

## 高変異性好熱菌を用いた耐熱化変異酵素のハイスループット創出

鳥取大学大学院工学研究科 鈴木 宏和

### 【略歴】

1999年 3月 東北大学 工学部 生物化学工学科 卒業  
2001年 3月 東北大学大学院 工学研究科 生物工学専攻 博士前期課程 修了  
2004年 3月 東北大学大学院 工学研究科 生物工学専攻 博士後期課程 修了, 博士 (工学)  
2004年 4月 東京大学大学院 農学生命科学研究科 博士研究員  
2007年 4月 理化学研究所 基礎科学特別研究員  
2009年 10月 神戸大学 自然科学系先端融合研究環 特命助教  
2011年 4月 九州大学大学院 農学研究院 客員准教授  
2014年 4月 鳥取大学大学院 工学研究科 准教授

### はじめに

酵素は、反応特異性や立体選択性をもつ優れた触媒であるが、常温菌由来の酵素は概して不安定であるため、産業実用には至りにくい。一方、高度（超）好熱菌由来の耐熱性酵素は非常に安定であるが、これらは反応至適温度が高温領域にあるものが多く、酵素を常温で利用したい分野（バイオセンサー、臨床検査、医療診断、化成品合成、および環境浄化プロセスなど）では、やはり使いにくい。これを背景に求められるのが、「常温高活性の不安定酵素から常温高活性の耐熱化変異（安定）酵素を創る」技術である。

### 高変異性好熱菌を利用した耐熱化変異酵素の創出

*Geobacillus* 属細菌は、増殖能や代謝能に優れた中等度好熱菌群で、様々な応用研究の対象となっている。*Geobacillus kaustophilus* HTA426 株はマリアナ海溝深海底泥から単離された *Geobacillus* 属細菌で、同属としては最初に全ゲノム配列が解読された。本菌は生育温度範囲が広く、増殖特性に優れ、また遺伝子操作技術も確立されている<sup>1-4</sup>。さらに大腸菌や枯草菌よりも自発的変異（自然発生的な DNA 変異）能が高いことから、本研究では HTA426 細胞内の自発的変異を利用した耐熱化指向性の酵素遺伝子変異法を検討してきた（図）。この手法では、まず対象遺伝子を HTA426 株に導入し、細胞内の自発的変異を利用しながら変異遺伝子を発生させる。そして、それと同時に対象遺伝子発現産物（酵素）の活性に依存した生育選択圧をかけることで、高温培養下でも活性を示す（すなわち耐熱化された）酵素を選別する。変異導入効率を向上させるために、DNA 修復系遺伝子を破壊した HTA426 派生株（MK480）も構築した。MK480 株中では、親株よりも  $10^3$  倍ほど高い頻度で自発的変異が起り、あらゆる塩基置換も起りうる。さらに培養と変異原処理を併用することで、変異導入効率をより向上させることも可能だ<sup>7</sup>。また HTA426 株の幅広い生育温度は、常温から高温にかけての段階的な耐熱化選択圧を可能としており、この点も HTA426 株を使う大きなメリットである。

### 本手法により得られた耐熱化変異酵素

本手法の有効性は、いくつかのモデル実験により示されている<sup>5-8</sup>。枯草菌由来のオロチジン 5'-リン酸脱炭酸酵素の耐熱化では、半数変性温度が  $10^{\circ}\text{C}$  ほど向上した変異体が得られた<sup>5</sup>。概して 1ヶ所の変異導入により  $5^{\circ}\text{C}$  程度の耐熱化が達成された変異体が得られており<sup>6,8</sup>、本手法は耐熱性を中程度向上させる低頻度変異の探索に有効といえる。また興味深いことにクロラムフェニコール アセチル基転移酵素の耐熱化では、プラスミド複製領域に変異が入ることで高温下クロラムフェニコール耐性を付与する意外なプラスミドも得られた<sup>7</sup>。本結果は、この手法が耐熱化変異酵素の創出だけではなく、予想外の変異

