

3. 成果活用に関する報告

(1) 特許

Ⅲで概述したように本事業に於いて新たに39件の特許を出願しその一部については既に国内特許権を取得した(表Ⅳ.3.1及び表Ⅳ.3.1.2)。事業化に関連する重要特許の一部は本事業開始時に出願済みのものがあるが、それらについては(株)カイオム・バイオサイエンス等の事業者への譲渡あるいは占有の形で委譲され、さらにその特許の補強が図られている。事業との関連性については重要特許を表Ⅳ.3.3に併記し様式7に詳述した。

1) フェーズⅠにおける成果のまとめ

i) 研究成果の知財化

表Ⅳ.3.1に、中間評価までに特許出願を完了、または申請中の合計20件を一覧表で表示した。なお、参考までに、本事業開始前にすでに特許出願を終えており、本事業において研究開発のベースとなっている特許についても併せて表示した。

ii) 技術移転諸事業への橋渡し

理化学研究所を中心に開発された成果番号*4の「体細胞相同組換えの促進方法及び特異的抗体の作製方法」は、短時間でモノクローナル抗体を作製する革新的な技術である(後にADLib法と命名)。本成果については、ベンチャー起業支援を進め、平成16年度末に理研ベンチャーとして(株)カイオム・バイオサイエンスが設立され、フェーズⅡから実質的に事業を開始することができた。

埼玉大学の成果番号⑫の「相同組換えを行わせる方法」は、非相同組換えに関わるKU遺伝子を破壊することにより相同組換え部分の遺伝子組換えを促進するユニークな技術である。これは、微生物から植物さらには動物にまで幅広い応用が見込めるが、特許の早期審査を進め国内発酵企業等への技術移転の可能性を探ることとした。

iii) 上記以外の実用化(製品化)へ向けた取り組み

タイテック(株)、埼玉大学及び公社との共同研究による成果⑳「GP等二次元ゲル電気泳動における規格化のための標準DNAセット」は、関連技術と合わせて簡便に生物の種類が同定できるユニークな技術である。コメの品種判別や感染症微生物の同定、さらには発酵プラントや浄化槽の運転モニタリング技術として実用化が期待された。

(株)NTTアドバンステクノロジーでは、埼玉大学と公社との共同研究による成果⑯「表面プラズモン測定装置および測定方法」について、関連技術と合わせて構成される小型SPR装置の特徴を活かし、医療分野、特に眼科領域に事業展開すべくフェーズⅡからは自社事業として検討を進めることとしてスピンオフした。

iv) フェーズⅡへ向けた事業化への取り組み

(バイオ関連機器分野)

埼玉大学の成果④、東洋大学と公社との共同研究による成果番号⑤～⑩および公社の成果⑱は、ゲル構造物、プラズマ重合膜、磁気ビーズ、マイクロ流体デバイスおよびDNA検出に関する特徴のある技術である。これらは、本事業が目指す高速分子進化リアクターを構成する要素技術であるとともに、それぞれ独自に利用展開が可能である。

(医療分野)

埼玉大学の成果番号①、産総研と公社との共同研究による成果②～③および県立がんセンターと公社との共同研究による成果⑮は、それぞれ、分子多様性作出技術、遺伝子型表現型対応付け技術およびその応用技術で、高速分子進化に必須の基盤技術である。これらの技術を含め、コア研に蓄積された高速分子進化の基盤技術をベースとして新たなベンチャーの立ち上げ、或いは地域の研究開発型企業に呼びかけ、医療分野における有用物質の開発を進める方向で検討を開始した。

(環境分野)

地域では、生ごみ処理、浄化槽管理、地下水の窒素成分削減、有害物質除去、悪臭除去等の様々な環境関連のニーズがある。東洋大学と公社との共同研究による成果⑰をもとに

さらに技術を発展させ、地域の環境関連研究所および環境関連企業と協力して、これらのニーズに応える展開を探ることとした。埼玉大学と（株）若尾電気の共同研究による既出願の*11は浄化槽の余剰汚泥の軽減に画期的な方法であることが分かってきた。（株）若尾電気から事業を分離して新たにベンチャー企業として平成17年1月に設立されたクラリス環境（株）がフェーズⅡへ向けて事業体制を整備した。

2) フェーズⅡにおける成果のまとめ

フェーズⅡから、研究の重点化に沿って事業化への取り組みも本格化してきた。重点化方針に沿って成果の権利化も費用対効果を勘案し周辺特許の強化、出願国の絞り込み等を戦略的に進めた。

i) 平成17～18年度

事業化基盤を整備する上で、成果の権利化を確保することが必須要件となる。フェーズⅠで整備した特許分野のスキルバンクを活用することに加えて、新たにウインググリーン特許事務所の奥原弁理士と顧問契約を結び綿密な連携をとりながら、事業化へ向けて計画的に、戦略的に国内出願、PCT出願、各国移行への対応を進めた。権利化対応に当たっては、研究の進捗を四半期ごとに工程表で捕捉、管理し、併せて当該国の関連する市場調査、競合力等の基本的な調査を実施した。その結果、国内出願7件、PCT出願6件の出願を達成し、事業化の進捗と合わせて審査請求等への対応も進めた。

ii) 平成19（最終）年度

当プロジェクトの本年末終了を見据えて、知財戦略として保有特許の仕分けを進めた。

1) 審査請求するもの、2) PCT から各国移行するもの、3) 企業へのライセンスを推進するもの等に区分けして、それぞれの案件毎に発明者、共同出願人と個別に検討した。当プロジェクトはバйдール非適用で進めてきたが、フェーズⅢへ向け「ADLib®法による抗体産生の関連特許」、「ペプチドアダプター創出技術に係わる特許（自動化を含む）」、「Somatogenin 等の新規医療標的分子に関連する特許」等、今後分子進化技術を事業展開していく上での基盤技術となる特許の海外出願、維持、企業へのライセンス等について事業化を円滑に進めるための具体的な作業を進めた。費用対効果を勘案し、事業化の目処とそれに必要な特許という視点から峻別した。

新たな特許としては、低曝気活性汚泥法によって醸成する処理水の畜舎や家畜糞尿に対する消臭効果に関して、さらには、カテプシンEに対するペプチドアダプターの補強特許を出願した。フェーズⅡで取得した特許の一覧を表Ⅳ.3.2にまとめた。出願と関連する事業化実績、技術移転（進行中を含む）等を表Ⅳ.3.3にまとめて示した。

表IV.3.1 フェーズ I における特許出願状況（出願済および出願準備中のもの）

サブテーマ名	成果番号	特許番号等	発明の名称
1. 高速分子進化のための基盤技術の開発	①	特願 2003-413780	タンパク質分解酵素に阻害作用を有するDNAの探査方法
	②	特願 2004-301687	有用タンパク質取得のための核酸構築物
	③	特願 2004-329493	タンパク質機能を向上させる mRNA 固定化基盤
	—	*1 特開 2002-171983	核酸の連結方法
	—	*2 特開 2002-315577	核酸ライブラリーの作製方法
	④	特願 2004-253184	ゲル構造物の製造方法及びこの方法で製造されたゲル構造物
	⑤	特願 2003-385944	プラズマ重合糖類膜
	⑥	特願 2004-363384	プラズマ重合ゲラニオール薄膜
	⑦	特願 2004-363385	プラズマ重合PEG薄膜
	⑧	特願 2004-339469	カーボンナノチューブの低温合成法
	⑨	特願 2004-339468	ダイヤモンドの低温合成法
⑩	特願 2004-93655	ビーズ配置用基盤およびそれを用いたビーズ配置方法	
—	*3 特願 2003-99718	回転振動磁場を用いた反応促進方法とそのための装置	
⑪	特開 2004-275194	遺伝子型と表現型の対応付け分子及びその利用	
2. 相同組換えによる高速ゲノム進化法の開発	—	*4 PCT/JP03/09563	体細胞相同組換えの促進方法及び特異的抗体の作製方法
	⑫	特願 2004-52952	相同組換えを行わせる方法
	⑬	特願 2004-338029	耐熱性多頻度DNA切断酵素の細胞内活性化によるゲノム再編成の誘発
	⑭	特願 2005-322469	リガンドに特異的に結合するタンパク質を効率的に選別する手法
3. 高速分子進化の福祉応用 3-1. 生理的病理的に重要な蛋白質の解析と創出	⑮	特願 2004-345885	HGFに特異的に結合し、その活性を阻止するDNA分子
	⑯	特願 2004-263457	表面プラズモン測定装置および測定方法
	—	*5 特許 3356212	屈折率整合透明フィルム及び屈折率整合透明フィルムを利用したセル
	—	*6 特許 3356213	SPR測定用資料セル及びセルホルダー
	—	*7 特許 3462179	表面プラズモン共鳴現象測定装置
	—	*8 特願 2003-358643	カテプシンEの腫瘍マーカーとしての用途およびカテプシンEならびにカテプシンDの腫瘍血管阻害療法のターゲットとしての用途

サブテーマ名	成果番号	特許番号等	発明の名称
3-2. 環境浄化能等のある 微生物・植物の分子育種	⑰	特願 2004-367536	新規耐アルカリ耐熱性脱窒菌
	⑱	特願 2004-007025	微生物ガス採取器
	⑲	特願 2004-314116	H S R D A法を用いた特異的D N A断片検出法
	⑳	特願 2004-350694	G P等二次元ゲル電気泳動における規格化のための標準D N Aセット
	—	*9 特開 2001-305104	ゲノムプロファイリング画像から特徴点を抽出する方法、並びに該方法で得られた特徴点群を用いた遺伝子型による種同定方法および類縁性同定法
	—	*10 特開 2001-299398	遺伝子型による生物の同定方法
	—	*11 特願 2001-175094	廃水処理方法及び廃水処理装置

