品製造プロセスを構築して行くために、これまで実用化が困難であった非水系反応場に利用可能なバイオプロセスの実現を目的として、(1)非水系生体触媒細胞デザイン技術、(2)複合反応システムデザイン技術に関する研究開発を実施する。(1)に関しては「生物機能を活用した生産プロセスの基盤技術開発」プロジェクトにおいて見出された有機溶媒耐性微生物である *K. rhizophila* DC2201 株(以下 DC 2201)等を利用して、疎水性物質の変換が可能な実用的生体触媒を作成する。そのためにダイセル化学工業が宿主ベクター系の開発を行うとともに、DC2201 等への水素酸化能付与に関する研究を東京大学と、水素利用細菌を宿主とした微生物触媒の開発を茨城大学と共同実施する。(2)に関しては、芳香族化合物等の疎水性物質の変換に有用な水酸化酵素、酸素添加酵素、炭素-炭素結合酵素、還元酵素、エネルギー再生酵素等を岐阜大学、独立行政法人 産業技術総合研究所(以下 産業技術総合研究所)と共同実施体制で収集する。また、岐阜大学、兵庫県立大学と酵素の有機溶媒耐性機構の解明を共同実施する。酵素のコンポーネント等の機能解析を行い、反応とエネルギー再生を組み合わせた複合反応システムを構築して、(1)で作成した非水系生体触媒細胞においてそれらの効率の発現を検討する。当該技術の有用性・汎用性を実証するため、有機溶媒を用いた非水系反応場で、医薬品、ポリマー原料となる芳香族酸、脂肪族アルコール等の生

成反応を実施する。

## ②酸素添加酵素の高機能化・多様化技術の研究開発(メルシャン株式会社)

本研究でメルシャンは *Pseudonocardia autotrophica* 由来のビタミン D3 水酸化 P450 酵素 (Vdh) の高機能化のため、進化工学的手法を用いて比活性が向上し副反応が抑制された改変 Vdh を取得する。さらに Vdh の機能最適化の結果、構築された酵素の能力を実証するために、バイオプロセスへの利用が想定される大腸菌や *P. autotrophica* などを宿主としたビタミン D (VD) 類の水酸化変換試験を実施する。一方で共同実施機関である産総研は Vdh と基質 (VD など) の複合体結晶構造解析を実施し、Vdh の基質認識メカニズムを原子レベルで明らかにする。

大阪大学では非水環境下での物質生産系の研究において、難水溶性基質の利用効率を高めるため、有機溶媒耐性細菌である *Rhodococcus opacus* B4 を用いた溶媒共存下での物質生産に取り組む。この時、定性・定量が容易な呈色反応(ベンゼンジオキシゲナーゼによるインジゴ生産)をモデルに、これらパラメーターの最適化や非水系で利用可能な補酵素再生系の導入などを行い、パーセントオーダーすなわち 10 g/l 以上の生産量を目指す。また、細胞内反応場制御因子解明のため、ゲノム中の約 4,000 の ORF に対し、それぞれを個別にノックアウトした1遺伝子破壊大腸菌ライブラリーを宿主に用いることで、P450 などの酸素添加反応の反応場に影響を及ぼす因子(遺伝子)を網羅的に探索する。得られた候補遺伝子は発現強化あるいは多重遺伝子破壊操作を行うことで酸素添加酵素にとって理想的な宿主微生物の構築を試みる。さらに大阪大学は広島大学と連携して *Rhodococcus opacus* B4 の親油性・有機溶媒耐性機構の解明を行う。トランスポゾンを利用した *R. opacus* B4 に対する変異導入とスクリーニングにより、親油性を失ったネガティブミュータントの取得を目指す。また、染色体加工技術を利用した解析から、有機溶媒耐性に重要な役割を果たしている遺伝子の探索を行い、親油性・耐性の分子機構の解明を行う。

## ③高効率酵素設計のための酵素反応シミュレーション技術の研究開発(日本電気株式会社)

高効率酵素や多様化酵素等目的に即した人工酵素を効率よく設計するための指針を与える世帯分子シミュレーション技術の開発と、本プロジェクトのメルシャン社の実施する P450 の高機能化への適用による開発手法の有効性実証を目的として、以下の研究開発を大阪大学、独立行政法人産業技術総合研究所及び茨城大学と共同実施する。

効率的な人工酵素を設計するために、QM/MM 法等のシミュレーションに基づいて酵素の反応機構を理論的に解明する基盤技術を構築する。CASSCF/MM 法と CASSCF-DFT 法に対して、エネルギー計算用プログラムを開発し、プロタイプ分子に対しての基本的動作を確認する。また、化学反応中間体・遷移状態の分子を取り扱うための関数系・アミノ酸配列の解析による構造活性相関の手法も援用しての自由エネルギー計算手法の検討を行う。P450 に関しては、最重要なヘム単体の電子状態を主として1点計算し、鉄原子の電荷・スピン状態に応じて変化する電子状態を計算・解析する。同時に力場作成用の基礎データを得る。P450 のアミノ酸置換対の複合体モデリング(結合配座の探索)や変異体評価を行う。基質と酵素の相互作用を独自のエネルギー成分

分割法によって解析する手法を開発し、副反応を抑制する変異予測を行う。モデル系に対して P450 の反応遷移状態を Broken Symmetry 計算等の手法により解析し部位選択性を解明する。共鳴ラマン分光測定により酵素の構造転移を解明していく。メルシャン社保有の P450 において、新規基質に対する変異予測を行い、構築したシミュレーション技術の有効性実証する。

#### ④微生物複合酵素系の産業用触媒としての研究開発(株式会社カネカ)

有用物質生産プロセスに用いる複合酵素系微生物触媒の開発を目標とする。平成 18 年度～20 年度は、高機能性複合酵素系の探索を中心とした研究開発を行なう。プロセスの構築に必要な情報を収集し、必要な酵素群を取得して、その機能解明及び高機能化検討を実施する。さらに、これら酵素群の使用によるプロセスの実現性を評価し、その実例を示す。平成 21 年度～22 年度は、ファインケミカル生産に有用な複合酵素系の機能発現制御技術の開発、及び反応場と生産プロセスの構築をめざした研究開発を展開する。すなわち、複合酵素系を微生物菌体内で実現するための遺伝子発現系を確立し、工業プロセスで使用可能な微生物を育種し、これを用いる生産プロセスを構築する。

具体的な研究対象としては、酵素的立体反転反応による光学活性化合物生産プロセスの開発をめざす。また、これを含む他の複合酵素系開発(アミノ基転移反応、オレフィン還元反応、水酸化反応、炭素-炭素結合反応、転移反応、ラジカル重合反応、二重結合転移・飽和化・不飽和化反応など)については、京都大学農学研究科と共同実施する。また、平成 19 年度には、ファインケミカル生産に加えて、コモディティケミカル生産プロセスの開発に向けた研究計画を追加した。

#### ⑤放線菌の活用による新規二次代謝産物の開発(明治製菓株式会社)

放線菌の有する二次代謝産物生合成に関する遺伝子の機能の解析及び改変を行い、代謝工学や人工的生合成遺伝子クラスターの技術を活用して、微生物を利用したプロセスで「非天然型」抗生物質の鍵化合物を生産させることを目的とする。

本研究開発においては、放線菌が生産する生理活性物質に焦点を当て、これを母核とする有用な「非天然型」生理活性物質の微生物による生産技術を検討する。一方では、放線菌が有する二次代謝酵素遺伝子を人工的生合成遺伝子クラスターの構成員として利用し、従来微生物では生産不可能であった化合物の生産を目指す。このような生産技術を開発することにより、環境調和型・資源循環型社会の構築に向け、従来の化学的プロセスから環境に優しいバイオプロセスへの転換を達成する。

本研究開発は東京大学大学院農学生命科学研究科 大西康夫教授(平成 21 年 7 月までは堀之内末治教授)と共同で実施する。明治製菓株式会社では「非天然型」生理活性物質生産菌の育種及び製造技術の開発を、モデル化合物として「非天然型」抗生物質 B を用いて実施する。中間目標として、二次代謝産物の生合成改変技術の確立を目指し、「非天然型」抗生物質 B の微生物による発酵生産を達成する。更に、最終目標として、微生物による非天然型二次代謝産物の量産化技術の確立を目指し、発酵による「非天然型」抗生物質 B の生産性を 200～300mg/L/D-培

養液にまで向上させる。一方、東京大学では、「非天然型」生理活性物質生産に必要な人工遺伝子クラスター法に関する基盤技術開発を実施するとともに、「非天然型」生理活性物質の量産化に活用できる基盤技術開発のため、二次代謝産物生合成の制御に関する研究開発を実施する。

⑥発現タンパク質解析による微生物機能利用のための技術基盤の研究開発(独立行政法人製品評価技術基盤機構)

バイオプロセスに用いる微生物反応の多様化・高機能化技術の中で、非水系バイオプロセスを実現するためには、有機溶媒耐性菌(以下、「OSR 株」という。)の有機溶媒重層培養時の挙動や有機溶媒耐性機構を明らかにする必要がある。OSR 株の有機溶媒耐性機構は、油脂成分であるミコール酸を大量に含有する細胞膜の特殊な細胞膜構造や薬剤排出機構が関係していると考えられていが現状では解明されていない。また、非水系バイオプロセスにおいてOSR株がどのような挙動を示すのか、物質生産にどのような影響があるのかも解明されていない。

本事業では、非水系バイオプロセスを実現するために必要な有機溶媒耐性菌 *Rhodococcus opacus* B4 株(以下、「*R. opacus* B4 株」という。)、*Kocuria rhizophila* DC2201 株(以下、「*K. rhizophila* DC2201 株」という。)について、(1)OSR 株の培養条件の検討、(2)ショットガン法による網羅的プロテオーム解析、(3)ペプチドマスーフインガープリント法による網羅的プロテオーム解析、(4)エンドマン分解法による有機溶媒耐性重要遺伝子の翻訳開始位置の決定、(5)膜タンパク質のプロテオーム解析技術の開発、(6)データ解析及び提供を実施する。

#### 2. 1. 4. 3 バイオリファイナリー技術の開発

以下の研究開発を実施する。

- ①ソフトバイオマス糖化技術の開発・増殖非依存型バイオプロセスの開発・トータルシステムの開発(財団法人地球環境産業技術研究機構)
- ②メンブレン利用高効率発酵システムによる有機酸製造基盤技術の開発(東レ株式会社)

①ソフトバイオマス糖化技術の開発・増殖非依存型バイオプロセスの開発・トータルシステムの開発(財団法人地球環境産業技術研究機構)

バイオリファイナリー技術開発は、ソフトバイオマスから糖を調製する糖化技術と糖から基幹物質を製造する糖変換技術に大別し得る。本研究開発では、これらの技術及び双方を連結したトータルシステムの開発を実施する。

(1)ソフトバイオマス糖化技術の開発

【対象とするソフトバイオマス資源】

コーンストーバーと古紙を対象とする。その理由は、資源的性質としてリグニン含量がほぼ同等であることによる。(Bioresource Technology 96:673-686 (2005))。また、コーンストーバーは、ソフトバイオマス資源として『国際標準資源』、すなわち、米国 DOE 傘下の研究機関はじめ欧米各国の

研究機関で糖化技術の検討に最も広く使用されている“資源”であり、糖化技術の国際的なデータ比較が可能となる。さらに実用化の観点からも、アジア地区でのソフトバイオマス資源実用化に最も可能性の高い資源として期待されている。一方、古紙は“国内産資源”であり、回収システムが確立しており逆有償も含めて経済性が発揮しうる“ソフトバイオマス資源”である。

本研究開発で対象とする古紙は、“一般的な古紙”(新聞紙 ダンボール等)ではなく、企業で使用した「事務書類(ノーカーボン紙、感熱紙を含む)」であり、オフィス機密古紙と称せられる。ノーカーボン紙、感熱紙を混合していることから、技術的にもこれらからのリサイクルはきわめて困難である。さらに、2005年4月に施行された個人情報保護法により企業内での使用済書類紙はその処理量の増加が見込まれるので、糖化資源として最適である。(現状はほぼ全量焼却処理されており、資源化への期待はきわめて大きい。

### 【酵素糖化技術】

ソフトバイオマスの糖化工程は酵素による処理が key となる。しかしながらコーンストーバー、古紙に対し直接酵素処理を行うことは、酵素が作用する表面積が少ないこと等から実質的ではなく該ソフトバイオマスに対する前処理が必要となる。“前処理の狙い”として酵素によるセルロース類への作用が効率よく行われる状態、すなわち、ソフトバイオマスの表面積(酵素によるアタックを受ける面積)を増加させる微裁断が有効である。次に、高次構造リグニンによる、酵素によるセルロース類へのアタックへの阻害を軽減させるため、微裁断されたソフトバイオマスの膨潤化が有効である。ハードバイオマスと比べてリグニン含量の少ないソフトバイオマス(コーンストーバー、古紙;リグニン含量は10-15%程度、Bioresource Technology 96:673-686 (2005))は、製紙工業で実用化技術として開発されている微細裁断工程、続く膨潤工程(水熱処理等)の既存技術をベースとし最適条件の設定により、酵素糖化に適応可能な状態とし得る。

酵素糖化はセルロソーム機能を利用する。セルロソームはセルラーゼと蛋白質の高次構造複合体で、絶対嫌気性 *Clostridium* 属細菌 (*Clostridium cellulovorans* 等数種の菌) が細胞表層に生成し、*Trichoderma reesei* 等が生産するセルラーゼに比べて、蛋白質あたり数十倍高いセルラーゼ分解活性を有することが知られている。しかしながら、セルロソーム生成微生物である絶対嫌気性 *Clostridium* 属細菌は極端に増殖が遅いことから、経済性あるセルロソーム製造は不可能とされ、バイオマス糖化への利用研究において対象とされてこなかった。

しかしながら我々はセルロソーム機能解析、セルロソーム形成に関わる分子生物学的解析等を実施し、セルロソーム機能を工業微生物(枯草菌)に導入することに成功した。この知見をベースに経済性を有するコストにてセルロソームを製造するための基盤技術開発を行う。

一方、我々はリグニンを含まない上質古紙を対象として酵素再利用による連続糖化法を確立し、酵素使用量の大幅削減によるコストダウンが可能となることを示した。この技術をリグニン含有古紙に応用することで古紙原料からの混合糖製造に関する早期工業化に向け開発を行う。酵素再利用システムにおける反応条件の最適化とあわせて、セルロソームを含めた各種追加酵素添加による糖化促進を検討する。

本研究開発では、酵素糖化に用いるセルロソームに関して、遺伝子／酵素群の構造及び発現メカニズムの解析、人工セルロソームの構築と工業微生物(コリネ型細菌等)による高生産技術の開発等を行い、コーンストーパー及び古紙等のソフトバイオマス高効率糖化プロセス確立のための基盤技術開発に目処を得ることを目標とする。

## (2) 増殖非依存型バイオプロセスの開発

現在、米国におけるバイオリファイナリーの糖変換技術では、主として発酵法を基礎として研究開発が行われている。しかしながら、発酵法は微生物の増殖に依存した生産法であるため、増殖の場と時間が必要であり、化学反応と比較して生産性が低く、設備費が高いため固定費が極めて大きくなる等の欠点を有している。本研究開発で用いるコリネ型細菌は、特殊条件下(還元状態)では、増殖は停止するものの主要な代謝系は維持され機能する性質を持っている(コリネ型細菌以外の微生物では同様な現象は報告されていない)。さらに、増殖非依存条件下では通常の増殖状態よりも、細胞あたりの代謝活性が高く、より高い物質生産能力を有することも報告されている。この増殖非依存型プロセスの構築により、欧米に対して日本独自の高度経済性を有するバイオリファイナリーを実現するための技術を開発する。

増殖非依存型バイオプロセスの開発は、(a) 増殖抑制条件下における細胞機能の統合的解明、(b) 基幹物質生産細胞の創製、(c) 糖からの各基幹物質製造プロセスの確立 の3つの研究項目より構成されている。

### (a) 増殖抑制下における細胞機能の統合的解明

発酵法をプロセスの観点から考えると、最も究極的な形態は微生物細胞の増殖を停止させ、代謝経路のみを回転させた微生物細胞を物質生産に用いることである。この理想的なバイオプロセスでは、①目的物質生成に必要な微生物を高密度に反応器に充填して「触媒」として用い、②該反応装置に原料糖類を添加し、連続的に物質生成をさせることができる。ところがこのようなプロセスはこれまでまったくの夢物語とされ、「分裂を停止した微生物細胞の代謝活性のみを利用することはできない」と考えられていた。しかしながら、最近、増殖を停止した状態でも物質生産が可能な微生物が見出された。本プロジェクトで用いるコリネ型細菌は、ある特殊な条件下(還元状態)では、増殖は停止するものの主要な代謝系は維持され機能する性質を持っている(コリネ型細菌以外の微生物では同様な現象は報告されていない)。さらに、この非増殖条件下では通常の増殖状態よりも、細胞あたりの代謝活性が高く、より高い物質生産能力を有することも報告されている。この還元状態での物質代謝の統合的な全容解明を行うため、糖の取り込みと生産物の排出、糖代謝、酸化還元状態、生体内物質の寿命、細胞複製等の細胞機能について、コリネ型細菌(R株)の全ゲノム解析情報に基づき、トランスクリプトーム解析、プロテオーム解析、メタボローム解析等の網羅的解析技術を駆使して解析を行う。これらの知見をバイオリファイナリーによる基幹物質生産のための代謝工学的改変の基盤情報として活用する。

### (b) 基幹物質生産細胞の創製

基幹化合物生成細胞の創製には、上記(a)で実施した「増殖抑制下における細胞機能の統合的解明」に基づいて、糖を原料とした基幹物質代謝系を最適に設計および改変を行う。

中央代謝系についてはグローバルレギュレーターの調節やプロモーターの改変等により制御し、代謝系の最適な組み合わせを設計してエネルギー獲得系の効率化を図る。個々の基幹物質代謝経路に関しては、細胞内酸化還元状態を最適化する代謝系を設計し改変することにより、糖からの目的生産物の生産効率を最大化する。また、誘導/強力プロモーター等により発現制御した高機能酵素遺伝子を導入し、一方で不要となる副生成物代謝経路を抑制し、生産物の排出系を強化することにより生成細胞の生産性を全体的に向上させる。また、代謝系の改変や酵素機能強化に必要な遺伝子は、メタゲノム法等により広範囲な遺伝子資源より探索し、DNA シャッフリング等の手法により活性や基質特異性をさらに改善する。以上、これまでに蓄積してきたゲノム工学や染色体工学手法を駆使して高生産性バイオリファイナリー基幹物質生成細胞を創製する。

### (c) 糖からの各基幹物質製造プロセスの確立

増殖非依存型バイオプロセスの開発は、上記(b)で創製した基幹物質生産細胞を順次用いて行う。これまで研究実績のあるコリネ型細菌の野生型代謝機能を利用した増殖非依存型バイオプロセスを基盤として、基幹物質生成細胞を用いてまず大量菌体触媒調製法を確立し、増殖非依存条件下で各基幹物質生産に適応した高効率物質生産のための最適基礎反応条件、高濃度菌体反応条件及び大容量反応条件等を設定する。また、増殖非依存型バイオプロセスの反応液は無機塩培地と糖だけであり反応後も副生成物が少ないことから、目的生産物の分離・精製には「膜」の利用が最適である。日本には「膜」分離・精製技術の先進企業が多く、効率的かつ経済性のある増殖非依存型バイオプロセスを実現するため、このプロセスに最適な高機能分離膜を選択し分離精製の評価を行う。

本研究開発では、増殖抑制条件下におけるコリネ型細菌の細胞機能の統合的解明により、ソフトバイオマスからの各種基幹物質高効率生産に必要な基盤要素技術を確立し、増殖非依存型バイオプロセスにより 10 g/L/h 以上の生産性を示すことを目標とする。

### (3) トータルシステムの開発

米国を中心とするバイオリファイナリーの早期実用化への動きは目まぐるしい程である。日本におけるバイオリファイナリーの早期産業化には本プロジェクトのごとく集中研究体制にて基盤技術の早期確立が肝要なことは無論であるが、より一層の早期実用化へは該技術体系に関する工業化基礎データの効率的な取得蓄積が必須である。

本研究開発の 2 つの主研究項目、ソフトバイオマスの糖化および増殖非依存型バイオプロセスに関するトータルシステムとして工業化基礎データの取得を研究第 2 年度よりプラスコスケールに

て開始する(研究期間後半からは詳細な物質収支把握可能な規模の小型装置による検討を実施する)。両工程の相互関連事項として、例えば、一般的に糖化工程で発生する所謂“発酵阻害物質”による、基幹物質生産への影響を把握する。これらの検討により、研究開発の全期間終了を待つことなしに、期間内において、基盤技術確立を終えた基幹物質に関する工業化研究を本研究開発の“枠外”として、企業にての実施を可能とする。

#### (4) ベンチプラントによる実証試験

増殖非依存型バイオプロセスの早期工業化を目指して、スケールアップ時の反応条件の最適化を検討する。

#### ②メンブレン利用高効率発酵システムによる有機酸製造基盤技術の開発(東レ株式会社)

バイオマスを原料とした高効率な有用物質の生産技術において、高性能分離膜を高度に利用したバイオリクターシステムによって、発酵プロセスおよび生産物の分離・精製プロセスの大幅な効率化を図るものである。すなわち、高性能高分子分離膜およびその関連技術と代謝制御発酵技術を融合させ、反応容器の時間当たりの生産量であるSTYが、10g/L/h以上で、かつ、工業生産規模で、実用的な膜利用発酵リアクターの開発を行い、遺伝子組換え、代謝工学などにより、各種有機酸を高収率で生産する有機酸製造用組換え微生物を創出し、上記バイオリクターシステムに適用することによって、高STYを維持した長期間連続発酵基盤技術を開発する。

また、発酵生産された有機酸を含む発酵液からの有機酸の精製には多くの精製分離工程、および濃縮工程が必要で、生産コスト高の要因となっている。よって、有機酸の精製を飛躍的に効率化する高選択性分離膜(ナノろ過膜(NF膜)、逆浸透膜(RO膜)など)を組み込んだダウンストリーム研究開発に取り組む。研究開発は、ベンチスケールでの精製検討を進め、有機酸の膜利用精製基本技術を確立する。

#### 2.1.4.4 総合調査研究(財団法人バイオインダストリー協会)

プロジェクトリーダーの指導の下、研究開発委員会開催、関連技術情報・特許周辺情報等の調査、各委託先への技術提供等による研究支援・方向性調整等を行なう。

本プロジェクトの一体的かつ円滑な推進及び、研究成果の検討による適切な研究の方向性の調整、研究者間の情報交換・意見交換による効率的な研究の推進等を目的として、外部の有識者に委嘱した研究開発委員を交えた、本プロジェクトの全実施機関による「研究開発委員会(本委員会及び分科会)」を設置し、本委員会を年1回程度、各研究開発項目実施関係者での分科会を年1~2回程度開催する。財団法人バイオインダストリー協会を代表委託先とする連名契約の研究体及び、(独)製品評価技術基盤機構(NITE)、(財)地球環境産業技術研究機構(RITE)及びその再委託先、株式会社東レが研究開発委員会の参加メンバーである。研究開発の進捗に併せて適宜研究打ち合わせを開催し研究計画を検討する他、関連技術情報、特許周辺情報等の調査を行い連名契約の研究体のメンバーに提供する。

(1) プロジェクト全体運営関連諸事項の検討

PL、SPLとの意見交換を行いながら、本プロジェクト全体および、各研究開発項目についての運営・研究計画・研究方針等について検討する。

(2) プロジェクト各研究開発項目グループ間における情報交換と成果の相互利用の検討

年1回程度の本プロジェクト全実施機関と研究開発委員からなる研究開発委員会(本委員会)の開催等により研究開発結果の発表と議論・検討、研究の体制・方向性・運営方針等についての検討、調整を行う。また、各研究開発項目グループ間および研究開発項目グループ内の各研究テーマ間での連携を促進し、効率的な研究開発の進展を図る。必要に応じて、下記(4)で行った調査の結果を報告する。

(3) プロジェクト個別テーマの進捗状況把握と検討、研究内容の調整と方向付けの検討

研究開発委員会での検討の他に、年1~2回程度、各研究題目内のそれぞれのテーマについて研究従事者による研究開発委員会分科会を開催し、適宜研究開発委員を交えて個別研究テーマについての詳細な進捗状況の報告・検討を行い、研究内容を調整し方向付けする。また、研究者同士の情報交換を図る。その他、研究開発の進行に当たり、必要に応じて会議を開催し、円滑かつ迅速な問題解決、方針の策定、情報整理に努める。

(4) プロジェクト関連技術情報の調査及びその他関連情報の交換による情報の共有化

有益な技術情報等の調査を文献調査等により行うほか、大規模な情報調査を外部調査機関等を活用して平成18年度は2件程度、19年度は1件程度、20年度は1件程度、21年度は1件程度、22年度は1件程度行い、本プロジェクトの関係者に提供して研究開発の推進に資する。また、適宜、研究開発に重要な情報の交換を媒介し、研究者間の情報共有化を図る。さらに、特許の確保を促進するため、特許周辺情報の調査を行う。

(5) 代表委託先としての検査

代表委託先として、平成18年度、19年度は協和発酵キリン株式会社、花王株式会社、旭硝子株式会社、ダイセル化学工業株式会社、メルシャン株式会社、日本電気株式会社、株式会社カネカ、明治製菓株式会社、バイオ・エナジー株式会社、株式会社豊田中央研究所、月桂冠株式会社の検査を、平成20年度、21年度、22年度は協和発酵キリン株式会社、花王株式会社、旭硝子株式会社、ダイセル化学工業株式会社、メルシャン株式会社、日本電気株式会社、株式会社カネカ、明治製菓株式会社の検査を実施する。

## 2.2 研究開発の実施体制

### 2.2.1 実施体制

本事業は公募によって選定された 15 機関への委託事業として開始された(「実施体制図」参照)。

そのうちバイオ燃料生産技術として推進すべきと判断されたテーマの委託先 3 社については、平成 20 年度に別事業「バイオマスエネルギー先導技術研究開発／加速的先導技術」の委託先として整理し、本事業での委託は終了した(「3. 情勢変化への対応」参照)。

また、旭硝子(株)の共同実施先であった香川大学については、共同研究内容を統括していた研究員が九州大学へと移籍したため、平成 20 年度より九州大学への共同実施に変更した。

### 2.2.2 プロジェクトリーダー

なお、マネジメント強化の一環として、NEDO は以下の通り高い技術的知見を有する専門家にプロジェクトリーダー(PL)およびサブプロジェクトリーダー(SPL)を委嘱し、PL・SPL はNEDOと協力して進捗管理や各委託先への指導・助言を行った。

#### ・プロジェクトリーダー

東レ株式会社 専任理事 先端融合研究所長

京都学園大学法人事務局調査企画部・京都大学名誉教授

清水 昌

#### ・サブプロジェクトリーダー

##### <高性能宿主細胞創製技術>

財団法人バイオインダストリー協会 事業企画部長

穴澤 秀治

##### <微生物反応の多様化・高機能化技術>

国立大学法人大阪大学大学院工学研究科 教授

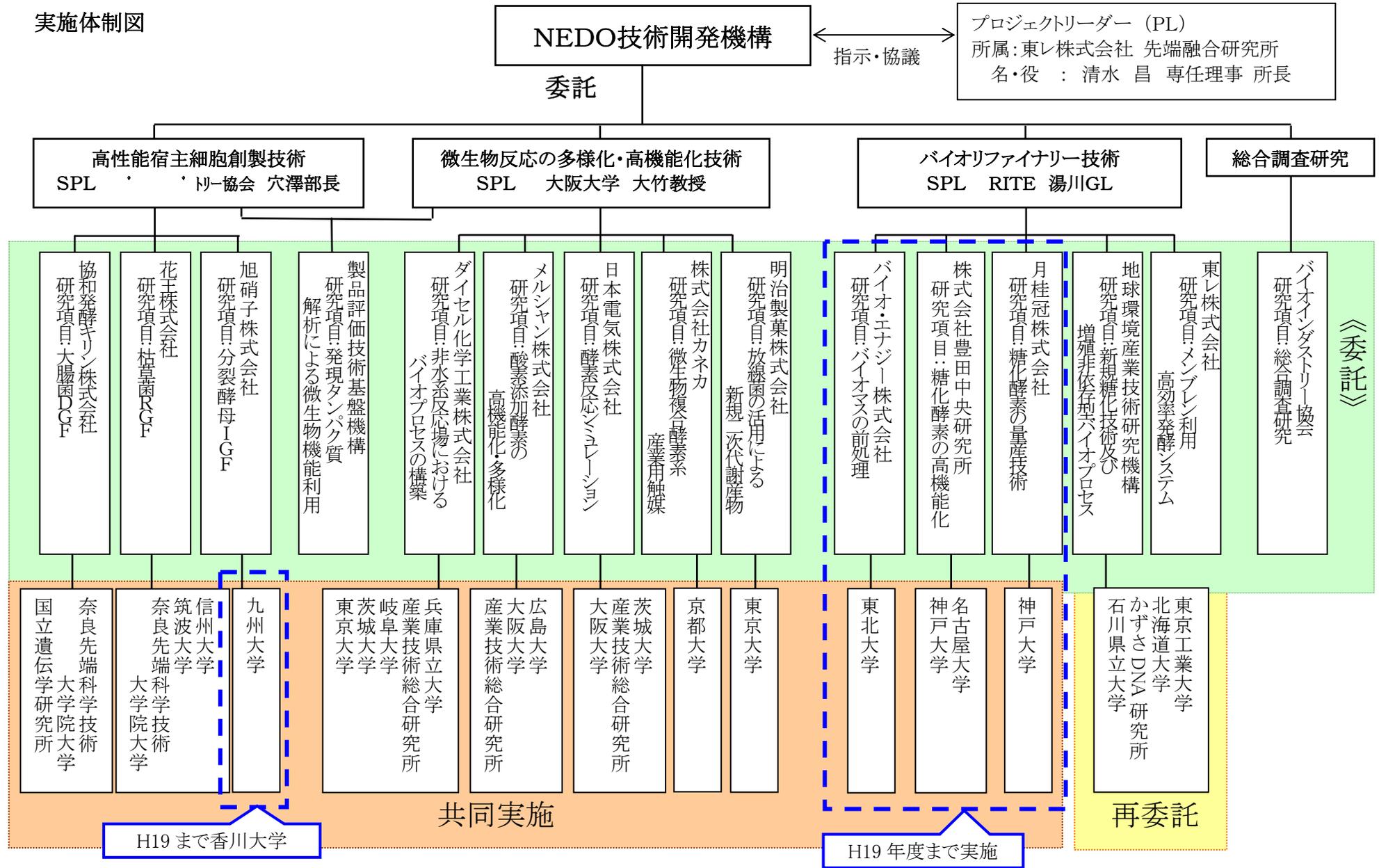
大竹 久夫

##### <バイオリファイナリー技術>

財団法人地球環境産業技術研究機構 理事 バイオ研究グループ グループリーダー

湯川 英明

実施体制図



### 2.3 研究の運営管理

研究開発全体の管理・執行に責任を有するNEDO バイオテクノロジー・医療技術部(バイオ・医療部)は、経済産業省及び研究開発責任者と密接な関係を維持しつつ、プログラムの目的及び目標、並びに本事業の目的及び目標に照らして適切な運営管理を実施した。

具体的には、研究開発委員会を開催し、進捗報告を受けて情報共有を行うと同時に外部有識者の意見を運営管理に反映させた。これまでに開催した研究開発委員会は以下の通り。

- 第1回 平成18年6月5日(月)
- 第2回 平成19年2月28日(水)
- 第3回 平成19年6月29日(金)
- 第4回 平成20年2月26日(火)
- 第5回 平成20年7月14日(月)
- 第6回 平成21年3月2日(月)
- 第7回 平成21年7月31日(金)
- 第8回 平成22年3月1日(月)
- 第9回 平成23年1月31日(月)

上記に加え、研究テーマ毎の分科会をそれぞれ毎年1回開催し、進捗状況や研究計画についてより詳細に議論した。また、年に2～3回NEDO 技術開発機構による経理検査を実施し、予算の行状況の管理を行った。

#### 研究開発委員会における登録委員

名	所属・役
清水 昌	東レ株式会社 専任理事 先端融合研究所長
穴澤 秀治	京都学園大学法人事務局調査企画部・京都大学名誉教授(フロンティア)
大竹 久夫	財団法人バイオインダストリー協会事業企画部長(フロンティア)
湯川 英明	大阪大学大学院工学研究科教授(フロンティア)
野 久	(財)地球環境産業技術研究機構 理事 フロンティア研究グループリーダー(フロンティア)
太田 明	富山県立大学工学部生物工学科 教授
勝 瞭一	東京大学大学院農学生命科学研究科 教授
工藤 俊章	東北大学名誉教授
小長谷明彦	長崎大学水産学部海産物質科学講座 教授
中島 紫	東京工業大学総合理工学研究科 教授
森川 正章	明治大学農学部教授
辺 隆司	北海道大学大学院地球環境科学研究科 教授
大島 桂典	京都大学生存研究所 副所長 教授
家山 一夫	東レ経営研究所 特別研究員 日立造機株式会社 事業・製品開発本部開発プロジェクト部 部長

## 2.4 研究開発成果の実用化、事業化に向けたマネジメントの妥当性

研究開発委員会において各受託者の実用化の見通しについて発表させ、それに対してプロジェクトリーダー、サブリーダー、外部委員が意見を述べた。知財 についても、バイオリファイナリーおよびバイオプロセスに関する特許調査を継続して行い、委員会等で出願状況の報告と確認を行い、積極的な知的財産 取得を促進した。市場調査、海外での研究状況の調査を行い助言を与えた。

## 3. 情勢変化への対応

### 3.1 事業全般

本事業が開始された平成 18 年度以降、食料と競合しないバイオマス燃料の生産技術に対する社会的な要望が急速に高まった。そこで、NEDO 新エネルギー部(新エネ部)では既存の事業を拡充し、平成 20 年度より新たに「バイオマスエネルギー先導技術研究開発/加速的先導技術」を開始した。バイオリファイナリー技術は本事業で目標とする化成品製造だけでなく、バイオマス燃料生産にも適用可能な共通基盤技術である。そこで、本事業のバイオリファイナリー技術のうち実施者が希望したテーマについて外部有識者を交えた 査を行い、より早期にバイオマス燃料生産技術としての実用化を目指して推進すべきと判断された3テーマ「バイオマスの前処理(バイオエナジー)」「糖化酵素の高機能化(豊田中央研究所)」「糖化酵素の量産技術(月桂冠)」については、「バイオマスエネルギー先導技術研究開発/加速的先導技術」のテーマとして委託することとし、本事業での委託は終了した。

### 3.2 個別事業

2007(H19)年に協和発酵キリンが Affimetrix 社製 GeneChip マイクロアレイ解析システムの導入を追加で行った。マイクロアレイ解析システムを導入したことにより、転写解析のスピードがアップして、溶菌関連遺伝子の同定という成果につながった。

2007(H19)年に花王がリボソーム機能改変および評価を追加で行った。枯草菌は 10 個の rRNA(rrn オペロン)を有するが、2 コピーにまで削除しても細胞増殖およびセルラーゼ生産性は野生株に対して 80%程度を維持する事が判った。また、枯草菌の rRNA オペロンの改変によりセルラーゼ生産性が 20%向上できた。

2008(H20)年にメルシャンが微生物ゲノムドラフト配列解析有用遺伝子評価試験を追加で行った。ゲノム配列データが得られたことで、2 年間を見込んでいたビタミンD水酸化変換を効率化する遺伝子を 1 年以内に同定できた。この結果、水酸化ビタミンDの生産性を 3-4 倍に増加させることができた。

2007(H19)にカネカがキャピラリー電気泳動装置、蒸発光散乱検出システムの導入を行った。キャピラリー電気泳動装置及び蒸発光散乱検出システムを導入したことにより、複合酵素系を用いる光学活性アミン生産プロセスの開発スピードが加速され、実用化レベルの技術開発につながった。

2006(H18)年、RITEが連続糖化試験装置、糖化解析システムの導入を追加で行った。高効率糖化プロセスの開発として、酵素再利用による連続糖化システムを構築し、リグニン含有古紙の糖化では糖化率80%を維持したまま、400時間超の連続糖化を確認した。

2007(H19)年、RITEが芳香族化合物分析・解析システムの導入を追加で行った。芳香族化合物生産の基盤技術の構築のため、キーとなる芳香族化合物中間体の生産株を構築し、当該代謝経路改変に必要な関連遺伝子に関する知見を得た。

2008(H20)年、RITEがベンチスケール試験システムの導入などを追加で行った。増殖非依存型バイオプロセスの工業化に必須な基盤要素技術の実証のため、該プロセスのスケールアップを検討し、フラスコスケールレベルと同等以上の生産性が得られた。

2008(H20)年、東レが微生物連続培養追加装置、運転データ計測記録装置等の導入を行った。微生物連続培養装置の追加仕様を施した追加装置、詳細な運転データ取得可能な記録装置を導入できたことで、メンブレン利用発酵リアクターの試験が効率的に行えるようになり、検討加速につながった。

#### 4. 中間評価結果への対応

##### 4.1 プロジェクト全体に関する評価に対する対応

###### 4.1.1 中間評価および指 事項

###### 4.1.1.1 総合評価

本プロジェクトは、我が国が伝統的に得意としてきた領域での微生物機能を活用した有用物質生産技術の研究開発であり、環境保全、バイオ燃料、資源の利活用の観点から意義深い。また、昨今のゲノム解読、生物学的知見や遺伝子操作技術・分析技術などの著しい進展を背景に、国際的に優位性を有する画期的なバイオプロセスの開発を目指している点で高く評価できる。さらに、得られた成果はレベルが高く中間目標をほぼ達成しており、化学工業やバイオ産業に関連する成果が多く実用化への期待も大きい。しかし、各個別テーマ及び各サブテーマの開発内容については、今後の最終目標の達成に向けて焦点を絞る必要もある。一方、個別テーマを担当しているグループごとに目標を達成しようとする傾向がみられるが、グループ間の連携を強化すべきである。【1】実用化へ向けての壁は決して低くはないであろうが、今後の研究開発の一層の進展によって、新たな産業の基盤技術となるものが多数、出てくることを期待する。

###### 4.1.1.2 今後に対する提言

プロジェクト内の3グループの連携を更に進めることで、野の広いプロジェクトとしてより大きな波及効果が期待できる。また、革新的な物質生産・変換用微生物の創製技術の開発を、大腸菌・枯草菌・分裂酵母・有機溶媒耐性菌・増殖非依存型反応細胞の菌株間で遺伝子とその機能情報を共用し、画期的な宿主細胞を創製する方向に進めて しい。開発した宿主に開発したプロセスや酵素システムを応用するなど、プロジェクトの成果を統合する戦略が望まれる。【2】また、高機

能宿主株や非水系反応場となる溶媒耐性宿主菌、増殖非依存型バイオプロセス、膜利用発酵システムなどの成果の実用化を促すため、複数の具体的かつ魅力的な実例を提示して しい。【3】

#### 4. 1. 1. 3 事業の位置付け・必要性について

バイオプロセスにかかわる多様な基盤技術の開発を進め、バイオプロセスのパラダイムシフトを目指す意義の大きいプロジェクトである。世界に ったバイオテクノロジー分野での我が国のアクティビティを活かして日本を支えるバイオ産業の復 を図ることは国家戦略の一部でもあり、リスクの高い技術開発を含むため NEDO の関与は妥当である。また、環境負荷を低減するグリーンプロセスや省エネルギープロセスの推進、バイオマスなどの資源有効利用を含む環境調和型産業システムを時代が求めている中で、本プロジェクトの目的は、バイオテクノロジー戦略大 に沿っており、現在の社会情勢、技術動向に照らし合わせて妥当である。今後も、米国の を考えると、日本としてはいっそうの力を込めねばならないプロジェクトである。【4】

#### 4. 1. 1. 4 研究開発マネジメントについて

プロジェクトリーダーのもとに多岐にわたるバイオプロセスの開発に向けて、学際的な大型研究プロジェクトを構築し、3グループで共同研究を実施していることは妥当である。また、伝統的に産官学共に我が国の強みである微生物分野の技術シーズと、蓄積された産業インフラの積極的利用を考慮し、最新の技術シーズを融合させた基盤技術開発に資源を集中させた戦略性は評価できる。さらに、バイオマス燃料に関するテーマについては実用化に向けて「バイオマスエネルギー先導技術研究開発／加速的先導技術」に移行するなど、社会情勢に機 かつ適切に対応している。多 分野の研究者からなる大きなプロジェクトであるため、各グループ間の一層の連携を図ることが必要である。【5】また、目標の達成度は、研究開始時の生産性(生産効率・収率)に比べて何倍と示されている場合が多く、実用化するために必要な生産性と比べていない。実用化するための目標値に対して、どの程度進捗したかの達成度(%)として示すべきである。【6】

#### 4. 1. 1. 5 研究開発成果について

中間目標は概ね順調に達成され、学術的にも重要な知見が論文として発表されている。最終目標に向けた道 も適切に示され、妥当なものとなっている。また、ゲノムの削除による宿主創製や有機溶媒一相培養系開発、増殖非依存型バイオプロセスなどのシステム構築や、水素酸化細菌や複合酵素系での生産システムなどで世界をリードするとともに、新たな技術領域の展開につながる意義のある成果が得られている。成果の汎用性、独自性及び重要性に関しては、十分に整理されていない。【7】世界における汎用性等を更に整理するとともに、その成果の適用範囲に関しても可能な限り明確にすることが望ましい。知的財産については、世界的な戦いになっている今、企業の枠を超えて、日本の知的財産と呼べるような成果が上がり、それが広く、日本の科学技術の進展につながることを期待する。また、実施者ごとの特許出願状況は成果として見えているが、グループ間や各グループ内での包括的・戦略的な特許出願も成果として見えると良いであろう。

**[8]****4.1.1.6 実用化の見通しについて**

既に利用されているアミノ酸や有機酸、産業用酵素、生理活性タンパク質、合成原料、ビタミン誘導体、二次代謝産物、バイオ燃料やコハク酸の効率的生産技術は、そのまま実用化につながると期待される。高機能宿主株や非水系反応場となる溶媒耐性宿主菌、増殖非依存型バイオプロセス、膜利用発酵システムなどの成果は多様な物質生産に利益をもたらす可能性があり、実用化が期待される。また、画期的な生産性を備えた高機能宿主や生産技術が生まれれば、化学工業やバイオ産業だけでなく、その製品を使用する自動車や家電を含む機械や電気などの関連産業への波及効果大きい。生産性や効率などに関する目標は設定されているが、実用化するために必要な達成(数値)目標が設定されていないので、実用化・出口イメージはやや不明確である。

**[9]** 今後、高機能宿主株や非水系反応場となる溶媒耐性宿主菌、増殖非依存型バイオプロセス、膜利用発酵システムなどの成果の実用化には、魅力的な実例を提示することが重要である。**[10]**

**4.1.2 中間評価および指 事項への対応**

**[1]** グループ間で有用な遺伝子と機能の情報を共有化し、プロジェクトとしての統合的な目標を設定し各グループを連携させるべく、研究者間レベルの合同研究開発委員会及び PL・SPL クラスのテーマ検討会を開催した。

**[2]** 生育向上や物質生産に有用な遺伝子情報はプロジェクト内での共有化を初めに行い、連携をはかった。

**[3]** 発酵、酵素変換の双方で宿主細胞ゲノムの大幅改良で有効な遺伝子情報の活用を検討した。他の菌種、植物、動物細胞までにも成果が適応できる可能性がある場合、その研究、特許戦略を検討する場を設け、順次、特許、論文等で報告を行った。

**[4]** 米国の技術に対抗するため、日本独自の技術の開発を推進し、本プロセスの汎用性を示していく計画を立てた。特許戦略については**[3]**の再掲。

**[5]** **[1]**の再掲。

**[6]** 研究成果の達成度を測る 度、方法を検討する場を設け、実用化に近い技術に関しては、実用化レベルの基準を設定し、その達成度を数値化した。

**[7]** 開発技術の分類と適応可能範囲を整理した資料を作成した。

**[8]** **[3]**の再掲。

**[9]** **[6]**の再掲。

**[10]** **[3]**の再掲。

**4.2 個別テーマ毎に関する評価に対する対応****4.2.1 高性能宿主細胞創製技術の開発****4.2.1.1 中間評価における指 事項**

(成果)

全体としては十分に目標値をクリアしている。特に、遺伝子多重削除などによる高機能性宿主細胞の創製は独創的である。また、成果は世界をリードするレベルに達しており、ゲノム解析の先行していた大腸菌・枯草菌・分裂酵母において、大規模ゲノム改変により、従来に無い物質生産改善のための新たな可能性を提示した点が評価できる。遺伝子多重削除による高機能性宿主細胞の創製技術については、技術の適用範囲を明確にする必要がある。プロテオーム解析も重要であるが、技術の適用範囲と効果の関連性究明に注力してほしい。【11】今回の大規模改変に用いた微生物のみならず、従来の工業菌種であるコリネ型細菌や放線菌、「微生物反応の多様化・高機能化」グループにより見出された新規微生物種にも応用可能な原理・原 が見出されることを期待する。【12】

(実用化)

大腸菌、枯草菌、分裂酵母の各宿主において生産性の向上が具体的に示されており、代謝や分泌などの基礎的な細胞機能に由来する効率の向上が示唆されていることから、多様なターゲットに応用できると推測され、実用化の見通しは明るい。それぞれの実施者でターゲットが異なっているので、それぞれについて実用化するために必要な数値目標を明示する必要がある。また、その数値目標に対する達成度を示してほしい。【13】特に、実用化に近い技術の達成度は、実用レベルを目指した目標値に対して相対値で表す方がわかり易い。

(今後に対する提言)