を通じた機能的プラスミドの創出にも利用できることを示唆している。

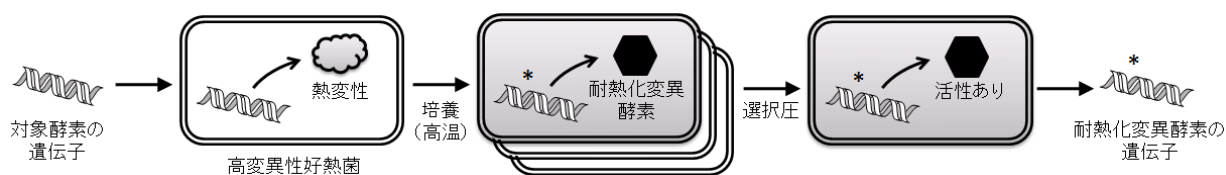


図 高変異性好熱菌を利用した耐熱化変異酵素の創出

*G. kaustophilus* HTA426 から構築した高変異性好熱菌に対象遺伝子を導入し、自発的変異を利用しながら変異遺伝子を発生させる。培養温度が高温であるため、耐熱化していない対象酵素は熱変性するが、発生した耐熱化変異酵素は活性を維持する。したがって、耐熱化変異酵素を産生するクローンは、対象酵素の活性に基づいた生育選択圧により選別できる。

## 今後の展望

本手法は、耐熱化変異酵素のスクリーニングが酵素活性に依存するため、現状としては汎用性に欠ける。よって「耐熱化変異酵素を簡便かつ汎用的にスクリーニングする手法」の確立は、本手法の発展において極めて重要な課題である。この課題は、試験管内ランダム変異を用いた古典的手法においても同様である。これまでに幾つかの耐熱化変異酵素スクリーニング法が報告されてきたが<sup>9,10</sup>、いずれの手法も簡便性もしくは汎用性において不十分で、今のところ普及はしていない。そこで本研究では、細胞内で発生した耐熱化酵素を蛍光レポーターによって検出する新手法の開発に取り組んでいる。このようなスクリーニング法を用いれば、高変異性好熱菌を用いた変異導入（ライブラリー化）からスクリーニングまでの全工程を自動化できるかもしれない。その確立によって、有用酵素の耐熱化（安定化）ひいては有用酵素の産業利用が世界的かつ飛躍的に促進されることを、私は夢見ている。

## 謝辞

当該プロジェクトに参画していただいた大城隆 教授（鳥取大学）、小林淳平 博士（現：神戸大学）、古川恵 技術補佐員、および学生の皆様、ならびに好熱菌遺伝子操作の技術開発にあたり多大な協力を賜りました吉田健一 教授（神戸大学）および大島敏久 教授（現：大阪工業大学）に、心より感謝申し上げます。

## 参考文献

1. Suzuki, H., Yoshida, K. *J. Microbiol. Biotechnol.* **22**, 1279–1287 (2012)
2. Suzuki, H., Murakami, A., Yoshida, K. *Appl. Environ. Microbiol.* **78**, 7376–7383 (2012)
3. Suzuki, H., Yoshida, K., Ohshima, T. *Appl. Environ. Microbiol.* **79**, 5151–5158 (2013)
4. Suzuki, H., Wada, K., Furukawa, M., Doi, K., Ohshima, T. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **77**, 2316–2318 (2013)
5. Suzuki, H., Kobayashi, J., Wada, K., Furukawa, M., Doi, K. *Appl. Environ. Microbiol.* **81**, 149–158 (2015)
6. Kobayashi, J., Furukawa, M., Ohshiro, T., Suzuki, H. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **99**, 5563–5572 (2015)
7. Kobayashi, J., Tanabiki, M., Doi, S., Kondo, A., Ohshiro, T., Suzuki, H. *Appl. Environ. Microbiol.* **81**, 7625–7632 (2015)
8. Wada, K., Kobayashi, J., Furukawa, M., Doi, K., Ohshiro, T., Suzuki, H. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **80**, 368–375 (2016)
9. Chautard, H., Blas-Galindo, E., Menguy, T., Grand'Moursel, L., Cava, F., Berenguer, J., Delcourt, M. *Nat. Methods* **4**, 919–921 (2007)
10. Asial, I., Cheng, Y. X., Engman, H., Dollhopf, M., Wu, B., Nordlund, P., Cornvik, T. *Nat. Commun.* **4**, 2901 (2013)