(注) *印：関連特許で本事業開始前に出願されたもの

表Ⅳ.3.2 フェーズⅡにおける特許出願一覧

サブテーマ名	成果番号	特許番号等	発明の名称
A. 高速分子進化のための基盤技術の開発	㉑	特願 2005-042885	多種微量試料の注入、移行方法
	㉒	特願 2005-052679	抗菌活性を有するペプチド
	㉓	特願 2005-235819	カテプシン E 特異的阻害 DNA 分子
	㉔	特願 2005-151353	生体反応又は、生体状態変化の複数同時解析法
	㉕	特願 2005-303009	固定化ピューロマイシン・リンカーを用いたタンパク質のスクリーニング方法
	㉖	特願 2005-337908	酵素固定化バイオセンサー
	㉗	特願 2005-337909	酵素固定化センサー
	㉘	特願 2005-268483	微小試料の蛍光検出法および装置
	㉙	特願 2006-166952	カテプシン E 特異的阻害剤
	㉚	特願 2006-297267	生体分子アッセイチップ
	㉛	特願 2007-097572	高親和性分子取得のためのリンカー
	㉜	特願 2007-011240	アプタマー創出進化リアクター制御装置
	㉝	特願 2007-328060	ブロックシャプリングに基づく二次ライブラリー (ASAC 法) の開発
B. 相同組換えによる高速ゲノム進化法の開発	㉞	特願 2006-132662	遺伝子ターゲティングに伴うランダムインテグレーションを抑える方法
	㉟	特願 2006-284624	抗体遺伝子の可変領域における変異部位の分布状況の調節法
C. 高速分子進化の医療応用	㊱	特願 2005-073506	下垂体細胞由来の新規分泌タンパク質及びその用途
	㊲	特願 2006-240233	糖代謝異常の治療又は予防
D. 高速分子進化の環境応用	㊳	特願 2005-309455	有機性廃棄物の処理方法
	㊴	特願 2007-225484	堆肥の製造方法

表IV. 3.3 事業化の成果と進捗状況

	事業主体	事業内容	関連特許	地域への貢献性
ベンチャー起業による事業化	(1) (株) カイオム・バイオサイエンス	抗体医薬	*4 ⑭⑮	研究開発、生産拠点を県内に持ち、域内バイオ事業の発展に貢献しうる。
	(2) ジェナシス (株)	アプタマー医薬	*1, *2 ⑳㉑	研究開発、生産拠点を域内に有し、県内発企業として発展が期待される。
	(3) クラリス環境 (株)	低曝気浄化槽	*11 ㉘	浄化槽事業を県域からスタートし、全国展開を進める。
事業化の目処が立った技術	(1) (株) ライフテック	進化リアクター	㉚	県内に本社を有する研究機器メーカー。
	(2) 埼玉大学、東亜ディケーター(株) (株) オプセル、(株) ビーアールディー	バイオプローブ	㉜	県内に事業所を有するオプセル(株)が参画する。
	(3) 埼玉県農林総合センター	害虫抵抗性イネの分子育種	⑲	県の公設試が事業主体となり農業分野に貢献する。
進行中の課題	(1) 埼玉大学、クラリス環境、埼玉県農林総合研究センター、県内畜産業者	低曝気技術による畜産廃棄物の無臭堆肥化	㉙	県内畜産業者が事業化に参画する。
	(2) 県立がんセンター、シバヤギ	DNA アプタマー	⑮	県機関が開発を主導し、知財権を有する。
技術導出 (検討中を含む)	(1) 埼玉大学→大手製薬会社	Somatogenin (協議中)	㉟	埼玉県発の成果として評価される。
	(2) 埼玉大学→京都大学動物実験施設	S-100 β -GFP ラットの開発 (導出済)	—	埼玉大学の研究力が評価される。
	(3) 埼玉大学→大手発酵系企業	糸状菌の相同組み換え技術 (協議中)	⑫	全国展開を予定しており、地域性は限定しない。
	(4) 埼玉大学→NTT アドバンステクノロジー	表面プラズモン測定装置、測定方法	⑯	NTTが自社事業として展開し、県域に限定されない。
	(5) 埼玉県産業技術総合センター	抗菌活性を有するペプチド	㉚	県内食品業への貢献が期待される。

(2) 成果展開報告

(1)モノクローナル抗体迅速作製技術 (ADLib®法:Autonomously Diversifying Library 法)

技術開発機関：理化学研究所、株式会社カイオム・バイオサイエンス

成果の展開

平成17年2月に、本技術を基にして理研発ベンチャー、株式会社カイオム・バイオサイエンスが設立され、研究拠点を埼玉県和光市に置いて、モノクローナル抗体を用いた医薬品・診断薬・検査薬・研究試薬の開発、製造及び販売の事業活動を進めている。

また、フェーズⅢの基幹事業である都市エリア産学官連携促進事業（平成19年度～21年度）では、本技術を基に、がん、メタボリックシンドローム、老化性神経変性疾患などの医薬シーズとなる抗体を創製するとともに、新たな創薬標的の生体分子を探索・獲得し、先端バイオ産業を創出・育成することとしている。

技術の概要

抗体は、生体が病原体の感染などの異物の侵入を受けたときに引き起こす免疫反応で中心的な役割を担う蛋白質である。現在、抗体は様々な生命医学研究に試薬として利用されているほか、診断薬や抗ガン剤などの抗体医薬品として利用されている。抗体は、通常の場合、実験動物に目的の抗原を注射し、数ヶ月間の免疫を行った後に入手可能になる。特定の結合特性を持つ抗体を量産するために、モノクローナル抗体が用いられるが、この場合も10週から半年程度の作製時間がかかる。また、動物個体を用いる従来法では、病原体毒素、配列が種間で保存された生命活動に重要な蛋白質、糖鎖などの抗原（困難抗原）に対しては良質な抗体が得にくいことが知られている。

ADLib®法（図1）では、ニワトリBリンパ球由来の培養細胞であるDT40細胞を用い、クロマチンを弛緩させる働きのある薬剤で処理を行うことで、抗体遺伝子座のDNA再編成を著しく促進することに成功し、この現象を利用してわずか1週間程度でモノクローナル抗体を作製することができる。また、必要な抗原の量も従来の数百分の一にまで低減できるほか、毒素などの困難抗原に対する抗体作製も可能になる（表1）。

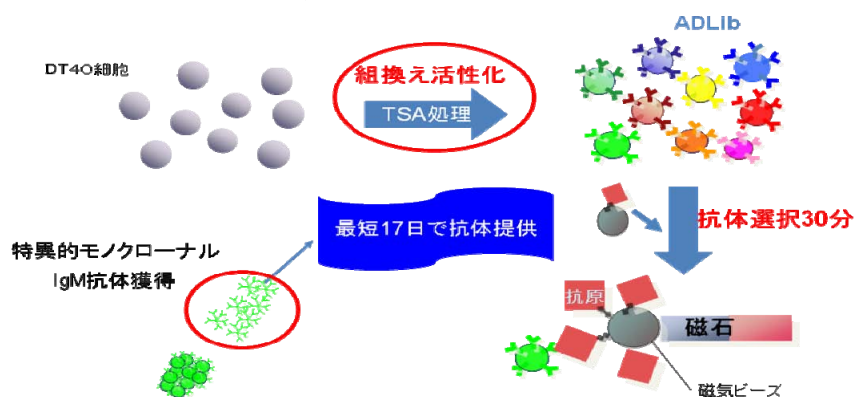


図1 ADLib®法の概要

応用分野

ADLib®法は、大学・研究機関がプロテオミクス等の研究で必要とする研究試薬用抗体や、診断薬・検査薬メーカーが新興病原体等に対する診断薬・検査薬を開発するための抗体、さらには、医薬品メーカーががん等の難治疾患に対する抗体医薬を開発するための抗体を提供することができる（図2）。本法は、これまで作製が困難であった抗原を含めて多種多様なニーズに対する抗体を、必要量、スピーディーに供給することが可能なことから、関連の研究ならびに商品開発のスピードアップを強力に支援することができる。

事業コンセプト

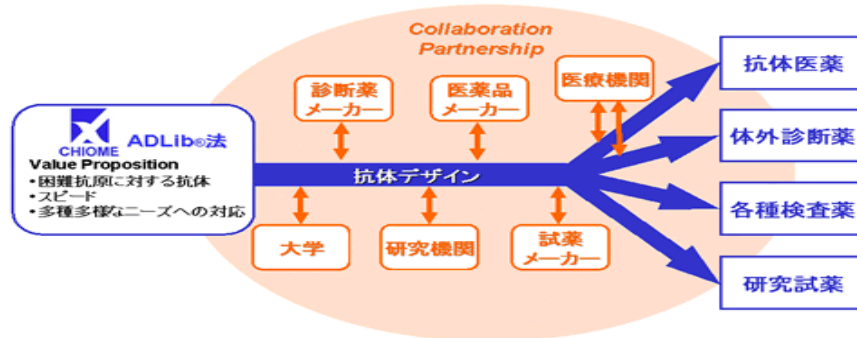


図2 ADLib®法による事業コンセプト

技術競争力

表1 既存技術との比較

	ADLib®法	マウス・モノクローナル抗体法	ファージディスプレイ法
適応可能抗原の範囲	自己抗体, 抗毒素抗体, 抗体酵素が可能	不可	自己抗体, 抗毒素抗体, 抗体酵素が可能
スピード	1-2週間	2-6ヶ月間	10週間
抗原量	数百 ng~1µg	数百 µg~mg	数百 µg
抗体の形状	完全抗体	完全抗体	ファージ粒子
自動化	可能	不可	可能
施設・設備	通常実験室で十分	動物飼育施設が必要	組換え DNA 実験可能な実験室

・モノクローナル抗体法

抗原をマウスに注射して免疫感作を行い、その後脾臓を摘出してB細胞を分離し、無限増殖能をもつミエローマと細胞融合させ、1種類の純粋な免疫グロブリン分子を無限に産生するハイブリドーマを取得する。この手法では動物個体への免疫感作が必須であり、抗体の入手までに数ヶ月を要する。また、抗原性の低い自己抗原や進化的に保存された抗原、毒素抗原などに対しては、十分な親和性や特異性をもつ抗体を作製することは困難である。

・ファージディスプレイ法

多数の人工抗体遺伝子をファージ粒子蛋白質の遺伝子と連結し、膨大なファージ抗体のライブラリーを準備する。この中から、目的抗原に対して特異的に結合するファージ抗体を選択した後、大腸菌に感染させてファージ抗体を大量に生産する。この手法は長年の実績があるが、ファージ抗体の特異性・親和性獲得に難点があり特別な工夫が必要となる。

出願特許

1. 特願2002-221232 (2002. 7. 30)
2. 特願2004-324217 (2004. 11. 08)
3. 特願2006-284624 (2006. 10. 19)