プロジェクト後半の研究開発では、基盤技術として更に深化すべき研究領域と、実用化を目指した応用技術開発領域の区別とを明確にすることで、応用技術の波及・実用化の加速が期待される。生産性向上に力点をおいて、欠失遺伝子の相補や単一遺伝子／オペロンの欠失などの手法を積極的に用いることも考慮して良いであろう。【14】発酵工業への波及効果の観点から、より多くの高付加価値の物質生産ターゲット(有用物質)に加え、大なる生産量となる有用物質を明示することが望ましい。【15】

#### 4. 2. 1. 2 中間評価指 事項への対応

【11】【7】の再掲。

【12】「微生物反応の多様化・高機能化」グループと連携を取りつつ有用な情報はプロジェクト内で共有化し、見出した成果は、論文等で報告した。

【13】【6】の再掲。

【14】基本技術を再整理し、プロジェクト内の他応用研究に活用できないか確認しながら Pj を推進した。

【15】高付加価値品の効率良い生産を目指す研究と、D-乳酸や L-アラニンなど光学活性を有するコモデティー物質生産のコストダウンに向けた研究を整理しながら方向を絞り込んだ。

#### 4. 2. 2 微生物反応の多様化・高機能化技術の開発

##### 4. 2. 2. 1 中間評価における指 事項

(成果)

個々の要素技術開発にかかわる中間目標が明確でないため、各プロジェクトの中間目標に対する達成度は計れないが、全体としては目標を十分に達成していると考えられる。有機溶媒一相培養系での生産は、これまでに例のない世界をリードする成果であり、従来から検討されている水-有機溶媒二相系を超える新たな領域を展開できる可能性が期待される。また、溶媒耐性菌を用いた生産システムや非天然型抗生物質生産システム、補酵素再生複合酵素系は、様々な物質生産に応用できる汎用性を備えており、実例の提示における今後の展開が期待される。最終的に非水系生体触媒細胞で多様な疎水性物質変換酵素を発現させて評価することを目指しているが、開発中の疎水性物質変換酵素を開発中の非水系生体触媒細胞で発現させるための動きは、まだ一部に留まっている。【16】 高効率酵素設計のための酵素反応シミュレーション技術は、酵素 P450 及び関連分子の機能解析への応用だけでなく他の酵素反応への応用も期待される。

【17】

(実用化)

ビタミン D 誘導体や光学活性アミノ酸・アルコール類、新規二次代謝産物、酵素反応シミュレーションプログラムは産物そのものを製品として、水素酸化細菌での光学活性化合物生産、ビタミン D 水酸化酵素などの酵素 P450 による物質生産、複合酵素系による物質生産、新規二次代謝産物の開発はこれらの生産システムとして、実用化の可能性が極めて高い。また、関連の物質変換系は化学工業で広く用いられているため、成果の技術的・経済的波及効果は大きくなり、当該分野における研究開発や人材育成の促進につながると期待される。中間評価段階での達成度は最終目標値に対する割合等で示されているものの、その最終目標値が実用化レベルであるか明確になっていない。特に、実用化に近い技術のレベルは、実用レベルを 100 として相対値で表す方がわかり易い。【18】 直近の石化製品の価格上昇などの環境要因を見直せば、コスト的に実用化可能な時期の前 しゃ、製造可能化合物種の拡大の可能性もあり、検討を望む。【19】

(今後に対する提言)

サブテーマ a~e のそれぞれの開発内容が、若干広がりすぎており、最終目標の達成に向けて、それぞれ可能な限り、焦点を絞る必要がある。例えば、有機溶媒耐性機構の解明を含めて生体触媒の非水系の反応場制御技術の開発に絞ることも検討して しい。非水系の反応を扱う観点から有機溶媒耐性菌を見出し、その有機溶媒耐性機構を明らかにしつつあるが、その機構解明により有機溶媒耐性を他菌種にも付与するなどの汎用性のある技術として成熟させることを期待する。【20】

#### 4.2.2.2 中間評価指 事項への対応

【16】開発中の疎水性物質変換酵素を開発中の非水系生体触媒細胞で発現させるため、R-2-クロロマンデル酸、エチル(S)-4-クロロ-3-ヒドロキシ酪酸やバニリン酸などの生産に取り組んだ。

【17】開発中の酵素反応シミュレーション技術には、汎用性があり他の酵素反応への応用も可能である。

【18】【6】の再掲。

【19】開発候補となる石化製品の価格動向と本手法での適応可能価格範囲を想定したシミュレーションデータを作成している。

【20】非水系の反応場制御技術の開発により注力するため、有機溶媒耐性細菌である *K. rhizophila* DC2201 株および *R. opacus* B-4 株に焦点を絞り、耐性機構解明と利用技術についてグループ間での連携を強め取組む計画である。

#### 4. 2. 3 バイオリファイナリー技術の開発

##### 4. 2. 3. 1 中間評価における指 事項

(成果)

成果は現在、注目を集めているバイオ燃料生産に直結する意義の大きいものであり、広く利用されることが期待される。また、コリネ細菌の増殖非依存型バイオプロセスは極めて高い生産性を

り、世界をリードする技術となる可能性が高い。なお、いずれの成果も中間目標をほぼクリアしている。ソフトバイオマス糖化技術の開発については、糖化プロセスの中で酵素処理前の省エネルギー型の前処理プロセスの確立が必要である。【21】 バイオマスリファイナリーに関するプロジェクトは、他の府省等でも実施されており、他のプロジェクトと差別化する必要がある。【22】

(実用化)

コリネ型細菌を用いた増殖非依存条件下での乳酸発酵生産や L-アラニン生産などについては、実用化の可能性が高く、膜分離プロセスと併用することにより更なる生産性向上を期待したい。また、未利用バイオマスからのバイオ燃料生産は、食 資源との競合で生じた問題をかかえる現在の世界情勢から、強く実用化が求められており、本プロジェクトで生産性が上がれば実用化は間近であろう。糖化と発酵プロセスを含めた機能的なプロセスの構築には、各サブグループの連携強化が望まれる。【23】また、実用化に近い技術のレベルは、実用レベルを 100 として相対値で表す方がわかり易い。【24】コリネ型細菌を利用する生産プロセスについては、コリネ型細菌利用の歴史のある我が国では生産インフラ・技術者等の関連資源が蓄積されており、国内資源の有効利用を期待する。

(今後に対する提言)

増殖非依存型バイオプロセスと膜利用発酵システムのいずれも高い性能を示す優れたシステムであり、両者が融合することで新たな成果が出る可能性もある。両者の融合を検討することが望まれる。【25】汎用化学品(石化代替品)の大規模生産が前提となることから、スケールアップやダウンストリーム開発では、工学的要素が多くなる。今回は、膜分離技術開発が先行して取り上げられているが、技術移転・実用化の加速を図るために、生物・工学両面の研究体制を更に充実させることが有効であろう。【26】セルラーゼ及びヘミセルラーゼ活性は一般的に黄 菌よりも黒 菌の方が高い。黄 菌のゲノムデータベースを利用する研究であることは理解できるが、ソフトバイオ

マスの利用の観点からすると黒 菌の利用についても検討の 地がある。dのサブテーマについては、古紙処理大規模プラントに採用されるなど、実用化の見通しが高く、基盤技術からの発展が期待される。【27】

#### 4. 2. 3. 2 中間評価指 事項への対応

【21】前処理技術は、既存技術(水熱処理法)をベースとし最適条件の設定により省エネ実用化技術の確立が可能となるよう計画済みであった。

【22】セルロソーム機能を利用した革新的糖化技術の開発と増殖非依存型プロセスによる基幹物質生産技術は、国内外で他にはない日本独自の技術であり差別化できている。

【23】今後、増殖非依存型バイオプロセスと膜システムの技術融合などで、合同によるサブプロジェクト委員会を開催しグループ内の連携を強化した。

【24】【6】の再掲。

【25】【23】の再掲。

【26】増殖非依存型バイオプロセスについても、大規模生産を前提としたスケールアップによるデータを取得する計画した。【1】の一部再掲。

【27】JBA グループ 3 社による糖化技術は、実用化に近い技術として、20年度より、新たな NEDO 実用化プロジェクトに移行させた。

## 5. 評価に関する事項

過去に実施した評価は次に記す中間評価(1回)である。

- ① 評価の実施時期:平成 20 年度
- ② 評価手法:外部評価
- ③ 評価事務局:研究評価部
- ④ 評価項目・基準:「標準的評価項目・評価基準」(中間評価分科会資料 3-3)
- ⑤ 評価委員(敬称略)

分科会長 中西 一弘 岡山大学 大学院自然科学研究科 機能分子化学専 教授

分科会長代理 福田 夫 長岡技術科学大学 生物系教授

委員 部 敬 東北大学 大学院農学研究科 応用生命科学専 准教授

委員 太田 一良 宮崎大学 農学部 応用生物科学科教授

委員 片山 秀策 独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構 バイオマス研究  
センター センター長

委員 谷口 正之 新 大学 自然科学系(工学部)教授

委員 吉川 学 株式会社毎日新聞社 科学環境部副部長

### Ⅲ. 研究開発成果について

#### 1. 事業全体の成果

本事業の研究開発は計画どおり順調に進捗し、最終目標とする事項に対してほぼ達成できた。

高性能宿主細胞創製技術の開発においては、大腸菌 DGF の研究開発(協和発酵キリン)で、野生株と同等以上の生育特性を示す DGF-298 株(ゲノムの 35%削除)の作製に成功した。染色体縮小化株群の ATP 供給能力は、野生株に比べ大幅に向上した。実験的な評価から、残存する削除できない機能未知遺伝子の割合は、目標の 10%以下(3.1%程度)であると結論した。また 4 つの重要機能未知遺伝子の機能解明を完了した。タイリングアレイ解析から、有用プロモーター群を見出した。成果を総合的に活用し、複数の化合物について、既報値を超える生産株育種に成功した。

枯草菌 RGF の研究開発(花王)で、枯草菌細胞において有用酵素生産に不要な遺伝子領域を 1.5Mbp 削除した株を構築する事に成功した。また、有用酵素分泌生産に関わる制御が窒素および炭素代謝制御により可能であることを特徴とする特異的遺伝子発現制御技術の構築にも成功した。細胞膜・壁の人工改変による溶菌抑制、分泌装置の増強を特徴とするユーティリティー機能増強技術の確立に成功した。これらの技術を創製枯草菌 RGF 株(924 株)に適用し、モデル酵素として採用したセルラーゼの生産性をプロジェクト開始時の世界最高値の 2.5 倍向上させる事に成功した。

分裂酵母高性能宿主細胞創製技術の研究開発(旭硝子)で、野生株と増殖性能が遜色ない 657.3kbp の染色体大規模削除株を完成し、この株の異種タンパク質生産性向上をヒト成長ホルモンおよびヒトトランスフェリンをモデルとして確認するとともに、そのメカニズムを解析した。さらに多座組込・誘導発現・分泌強化・糖鎖改良に関する技術開発を終了し、合わせて異種タンパク質生産性向上例を示した。

微生物反応の多様化・高機能化技術の開発においては、非水系反応場におけるバイオプロセスの構築(ダイセル化学)で、有機溶媒耐性 *K. rhizophila* DC2201 株(以下 DC 2201)の発現系の開発、外来酵素遺伝子の発現検討、有機溶媒-水二相系反応場における物質生産検討を実施した。DC2201 の宿主ベクター系を開発し、ニトリラーゼ、不斉還元酵素、補酵素再生系酵素遺伝子の発現に成功した。医薬品中間体として有用な (R)-マンデル酸(RMA)、(S)-4-クロロ-3-ヒドロキシ酪酸エチル(ECHB)の生産に関して検討を行ない、大腸菌と比較して飛躍的に生産性が上がり、蓄積量(RMA 211 g/L、ECHB 355 g/L)も世界最高レベルであった。

酸素添加酵素の高機能化・多様化技術の研究開発(メルシャン)で、進化工学的手法、酵素結晶解析情報による機能改変したビタミンD水酸化酵素遺伝子を育種最適化した放線菌宿主に導入することで現行プロセス変換菌の数倍の STY の向上を達成した。

高効率酵素設計のための酵素反応シミュレーション技術の研究開発(日本電気)で、構築した

シミュレーション技術により一連の酵素反応のメカニズムを解析することが可能になった。本プロジェクトでは、P450 VDH 系に対して基質結合過程、水酸化反応、反応生成物解離過程を含む一連の流れに対するシミュレーションを実施し、反応メカニズムに関する多くの知見を得た。メルシャン社保有の P450 において、新規基質に対する変異部位予測を行い、水酸化反応の副反応を 1/3 に低減することに成功。シミュレーション技術の有効性が示された。

微生物複合酵素系の産業用触媒としての研究開発(カネカ)で、複数の酵素の組み合わせや、補酵素の再生系、補欠因子族等を複合して使用する産業用触媒の創製によって、非天然L体アミノ酸類、キラルアルコール類において 100g/Lレベルの、またキラルアミン類、リン酸化糖類、ヒドロキシアミノ酸類、共役脂肪酸類、水酸化脂肪酸類などにおいて 30~50g/Lレベルでの生産が可能な各種の酵素的生産プロセスを開発した。

放線菌の活用による新規二次代謝産物の開発(明治製菓)で、人工遺伝子クラスター法技術を用いて非天然型抗生物質Bの発酵生産に成功した。その後、種々の生産性向上検討を実施し、約 50 倍に生産性を向上させることができた。その際の生産速度は 175mg/L/D-培養液であり、最終目標をほぼ達成できた。

発現タンパク質解析による微生物機能利用のための技術基盤の研究開発(独立行政法人製品評価技術基盤機構)では、高性能宿主細胞 DGF、微生物反応の多様化・高機能化技術の開発に利用する有機溶媒耐性菌 *R. opacus* B4 株、*K. rhizophila* DC2201 株について、網羅的・定量的プロテオーム解析を実施した。結果として、解析対象菌株の代謝変化や有機溶媒耐性機構の解明につながるタンパク質の発現状況を捉えることに成功した。これらの成果は、解析対象菌株の新規バイオプロセスの実現に向けた基礎的なデータとなる。

バイオリファイナリー技術の開発においては、ソフトバイオマス糖化技術の開発・増殖非依存型バイオプロセスの開発・トータルシステムの開発(地球環境産業技術研究機構)で、好気性工業微生物(コリネ型細菌)による高機能セルラーゼ(人工セルロソーム)の生産に成功した。酵素再利用法による連続糖化システムを構築、リグニン含有古紙の糖化で糖化率 80%を維持したまま、長時間連続糖化を確認し、糖化酵素コスト大幅低減の可能性を示した。糖代謝速度向上、細胞内酸化還元バランスの調整、代謝遺伝子発現レベルの最適化などの要素技術を確認、各種化合物(D-乳酸、L-アラニン、キシリトール、バリン)の高効率生成(10 g/L/h 以上)を示した。バイオマス由来混合糖(グルコース、キシロース、アラビノース、マンノース、セロビオース)完全同時利用技術を確認、D-乳酸、キシリトール、バリンの高効率生成を確認した。

メンブレン利用高効率発酵システムによる有機酸製造基盤技術の開発(東レ)で、膜利用発酵プロセスのパイロットスケール試験装置を開発した。パイロットスケール装置において D-乳酸発酵で STY10g/L/h を達成した。高純度 D-乳酸が得られる NF/RO 膜を用いた膜利用精製プロセス基本技術を確認した。

全体の成果

目 標	研究開発成果	達成度
<p>①高性能宿主細胞創製技術 遺伝子の大部分が機能既知となるまでの遺伝子の多重削除により恒常性維持機能を低減させた宿主細胞に対しての宿主としての機能付与(代謝フラックス制御・物質生産への切り替え・補酵素供給機能増強等)により、プロジェクト開始時における世界最高値の2倍以上の生産性を達成する。</p> <p>②微生物反応の多様化・高機能化技術 既に微生物反応により生成されることが基礎研究で知られている物質についてはSTY (Space/Time/Yield: 反応容器の時間あたりの生産量)数g/L/h 以上、知られていない物質についてはその10分の1以上(医薬品等の高付加価値品については実用化に十分なSTY の数倍以上)の生産を行う。</p> <p>③バイオリファイナリー技術 バイオマス糖化技術においては、草本系のソフトバイオマスについて、原料濃度10%にて1 日で90%の糖化を行える技術を開発する。また、高効率糖変換技術においては、糖から新たに6種の基幹物質をSTY10 g/L/h 以上で継続的に生産することのできる技術を開発する。これら技術の開発により、総合的生産体系を開発・構築する。</p>	<p>①以下の物質に関して目標を達成 アルギニン生産3.9倍 セルラーゼ生産2.5倍 ヒト成長ホルモン(hGH) 2.6倍</p> <p>②以下の物質に関して目標を達成した。 (R)-マンデル酸(RMA)8.8g/L/h (S)-4-クロロ-3-ヒドロキシ酪酸 2.1g/L/h ビタミンD 従来STYの3倍 非天然L体アミノ酸類 100g/L/h 非天然抗生物質 7.3mg/L/h</p> <p>③糖化率80%を維持したまま、400時間超の連続糖化を達成 選択と集中により以下の物質でSTY10g/L/hを達成した。 D-乳酸 10g/L/以上 L-アラニン 10.3g/L/h キシリトール 10g/L/h以上 バリン 10g/L/h 以上</p>	<p>①達成</p> <p>②達成</p> <p>③達成</p>

特許、論文、外部発表等の件数(プロジェクト計)

区分	特許出願			論文		その他外部発表(プレス発表等)
	国内	外国	PCT※出願	査読付き	その他	
H18FY	16	0	1	42	12	138
H19FY	30	0	1	73	29	172
H20FY	26	3	7	55	14	154
H21FY	22	12	11	69	14	117
H22FY	17	0	6	73	27	120
計	111	15	26	312	96	701

## 1. 1 高性能宿主細胞創製技術の開発

1-①大腸菌DGF (Designed Genome Factory)の研究開発(協和発酵キリン株式会社)

目 標	研究開発成果	達成度
<p>下記個別テーマを統合的に活用し、プロジェクト開始時における世界最高値の2倍以上の生産性を達成する。</p> <p>(1) 遺伝子機能解明 縮小化染色体上の排除不可能な機能未知遺伝子の割合が全遺伝子の 10%程度にまで減らす。</p> <p>(2) 染色体遺伝子構成のデファイン化 IS、トキシン遺伝子を完全に排除し、染色体長を 2.8 Mbp 以下にする。</p> <p>(3) 宿主細胞の機能解析と改良 染色体縮小化株の生育特性、ユーティリティ一供給機能を改良する。</p> <p>(4) 遺伝子発現制御技術の開発と応用 発現制御系のコレクションを行い、物質生産系へ応用し、世界最高値の2倍以上の生産性を達成する。</p>	<p>アルギニン生産 3.29 g/L/h、ニコチアナミン生産 1.2 g/L を実証した。</p> <p>(1) 3.1%</p> <p>(2) IS、トキシン遺伝子はすべて削除、染色体長は 2.98 Mbp までに縮小化</p> <p>(3) S化、<i>proVXW</i> 復帰により生育特性を改良、ATP 供給活性の増大</p> <p>(4) 亜鉛応答型プロモーター群の収集とアルギニン生産での実証</p>	<p>達成</p> <p>(1) 達成</p> <p>(2) IS、トキシン遺伝子の排除は達成、染色体縮小化に関しては 180 kbp の未達成</p> <p>(3) 達成</p> <p>(4) 達成</p>

## 1-②枯草菌RGF (Refined Genome Factory) の研究開発 (花王株式会社)

目 標	研究開発成果	達成度
(1) 枯草菌ゲノム改良技術の構築	(1) 枯草菌ゲノムを効率良く強化・削除する技術を構築	(1) 達成
(2) 不要遺伝子が削除された縮小株の構築 1.3~1.5Mbp 削除株	(2) 1.5Mbp 削除株の構築に成功	(2) 達成
(3) 酵素生産性を MGB874 株の2倍以上に向上	(3) セルラーゼ生産性を MGB874 株の2.5倍に向上	(3) 達成
(4) プロモーター改変等による蛋白質分泌生産に関わる制御技術の構築	(4) プロモーター改変等により窒素代謝、および、炭素代謝の人為的制御技術を構築し、増殖と酵素生産の制御に成功	(4) 達成
(5) 代謝活動の持続などによる高機能化	(5) 緊縮応答に関わる遺伝子の多重欠失によりセルラーゼ生産性を MGB874 株に比べて 20%向上	(5) 達成
(6) 細胞膜・壁の人工改変	(6) 細胞表層のアニオン性ポリマー組成の改変、および、細胞膜脂質改変による酵素生産強化に成功	(6) 達成
(7) ゲノム縮小株への技術統合による生産性向上	(7) ゲノム縮小株に、分泌装置強化、代謝制御を統合し、セルラーゼ生産性を MGB874 株の2.5倍に向上	(7) 達成
(8) 異種蛋白質(インターフェロン)の高生産化技術の構築に成功した	(8) 異種蛋白質(インターフェロン)の高生産化技術の構築に成功	(8) 達成
(9) 有用酵素生産に特化したリボソーム専有化技術の構築	(9) 有用酵素生産に特化したリボソーム専有化株の構築	(9) 達成
(10) 分泌装置の強化・改良技術の構築	(10) Sec 系分泌装置の強化・改良による酵素高生産化に成功	(10) 達成
(11) 溶菌抑制技術の構築	(11) 新規溶菌抑制技術の構築に成功	(11) 達成

## 1-③分裂酵母高性能宿主細胞創製技術の研究開発(旭硝子株式会社)

目 標	研究開発成果	達成度
<p>(1) 特異的遺伝子発現制御技術 外来遺伝子機能安定導入技術開発</p> <p>遺伝子発現制御機能付与技術開発</p>	<p>(1) 外来遺伝子組込みに最適な遺伝子座を特定、最大 5 コピーの発現ユニットを一度に組込むことが可能であることを見出した。 熱ならびに多様なストレスによって外来遺伝子の発現が誘導される系を確立、培養後期に特異的に発現するプロモーターの取得に成功した。</p>	<p>(1) 達成</p>
<p>(2) ユーティリティー機能増強技術開発 エネルギー供給系の解明と最適化技術開発</p> <p>分子シャペロン群の解明と最適化技術開発</p> <p>小胞体ストレスの検出・回避技術開発</p> <p>翻訳後修飾系の制御技術開発</p>	<p>(2) 窒素飢餓応答やアミノ酸代謝変動に起因するタンパク質生合成系の活性化を、オミックス解析から確認した。 複数の薬剤添加や Pdi1・Hsp16 の過剰生産によって分泌生産量が上昇することを見出した。 ERAD 軽減変異株において分泌生産量が上昇することを見出した。 O-結合型糖鎖構造最小化(omh1 破壊株)・N-結合型糖鎖構造最小化(gms1och1・alg3och1 破壊株)・ガラクトース付加完全削除・外来マンノシダーゼ発現系が実現した。</p>	<p>(2) おおむね達成</p> <p>(バイアンテナ型糖鎖付加タンパク質の効率的な生産に関しては未達のため研究開発を継続)</p>
<p>(3) 異種蛋白質やその生産系を利用した低分子化合物の生産性がプロジェクト開始時における世界最高値の 2 倍以上の生産性を達成する。</p>	<p>(3) 野生株と同等の増殖性能を示す大規模削除株が得られ、異種タンパク質生産性が 1.9 倍から 2.6 倍に向上したことが、ヒト成長ホルモンならびにトランスフェリンにおいて示された。</p>	<p>(3) 達成</p>

## 1-④発現タンパク質解析による微生物機能利用のための技術基盤の研究開発

(独立行政法人製品評価技術基盤機構)

目 標	研究開発成果	達成度
<p>(1) 培養 MGF-01 株及び <i>E. coli</i> K-12 W3110 株の培養条件の検討</p>	<p>(1) MGF-01 株の培養を行い、<i>E. coli</i> K-12 W3110 株に比べ高性能増殖の過程を捉えることに成功した。</p>	<p>(1) 達成</p>
<p>(2) 網羅的プロテオーム解析 <i>E. coli</i> K-12 W3110 株の総遺伝子数 4,388 の 35%以上を検出</p>	<p>(2) <i>E. coli</i> K-12 W3110 株 1,641 検出 (38.3%) MGF-01 株 1,385 検出 (31.6%)</p>	<p>(2) 達成</p>
<p>(3) データ解析及び提供 プロテオーム解析データを協和発酵に対し迅速に提供</p>	<p>(3) MGF-01 株の代謝解析を行い、協和発酵にプロテオーム解析データを提供した。</p>	<p>(3) 達成</p>

## 1. 2 微生物反応の多様化・高機能化技術の開発

## 2-①非水系反応場におけるバイオプロセスの構築(ダイセル化学工業株式会社)

目 標	研究開発成果	達成度
<p>(1)非水系生体触媒細胞デザイン技術開発 「生物機能を活用した生産プロセスの基盤技術開発」プロジェクトにおいて見出された有機溶媒耐性微生物である <i>Micrococcus</i> sp. DC2201 株(以下 DC 2201 株)等を利用して、疎水性物質の変換が可能な実用的生体触媒を作成する。そのためにダイセル化学工業が宿主ベクター系の開発を行うとともに、DC2201 株等への水素酸化能付与に関する研究を東京大学と、水素利用細菌を宿主とした微生物触媒の開発を茨城大学と共同実施する。</p>	<p>(1) 1)有機溶媒耐性 <i>K. rhizophila</i> DC2201 株(以下、DC2201)のプラスミドベクターによる基本的な形質転換系を構築することが出来た。 2)DC2201 を用いて医薬品中間体として有用な (R)-マンデル酸(RMA)、(S)-4-クロロ-3-ヒドロキシ酪酸エチル(ECHB)生産に関して検討を行い、大腸菌と比較して飛躍的に生産性が上がり、それらの蓄積量(RMA 211 g/L(水相)、ECHB 355 g/L(酢酸ブチル相))も世界最高レベルであった。STY は RMA が 8.8 g/L/h、ECHB が 2.1g/L/h であり、当初の目標を達成した。 3)水素酸化細菌宿主として <i>Ralstonia eutropha</i> H16 株および <i>Rhodococcus opacus</i> MR11 株を使用し、ヒドロゲナーゼと不斉還元酵素の共発現、共役系によって、(R)-1,2-プロパンジオールと(R)-4-クロロ-3-ヒドロキシ酪酸エチル生産を実現した。 4)有機溶媒耐性株と大腸菌に NAD 還元型ヒドロゲナーゼを発現させ、物質生産に資することを目標に研究を進め、大腸菌に NAD 還元型ヒドロゲナーゼの発現が確認された。</p>	<p>(1) 達成</p>
<p>(2)複合反応システムデザイン技術開発 芳香族化合物等の疎水性物質の変換に有用な水酸化酵素、酸素添加酵素、炭素-炭素結合酵素、還元酵素、エネルギー再生酵素等を岐阜大学、独立行政法人 産業技術総合研究所(以下 産業技術総合研究所)と共同実施体制で収集する。また、岐阜大学、兵庫県立大学と酵素の有機溶媒耐性機構の解明を共同実施する。酵素のコンポーネント等の機能解析を行ない、反応とエネルギー再生を組み合わせた複合反応システムを構築して、(1)で作成した非水系生体触媒細胞においてそれらの効率的発現を検討する。当該技術の有用性・汎用性を実証するため、有機溶媒、超臨界流体等を用いた非水系反応場で、ポリマー原料となる芳香族酸、脂肪族アルコール、アダマンタン類酸化物等の生成反応を実施する。中間・最終目標及び実用化・成果普及プランについては以下の通りとする。</p>	<p>(2) 1)<i>Arthrobacter</i> F73 のニトリラーゼを取り上げ、ランダム変異導入による有機溶媒耐性が向上した強化変異体の取得を行なった。その構造特性を明らかにするために、野生型ニトリラーゼを高純度で精製した。 2)難水溶性の基質であるアダマンタンおよびイソイゲノールに作用する微生物酵素の探索を実施し、見出したイソイゲノールの変換には有機溶媒耐性宿主が適することを示した。 3)脱炭酸酵素の炭酸固定活性を活用した有用カルボン酸の酵素合成を目指し、超臨界二酸化炭素条件下で機能する酵素の探索を進め、<i>Bacillus</i> 属細菌に高温域で安定に活性を示す菌株を見いだした。 4)メタゲノム的手法を用いて、排水から採取した新規な芳香族水酸化酵素の機能を評価し、DC2201 への導入を検討した。 5)有機溶媒耐性ニトリラーゼを精製し、その性状を調査したが、精製後、時間経過に伴ってさらに大きな凝集状態に移って行く傾向も見られることがわかった。 6)2,6-dihydroxybenzoate decarboxylase の結晶化および結晶構造解析に成功した。</p>	<p>(2) 達成</p>

## 2-②酸素添加酵素の高機能化・多様化技術の研究開発(メルシャン株式会社)

目 標	研究開発成果	達成度
<p>(1)酸素添加酵素任意デザイン化技術の開発 (メルシャン) 1)ビタミン D およびステロイド骨格を有する化合物に対して任意の部位を水酸化しうる P450 をデザインし、取得実証すること</p> <p>2)最適宿主と最適プロセスの開発により、活性型ビタミン D の収率も含めた生産性を従来技術の 10 倍とすること</p> <p>(2)酸素添加酵素の結晶構造解析技術の研究開発 (産総研) 酵素・基質複合体構造解析技術の開発</p> <p>(3)Whole cell catalyst における酵素反応場の解析・制御技術の開発 (大阪大学) 反応律速因子の任意制御技術開発</p> <p>(4)マルチコンポーネント酸化酵素系の反応場制御基盤技術の開発 (広島大学) 酸素添加反応に最適な菌株構築技術の開発</p>	<p>(1) 1)副反応を低減したビタミン D3水酸化酵素を創製した。26 位水酸化副反応制御を達成したことで任意の部位の水酸化制御の可能性を示せた。</p> <p>2)ビタミンD3変換系において酵素機能改変、宿主改良により従来変換株の生産性は数倍向上した。</p> <p>(2) 野生型 Vdh と高活性型変位体 Vdh-K1 について基質フリーならびに基質との複合体それぞれの構造解析に成功した。この構造情報を元に機能改変型酵素の作製に貢献した。</p> <p>(3) 酸素添加反応に影響を及ぼしうる反応場構成因子を細胞内外の各レベルで同定・検証した。細胞内反応場構成因子として大腸菌をモデルに 3 つの遺伝子を同定した。一方、細胞外レベルでの反応場構成因子として、細胞の表層疎水度に着目し、有機溶媒存在下での微生物変換反応におけるそれらの影響を定量化した。リアクタースケールでのパラメーター操作により疎水性細菌を用いた物質生産システムの最適化に成功した。</p> <p>(4) Vdh の Red/Ox パートナーを特定し酸素添加反応の至適化を可能にした。 ミコール酸合成系、排出ポンプが <i>R. opacus</i> B4 株の有機溶媒耐性に関わることを発見。耐性機構を明らかにした。</p>	<p>(1) 1) ほぼ達成 方針変更して酵素改変によるビタミン D の水酸化反応制御に集中して研究した(このためステロイド化合物に対しては未達成)。</p> <p>2) 一部達成(達成度 80%) <i>P. autotrophica</i>による変換系では最終到達点の 10 倍の生産性向上には至らなかったが、工業生産菌からの改善であることを考慮すれば画期的である。促進因子重複活用でさらに生産性向上が期待できる。</p> <p>(2) 達成</p> <p>(3) ほぼ達成</p> <p>(4) ほぼ達成 Red/Ox パートナー挙動解析は 2011 年 8 月達成見込み</p>

## 2-③高効率酵素設計のための酵素反応シミュレーション技術の研究開発(日本電気株式会社)

目 標	研究開発成果	達成度
(1) 酵素-基質ドッキング構造予測技術の開発	(1) 精度70%(従来の2.6倍)	(1) 達成
(2) 酵素改変部位予測技術の開発	(2) P450 の新規基質に対する変異予測ヒット率57%(ランダム変異に対して58倍)。副反応は最大で1/3に抑制。	(2) 達成
(3) 量子化学計算 CAS 法の高速計算プログラムの開発	(3) 計算速度3倍。P450 の反応活性種と推測されている compound I の2種の構造(perferryl-oxo 種と ferryl-oxo 種)を計算し、水酸化過程の反応メカニズムの新たな仮説提案	(3) 達成

## 2-④微生物複合酵素系の産業用触媒としての研究開発(株式会社カネカ)

目 標	研究開発成果	達成度
<p>有用物質生産プロセスに用いる複合酵素系微生物触媒の開発を目標とする。研究対象としては、酵素的立体反転反応による光学活性化合物生産プロセスの開発及び他の複合酵素系プロセスの開発(アミノ基転移反応、オレフィン還元反応、水酸化反応、炭素-炭素結合反応、転移反応、ラジカル重合反応、二重結合転移・飽和化・不飽和化反応など)である。プロセスの生産性としては、蓄積濃度で50-100g/L(2-5g/L/h程度)をめざす。</p> <p>(1)高機能性 Multi-component 酵素系による光学活性アミノ酸生産プロセスの開発</p> <p>(2)高機能性 Multi-component 酵素系による光学活性アルコール生産プロセスの開発</p> <p>(3)高機能性 Multi-component 酵素系の探索・機能解析</p> <p>(4)Multi-component 酵素系の機能発現制御技術の開発</p> <p>(5)最適反応場・プロセスの構築</p>	<p>プロジェクト前半は、主にプロセスの構築に必要な情報を収集し、必要な酵素群を取得して、その機能解明及び高機能化検討を実施し、これら酵素群の使用によるプロセスの実現性を評価し、その実例を示した。後半では、ファインケミカル生産に有用な複合酵素系の機能発現制御技術の開発、及び反応場と生産プロセスの構築に関する研究開発を行なった。</p> <p>(1)4酵素からなる複合酵素系による L 体の非天然アミノ酸の安価生産プロセスを開発した(100g/L)。</p> <p>(2)1)4 酵素からなる複合酵素系によるキラルジオール類の安価生産プロセスを開発した(100g/L)。 2)アミノ基転移と酸化還元酵素からなるキラルアミン類の生産プロセスを開発した(50g/L)。</p> <p>(3)1)β-アミノ酸生産に有用な新規なアミノ基転移酵素を発見し、その性質を調べた。 2)酵母解糖系と共役可能なアルドラーゼ活性菌を取得した。4-ヒドロキシアミノ酸生産に有用なアルドラーゼ類を探索し、有用な酵素群を発見した。 3)高度不飽和脂肪酸に関する不飽和化活性菌を発見した。脂肪酸の二重結合水和化活性を発見した。 4)ヒドロキシイソロイシン生産に有用な 2-ケトグルタル酸依存性の新規ジオキシゲナーゼを発見した。</p> <p>(4)1)FMN 依存酸化還元酵素系の解析を行なった。 2)パチルスのシクロム P450 水酸化酵素の活性化因子を探索し、スーパーオキシドディスムターゼが有効であることを発見した。 3)乳酸菌による高度不飽和脂肪酸の分子内二重結合異性異化メカニズムを解明した。 4)ラッカーゼ・ペルオキシダーゼの活性賦活化メディエーター活性を各種物質中に発見した。 5)ジオキシゲナーゼの補酵素である 2-ケトグルタル酸を効率よく供給する大腸菌を育種した。</p> <p>(5)1)アクチノールを生産する 4 酵素からなる酸化還元複合酵素系プロセスを開発した(100g/L)。 2)パン酵母解糖系の高エネルギー化合物供給系と酵素的アルドール縮合反応からなるリン酸化糖類の生産プロセスを開発した(50g/L)。 3)ジオキシゲナーゼ機能化大腸菌を用いてヒドロキシイソロイシン生産プロセスを開発した(70g/L)。 4)アルドラーゼ・アミノ基転移酵素共役系によるヒドロキシアミノ酸生産プロセスを開発した(5g/L)。 5)乳酸菌の共役化酵素群発現大腸菌を用いて共役脂肪酸生産プロセスを開発した(50mg/ml)。 6)乳酸菌の水和複合酵素系を用いるキラル水酸化脂肪酸生産プロセスを開発した(25g/L)。</p>	<p>(1)達成</p> <p>(2)達成</p> <p>(3)達成</p> <p>(4)達成</p> <p>(5)達成</p>

## 2-⑤放線菌の活用による新規二次代謝産物の開発(明治製菓株式会社)

目 標	研究開発成果	達成度
(1)非天然型抗生物質Bの培養生産性 200~300mg/L/D	(1)非天然型抗生物質Bの培養生産性 175mg/L/D	(1) ほぼ達成

## 2-⑥発現タンパク質解析による微生物機能利用のための技術基盤の研究開発

(独立行政法人製品評価技術基盤機構)

目 標	研究開発成果	達成度
(1) <i>R. opacus</i> B4 株の培養 <i>R. opacus</i> B4株及び有機溶媒耐性劣化株 の培養条件の検討	(1) 非水系バイオプロセスを考慮した有機溶媒接触 方法を検討し、 <i>R. opacus</i> B4 株及び有機溶媒耐 性欠損株の培養菌体を採集した。	(1) 達成
(2) <i>K. rhizophila</i> DC2201 株の培養条件の検 討	(2) 非水系バイオプロセスを考慮した有機溶媒接触 方法を検討し、 <i>K. rhizophila</i> DC2201 株の培養菌 体を採集した。	(2) 達成
(3) 網羅的プロテオーム解析 非水系バイオプロセスを考慮した有機溶媒 耐性菌の網羅的プロテオーム解析を実施	(3) <i>R. opacus</i> B4 株 1,966 検出 (23.5%) 有機溶媒耐性劣化株 2,541 検出 (30.4%) <i>K. rhizophila</i> DC2201 株 1,446 検出 (61.4%)	(3) 達成
(4) 膜タンパク質のプロテオーム解析技術 の開発 膜タンパク質のプロテオーム解析技術の 開発に着手する。	(4) 多次元法及び前処理法を改良し、解析に必要な 膜タンパク質の検出に成功した。	(4) 達成
(5) データ解析及び提供 プロテオーム解析データを共同実施先に対 し迅速に提供	(5) 有機溶媒耐性菌の代謝解析を行い、共同実施先 の大阪大学、広島大学、ダイセル化学にプロテ オーム解析データを提供した。	(5) 達成

## 1.3 バイオリファイナリー技術の開発

3-①ソフトバイオマス糖化技術の開発・増殖非依存型バイオプロセスの開発・トータルシステムの開発(財団法人地球環境産業技術研究機構)

目 標	研究開発成果	達成度
(1)ソフトバイオマス糖化技術の開発 セルロソーム機能を利用した高効率糖化プロセスの基盤技術の確立	(1) ソフトバイオマスの分解に最適化されたミニセルロソームを構築 コリネ型細菌による人工セルロソームの生成を確認 コリネ型細菌の高効率分泌シグナルと分泌能向上変異株を取得 耐熱性セルラーゼの特性・構造を解明 メタゲノム的手法により新規セルラーゼを取得 などの要素技術を確立 酵素再利用法により、リグニン含有古紙を糖化率80%で400時間超の連続糖化	(1) 達成
(2)増殖非依存型バイオプロセスの開発 ホスト菌(コリネ型細菌)の細胞機能の統合的解明による生産性向上の基盤要素技術の確立	(2) 糖取り込み系、中央代謝系、各種物質輸送代謝系、細胞複製に関わる遺伝子の機能・制御機構を解明 解糖系酵素発現量の改変による生産性の大幅向上を確認 糖消費速度が向上する遺伝子改変株を取得 補酵素再生系の改変による生産性の大幅向上を確認 糖取り込み系の改変による糖利用能の大幅向上・拡大を達成 高感度・精度メタボローム解析手法を確立 などの要素技術を確立	(2) 達成
各種化合物の高効率生成システムの確立 (STY 10 g/L/h 以上)	D-乳酸、L-アラニン、キシリトール、パリンについて 10 g/L/h 以上の高効率生成を確認	達成
(3)トータルシステムの開発 ソフトバイオマスからの基幹物質生産について基礎データ取得	(3) 増殖非依存型バイオプロセスの発酵阻害物質耐性を確認 C6, C5 混合糖(グルコース、キシロース、アラビノース、セロビオース、マンノース)の完全同時利用技術を確立 古紙からD-乳酸の高効率生成を確認	(3) 達成
(4)ベンチプラントによる実証試験 増殖非依存型バイオプロセスのスケールアップ時の反応条件の最適化	(4) 10 Lスケールで、フラスコスケールレベルと同等以上の生産性を確認	(4) 達成

## 3-②メンブレン利用高効率発酵システムによる有機酸製造基盤技術の開発(東レ株式会社)

目 標	研究開発成果	達成度
(1)膜利用革新的発酵リアクターの開発 ピルビン酸またはD-乳酸を対象としたS TY(Space/Time/Yield)10g/L/h以上 の生産性を持つ膜利用革新的発酵リアク ターの基本プロセスの決定とパイロット設 備へのスケールアップ実証	(1) パイロットスケールにおいてD-乳酸 STY が 11. 2g/L/hr で、800時間の連続発酵を達成	(1) 達成
(2)D-乳酸製造用組換え酵母の創出 高光学純度 D-乳酸製造用酵母を創出	(2) D-乳酸光学純度99. 9%e. e. 、対糖収率90% のD-乳酸発酵酵母を開発した。	(2) 達成
(3)高選択性分離膜を組み込んだ精製プロセ スの開発 精製プロセス基盤技術確立とベンチスケ ールスケールアップ	(3) NF/RO膜を用いた高効率D-乳酸精製プロセ ス基盤技術を確立、ベンチスケールで実証した。	(3) 達成

## 1. 4 総合調査研究(財団法人バイオインダストリー協会)

目 標	研究開発成果	達成度
総合調査研究 (1)研究開発委員会等開催 本委員会 9回 分科会 15回 研究計画検討会 4回	(1) 9回 15回 4回	(1) 達成 達成 達成
(2)研究技術動向調査等報告 6報以上	(2) 10報	(2) 達成

## 2. 研究開発項目毎の成果

### 2.1 高性能宿主細胞創製技術の開発

#### 2.1.1 大腸菌 DGF の研究開発(協和発酵キリン株式会社)

##### 2.1.1.1 染色体遺伝子構成のシンプル化

染色体縮小化株 MGF-02 (62 領域、1.16 Mbp を欠失)を出発菌株として、更に染色体の縮小化を進めることとした。詳細は後述するが、K-12 株がもともと保有している代謝上の変異点 2 点を同時に野生型に復帰させると(S 化)菌株の生育がより安定化する。そこでまず MGF-02 株の S 化株を作製し、この MGF-02S 株から不要遺伝子の削除を進めた。特に染色体上の様々な場所に飛び込む性質を持ち遺伝型の不安定化をもたらす IS 配列の除去を中心に染色体加工を進めた。また MGF-02 株で既に欠失している 096 領域(*proVXW*を含む)は浸透圧耐性ならびに初期成育に重要な役割を持つことが判明し(後述)、096 領域の復帰を行った。最終的に、合計 92 領域を欠失させ、野生型株染色体(4.65 Mbp)の 36%にあたる領域を除去した。作製した株の染色体総延長は 2.98 Mbp となり、本染色体縮小化株を DGF-298 株と称する。本菌株は野生型株が保有する 51 個の IS 配列をすべて除去したものになっている。野生型染色体から DGF-298 株に至る、代表的な染色体縮小化株を図1にまとめた。また DGF-298 株の染色体構造の模式図を図2に示した。DGF-298 株は M9 最小培地で生育することが可能であり、野生型株よりも生育の立ち上がり早い。本菌株のゲノムシーケンシングを実施し、変異点の解析も終了した。

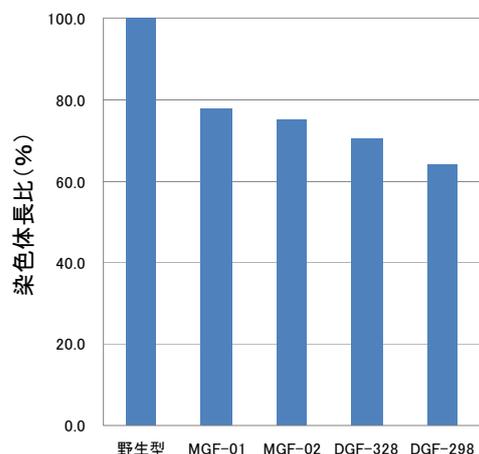


図 1. 代表的な菌株の染色体長

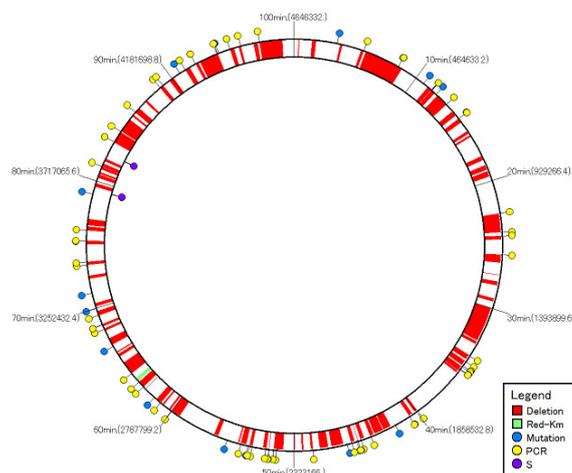


図 2. DGF-298 株の染色体構造模式図

大腸菌染色体を円で表し、頂点にゲノム配列(AC\_000091)の塩基番号 1 番を置いた。赤いボックスは染色体縮小化にともない削除した領域を表し、黄緑色のボックスは Red 組換え系が置換的に挿入されている部分を示した。円周の外側のピンは点変異部位を表し、黄色は染色体加工時の手法に由来するもの、水色は自発的な変異点を示す。内側の紫のピンは、S 化で導入した機能遺伝子の位置で、下が *pyrE* 遺伝子座、上が *ilvG* 遺伝子座を表す。

プロジェクト開始当初での最新データベース(Riley M, and et al. (2006) *Nucleic Acids Res.* 34:1-9)で、染色体縮小株の親株であるW3110株、MGF-02株、ならびにDGF-298株が持つ遺伝子群の機能分類を行った。その結果を表1に示す。機能推定さえもできない機能未知遺伝子群はW3110株で619遺伝子存在するとされていた(表1、Partial informationとUnknown functionの総和)。DGF-298株ではこのカテゴリーの遺伝子の41%を削除して、残りは365遺伝子となっている。またISなどのモバイルエレメントを積極的に排除しており、野生株で321遺伝子あったもの(表1、Phage/IS in commonとPhage/IS in common, predictedの総和)を94%排除し、DGF-298株では19遺伝子までに減少させている。またこのデータベースでは機能に関してエビデンスのある遺伝子と無い遺伝子を分類している。その数字を利用すると、W3110株ではエビデンスの無い遺伝子の割合が45.7%あったものが、DGF-298株では38.3%にまで減少した。

