

次世代シーケンサーによる歴代工業用変異育種株の解析と応用

天野エンザイム株式会社 研究開発統括部 フロンティア研究部
松原寛敬



【略歴】

2002 年 筑波大学大学院バイオシステム研究科 修士課程修了
同年 天野エンザイム株式会社 入社
2021 年 東京大学大学院農学生命科学研究科応用生命工学専攻 博士課程修了 博士（農学）
修了・学位取得
現職 天野エンザイム株式会社 イノベーション本部 フロンティア研究部 専門研究員

1. はじめに

工業用酵素生産では、経済的合理性の面から酵素を大量生産できる菌株の創出が必要となる。また、大量高密度培養に耐えうる性質（例えば凝集しない、スケールアップ培養でも酵素高生産性を保つ、発泡が少ないなど）、すなわち工業生産上必要な性質（本発表ではこれを工業性と略す）を併せ持った菌株として作成することも重要である。

高い酵素生産性と工業性を併せ持つ酵素生産菌の創出には、ランダム変異とスクリーニングを組み合わせた手法（以下、変異育種と略）と、遺伝子組換え技術の応用が考えられる。

変異育種による生産菌改良は堅牢な菌株改良法の1つであり、高い酵素生産性だけでなく工業性を併せ持つ菌株の創出において、現代においても重要な技術といえる。一方で、菌株の改変をランダム変異に頼るため、多大な労力と時間を要することが課題である。遺伝子組換えによる生産菌改良では、理論的改変が可能となるが、遺伝子配列と表現型の関係が解明されている場合、有効である一方で、そうでない場合には適用しにくい技術である。

遺伝子組換えによる酵素生産では、モデル生物（原核生物では大腸菌や枯草菌、真核生物では麹菌や酵母など）で報告が相次いでいる。しかし変異育種により高い酵素生産性と工業性を併せ持った、育種株をホストとする遺伝子組換え酵素生産については一部の報告にとどまっている。

もし長年の変異育種によって作成した酵素生産菌株を遺伝子組換えのホスト株として利用し、異種酵素の大量生産に用いることができれば、変異育種にかかる時間のみならず、製造工程開発の期間を劇的に短縮できる可能性がある。

本報告では当社で長年にわたり育種を繰り返してきた α -アミラーゼ生産株である、*Bacillus amyloliquefaciens* 株のホスト株化と、本生産菌の酵素高生産にかかわる有用変異点の解析・同定と、その知見の応用について報告する。

2. 育種菌株の形質転換系の効率向上

Bacillus amyloliquefaciens は 1947 年に繊維工業用海苔抜き剤の国産化のために発見、単利された α -アミラーゼ生産菌株である¹⁾。*B. amyloliquefaciens* は、一般的に形質転換困難な株として知られていた²⁾が、当社では変異育種による形質転換能の付与が試みられ、形質転換可能株が作成されていた。本件等ではさらなる形質転換法の改良を行い、1 バッチ当たり 10,000 株程度を取得可能な実用的な形質転換法を確立した。改良形質転換法を用いて、異種酵素遺伝子の発現と分泌生産においても高い酵素生産性と工業性を維持していることを確認した。

3. 歴代変異育種株のゲノム解析と有用変異点の絞り込み

本株は長年の変異育種によって歴代の生産菌株が作成されてきた。ここから 8 株のゲノム解析を行い、酵素生産性向上に関与する変異点の同定を試みた。変異の中でも特に表現型に大きな影響を与える変異である、ナンセンス変異やフレームシフト変異に着目し、候補遺伝子の絞り込みを行った。これらの変異の効果は、変異の入った遺伝子を破壊することで確認できると考え、順次単独破壊・酵素生産性の評価を行った。その結果、No. 30 と名付けた遺伝子の破壊が顕著な酵素生産性向上効果を示すことを見出した。また、その効果は No. 30 遺伝子の相補で消失したため、この遺伝子の破壊が酵素生産性を向上させていることを確認した。No. 30 遺伝子破壊による酵素生産性向上効果は α -アミラーゼの生産性だけでなく、異種酵素の組換え生産時にも発揮されることを確認した。

4. まとめ

歴代変異育種株のゲノム解析により、酵素生産性に関与すると思われる変異点の絞り込みを行い、候補遺伝子の一部について遺伝子破壊による効果確認を行った。その結果、1 つの遺伝子破壊で酵素生産性が大きく向上する遺伝子、No. 30 遺伝子を見出した。また遺伝子相補によってその酵素生産性向上効果が消失することを確認した。この遺伝子の破壊株では、 α -アミラーゼの生産性だけでなく、異種酵素発現においても酵素生産性が向上することが確認できた。

本手法は弊社が多数所有する、ほかの歴代変異育種株にも応用可能であることが考えられる。今後、ゲノム解析と有用変異点の同定および応用をほかの菌株にも適用して、効率的な酵素生産性向上を目指していきたい。また、作出した遺伝子操作可能な工業用酵素生産株による物質生産について今後も応用を続けていきたい。

5. 参考文献

- 1 日本酵素協会, 日本酵素産業小史
- 2 Guoqiang Zhang , Wenzhao Wang, Aihua Deng, Zhaopeng Sun, Yun Zhang, Yong Liang, Yongsheng Che, Tingyi Wen. PLoS Genet. 2012 Sep;8(9):e1002987.