(2) マイクロリアクターアレイ型「分子進化リアクター」

技術開発機関：ジェナシス株式会社、東京大学工学系研究科総合研究機構

成果の展開

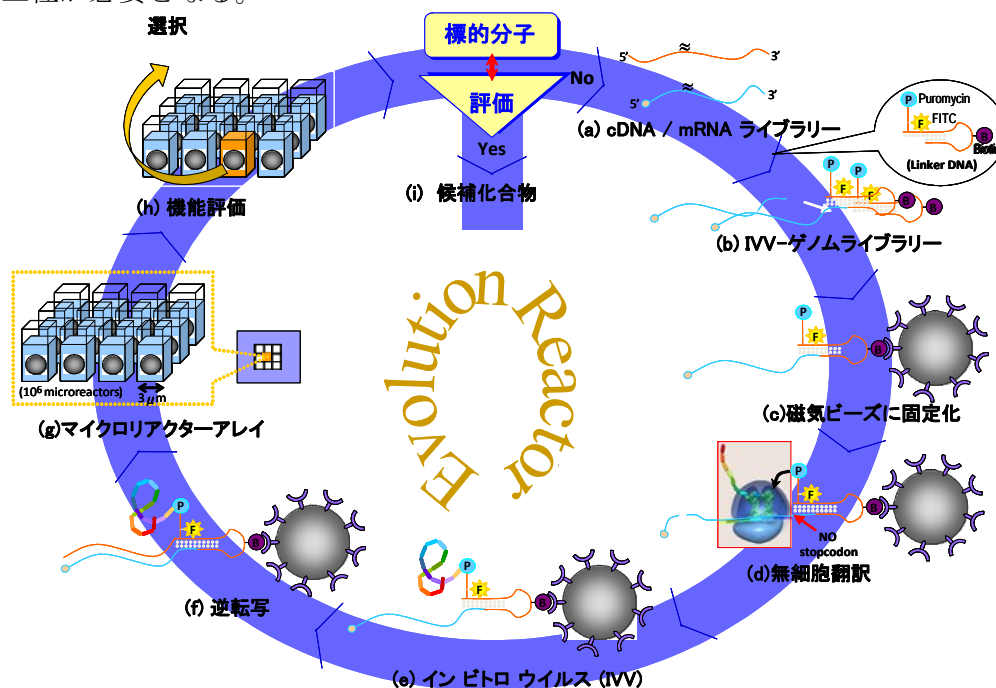
平成18年4月に、本技術の内の cDNA ディスプレ法を基に産総研発ベンチャー、ジェナシス株式会社が設立され、研究拠点を埼玉県川口市に置いて、ペプチド医薬開発の事業活動を進めている。また、フェーズⅢの基幹事業である都市エリア産学官連携促進事業（平成19年度～21年度）では、本技術を基に、がん、メタボリックシンドローム、老化性神経変性疾患などの医薬シーズとなるペプチドを創製するとともに、新たな創薬標的生体分子を探索・獲得し、先端バイオ産業を創出・育成することとしている。なお、マイクロリアクターアレイ型「分子進化リアクター」については、引き続き、フェーズⅢにおいて東京大学工学系研究科総合研究機構で実用化開発を行う。

技術の概要

進化分子工学は生物が30数億年を経て到達した進化の過程を、短時間に実験室で実現する技術のことで、医薬用途の有用蛋白質等を開発するのに有力な手段である。分子進化は、DNAを起点とし、変異発生、対応付け、淘汰（評価・選別）、増幅の各工程を経てDNAに戻るプロセスからなる。この進化サイクルを繰り返し実施することにより、目標に向かって蛋白質等の分子の機能を高度化することができる。

マイクロリアクターアレイ型「分子進化リアクター」は、*in vitro virus* (IVV) 法を中心とする先端バイオ技術と、半導体産業で培われたナノ微細加工技術とを駆使し、進化サイクル全体の機能向上と効率化及び大規模スクリーニングを目指す。

分子進化の起点となるDNAには、メリットとして、4種の塩基の配列組合せにより多様な分子（例えば 10^{10} 種類 = 100億種類）を創出しうる能力（変異能が大）と増幅（PCR）により比較的簡単に量を増やせる能力がある。逆に、デメリットとして、DNAはタンパク質に比べその機能が制限されているため、表現型としてのペプチドや蛋白質に翻訳（対応付け工程）することが必要となる。したがって、進化サイクルを廻すには、DNAから蛋白質等への転写、蛋白質等での機能評価と選別（淘汰）、および蛋白質等からDNAに戻す逆転写の工程が必要となる。

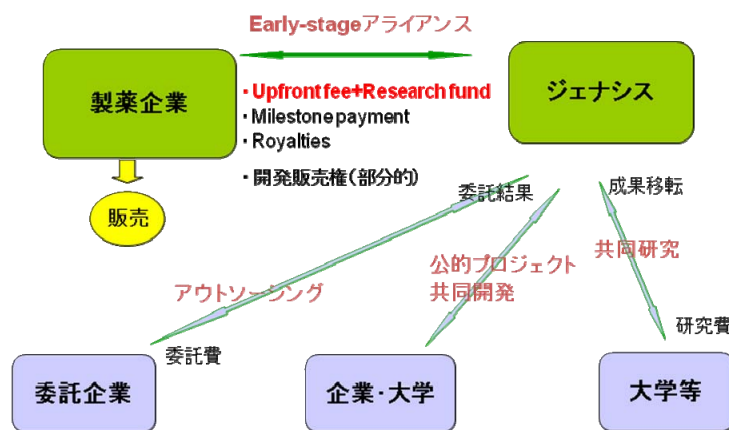


ここでは、この対応付け工程において新規のリンカーによる新たな *in vitro virus* を開発し、DNA→mRNA→蛋白質・cDNA（評価・選別）→DNAのサイクルを廻す実用的な技術確立した。また、ハードの面では、1分子レベルで100万種類の機能を同時並列で評価し選別しうる、細胞型スクリーニングアレイの開発を目指している。これが完成すれば、蛋白質等の機能、例えば酵素活性等、を高度化する研究が大幅にスピードアップされる。

応用分野

現在、国内における蛋白質・ペプチド医薬の市場規模は数千億円で、将来、さらに拡大することが期待される。「分子進化リアクター」は、蛋白質・ペプチド医薬の開発を大幅にスピードアップすることができ、また、酵素等の生体分子を高速進化させ、高機能な生体分子を創ることができることから、食品、環境、エネルギーなどの広範な産業分野に貢献することが期待される。

多角的なアライアンスにより多様な創業シーズの開発を加速



事業コンセプト

前臨床試験終了後に医薬品候補を製薬企業に提示するLate-stage 事業モデルではなく、ジェナシスが有する技術・特許を基に製薬企業と共同研究を行う Early-stage 事業モデルを描いて実施する。

技術競争力

In vivo で実施する細胞ディスプレイ法やファージディスプレイ法があるが、細胞毒性や膜透過性が悪いことからライブラリーの大きさに制限がある。

これに対して、*in vitro* 法は、もともとライブラリーサイズが大きいメリットがあったが、最近は無細胞翻訳系の技術革新がすすみ、また、弱点であったRNA分解を克服するcDNAディスプレイ法が開発されたことにより、こちらが主流になってきている。

cDNAディスプレイ法の概要・優位性

	ファージ ディスプレイ	リボソーム ディスプレイ	mRNA ディスプレイ	cDNA ディスプレイ
タンパク質発現	細胞内 (大腸菌)	無細胞	無細胞	無細胞
ライブラリーサイズ	10 ⁸ /ml	10 ¹² /ml	10 ¹⁴ /ml 100兆/ml	10 ¹⁴ /ml 100兆/ml
1サイクル	4-5日	2-3日	2-3日	1-2日
安定性	安定	不安定 (mRNA)	不安定 (mRNA)	安定(cDNA)
細胞毒性のある ペプチド	不可	可	可	可
対応付けの方法	ファージ	リボソーム (非共有結合)	ビュロマイシン (共有結合)	ビュロマイシン (共有結合)
固相化(フォールディング 向上・翻訳後修飾)	不可	不可	不可	可

出願特許

1. 特願2004-329493 (2004. 11. 12)
2. 特願2004-301687 (2004. 10. 15)
3. 特願2005-303009 (2005. 10. 18)
4. 特願2006-297267 (2006. 11. 1)
5. 特願2007-097572 (2007. 4. 3)

(3) 微好気活性汚泥法による余剰汚泥減容システム

技術開発機関：埼玉大学大学院理工学研究科、クラリス環境株式会社

成果の展開

平成17年1月に本技術を基にクラリス環境株式会社が設立され、地域結集型共同研究事業と併行してNEDOの産業技術実用化開発助成事業（平成17～18年度）を実施したことで、概略、技術の確立を果たした。同社は、平成19年4月から、廃水処理施設の改修工事及び販売事業を進めている。また、フェーズⅢにおいて、本技術の畜産事業領域への応用である「畜舎消臭・堆肥化促進」を地域密着の事業として育成すべくJST等の競争的資金に応募する準備を進めている。

技術の概要

現在、わが国では、廃水処理時に発生する余剰汚泥は産業廃棄物の約5割を占めている。産業廃棄物の埋立て処理場の残存容量に限界があり、焼却処理するにしても重油が必要なことから、その発生抑制が緊急の課題となっている。

本システムは、汚水処理能力を損なわずに、微生物の増殖を抑制しながら廃水処理することを狙ったものである。具体的には、酸素以外の電子受容体、すなわち、硝酸イオンなどを利用して生育する微生物群を誘導し廃水中の有機物を分解する、従来とは異なる発想によるものである。本システムによれば、従来の活性汚泥法のBOD処理能力を維持しつつ、発生する余剰汚泥を大幅に削減し、エネルギーの使用量を削減するとともに、悪臭ガスの発生を抑えることができる（図1、表1）。

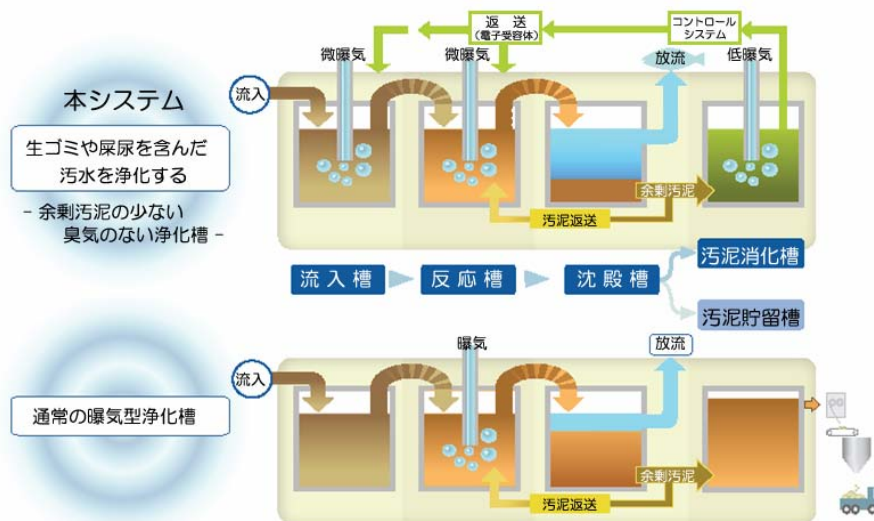
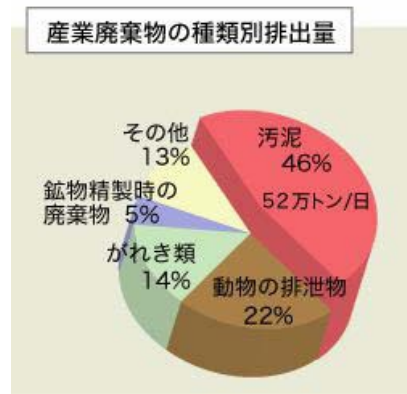