表1:染色体縮小化株に残存する遺伝子の機能分類

	W3110	MGF-02	DGF-298
Enzyme	1092	944	858
Enzyme, predicted	391	279	233
Transporter	343	247	213
Transporter, predicted	254	159	133
Regulator	242	183	148
Regulator, predicted	164	103	83
Membrane	43	36	32
Membrane, predicted	211	155	131
Factor	149	130	111
Factor, predicted	61	50	46
Structural component	88	71	60
Structural component, predicted	37	35	28
Carrier	77	66	63
Carrier, predicted	42	30	28
RNA	156	144	137
Lipoprotein	46	38	31
Cell process	56	50	49
Leader peptide	11	11	10
Pseudogenes in common	74	30	17
Site (OriC)	1	1	1
Phage/IS in common	311	77	15
Phage/IS in common, predicted	10	6	4
Partial information	147	101	92
Unknown function	472	327	273
Total	4478	3273	2796
With evidence	2433	1965	1725
Without evidence	2045	1308	1071
Without evidence/Total	45.7%	40.0%	38.3%

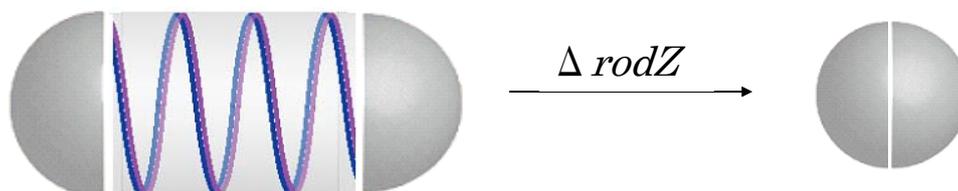
## 2. 1. 1. 2 遺伝子機能解明

KO ライブラリー(一遺伝子破壊株ライブラリー)の各菌株の BIOLOG 試験結果から、破壊すると代謝プロファイルが大きく変化する機能未知遺伝子 65 個を選抜した(表2)。この中で *yfgA* と *ybgT* の2つの遺伝子は、MGF-01WS 株(MGF-01 株の改良株で、S 化されている)を親株とした場合、破壊することができず、必須性が高い遺伝子であることが示唆された。2つの遺伝子のうち、*yfgA* については、共同研究先の国立遺伝学研究所仁木研究室の解析により、大腸菌細胞の桿菌形態を維持するために必要な遺伝子であることが判明した(*yfgA*=*rodZ*、図3)。野生株で *rodZ* を破壊すると、大腸菌が球菌化すると同時に、TCA 関連有機酸の資化能力が大幅に低下する。この結果は、菌体のシリンダー部分がなくなると代謝へ大きな影響がでることを示唆している。

表 2:破壊すると代謝プロファイルが大きく変化する機能未知遺伝子リスト

JW0104 (ppdD)	JW1221 (ychJ)	JW1664 (ydhY)	JW2420 (yfeT)	JW2879 (ygfA)	JW5001 (htgA)	JW5494 (hybB)
JW0126 (yadE)	JW1246 (yciB)	JW1680 (ydiM)	JW2451 (yffH)	JW3201 (yhcM)	JW5004 (caiE)	JW5528 (yrrA)
JW0144 (hrpB)	JW1272 (yciM)	JW1716 (yniC)	JW2478 (yfgO)	JW3357 (yrfC)	JW5049 (ykiB)	JW5539 (yhcB)
JW0380 (yaiA)	JW1333 (abgR)	JW1747 (ynjF)	JW2500 (yfgA)	JW3430 (yhhF)	JW5123 (ycbV)	JW5832 (yedQ)
JW0394 (yajB)	JW1336 (ydaN)	JW1822 (yebS)	JW2538 (yfhA)	JW3586 (yibN)	JW5152 (yceP)	JW5911 (yniD)
JW0667 (ybfM)	JW1445 (yncC)	JW1835 (yebE)	JW2559 (yfiC)	JW3690 (yieE)	JW5199 (yciX)	
JW0724 (ybgT)	JW1492 (ydeM)	JW1842 (yebK)	JW2635 (ygaF)	JW3983 (yjbD)	JW5203 (ymjB)	
JW0725 (ybgE)	JW1587 (ynfL)	JW1958 (yeeI)	JW2759 (gudX)	JW4101 (yjeH)	JW5287 (ynjE)	
JW0726 (ybgC)	JW1588 (ynfM)	JW2092 (yohL)	JW2864 (ygfX)	JW4116 (poxA)	JW5309 (yecM)	
JW1052 (mdtH)	JW1631 (ydhA)	JW2319 (yfcJ)	JW2865 (ygfY)	JW4134 (yjeT)	JW5473 (ygfB)	

MGF-01SW 株を親株として、各遺伝子の破壊を個別に行ったところ、黄緑のマーカーで示した *yfgA* と *ybgT* については破壊することができなかった。

図 3. *rodZ* (*yfgA*) を欠失させた株の形態変化模式図

大腸菌菌体を灰色で模式的に表した。左側の桿菌図で、螺旋を形成している粒子が RodZ 蛋白質である。*rodZ* 欠損株は、シリンダー部分が形成されず、球菌となる(Shiomi D., and et al. (2008) *EMBO J.* 27:3081-3091)。

欠失統合化検討の中から、機能既知アミノトランスフェラーゼ遺伝子 *avtA* と同時に破壊すると栄養要求性を示す機能未知遺伝子2つ、*yfbQ*、*yfdZ* を見いだした。これら3つの遺伝子破壊株は、アラニン要求性を示すことが判明した。この結果から、*yfbQ*、*yfdZ* 遺伝子はアラニン合成を司るアミノトランスフェラーゼをコードすると結論した。最近になり、米国のグループから論文が発表され、我々の結論と同様、両遺伝子が glutamic-pyruvic transaminase をコードし、アラニン合成に係る遺伝子であることが示された(Kim S. H., and et al. (2010) *J. Bacteriol.* 192:5304-5311)。その論文では、*yfbQ*=*alaA*、*yfdZ*=*alaC* と名づけられた。アラニン合成に係る3遺伝子のうち、染色体縮小化 DGF-298 株では *yfbQ* のみが保持されている。

国立遺伝学研究所仁木研究室において、機能未知遺伝子欠損株 1188 株を対象とし、DNA 複製の制御に関与する機能未知遺伝子のスクリーニングを行った。その中で、栄養要求性に起因して見かけの DNA 複製制御異常を示した  $\Delta yhhK$  株を見出した。*in vivo* 実験から *yhhK* はパントテン酸合成に係る遺伝子であることが判明した。*in vitro* 実験からは、YhhK はパントテン酸合成酵素の一つ PanD (L-aspartate- $\alpha$ -decarboxylase) の切断、活性化に係る因子であることが判明した (図4)。

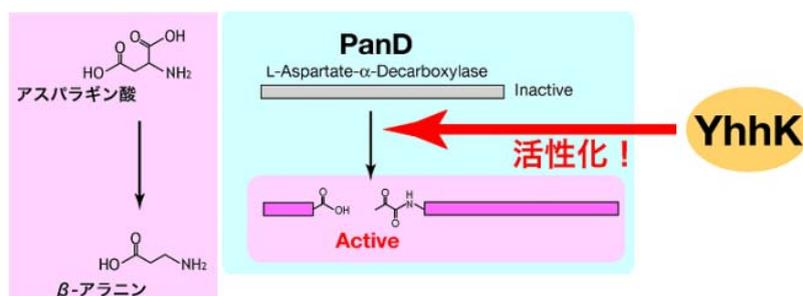


図 4. YhhK の機能

アスパラギン酸をβ-アラニンに変換する脱炭酸酵素 (L-Aspartate- $\alpha$ -decarboxylase) は、不活性型酵素として翻訳されるが、YhhK に依存した N 末端部位の切断により、活性体へと変換される。

プロジェクト開始当時に欠失可能と考えられた遺伝子以外で、論文報告が見られない機能未知遺伝子群を選抜したところ 897 遺伝子が見出された。これらの遺伝子に対応する KO ライブラリー株の BIOLOG 試験結果を解析し、遺伝子破壊により資化力が低下する化合物数に基づいてカテゴリー分けした結果が表3である。資化力が劣化する化合物数が 2 以上になる機能未知遺伝子破壊株は 65 株あり、それらで破壊された遺伝子群は先に示した表 2 に記載した。これら 65 遺伝子を MGF-01WS 株にて破壊し(2 遺伝子は破壊できず)、その破壊株の生育を検証したところ、7 株にて生育の悪化が見られた(表3)。この結果から、生育に悪影響が出る遺伝子破壊の割合は、このカテゴリーでは  $9/65=14\%$  であった。一方、資化力が劣化する化合物数が1のカテゴリーから70株を選抜し、MGF-01WS 株にて破壊し、その破壊株の生育を検証したところ、3 株で生育の悪化が見られた(表3)。この結果から、生育に悪影響が出る遺伝子破壊の割合は、このカテゴリーでは  $3/70=4.3\%$  であった。資化力が劣化する化合物数が0または1のカテゴリーで、この割合が適用できるとすれば、このカテゴリー中で生育悪化を引き起こす可能性がある遺伝子の数は  $792 \times 4.3\% = 34$  遺伝子、と計算された。ここまでの結果を総合すると、897 ある機能未知遺伝子のうち、削除できないものは 83 遺伝子程度と推定される(表3)。DGF-298 株は 2796 遺伝子 (RNA を除くと 2659 遺伝子) から構成されており、削除できない機能未知遺伝子 83 という数字は、全体 (2659) の 3.1% である。これらの結果から、DGF-298 株の遺伝子構成は、削除できない機能未知遺伝子が 10% 以下に低減されていることが示唆された。削除可能性と既存情報をまとめたアノテーション表を現在作成中であり(国立遺伝学研究所との共同研究)、成果報告書に添付する予定である。

表 3: バイオログ試験結果に基づいた機能未知遺伝子破壊株分類

Biolog資化劣化 化合物数	株数	生育悪化株数、内訳
0	675	34 <i>ybaM, ydiJ, yohD</i> (総数は推定)
1	117	
2	42	5 <i>ygfY, ybgC, ygfA, yhhF, poxA</i>
3	12	1 <i>yhcB</i>
4	4	0
5	2	0
6	3	2 <i>yhcM, ybgT</i>
11	2	1 <i>yfgA</i>
No KO strain	40	40
Total	897	83

### 2. 1. 1. 3 宿主細胞の機能解析と改良

大腸菌 K-12 株がもともと保有している代謝上の変異点が 2 点知られていた。一つは *ilvG* に存在するフレームシフト変異であり、この変異のために K-12 株は最小培地ではバリン感受性を示す (Andersen D. C., and et al. (2001) *Biotechnol. Bioeng.* 75:212-218)。このバリン感受性はイソロイシンの添加で相補されるために、K-12 株のジャーフェーマンターの培養ではイソロイシンを添加し、培養を安定させる方法がよく用いられている。もう一つは *rph* 遺伝子のフレームシフト変異であり、下流の *pyrE* の発現を低下させるので、K-12 株は部分的なウラシル要求性を示す (Soupene E., and et al. (2003) *J. Bacteriol.* 185:5611-5626)。この 2 つの変異を同時に野生型に復帰させる (S 化) と菌株の生育が向上することがわかった。*ilvG* 変異の復帰は初期生育を安定化させ、*rph* (*pyrE*) 変異の復帰は培養後半での生育が増進する効果があった。MGF-01 株から MGF-02 株を

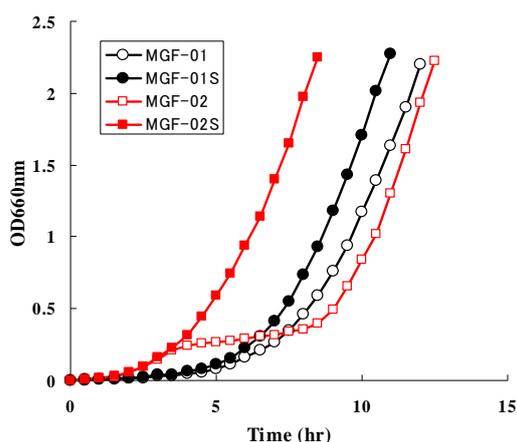


図 5. S 化による初期成育改善

MGF-01 株 (○)、MGF-01S 株 (●)、MGF-02 株 (□)、MGF-02S 株 (■) の生育経時変化を 660nm の濁度を自動濁度測定装置で計測した結果を示す。用いた培地は M9 最小培地で、37℃にて振盪培養した。

作製する工程では、グリシン分解系の活性化因子をコードする *gcvA* を欠失させ、K-12 株が保有する比較的強力なグリシン分解系を弱体化している。グリシン分解系を弱めることで、M9 最小培地を用いた培養試験での MGF-02 株の初期生育立ち上がりは早くなるがすぐに停滞期に入る (図5)。MGF-02 株を S 化することで、停滞期がなくなる事が判明した (図5)。このようにして作製した S 化 MGF-02 株を MGF-02S 株と命名し、更なる染色体縮小化の出発材料とした。先に記載した DGF-298 株も MGF-02S 株由来であり、S 化を継承している株である。

大腸菌は比較的溶菌し易い菌であり、長期間の培養が難しい。そこでトキシン遺伝子(発現すると細胞を自ら破壊する遺伝子群)の排除による細胞の長寿命化の可能性を検討した。野生株から6組のトキシン-アンチトキシン遺伝子(*mazEF*, *chpBS*, *hipBA*, *yefM-yoeB*, *relBE*, *dinJ-ycfQ*)を欠失させ、長期間培養での細胞の生存性を、フローサイトメーターを用いる手法にて計測したところ、*hipAB* を欠失させることで細胞の生存性が上昇することが判明した。メカニズム解析を行ったところ、*hipAB* 欠失は酸化ストレスが引き金になる細胞死を遅延させる効果があることがわかった(Kawano H., and et al. (2009) *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 73:117-123)。DGF-298株では上記6組のトキシン-アンチトキシンを欠失させている(例外的に *mazEF* についてはトキシン遺伝子 *mazE* のみ欠失させている)。

高塩濃度(5.0% NaCl)培地での培養結果から、これまでに作製してきたゲノム縮小化株は浸透圧耐性能が低下していることが判明した[野生株(耐性) > MGF-01株、MGF-02株 > DGF-326株]。原因となる遺伝子欠損を解析したところ、MGF-01株作製過程で欠失させた096領域[JW2652(*proI*)~JW2658(*ygaH*)]が浸透圧耐性能獲得に重要であることがわかった。096領域を復帰すると、浸透圧耐性能能力が向上すると同時に、各種培養での成育開始が早くなるという効果がある。そこで染色体縮小化工程の最終段階近くで、096領域は復帰させ、最終株であるDGF-298株は096領域を保持している。

MGF-02株への染色体縮小化においては、モバイルエレメントの積極的な排除を行っているが、MGF-02S株にはまだ17個のISが残存していた。ISは飢餓状態などで、飛火し、染色体上の様々な場所に挿入され、その数を増やしてゆく性質がある。ISが残存していると、遺伝型が安定化せず、高率な変異株出現の原因となる。そこでISの完全除去を行った。共同研究先の奈良先端大学におけるタイリングアレイCGH解析により、ISの残存を高感度に検出することができる。CGH解析結果を元に、ISの排除を進め、DGF-298株ではIS完全除去に成功した。またDGF-328株は設計上ISを完全除去した株であったが、CGH解析の結果、IS3とIS150が残存していることが判明した。これはDGF-328作製時に用いたP1ファージ由来で、欠失した411C領域[IS3が二つ、IS150が一つ存在、JW3528(*insK*)~JW3509(*dppF*)]が復帰した株が混じっていたためであった。DGF-328株から411C領域を欠失させた株DGF-326株(IS完全除去株)は、初期成育の悪化が見られた。そこで411C領域内の生育に重要と考えられる遺伝子群[JW5940(*bisC*)~JWR0080(*proK*)]のみをDGF-326株で復帰させ、IS完全削除株であるDGF-327株を作製した。このDGF-327株については、ゲノムリシーケンシングを実施し、IS完全削除株であることを確認すると同時に、変異点を同定した。

生育と細胞内のATP供給とは密接にかかわっているとされており、生育を損なわないように不要遺伝子を排除していった場合には、より無駄が低減し、ATP供給力が向上した菌株が作製されるものとの仮説を立てた。そこで染色体の縮小化においては、生育面で問題が発生しないことを条件に欠失する領域を定め、実際に欠失して生育上の問題がないことを確認しながら染色体加工を進めていった。生育に問題を生じさせる欠失については、染色体縮小化のデザインから外した。このようにして作製した一連の染色体縮小化株のATP供給能力をルシフェラーゼ法(Hara K. Y.,

and Mori H. (2006) *J. Biomol. Screen.* 11:310-317)を用いて測定した結果を図6に示す。染色体縮小化に伴い、細胞あたりの ATP 供給能力が高まっていることが判明した。

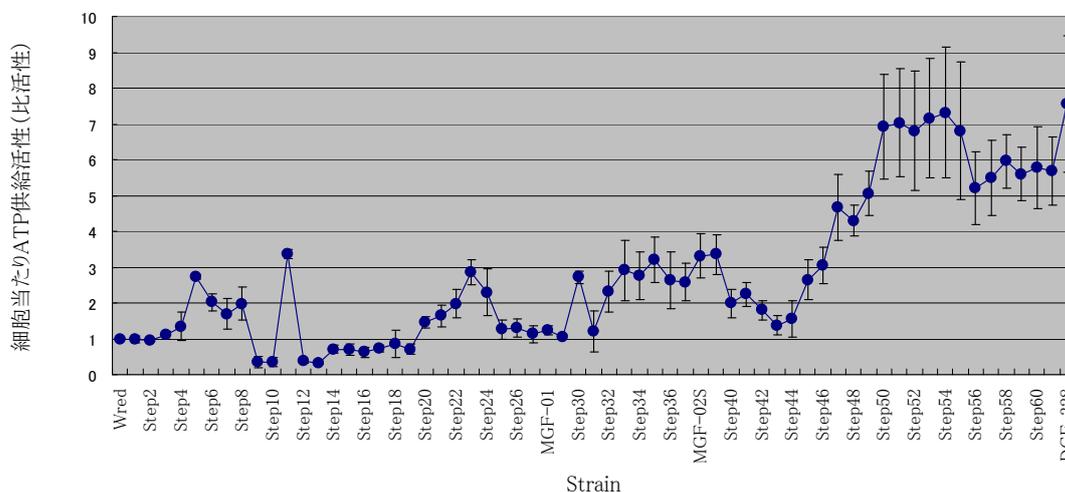


図 6. 染色体縮小化株の ATP 供給活性

野生型株 (W3110red 株) から DGF-328 株に至るまでの段階的な染色体縮小化株について、その ATP 供給活性を測定した。4 回の測定結果の平均値をプロットし、標準偏差をエラーバーとして示した。

#### 2. 1. 1. 4 高度な遺伝子発現制御に使用可能なプロモーターの探索・開発

奈良先端大学との共同研究を進めた精度の高い転写解析可能なタイリングアレイを用いて、プロモーターの探索・評価を行った。小笠原研究室にて設計された新型タイリングアレイ (Genechip, AS 型タイリングアレイ) は、ゲノム両鎖について、約 32 塩基の均一な間隔で、25-mer のオリゴヌクレオチドプローブセットを、計 240,000 セット配置した、大腸菌 K-12 株用カスタムタイリングアレイであり、Affymetrix 社に依頼して作製した。設計に際し、ゲノム配列として W3110 株のシーケンス情報を使用し、affymetrix 社から提供された、ゲノム両鎖に対する、タイリングアレイフォーマットによりタイリングアレイの設計は行われている。本タイリングアレイのプローブ位置の最終的な確認は、インシリコクローニング社から提供されているタイリングアレイ解析に特化した表示ソフトである、IMC ソフトウェアを用いて行い、特定の領域にプローブの欠損等が集中した結果、極端にカバー率の低い領域ができていた等、設計時において判断可能な、実験実施上、重大な問題につながる設計上の問題がないことは確認済みである。

実用的なプロモーターの探索のために野生株 W3110 の S 化株 (W3110S) を、2L ジャーファーマンターにて高密度に培養し、経時的にサンプルを取得し発現解析を行った。有用プロモーターを探索し、Off→On 型プロモーター (培養途中ではじめて ON になる) および恒常的に発現しているプロモーターのリストを作成した。Off→On 型の発現をしている遺伝子群の中で On 時の発現が強く誘導されるものとして、Curli 合成関連の *csdB*、Zn の取り込みに関わる *yodA*、*znuA* を見だし、各

遺伝子のプロモーター (*P<sub>csg</sub>*, *P<sub>yodA</sub>*, *P<sub>znuA</sub>*) について、アルギニンの生産系で評価を開始した。アルギニン生合成の鍵酵素である *argA* のフィードバック阻害を解除する変異を導入した *argA\** をクロラムフェニコール耐性遺伝子と共に、染色体上の *argR* (アルギニン分解系の転写抑制、アルギニン合成系の転写活性に関与し、破壊するとアルギニンの生産が増大する) の位置に置換的に挿入した株 (この操作で *argR* は破壊される) を作製した。トリプトファンプロモーター (*P<sub>trp</sub>*) と *yodA* プロモーター (*P<sub>yodA</sub>*) を使用した場合の濁度とアルギニン生産量の経時変化を図7に示した。*P<sub>trp</sub>* を使用した場合は、培養初期からアルギニン合成が始まり、その結果菌体増殖が低く抑えられる。一方で、*P<sub>yodA</sub>* を使用した場合には、培養初期に *argA\** の発現が抑えられるため、アルギニン生産が行われず菌体量が増加する。その結果、培養途中でアルギニン生産が開始する時点では、菌体量増加による生産速度の向上が確認された。このときアルギニンの生産速度の最大値は 3.29 g/l/h であり、*Corynebacterium* 属細菌を用いたアルギニン発酵の論文値 0.85 g/l/h を大きく上回った。

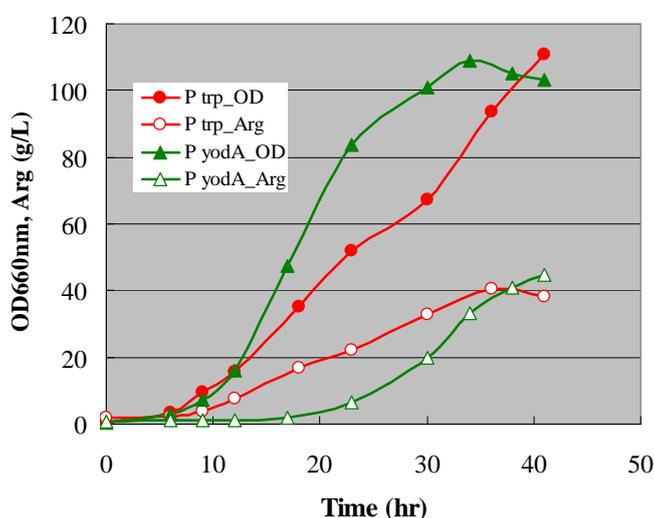


図 7. 生育連動型プロモーターを用いたアルギニン生産例

野生型株 W3110 を宿主として用いた。*P<sub>trp</sub>* あるいは *P<sub>yodA</sub>* を用いて *argA\** を発現させることで、アルギニンを生産させた。*P<sub>trp</sub>* を用いた場合の OD 値 (●) ならびにアルギニン蓄積量 (○)、*P<sub>yodA</sub>* を用いた場合の OD 値 (▲) ならびにアルギニン蓄積量 (△) の変化を経時的に示した。

前記の *P<sub>yodA</sub>* 以外にも様々な亜鉛応答型プロモーターが知られていたもので、それらを収集し、 $\beta$  ガラクトシダーゼ遺伝子 (*lacZ*) をレポーターとして、亜鉛添加による制御性を検証した。初発亜鉛添加なし培地で培養を開始し、培養途中で亜鉛を添加した結果を図8にまとめた。亜鉛で抑制がかかる代表的なプロモーターとしては *P<sub>yodA</sub>* があった。逆に亜鉛で誘導がかかる代表的なプロモーターは *P<sub>zntA</sub>* があった。亜鉛の添加によりこれらプロモーターを制御することで、様々なプロファイルで遺伝子群の発現制御が可能となる。

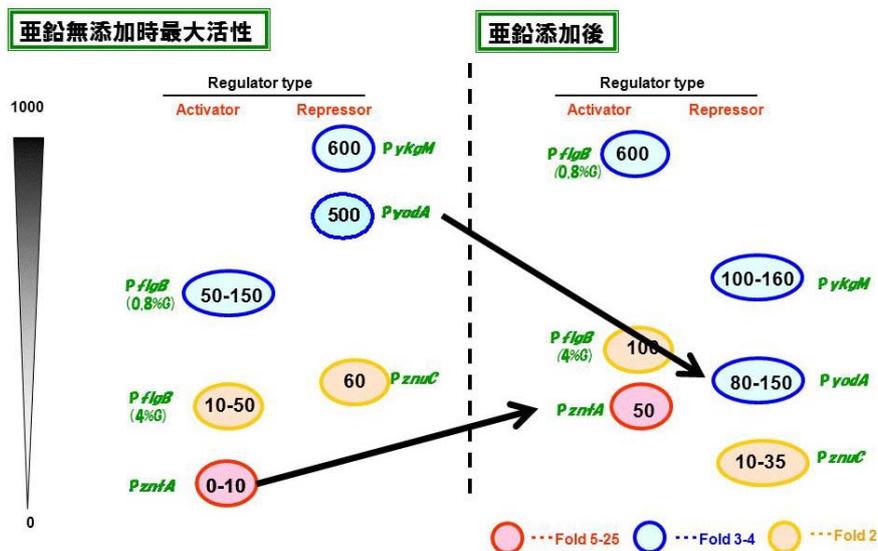


図 8. 亜鉛応答型プロモーター類の制御性

*lacZ* をレポーター遺伝子として用いて、各種亜鉛応答型プロモーターの亜鉛制御性を検証した。図の縦軸方向は、*LacZ* 活性のミラーユニットに相当し、上に位置するほど強く発現していることを示す。亜鉛無添加培養初期段階の各プロモーターからの *LacZ* 活性を、図左側に楕円の位置で表している。培養開始後 12 時間目に終濃度が 400  $\mu\text{M}$  になるように硫酸亜鉛を添加し、*LacZ* 活性を測定した結果を右側の楕円位置で示した。*PflagB*、*PzntA* は亜鉛により発現誘導がかかるプロモーターであり、*PykgM*、*PyodA* と *PznuC* は亜鉛添加により発現抑制がかかるプロモーターである。各プロモーター発現強度の変化量(誘導時/抑制時)の大きさにより、発現強度を示す楕円を色分けしている。変化量が、5 以上、4~3、2 以下で分類し、それぞれ赤、青、黄色で色分けした。

### 2. 1. 1. 5 物質生産への応用

染色体縮小化株による ATP 供給が物質生産に結びつくかを検証するため、染色体縮小化株菌体を ATP 供給源とする静止菌体反応を行った。グルタチオン (GLT) は抗酸化作用を示す生体成分である。グルタチオン合成酵素を発現する菌体との共役反応にて、ATP 依存的なアミノ酸縮合反応を行わせグルタチオンを酵素的に合成させた(図9)。使用した ATP 供給菌の菌体湿重量あたりのグルタチオン生産性を図9に示す。野生型株ではグルタチオン生産がほとんど進行しない。染色体縮小化株を ATP 供給源として用いた反応においては、グルタチオン生産反応が進行し、染色体縮小化株から ATP 供給が行われ、物質生産に使われるようになったことが証明された(図 10)。

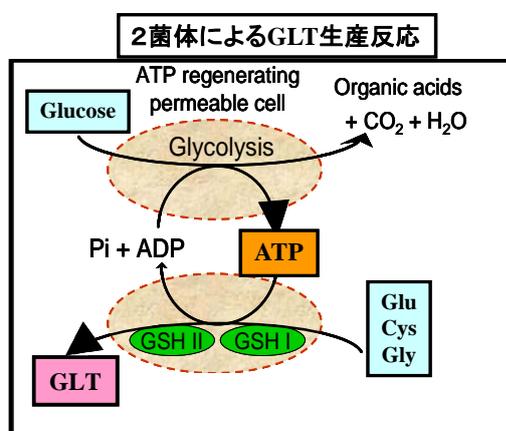


図 9. 菌体反応による GLT 生産模式図

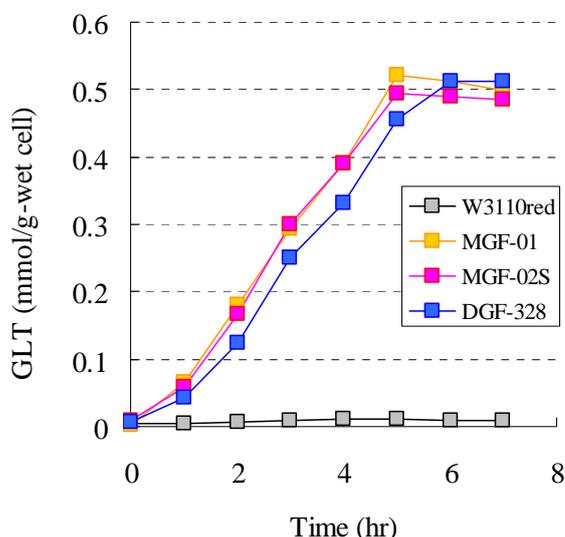


図 10. 野生株と染色体縮小化株による GLT 生産

図9に記載の方法にて、遠心濃縮した菌体を用いた GLT 生産反応を行った。野生株 (W3110red)、■;MGF-01 株、■;MGF-02S 株、■;DGF-328 株、■を ATP 供給菌として用いた反応経時変化を示す。

次に、大腸菌ではまだ生産例のない物質の生産に染色体縮小化株を応用した。ニコチアナミンは、植物が分泌する鉄のキレーター的一种である。ニコチアナミンは 3 分子の S-アデノシルメチオンから酵素的に合成される化合物である(図 11)。S-アデノシルメチオン(SAM)は、メチオンと ATP が縮合して作られる化合物であり(図 11)、ATP 供給力の高い染色体縮小化株では、SAM の効率的な供給を経て、ニコチアナミンの高生産に繋がるものと期待して実験を行った。イロイヌナズナの cDNA からクローン化したニコチアナミン合成酵素遺伝子 (*NAS3*) と大腸菌のメチオン合成系遺伝子の一つ (*metK*) をプラスミド上に載せて (pQE-NAS3 ならびに pSTV-*metK*) 大腸菌に導入し、ニコチアナミンが生産できるかを検証した。野生株と MGF-01 株を用いた検討を行ったが、ともに 2.0 mM 程度のニコチアナミンを生産するのみであった。MGF-01 株は、野生株に比べ生育がよいものの、プラスミドの保持率が悪かった。検討の過程で、ニコチアナミン高生産変異株が MGF-01 株より分離できた。この変

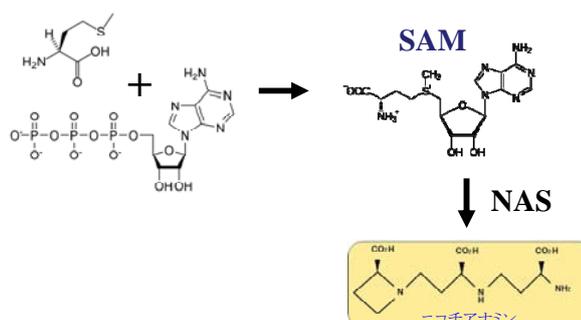


図 11. ニコチアナミン生合成経路

異株から一旦プラスミドを脱落させた株を作製し(MGF-01M 株)、もう一度プラスミドを再導入した。本形質転換株は、MGF-01 株の生育特性を維持し、野生株並みにプラスミドを保持できる株であった。MGF-01M 株を用いたジャー培養では、4.0 mM (1.2 g/L) のニコチアナミンが生産された(図 12)。これは発酵法によるニコチアナミン生産の世界トップレコードである。このように染色体縮小化株を親株とした変異株を用いることで、高効率な物質生産系を構築することが可能であることが示された。またこの結果は、生育、ATP 供給面で優れる染色体縮小株が、物質生産宿主として優れていることを示唆する結果であった。

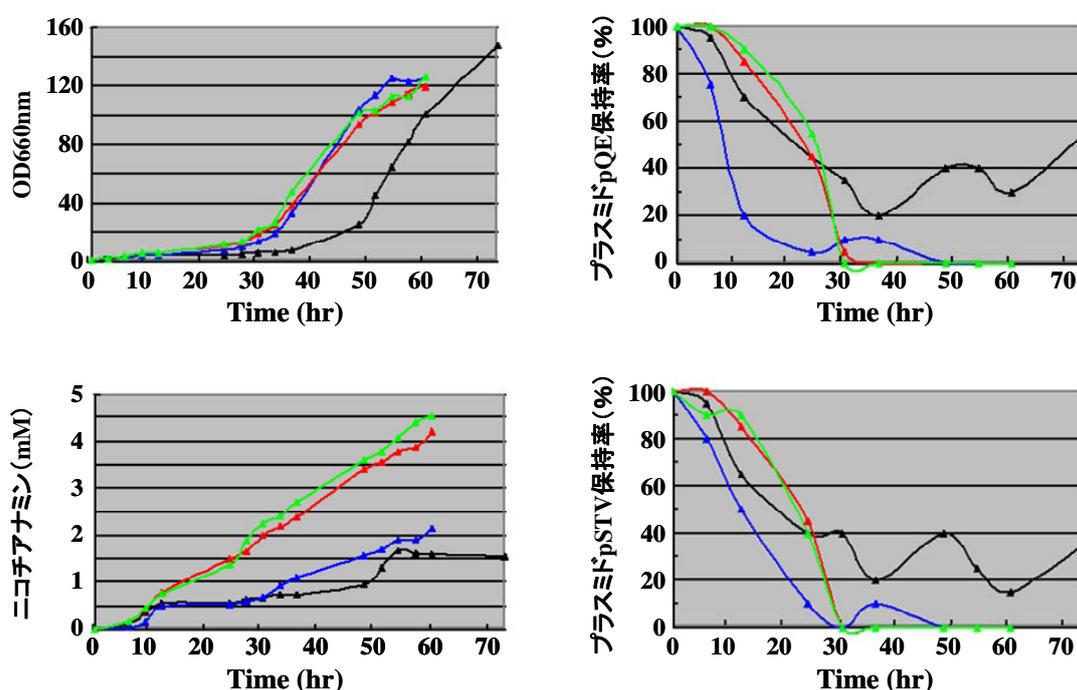


図 12. MGF-01M 株によるニコチアナミン生産

pQE-NAS3 ならびに pSTV-metK にて形質転換した組換え大腸菌を 2L ジャーファーメンターにて培養し、ニコチアナミンの生産経時変化を定量した。使用した宿主は以下の通り、野生株 (W3110)、▲; MGF-01 株、▲; MGF-01M 株、▲ ならびに ▲。▲印の培養では、メチオニンを連続フィードしている。

D-乳酸はポリマー原料として注目されている化合物である。ポリマー原料としては、高光学純度の D-乳酸が要求されており、様々な発酵菌の研究開発が進められている。大腸菌のユビキノン合成系を欠損させることにより、好氣的に高光学純度の D-乳酸を生産することが可能となる。特に *ubiB* 欠損株は D-乳酸生産速度が速く、注目した。W3110 株から MGF-01 株にいたる染色体縮小化株群で *ubiB* 欠損株を作製し、その D-乳酸生産能力を検証したところ、9 工程の染色体縮小化を行った S9 株が最も高い生産性を示し、MGF-01 株は野生株よりも低い生産性を示した(表5)。生産性低下の原因となる欠失を同定したところ、既述の 096 領域 [JW2652 (*proV*)~JW2658 (*ygaH*)] の欠失が生産性を低下させる主要因であることが判明した。その他にも 036、074、075、077 領域も

欠失すると D-乳酸生産に悪影響を与えることが判明し、これらの領域を復帰させた株 MGF-01L5  $\Delta$ ubiB 株を作製し、D-乳酸生産検討に用いた。D-乳酸増産のための代謝系のボトルネックを鋭意検討したところ、グルコース取り込み系遺伝子 (*ptsG*) とピルビン酸脱水素酵素遺伝子 (*ldhA*)、すなわち乳酸発酵代謝系の入口と出口の酵素遺伝子を同時強化することで、大幅に D-乳酸生産性を高めることに成功した。プラスミド pMGtAt は、*ptsG* と *ldhA* を同時発現強化するもので、本プラスミドを導入することで、各 *ubiB* 欠損株の D-乳酸生産速度は向上し、酵母エキスを 0.5% 添加している培地を用いると、80 g/L の D-乳酸を 24 時間で生産できるようになる。このプラスミドを保持している野生型  $\Delta$ ubiB 株と、MGF-01L5  $\Delta$ ubiB 株とでは、生産性に大きな差は無い。MGF-01L5  $\Delta$ ubiB (pMGtAt) 株での D-乳酸生産の最大速度は 4.5 g/L/hr であり、高光学純度 D-乳酸の生産速度としてはプロジェクト開始当時の WR の 2 倍の値であった。

表 4: 各種菌株の乳酸生産性

評価株	D-乳酸 (g/L at 48hr)
W3110 $\Delta$ ubiB	60.8
S9 $\Delta$ ubiB	72.7
MGF-01 $\Delta$ ubiB	58.8
MGF-01 $\Delta$ ubiB $\Delta$ 096::wt	63.2
MGF-01L5 $\Delta$ ubiB	74.9

## 年度毎の特許、論文、外部発表等の件数

区分	特許出願			論文		その他外部発表 (プレス発表等)
	国内	外国	PCT <sup>※</sup> 出願	査読付き	その他	
H18FY	0件	0件	0件	0件	1件	9件
H19FY	0件	0件	0件	3件	0件	3件
H20FY	1件	0件	1件	1件	0件	6件
H21FY	1件	2件	1件	4件	0件	3件
H22FY	2件	0件	0件	0件	0件	3件

(※ Patent Cooperation Treaty : 特許協力条約)

## 2. 1. 2 枯草菌RGFの研究開発(花王株式会社)

本研究開発は、タンパク質分泌生産効率が既存の微生物レベルを超える高性能宿主微生物(RGF:Refined Genome Factory)を創製することが目的である。本研究では(1)遺伝子機能解析、(2)特異的遺伝子発現制御、(3)ユーティリティー機能増強、(4)ゲノム縮小株への高生産化技術の統合、の4つの研究項目に注力する。これら(1)(2)(3)(4)で得られた情報と技術を駆使して最終的にタンパク質の分泌生産性が大幅に向上した枯草菌RGFの創製を目指し、各項目に関して以下に記す成果が得られた。

### 2. 1. 2. 1 平成18年－22年度成果

#### (1) 遺伝子機能解析(ゲノム縮小化技術/代謝最適化技術)

次世代型高機能宿主の構築に向け、これまでに創製した宿主および研究成果を基盤として、さらに生育および物質生産に必要な基本的な遺伝子セットを残しつつ物質生産に不要な代謝や制御に関連する遺伝子を削除した枯草菌の作製を目指し、ゲノム縮小株のトランスクリプトーム、メタボローム動態の解析研究を進めた。これまでに枯草菌から不要遺伝子領域を874kbp削除したゲノム縮小株を得ており、本株はタンパク質の分泌効率や培養後半での代謝活性が向上していた。しかしながら、本株はLB培地において細胞の異常伸長を呈したことから、更なる削除(目標:1.5Mbp削除)には不適合であると判断された。そこでMGB874株に生じた形態異常の原因となった遺伝子変異を特定し、正常配列に戻す事で、正常増殖を示したRGF874株を構築した。更に、本株を用いて富栄養培地、最小培地での転写プロファイルを経時的に測定し、得られたデータを基に新たに削除する領域(53領域、1091遺伝子、約1Mbp)を抽出した。不要領域の効率的な削除手法を開発し、53領域の単独削除株を構築し、増殖および生産性評価を行った。その結果、RGF874株と比べて120%以上生産性が向上する領域を7領域、生産性に変動が無い領域として26領域、生産が低下する領域として16領域を峻別した。MGB874株から上記削除領域の内、27領域を削除したゲノム縮小株(RGF1334株)を創成した。本株はMGB874株に比べて培養後半で高いセルラーゼ生産能を有しており、培養5日目で生産性が1.2倍に向上した。

RGF1334株からさらに10領域を削除し、野生株のゲノムDNAの1.5M欠失したRGF1501株を作製したが、セルラーゼ生産性は逆に低下した。

また、RGF1334の特徴として、定常期のリボゾームプロファイルを解析し、活性型のリボゾームが存在することでタンパク質合成が亢進していることを示した。細胞周期に関しては、削除されていたDnaA Boxを戻すことにより、染色体複製開始異常を完全に回復することができた。さらに染色体の30%を縮小した菌株の染色体複製・細胞分裂の解析により、染色体複製開始・細胞分裂のタイミングについての理解が可能となった。

新たな酵素生産技術の開発を目指し、リパーゼ(LipA)評価系及びプラスミド発現系を構築し、更に宿主機能改善により本株のスタート時に対して約10倍に生産性が向上できた。また、ストレス応答プロテアーゼである*htrA*と*htrB*の多重削除や*bpr*と*vpr*を欠失させる事でリパーゼ生産性が

120%に向上する事を見出した。

## (2) 特異的遺伝子発現制御(遺伝子制御技術/代謝最適化技術)

タンパク質分泌生産に関わる遺伝子群の効率的発現制御に対して、オペロン化による一括制御技術の開発を目指した結果、分泌装置に関連する遺伝子を単一オペロンに集約化する事でセルラーゼ生産性が120%に向上できた。更に、抗体を用いたウェスタン解析法を用いて、集約化された遺伝子のタンパク質発現量を評価した結果、親株に比べて2-3倍量の発現が認められた。また、分泌装置関連遺伝子の集約化と同時にゲノム側の同遺伝子を全て削除し、分泌装置が機能している事を確認した。

酵素生産に特化した代謝パスウェイのデザインを目的として、枯草菌MGB874株、MGB874(*rocR*復帰)、MGB874( $\Delta$  *rocG*)、MGB874(*rocR*復帰  $\Delta$  *rocG*)と野生株(168株)のタイリングアレイによる転写解析を行い、増殖と酵素生産がグルタミン代謝系(GS-GOGAT経路)で制御できる事、更に窒素効率の向上に寄与できる事を明らかにした。また、バリン代謝関連遺伝子(*ywaA*, *ybgE*, *bcd*)の欠失およびアルギニン分解関連オペロン(*rocDEF*)の復帰で酵素生産性をそれぞれ1.2倍以上向上でき、窒素効率が改善された。

細胞内の動態解析による有用タンパク質生産に特化した代謝経路のデザインを行う事を目的に、枯草菌 MGB874 株と野生株(168 株)のメタボローム解析を行った。その結果、グルタミン酸の蓄積量が MGB874 株で野生株の 2 倍以上存在しており、グルタミン酸制御に関与する *rocG* 遺伝子の制御が鍵であると考えた。そこで、*rocG* 欠失株を構築する事で細胞内のグルタミン酸量を増加させることができると考え、欠失株を構築し評価を行った。しかし、グルタミン酸が高蓄積し細胞増殖は増加する一方で、酵素生産性は低下することが判った。解析の結果、培養 20 時間で培養液中のアンモニア枯渇が起こっていることが判明したため、*rocG* 欠失株のアンモニア代謝制御系の改良を目的に、アンモニア流加系培養による評価を行った。その結果、アンモニア流加により MGB874 株の 1.5 倍にまで生産量が向上できた。更に、細胞内のアンモニア制御系遺伝子の改良により、最終的に MGB874 株の 1.7 倍にまで生産量を向上させる事に成功した。

また、*rocG* の低レベルの発現が酵素生産に重要であることから、IPTG で制御可能な Pspac プロモーターを利用し、*rocG* の転写を制御することで、酵素生産量の更なる向上を目指した。その結果、IPTG を添加するにつれて酵素生産量は増加し、最適条件下で MGB874 株の 1.2 倍のセルラーゼ生産量を示した。そこで、IPTG 添加条件を模倣した *rocG* 制御が可能なプロモーターをプロモーターライブラリーから選抜し、*rocG* 遺伝子の制御に供したところ、1.2 倍のセルラーゼ生産量を確認できた。

更なる酵素生産量向上のため、窒素代謝に加え炭素代謝制御技術の構築を行った。酵素生産に最適な炭素消費速度に制御するため、主要マルトーストランスポーターである MalP トランスポーターの発現量を誘導物質(キシロース)の添加により制御可能な株の構築した。様々な糖消費速度条件下におけるセルラーゼ生産量を測定した結果、malP が緩やかに発現している場合に MGB874 株と比較して約 2 倍の酵素生産に成功した。

### (3) ユーティリティ機能増強(高生産化技術)

MGB874 株はプラスミドコピー数が野生株に比べて増加するが、培養後半で急激に減少する。そこで、ヌクレアーゼ遺伝子の欠失株を構築し評価を行ったところ、菌体量を増やさずにセルラーゼ生産性が野生株に比べて 150%に向上する遺伝子、及び菌体量と共にセルラーゼ生産が向上した二つのタイプを見出した。

枯草菌は 10 個の rRNA (*rnn* オペロン) を有しているが、2 コピーにまで削除しても細胞増殖およびセルラーゼ生産性は野生株に対して 80%程度を維持することが分かった。また、枯草菌の rRNA オペロンの改変によりセルラーゼ生産性が 20%向上した。さらに、遺伝子削除によるリボソームの改変によっても、セルラーゼ生産性が最大 20%向上した。

菌体外タンパク質輸送における主要膜透過装置を構成する因子である *secA* の C 末端側に存在する不用領域の削除によりセルラーゼの生産性が 115%に向上した。

枯草菌のタンパク質分泌輸送装置(*secA*)を改変することで、ヒト型インターフェロン  $\alpha$  タンパク質が 2 倍の生産量を示した。また、枯草菌の持つ 2 つの Tat システムを、それぞれ高発現した結果、ヒト型インターフェロン  $\alpha$  タンパク質の生産性が約 2 倍向上した。

細胞表層の電荷制御技術の構築を目指し、プロテアーゼ 9 重欠失株(Dpr9)をベースに、細胞壁の電荷(テイクロン酸およびリポテイコ酸)に関与する遺伝子を人為的発現制御できる株を構築した。この株において、浸透圧の調節は Dpr9 と同程度の能力を有することが判明した。テイクロン酸高発現株においてセルラーゼ生産量が約 1.3 倍に向上したが、アミラーゼの生産量は変わらなかった。一方、リポテイコ酸高発現株ではアミラーゼ生産量が顕著に低下したのに対し、セルラーゼの生産量は変わらなかった。

各種細胞膜脂質合成関連遺伝子欠失を 10 株構築し、セルラーゼ、アミラーゼ、プロテアーゼの生産性を検討した結果、いくつかの欠失株で酵素生産性向上し、酵素の種類により生産に適した膜脂質組成が異なる可能性が示唆された。

### (4) ゲノム縮小株への高生産化技術の統合

枯草菌全ゲノムから 1.3Mb 以上の遺伝子領域を削除したゲノム縮小株をベースに、分泌装置(*secY*)の高発現化技術を統合した結果、MGB874 株に対してセルラーゼ生産量を 1.2 倍以上向上させることに成功したが、アルギニン分解関連オペロン(*rocDEF*)復帰の統合効果のないことも判明した。

最適な統合株として検討した結果、925kbp を削除したゲノム縮小株(RGF925)に、アミノ酸代謝関連遺伝子改変(*rocG* 欠失とアンモニア流加系培養)・分泌装置改良(*secY* 強化)の個別技術を集約した結果、MGB874 株に対してセルラーゼ生産性が 2.5 倍向上し、初期の目標である 2 倍向上を達成した。

## 2. 1. 2. 2 共同研究 遺伝子機能解析及びユーティリティ機能増強

(1) 奈良先端科学技術大学院大学・バイオサイエンス研究科 小笠原 直毅 教授

(a) 遺伝子機能解析研究(ゲノム縮小化技術/代謝最適化技術)

枯草菌ゲノム削除株(MGB874 株)の増殖異常の原因を正常に戻した菌株(RGF874 株)を用いて富栄養培地、最小培地での転写プロファイルを経時的に測定し、得られたデータを基に新たに削除する領域を抽出した。RGF874 株を基株として、新削除領域の単独欠失株を 49 株取得し、富栄養培地での細胞増殖、細胞形態について確認を行った。さらに、これら 49 株のセルラーゼ生産性について考慮した結果、33 領域の削除が今後の連続的な削除の候補として選抜することができた。

また、RGF874 株の生産性向上の要因として、定常期におけるタンパク質翻訳効率の向上が確認され、その原因として定常期特異的に形成される不活性化された 100S リボゾームの減少が確認され、このことが定常期における酵素生産の持続に大きな要因として働いていると考えられた。

MGB874 株から上記削除領域の内、27 領域を削除したゲノム縮小株(RGF1334 株)を創成した。本株は MGB874 株に比べて培養後半で高いセルラーゼ生産能を有しており、培養 5 日目で生産性が 1.2 倍に向上した。RGF1334 株から、さらに 10 領域を削除し、野生株のゲノム DNA の 1.5M 欠失した RGF1501 株を作製した。しかし、RGF1334 以降ゲノム縮小を続けるとセルラーゼ生産性には負の効果が見られたため、RGF1334 株について、ゲノムシーケンシング、転写マップ作製、メタボローム解析などのオミックス解析、タンパク質合成能、細胞周期の解析を行った。

メタボロームに関しては、効率的に解析するためのソフトウェアとして AMDORAP を開発し、LC-LTQ-Orbitrap を用いてゲノム縮小株の細胞内代謝物を解析・同定した。その結果、削除株の特徴を明らかにすることができた。さらに、トランスクリプトームデータから細胞内代謝物変化の原因遺伝子を同定し、トランスクリプトームとメタボロームデータの関連性を見出すことに成功した。

Solexa シーケンサを用いたゲノムシーケンシングより、RGF1334 株の全ゲノムシーケンシングを明らかにし、20 か所あまりの SNP と 2 か所の塩基挿入・削除を確認した。

また、RGF1334 の特徴として、定常期のリボゾームプロファイルを解析し、活性型のリボゾームが存在することでタンパク質合成が亢進していることを示した。細胞周期に関しては、削除されていた DnaA Box を戻すことにより、染色体複製開始異常を完全に回復することができた。さらに染色体の 30% を縮小した菌株の染色体複製・細胞分裂の解析により、染色体複製開始・細胞分裂のタイミングについての理解が可能となった。

(b) 特異的遺伝子発現制御研究(遺伝子制御技術/代謝最適化技術)

増殖に伴う転写プロファイルをもとに個々の遺伝子の発現時期の特定を行った。例として、ゲノム削除株では 2 成分制御系 PhoPR 制御遺伝子ほか特異的に転写の上昇が確認される遺伝子群が多数発見され、これらの制御系下の制御領域は使用可能と考えられた。

タイリングアレイを用いたトランスクリプトーム解析、転写因子  $\sigma A$  と RNA ポリメラーゼ  $\beta$  サブユニットの ChIP-chip 解析により、詳細な転写マップを完成させた。作成した転写マップを用いて、培地条件、細胞増殖のフェイズに依存したプロモーターを新たに同定し、遺伝子発現制御のための情

報の収集を行うことができた。

また、抗生物質に反応する枯草菌 2 成分制御系 *liaRS* を用いて、発現制御系の構築を行った。この技術により非常に低濃度の抗生物質の添加によって強力な転写の誘導を行い、実際に発現制御に応用することができることが示された。

(2) 筑波大学・生命環境科学研究科 中村 幸治 准教授

(a) 遺伝子機能解析研究 (ゲノム縮小化技術 / 代謝最適化技術)

タンパク質の翻訳制御が可能な低分子 RNA として同定した BS101 とターゲットとなるタンパク質の翻訳制御を調整する領域をもちいて、LacZ タンパク質の発現調節が可能であることを示した。また、タイリングアレイを用いた遺伝子間領域の転写解析により、新規低分子 RNA の検索を行った。その結果、複数の転写物より低分子 RNA 候補を選抜した。

タイリングアレイの遺伝子発現解析データより、遺伝子間領域から孢子形成時に特異的に発現している低分子 RNA を同定し、細胞増殖時に高発現することで生育に阻害が見られることを見出した。この特性は、発現制御に応用できるものと期待された。

(b) ユーティリティ機能増強 (高生産化技術)

枯草菌におけるタンパク質シャペロン装置をオペロン化したシャペロン強化株を作成し、ヒト・インターフェロン  $\alpha$  タンパク質の生産性が 200%、インターフェロン  $\beta$  は 180%、エンドスタチンは 120% にそれぞれ向上した。また、評価結果より、生産物によって必要とするシャペロン因子が異なる傾向が見られ、インターフェロン  $\beta$  に関しては、DnaK/J の強化が生産性向上に効果があったと予想された。

SecA は、分泌タンパク質を細胞内から細胞外に押し出す機能を持つ。SecA の C 末端側に存在する CTL 領域は、多くの種間で相同性が非常に低く、機能性も見出されていない領域であった。また、CTL 下流に存在する Sec-C ドメインは、大腸菌 SecB 結合領域の相同領域であるが、枯草菌には SecB が存在しない為、不要な領域と考えられた。そこで、本領域を削除した株を作成し、インターフェロン  $\alpha$  の生産性評価を行ったところ、野生株に比べ 2 倍以上生産量が増加した。

枯草菌のタンパク質分泌輸送装置の一つである Tat システムを利用した分泌タンパク質生産について検討を行なった。枯草菌の持つ 2 つの Tat システムを、それぞれ高発現プロモーターによって発現させる強化株を作成し、本株を用いてヒト型インターフェロン  $\alpha$  タンパク質の生産性評価を行った結果、約 2 倍の生産性を示した。さらに、枯草菌のタンパク質分泌輸送装置構成因子 (Ffh) に変異を導入し、セルラーゼ生産向上株を選別した結果、野生型 Ffh に比べてセルラーゼ生産性を 60% 以上向上させる Ffh 変異株を取得した。

また、プロテオーム解析の結果、ゲノム縮小株において、宿主由来の菌体外分泌タンパク質量が減少していたことから、物質生産時の夾雑物を減少させることが可能となった。特に、ゲノム縮小株をもとに作成したプロテアーゼ欠失株においても、夾雑物は少なく、異種タンパク質の生産に有効であることが見出された。また、菌体外分泌に使用するシグナル配列と Pro 配列の改良によりヒト型インターフェロン  $\alpha$  タンパク質の生産量を 5 倍増加させることを可能にした。

(3)信州大学・繊維学部応用生物科学科細胞工学 関口 順一 教授

(a)ユーティリティ機能増強(高生産化技術)

溶菌防止技術について2通りの技術を確立した。細胞壁溶解酵素活性阻害タンパク質 YoeB の発現強化およびペプチドグリカン糖鎖の脱アセチル化酵素 YjeA の発現強化における細胞壁構造の改変により、それぞれ溶菌を防止する上で人為的な操作が可能となった。

CTC(5-Cyano-2,3-ditoly-2H-tetrazolium chloride)による細胞呼吸活性を指標に MGB874 株の代謝活動の持続性を評価したところ、培養後期の代謝活動の持続化が観察されたことを「生物機能を活用した生産プロセスの基盤技術研究」において報告している。本プロジェクトで創製された RGF874 株もまた MGB874 株と同様に培養後期の代謝活動が維持されていることを確認した。また代謝活動の持続に関わる因子を明確にする為、マイクロプレートリーダーを用いた CTC 染色性の簡易評価方法を構築した。この評価方法を利用し、代謝活動の持続に関わる因子を探索した。現在までに、スポア形成が阻害される *phrA* および *phrE* それぞれの単独変異株、またスポア形成関連の  $\sigma^H$ 、 $\sigma^F$ 、 $\sigma^E$ 、 $\sigma^G$  および  $\sigma^K$  の各種シグマ変異株において、培養後期の代謝活動の持続化が観察された。一方、スポア形成初期に機能する転写制御因子である Spo0A の変異株では培養後期の代謝活動は低下していた。これらのことから Spo0A がリン酸化(活性化)され且つスポア形成が遅延している状態が、培養後期の代謝活動の持続性に関わることが示唆された。

細胞内 ATP 量を指標とした宿主細胞の代謝活動持続評価を行った。ATP は生体のエネルギー代謝、恒常性の維持など細胞内の重要な反応に欠かせない物質として知られている。培養後期には野生株の細胞内 ATP 量は減少していくが、MGB874 および RGF874 株では野生株の 1.5-2 倍高いことが明らかとなり、培養後期の代謝活動の持続化が示唆された。

細胞表層の電荷制御技術の構築を目指し、プロテアーゼ 9 重欠失株をベースとし、tagF(テイコ酸合成関連遺伝子)の発現量を IPTG 濃度により人為的に発現制御できる株(Dpr9/PtagF)を構築した。Dpr9/PtagF 株を IPTG 非存在下で培養した時のテイコ酸量は Dpr9 と比較して約 20-30% 減少しているが、浸透圧の調節は Dpr9 と同程度の能力を有し、さらに細胞壁溶解酵素活性が低下し、Dpr9 の溶菌しやすい性質を回避できる利点を持つことが示された。

表層の電荷に関わるアニオン性ポリマー因子(テイコ酸およびテイクロン酸)を高発現させた組成改変株を構築し、各種酵素生産量を評価した。その結果、テイクロン酸高発現株においてセルラーゼ生産量が約 1.3 倍に向上したが、アミラーゼの生産量は変わらなかった。一方、リポテイコ酸高発現株ではアミラーゼ生産量が顕著に低下したのに対し、セルラーゼの生産量は変わらなかった。また、細胞表層の電荷の変化を確認するため、常法に従い各菌株の細胞壁中のテイコ酸およびテイクロン酸の解析を行った結果、テイクロン酸高発現株におけるテイクロン酸量は野生株の約 4 倍にまで増加しており、高発現システムが機能していることを確認できた。一方、本株のテイコ酸量は減少傾向が認められ、テイクロン酸の高発現が、テイコ酸量に影響を及ぼすことが示唆された。

各種細胞膜脂質合成関連遺伝子欠失を 10 株構築し、セルラーゼ、アミラーゼ、プロテアーゼの

生産性を検討した結果、いくつかの欠失株で酵素生産性向上し、酵素の種類により生産に適した膜脂質組成が異なる可能性が示唆された。

セルラーゼでは、リジルホスファチジルグリセロール(LPG)合成酵素 MprF、カルジオリピン(CL)合成酵素 YwnE および YwjE、グリコリピド(GL)合成酵素 UgtP のそれぞれ単独遺伝子欠失株( $\Delta$ mprF、 $\Delta$ ywnE、 $\Delta$ ywjE)でセルラーゼの生産性が1.2倍以上向上した。さらにCL合成酵素二重欠失株( $\Delta$ ywnE  $\Delta$ ywjE)において相乗効果が認められた。アミラーゼでは $\Delta$ mprF株で約1.4倍向上し、 $\Delta$ mprF  $\Delta$ ywnE株で2倍近く向上した。プロテアーゼでは $\Delta$ ugtP株で約1.2倍、 $\Delta$ mprF  $\Delta$ ywnE  $\Delta$ ugtP および $\Delta$ mprF  $\Delta$ ywnE  $\Delta$ ugtP  $\Delta$ pssA-psd(PssA;ホスファチジルセリン(PS)合成酵素、psd;ホスファチジリエタノールアミン(PE)合成酵素)株で1.3倍以上向上した。

### 年度毎の特許、論文、外部発表等の件数

区分 年度	特許出願			論文		その他外部発表（プレス発表等）
	国内	外国	PCT <sup>※</sup> 出願	査読付き	その他	
H18FY	0件	0件	0件	0件	0件	6件（プレス発表1件）
H19FY	9件	0件	1件	5件	2件	11件（うち国際学会4件）
H20FY	5件	0件	1件	1件	0件	9件（プレス発表1件）
H21FY	3件	0件	0件	2件	1件	7件（うち国際学会4件）
H22FY	2件	0件	0件	12件	1件	7件（うち国際学会2件、プレス発表1

(※ Patent Cooperation Treaty : 特許協力条約)

### 2. 1. 3 分裂酵母高性能宿主細胞創製技術の研究開発(旭硝子株式会社)

分裂酵母 *Schizosaccharomyces pombe* (*S. pombe*) は、出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* (*S. cerevisiae*) とともに、分子細胞生物学の分野で、特に細胞周期・細胞形態・染色体構造・情報伝達の研究に盛んに用いられているモデル真核微生物である。*S. pombe* の染色体塩基配列の決定は、2002年2月に英国サンガー研究所の Wood らによって、真核生物における第6番目のものとして報告された。セントロメア・テロメアおよび6箇所のギャップを除いた合計12,534,388bpが決定され、総遺伝子数は当初4,824-4,940と推定された。*S. cerevisiae* と比較して、ゲノムの大きさがそれほど変わらないのに関わらず遺伝子が約1,000個少なく、約4,900遺伝子というのは、これまでに全塩基配列が決定されたモデル真核生物の中で最小の遺伝子数であり、重複遺伝子が少ないため、遺伝子の機能を解析する上では良い酵母となっている。このように *S. pombe* は *S. cerevisiae* に比べて遺伝子重複が少ないという特徴を持ち、また、ORF中には約43%の遺伝子にイントロンが存在し、*S. cerevisiae* や *Candida albicans* などと比較するとイントロンが約10倍多いことも明らかになっている。

外来遺伝子発現のための宿主という観点からも、分裂酵母は出芽酵母と比較して優れた特性を持っている。例えばタンパク質の翻訳後修飾において、酵母は真核微生物であるために大腸菌や枯草菌とは異なり、糖タンパク質糖鎖を合成する能力がある。この真核細胞としての宿主の利点を活かすためには、高等生物由来の糖タンパク質を分裂酵母で分泌生産することが期待される。しかしながらその糖鎖構造は高等動物由来のものと分裂酵母由来のものでは大きく異なっている。分裂酵母はその糖鎖構成成分に、出芽酵母とは異なるガラクトースを含み、高等動物に近い糖鎖構造を有している。このようにそのまま高等動物の発現用宿主として用いるには課題があり、分裂酵母特有の糖鎖生合成系を高等動物型、より好ましくはヒト型に改良することが必要である。

異種タンパク質の生産系は大腸菌から動植物細胞、無細胞系に至るまで多く存在する。近年では動物体・植物体・昆虫体そのものを宿主とした研究開発も進んでいる。酵母は真核単細胞生物であり、その遺伝子操作や大量培養が簡便であることから、異種タンパク質生産のよい宿主とされている。例えば *Pichia pastoris* というメタノール資化性酵母で異種タンパク質生産に関しては多くの実績例がある。分裂酵母においても、特に近年では旭硝子や、九州大学／香川大学との共同による研究開発成果が多く生まれており、分裂酵母で良い生産系を確立することができれば、日本発のオリジナル技術としてわが国の産業にとってもプラスになることが期待できる。そこで本研究では、菌体内および分泌型での生産性を簡便に測定できるモデルタンパク質として緑色蛍光タンパク質(GFP)およびヒト成長ホルモン(hGH)を、真核微生物の利点を生かした高等動物由来の糖鎖付加モデルタンパク質としてヒトトランスフェリン(hTF)を選び、研究開発を行った。

まず分裂酵母染色体大規模削除株の作製と異種タンパク質生産の向上(2. 1. 3. 1)として、エネルギー供給系の解明と最適化技術開発を含めた、本テーマの主眼である分裂酵母染色体大規模削除株の作製と、それを用いた異種タンパク質生産性の向上例について示す。次に分裂酵母染色体大規模削除株の作製にともなう個別の技術開発例として、外来遺伝子機能安定導入(2. 1. 3. 2)、遺伝子発現制御機能付与(2. 1. 3. 3)、分子シャペロン群の解明と最適化技術開発と小

胞体ストレスの検出・回避技術開発を統合した異種タンパク質分泌生産向上(2. 1. 3. 4)、ゴルジ装置における翻訳後修飾系の制御(2. 1. 3. 5)に関して記載する。

### 2. 1. 3. 1 分裂酵母染色体大規模削除株の作製

近年、微生物のゲノムをダイナミックに改変して有用な細胞を創り上げる合成生物学が脚光を浴び始めている。様々なツールを導入するための宿主細胞として、物質生産に不要な代謝エネルギーの浪費を削減したシンプルな細胞の構築が望まれている。分裂酵母は高等動物の遺伝子機能をよく相補し、特にヒトに由来するタンパク質の生産に利用することができる有用な異種タンパク質生産宿主株のひとつである。そこで、不要な代謝エネルギーの浪費を抑えた分裂酵母物質生産宿主株を構築するため、染色体をダイナミックに改変することを試みた。分裂酵母には約 4,900 個の遺伝子があり、その 21.6%が必須遺伝子である。これらの必須遺伝子は3本の染色体上に散在しており、大規模な非必須遺伝子クラスター領域はほとんど無い。しかしながら、第1、第2染色体末端には 120kbp から 210kbp に及ぶ広い非必須遺伝子クラスター領域が存在する。そこで我々は、第1、第2染色体末端を染色体削除のターゲットとし、実際に Latour 法を用いて大規模削除が可能であることを証明した。さらに細胞の安定性も重視しながら様々な検討を行った結果、最大染色体削除サイズ 657.3kbp (全ゲノムの 4.7%)、最大遺伝子削除数 219 遺伝子の染色体大規模削除株を得ることが出来た。さらに、モデルタンパク質として緑色蛍光タンパク質 (EGFP、菌体内発現)、ヒト成長ホルモン (hGH、分泌発現)、ヒトトランスフェリン (hTF、分泌発現) を用いて染色体大規模削除株の異種タンパク質の発現能力が向上していることを確認した。さらに物質生産能力が向上した現象について、オミックス解析などを用いて要因の解明に取り組んだ。以下に本研究結果の詳細について報告する。

#### (1) 染色体大規模削除株の構築

分裂酵母の染色体は、長さが 5.7Mbp、4.6Mbp、3.5Mbp の 3 本の線状 DNA で構成され(図 1)、全ゲノム配列はデータベース (<http://www.genedb.org/genedb/pombe/>) に公開されている。本プロジェクトの開始当初、出芽酵母のような一遺伝子破壊株ライブラリーによる必須遺伝子情報は公のデータベースには公開されていなかった。そこで、分裂酵母と出芽酵母の相同遺伝子情報を参考に染色体上の必須遺伝子の分布を推測した。分裂酵母の必須遺伝子は染色体上に満遍なく散在しており、100kbp 以上の大領域を一度に削除できる領域は第 1 染色体と第 2 染色体末端以外ほとんどないことが推測された(表 1)。近年、Kim ら(2010)によって分裂酵母一遺伝子破壊ライブラリーの構築による必須遺伝子情報が公開された。この論文においても第 1 染色体、第 2 染色体末端領域にはほとんど必須遺伝子が存在しないと報告されたが、第 1 染色体左腕の SPAC1F8.07c (*pdc2*) と第 2 染色体左腕の SPBC1348.06c、*alr2* は必須遺伝子であるとアノテーションされていた(図 2)。しかしながら、我々の Latour 法を用いた大規模削除解析では、これら 3 つの遺伝子は削除することが出来たため、第 1、第 2 染色体各末端の最末端にある必須遺伝子はそれぞれ *trs33*、*sec16*、*zas1*、*usp109* であることが判明した。

表 1 必須遺伝子マップから大規模削除が可能と推測された非必須遺伝子領域

No.	Regions	Involved genes	ORFs	Size (kb)	Deletant
1	BLT	estimated <i>tlh</i> - SPBC1198.03c	68	211.7	IGF525
2	ALT	SPAC212.11( <i>tlh1</i> )- SPAC13G6.04( <i>tim8</i> )	72	179.7	IGF719
3	ART	SPAC29B12.08 - estimated <i>tlh</i>	52	155.4	IGF524
4	BRT	SPBC1289.13 - SPBCPT2R1.08c( <i>tlh2</i> )	41	121.6	IGF526
5	AGL	SPAC513.02 - SPAPB1A11.04c	26	76.7	MGF338
6	PDA	SPAC26F1.03 ( <i>pda1</i> )- SPAC19D5.04( <i>ptr1</i> )	11	38.6	finished
7	MFM	SPBC947.06c - SPBPJ4664.03( <i>mfm3</i> )	9	37.6	finished
8	CLT	SPCP20C8.01c - SPCC757.15	12	32.0	not tried
9	AMT	SPCC1739.14( <i>npp106</i> ) - SPCC576.04	10	27.7	MGF392
10	CRT	SPCP1E11.10 - SPCC569.01c	11	26.9	not tried
11	GHT	SPCC1235.11 - SPCC548.05c	9	25.5	IGF573
12	PKU	SPCC576.16c( <i>wtf22</i> ) - SPCC126.04c( <i>sgf73</i> )	6	14.7	MGF457
13	DEC	SPBC1271.11 - SPBC1271.06c( <i>mug96</i> )	6	15.0	finished

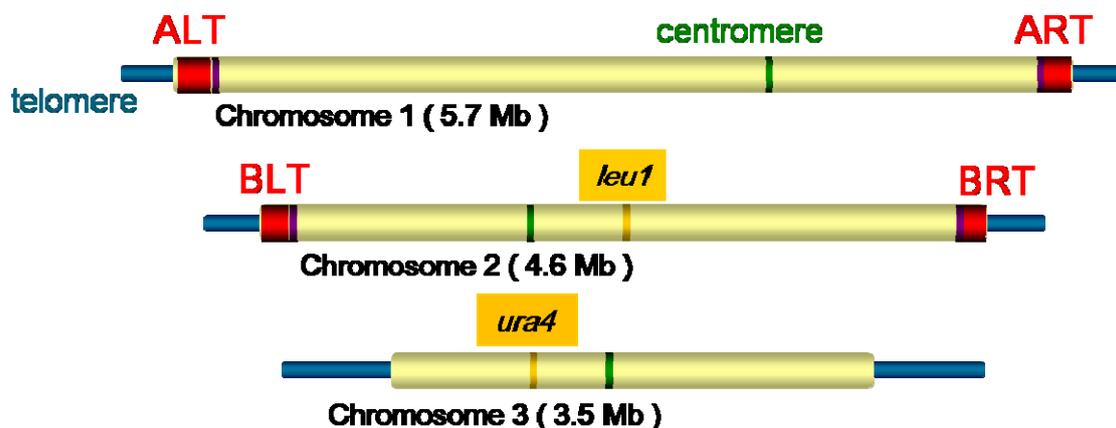


図1 分裂酵母染色体

分裂酵母の3本の染色体をデータベースの情報を元に模式化した。赤く示した領域は削除のターゲット領域である。

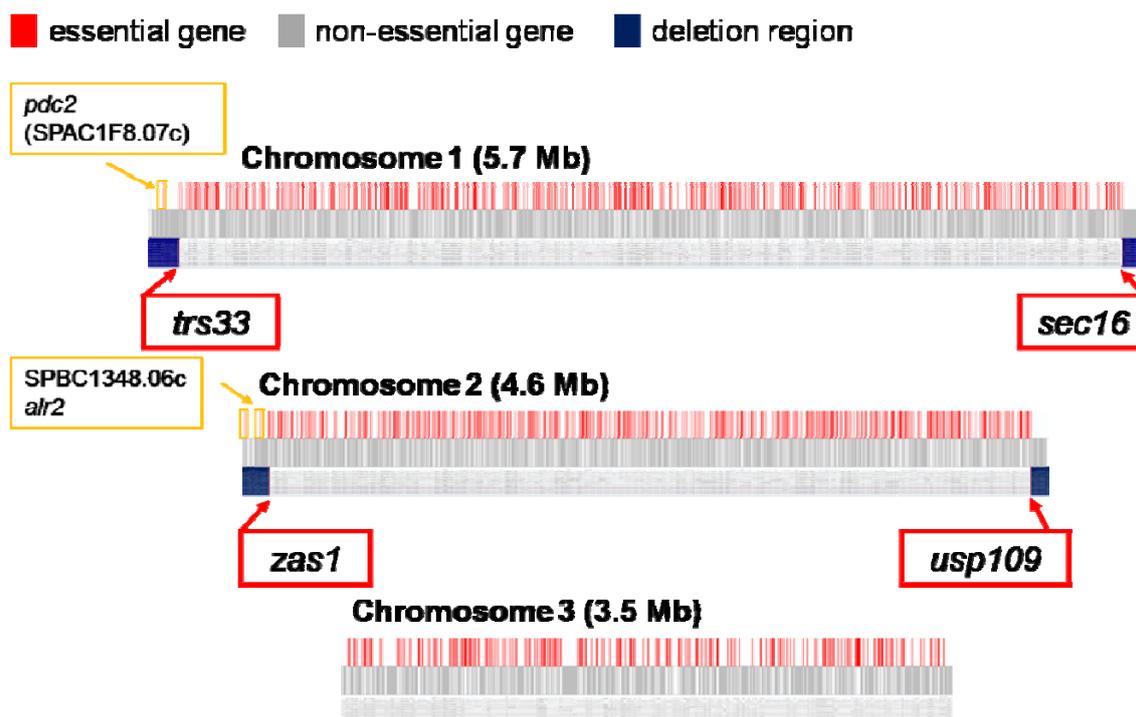


図2 分裂酵母必須遺伝子マップ

2010年に発表された必須遺伝子情報をもとに必須遺伝子の分布を模式化した。赤は必須遺伝子、グレーは非必須遺伝子、濃紺は本研究で削除した領域を示す。また、赤で囲んだ遺伝子は各末端における最末端の必須遺伝子、オレンジで囲んだ遺伝子はKimらの論文では必須遺伝子とされたが、Latour法を用いた大規模削除で削除することが出来た遺伝子を示す。

各末端の必須遺伝子が決定したので、第1染色体、第2染色体末端の100kbpを超える非必須遺伝子クラスター領域をターゲットとした染色体大規模削除を試みた。大規模削除に用いる Latour 法は、削除領域の片側の遺伝子配列をもう一方の片側に挿入し、相同組換えにより内部の領域をループアウトさせる方法である。しかしながら、第2染色体右腕を除く3か所の染色体末端のテロメアまでの領域は、ゲノムプロジェクトによる配列決定が完了していない部位であった。そこで我々は、各染色体末端の未解読領域近傍の塩基配列の相同性が非常に高いため、おそらく未解読領域も相同性が高い塩基配列を有していると推測した(図3)。テロメアまで解読が完了していた第2染色体右腕の塩基配列をもとに、未解読領域の塩基配列を推測して相同組換え用のDNA断片を作製した。その結果、塩基配列解読が完了していない染色体末端領域においても染色体大規模削除株を構築することに成功した。

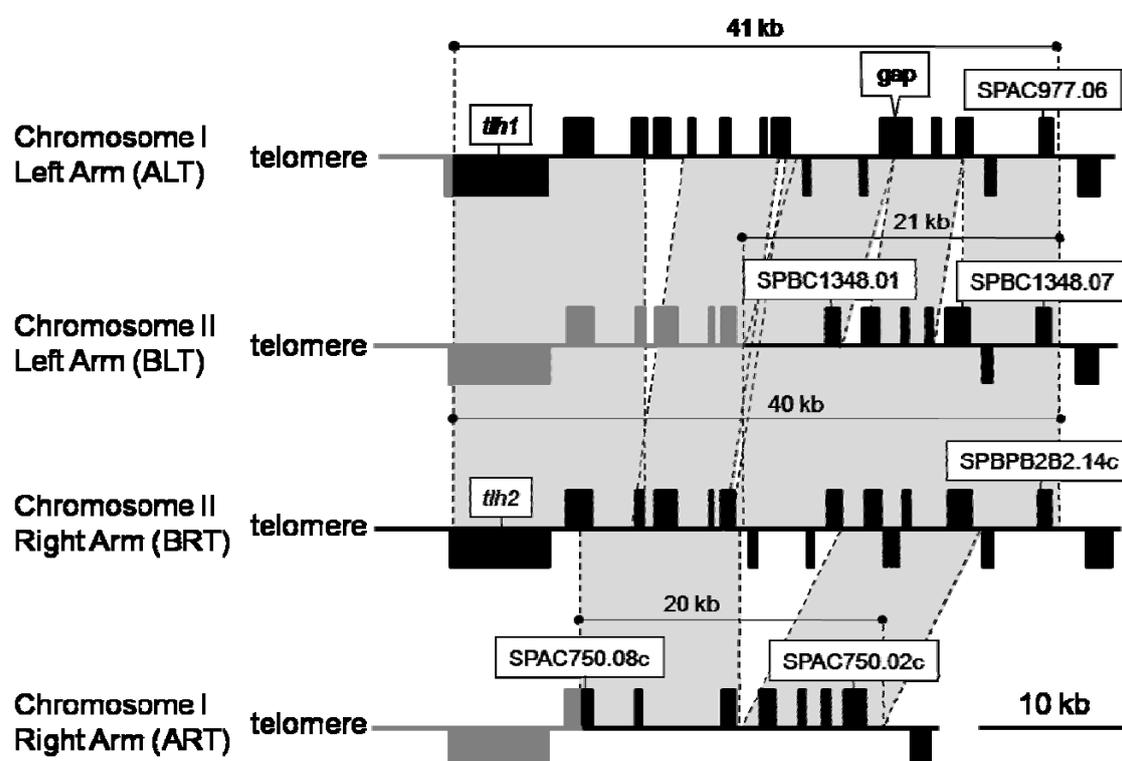


図3 染色体末端重複領域

第1染色体、第2染色体の右腕と左腕両末端を模式的に示した。黒い四角は遺伝子を表しており、上向きに示した遺伝子は5'→3'、下向きに示した遺伝子は3'→5'の向きである。各染色体末端のグレーのゾーンで繋がれた領域は、塩基配列レベルでの相同性が98%以上の領域である。グレーの四角は、テロメアまで配列が決定されている第2染色体右腕より推測した遺伝子を示している。

## (2) 染色体大規模削除株の増殖

染色体大規模削除株の第 1 段階の評価として最大比増殖速度 ( $\mu_{max}$ ) を測定し、増殖能の確認を行った。第 1 染色体右腕削除株 ( $\Delta$ ART (155.4kbp)、IGF524)、第 2 染色体右腕削除株 ( $\Delta$ BRT (121.6kbp)、IGF526) は親株と同程度の増殖能を維持していた (図 4)。第 1 染色体左腕 (ALT) 削除株は非必須遺伝子クラスター領域全長を削除することが非常に困難であったため、この領域内を *tlh1*-SPAC977.09c 間 ( $\Delta$ 46.8kbp、IGF522) と SPAC977.11-*gpi7* 間 ( $\Delta$ 121.8kbp、IGF523) に分けて削除した。その結果、IGF522 はほぼ親株と同等の増殖速度を維持していたが、IGF523 の増殖速度は親株比 4 割程度と著しく低下した。第 2 染色体左腕削除株 ( $\Delta$ BLT (211.7kbp)、IGF525) は、親株の 8 割程度の増殖速度を維持していた。

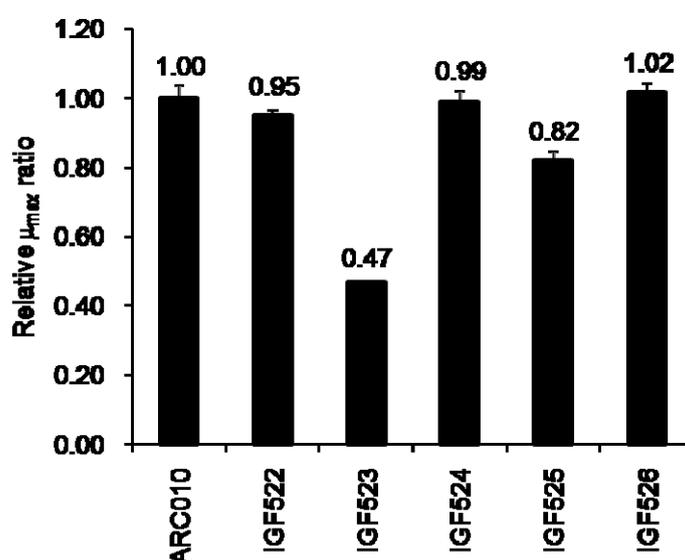


図 4. 染色体大規模削除株の最大比増殖速度 ( $\mu_{max}$ )

YES (pH5.0) 培地にて  $OD_{660}$  を測定した値から  $\mu_{max}$  を算出し、親株 ARC010 と比較した相対比を示した。ARC010 : 親株、IGF522 :  $\Delta$ ALT ( $\Delta$ *tlh1*-SPAC977.09)、IGF523 :  $\Delta$ ALT ( $\Delta$ SPAC977.11-*gpi7*)、IGF524 :  $\Delta$ ART、IGF525 :  $\Delta$ BLT、IGF526 :  $\Delta$ BRT。

染色体大規模削除株の増殖能を改善するため、ALT、BLT 削除領域内で増殖速度に影響する遺伝子の選抜を試みた。まず、ALT 削除領域内の増殖速度維持に必要な遺伝子の探索を行った。本プロジェクト外の実験結果より、IGF523 株の削除領域内に存在する SPAC1F8.07c (*pdc2*) を削除すると増殖効率が低下することが分かっていたので、ALT を削除する際に *pdc2* を *ura4* 座へ挿入し、ALT の非必須遺伝子クラスター領域全長の削除を行った。完成した ALT 削除株 IGF719 の増殖速度は親株比 0.83 倍まで改善した (図 5)。さらに増殖能を改善するため、*pdc2* 以外の増殖速度維持に必要な遺伝子を探索した。ALT 削除領域を分割した削除株を構築して増殖速度を測定したところ、ALT-2 までは増殖速度を維持していたが、それ以上削除領域を拡大すると増殖速度の低下が観察された (図 6A、B)。この結果より、*gmh1*、SPAC5H10.12c、*gmh2* は増殖速度には影響せず、

残りの *rad8*, *rps101*, *gpi7*, *tim8* のいずれかが増殖速度の維持に必要であることが示唆された。続いて IGF622 (ALT ( $\Delta$ *tlh1-gpi7*), *ura4* 遺伝子座に *cdc2* 復帰済み) へ *rad8*, *rps101*, *gpi7* を復帰することで増殖速度が回復するか確認を行った。IGF622 の *leu1* 遺伝子座へ各遺伝子を復帰して培養試験を行ったところ、*rps101* 復帰株で増殖速度の回復が観察された (図 6C)。これらの結果より、増殖速度を維持した削除株における ALT の削除領域は *tlh1* から *gmh2* までが適当であると判断し IGF718 を構築した。IGF718 の増殖速度は親株と同等まで回復し、ALT 削除株の増殖速度を改善することが出来た (図 5)。

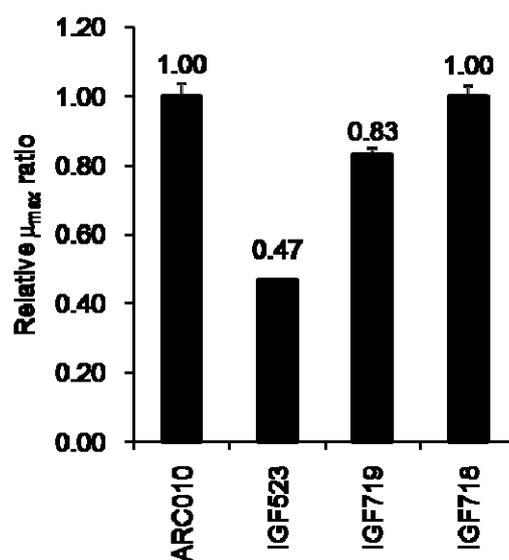


図 5 第 1 染色体左腕 (ALT) 大規模削除株の最大比増殖速度 ( $\mu_{max}$ ) の改善

YES (pH5.0) 培地にて  $OD_{660}$  を測定した値から  $\mu_{max}$  を算出し、親株 ARC010 と比較した相対比を示した。ARC010 : 親株、IGF523 :  $\Delta$ SPAC977.11-*gpi7*, IGF719 :  $\Delta$ SPAC977.11-*tim8* (*ura4* 遺伝子座へ *cdc2* 復帰)、IGF718 :  $\Delta$ SPAC977.11-*gmh2* (*ura4* 遺伝子座へ *cdc2* 復帰)。

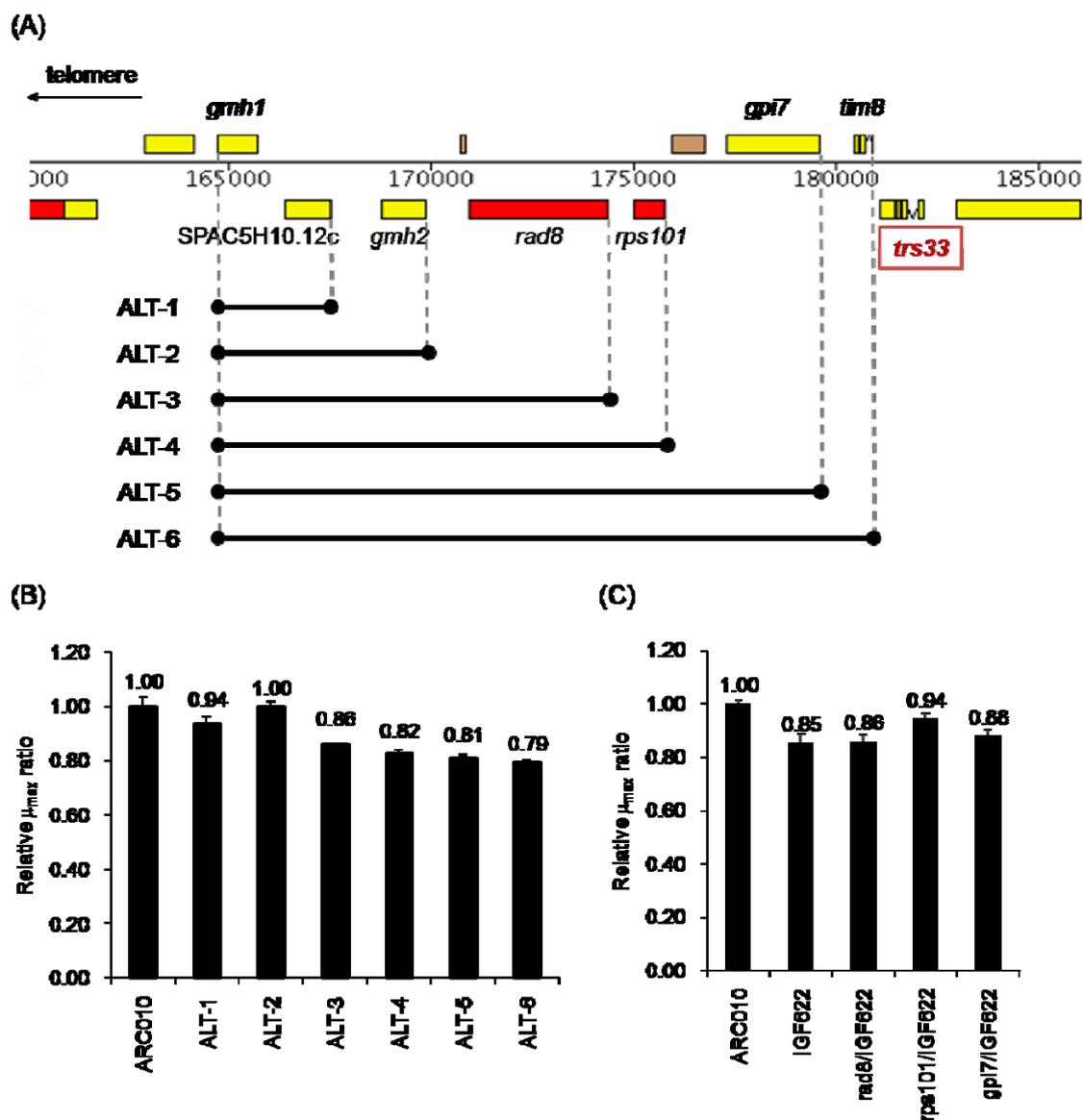


図6 ALT 削除領域における部分的な削除株の最大比増殖速度 ( $\mu_{max}$ )

(A) 第1染色体左腕最末端の必須遺伝子 *trs33* 近傍において部分的な削除株を構築した。両端の黒丸を結ぶ黒線は、各削除株 (ALT-1 から ALT-6) の削除領域を示している。(B) YES (pH5.0) 培地にて  $OD_{660}$  を測定した値から  $\mu_{max}$  を算出し、親株 ARC010 と比較した相対比を示した。(C) YES (pH5.0) 培地にて  $OD_{660}$  を測定した値から  $\mu_{max}$  を算出し、親株 ARC010 と比較した相対比を示した。IGF622:  $\Delta t/h1-gpi7$  (*ura4* 遺伝子座に *pdc2* を復帰)、*rad8*/IGF622, *rps101*/IGF622, *gpi7*/IGF622: IGF622 の *leu1* 遺伝子座に *rad8*, *rps101*, *gpi7* をそれぞれ復帰。

続いて BLT 削除領域内における増殖速度の維持に必要な遺伝子の探索を行った。IGF525 に *ura4* を復帰してウラシル非要求性になった IGF629 は、IGF525 と比較して大幅に増殖速度が回復することから、*ura4* が関与する代謝系に増殖速度改善の手がかりがあると推測された(図 7)。*ura4* はピリミジン塩基の材料となる UMP 生合成過程において、*de novo* 合成経路の最終段階を触媒するオロチジン 5'-リン酸脱炭酸酵素をコードしている。BLT 削除株では *ura4* 復帰による *de novo* 合成経路を正常化によって増殖速度が回復するため、BLT 削除領域内には *de novo* 合成経路を補完する salvage 合成経路に含まれる遺伝子があり、削除してしまったことによって UMP の生合成が十分に行われず増殖速度が低下してしまったと考えられた。そこで BLT 領域内の遺伝子を調べたところ、SPBC1683.05 と SPBC1683.06c が salvage 合成経路に関与していることが推測された(図 8)。これらの 2 遺伝子をそれぞれ IGF525 の *leu1* 遺伝子座へ復帰すると、SPBC1683.05 復帰株大幅な回復を示した(図 7)。SPBC1683.05 は、アミノ酸レベルでの相同性からウラシルまたはウリジントランスポーターであるとアノテーションされている。そのため、BLT 削除株ではウラシルトランスポーターの欠損による UMP 合成量の低下に伴い増殖速度が低下したと考えられた。

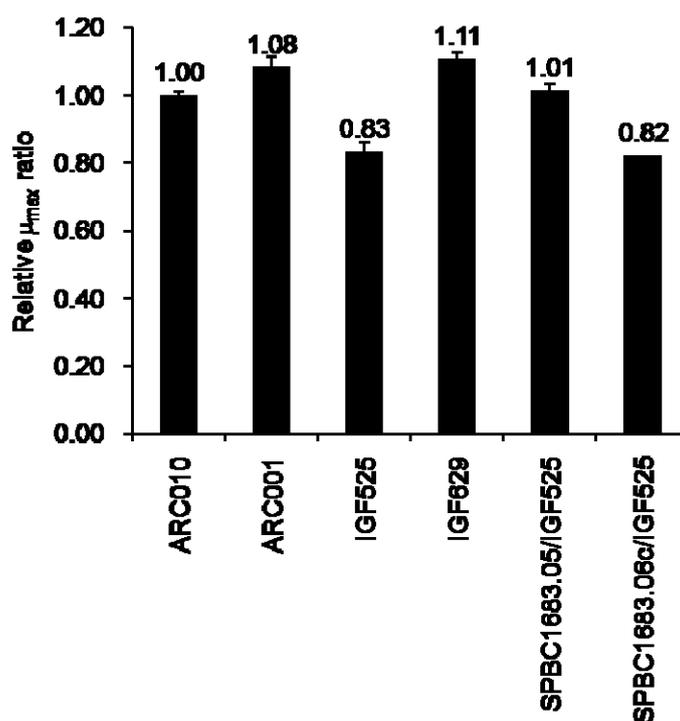


図 7 UMP 生合成遺伝子復帰による BLT 削除株の最大比増殖速度 ( $\mu_{max}$ ) の改善

YES (pH5.0) 培地にて  $OD_{660}$  を測定した値から  $\mu_{max}$  を算出し、親株 ARC010 と比較した相対比を示した。ARC010: 親株 (*ura4*-D18)、ARC001: 親株、IGF525:  $\Delta$ BLT, *ura4*-D18、IGF629:  $\Delta$ BLT, *ura4*、SPBC1683.05/IGF525、SPBC1683.06c/IGF525: IGF525 の *leu1* 遺伝子座へ SPBC1683.05 と SPBC1693.06c をそれぞれ復帰。