図1 微好気活性汚泥法と従来法の比較

応用分野

本システムは、食品加工業を中心とする産業廃水、ビルやホテル等の廃水、畜産廃棄物、都市下水およびディスポーザー廃水等の処理に利用できる。現在用いられている活性汚泥法に対して、本システムの利点をアピールすることにより、新設需要ならびに置換え需要（設備の改修、更新）が見込まれる（図2）。

事業コンセプト

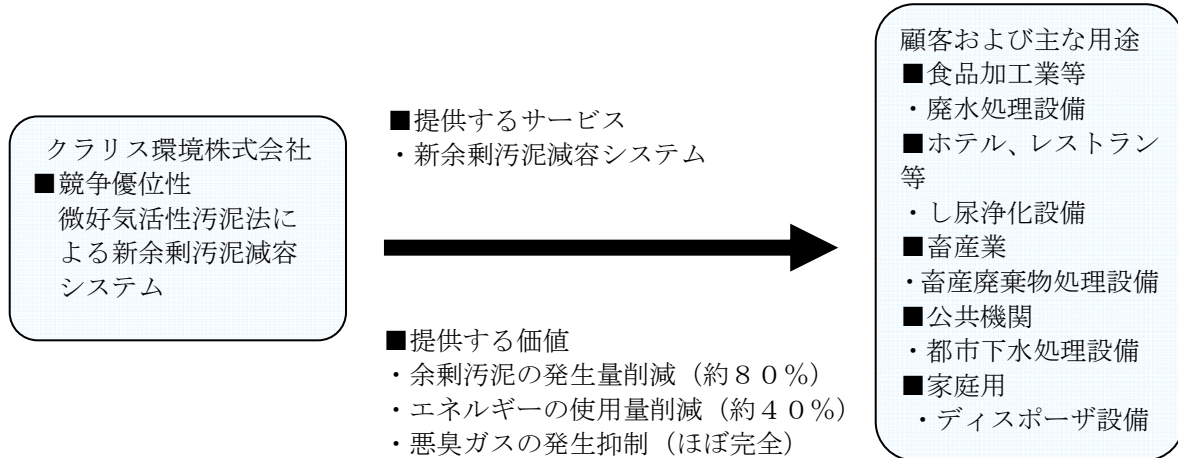


図2 微好気活性汚泥法による事業コンセプト

技術競争力

余剰汚泥の減容化や発生した汚泥の有効利用に関しては、各方面において積極的に技術開発が行われている。他の方法と比べて本システムが優位な点を表1に示す。

表1 本システムと他の方法との性能およびコスト比較

	本システム	活性汚泥法	嫌気・好気法	オゾン処理法	微生物製剤法
余剰汚泥の削減	○	×	△	○※1	△
臭気の発生抑制	◎	△	×	×	×
建設コスト	○	○	△	×	○
ランニングコスト	○	×	×	×	×※2
保守・管理	○	△	×	×	×
溶存酸素量	1 mg/l以下	2~3 mg/l	0 mg/l 2~3 mg/l	2~3 mg/l	2~3 mg/l
主な呼吸形式	硝酸呼吸 (酸素呼吸)	酸素呼吸 (硫酸呼吸)	硝酸呼吸 酸素呼吸 (硫酸呼吸)	酸素呼吸 (硫酸呼吸)	酸素呼吸 (硫酸呼吸)
主な微生物	アシネトバクター属 シュートモナス属	バシラス属			

※1 発生した汚泥の処理 ※2 微生物を投入し続ける

出願特許

1. 特許番号第3667254（2005.04.15）
2. 特願2005-309455（2005.10.25）
3. 特願2007-225484（2007.08.31）

(4) アプタマー創出進化リアクター

技術開発機関 埼玉大学大学院理工学研究科、株式会社ライフテック、埼玉県立がんセンター

成果の展開

今回開発した DNA アプタマー創出進化リアクターの技術をベースに、フェーズⅢでは、これにジェナシス株式会社の cDNA ディスプレイ法を加えてペプチドアプタマー創出進化リアクターを開発する。本リアクターはこれまでに世界に類がなく、完成すればペプチド医薬のシーズ開発が大幅に加速され期待が大きい。

技術の概要

アプタマーとは、標的とする蛋白質等に強く結合し、その働きを抑えたり高めたりする RNA や DNA やペプチドのことで、人工的に（試験管の中で）適応進化させて得られる。図 1 に DNA アプタマーの代表的なものの構造を示す。

進化とは分子進化のことで、地球上の生体分子が約 40 億年に及ぶ進化の過程を経て高度化したものを、実験室で、短時間で実現する技術のことである。図 2 に示すように、出発分子から、変異、淘汰・選択、増殖のサイクルを繰り返すことにより、高機能分子を創り出すことができる（図 2）。

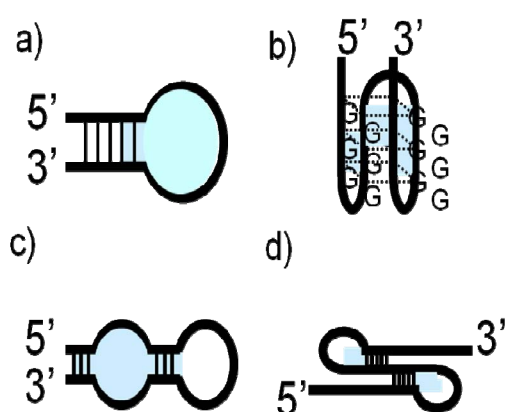


図 1 DNA アプタマーの代表的な構造
DNA アプタマーは独特な構造をとることにより種々の物質を認識することができ
(a:Hairpin b:G-quartet c:Burige
d:Pseudo knot)

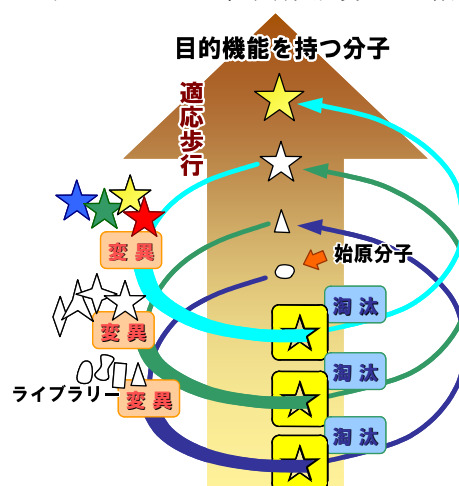


図 2 高速分子進化の概念図
チンパンジーがタイプライターを叩いたような文章から出発しても、速やかに、シェークスピアのような文書が書けるようにできる。

アプタマー創出進化リアクターとは、高機能アプタマーを創り出す分子進化の研究プロセスを自動的に行う研究開発用途ロボットのことであり、これまで、アプタマーを創出する研究は研究者が手で行っていたが、その過程は非常に複雑で多くのプロセスを含むため、膨大な時間と労力を要した。しかるに、本装置を用いれば、5 サイクルまでの進化を約 10～20 時間で実施することができ、大幅な労力の削減と時間の短縮を図ることができる。

・アプタマー創出進化リアクター (ACER1000 装置) (図 3, 4)

プログラムの設定、確認等は本体上部に設置された液晶タッチパネルで行う。また、プログラムの設定は外部コンピューターでも設定が可能であり、USB ケーブルを用いて容易に転送することができる。すべての実験操作は、クリーンに保たれたフード内で行われ、コンタミネーション等の影響を最低限におさえる。また、未使用時には、UV ランプにより、滅菌あるいは外来 DNA の分解を行うことができる。

・高機能アプタマーの作製

出発物質として、両端のプライマー配列に挟まれた領域に、ランダム DNA 領域を設定した全長 50~200 bp 程度の DNA をランダム DNA ライブラリーとする。仮に、このランダム配列が 50 bp だとすると、その組み合わせは確率的には 4^{50} 通り (10 の 30 乗) の組み合わせが存在するライブラリーとなる。標的物質に対し DNA ライブラリーを作用させた後、非特異的に結合する DNA を洗い流す操作を複数回行うことで、特異的に標的物質に結合する配列の DNA を選択する。標的物質は磁気ビーズに固定化されており、磁気ビーズを回収することで同時に結合している DNA を回収できる。回収した DNA を PCR により増幅し、ライブラリーの再構築を行う。再構築された DNA ライブラリーを再度同様な操作を行うことにより、徐々に含まれる配列を収束させていく。ある程度 DNA ライブラリーに含まれる配列が収束した時点で配列決定を行い、SPR 等で機能を評価し DNA アプタマーとする。

・高機能アプタマー作製の自動化

アプタマー創出進化リアクターは、上記の操作をすべて自動で行うことが可能なように構成されている。すなわち、標的物質と DNA ライブラリーとを磁気ビーズを用いて回収する装置、DNA 増幅のための PCR 装置、DNA 変性 (一本鎖化) 操作を行うためのシステム、各種試薬や標的等を保存するための冷蔵試薬槽が含まれる。また、多様な条件設定に対応するため、同時に 8 サンプルを異なった条件で操作することが可能である。標的物質と DNA ライブラリーとの反応から、DNA 回収、増幅、ライブラリー再構築までを 1 サイクルとすると、5 サイクルをおよそ 10~20 時間 (条件設定による) で行うことが可能である。

アプタマー創出進化リアクター

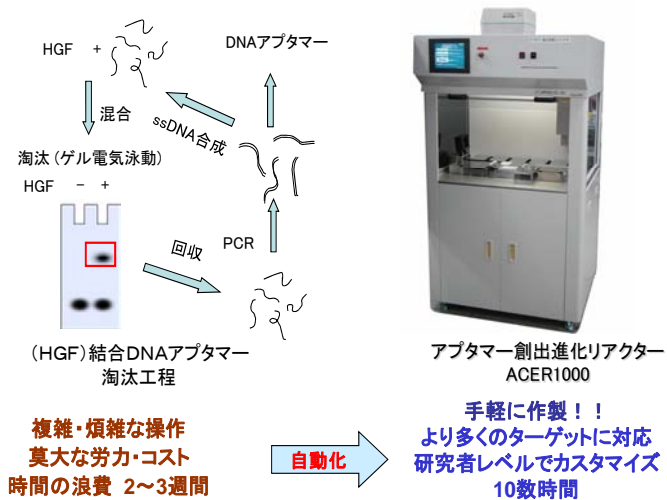


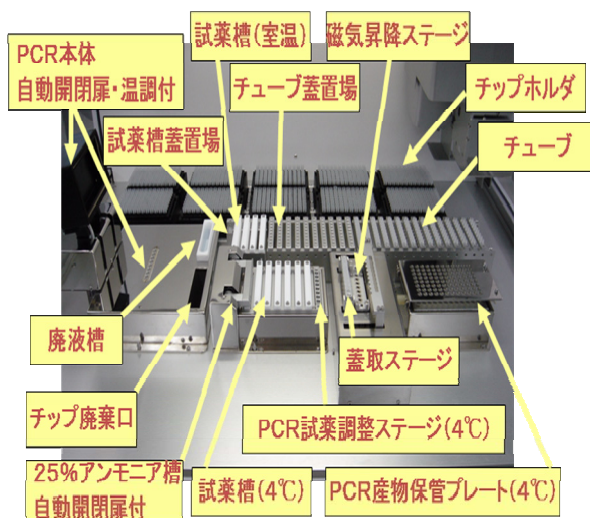
図3 アプタマー創出進化リアクターの概要

図4 フード内の各装置

フード内には、進化サイクルを迅速にすすめるために各種装置を設置しており、一度の設定で進化サイクルを 5 サイクルまで行うことができる。

(応用分野)

昨年、アメリカで、アプタマー医薬「Macugen」が眼の疾患であるウェット型黄斑変性症を対象に認可され、世界ではじめてアプタマー医薬が実用化された。アプタマー医薬は、抗体医薬と並んでポスト・ゲノム時代のバイオ医薬品として大いに期待されている。そのような中で、アプタマー創出進化リアクターが登場することは、新規アプタマーの開発速度を大幅に上げることになり、医薬用あるいは診断用アプタマーの開発を進めている企業や大学等公的研究機関から歓迎されることと思われる。



出願特許

1. 特願 2007-11240 (2007.04.20)

(5) 生体内反応多重並列可視化バイオプローブの作製技術

技術開発機関：埼玉大学大学院理工学研究科

成果の展開

埼玉大学は本技術を基に、東亜ディーディーケー株式会社、株式会社オプセルおよび株式会社ビーアールディーと共同で、平成18年度産学共同シーズイノベーション化事業「顕在化ステージ」を進めてきた。今後は、さらに試薬会社を加え、製薬企業向けの医薬開発機器および試薬キットを開発し販売する計画である。

技術の概要

本技術は、生体内の酵素活性やpH等の変化を測定する技術で、医薬品の開発や病態の診断等に応用することができる。蛍光分子が2種類存在した場合、エネルギーが片方の分子から他の分子へ移動する現象が観察され、これを蛍光共鳴エネルギー移動(FRET)*と呼ぶ。ここで、FRET効率は蛍光エネルギーを与える側の分子(ドナー)の蛍光強度と与えられる側の分子(アクセプター)の蛍光強度の比率に反映され、生体内反応を蛍光強度の比率の変化に定量的に変換するのがバイオプローブである。*FRET: Fluorescent Resonance Energy Transfer

酵素反応を例にこのメカニズムを説明する。図1は蛍光蛋白質GFP(緑色系と蛍光色素(赤色系)とからなるバイオプローブがプロテアーゼで切断される様子を示している。最初、プロテアーゼが作用していない状態では、エネルギーがGFPから蛍光色素に移ってFRETが起きているが、プロテアーゼで切断されると両者間の距離が広がりFRETが消滅する。これを各波長の蛍光強度の変化で見たのが図2である。プロテアーゼ処理前は500nm近辺の蛍光強度が低く550nm近辺の蛍光強度が高いのが、プロテアーゼで切断されるとエネルギーが吸い取られなくなるため500nm近辺の蛍光強度が高くなり、相対的に550nm近辺の蛍光強度が低くなる。

これまで蛍光分子を使って様々なバイオプローブが開発されてきたが、概ね、蛍光蛋白質間や有機蛍光分子間のFRETを利用したものであった。しかるに、本技術では、キメラ型、例えば、蛍光蛋白質と有機蛍光分子間のバイオプローブに注目し検討した結果、生体内反応を多重並列で可視化することが可能となり、その結果、生体内で起こる反応や生体分子の濃度変化をリアルタイムで複数同時にモニターすることが可能となった。本技術の特徴は、生体内反応を複数同時にモニターできるところにある。

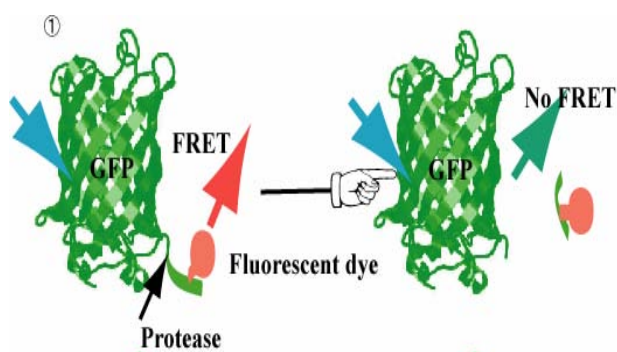


図1 酵素活性を指標としたスクリーニングのためのバイオプローブ概念図

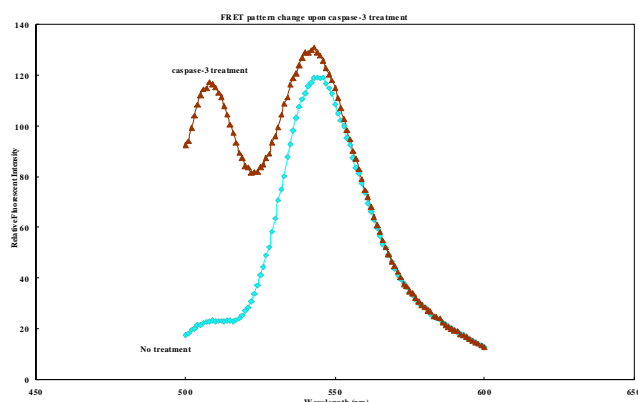


図2 caspase-3 処理による FRET パターン変化

応用分野

医薬品開発のスピードアップに貢献する。例えば、ターゲットとなる酵素活性や生体分子の濃度変化をモニターする多重並列可視化バイオプローブを作製し、正常状態、病態ならびに薬剤の存在下での酵素の活性変化や生体分子の濃度変化をモニターすることができる。また、疾病と関連して起こる複数の細胞内現象が特定されている場合、発症前に観察される現象ほど意義があるが（例えば、筋萎縮性側索硬化症候群（ALS）発症前の細胞内での複数種caspaseの活前診断が可能となる。

技術競争力

・ 蛍光蛋白質間の相互作用を利用したバイオプローブ 蛍光蛋白質とその色変異体を用いたバイオプローブの開発が盛んに行われている。しかしながら、細胞への蛍光蛋白質の導入が遺伝子導入により行われるため、色変異体2種の組合せに制限がある。また、DNase、Glycosidaseなど異種の酵素活性を同時にターゲットとすることが困難なことや、バイオプローブの開発に労力と時間がかかる等の難点がある。

・ 有機蛍光分子を利用したバイオプローブ 有機蛍光分子そのものがセンサー分子で単独で使用される場合（カルシウム濃度測定など）や、生体分子を有機蛍光分子でラベルして酵素の基質として用いられる場合（プロテアーゼ、キナーゼ活性測定など）がある。前者では、分子を化学合成しなければならないことからモニター可能な生体内現象が制限される。また、後者では、片方が発光分子、もう片方が消光分子となる場合がほとんどで、FRET効率の変化ではなく蛍光の回復あるいは消失でみるため、測定系の蛍光バックグラウンドへの配慮が必要となる。

出願特許

1. 特願2005-151353（2005.05.24）



図3 生体内反応可視化バイオプローブ装置（試作品）

(6) 病気や害虫に強い水稻の高速分子育種

技術開発機関：埼玉県農林総合研究センター、日本大学生物資源科学部

成果の展開

埼玉県では、近いうちに、DNA マーカーによる手法で育種したツマグロヨコバイ耐性イネを市場に出す予定である。また、今後のイネの育種においても DNA マーカーによる手法を活用する予定である。

技術の概要

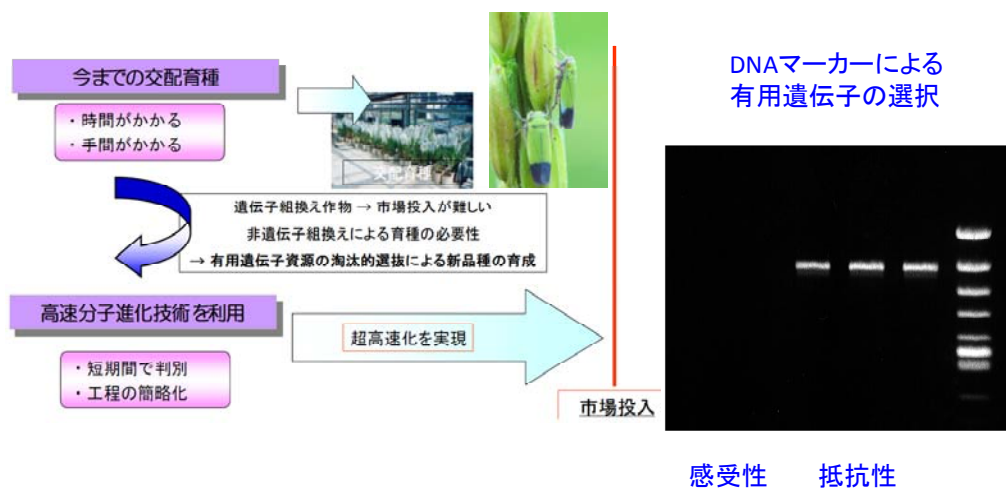
環境保護の観点から、化学農薬に頼らない栽培法の開発が進められている。埼玉県でも、県をあげて減農薬栽培に取り組んでいるが、さらに化学農薬の使用量を減らすためには、複数の病害虫に強い水稻の新品種を早期に育成することが不可欠である。