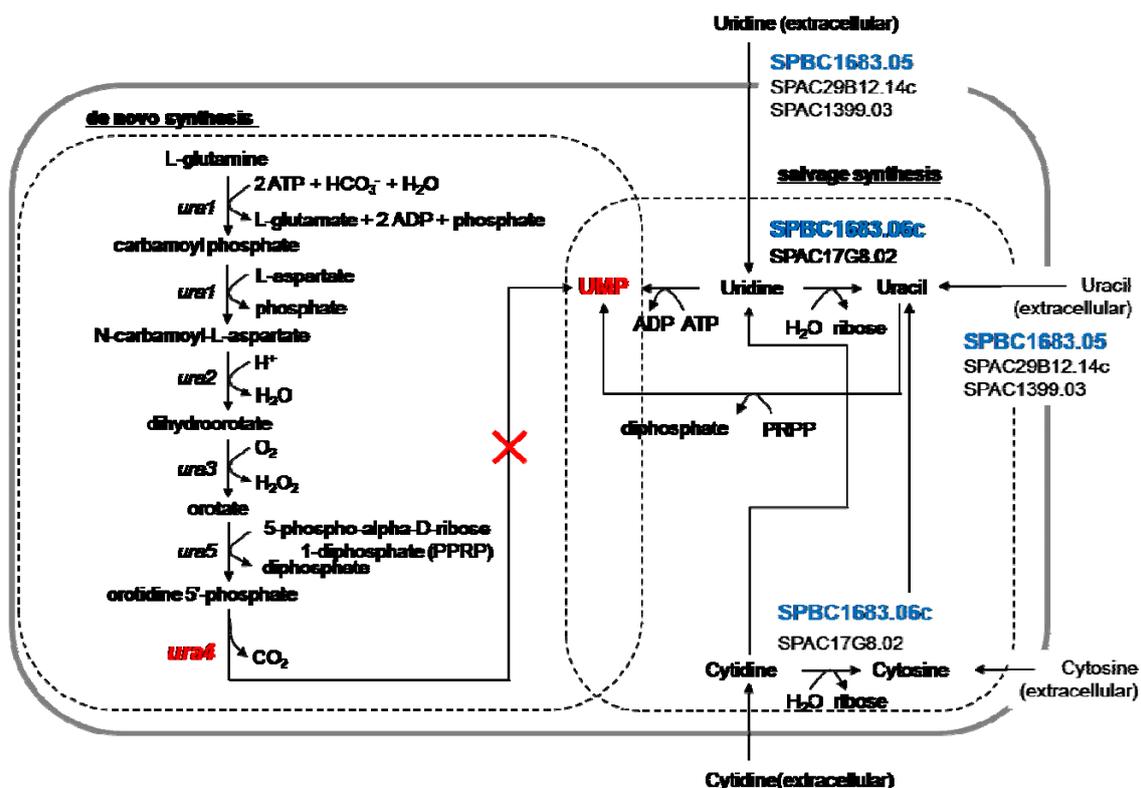


図 8 UMP 合成経路

*ura4*-D18 株では orotidine 5'-phosphate から UMP が生合成されないため、細胞外からウラシル、またはウリジンを取込み UMP を生合成する salvage 経路が機能しないと生育することが出来ない。

以上の結果より、分裂酵母の第 1 染色体、第 2 染色体の末端には最も端にある必須遺伝子として *trs33*(ALT)、*sec16*(ART)、*zas1*(BLT)、*usp109*(BRT) が存在し、最末端遺伝子からこれらの必須遺伝子までの 100kbp から 200kbp の非必須遺伝子クラスター領域を削除することが可能であることが明らかとなった。しかしながら、増殖速度を維持するためには、*pdc2*(ALT) が必要であり、さらに *ura4* 遺伝子が欠失した株では SPBC1683.05 (BLT) が必要であることが判明した。これらの結果を踏まえ、分裂酵母染色体大規模削除株の最終モデルとして、*tlh1-gmh2*(ALT、 $\Delta$ 168.4kbp)、SPAC29B12.08-estimated *tlh* (ART、 $\Delta$ 155.4kbp)、estimated *tlh*-SPBC1198.03c (BLT、 $\Delta$ 211.7kb)、SPBC1289.13-*tlh2*(BRT、 $\Delta$ 121.6kbp) の各大規模削除領域を統合し、さらに *ura4* 遺伝子座へ *pdc2* 遺伝子を復帰した(場合によっては SPBC1683.05 も復帰) 657.3kbp 削除株を構築することに決定した(図 9)。

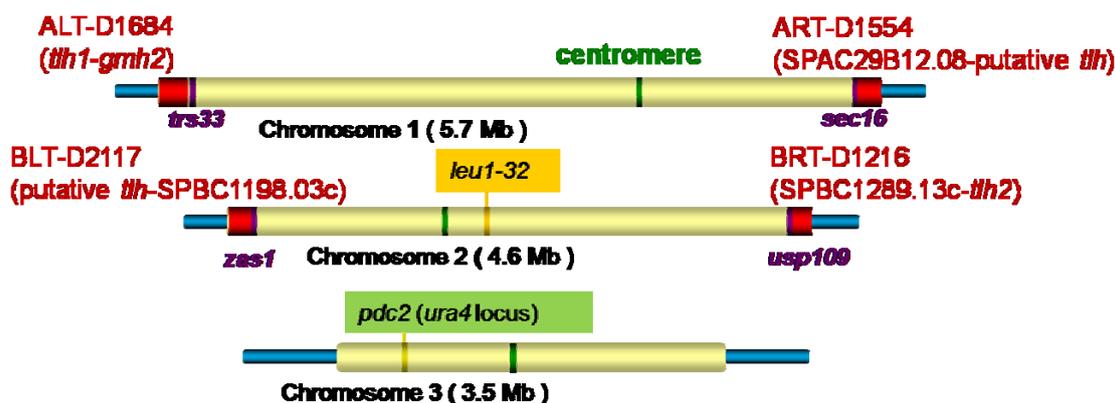


図9 染色体大規模削除株最終モデル

決定した各染色体末端削除領域を赤で示し、詳細を赤字で示した。ALT 削除株を構築する際に増殖速度を維持するため、*ura4* と SPCC330.06c の間に *pdc2* 遺伝子を移動した。また、物質生産を行う際には第 2 染色体の *leu1* と *top2* の間に発現カセットを挿入することにした。

### (3) 染色体削除領域の統合

染色体末端 4 領域を様々に組み合わせ 2 領域以上の削除を統合した 11 種類の大規模削除統合株を構築した(表 2)。ALT 削除株の増殖速度改善と並行して行っていたため、ALT 削除領域が改善前の *tlh1-gpi7* がベースとなる統合株を先に構築し、その後に増殖速度改善株として *tlh1-gmh2* の ALT 削除株を組み合わせた統合株を構築した。最も削除サイズが大きい 4 領域削除統合株を構築する際、3 領域削除株 IGF534 ( $\Delta$ ART BLT BRT) の ALT 削除を試みたが、なかなか削除株を得ることができなかった。その原因として、分裂酵母の第 1、第 2 遺伝子末端は非常に相同性が高いため(図 3)、4 領域目を削除すると合成致死が生じているのではないかと考えられた。そこで、ALT 削除領域内の部分的な DNA 断片を pSL2 染色体組込みベクターへクローニングし、ALT 削除用 Latour 断片を保持する IGF534 の *leu1* 遺伝子座へ挿入して ALT 領域の削除を再度試みた(図 10)。その結果、SPAC977.11、SPAC977.12、SPAC977.13c、SPAC977.14c 含む DNA 断片を復帰した株で 4 領域削除統合株を得ることが出来た。SPAC977.11 は BLT、SPAC977.12 は ART、BLT にそれぞれ相同遺伝子が存在する。これらのどの遺伝子が合成致死の原因となっているか調べるため、単独で *leu1* 遺伝子座へ挿入し IGF534 の ALT 削除を試みた。SPAC977.13c は pseudogene のため除外し、3 つの遺伝子について解析を行った。1 遺伝子ずつ挿入して削除を試みた結果、SPAC977.11 を挿入した株で容易に 4 領域削除株を得ることが出来た(表 3)。合成致死候補遺伝子が SPAC977.11 である可能性があるところまで絞り込んだが、他の 3 領域削除株の 4 領域目の削除においても同様の傾向が得られるか確認を行った。IGF650 ( $\Delta$ ALT ART BLT)、IGF651 ( $\Delta$ ALT ART BRT)、IGF652 ( $\Delta$ ALT BLT BRT) の *leu1* 遺伝子座へ SPAC977.11 を挿入し、各 4 領域目の削除試験を行った結果、IGF650、IGF652 では SPAC977.11 の有無に関係なく 4 領域削除株は高確率で得られ、SPAC977.11 は特に 4 領域目の削除には必要ないことが分かった(表 4)。しかしながら、IGF651 では IGF534 と同様に SPAC977.11 を復帰していない株で、4 領域目の

削除効率が減少していた。IGF651 の 4 領域目の削除のターゲットは BLT 領域であり、BLT には SPAC977.11 の相同遺伝子である SPBPB8B6.06c が存在していた。以上の結果より、SPAC977.11 と SPBPB8B6.06c を両方削除しても合成致死は生じないが、Latour 法で削除する際の相同組換え効率に何らかの影響を与えていることが示唆された。以上より 4 領域削除統合株 IGF690 ( $\Delta 665.6$  kbp) の獲得に成功し、そして増殖改善の検討結果を踏まえた最終モデルに沿った IGF740 ( $\Delta 657.3$  kbp) が完成した。

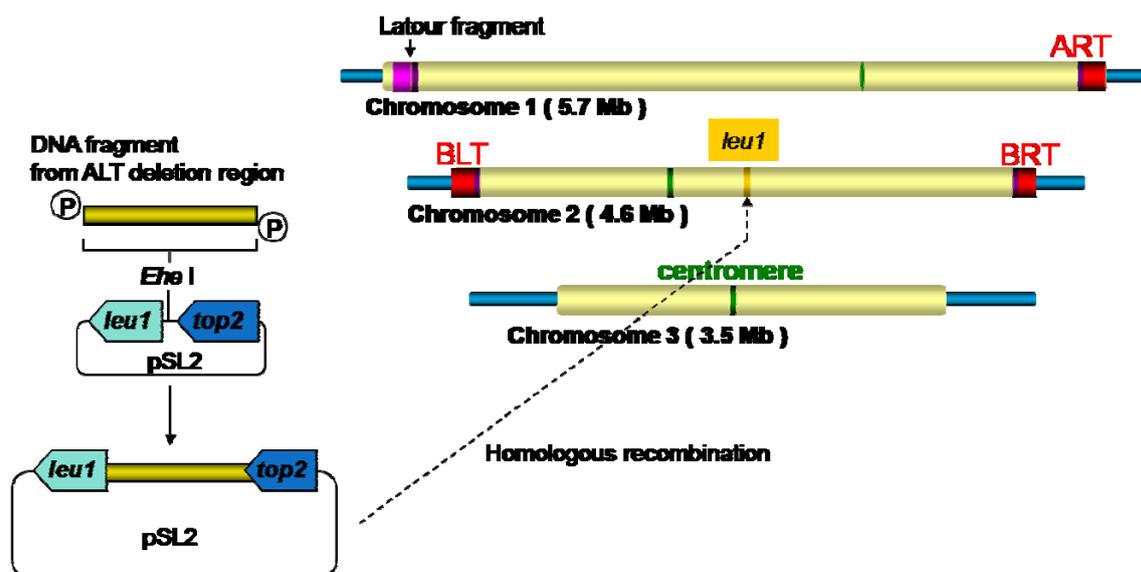


図 10 IGF534 の ALT 領域削除時に生じる合成致死要因遺伝子の探索

ALT 削除領域内を部分的に pSL2 ベクターへクローニングし、ALT 削除用の Latour 断片を染色体上に保持する IGF534 の *leu1* 遺伝子座へ相同組換えによって挿入した。

表 2 分裂酵母染色体大規模削除統合株リスト

Deletion regions		ALT ( <i>tlh1-gpi7</i> )			ALT ( <i>tlh1-gmh2</i> )*		
		<i>ura4</i> -D18	<i>ura4</i> <sup>+</sup>	Deletion size	<i>ura4</i> -D18	<i>ura4</i> <sup>+</sup>	Deletion size
1 region	ALT	IGF622	IGF637	176.8 kb	IGF718	IGF724	168.4 kb
	ART	IGF524	IGF628	155.4 kb	-	-	-
	BLT	IGF525	IGF629	211.7 kb	-	-	-
	BRT	IGF526	IGF630	121.6 kb	-	-	-
2 regions	BLT BRT	IGF530	IGF631	333.4 kb	-	-	-
	ART BRT	IGF531	IGF632	277.1 kb	-	-	-
	ART BLT	IGF532	IGF633	367.2 kb	-	-	-
	ALT ART	IGF638	IGF647	332.2 kb	IGF738	IGF755	323.9 kb
	ALT BLT	IGF639	IGF648	388.5 kb	IGF739	IGF756	380.2 kb
	ALT BRT	IGF640	IGF649	298.4 kb	under construction	under construction	290.1 kb
3 regions	ART BLT BRT	IGF534	IGF634	488.8 kb	-	-	-
	ALT ART BLT	IGF650	IGF658	543.9 kb	IGF722	IGF728	535.6 kb
	ALT ART BRT	IGF651	IGF659	453.8 kb	IGF720	IGF726	445.5 kb
	ALT BLT BRT	IGF652	IGF660	510.2 kb	IGF763	under construction	501.8 kb
4 regions	ALT ART BLT BRT	IGF690	IGF693	665.6 kb	IGF740	IGF742	657.3 kb

\* *tlh1-gpi7*間を削除した ALT 削除株シリーズを構築したのち、増殖速度を改善するために *tlh1-gmh2*間を削除した ALT 削除増殖改善株を構築した。

表 3 ALT 領域内における合成致死候補遺伝子と候補遺伝子復帰株の削除効率

Gene ID	Product	Locus of homologous gene	Deletion ratio (Deletant/total) <sup>a</sup>
SPAC977.11	CRCB domain protein	BLT	48/48 (100%)
SPAC977.12	L-asparaginase	ART, BLT	3/48 (6%)
SPAC977.13c	hydrolase, pseudogene	-	not tested
SPAC977.14c	aldo/keto reductase	-	2/48 (4%)

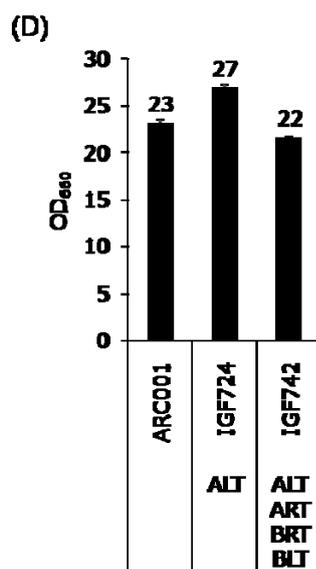
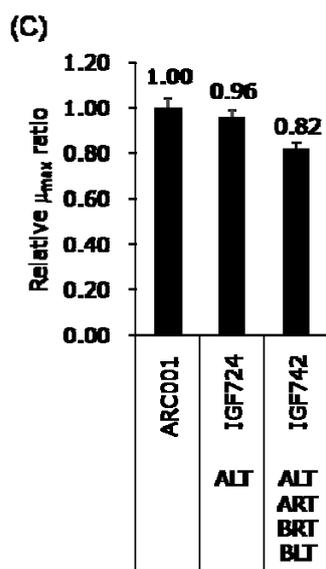
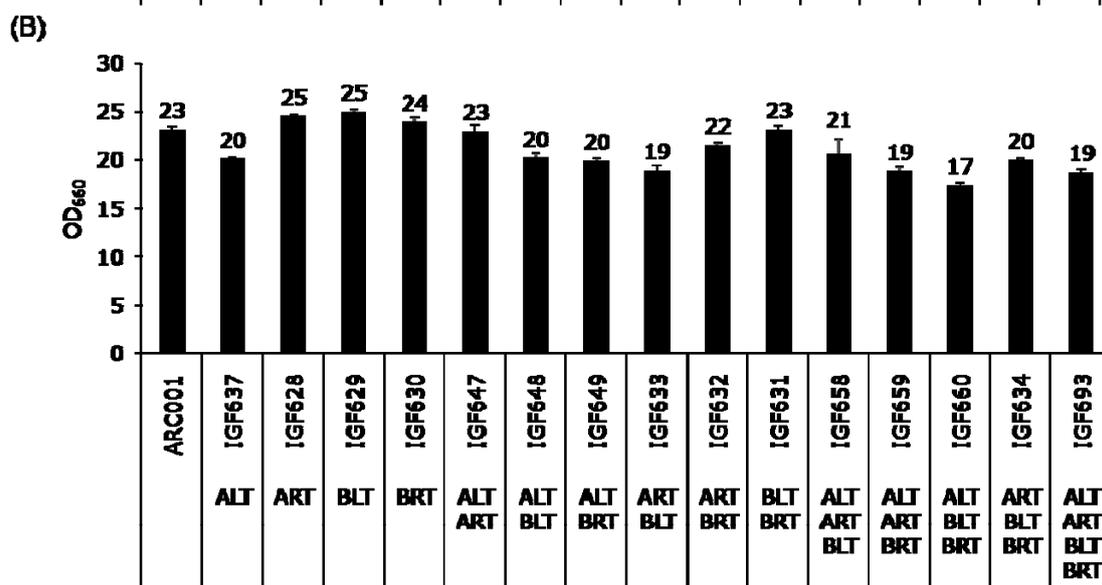
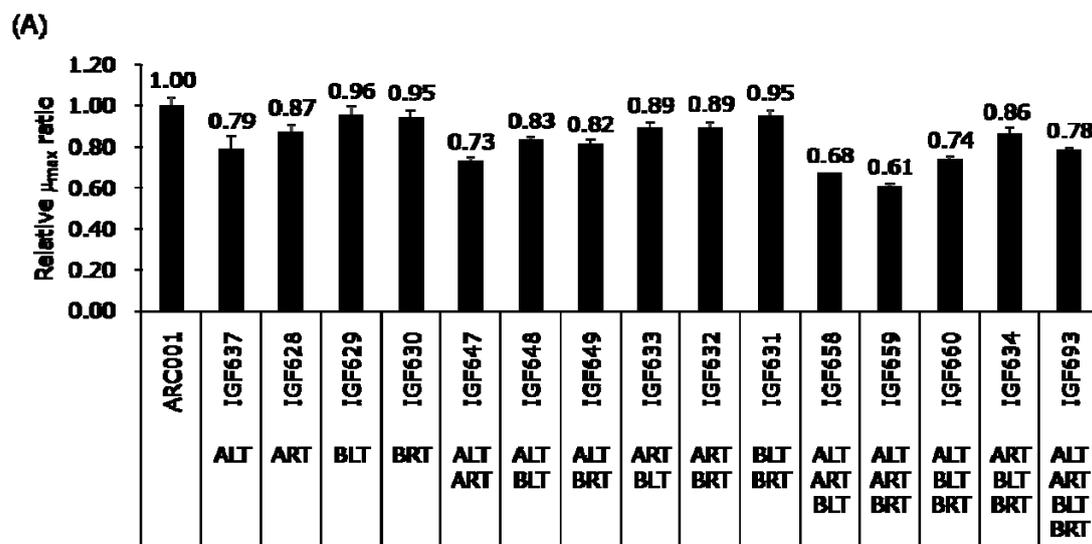
<sup>a</sup>各遺伝子を IGF534 株の *leu1* 遺伝子座へ復帰した後、Latour 法による ALT 削除効率を示した。各遺伝子復帰株 48 コロニーについて PCR チェックを行い、ALT 領域の削除を確認した。( ) 内は削除株獲得確率。

表 4 SPAC977.11 復帰による 4 領域削除株の取得率

Target region of deletion	Deletion ratio	
	SPAC977.11 inserted to <i>leu1</i> locus	no inserted gene
IGF650 BRT	58 %	70 %
IGF651 BLT	88 %	19 %
IGF652 ART	85 %	94 %

#### (4) 染色体大規模削除統合株の特性

削除領域を統合した染色体大規模削除株の特性を調べるため、まず最大比増殖速度 ( $\mu_{max}$ ) と最終到達濁度を測定した(図 11)。染色体削除の際に Latour 断片を挿入するマーカー遺伝子として *ura4* を用いており、FOA 処理にて *ura4* と共に削除領域をループアウトさせていたのだが、分裂酵母は *ura4* 株の方がより増殖が安定するため、増殖効率の解析には *ura4* 株を用いた。染色体末端削除の統合を進めるにつれて最大比増殖速度、最終到達濁度共に減少傾向にあり、4 領域削除株 IGF693 株では最大比増殖速度が親株比 0.78、最終到達濁度は親株が  $OD_{660}=23$  に対して 19 まで低下してしまった(図 11A,B)。特に ALT を削除すると低下する傾向にあった。しかし、ALT 削除領域の改良を行うと、IGF637 の最大比増殖速度が親株比の 0.79、最終到達濁度が  $OD_{660}=20$  であるのに対し、改良後の IGF724 の最大比増殖速度は 0.96、最終到達濁度は  $OD_{660}=27$  まで向上した。同様に 4 領域削除株でも IGF693 の最大比増殖速度が 0.79、最終到達濁度が  $OD_{660}=19$  であるのに対し、改良後の IGF742 では最大比増殖速度は親株比 0.82、最終到達濁度が  $OD_{660}=22$  まで回復した(図 11C,D)。



### 図 11. 染色体大規模削除株の最大比増殖速度 ( $\mu_{max}$ ) と最終到達濁度 ( $OD_{660}$ )

(A) 各削除領域統合株の最大比増殖速度を示した。ALT 削除領域については増殖改善前 (ALT  $\Delta t/hl-gpi7$ ) である。YES (pH5.0) 培地にて  $OD_{660}$  を測定した値から  $\mu_{max}$  を算出し、親株 ARC001 と比較した相対比を示した。(B) (A) で示した削除領域統合株の最終到達濁度を示した。(C) 増殖改善のため ALT 削除領域を  $t/hl-gmh2$  に変更した削除領域統合株の最大比増殖速度を示した。培養条件は (A) と同様である。(D) (C) で示した削除領域統合株の最終到達濁度を示した。

次に細胞分裂と染色体分配が正常に行われているか確認するため顕微鏡観察を行った。YES (pH5.0) 培地、32°C で  $OD_{660} \approx 5.0$  の対数増殖期でサンプリングした 1 領域削除株と 4 領域削除統合株について観察した (図 12)。どの株も細胞形態、染色体分配の様子に異常はなかったが、IGF742 では細胞が若干小さくなる傾向があった。分裂酵母では培地中の窒素源が少ないことによる栄養飢餓ストレスで細胞が小さくなるという報告がされている。そこで、これらの株のアミノ酸取込み能について調べた。まず、ロイシン要求性を持つ染色体大規模削除株を EMM+Leu 培地にスポットしたところ、IGF724、IGF628、IGF742 株で増殖の遅延が観察された (図 13)。IGF628 の削除領域である ART 領域には、アミノ酸トランスポーターである *isp5* と SPAC869.10 (*put4*) が含まれており、ロイシンの取込みに関与していると推測されている。そのため、ART 削除株では EMM+Leu 培地中のロイシンの取込み効率が低下し増殖が遅延したと考えられた。IGF724 にも同様の傾向が観察された。IGF724 の削除領域である ALT 領域にはロイシン取込み機能を持つアミノ酸トランスポーターの報告や *isp5*、*put4* などの相同遺伝子も存在しないが、同様の機能を持つトランスポーターが存在することが推測された。しかしながら、YES 培地では IGF628、IGF724、IGF742 とともに目立った増殖の遅延は観察されなかった。2008 年に公開された分裂酵母のゲノムワイドなトランスクリプトーム解析によると、*isp5*、*put4* 共に YE 培地よりも主に最少培地や窒素飢餓状態で発現が誘導されているため、窒素源が豊富な栄養培地では他のロイシン取込み機能を持つアミノ酸トランスポーターが働いているのではないかと推測した。続いて、アミノ酸類似体を用いた試験では IGF628、IGF742 でカナバニン、チアリジン耐性が観察され、また IGF742 のみにおいてエチオニン耐性が観察された。これらのアミノ酸類似体が細胞内へ取込まれると、正常なタンパク質が合成できないため細胞は増殖出来なくなるが、アミノ酸取込み機能が低下している株では培地中のアミノ酸類似体も取込むことが出来ないため耐性を示す。IGF628 株の削除領域である ART 領域には、アルギニンやリシンなどの主要な塩基性アミノ酸トランスポーターである *cat1* が存在している。そのため、IGF628 と IGF742 ではアルギニン、リシンの取込能力が低下し、カナバニン、チアリジンに対して耐性を示したと推測された。また、カナバニン耐性試験では IGF628 よりも削除領域を統合した IGF742 の方が強い耐性が出ているので、ART 削除領域以外にもアルギニン取込み機能を持つアミノ酸トランスポーターの存在が示唆された。さらに、IGF742 株はエチオニン耐性も示していることから、削除領域内にマイナーなメチオニン取込み機能を持つアミノ酸トランスポーターがいくつか存在し、それらを多重に削除したことによって現れた表現型ではないかと考えられた。

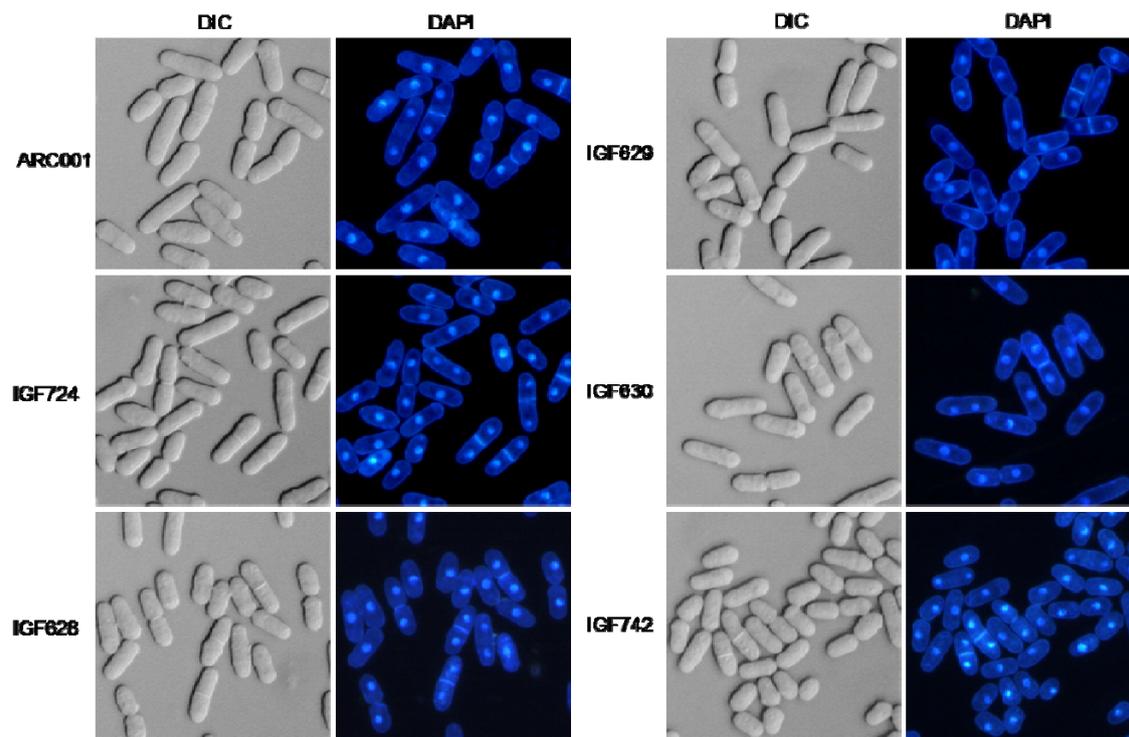


図 12 染色体大規模削除株の細胞分裂と染色体分配の観察

YES (pH5.0), 32°Cで対数増殖期中期まで培養した細胞形態の顕微鏡観察を行った。DIC は細胞の微分干渉像、DAPI は染色体の状態を示している。(ARC001, 親株; IGF724,  $\Delta$ ALT; IGF628,  $\Delta$ ART; IGF629,  $\Delta$ BLT; IGF630,  $\Delta$ BRT; IGF742,  $\Delta$ ALT ART BLT BRT)

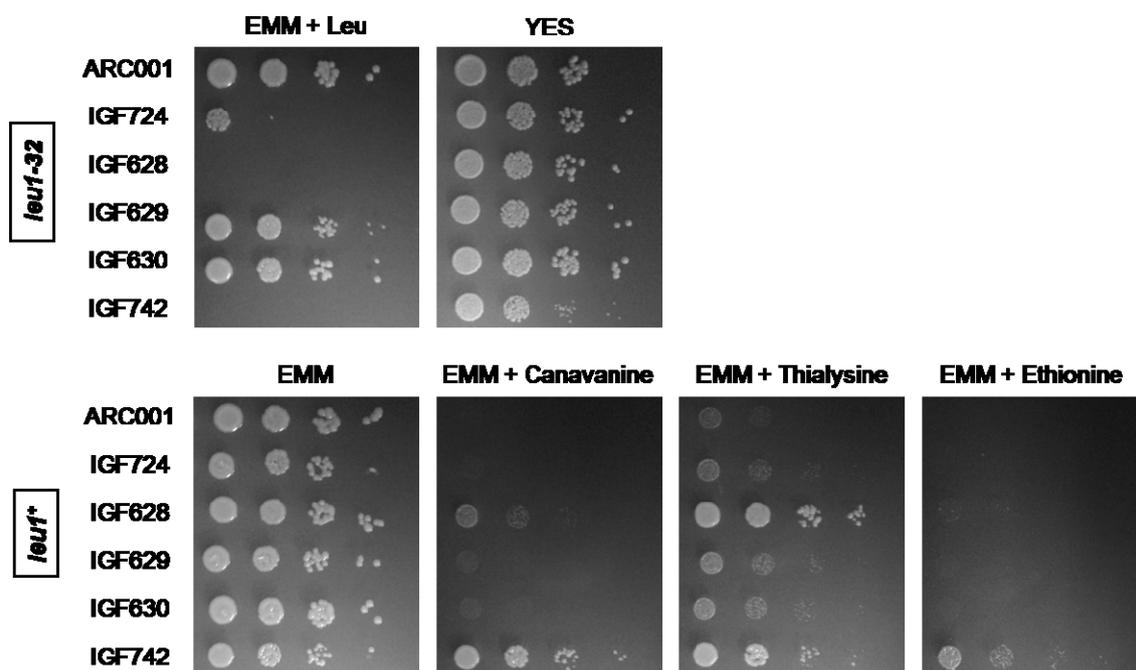


図 13 アミノ酸取込み試験

各染色体大規模削除株のアミノ酸取込み能の解析を行った。(Leu, ロイシン, 250 mg/L; Canavanine, アルギニン類似体, 60 mg/L; Thialysine, リシン類似体, 200 mg/L; Ethionine, メチオニン類似体, 30 mg/L)

真核生物の染色体は直線状であり、その末端にはテロメアが存在する。テロメアは染色体の安定分配に必要な領域であり、テロメアが欠損した分裂酵母では染色体末端どうしの異常な融合が報告されている。構築した染色体大規模削除株の削除領域は第 1、第 2 染色体末端部位であるが、染色体最末端に位置する遺伝子から必須遺伝子手前の遺伝子までを削除しているため、テロメアは残されている。しかしながら、テロメアのヘテロクロマチン形成に必要なタンパク質の結合部位が染色体大規模削除株の削除領域内に含まれていた。ヘテロクロマチン形成タンパク質の結合部位を削除したことが、染色体大規模削除株のテロメアの安定性に影響していないか確認するため、約 100 世代継代培養した親株 ARC001 と 4 領域削除株である IGF742 株のテロメアの長さを比較した。制限酵素 *EcoRI* で完全に消化した染色体 DNA を電気移動し、テロメアリピート配列をプローブに用いてサザンハイブリダイゼーションを行った。その結果、IGF742 のテロメアの長さは親株とほとんど同じであり、染色体末端削除はテロメア長にほとんど影響していないことを確認した(図 14)。

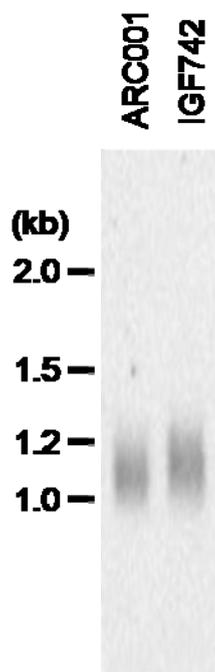


図 14 染色体大規模削除株のテロメア長の確認

YES (pH5.0) 培地、32°C で約 100 世代培養した分裂酵母（親株 ARC001 と 4 領域削除株 IGF742）の染色体 DNA を抽出し、サザンブロット解析によりテロメア長を確認した。

以上の結果より、最も削除サイズが大きい IGF742 は、増殖速度、細胞形態、染色体分配はほぼ正常であったが、いくつかのアミノ酸取込み能が低下している特性を持つことが明らかとなった。

#### (5) 染色体大規模削除株における物質生産効率

染色体大規模削除株における異種タンパク質生産能の解析を行った。モデルタンパク質として緑色蛍光タンパク質 (EGFP、細胞内蓄積タンパク質)、ヒト成長ホルモン (hGH、細胞外分泌タンパク質)、ヒトトランスフェリン (hTF、糖鎖付加・細胞外分泌タンパク質) を用い、各遺伝子は分裂酵母で構成的に発現する hCMV (ヒトサイトメガロウイルス) プロモーターとリポコルチンターミネーターの間に配置して第 2 染色体上の *leu1* 遺伝子座へ挿入した (図 9)。

まず EGFP 発現株を EMM 培地にて 32°C で振盪培養し、タンパク質の生産が盛んな対数増殖期にて EGFP の蛍光値を経時的に測定した (図 15)。1 領域削除株ではほとんど効果が見られず、削除領域を統合していくにつれて EGFP 発現効率の上昇が観察され、4 領域削除株 IGF742 が最も高い値を示した。

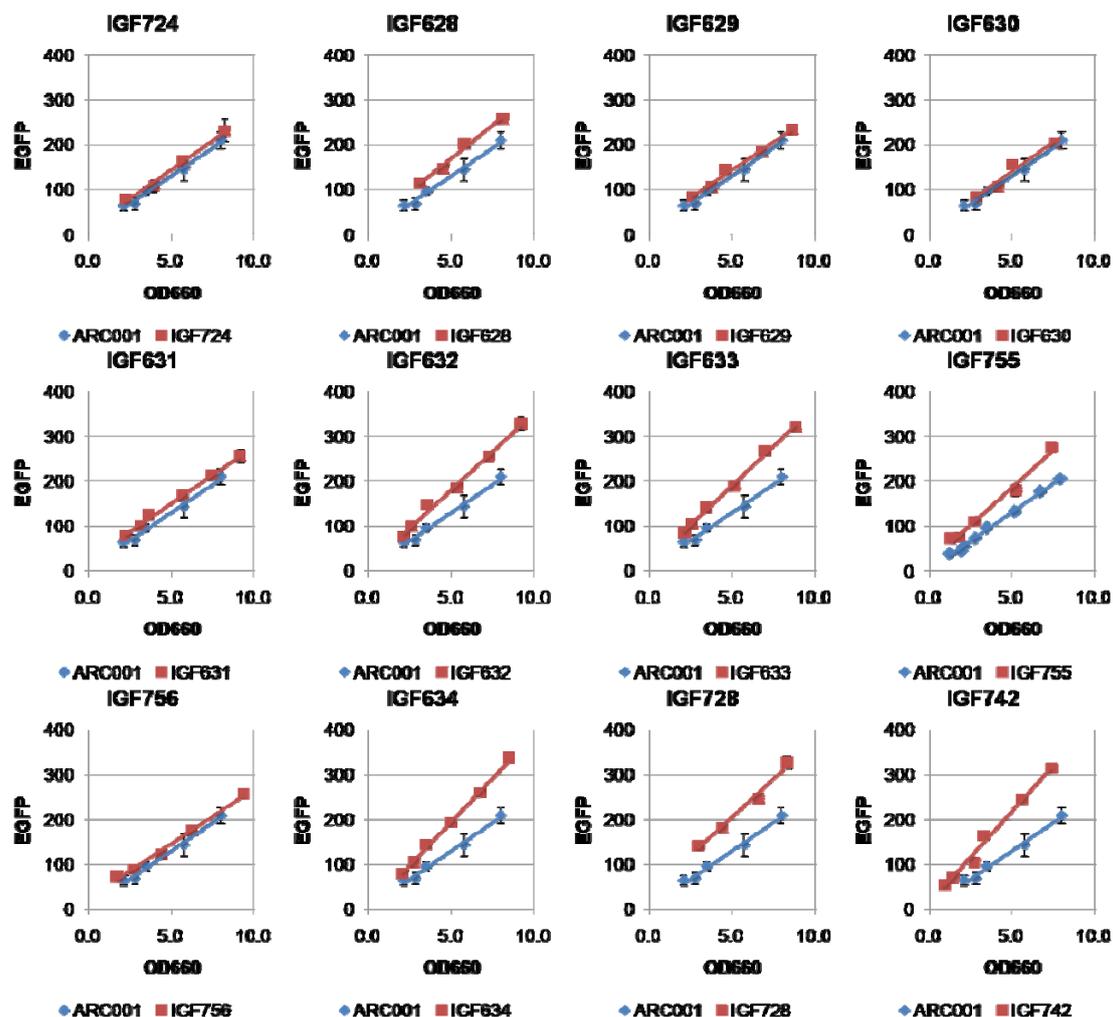


図 15 染色体大規模削除株における EGFP 発現解析

EMM 培地で培養した株の EGFP 蛍光値を経時測定した。各グラフのひし形は親株 ARC001、四角は各染色体大規模削除株を示した。(ARC001, Parent; IGF724,  $\Delta$ ALT; IGF628,  $\Delta$ ART; IGF629,  $\Delta$ BLT; IGF630,  $\Delta$ BRT; IGF631,  $\Delta$ BLT BRT; IGF632,  $\Delta$ ART BRT; IGF633,  $\Delta$ ART BLT; IGF755,  $\Delta$ ALT ART; IGF756,  $\Delta$ ALT BLT; IGF634,  $\Delta$ ART BLT BRT; IGF728,  $\Delta$ ALT ART BLT; IGF742,  $\Delta$ ALT ART BLT BRT)

続いて分泌発現解析を行った。まず hGH 発現株を YPD (MES pH6.0) 培地、32°C で培養し、培養開始より 2 日から 6 日経過した定常期の培養液上清をサンプリングした。各培養上清に分泌された hGH を測定するため TCA 濃縮を行い、SDS-PAGE 解析を行った。そして CBB で染色したバンドの濃度勾配によって hGH 含量を推測した(図 16)。解析の結果、1 領域削除株から分泌発現効率が向上しており、菌体濁度あたりの分泌発現効率が最も上昇した株は IGF658 ( $\Delta$ ALT ART BLT) であった。

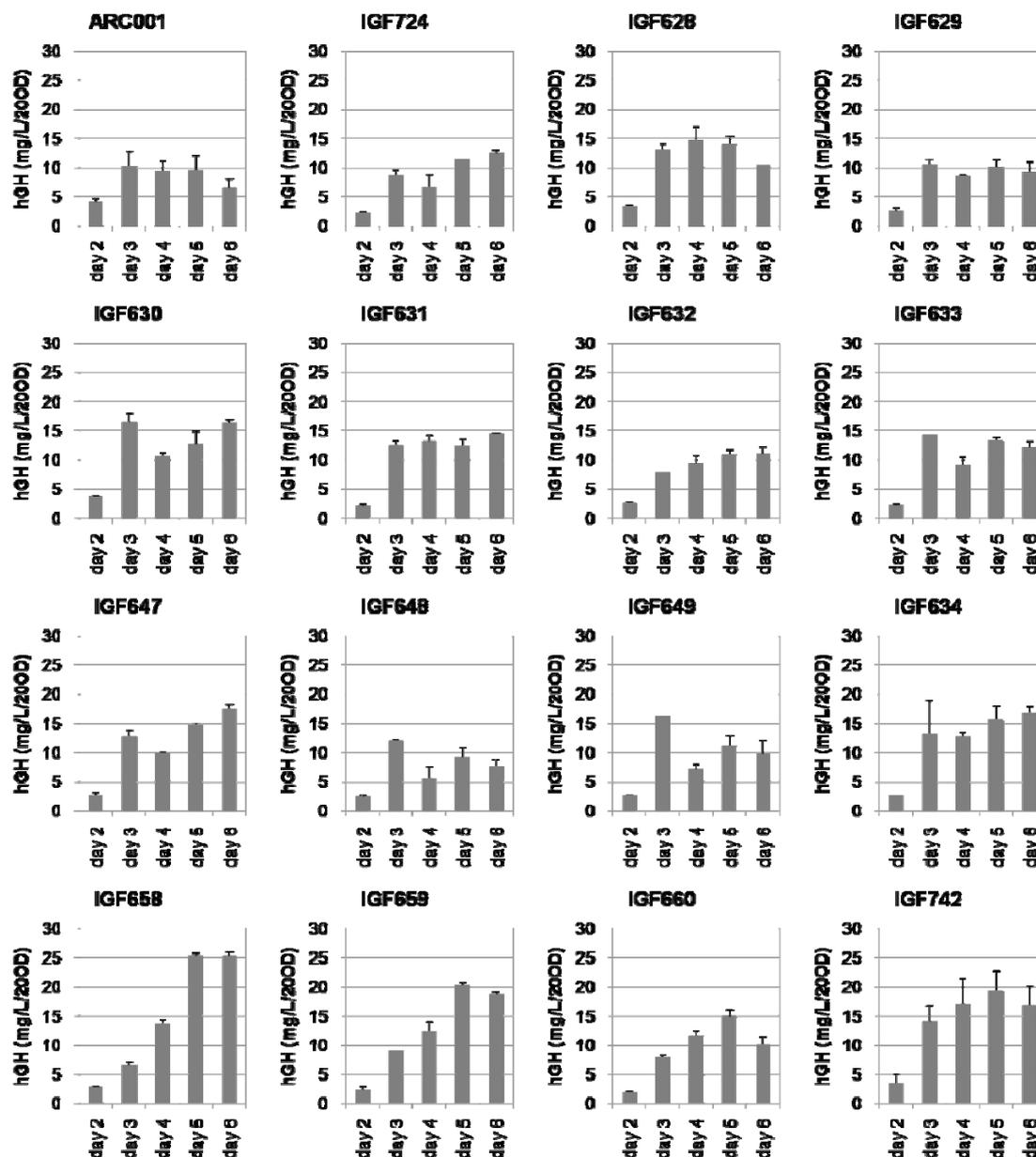


図 16 染色体大規模削除株における hGH 分泌発現解析

YPD (MES pH6.0) 培地で培養し、24 時間毎に培養上清のサンプリングを行った。各培養上清液を TCA 濃縮し、電気泳動後にバンド濃度による hGH の測定を行った。各測定値をサンプリングした際の細胞密度 ( $OD_{660}=20$  に換算) により補正しその値をグラフに示した。(ARC001, Parent; IGF724,  $\Delta$ ALT; IGF628,  $\Delta$ ART; IGF629,  $\Delta$ BLT; IGF630,  $\Delta$ BRT; IGF631,  $\Delta$ BLT BRT; IGF632,  $\Delta$ ART BRT; IGF633,  $\Delta$ ART BLT; IGF647,  $\Delta$ ALT ART; IGF648,  $\Delta$ ALT BLT; IGF649,  $\Delta$ ALT BRT; IGF634,  $\Delta$ ART BLT BRT; IGF658,  $\Delta$ ALT ART BLT; IGF659,  $\Delta$ ALT ART BRT; IGF660,  $\Delta$ ALT BLT BRT; IGF742,  $\Delta$ ALT ART BLT BRT)

次にhTFの分泌発現解析を行った。hGH分泌発現解析に用いた同様の培地で、培養開始より2日から10日経過した定常期の培養上清をサンプリングした。培養液中に分泌されたhTFをELISA法にて定量し、親株ARC001と比較した(図17)。hTF分泌発現においても1領域削除株からhTF分泌量は増加し、菌体濁度あたりの分泌量が最も向上した株はIGF728( $\Delta$ ALT ART BLT)であった。