一方、ユーザーからは、病害虫に強い外部由来の遺伝子を導入した農作物、いわゆる遺伝子組換え作物に対しては安全性を危惧する声が強くなり、従来からの交配法で作った新しい品種が求められている。

これまで、従来からの交配法により病害虫（イネ縞葉枯病やツマグロヨコバイ）に強い品種を育種してきたが、多くの時間と労力を必要とすることから、ニーズに対応するためには革新的な育種技術を開発する必要に迫られている。そこで、遺伝子組換えなしに優良形質を保有した育種を可能とする DNA マーカーによる手法に注目し、取り組んできた。

これまで、埼玉県が保有する水稻の豊富な遺伝子資源から有用遺伝子を鑑定し、病害虫耐性 DNA マーカーを開発し、複数の病害虫に強い系統の早期育成手法（オーダーメイド育種）の目途をたて、現在、その効果を検証しているところである。

病気や害虫に強い水稻の高速分子育種



1. 埼玉県が保有する水稻の豊富な遺伝子資源
2. 有用遺伝子を鑑定
3. 病害虫耐性DNAマーカーを開発

応用分野

ツマグロヨコバイ抵抗性に連鎖する DNA マーカーを開発し特許化する。また、DNA マーカーを利用してツマグロヨコバイに抵抗性のあるコシヒカリ等を育成し、品種登録を行い市場に展開する。

ここで開発した水稻の分子育種技術は、他の栽培植物へも技術移転が期待される。

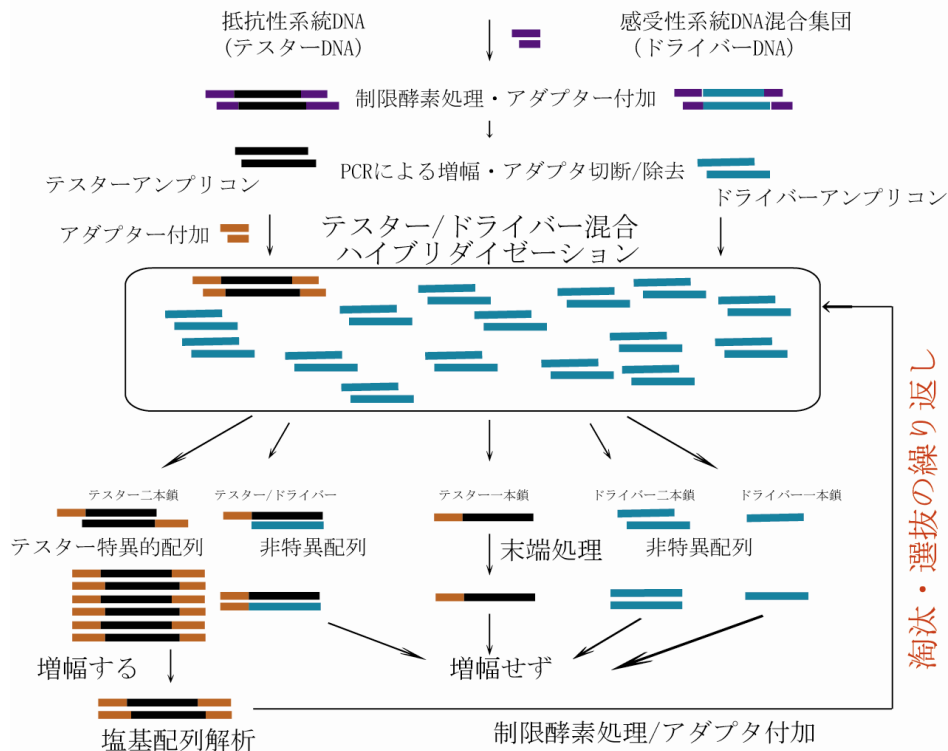
技術競争力

・戻し交雑育種法

戻し交雑育種法は、一つの育種目標を達成するために同一交配母本を用い、複数回交配を行って、その後、系統育種法や集団育種法などにより固定を図る方法である。ある品種に特定の形質のみを取り入れる場合に用いられる。DNA マーカーによる選抜は、ある品種に病害虫抵抗性遺伝子のような主働遺伝子を導入する場合に有利である。

・RDA による耐性系統特異的 DNA 断片解析 (RDA: Representational Difference Analysis)

RDAは、あるゲノム集団中に特異的に存在する塩基配列を検出するための技法である。簡単に言うと、ゲノムの引き算と言い換えられる。まず、求める特徴を有した引かれるゲノムをテスターDNA、引かれるゲノムの集合をドライバーDNAとする。この両者のゲノムDNAを同じ制限酵素で切断し、末端にアダプターを付加しPCRを行う。ゲノム上に同じ配列を持っておれば、同じ大きさのDNA産物を得ることができる。次に、ハイブリダイゼーションを行う。操作によりいろいろな二本鎖DNAが出来上がる。例えば、テスター同士、テスターとドライバーのキメラ、ドライバー同士、また、うまく接着できなかつたものができる。次に、ヌクレアーゼ処理して、アダプターに結合するプライマーを用いてPCRを行う。結果として、増幅されるのはテスターアンプリコン由来の二本鎖のみとなる。この操作によって得られた産物を、再度、別のアダプターを付加して同様の操作を行うことよりテスター特異的な産物が濃縮される。



・特異的塩基配列検出手法の比較

多型解析を行う場合、いろいろな手法がある。RAPD (Random amplified polymorphic DNA) は、操作は容易であるが再現性や DNA 断片の回収が困難であり、AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) や DD (Differential Display) は、再現性は高いが得られる DNA 断片が微量なため回収が難しいなど、一長一短がある。一方、RDA は、若干操作が繁雑であるが再現性の高さ、DNA 断片の回収が楽なことなど、多型解析をするのに大変便利な方法である。

出願特許

1. 特開 2006-121966 (2006.05.18)

(7)ゲノムプロファイリング (GP) 法

技術開発機関：埼玉大学大学院理工学研究科、タイテック株式会社

成果の展開

本技術は埼玉大学で開発され、遺伝子の特徴から生物の種を判別する簡易法として画期的な方法である。応用分野としては病原菌検査、微生物の同定とその動向モニタリングおよびコメ等の品種鑑定等に有用である。タイテック株式会社が基本特許権と商品（ハード機器）を持つが販路を拡大するにはソフト開発業者（有用データベース構築）との連携が必要である。

技術の概要

これまで、微生物を含む生物の判別は表現型を用いて行われてきた。しかし、表現型では判別が困難な生物が多く存在することが知られている。現在のシーケンス技術によれば、各生物のゲノム同士を比較することも可能だが、相当の手間とコストをかける必要があり、現実的ではない。また、より簡便な方法として、16S rRNA 遺伝子等の配列比較があるが、変異のためにPCRプライマーが適合せず、プライマーの設計をし直す必要が起きたりする。また、単一の遺伝子のみで種の同定、識別をしてしまうことは、木一本を観て森全体を分かったとしてしまうことに似て、十分な情報量を基にした判断とはいえない。そこで現在では、あらゆる生物に対して同一操作で簡便かつ迅速にしかも低コストでゲノム情報を引き出せる方法が求められている（図1）。

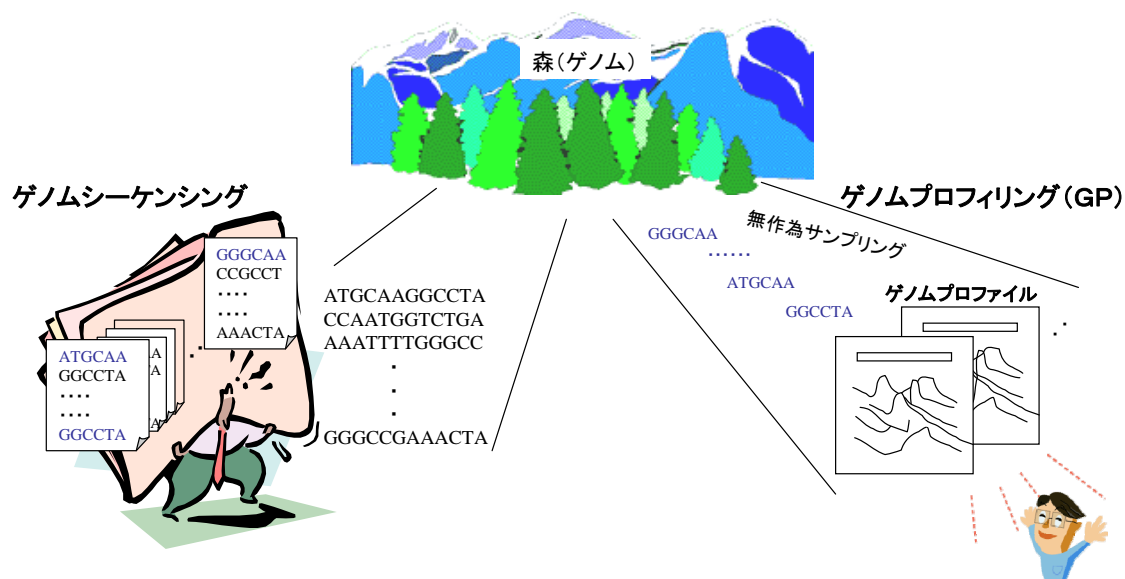


図1 ゲノムシーケンシングとゲノムプロファイリング

GP法では、森（ゲノム）の特徴を比較するのに必要十分な情報量をもったプロファイルが簡便に得られる。

GP法は次のように実施する（図2）。(1)同定対象である生物のゲノムを鋳型としたランダムPCRにより2本鎖DNA断片群を調製し、(2)2本鎖DNA断片群を温度勾配ゲル電気泳動（TGGE^{*1}）に付し、(3)電気泳動パターンから各DNA断片の同定ポイントを抽出し、(4)得られた同定ポイント群からPaSS^{*2}またはゲノム準距離を求め、(5)PaSSまたはゲノム準距離に基づいて生物の判同定、識別を行う。なお、TGGEによる電気泳動の際に、同定ポイントの基準点として標準DNAを共存させ、標準DNAとの位置関係から同定ポイントの擬絶対位置を決定する。この全工程を約3時間で実施することができる。また、これまでに、イネ、酵母、乳酸菌および浄化槽微生物について実績を積んできた（図2）。

※ 1 Temperature gradient gel electrophoresis.

※ 2 Pattern similarity score.