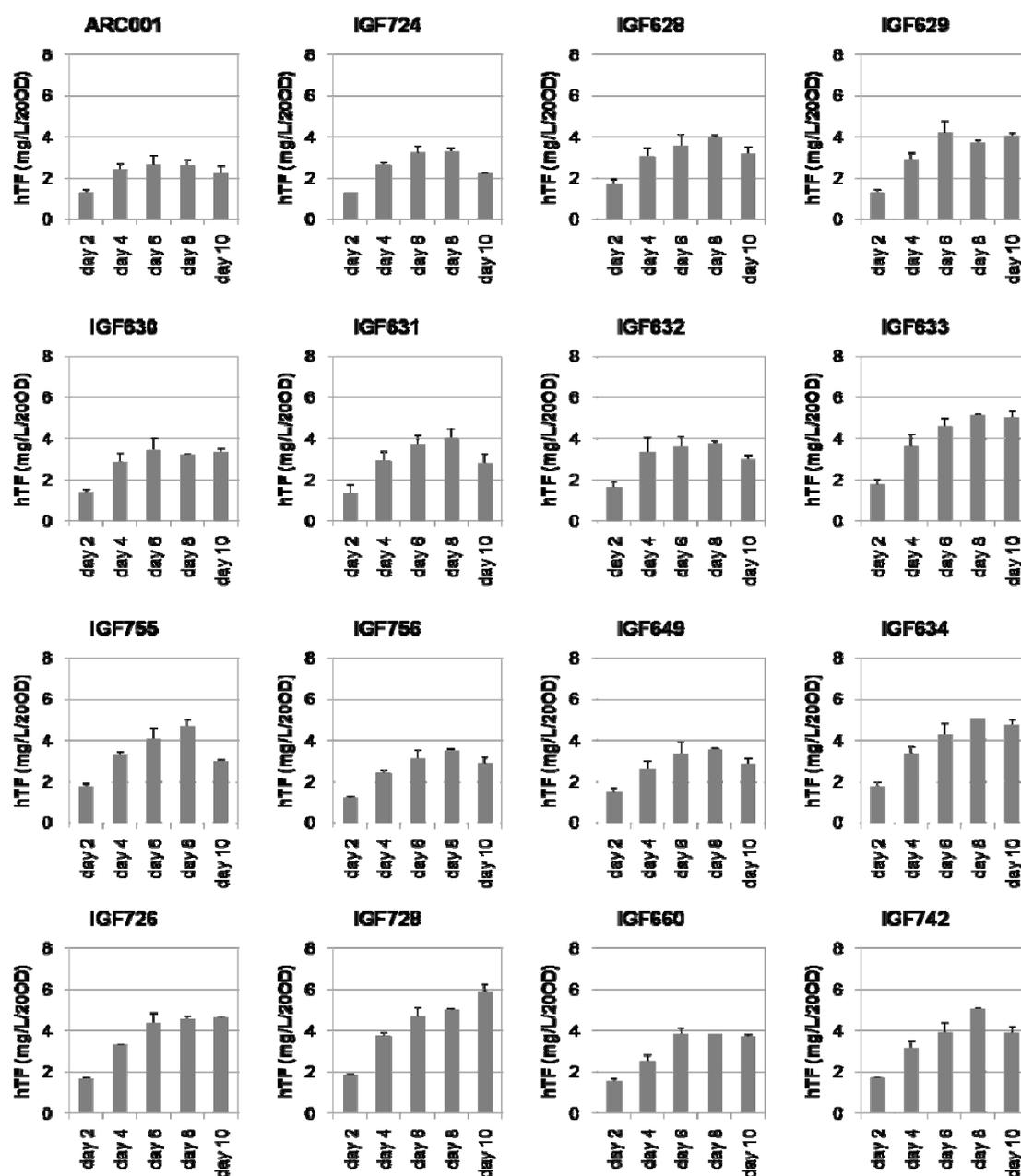


図17 染色体大規模削除株におけるhTF分泌発現解析

YPD (MES pH6.0) 培地で培養し、24時間毎に培養上清のサンプリングを行った。各培養液上清中に含まれるhTF量をELISA法により定量しグラフに示した。各測定値をサンプリングした際の細胞密度( $OD_{660}=20$ )

に換算)により補正しその値をグラフに示した。(ARC001, Parent; IGF724,  $\Delta$ ALT; IGF628,  $\Delta$ ART; IGF629,  $\Delta$ BLT; IGF630,  $\Delta$ BRT; IGF631,  $\Delta$ BLT BRT; IGF632,  $\Delta$ ART BRT; IGF633,  $\Delta$ ART BLT; IGF755,  $\Delta$ ALT ART; IGF756,  $\Delta$ ALT BLT; IGF634,  $\Delta$ ART BLT BRT; IGF726,  $\Delta$ ALT ART BRT; IGF728,  $\Delta$ ALT ART BLT; IGF742,  $\Delta$ ALT ART BLT BRT)

図 18 に各モデルタンパク質生産効率に対する染色体削除効果を親株に対する相対値で示した。EGFP 発現では 4 領域削除株 IGF742 で 1.8 倍、hGH 分泌発現では IGF658 で 3.3 倍、hTF 分泌発現では IGF728 で 2.0 倍と効率が上昇していた。

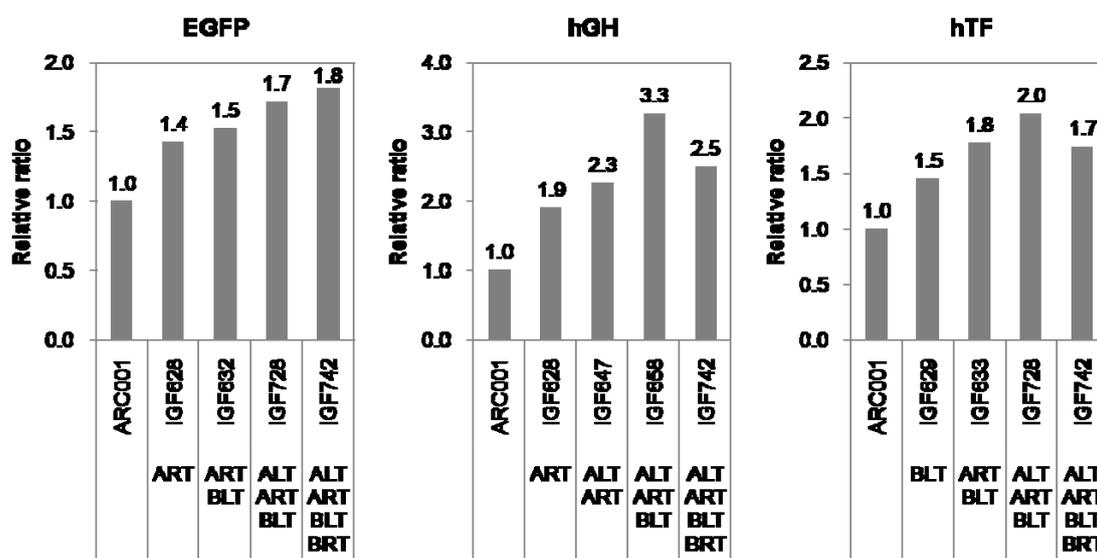


図 18 物質生産効率相対比

各発現タンパク質における染色体削除効果を相対比で示した。EGFP は経時測定した蛍光値から近似式を算出し、 $OD_{660}=5$  の時の EGFP 蛍光値を比較した。hGH、hTF は各株で最も高い生産値を比較した。

#### (6) オミックス解析による物質生産効率向上要因の推定

染色体大規模削除株において物質生産効率が上昇する要因を探るため、染色体削除による遺伝子発現傾向の変化を解析した。4 領域削除株である IGF742 と、各遺伝子の変動がどの削除領域から由来しているのか確認するために 1 領域削除株である IGF724 ( $\Delta$ ALT)、IGF628 ( $\Delta$ ART)、IGF629 ( $\Delta$ BLT)、IGF630 ( $\Delta$ BRT) について cDNA マイクロアレイ解析を行い、親株 ARC001 の遺伝子発現傾向と比較した(図 19)。その結果、IGF742 では窒素飢餓で発現が誘導される減数分裂制御因子である *mei2* や接合フェロモンである *mfm1* や *mfm3* の転写量が増加していたため、染色体大規模削除株は窒素源がまだ培地中に残っている対数増殖期において窒素飢餓を感じていることが推測された。同様の傾向が ART 単独削除株である IGF628 でも観察されたため、この窒素飢餓傾向は ART 領域削除に起因していた。IGF628 はアミノ酸トランスポーターの削除によりアミノ酸取込み能が低下している。そのため窒素飢餓傾向が生じているのではないかと考えられた。さらに、KEGG データベースを用いて cDNA マイクロアレイ結果を代謝マップにマ

ッピングしたところ、アンモニアからグルタミン酸を生合成する遺伝子の転写量が増加していた。グルタミン酸はアミノ酸生合成において最も基本的なアミノ酸である。そのため、異種タンパク質の生産量向上に何らかの影響を与えている可能性が推測された。しかしながら、細胞内のアミノ酸量は厳密に制御されているため、グルタミン酸生合成経路周辺遺伝子の発現上昇は培地中のアミノ酸取込み量の低下に起因しているとも考えられる。そこで、培地を YPD 培地から EMM 培地に変更し、培地中の窒素源はアンモニアだけにして同様の解析を行った。培地を EMM 培地に変更しても、窒素飢餓で発現が誘導される *mei2* や *mfm1*、*mfm3* の発現量が増加していた(図 20)。また、今回はアンモニウムトランスポーターである *amt1* の発現量も増加していた。EMM 培地でのマイクロアレイ結果を代謝マップにマッピングしたところ、やはり YPD 培地の時と同様にアンモニアからグルタミン酸を生合成する遺伝子、TCA サイクルのオキシグルタル酸からグルタミン酸を生合成する遺伝子、そしてグルタミン酸からグルタミンを生合成する遺伝子とグルタミン酸生合成周辺遺伝子の発現が増加していた。さらに、IGF634 ( $\Delta$ ART BLT BRT) のメタボローム解析では、アミノ酸の前駆体となる物質が親株と比較して増加していたことから、染色体大規模削除株ではアミノ酸生合成系に何らかの変化が生じているのではないかと推測された。

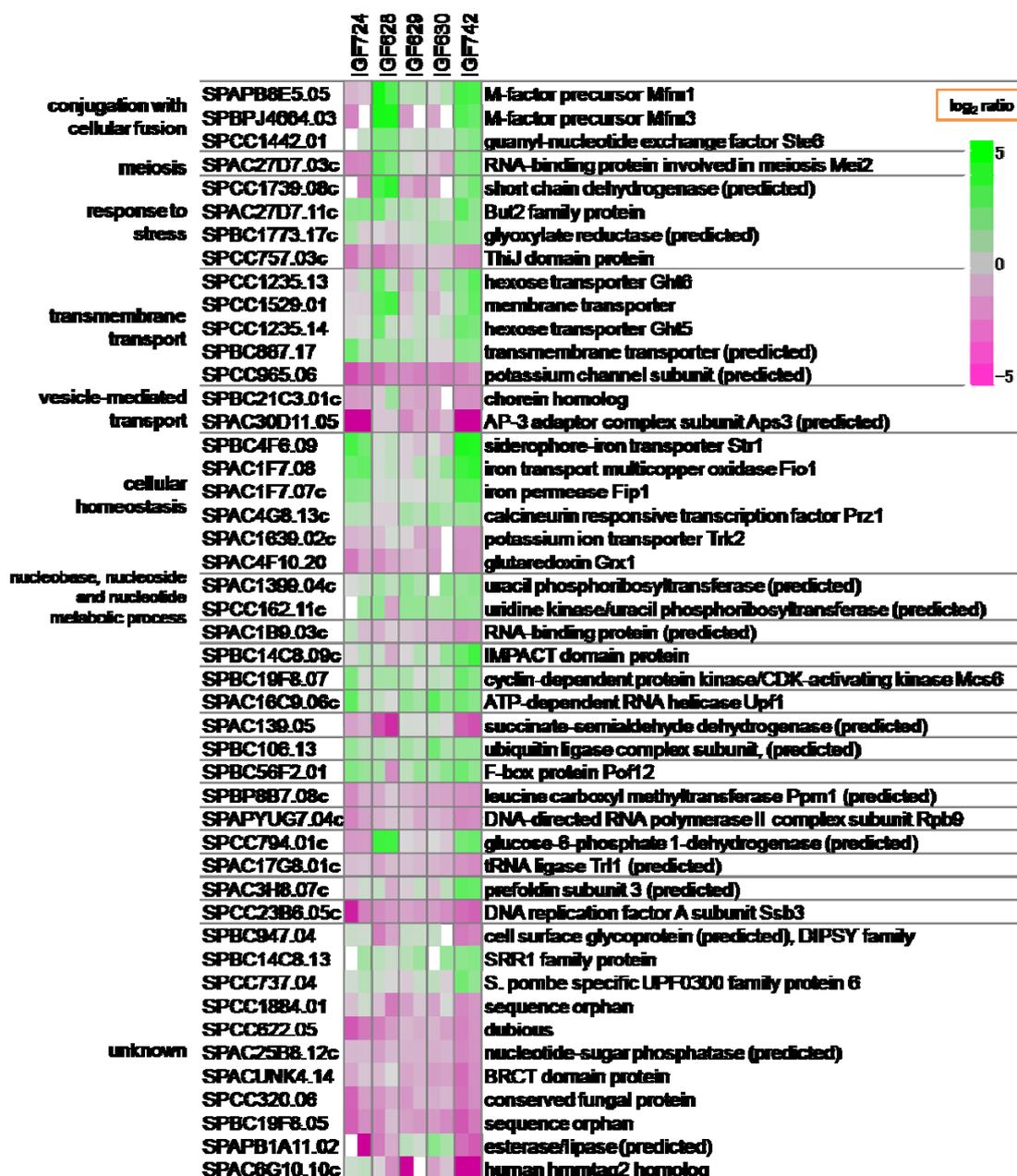


図 19 YPD 培地におけるトランスクリプトーム解析

YPD 培地で対数増殖期まで培養した染色体大規模削除株の遺伝子の発現傾向を親株 ARC001 と比較し、発現量比をヒートマップで示した。各染色体大規模削除株 (IGF724, ΔALT; IGF628, ΔART; IGF629, ΔBLT; IGF630, ΔBRT; IGF742, ΔALT ART BLT BRT) の cDNA マイクロアレイ解析を 2 回ずつ行った。各遺伝子の発現量比を log<sub>2</sub> 比で示し、IGF742 において log<sub>2</sub> 比 ±1.5 以上の変動があった遺伝子をピックアップし、ジーンオントロジーのバイオリジカルプロセスに基づいて分類した。2 個以上遺伝子が含まれるカテゴリー一名を遺伝子名の左に示した。緑色は発現量が増加した遺伝子、マゼンタは発現量が低下した遺伝子を示している。

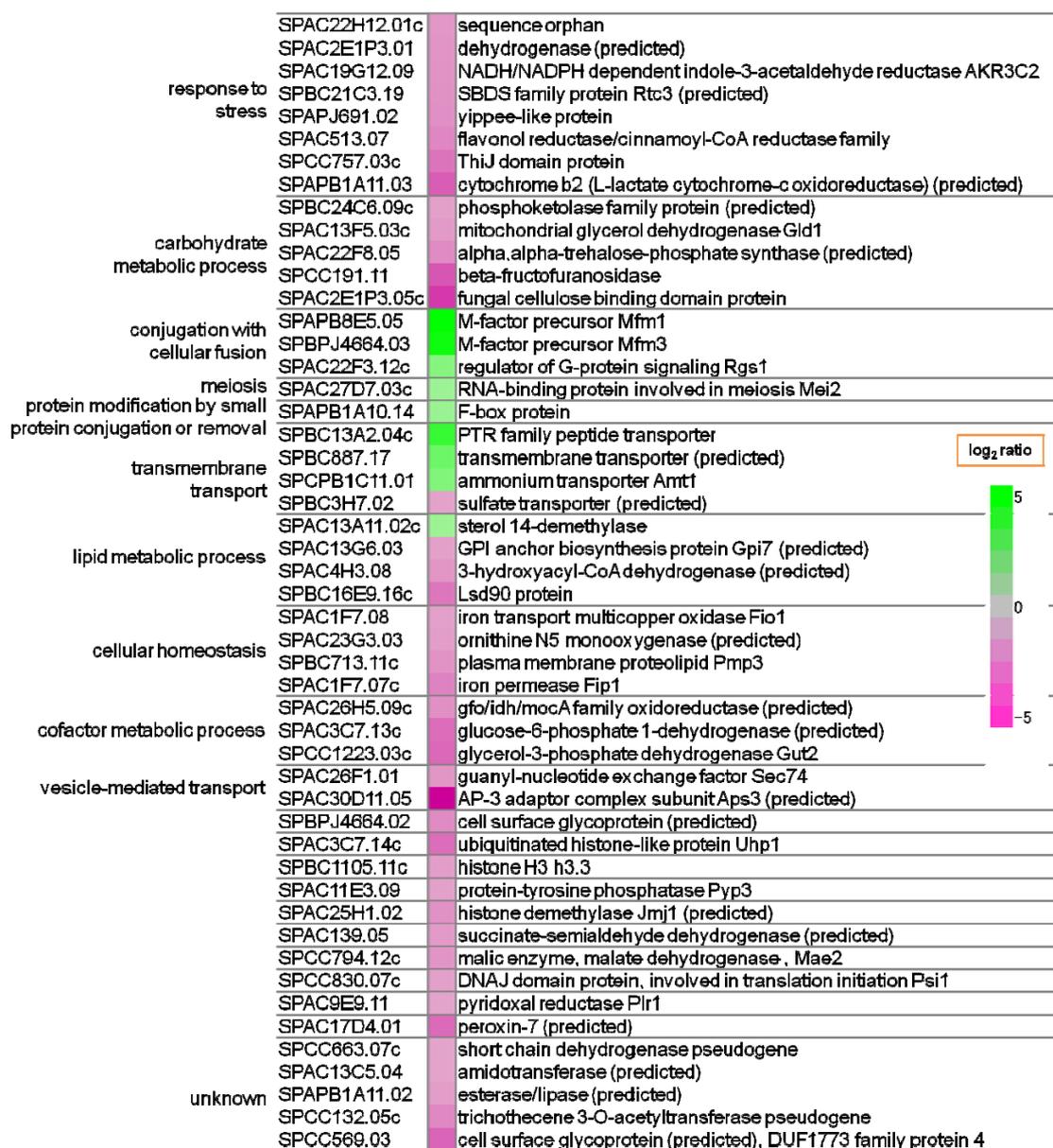


図 20 EMM 培地におけるトランスクリプトーム解析

EMM 培地で対数増殖期まで培養した IGF742 の遺伝子発現傾向を親株と比較し、発現量比をヒートマップで示した。各遺伝子の発現量比を  $\log_2$  比で示し、 $\pm 1.5$  以上の変動があった遺伝子をピックアップしてジェノントロジーのバイオリジカルプロセスに基づいて分類した。2 個以上遺伝子が含まれるカテゴリー名を遺伝子名の左に示した。緑色は発現量が増加した遺伝子、マゼンタは発現量が低下した遺伝子を示している。

### 結語

分裂酵母 IGF では可能な限り分裂酵母のゲノムサイズを縮小化するため、データベースによる相同検索や一遺伝子破壊株情報より大規模に削除できる領域の詳細な決定を行った。第 1 染色

体、第 2 染色体の両末端の 4 つの領域に広範囲におよぶ非必須遺伝子クラスターが存在することが推測されていたため、まず各領域の最も末端にある必須遺伝子を特定した。各末端の必須遺伝子は *trs33*(ALT)、*sec16*(ART)、*zas1*(BLT)、*usp109*(BRT) であることが Latour 法により明らかとなった。一遺伝子破壊株ライブラリーでは非必須遺伝子が必須遺伝子として判定された理由として、第 1 に遺伝子削除により増殖能が著しく低下するために削除株を得ることが困難であった、そして第 2 に染色体の部位により相同組換え効率が低いため削除株を得ることが困難であったことが考えられた。本研究で用いられた Latour 法による大規模削除でも増殖能低下要因となる遺伝子 *pdc2* の削除は非常に困難であったが、その他の必須遺伝子とされていた 2 つの遺伝子 SPBC1348.06c と *alr2* については問題なく削除することが出来た。染色体の相同組換え効率が低い部位を含む程度大きな領域を削除できる本方法は、染色体構造の改変のみならず、遺伝子の機能解析においても有利な方法であるといえる。

分裂酵母 MGF より IGF へ発展させるにあたり、まず MGF 株で問題となっていた削除サイズの拡大に伴う増殖速度の低下や細胞の形態異常などの問題を解決する必要があった。上述で特定した非必須遺伝子クラスター領域を単独で削除した各 IGF 株の中では、ALT 削除株と BLT 削除株に生育の遅延が生じていた。これらの領域の中の増殖速度に影響する遺伝子の選定を行ったところ、*pdc2*、SPBC1683.05 を削除すると増殖速度に影響することが判明した。大規模削除を行う際に、これらの遺伝子を *ura4* 座に移転して残すことによって、増殖速度低下の問題を解決することが出来た。これらの結果より、増殖速度、細胞形態などほぼ安定に維持した染色体大規模削除株 IGF742 ( $\Delta$ 657.3 kbp) が完成した。

増殖能を改善した染色体大規模削除株では、異種タンパク質生産効率が向上していた。タンパク質生産能だけを評価した EGFP 発現解析では IGF742 が約 1.8 倍、さらに分泌効率も合わせて評価した hGH 分泌発現解析では IGF658 が約 3.3 倍、hTF 分泌発現解析では IGF728 が約 2.0 倍に効率が上昇していた。これらの発現効率が上昇した理由については現在解析中であるが、オミックス解析からアミノ酸合成の基礎となるグルタミン酸合成周辺の活性化が要因のひとつであることが推測された。トランスクリプトーム解析では、窒素飢餓で誘導される接合フェロモン因子や減数分裂調節因子の発現が上昇していたことも特徴的であった。さらに最少培地 EMM ではアンモニウムトランスポーターの発現も上昇していた。このことから、染色体大規模削除株では窒素源取り込み系にも変化が生じていることが推測された。実際に、削除領域中にはいくつかのアミノ酸トランスポーター遺伝子が存在しているため、アミノ酸取り込み効率の減少も要因のひとつであるのかもしれない。今後、異種タンパク質高生産株としてより改良していくためにもオミックス的手法などを用いてさらに解析を掘り下げ、要因を解明する必要がある。

以上より、組換えタンパク質生産宿主細胞の土台として異種タンパク質生産効率の上昇した染色体大規模削除株 IGF742 が完成した。さらに異種タンパク質生産効率や分泌効率を向上させるために、MGF で作製した組換えタンパク質生産宿主細胞のひとつであるプロテアーゼ八重削除株との削除領域の統合や、液胞輸送系の弱化や小胞体分子シャペロンの強化などの機能統合、さらに品質向上のための HCP(宿主細胞由来タンパク質)低減や糖鎖エンジニアリングなども検

討することが望まれる。しかしながら、これらの機能統合は全ての組換えタンパク質において有効であるとは限らず、組換えタンパク質ごとに最適な条件を選別する必要がある。本プロジェクトで構築した染色体大規模削除株を土台とし、組換えタンパク質ごとに最適な機能統合を加えることで、さらに効率的に物質生産性の高い生物プロセスに繋がることが期待される。

### 2.1.3.2 外来遺伝子機能安定導入

外来の多数の有用形質を宿主細胞に効率的に付与することを可能とする染色体改変技術の開発を目的とし、染色体上に多数の外来遺伝子発現ユニットを安定に保持することが可能である技術開発を行なった。その結果、外来遺伝子を組込むことに最適な遺伝子座を特定するとともに、さらに複数の外来遺伝子発現ユニットを一度に組込むことが可能であることを見出した。

分裂酵母ではすでに、特定の遺伝子座に発現カセットを多重に組み込む技術が開発されている。緑色蛍光タンパク質 (GFP) のように、宿主細胞の生育にほとんど影響を及ぼさないタンパク質をコードする遺伝子の場合、導入した発現カセットは 50 世代を超えて安定である。しかしながらタンパク質の種類によっては、長期継代培養時に相同組換えによると思われる発現カセットの脱落に起因する生産量の低下が生じる場合がある。このため発現カセットを一箇所に多数ではなく、多くの箇所に同時に組み込むことによって物質生産の継代安定性を担保するという、外来の遺伝子機能を安定に染色体に導入する技術の開発を目指している。

分裂酵母の染色体には、発現カセットを一度に多くの箇所に同時に組み込むことに適した、高度に保存された配列の重複がある。セントロメアや複製開始起点に多い AT-rich な配列以外にも、LTR や *tf2* というトランスポゾンに由来するもの、さらには染色体末端領域 (サブテロメア領域) に 4 コピー程度が染色体上に重複している遺伝子が存在する。なかでも *tf2* は、13 個の配列が 99% 以上の相同性で染色体全体に散在している (図 2.1.3.2-1)。このため、この遺伝子座に組込むことが可能なベクターを作製し (図 2.1.3.2-2)、形質転換の結果、同時に多コピー導入可能であることを、特異的なプライマーセットを用いて確認することに成功した (図 2.1.3.2-3)。

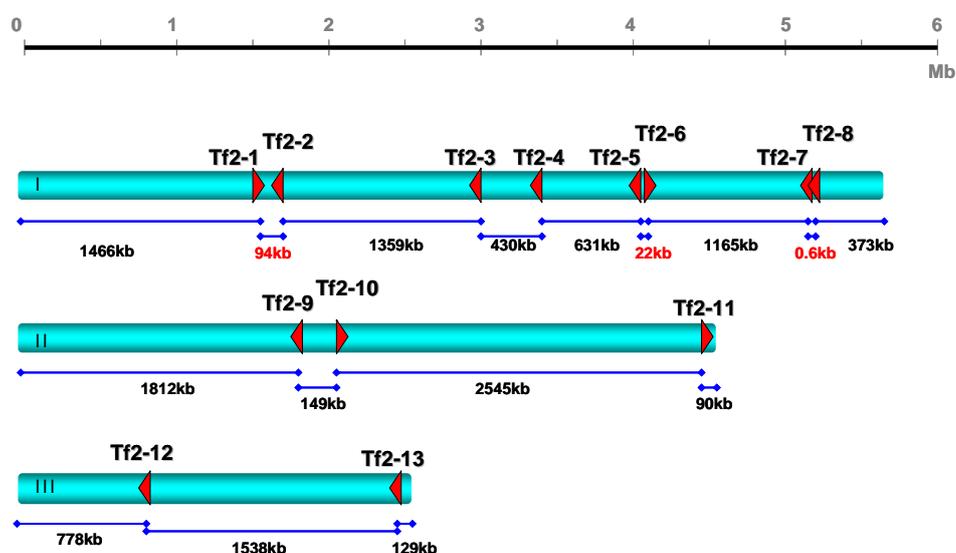


図 2.1.3.2-1 Tf2 遺伝子の染色体上の分布

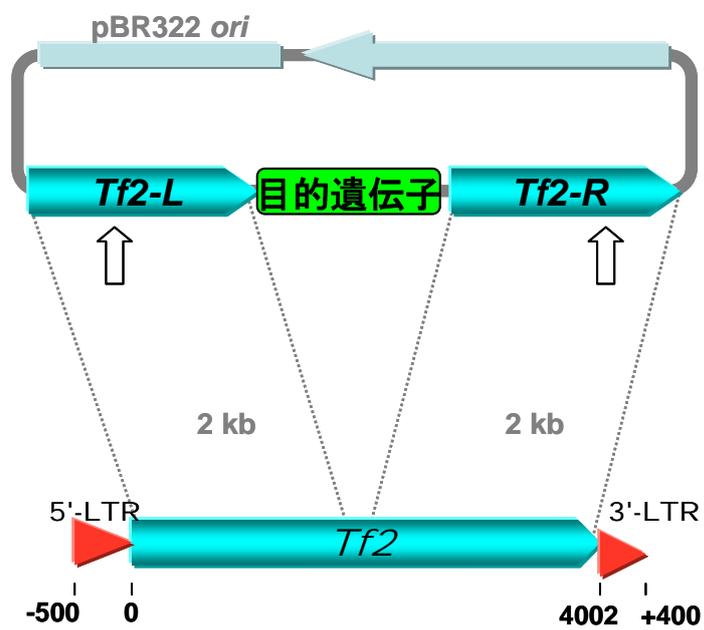


図 2.1.3.2-2 多座組込型発現ベクター

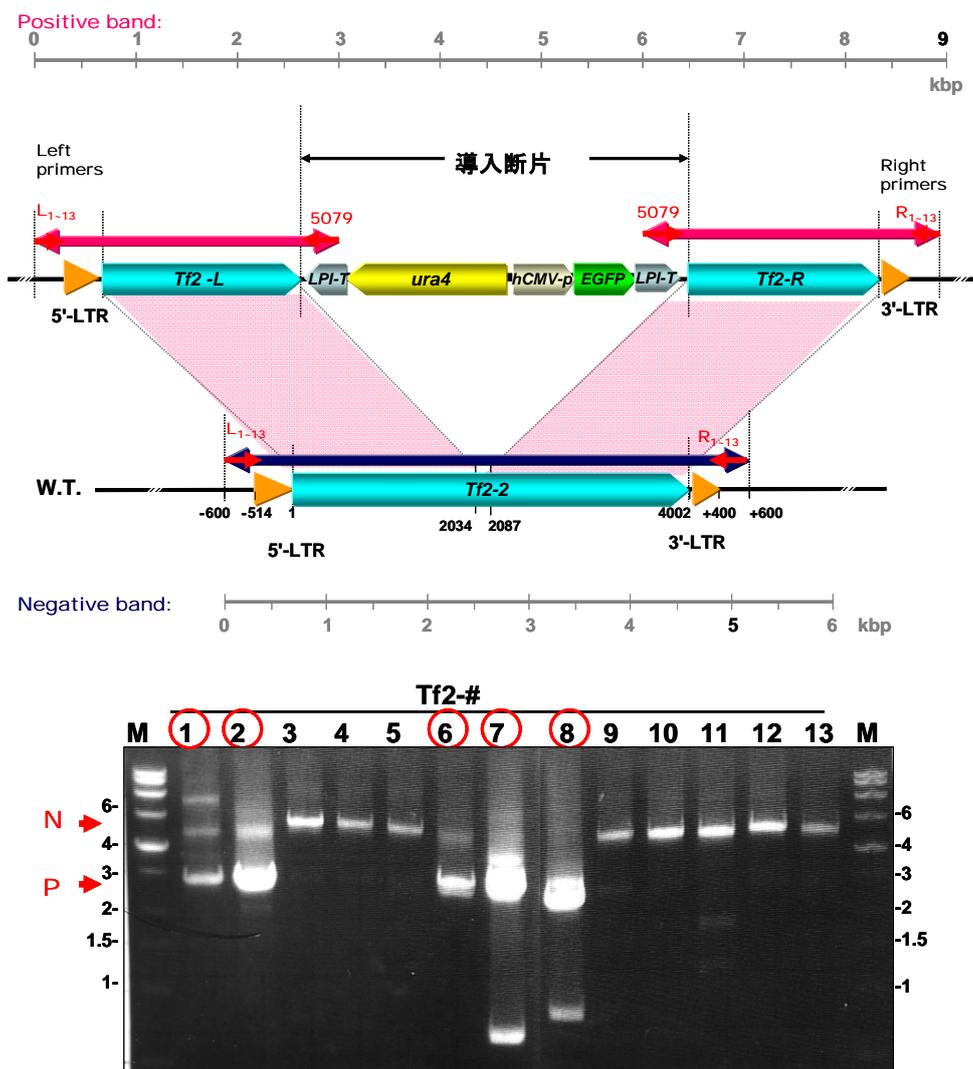


図 2. 1. 3. 2-3 多座組込遺伝子座および組込コピー数の確認

本成果は特願 2009-015472 として特許出願し、広く成果の公表ならびに普及に努めた。

### 2. 1. 3. 3 遺伝子発現制御機能付与

外来の有用形質を効率的に発現することを可能とする遺伝子発現制御技術の開発を目的とし、薬剤添加による誘導型プロモーターや外部信号による制御が可能なプロモーターの取得と、その配列を最適化する技術開発に取り組んだ。分裂酵母ではすでに、誘導型発現が可能なプロモーターが複数取得されている。これらを用いて、モノアミノキシダーゼのように、宿主細胞の生育に影響を及ぼし、構成的な発現では十分量の生産物が得られないものでも、生産が可能になっている。しかしながらタンパク質の種類によってはさらに強い発現制御、すなわち増殖と生産の完全な分離を必要とする場合がある。このため、薬剤を添加することなどの化学信号や、外来の物理学的な信号によって初めて遺伝子発現が始まり、添加しない場合は全く転写が行われないプロモーターならびにその補助因子を取得し、より汎用性の高い物質生産が可能になる技術の開発を目指している。その結果、熱ならびに多様なストレスによって外来遺伝子の発現が誘導される系を確立した(図 2.1.3.3-1)。

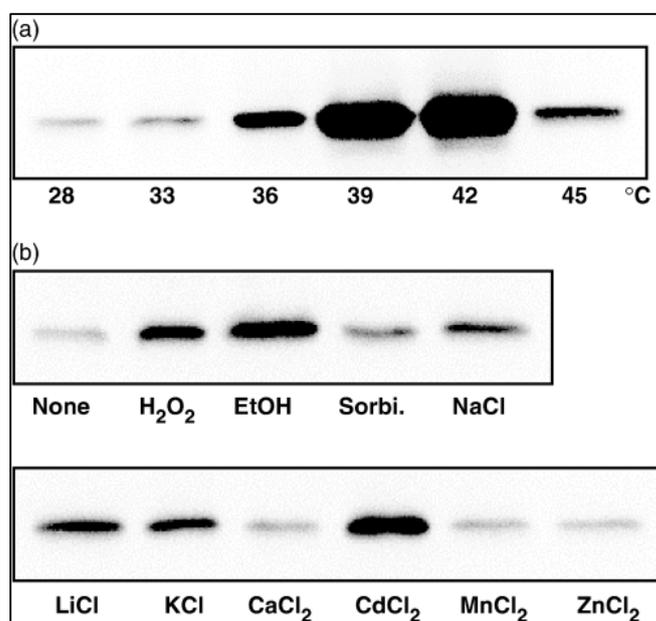
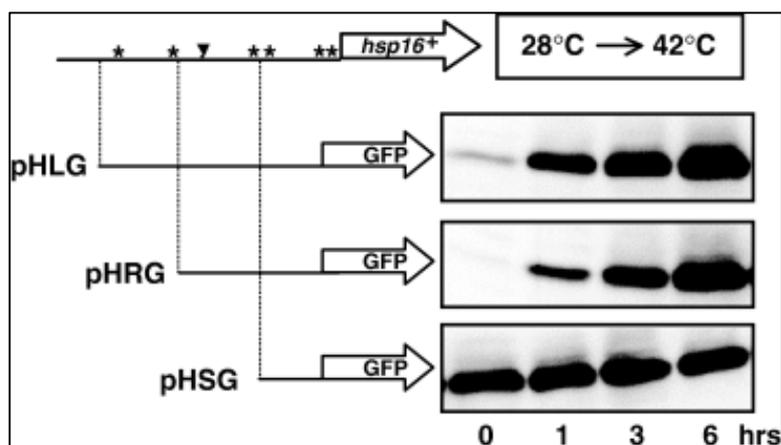


図 2.1.3.3-1 *hsp16* プロモーターを用いた温度遷移および各種ストレスによる転写誘導

本成果は特願 2007-533214 として特許出願し、広く成果の公表ならびに普及に努めた。

#### 2.1.3.4 異種タンパク質分泌生産向上

異種タンパク質の大量生産を行う場合、効率のよい発現が求められる。われわれはヒトトランスフェリン (hTF) をモデルタンパク質とし、分裂酵母における分泌生産性の向上を目的とした。hTF は約 80kDa の可溶性タンパク質であるが 2 箇所の N-結合型糖鎖修飾部位を持つため、分裂酵母で発現させると N 型糖鎖の付加により約 110~120kDa 程度の分子量を示す。また本タンパク質の N 末端領域には細胞外への分泌シグナルを保持しているため、細胞外に分泌される。そのため、本タンパク質の培地中への分泌量を最大化するために、培養条件の検討を行った。

まず、染色体組込型 hTF 構成分泌発現ベクター pTL2OSTFN-CF-4XL を構築し、酢酸リチウム法によって Idiris らが構築したプロテアーゼ多重破壊株である MGF433(A8) 株を形質転換した。最小培地 MM 上でのロイシン要求性の回復によって形質転換体を選択し、複数のクローンを獲得し、hTF 生産実験を行い生産が確認されたクローンを以下の実験に使用した。培地の違いに依存した hTF 生産量の違いを検討するために、分裂酵母の培養で汎用されている培地である YPD・MM・YES 培地を用い、48 時間それぞれの培地で培養したのち培養上清を回収し、ウェスタン解析により解析した。その結果、YPD と MM 培地においてよく分泌生産されていた(図 2.1.3.4-1)。さらにこの 2 つの培地に 2% のカザミノ酸(CAA)を添加したところ、ともに同程度生産量の増加が見られ、カザミノ酸無添加に比べて約 5 倍以上向上させることが可能となった。hTF を今後産業的に大量発現する際のコスト面等を考慮し、このあとの培養条件等の検討は、安価な MM 最少培地を基本培地として実験を行うこととした。

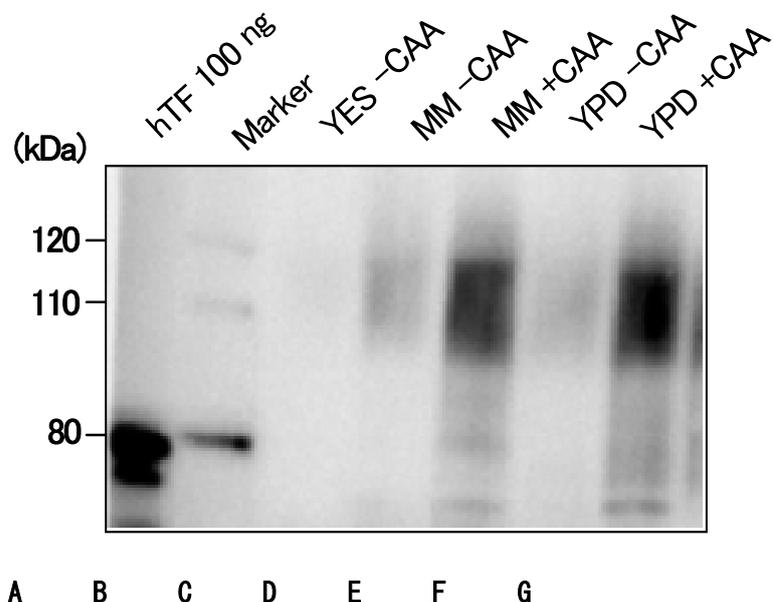


図 2.1.3.4-1 hTF 分泌生産に対する培地組成の影響

左から市販品 100ng (レーン A)ならびに分裂酵母で生産した hTF (レーン B)の SDS-PAGE(ウエスタン検出)。48 時間培養後、各培養上清をアセトン沈殿し、1レーンあたり培地 0.5 ml 相当を泳動した。栄養培地 YES 及び YPD と MM 最少培地にカザミノ産(CAA)を添加した場合としなかった場合についてウエスタン解析を行った。

さらに培地に添加することで hTF の生産を向上させることが出来る物質のスクリーニングを行った。MM 培地に 2%の CAA を添加した培地をベースとし、これにデキストラン硫酸ナトリウム、Tween20、デオキシコール酸、TritonX-100、SDS、ポリエチレングリコール分子量 8000 平均(PEG 8000)を添加した。48 時間それぞれの培地で培養したのち培養上清を回収し、ウエスタン解析により解析したところ、デキストラン硫酸ナトリウムを 0.002~0.01%添加した場合がもっとも高い生産向上能を示し、無添加に比べて約 3 倍以上の生産向上を示した(図 2.1.3.4-2)。

これらの結果から、MM 培地に 2%カザミノ酸とデキストラン硫酸ナトリウムを 0.002~0.01%添加することで相乗効果により無添加の場合に比較して 15 倍以上の生産向上を可能にした。

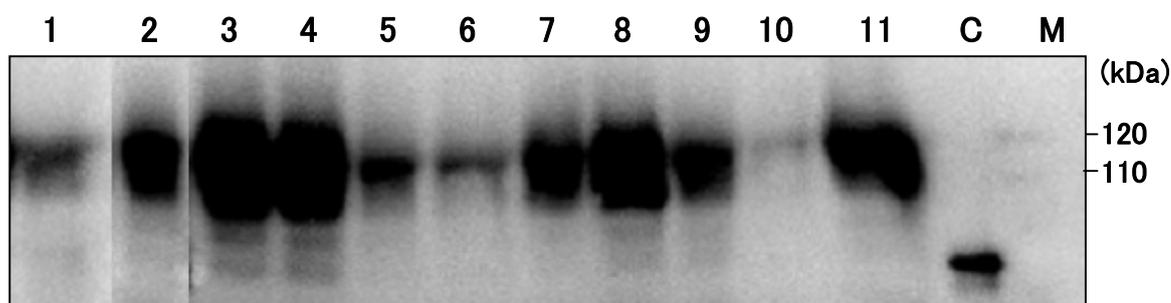


図 2.1.3.4-2 HTF 分泌生産に対する添加物の影響

市販品(C)ならびに分裂酵母で生産したhTFのSDS-PAGE(ウエスタン検出)。1:基本培地(CAA添加なし)、2:基本培地(CAA添加)、3:デキストラン硫酸ナトリウム 0.01%、4:デキストラン硫酸ナトリウム 0.002%、5:Tween20 0.01%、6:Tween20 0.002%、7:デオキシコール酸 0.01%、8:デオキシコール酸 0.002%、9:TritonX-100 0.002%、10:PEG8000 1%、11:PEG8000 0.1%、C:市販品 hTF 100ng、M:分子量マーカー。2-11は培地にCAA2%含む。48時間培養後、各培養上清をアセトン沈殿し、1レーンあたり培地0.5ml相当を泳動した。

出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* において、分子シャペロンである protein disulfide isomerase Pdi1 タンパク質と、糖鎖付加されない変異 hTF ではあるが、これらを共発現させることで hTF の分泌生産が向上することが報告されている。そこでこのような効果が分裂酵母においても見られるか検討を行った。分裂酵母のゲノムデータベースを用いて検索したところ、分裂酵母には *PDII* 遺伝子のホモログが SPAC1F5.02、SPAC17H9.14c、SPBC3D6.13c、SPAC959.05c、SPCC1840.08c の5種類存在することが明らかになった。そこでこれらの遺伝子を hTF 発現株において共発現することを試みた。

分裂酵母のゲノムから PCR 法によりそれぞれの遺伝子を増幅し多コピー高発現型ベクター pREP1 にクローニングし、それぞれの発現ベクター pREP-SPAC1F5.02、pREP-SPAC17H9.14c、pREP-PBC3D6.13c、pREP-SPAC959.05c、pREP-SPCC1840.08c を作製した。それぞれの発現ベクターを酢酸リチウム法によって上記で作製した hTF 発現 A8 株に形質転換を行った。最少培地 MM 上でのウラシル要求性の回復によって形質転換体を選択し、複数のクローンを獲得した。これらの株を基本培地で48時間培養した後、培養上清を回収しウエスタン解析により解析した結果、hTF と SPAC959.05c、SPCC1840.08c 共発現株においては hTF の生産向上は見られなかったが、hTF と SPAC17H9.14c、PBC3D6.13c 共発現株においては顕著な生産向上が見られた(図 2.1.3.4-3A)。また hTF と SPAC1F5.02 共発現株においては、糖鎖付加型の hTF を示す 120kDa 付近の hTF の生産向上には影響を与えなかったが、約 80kDa の hTF の発現が観察された。培養上清に対し、N型糖鎖を特異的分解する peptide:N-glycosidase である EndoHf で処理したところ 120kDa 付近の hTF は消失し、SPAC1F5.02 共発現株によって生じた約 80kDa の hTF と同位置に移行したことから、この約 80kDa の hTF は糖鎖の付加されていない hTF であることが示唆さ

れた(図 2.1.3.4-3B)。つまり hTF と SPAC1F5.02 共発現株により糖鎖付加されない hTF の生産が可能になるという意外な結果が得られた。また基本培地において、hTF と SPAC17H9.14c、PBC3D6.13c 共発現株の生産向上能はデキストラン硫酸ナトリウムを 0.002~0.01% 添加した場合よりも約 3 倍以上高いことが示唆された(図 2.1.3.4-3C)。

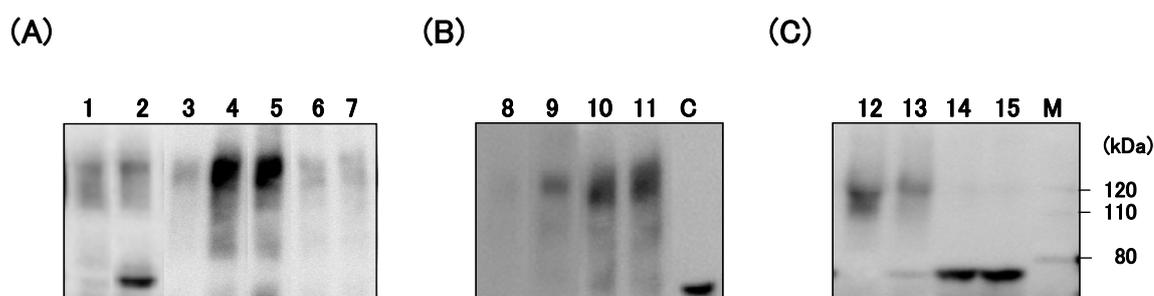


図 2.1.3.4-3 hTF 生産に対する分裂酵母 PDI ホモログの共発現の影響

(A) MM 培地(カザミノ酸なし)にて各 PDI ホモログと hTF を共発現させたもの。(B) デキストラン硫酸ナトリウム添加時との比較。(C) endoH 処理による hTF のバンドシフト。1、7、8、12: PDI ホモログの共発現なし、2、13: SPAC1F5.02 共発現、3: SPAC959.05c 共発現、4、10: SPAC17H9.14c 共発現、5、11: SPBC3D6.13c 共発現、6: SPCC1840.08c 共発現、9: デキストラン硫酸ナトリウム 0.01% 添加、14: 12 のサンプルを endoH 処理したもの、15: 13 のサンプルを endoH 処理したもの、C: 市販品 hTF 100ng、M: 分子量マーカー。48 時間培養後、各培養上清をアセトン沈殿し、1 レーンあたり培地 0.5 ml 相当を泳動した。