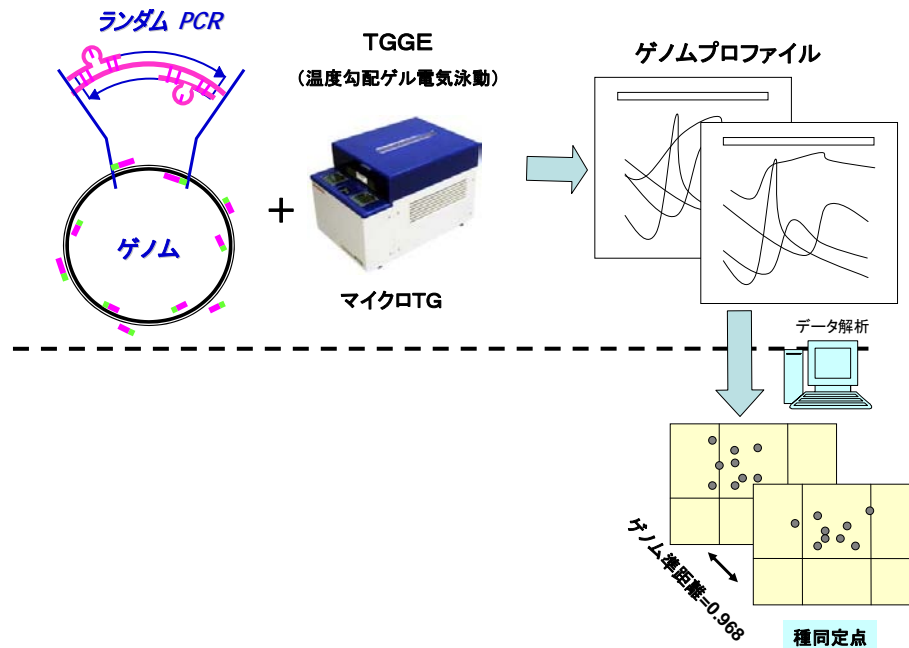


図2 ゲノムプロファイリング (GP) 法の概要
GP法は、情報量が多く、ランニングコストが低く
操作が簡便で、スピーディーに結果が得られる。

技術説明

・プライマーとランダムPCR

微生物等のゲノムDNAを鋳型とし、ある任意の配列のDNA断片をプライマーとして熱処理、アニーリングおよび伸長反応のサイクルを繰り返し行い、2本鎖DNA断片を得る(プライマーと鋳型DNA、そしてサイクル条件を一定にすれば再現性のある2本鎖DNA断片が得られる)。ここに、プライマーの塩基長および配列を変えることにより、ゲノムの配列情報を多面的に取り出すことができる。そのため、目的に適ったプライマーを適宜選択することが重要となる。プライマーは長すぎても、短すぎてもPCR産物の収量が低下する傾向があり、好ましいプライマーの長さは10～12塩基長である。なお、ランダムPCRの詳細条件は下記特開を参照のこと。

・温度勾配ゲル電気泳動 (TGGE)

得られた2本鎖DNA断片をTGGEにより分離展開する。TGGEはタイテック社製電気泳動装置マイクロTGを用い、2本鎖DNAの泳動方向に対して垂直方向に温度勾配をゲルに設けて行う。TGGEによって、個々の2本鎖DNA断片が有する塩基配列に固有のメルティング(2本鎖の解離)の挙動パターンが表れ、ゲル全体はゲノムの特徴を反映した像を表していることになる。

・同定ポイント座標化と標準規格化

TGGEによって得られたパターン像から、2本鎖が融解開始する点を特徴点としてピックアップする。10～12点の特徴点を得られ、これらの特徴点を温度勾配方向にx軸、移動度方向にy軸の座標に変換する。この際、TGGE時に対象試料と同時に泳動させた内部標準試料DNA(塩基配列既知)の特徴点を基準に、コンピューター上で座標の標準規格化を行う。

・ PaSS とゲノム準距離 (図3)

同定ポイント群 (温度及び移動度) から PaSS またはゲノム準距離を求める。PaSS とはパターン類似度であり、図4に示す式で表される。ゲノム準距離とは、PaSS を用いた2種の生物のゲノムの類縁状況を表す指標であり、 $(1 - PaSS) / PaSS$ で表される。PaSS またはゲノム準距離を用いて遺伝子型により微生物を分類・同定することができる。

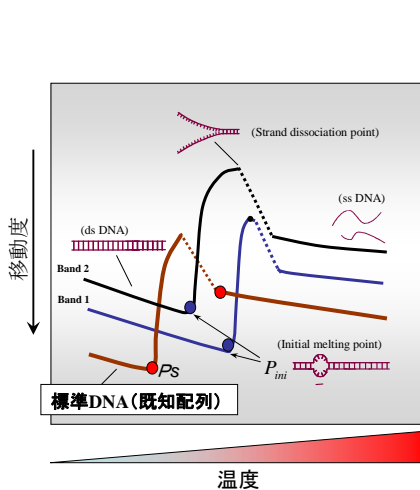
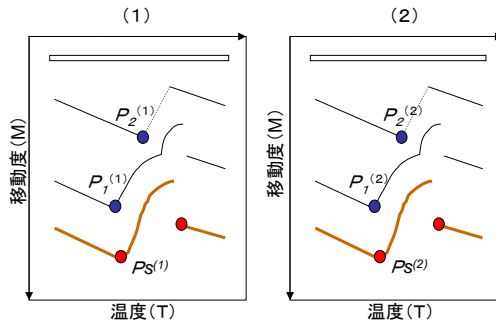


図3 TGGEにおけるDNAの変性過程
個々のDNAは塩基配列に応じた変性パターンを示し、プロファイル1枚はゲノムの特徴を示します。



標準DNAの特徴点座標 (Ps) を基準にゲルおよび泳動毎の微妙なズレを補正し、各DNAの特徴点を標準規格化

下式に従い、2者間のゲノム準距離を算出

$$PaSS = 1 - \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n \frac{|\bar{P}_i^{(1)} - \bar{P}_i^{(2)}|}{|\bar{P}_i^{(1)}| + |\bar{P}_i^{(2)}|} \quad 0 \leq PaSS \leq 1$$

$|\bar{P}| = P(T, M)$ PaSSが1に近いほど類似性が高くなる

図4 GPのデータ解析およびゲノム比較計算

・ 病原性酵母への適用

図5および6にGP法を病原性酵母に適用して得たデータを示す。*C. albicans* 12株および*C. Tropicalis* 9株について解析を行った結果、両者は明確に別のクラスターに分かれ、GP法は種レベルの識別には十分応えうることを確認した。なお、従来法では*C. Tropicalis* に分類されていたものが異種 (*C. parapsilosis*) であることが分かった (図5, 6)。

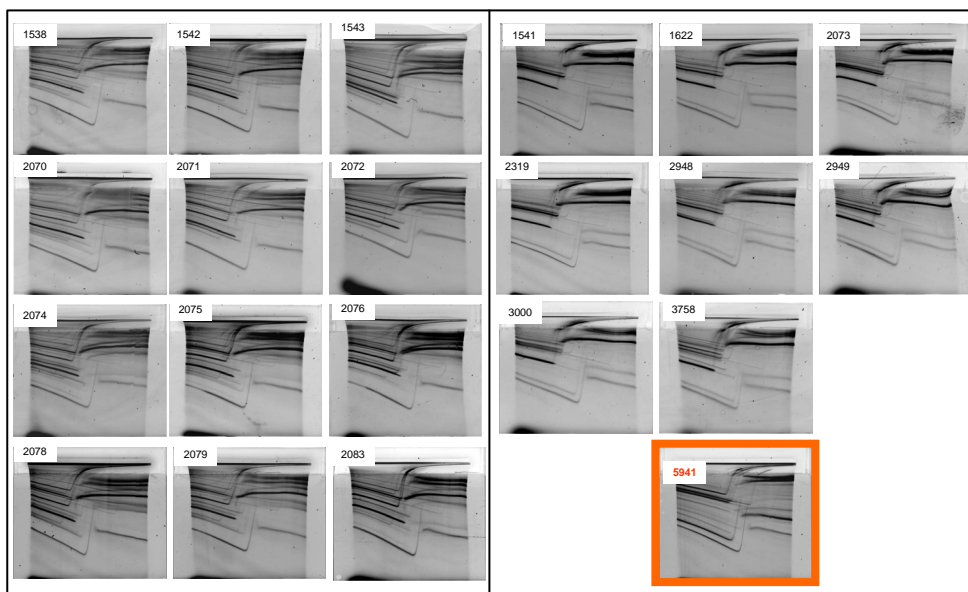


図5 病原性酵母 *C. albicans* (左) と *C. Tropicalis* (右) の株のゲノムプロファイル

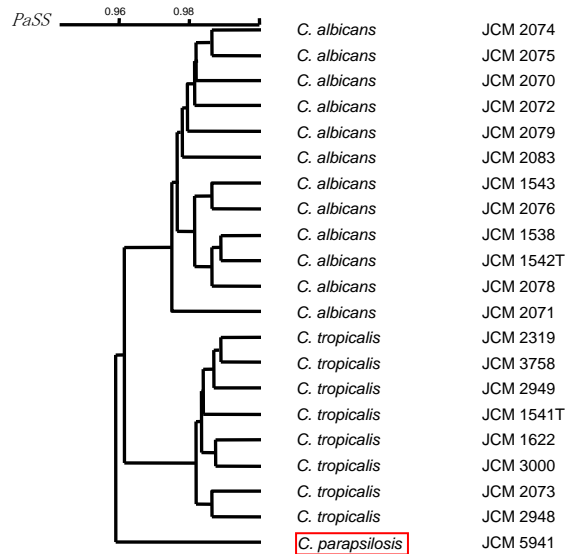


図6 上記病原性酵母2種の株のGPから求めた系統樹
 □ 枠はGP法で異種であることが判明した。

応用分野

- ・病原菌検査市場

微生物が原因になる疾患、例えば、O157、結核、MRSA等の菌種の同定や感染経路の把握に、操作が簡便で迅速に実施できる方法が求められている。

- ・バイオレメディエーション市場

微生物の同定と生態モニタリングを簡便かつ迅速に実施できる方法が求められている。

- ・品種鑑定市場

コメ等の品種鑑定市場が形成されつつある。

技術競争力

- ・ゲノムシーケンシングおよび16S rRNAの配列比較

各微生物のゲノム(全体)同士を比較することにより微生物の種の同定、識別をすることは、現在のシーケンス技術レベルでは十分可能である。しかし、相当の時間とコストをかける必要があり、簡便な方法ではない。また、より簡便な方法として、ゲノムの一部の配列比較をする方法があるが、例えば16S rRNA遺伝子の配列比較では、同一の配列であるという結果になっても、他の遺伝子配列が異なっていたという報告がある。単一の遺伝子の配列情報だけでは十分な情報量とは言えず、この方法による種の識別・同定には落とし穴があると言われている。