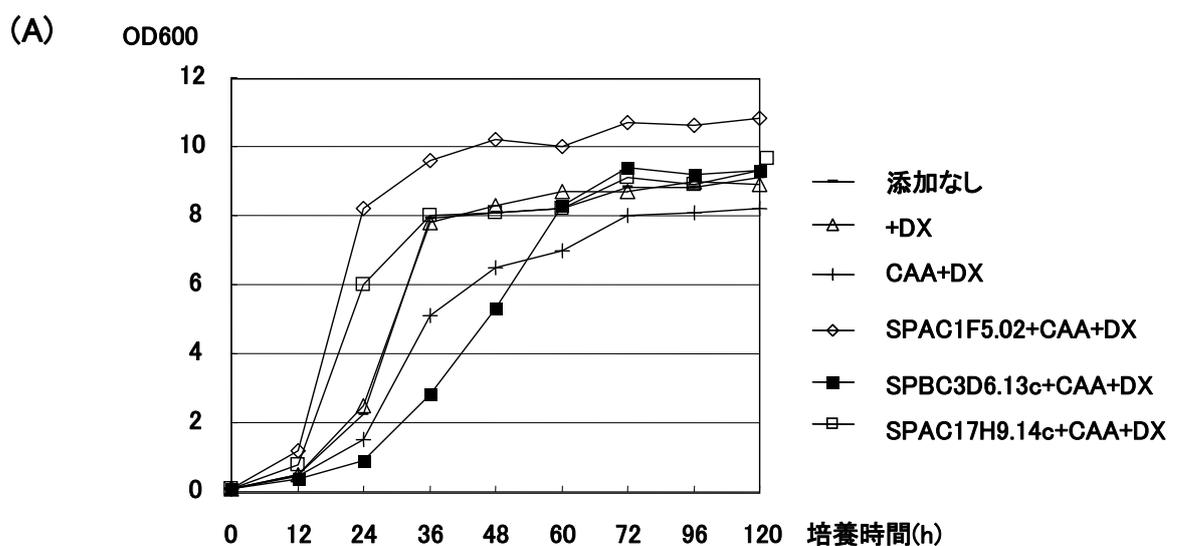
共発現により生産向上を示した SPAC17H9.14c、PBC3D6.13c と SPAC1F5.02 の細胞内局在を検討するため、それぞれの遺伝子に緑色蛍光タンパク質をコードする GFP 遺伝子融合させ、それぞれの融合遺伝子を多コピー発現ベクター、pREP41 にクローニングし、酢酸リチウム法によって ARC039 株を形質転換をした。最少培地 MM 上でのロイシン要求性の回復によって形質転換体を選択して複数のクローンを獲得し、GFP の蛍光が確認されたクローンに対し蛍光顕微鏡観察を行った。その結果、それぞれの GFP 融合タンパク質は ER に局在することが明らかとなり、本タンパク質群は ER において機能していることが示唆された(図 2.1.3.4-4)。



図 2.1.3.4-4 3種のPDIホモログの細胞内局在

各遺伝子のN-末端にGFPを連結して発現させ、蛍光顕微鏡により観察したところ、ERに局在していることが明らかとなった。

SPAC17H9.14c、SPBC3D6.13c と SPAC1F5.02 それぞれと hTF 共発現した株において、hTF の分泌生産量の経時変化を検討した。それぞれの共発現株に対し、基本培地にカザミノ酸 2%とデキストラン硫酸ナトリウム 0.01%を添加した培地と hTF のみの発現株についてはこれに加えて無添加の培地とデキストラン硫酸ナトリウム 0.01%のみを加えた培地において生育速度とウエスタン解析により hTF 分泌生産量の時変化を解析した。その結果 SPAC1F5.02 共発現株は、成長も早く、120 時間培養後には hTF のみの発現株に比べ高い細胞密度になった(図 2.1.3.4-5A)。このことは SPAC1F5.02 が発現することで hTF 生産のストレスを和らげていることが示唆される。また SPBC3D6.13c 共発現株では成長の遅延が見られるが、最終的な細胞密度は hTF のみの発現株と同一になった。hTF の分泌生産量を見ると無添加やデキストラン硫酸ナトリウム 0.01%のみを加えた培地では hTF の発現は 24 時間が最大でありその後減少していることが明らかとなった(図 2.1.3.4-5B)。しかしデキストラン硫酸ナトリウム 0.01%のみを添加したものは若干生産量も多く、培養時間経過による hTF の減衰も弱くなっていた。興味深いことに SPBC3D6.13c 共発現株においては、hTF の生産に遅延が見られるがほかの共発現株や hTF のみの発現株と異なり、120 時間後まで hTF の分泌生産量の増加が観察された。これらの結果から、基本培地にカザミノ酸 2%とデキストラン硫酸ナトリウム 0.01%を添加した培地でさらに SPAC17H9.14c もしくは SPBC3D6.13c を共発現することにより、基本培地での hTF 生産よりも約 45 倍以上の分泌生産の向上を与えることが可能であると考えられる。



(B)

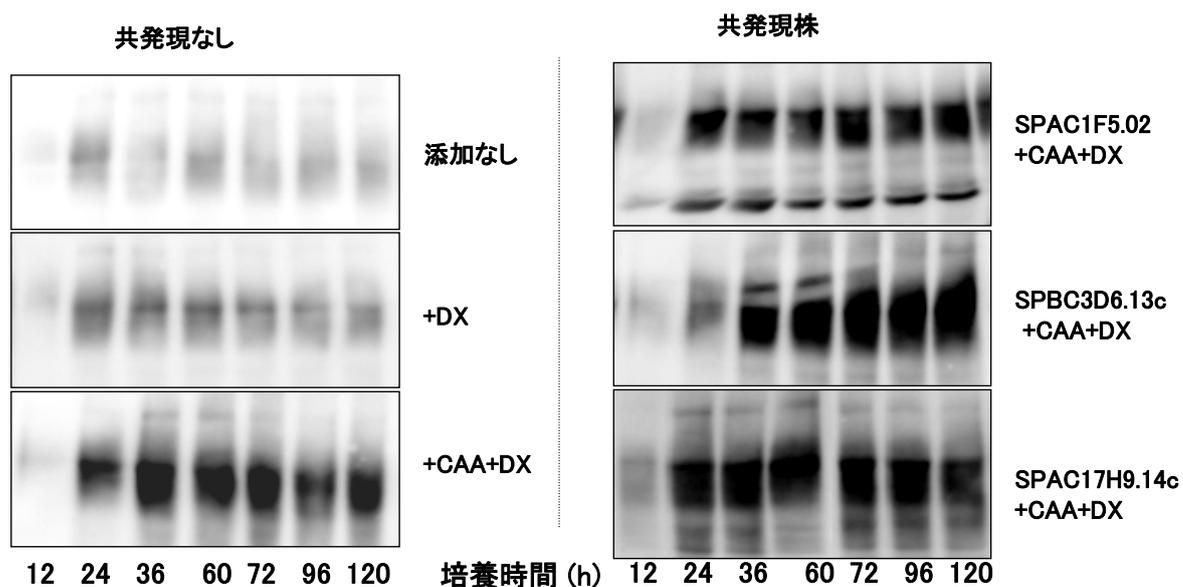


図 2. 1. 3. 4-5 共発現によって生産能に変化を示した PDI ホモログの共発現時の成長曲線と hTF の分泌生産の経時変化

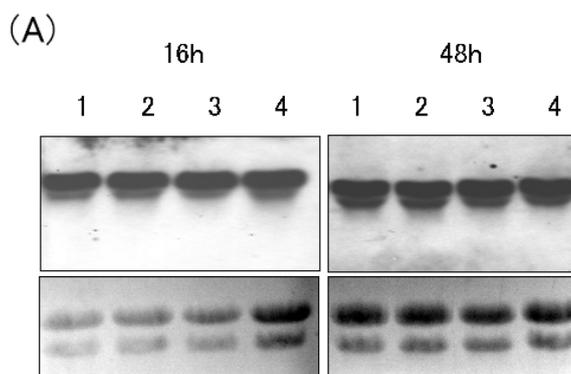
(A)それぞれの株の生育曲線を OD=600 で 120 時間追跡した。(B)分泌生産された hTF の生産量の経時変化をウエスタン解析した結果。各培養時間においてそれぞれの培養上清をアセトン沈殿し、1 レーンあたり培地 0.5 ml 相当を泳動した。

今回の実験で分裂酵母によりヒトトランスフェリンを生産させた場合には、培地としてカザミノ酸

を用いた場合に飛躍的にその生産効率を向上させることができた。さらにデキストラン硫酸を添加した場合にも、著量な hTF を培地中に生産することを見いだした。また今回、分裂酵母の PDI の過剰発現による hTF の生産効率を調べた結果、SPAC17H9.14c、SPBC3D6.13c という2つの PDI ホモログが hTF の生産効率を上昇させることがわかった。

培地添加物で分泌が強化された結果は、どのような作用によるものか明らかとするために、MM 培地への添加物が hTF 遺伝子の発現を強化している可能性についてノザン解析による検討を行った。それぞれの培地において、16もしくは48時間培養後、菌体を回収し RNA を抽出した。その後、hTF 遺伝子の一部をプローブとしてノザン解析を行った。その結果、培地添加物を加えても hTF 遺伝子の転写量は無添加と比較して有意な差はなく、分泌強化は遺伝子発現の変化によるものではないことが明らかとなった。(図 2.1.3.4-6A)

また、3種の PDI (SPAC1F5.02、SPAC17H9.14c、SPBC3D6.13c) 過剰発現株においてもノザン解析を行った。各 PDI はチアミン飢餓応答プロモーター *nmt1* 下流に位置し、チアミン飢餓状態で各 PDI が発現するように作製しており、図 2.1.3.4-6B に示したようにチアミン添加で各 PDI の発現は抑えられているが、それにもにかかわらず hTF の発現量に関してはチアミン添加に関わらず変化しない。このことから、PDI についてもそれらの過剰発現により、hTF 遺伝子の転写が促進されているのではないことが明らかとなった。(図 2.1.3.4-6C)



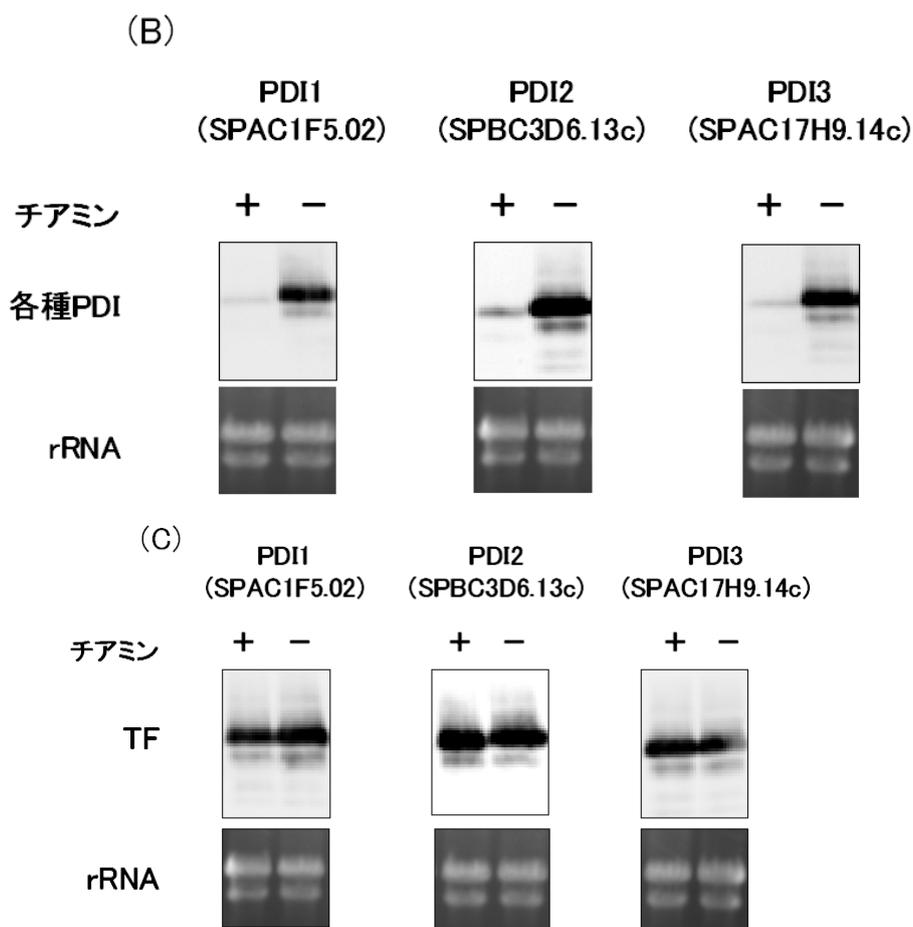


図 2.1.3.4-6 A8 株における hTF 遺伝子のノーザン解析

(A) A8 株における hTF 遺伝子の発現量比較。レーン 1; 添加なし、レーン 2; デキストラン硫酸ナトリウム (DX) 0.002%、レーン 3; カザミノ酸 2%、レーン 4; DX 0.002% + カザミノ酸 2%。A8 株に hTF 発現ベクター pTL20STFN-CF-4XL を導入し、培養 16 時間と 48 時間でそれぞれの添加培地における RNA 量を比較した。上は hTF の mRNA、下は rRNA を示す。培地成分、培養時間に関係なくほぼ一定量の hTF 遺伝子の発現が観察された。(B) 各 PDI 過剰発現株における PDI の転写量。各 PDI 遺伝子はチアミン飢餓誘導性プロモーター nmt1p 下で発現しており、チアミン添加により強く抑制され、チアミン飢餓で過剰発現する。(C) 各 PDI 過剰発現株における hTF の転写量。hTF は hCMV (ヒトサイトメガロウイルス) 由来プロモーター下で恒常的に発現している。hTF 発現量は PDI 遺伝子の発現量の違いにも影響されないことが明らかとなった。

次にデキストラン硫酸ナトリウム (DX) 添加もしくはカザミノ酸 (CAA) の添加物の有無による hTF の細胞内蓄積の変化を検討した。各培養液において hTF 発現株を培養し、培養上清及び細胞を回収し、それぞれに含まれる hTF の量をウエスタン解析により検討した。その結果、添加物を加えた場合に比べて無添加の培地では、有意に蓄積量が増えていることはなく、細胞内に蓄積する hTF の量は培地添加物に影響されないことが明らかとなった(図 2.1.3.4-7)。このことより、培地添

加物は細胞内の輸送を効率化している可能性は低いことが推測された。これらのことから、現在まで明らかとなった、hTF の分泌強化機構は、細胞内における輸送経路の効率化や、hTF 遺伝子の転写量増加によるものではないことが推察された。

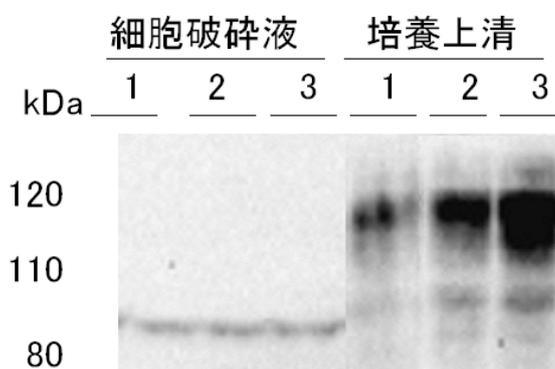


図 2.1.3.4-7 細胞内外での hTF の分布

レーン 1; 添加なし、レーン 2; デキストラン硫酸ナトリウム (DX) 0.002%、レーン 3; カザミノ酸 2%、レーン 4; DX 0.002% + カザミノ酸 2%。hTF 発現株を各培地において 60 時間培養後、細胞はビーズ法により破碎し、培養上清はアセトン沈殿により濃縮しウエスタン解析に供した。細胞内には糖鎖なしの hTF (約 85 kDa) のみが観察され、蓄積は ER 内腔と見られその量は添加物に影響を受けない。

次に現在まで hTF の分泌強化を示した培養方法それぞれにおける hTF の分泌量の定量化を行った。Bethyl 社の Human Transferrin ELISA Quantitation Kit による ELISA による定量化を行った。その結果デキストラン硫酸塩、カザミノ酸を加えた場合、無添加とは有意に hTF の分泌が向上し、デキストラン硫酸塩 (DX) 添加もしくはカザミノ酸添加により約 6 倍、両方加えることにより約 15 倍分泌が強化されたことが明になった (図 2.1.3.4-8)。

さらに、分裂酵母の PDI ホモログである、SPAC17H9.14c もしくは SPBC3D6.13c を hTF と共発現による分泌強化を検討した。無添加培地で且つ PDI 共発現なしにおける hTF の分泌と比較して、共発現株は DX 添加により約 10 倍、カザミノ酸添加により約 13 倍、さらに DX 添加とカザミノ酸両方加えることにより約 40 倍も分泌が強化されることが明になった (図 2.1.3.4-8)。またここで、DX に対して透析を行い、低分子挟雑物の影響を排除しても、その活性に変化はなかったことから、DX の hTF 分泌強化能は、DX 分子自体にあると考えられる。この効果は現在まで報告はなく、まったく新規な現象である。DX は弱い界面活性剤様の作用を持ち、カルシウムイオン等のカチオン存在下で脂質二重膜の疎水領域と相互作用することが報告されている。この作用によりタンパク質分泌の最大の障壁となる、細胞膜に何らかの作用を及ぼし、結果 hTF の細胞膜・細胞壁の透過性が増加し、分泌量が増加することが推察される。今後はその作用機序についてさらに検討を加えていく必要があると考えている。

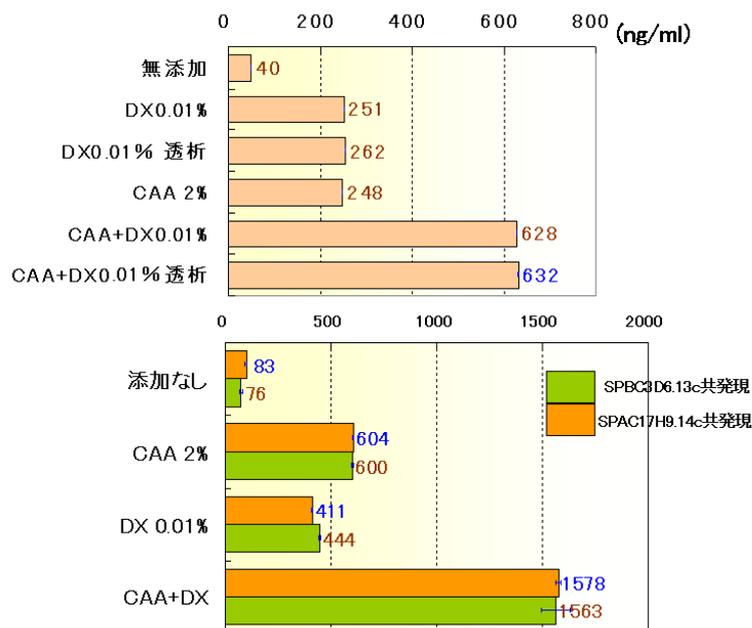


図 2.1.3.4-8 ELISA による hTF の定量

われわれは hTF の分泌強化に PDI が強く関与することを明らかとしたが、PDI は小胞体(ER)において分泌系タンパク質等の立体構造安定化を担う分子シャペロンとして機能していることが出芽酵母等の研究から明らかとなっている。つまり ER における品質管理機構が hTF の分泌強化に大きな影響を与えている可能性を示唆していると考えられた。そこで ER の品質管理機構のひとつである、ERAD (ER-Associated Degradation) に注目した。タンパク質は ER において PDI や Bip といった分子シャペロンにより安定化させられ、正しい立体構造をとることが促進されるが、一定量の異常なタンパク質の発生は常に起こる。ER で生じた異常・変性タンパク質に対する分解機構である。その機構については、動物細胞や出芽酵母で多くの報告がなされ、ERAD 関連タンパク質がさまざまな変性タンパク質や過剰に発現したタンパク質が引き起こすストレスに ire1p などが応答し、それら変性タンパク質の ER 外への排出とプロテアソーム分解に関与することが示されている(図 2.1.3.4-9)。

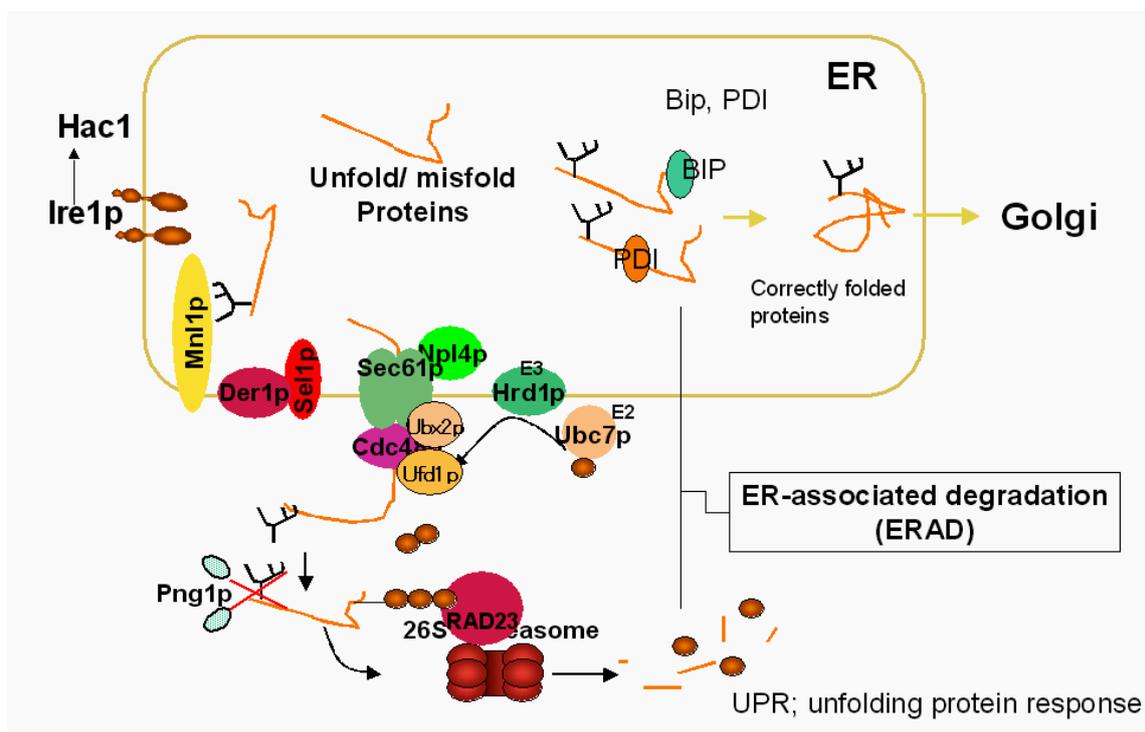


図 2.1.3.4-9 ER におけるタンパク質の品質管理機構 (出芽酵母)

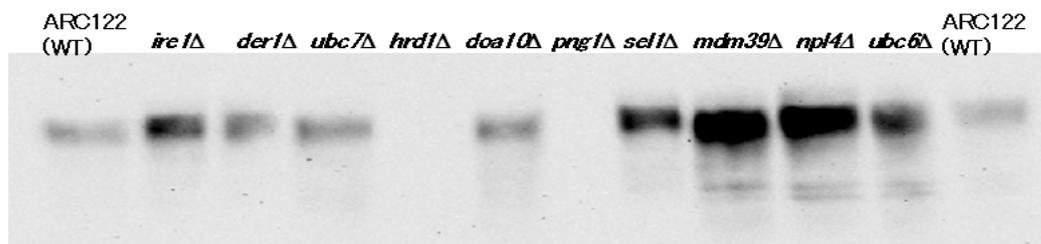
出芽酵母では ER ストレスは Ire1p などにより感知され、転写因子である HAC1 遺伝子を活性化することで PDI などの分子シャペロンの発現増加、もしくは ERAD の活性化を誘導する。

しかしながら、分裂酵母における ERAD の機構についてはほとんど報告がない。そこでわれわれは、分裂酵母における ERAD 関連遺伝子のゲノムデータベースからの抽出を行ったところ、数多くの ERAD 関連遺伝子群のホモログが見出された(表 1)。

表1 ERADに関わる分裂酵母  
ホモログ遺伝子の一覧

<i>S.cerevisiae</i>	<i>S.pombe</i>	相同性
<i>IRE1</i> (YHR079C)	<i>ire1</i> <sup>+</sup> SPAC167.01	60%
<i>PNG1</i> (YPL096W)	<i>png1</i> <sup>+</sup> SPBC1709.14	57%
<i>UBC7</i> (YMR022W)	<i>ubc3</i> <sup>+</sup> SPBP16F5.04	76%
<i>SEL1</i> (YML013W)	<i>sel1</i> <sup>+</sup> SPCC285.11	50%
<i>HRD1</i> (YOL013C)	<i>hrd1</i> <sup>+</sup> SPBC17D11.02c	45%
<i>DER1</i> (YBR210W)	<i>der1</i> <sup>+</sup> SPBC365.08c	52%
<i>NPL4</i> (YBR170C)	<i>npl4</i> <sup>+</sup> SPBC1711.10c	61%
<i>UBC6</i> (YMR100W)	<i>ubc6</i> <sup>+</sup> SPAC10F6.05c	77%
<i>DOA10</i> (YIL030C)	<i>doa10</i> <sup>+</sup> SPBC14F5.07	51%
<i>MDM39</i> (YGL020c)	<i>mdm39</i> <sup>+</sup> SPBC543.10	47%

ここで hTF のような外来遺伝子の過剰発現はそれ自体が細胞に対するストレスとなりうることから、ERAD の対象になりうる可能性もあり、ERAD はタンパク質の生産にという観点では、負の影響を与えている可能性がある。そこで野生株 ARC039 において ERAD 関連各遺伝子の破壊株を作製し、各破壊株において hTF の導入と生産能の検討をおこなった。表中に示された 10 種の遺伝子破壊株において hTF の分泌量をウェスタン解析により検討した結果、いくつかの破壊株において hTF の分泌を強化したものが見られた。特に *mdm39*、*npl4* 破壊株においては顕著な hTF 発現強化が見られた。(図 2.1.3.4-10)



### 図 2. 1. 3. 4-10 分裂酵母における ERAD 関連遺伝子ホモログ破壊株での hTF の分泌量比較

それぞれの破壊株に染色体組み込み型 hTF 恒常分泌発現ベクター-pTL20STFN-CF-4XL を導入し、それぞれ破壊株を 60 時間培養後、培養上清を回収しアセトン沈殿により濃縮しウエスタン解析に供した。ARC122 株は ARC039 株に pTL20STFN-CF-4XL を組みこんだものである。

今回われわれは ERAD 関連タンパク質が異種タンパク質発現分泌向上に影響を与えるという結果を得たが、このような報告はいまだかつてなく、その作用機序については非常に興味もたれる。出芽酵母では Mdm39p は膜タンパク質として ER 内腔へのタンパク質輸送、ER 滞留シグナルを持つタンパク質のゴルジから ER への逆輸送に関与している。また Npl4p は ERAD 関連タンパク質のひとつ Cdc48p(破壊は致死)と相互作用し、ユビキチン化されたタンパク質を ER から排出する機構に関与している。これら 2 つが過剰生産タンパク質に対しどのような作用し影響を及ぼすかを明らかとすることで ER を効率のよいタンパク質生産の場となるよう改良することが可能と考えられ、現在検討を行っている。また現在この 2 つの破壊株を 8 種のプロテアーゼ破壊株で作成し TF の更なる分泌強化を目指し、さらに我々が前回報告した、添加物による分泌向上や PDI 共発現による分泌向上などの結果との組み合わせによる相乗効果により前回報告よりも更なる TF 分泌強化株の創製を試みている。

### 結語

われわれはこれまでの研究で分裂酵母と出芽酵母の細胞内タンパク質小胞輸送機構や ABC トランスポーター、さらに糖鎖付加機構などの基本的なメカニズムをゲノム塩基配列から比較し、両酵母には様々な相違点があることが明らかになった。そして研究の過程で異種タンパク質生産を効率良く行う株を作るにあたり、いくつかの問題点もわかってきた。異種タンパク質を過剰に生産した場合には、宿主である分裂酵母本来の細胞内代謝経路や輸送経路に障害を伴うことが考えられる。とりわけ過剰な異種タンパク質生産は粗面小胞体にストレスを与え、分子シャペロンなどの過剰発現を引き起こす。また ER 内で正しくフォールディング出来ない異種タンパク質は ER 内に留まり、最終的にはユビキチン-プロテアソーム系により分解される。ではこのようなタンパク質品質管理機構は分裂酵母の異種タンパク質生産にとって有利に働くのであろうか？ われわれのこれまでの解析結果から、分裂酵母の ER 内で新生タンパク質のフォールディングに関与する Bip タンパク質が過剰生産しており、各種ストレスを与えてもその発現量が変化しないことを見い

だしている。そこで同じくタンパク質のフォールディングに関与する PDI の過剰発現について検討を行ったところ、良好な結果を得ることができた。今後は分裂酵母の品質管理機構を含め、ER からゴルジ-細胞表層への小胞輸送機構についてさらに解析を行いたい。

一言で異種タンパク質生産と言っても、糖タンパク質や膜タンパク質などその種類は多様である。そこで生産させたいタンパク質の種類によって宿主・ベクター系や培養条件などを選択可能な汎用性の高いシステムの構築を目指していきたい。我々のこれまでの研究の過程で異種タンパク質生産を効率良く行う株を作るにあたり、異種タンパク質生産にはいくつかの重要な「関所」が存在することがわかってきた。最も大きな関所は粗面小胞体において立体構造の異常なタンパク質の蓄積を排除する機構である品質管理機構をどのように利用すれば生産効率の向上につながるのかという問題である。これまでの研究成果を生かして、今後はヒト適応型糖鎖を生産する新たな分裂酵母宿主を創製することで、さらに本格的な産業応用に利用可能な分裂酵母宿主を作りだせればと考えている。

最近になって、我々は分裂酵母の品質管理機構を解析するための、マーカータンパク質を同定することができた。そこで今後は分裂酵母の ERAD 関連遺伝子の破壊、およびその機能を明らかにするとともに、異種タンパク質生産への ERAD の機能についても詳細に解析を行う予定である。生産された異種タンパク質が本当に酵素活性などの生物活性を維持しているかについては、まだ明らかにしていない。せつかく菌体外に分泌した異種タンパク質のコンフォーメーションが異常になっている可能性もある。今後は実際にこの系で生産された異種タンパク質が天然型と同等の生物活性を有しているのかさらに明らかにすることが急務である。

本成果は特願 2009-287873 として特許出願し、また Appl Microbiol Biotechnol 誌の 85 巻 (2009 年)ならびに 86 巻 (2010 年)に掲載され、広く成果の公表ならびに普及に努めた。

### 2. 1. 3. 5 ゴルジ装置における翻訳後修飾系の制御

外来遺伝子発現のための宿主という観点から、分裂酵母は出芽酵母と比較して優れた特性を持っている。例えばタンパク質の翻訳後修飾においても分裂酵母は真核微生物であるために大腸菌や枯草菌とは異なり、糖タンパク質糖鎖を合成する能力がある。そこで真核細胞宿主の利点を活かすためには高等生物由来の糖タンパク質を分裂酵母では生産することが期待されている。しかしながらその糖鎖構造は高等動物由来のものとは大きく異なっている。分裂酵母はその糖鎖構成成分にガラクトースを含み、高等動物に近い糖鎖構造を有しているものの、そのまま高等動物の発現用宿主として用いるには問題があり、分裂酵母の糖鎖生合成系を改変することが必要である。そこで本研究では

分裂酵母糖鎖合成欠損変異株の糖鎖構造を詳細に解析を行った結果について報告する。

#### (1) 分裂酵母の N-結合型糖鎖の改変(*och1* 破壊株の糖鎖構造解析)

分裂酵母を宿主として異種糖タンパク質を発現させる際の問題点として、分裂酵母特有のガラクトマンナンが糖鎖としてタンパク質に付加することが挙げられる。このガラクトマンナンの生合成は  $\alpha$ 1,6-マンノース転移酵素である Och1p の作用により  $\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$  にマンノースを転移すること

により開始される。*och1* 破壊株では糖タンパク質であるアルカリホスファターゼの分子量が大きく減少し、ガラクトマンナンが付加していないと考えられる。分裂酵母の糖鎖をヒト型に改変するためには、ガラクトマンナンが付加しなくなった *och1* 破壊株の糖鎖構造の情報が必要であるが、*och1* 破壊株の詳細な糖鎖構造は未解明である。そこで、糖鎖構造解析で良く用いられるヒドラジン分解・ピリジルアミノ化法により、*och1* 破壊株の糖鎖構造解析を行った。

#### *och1* 破壊株の糖鎖構造解析

まずは、*och1* 破壊株より糖タンパク質を熱水-クエン酸緩衝液を用いて抽出した。得られた糖タンパク質よりヒドラジン分解法により、糖鎖を遊離し、還元末端をピリジルアミノ (PA) 化法により蛍光標識した。PA 糖鎖のサイズ分画 HPLC 分析と HPLC 上の各ピークの質量分析により、*och1* 破壊株の主要な糖鎖は Hex<sub>11</sub>GlcNAc<sub>2</sub>-Hex<sub>15</sub>GlcNAc<sub>2</sub> であることが明らかとなった。

さらに詳細な構造決定をおこなうために、PA 化糖鎖を HPLC により、単一標品まで精製し、<sup>1</sup>H NMR 分析を行った。まずは *och1* 破壊株より糖タンパク質を熱水-クエン酸緩衝液を用いて抽出した。得られた糖タンパク質よりヒドラジン分解法により、糖鎖を遊離し、還元末端を PA 化法により蛍光標識した。PA 化糖鎖をサイズ分画 (順相) HPLC と逆相 HPLC を用いて、単一ピークまで精製し、2-10 nmol の PA 化糖鎖を得た。得られた PA 化糖鎖を 600 MHz <sup>1</sup>H MNR により分析を行い、構造を決定した。以下に *och1* 破壊株の主要 N-結合型糖鎖の構造を示す (表 2.1.3.5-1)。

表 2.1.3.5-1 分裂酵母 *och1* 破壊株の糖鎖構造

Structure	Composition
	Gal <sub>2</sub> Man <sub>9</sub> GlcNAc <sub>2</sub> -PA
	Gal <sub>3</sub> Man <sub>9</sub> GlcNAc <sub>2</sub> -PA
	Gal <sub>4</sub> Man <sub>9</sub> GlcNAc <sub>2</sub> -PA
or	or
	Gal <sub>3</sub> Man <sub>10</sub> GlcNAc <sub>2</sub> -PA
	Gal <sub>5</sub> Man <sub>9</sub> GlcNAc <sub>2</sub> -PA
	Gal <sub>6</sub> Man <sub>9</sub> GlcNAc <sub>2</sub> -PA

本成果は Biosci. Biotechnol. Biochem. 誌の 73 巻 (2009 年) に掲載され、広く成果の公表ならびに普及に努めた。

#### *gms1och1* 二重破壊株の糖鎖構造解析

*och1* 破壊株の糖鎖構造解析の結果、*och1* 破壊株の糖鎖の非還元末端には $\alpha$ -ガラクトースが多数結合していることが明らかとなった。*och1* 破壊株の糖鎖からヒト型のハイマンノース型糖鎖に改変するには、この $\alpha$ -ガラクトースを除去する必要がある。以前、我々は糖鎖に $\alpha$ -ガラクトースが結合しない *gms1* 破壊株を単離した。分裂酵母 *gms1* はゴルジ局在の UDP-ガラクトース輸送体をコードしており、その破壊株では糖転移酵素の基質である UDP-ガラクトースがゴルジ内腔に取り込まれず、糖鎖にガラクトースが付加しなくなる。そこで *gms1och1* 二重破壊株を作製し、その糖鎖構造解析を行った。

*gms1och1* 二重破壊株より PA 化糖鎖を調製し、サイズ分画 HPLC 分析を行ったところ、主要な糖鎖として Hex<sub>8</sub>GlcNAc<sub>2</sub> - Hex<sub>12</sub>GlcNAc<sub>2</sub> のピークが検出された。*gms1och1* 二重破壊株の糖鎖は *och1* 単独破壊株と比較して、糖鎖サイズの減少が見られた。これは $\alpha$ -ガラクトースが結合しなくなったためであると考えられる。次に $\alpha$ 1,2-マンノシダーゼ消化を行い、消化前後のクロマトグラムを比較することにより、構造解析を進めた。*gms1och1* 二重破壊株の糖鎖に *in vitro* で $\alpha$ 1,2-マンノシダーゼを作用させたところ、Hex<sub>8-12</sub>GlcNAc<sub>2</sub>-PA の糖鎖は、全て M5 の糖鎖へと加水分解された。この結果より、*gms1och1* 二重破壊株の糖鎖は M5 の糖鎖の非還元末端に $\alpha$ 1,2-マンノースが 3 から 7 個結合した構造を持つことが明らかとなった。

さらに $\alpha$ 1,2-マンノースの詳細な分岐構造を調べるために、*gms1och1* 二重破壊株のサイズの異なるピークをそれぞれ分取し、逆相 HPLC でさらに精製を行い、単一標品を調製した後、部分アセトリシス分析を行った。部分アセトリシス分析では $\alpha$ 1,6 マンノース結合を特異的に加水分解することにより、ハイマンノース型糖鎖の分岐構造を調べることができる。部分アセトリシス解析の結果、この $\alpha$ 1,2-マンノースの分岐構造を含めた詳細な *gms1och1* 二重破壊株の糖鎖構造を決定した。糖鎖構造を表 2.1.3.5-2 に示す。*gms1och1* 二重破壊株ではヒト体内で抗原になり得る $\alpha$ -ガラクトースが全く付加しておらず、本株は異種糖タンパク質生産株として有用であると考えられる。

表 2.1.3.5-2 *gms1och1* 二重破壊株の糖鎖構造

ピーク	構造	相対含量 <sup>a</sup>
a		9
b-1		35
b-2		17
c		100
d	<p style="text-align: center;">or</p>	47
e	<p style="text-align: center;">or</p>	20

<sup>a</sup> 相対含量は c-1 のピーク面積を 100 とした相対値で示した。

本成果は Appl. Microbiol. Biotechnol. 誌の 86 巻 (2010 年) に掲載され、広く成果の公表ならびに普及に努めた。

また上述のように、*gms1Δoch1Δ* 二重破壊株は  $\alpha$ -ガラクトースが完全に欠損した  $\text{Man}_{10-12}\text{GlcNAc}_2$  型糖鎖を生産することが明らかとなった。ヒト型糖鎖生産のためにはさらに  $\alpha$ 1,2-マンノースを刈り込む必要があるため、*gms1Δoch1Δ* 二重破壊株に  $\alpha$ 1,2-マンノシダーゼ遺伝子を導入し、その糖鎖構造変化の解析を行った。

まずは導入した  $\alpha$ 1,2-マンノシダーゼ遺伝子が分裂酵母細胞内で酵素活性を有する酵素として発現しているかを調べるために、 $\alpha$ 1,2-マンノシダーゼ遺伝子導入株から粗細胞抽出液を調製し、酵素活性測定を行った。酵素活性産物はサイズ分画 HPLC を用いて解析を行った(図 2.1.3.5-1)。 $\text{Man}_8\text{GlcNAc}_2\text{-PA}$  糖鎖を基質として活性測定を行った場合、酵素産物である  $\text{Man}_{5-7}\text{GlcNAc}_2\text{-PA}$  糖鎖が検出され、導入した  $\alpha$ 1,2-マンノシダーゼ遺伝子は酵母細胞内で活性を有するタンパクとして発現していることが確認された。

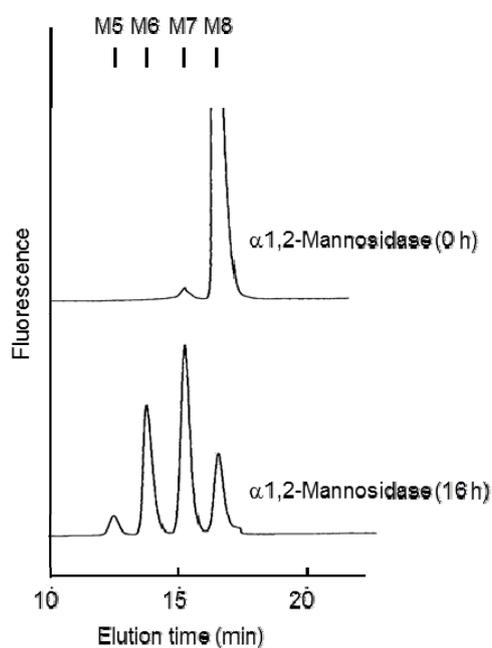


図 2.1.3.5-1  $\alpha$ 1,2-マンノシダーゼの活性測定

$\alpha$ 1,2-マンノシダーゼ遺伝子導入株から粗細胞抽出液を調製し、 $\text{Man}_8\text{GlcNAc}_2\text{-PA}$  糖鎖を基質として  $37^\circ\text{C}$ 、16 時間で酵素反応を行った。酵素反応産物はサイズ分画 HPLC で解析を行った。図上の黒線はそれぞれ標準糖鎖  $\text{Man}_{5-8}\text{GlcNAc}_2\text{-PA}$  (M5 - M9) の溶出位置を示す。

次に、 $\alpha$ 1,2-マンノシダーゼ遺伝子導入した *gms1Δoch1Δ* 二重破壊株から *N*-結合型 PA 化糖鎖を調製し、サイズ分画 HPLC で分析を行った(図 2.1.3.5-2)。低発現用ベクターを用いて  $\alpha$ 1,2-マンノシダーゼ遺伝子を発現させた場合、目的の M5-PA 糖鎖は生産されたものの、M6-PA 以上の大きさの糖鎖も検出された。一方、高発現用ベクターを用いて発現させた場合、ほぼ単一の M5-PA 糖鎖に相当するピークのみが検出された。この M5-PA 糖鎖相当のピークを分取し、逆相 HPLC 分析を行ったところ、図中に構造を示すような M5A-PA の標準標品と溶出位置が一致し、異性体構造が明らかとなった。本株は単一のヒトハイマンノース型糖鎖生産株であり、糖タンパク

質生産宿主として非常に有用な株であると言える。

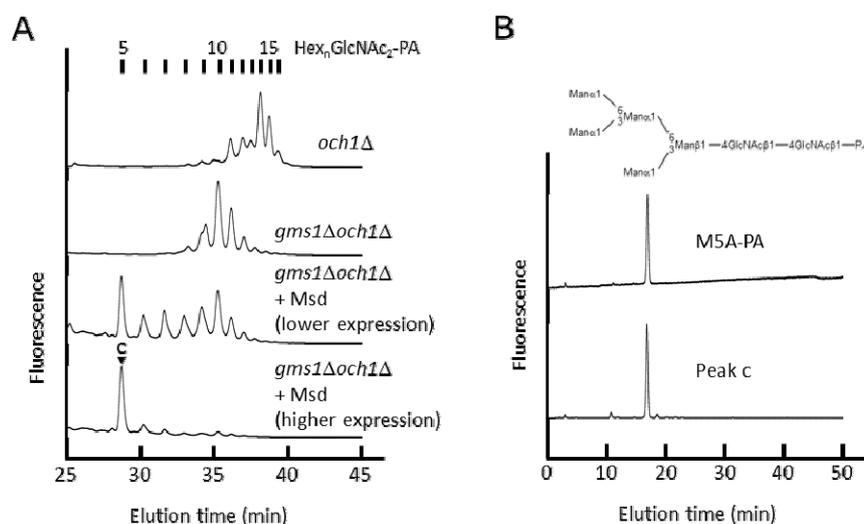


図 2.1.3.5-2 α1,2-マンノシダーゼ遺伝子導入 *gms1Δoch1Δ* 二重破壊株の糖鎖構造解析。

A、*och1Δ*株、*gms1Δoch1Δ*二重破壊株およびα1,2-マンノシダーゼ遺伝子導入（低発現または高発現ベクター）*gms1Δoch1Δ*二重破壊株より *N*-結合型 PA 化糖鎖を調製し、サイズ分画 HPLC 分析を行った。図上の黒線はそれぞれ標準糖鎖 Man<sub>5-9</sub>GlcNAc<sub>2</sub>-PA (M5 - M9) および *och1* 破壊株で同定されたサイズ既知の糖鎖の溶出位置を示す。B、ピーク c の逆相 HPLC を行った。上図は M5A-PA 標準糖鎖、下図はピーク c のクロマトグラムを示す。頭上の模式図は M5A-PA の構造を示す。

#### *alg3och1* 二重破壊株の糖鎖構造解析

出芽酵母の *ALG3* (*ScALG3*) は ER 内腔においてドリコールリン酸オリゴ糖の生合成に関与する α1,3-マンノース転移酵素である。出芽酵母における *ALG3* 破壊株における ER 型インベルターゼの糖鎖構造が報告され、主要な糖鎖は以下のような構造であることが報告されていた (図 2.1.3.5-3)。

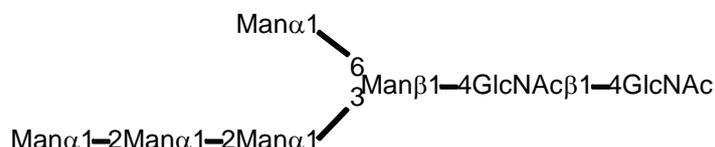


図 2.1.3.5-3 出芽酵母 *ALG3* 破壊株の糖鎖構造

この構造は α1,6-マンノースに α-マンノースが結合しておらず、野生型出芽酵母のコア糖鎖である M9 よりもマンノースの数が少ない構造であった。一方、分裂酵母のホモログである *alg3* に関する報告はない。そこで、出芽酵母と同様に分裂酵母 *alg3* 破壊株においてもコア糖鎖サイズの減少を期待して、*alg3och1* 二重破壊株を作製し、その糖鎖構造解析を行った。

*alg3och1* 二重破壊株から PA 化糖鎖を調製し、サイズ分画 HPLC 分析を行ったところ、主な *N*-結合型糖鎖としては2つのピークが検出された。これらの糖鎖は標準糖鎖との溶出位置との比較から Hex<sub>7-8</sub>GlcNAc<sub>2</sub>-PA であると予測された。これらのピークを分取し、 $\alpha$ -1,2 マンノシダーゼおよび $\alpha$ -ガラクトシダーゼを作用させたところ、 $\alpha$ -ガラクトシダーゼを作用させたときのみ、サイズ分画 HPLC 上でピークの移動が観察され、M5 のピークが生成した。生成した M5 のピークを分取し、 $\alpha$ 1,2-マンノシダーゼを作用させたところ、M3 のピークが生成した。以上の結果より、*alg3och1* 二重破壊株の糖鎖構造は表 2.1.3.5-3 のように決定された。

表 2.1.3.5-3 *alg3och1* 二重破壊株の糖鎖構造

ピーク	構造	組成	相対含量 a
a		Gal <sub>2</sub> Man <sub>5</sub> GlcNAc <sub>2</sub> -PA	100
b		Gal <sub>3</sub> Man <sub>5</sub> GlcNAc <sub>2</sub> -PA	47

<sup>a</sup> 相対含量は a のピーク面積を 100 とした相対値で示した。

#### 分裂酵母の糖鎖構造の改変と異種糖タンパク質の生産

次に、*alg3och1* 二重破壊株を異種糖タンパク質生産宿主として用いた場合においても、異種糖タンパク質にサイズが減少した糖鎖が付加するかどうかを調べた。*alg3och1* 二重破壊株にヒトランスフェリン (hTF) をモデル糖タンパク質として異種発現させ、ウェスタン解析によりその分子量を解析した。野生株および *alg3* 破壊株では 100 - 120 k の分子量を有するスミアなバンドが検出された。一方、*och1* 破壊株および *alg3och1* 二重破壊株では 80 k 付近の分子量を有するシャープなバンドが検出され、*alg3och1* 二重破壊株の方がより小さな分子量を有していた。PNGase を作用させたところ、全ての株でバンドが低分子量化し、同じ位置へ移動した。この結果よりバンド分子量の違いは付加した糖鎖サイズの違いに由来することが考えられた。一方、Endo H を作用させたところ、野生株および *och1* 破壊株では PNGase 消化後と同じ位置にバンド移動が観察されたが、*alg3* 破壊株および *alg3och1* 二重破壊株ではバンド移動が観察されなかった。Endo H は出芽酵母 *alg3* 破壊株が生産する糖鎖には作用しない基質特異性を有することが報告されていることから、異種発現させた hTF にも図 2.1.3.5-4 のような糖鎖が付加していることが示唆された。

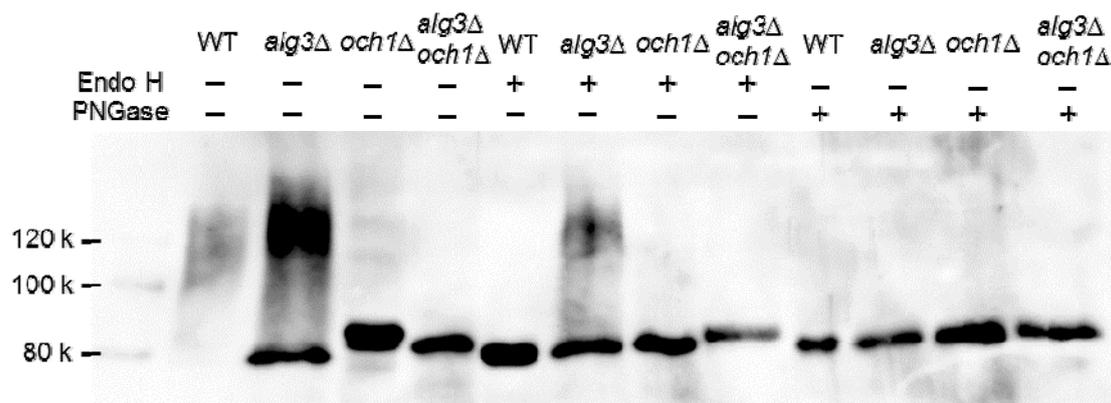


図 2. 1. 3. 5-4 各糖鎖合成欠損株で異種発現させた hTF のウエスタン解析。

野生株、*alg3*破壊株、*och1*破壊株および *alg3och1* 二重破壊株に hTF-FLAG 発現ベクターを導入し、形質転換体を得た。形質転換体を MM 培地にて 60 時間培養し、上清を回収、濃縮後、SDS-PAGE サンプルバッファーに溶解させた。溶解後、Endo H および PNGase 消化を行い、抗 FLAG 抗体によるウエスタン解析により分子量を解析した。

本成果は J. Biotechnol. 誌の 150 巻 (2010 年) に掲載され、広く成果の公表ならびに普及に努めた。

#### (2) 分裂酵母の O-結合型糖鎖の改変(均一な O-結合型糖鎖を有する *omh1* 変異株の取得)

出芽酵母 *KTR* ファミリーに属する  $\alpha$ 1,2-マンノース転移酵素は N-結合型糖鎖だけでなく O-結合型糖鎖の生合成にも関与することが知られている。分裂酵母ゲノムデータベースには 6 個のホモログの存在が示唆されているが、その詳細な解析はなされていない。そのため、分裂酵母 O-結合型糖鎖の生合成メカニズムは未解明である。分裂酵母で異種タンパク質を発現させる際には、Ser/Thr リッチなアミノ酸領域に分裂酵母型である O-マンノース型糖鎖が様々な長さで付加し、問題となっている。そこで、出芽酵母 *KTR* ファミリーの分裂酵母ホモログを *omh1* -  $\theta$  と命名し、糖鎖生合成への影響を調べた。

まずは、各遺伝子破壊株を作製し、N-結合型糖鎖への影響を酸性ホスファターゼの活性染色により解析した。分裂酵母酸性ホスファターゼは複数の糖付加モチーフを有しており、糖鎖生合成欠損株の解析に良く用いられている。野生株と各破壊株を低リン酸培地で培養することにより酸性ホスファターゼを誘導し、ネイティブゲル電気泳動を行った。泳動後活性染色により、酸性ホスファターゼを可視化し、移動度を比較したところ、野生株と各破壊株で顕著な差は見られなかった。以上の結果より、*omh* 各破壊株は N-結合型糖鎖の生合成には関与しないことが示唆された。次に O-結合型糖鎖の影響を O-結合型糖鎖のみが付加している出芽酵母キチナーゼの分子量を比較することにより解析した。グルコース抑制分泌型プラスミドである pFM1-1 にクローニングされた出芽酵母キチナーゼを野生株および *omh1* 破壊株に形質転換した。両株をグルコース抑制条件下で、定常期まで培養し、低グルコース濃度培地に移し、キチナーゼの発現を誘導した。菌

体を回収後、ガラスビーズを用いて破碎し、粗タンパク質抽出液を得た。得られた粗タンパク質抽出液にキチンを加えて、キチナーゼを吸着させ、緩衝液で洗浄後、野生株と各破壊株で出芽酵母キチナーゼを発現させ、キチンビーズを用いて精製した。精製キチナーゼを SDS-PAGE で分析したところ、*omh1* 破壊株のみ分子量の減少が見られた。以上の結果より、*omh1* は O-結合型糖鎖の生合成に関与することが示唆された。

次に、より詳細な糖鎖構造情報を得るために、野生株および各 *omh* 破壊株より O-結合型 PA 化糖鎖を調製し、サイズ分画 HPLC 分析を行った。野生株では主に5個の糖鎖のピークが検出された。*omh1* 破壊株以外の *omh* 破壊株では野生株と同じピークが検出された。*omh1* 破壊株では単一のピークのみが検出され、その構造はガラクトシルマンノースの 2 糖であった。以上の結果より、Omh1p はセリン/スレオニンに付加されたマンノースへ $\alpha$ 1,2-マンノースを付加している $\alpha$ 1,2-マンノース転移酵素であることが強く示唆された。

分裂酵母 *omh1* の破壊株の O-結合型糖鎖はガラクトシルマンノースからなる2糖のみからなることが明らかとなったが、本破壊株を用いて、O-結合型糖鎖を有する異種糖タンパク質を発現させた場合にも、ガラクトシルマンノースからなる 2 糖のみを有するかどうかに興味を持たれる。そこで、本破壊株に出芽酵母キチナーゼを発現させて、その O-結合型糖鎖の糖鎖構造解析を行った。

まずグルコース抑制分泌型プラスミドである pFM1-1 にクローニングされた出芽酵母キチナーゼを野生株および *omh1* 破壊株に形質転換した。両株をグルコース抑制条件下で、定常期まで培養し、低グルコース濃度培地に移し、キチナーゼの発現を誘導した。菌体を回収後、ガラスビーズを用いて破碎し、粗タンパク質抽出液を得た。得られた粗タンパク質抽出液にキチンを加えて、キチナーゼを吸着させ、緩衝液で洗浄後、SDS を含む緩衝液で溶出させ精製を行った。精製キチナーゼの純度を SDS-PAGE で確認後、透析を行い、ヒドラジン分解-PA 化法を用いて PA 化糖鎖を調製した。次に、得られた PA 化糖鎖のサイズ分画 HPLC 分析を行った。野生株とは異なり *omh1* 破壊株では主要なピークとして 2 糖のみが検出された。この 2 糖画分を分取し、 $\alpha$ -ガラクトシダーゼおよび  $\alpha$ -マンノシダーゼを作用させ、逆相 HPLC 分析を行ったところ、 $\alpha$ -ガラクトシダーゼでのみ消化され、マンノース単糖が検出された。以上の結果より、分裂酵母 *omh1* 破壊株で発現させた出芽酵母キチナーゼの O-結合型糖鎖は、細胞全体の糖鎖構造解析の結果と同様に、ガラクトシルマンノースの 2 糖からのみなることが分かった(図 2.1.3.5-5)。

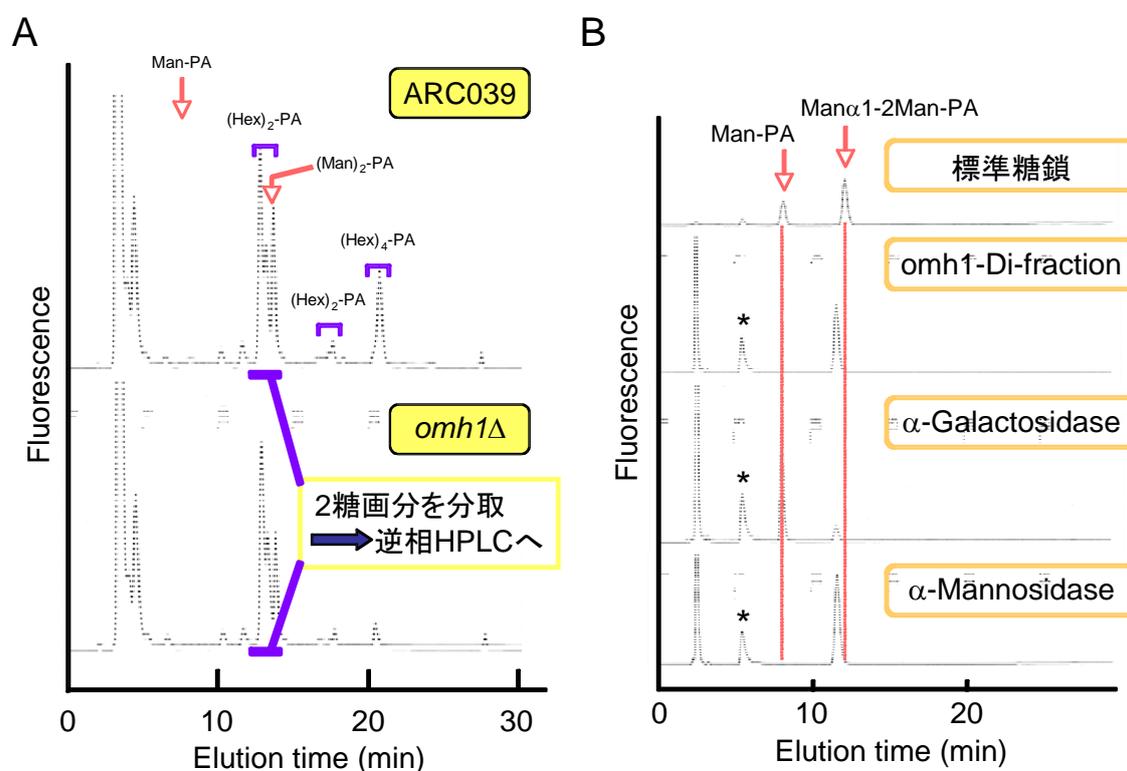


図 2.1.3.5-5 *omh1* 破壊株で発現させた出芽酵母キチナーゼの *O*-結合型糖鎖の解析

A. 野生株および *omh1* 破壊株で発現・精製した出芽酵母キチナーゼより PA 化糖鎖を調製し、サイズ分画 HPLC 分析を行った。B. サイズ分画 HPLC で分取した 2 糖画分の  $\alpha$ -ガラクトシダーゼおよび  $\alpha$ -マンノシダーゼ消化物の逆相 HPLC 分析を行った。図中の矢印は標準糖鎖 Man-PA および Man $\alpha$ 1,2-Man-PA の溶出位置を、星印は夾雑物のピークを示す。

### (3) 分裂酵母 $\alpha$ -ガラクトース転移酵素完全欠損株の作製

#### 分裂酵母ガラクトース転移酵素の機能解析と 7 重破壊株の作製

ヒト型複合型糖鎖 (Gal<sub>2</sub>GlcNAc<sub>2</sub>Man<sub>3</sub>GlcNAc<sub>2</sub>) を分裂酵母で生産させる場合、ガラクトマンナンを欠損させた *och1* 破壊株から  $\alpha$ -マンノースおよび  $\alpha$ -ガラクトースの刈り込みによる M3 糖鎖 (Man<sub>3</sub>GlcNAc<sub>2</sub>) の生産、 $\beta$ -GlcNAc 付加、 $\beta$ -ガラクトースの付加のステップが必要である。前項で述べたように  $\alpha$ -ガラクトースの刈り込みはゴルジ局在 UDP-ガラクトース輸送体をコードしている *gmsI* 遺伝子を破壊することにより、達成できた。しかし、UDP-ガラクトースは酵母内在性  $\alpha$ -ガラクトース転移酵素だけでなく、 $\beta$ -ガラクトース付加に必要な  $\beta$ -ガラクトース転移酵素の基質でもあり、 $\beta$ -ガラクトース付加には *gmsI* 遺伝子を分裂酵母内に残す必要がある。そこで、分裂酵母に存在する全ての  $\alpha$ -ガラクトース転移酵素の探索とその多重破壊を試みた。本研究開発開始前までに分裂酵母には 4 つの  $\alpha$ -ガラクトース転移酵素 (*gma12*、*gmh1-3*) の存在が報告されている。分裂酵母のゲノムデータベースを検索したところ、さらに 3 つの推定  $\alpha$ -ガラクトース転移酵素が見出さ

れ、*gmh4-6<sup>+</sup>*と名付けた。分裂酵母 $\alpha$ -ガラクトース転移酵素の各単独破壊株を作製し、その機能解析を試みた。

各単独破壊株の生育および細胞形態は野生株との変化は見出されなかった。分裂酵母の代表的な糖タンパク質である酸性ホスファターゼを *N*-結合型糖鎖付加のレポータータンパク質として、ネイティブ PAGE を行い、活性染色を行ったところ、*gma12 $\Delta$* 、*gmh2 $\Delta$* 、*gmh3 $\Delta$* および *gmh6 $\Delta$* において $\alpha$ -ガラクトース付加欠損に由来すると考えられる分子量低下が観察された(図 2.1.3.5-6A)。より定量的に $\alpha$ -ガラクトース付加欠損の程度を観察するために、各単独破壊株より細胞表面糖タンパク質を調製し、 $^1\text{H}$  NMR 解析を行った。各アノマープロトン ( $^6\text{-Man}^{-6}$ 、 $^{2,6}\text{-Man}^{-6}$  および  $\text{Gal}^{-2}$ ) の比ピーク面積を  $^6\text{-Man}^{-6}$  のピーク面積を 1 とした相対値で示したところ、 $\text{Gal}^{-2}$  の量は *gma12 $\Delta$* 、*gmh2 $\Delta$* 、*gmh3 $\Delta$*  および *gmh6 $\Delta$* において野生株と比べて 60、59、79 および 75% 減少していることが明らかとなった(図 2.1.3.5-6B)。

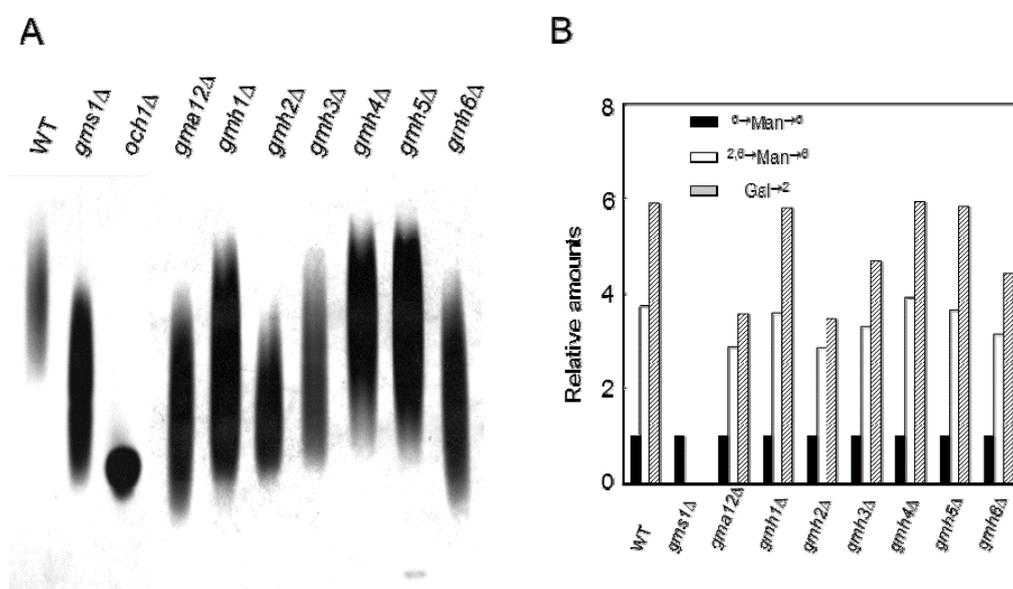


図 2.1.3.5-6 分裂酵母 $\alpha$ -ガラクトース転移酵素単独破壊株の *N*-結合型糖鎖解析

A、各単独破壊株を YES で対数増殖中期 ( $\text{OD}_{600}=4-5$ ) まで培養後、低リン酸 MM 培地で 6 時間培養し、酸性ホスファターゼを誘導した。誘導後、菌体を回収、破碎し、ペリプラズム画分に分泌された酸性ホスファターゼを抽出した。抽出したサンプルをネイティブ PAGE で分画後活性染色を行い、*N*-結合型糖鎖に対するガラクトース付加の程度を観察した。*gms1 $\Delta$* はガラクトース欠損株、*och1 $\Delta$* はガラクトマンナン欠損株のコントロールとして用いた。B、糖タンパク質を各単独破壊株から調製し、 $^1\text{H}$  NMR 解析を行った。各アノマープロトン ( $^6\text{-Man}^{-6}$ 、 $^{2,6}\text{-Man}^{-6}$  および  $\text{Gal}^{-2}$ ) の比ピーク面積を  $^6\text{-Man}^{-6}$  のピーク面積を 1 とした相対値で示した。

次に各単独破壊株より *O*-結合型 PA 化糖鎖を調製し、サイズ分画 HPLC で分析を行ったところ、*gma12 $\Delta$* 、*gmh2 $\Delta$*  および *gmh6 $\Delta$* において野生株とは異なる HPLC プロファイルが得られた(図

2.1.3.5-7)。以上の結果より、Gma12p、Gmh2p および Gmh6p は *N*-および *O*-結合型糖鎖の両方に、Gmh3p は *N*-結合型糖鎖の $\alpha$ -ガラクトース付加に関与することが明らかとなった。

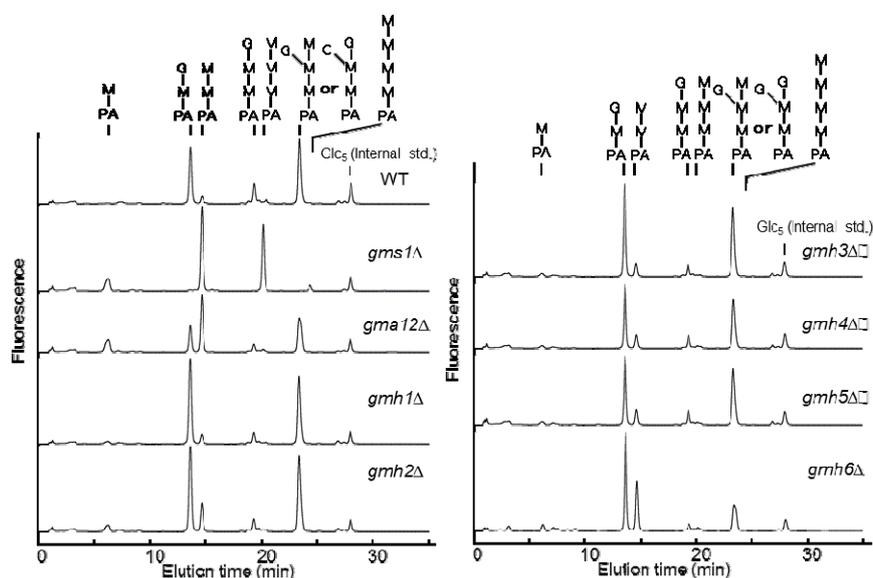


図 2.1.3.5-7 分裂酵母 $\alpha$ -ガラクトース転移酵素単独破壊株の *O*-結合型糖鎖

各単独破壊株より *O*-結合型 PA 化糖鎖を調製し、サイズ分画 HPLC 分析を行った。図上の黒線は野生株および *gms1Δ* で同定された構造既知糖鎖の溶出位置とその構造の模式図を示す (M: マンノース、G: ガラクトース、模式図中の縦線は $\alpha$ 1,2-結合を、斜め線は $\alpha$ 1,3-結合を示す)。

$\alpha$ -ガラクトース転移酵素単独破壊株の糖鎖構造解析の結果より、単独破壊株では $\alpha$ -ガラクトース付加を完全に欠損させることは出来ないことが明らかとなった。そこで、 $\alpha$ -ガラクトース転移酵素破壊による $\alpha$ -ガラクトース完全欠損を期待して 7 つの $\alpha$ -ガラクトース転移酵素を破壊した 7 重破壊株 (7Gal $\Delta$ ) を作製した。7Gal $\Delta$ 株の高温 (37°C) 感受性およびハイグロマイシン B (糖鎖合成欠損株で感受性を示すことが知られている) 感受性を調べたところ、7Gal $\Delta$ 株は *gms1Δ*株と同様に高温、ハイグロマイシン B 感受性を示し、 $\alpha$ -ガラクトース付加完全欠損が期待された (図 2.1.3.5-8A)。さらに 7Gal $\Delta$ 株糖タンパク質のガラクトース含量を測定するために、単糖組成解析を行ったところ、*gms1Δ*では単糖ガラクトースが検出されないのに対して、7Gal $\Delta$ 株では全糖含量の内 3%程度のガラクトースを含有していることが明らかとなった (図 2.1.3.5-8B)。

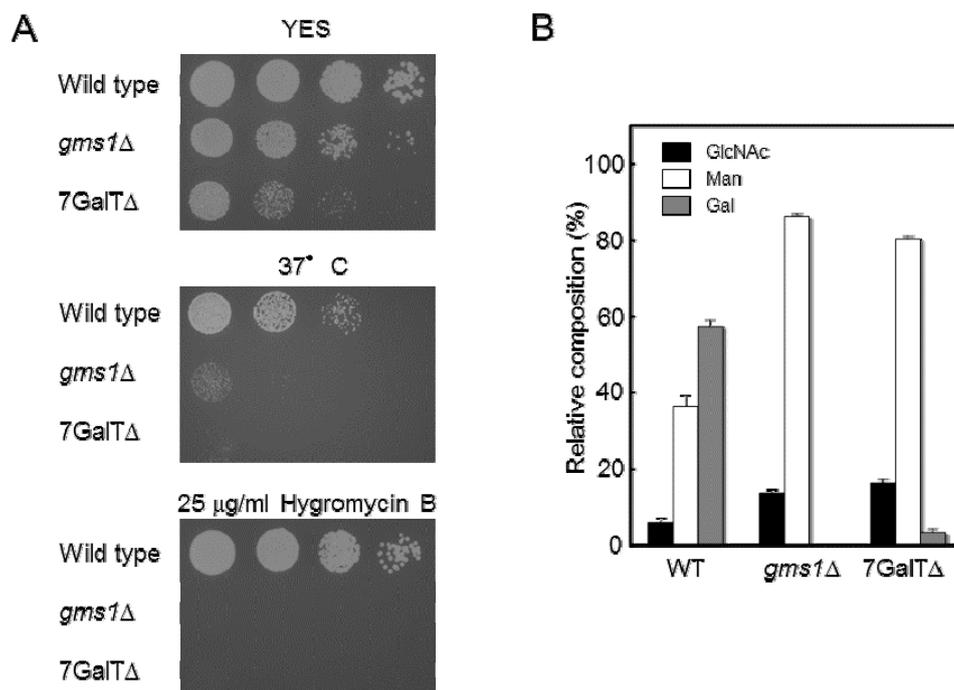


図 2.1.3.5-8 7GalTΔ株の表現系解析と糖組成解析

A、野生株、*gms1Δ*株および7GalTΔ株をYES培地（30°Cまたは37°C）およびハイグロマイシンBを含むYES培地（30°C）で3日間培養した。B、野生株、*gms1Δ*株および7GalTΔ株よりガラクトマンナン糖タンパク質を抽出し、酸加水分解を行った。得られた単糖をPA化し、HPLCにより定量した。

7GalTΔ株においてどのような $\alpha$ -ガラクトース含有糖鎖が存在するか調べるために、7GalTΔ株よりO-結合型糖鎖を調製し、サイズ分画HPLC分析を行った。サイズ分画HPLCでは*gms1Δ*株に比べて7GalTΔ株では4糖画分の溶出位置に違いが見られた(図2.1.3.5-9A)。7GalTΔ株の4糖画分はサイズ分画HPLC上では野生株のGal残基を含有する4糖ピークと一致していたことから、野生株(a)および7GalTΔ株の4糖ピーク(b)を分取し、逆相HPLC分析を行った(図2.1.3.5-9B)。ピークaからは2種類のピーク(ピークa-1およびa-2)、ピークbからは単一ピーク(ピークb-1)が検出された。



つの遺伝子があり、それぞれ *otg1 - 3* ( $\alpha$ 1 (one),3 (three)-galactosyltransferase)と名付け、この遺伝子解析を行うことにした。これらの遺伝子を 7GalT $\Delta$ 株より破壊し、10重破壊株を作製した(10GalT $\Delta$ )。10GalT $\Delta$ 株糖タンパク質のガラクトース付加を調べるために、ガラクトース認識レクチンである PNA レクチンブロットを行った(図 2.1.3.5-11)。7GalT $\Delta$ 株ではわずかに染色されるのに対して、10GalT $\Delta$ 株では *gms1* $\Delta$ 株と同様に、全く染色が見られなかった。

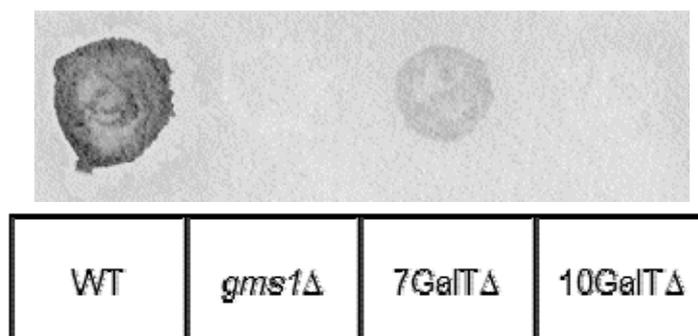


図 2.1.3.5-11 10GalT $\Delta$ 株の PNA レクチンブロット

野生株、*gms1* $\Delta$ 株、7GalT $\Delta$ 株および 10GalT $\Delta$ よりガラクトマンナン糖タンパク質を抽出し、ガラクトース認識レクチンである PNA のレクチンブロットを行った。

また 10GalT $\Delta$ 株より O-結合型糖鎖を調製し、サイズ分画 HPLC 分析を行ったところ、*gms1* $\Delta$ 株と同様の HPLC プロファイルが得られた(図 2.1.3.5-12)。また *otg1 - 3*株では $\alpha$ 1,2-ガラクトース含有糖鎖は検出されるものの、 $\alpha$ 1,3-ガラクトース含有 4 糖ピークは検出されなかった。以上の結果より、10GalT $\Delta$ 株の糖鎖には全く $\alpha$ -ガラクトースが付加しておらず、また *otg1 - 3*は $\alpha$ 1,3-ガラクトース転移酵素をコードしていることが強く示唆された。今回得られた 10GalT $\Delta$ 株は $\alpha$ -ガラクトース付加完全欠損株であるが、*gms1*が機能しているためゴルジ体にはヒト型複合型糖鎖生産に必要な $\beta$ -ガラクトース転移酵素の基質となる UDP-ガラクトースが取り込まれる。つまり、10GalT $\Delta$ 株はヒト型複合型糖鎖生産の基盤となる非常に有用な株であると言える。

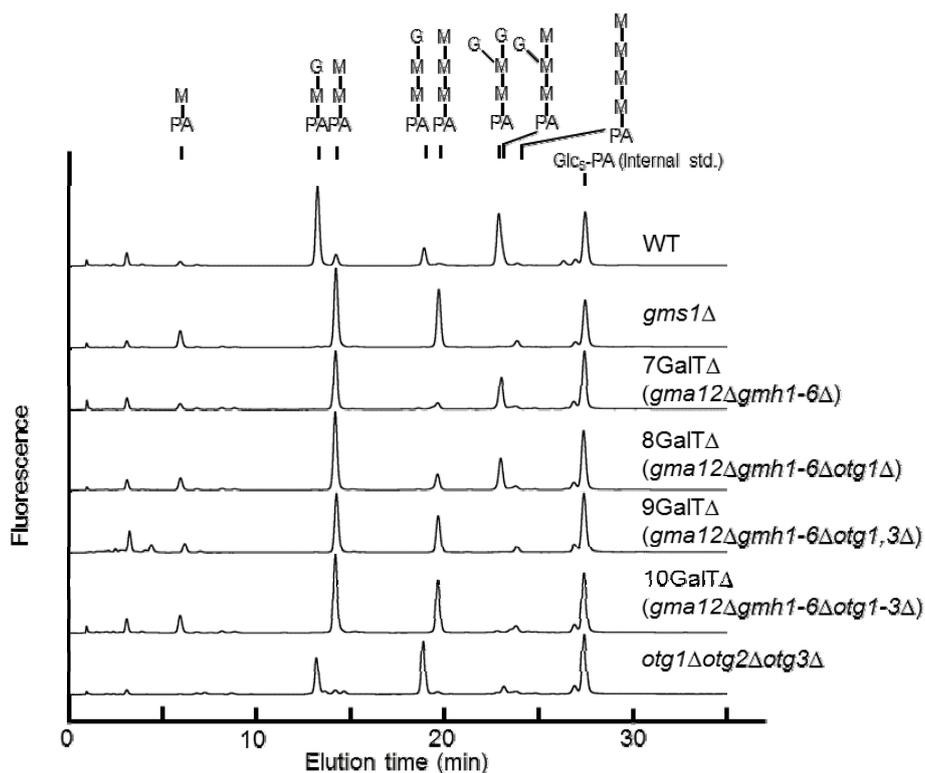


図 2. 1. 3. 5-12 10GalT $\Delta$ 株 O-結合型糖鎖のサイズ分画 HPLC 解析

野生株、*gms1* $\Delta$ 株、7GalT $\Delta$ 株、8GalT $\Delta$ 株、9GalT $\Delta$ 株、10GalT $\Delta$ 株および *otg1-3*より O-結合型 PA 化糖鎖を調製し、サイズ分画 HPLC 分析を行った。図上の黒線は野生株および *gms1* $\Delta$ で同定された構造既知糖鎖の溶出位置とその構造を示す (M: マンノース、G: ガラクトース、模式図中の縦線は $\alpha$ 1,2-結合を、斜め線は $\alpha$ 1,3-結合を示す)。

#### 結語

我々は分裂酵母の N-及び O-結合型糖鎖の構造解析及び糖鎖の生合成に関与する遺伝子の解析を行った。その結果、N-結合型糖鎖に関してはガラクトース転移酵素の機能と遺伝子破壊株を取得し、初めて分裂酵母の  $\alpha$ -1,3 転移酵素遺伝子を同定することができた。さらにヒト型糖鎖のコア構造を持った糖鎖を分裂酵母で生産することも可能になった。最終的にはヒト由来の糖転移酵素を発見して、よりヒト型糖鎖に近い構造を持った分裂酵母宿主の創製を行いたいと考えている。O-結合型糖鎖に関しては細胞表層糖タンパク質も、また実際に異種糖タンパク質を生産させた場合にも、均一な二糖構造から成ることを今回明らかにすることが出来た。

本研究で述べたように分裂酵母には多数の糖鎖へのガラクトース付加に関連する転移酵素が存在する。今回、これまで全く報告のない新たな  $\alpha$ -1,3 ガラクトース転移酵素を同定することに成功し、さらにゲノム上に存在するすべての分裂酵母糖転移酵素ホモログの機能を明らかにすることができた。一般に高等動物における糖鎖のガラクトース残基は  $\beta$  結合の場合が多く、本研究で創製した全ガラクトース転移酵素 10 重破壊株は今後、 $\beta$  結合のガラクトースを含む糖鎖の生合

成には極めて有用な宿主であると考えている。分裂酵母には他の生物とは異なり、酸性糖鎖はすべてガラクトースにピルビン酸が付加されていることが Trimble らの研究で明らかにされている。我々は分裂酵母の糖鎖へのピルビン酸の付加に重要な転移酵素である Pvg1 を大腸菌で生産して、その酵素学的性質の解析も行っている。もし高等動物の糖鎖で見られる酸性糖であるシアル酸と分裂酵母のピルビン酸が類似した機能を有する場合には、シアル酸合成系を分裂酵母に導入することを省けるのでより実用化に近くなるのではないかと考えている。よってピルビン酸含有糖鎖の機能についても更なる研究を進めて行く予定である。

本研究で作製した株を用いれば、ヘテロな糖鎖による影響を考えずにすむために、非常に有用な宿主細胞が創製されたと考えている。今後も引き続き生産させたいタンパク質の種類によって宿主・ベクター系や培養条件などを選択可能な汎用性の高いシステムの構築を目指していきたい。これまで得られた研究成果を生かしてヒト適応型糖鎖を生産する新たな分裂酵母宿主を創製することで、さらに本格的な産業応用に利用可能な分裂酵母宿主の創製を進めていきたい。

#### 年度毎の特許、論文、外部発表等の件数

区分 年度	特許出願			論文		その他外部発表（プレス発表等）
	国内	外国	PCT <sup>※</sup> 出願	査読付き	その他	
H18FY	0件	0件	0件	7件	0件	2件
H19FY	0件	0件	0件	6件	3件	6件
H20FY	1件	0件	0件	8件	1件	3件
H21FY	4件	0件	2件	9件	0件	11件
H22FY	1件	0件	1件	6件	0件	7件

(※ Patent Cooperation Treaty : 特許協力条約)

## 2. 1. 4 発現タンパク質解析による微生物機能利用のための技術基盤の研究開発

(独立行政法人製品評価技術基盤機構)

### 2. 1. 4. 1 MGF-01 株及び *E. coli* K-12 W3110 株の培養条件の検討

バイオプロセスに適用できる培地によりMGF-01及び*E. coli* K-12 W3110株を培養し、プロテオーム解析を行うための菌体を採集した。

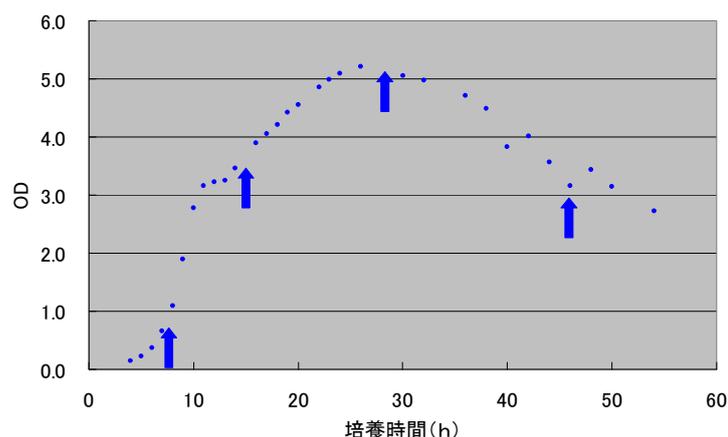
#### (1) 培地

培地は、コスト、生産物質の精製及び発酵タンク内に栄養源の投入が簡便である単純培地とした。

#### (2) 培養結果

培地と菌体を培養フラスコに入れ、回転培養を実施した。MGF-01株の培養結果を図1に示す。MGF-01株は、*E. coli* K-12 W3110株とは違う増殖パターンを示し、遺伝子多重削除の効果により、増殖を継続できるようになったものと考えられる。

MGF-01株の特殊な増殖状態をプロテオームから解明するため、対数増殖期中期として8時間、対数増殖期後期として16時間、MGF-01株の特長である再増殖期後期として30時間、定常期後期として48時間の菌体を採取した。



図－1 MGF-01株増殖曲線

### 2. 1. 4. 2 ショットガン法による網羅的プロテオーム解析

培養により得られた菌体からタンパク質を抽出し、一次元電気泳動法(SDS-PAGE)を用いタンパク質を分離した。分離されたタンパク質を酵素消化し、高速液体クロマトグラフィー・エレクトロスプレーイオン化タンデム質量分析法(LC-ESI-MS/MS)でペプチド断片を検出した。

ショットガン法の結果、MGF-01株からは、1,382種のタンパク質を同定した。同定タンパク質の内、363種が機能未知タンパク質であった。MGF-01株の残存遺伝子の中で363種の機能未知遺伝子の発現が確認された。よって、この363種のタンパク質が機能解析対象遺伝子の候補となる。

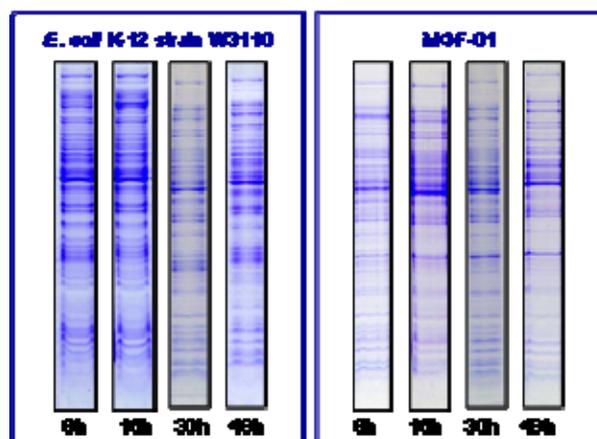


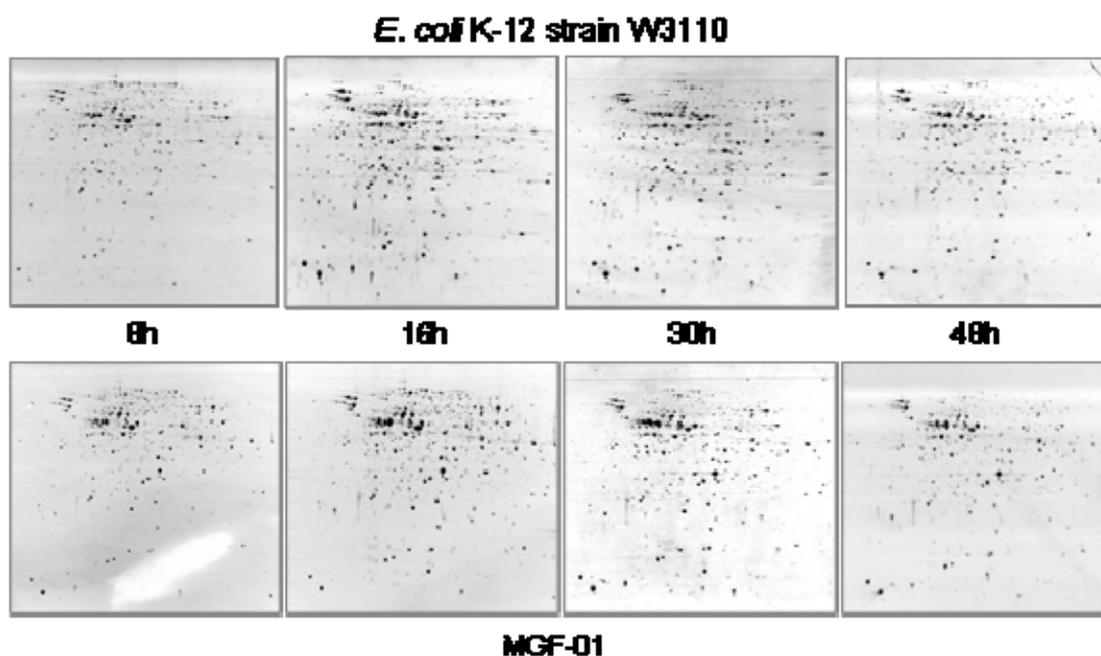
図-2 ショットガン法用SDS-PAGE

#### 2. 1. 4. 3 ペプチドマスマーフィンガープリント法によるプロテオーム解析

菌体からタンパク質を抽出し、二次元電気泳動法 (2D-PAGE) を用いタンパク質を分離した。分離されたタンパク質を酵素消化し、マトリックス支援イオン化飛行時間型質量分析法 (MALDI-TOF-MS) でペプチド断片を検出した。

##### (1) 二次元電気泳動

MGF-01株の増殖状態の変化をプロテオームから解明するため、8、16、30及び48時間培養した菌体について、二次元電気泳動を行った。*E. coli* K-12 W3110株についても同様に二次元電気泳動を行った。



(上段 *E. coli* K-12 W3110株、下段 MGF-01株。8h,16h,30h,48hはそれぞれ培養時間。)

図－3 二次元電気泳動像

#### (2) ペプチドマスーフインガープリント法によるプロテオーム解析結果

大腸菌 K-12 W3110株の8、16、30及び48時間培養した菌体について、二次元電気泳動を行い、ペプチドマスーフインガープリント法により、発現タンパク質の同定を行った。*E. coli* K-12 W3110株の総遺伝子数4,227の内、473種を同定した。

得られた二次元電気泳動結果から、それぞれに変動するタンパク質を検出した。これらの変動タンパク質の同定を行うことにより、MGF-01株の増殖機構の解明、高性能化及び発酵工程における菌体状態の把握が可能になることが予想される。

#### 2. 1. 4. 4 エドマン分解法による機能未知遺伝子翻訳開始位置の決定

ペプチドマスーフインガープリント法により、機能未知遺伝子から発現していると確認されたタンパク質について、エドマン分解法にてN-末端解析を行った。

二次元電気泳動法にて発現が確認された85種114個のタンパク質についてN-末端解析を行ったところ、DDBJ登録遺伝子の開始位置と一致したものが69種、開始位置が異なるものが4種、タンパク質としての機能を発揮するため、分解、プロセッシングを受けてN-末端が変化していたものが12種、解析不能が5種であった。

#### 2. 1. 4. 5 データ解析及び提供

##### (1) MGF 株及び *E. coli* K-12 W3110 株の発現タンパク質の検出結果

MGF-01 株及び *E. coli* K-12 W3110 株網羅的プロテオーム解析を行った。この結果、大腸菌 K-12 W3110 株の総遺伝子数 4,227 の 38.8%である 1,641 の発現タンパク質を検出した。MGF-01 株のプロテオーム解析の結果、1,385 個の発現タンパク質を検出した。解析の結果、MGF-01 株に残存している機能未知遺伝子から、368 の発現タンパク質が発現しているのを確認し、機能解析対象遺伝子の候補とした。発現が確認されていない機能未知遺伝子は、削除対象遺伝子の候補となる。

##### (2) MGF-01 株と *E. coli* K-12 W3110 株の発現タンパク質の変動の比較解析結果

*E. coli* K-12 W3110 株と MGF-01 株の間で発現量に変動しているタンパク質の解析結果から、変動タンパク質を選択し機能分類し、93 種類の既存のパスウェイについて解析を行った。

その結果、MGF 株は糖代謝、TCA サイクル、ペントースリン酸回路などにおいて反応の中心となる酵素や回路を構成する多くの酵素について W3110 株より発現量が高まっていた。

##### (3) MGF 株の高性能増殖について

*E. coli* K-12 W3110 株では対数増殖期が終了するタイミングにおいても、MGF-01 株は定常期に移らず、更に増殖を続けることが確認された。これは遺伝子削除の効果により、増殖を継続できるようになったと考えられる。

## (4) データ提供

*E. coli* K-12 W3110 株の新規 ORFs 情報及びアノテーション修正情報、MGF-01 に発現している機能未知遺伝子リスト、MGF-01 に発現している機能未知遺伝子の N-末端解析情報、MGF-01 に発現している遺伝子の中で変動する遺伝子のリスト及び 93 種類のパスウェイマップ、MGF-01 に発現している遺伝子の変異情報プロテオーム解析データを協和発酵キリンに提供した。

## 年度毎の特許、論文、外部発表等の件数

区分 年度	特許出願			論文		その他外部発表（プレス発表等）
	国内	外国	PCT※出願	査読付き	その他	
H18FY	0件	0件	0件	0件	0件	0件
H19FY	1件	0件	0件	0件	0件	2件
H20FY	0件	0件	0件	0件	0件	2件
H21FY	0件	0件	0件	0件	0件	0件
H22FY	0件	0件	0件	0件	0件	0件

(※ Patent Cooperation Treaty : 特許協力条約)