出願特許

1. 特開2001-299398、US 6,856,915
2. 特開2001-305104 (2001.10.31)
3. 特願2004-350694 (2004.12.03)

(8) 効率的遺伝子ターゲティング技術

技術開発機関：埼玉大学大学院 理工学研究科

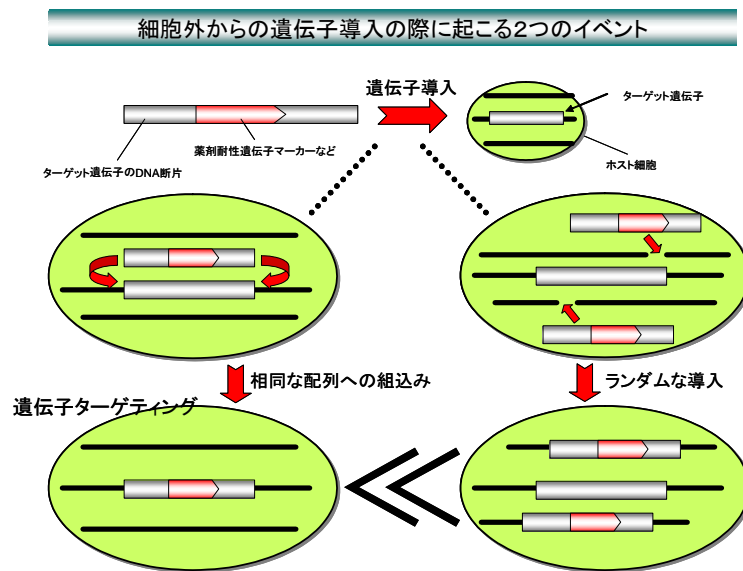
成果の展開

相同組換えによる遺伝子ターゲティング技術はこれまでに例がなく、効率的に意図する場所に遺伝子を導入する、あるいは置き換えることができる技術として画期的である。本技術は麹菌に対しても応用できることから、国内の味噌・醤油等の醸造会社に技術移転する方向で話を進めている。また、フェーズⅢの基幹事業である都市エリア産学官連携促進事業における基本技術として、抗体の生産技術改善に活用する計画である。

技術の概要

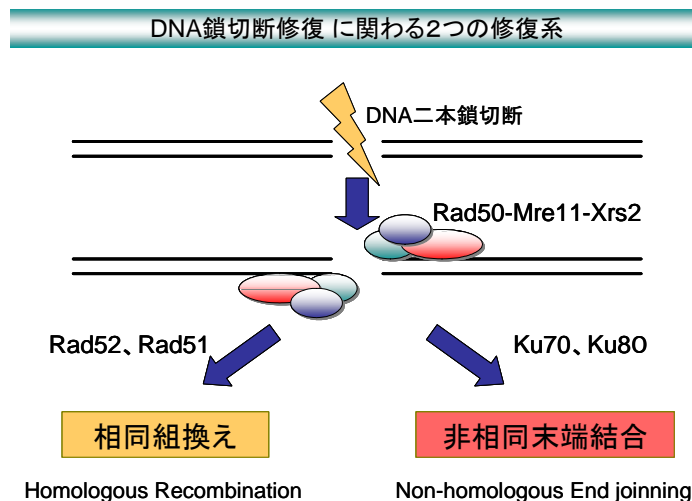
- ・ 遺伝子ターゲティングとは

遺伝子ターゲティングとは、細胞外から DNA を導入して、細胞内の特定の遺伝子のみを破壊したり、改変したりすることである。



- ・ 相同組換えと非相同組換え

真核細胞では、DNA鎖が切断された場合の修復系として、相同組換えと非相同組換えの2つの修復経路が確認されている。



真核細胞における遺伝子ターゲティング効率

生物種	相同配列長 (kbp)	遺伝子ターゲット率	文献
出芽酵母	0.06	90%	1)
分裂酵母	0.08	80? 90%	2)
コウジカビ	1.27	5.4%	3)
アカパンカビ	2	3? 5%	4)
タバコ	2	0.0084%	5)
ほ乳動物細胞	0.8	0.00037%	6)

- ・真核生物の中でも酵母は例外的に相同組換えを行うので、ターゲット率が高い。
- ・高等生物ほど、ターゲット率は顕著に低くなる。
- ・酵母以外の生物で人為的にターゲット率を上昇させる方法は成功していない。

文献 1) Takita *et al.* 1997, 2) Bahler *et al.* 1998, 3) Bird and Bradshaw 1997, 4) Handa *et al.* 2000, 5) Lee *et al.* 1990, 6) Pierce *et al.* 1998

相同組換えは、DNA の相同な配列間における相互作用により誘起されるのに対し、非相同組換えは、DNA の相同性とは無関係に、切断された二重鎖の末端が直接結合されることで起こる。出芽酵母など、真核細胞のごく一部では、相同組換えのシステムが主に使用されているが、ヒト、動物、植物、昆虫および出芽酵母以外の多くの微生物では、非相同組換えのシステムが主に使用されている。

相同組換えに基づくターゲティングは、既存の遺伝子を効率よく改変することが可能で、新種株の作出などの目的に利用することができる。そのため、これまでも相同組

換え率を向上させる試みが数多く行われてきたが、依然として相同組換え頻度は極めて低く（1%以下）、かつ、煩雑な操作が必要なことから実用的な方法ではなかった。

・相同組換え頻度の向上による効率的遺伝子ターゲティング

上記事情に鑑み、開発者らは、アカパンカビにより相同組換え率を向上させる方法について鋭意研究を重ねた結果、意外にも、非相同組換えに必要な遺伝子である KU70 および KU80 の機能を喪失もしくは低下させることで、真核細胞における相同組換え頻度を著しく向上させることを見出した。本方法によれば、100%に近い相同組換え頻度が得られ、遺伝子の破壊や遺伝子の置換を効率よく行うことができる。また、異種生物の遺伝子をゲノムの特定領域に挿入し、発現させることが可能となる。

アカパンカビにおける遺伝子ターゲティング効率の向上

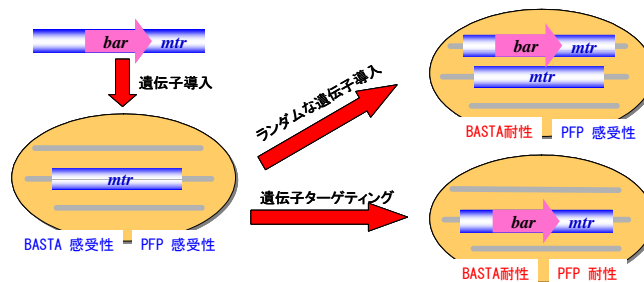
アカパンカビ株	BASTA耐性	PFP耐性	遺伝子ターゲティング
野生株	238	38	16%
非相同末端結合欠損株			
$\Delta ku70$ (<i>mus-51</i>)株	168	168	100%
$\Delta ku80$ (<i>mus-52</i>)株	275	275	100%
相同組換え欠損株			
$\Delta rad51$ (<i>mei-3</i>)株	93	3	3%
$\Delta rad52$ (<i>mus-11</i>)株	65	0	0%

応用分野

本方法の基礎研究、応用研究および産業分野に及ぼす影響は極めて大きく、基礎研究では遺伝子の機能解析に大きな威力を発揮し、応用研究では、自在にデザインした DNA をゲノムの特定の位置に組み込むことや、逆に、特定の遺伝子を除去するのに有効である。産業分野では、微生物を用いて製品を生産する、医薬品、食品、工業用品および生活用品の分野に大きなインパクトを与える。具体的には、消化酵素剤やかび由来の生理活性物質等の医薬品に、また味噌、醤油、酒、食酢、チーズ等の醸造や発酵食品に、アミラーゼや異性化糖酵素

等の工業用品に、リパーゼやプロテアーゼ等の生活用品に応用することができる。

アカパンカビにおける遺伝子ターゲティング実験系



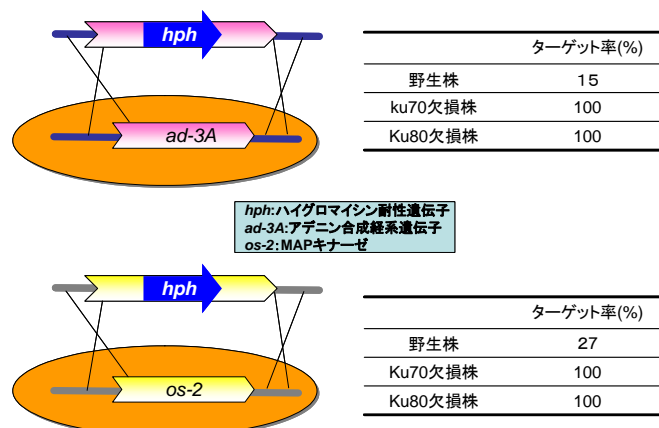
Bar 遺伝子: 抗生物質BASTA耐性遺伝子

Mtr 遺伝子: アミノ酸取り込みに関連する遺伝子。この遺伝子があると、アミノ酸アナログPFP(p-フルオロフェニルアラニン)を取り込み感受性を示す

・他の標的遺伝子での実施例

アカパンカビで、前述の *mtr* 遺伝子をターゲットとした *bar* 遺伝子の導入の他に、*ad-3A* 遺伝子および *os-2* 遺伝子をターゲットとした *hph* 遺伝子の導入においても 100% のターゲット率が確認されている。

アカパンカビにおける他の標的遺伝子での実施例



hph: ハイグロマイシン耐性遺伝子
ad-3A: アデニン合成経系遺伝子
os-2: MAPキナーゼ

技術競合力

・出芽酵母をモデルとする方法

出芽酵母の相同組換えにおいて重要な役割を果たしている *RAD51* 遺伝子あるいは *RAD52* 遺伝子またはそのホモログ遺伝子を他の生物で高発現させる系が試みられているが、それほど相同組換え頻度があがらず、むしろ細胞にとって悪い影響を与えることが報告されている。

・ベクターを改良する方法

受容細胞の方を工夫するのではなくベクター側の改良が試みられ、多くの多様なターゲットベクターが開発されている。ほ乳類細胞や植物細胞でのネガティブ・ポジティブ選択法による相同組換え個体の濃縮法はその代表的なものであるが、それによっても依然として頻度は極めて低いのが現状である。

出願特許

1. 特願 2004-052592 (2004.02.27)
2. 特願 2006-132662 (2006.05.11)

(9) 新たな創薬標的とその制御分子

1) カテプシンEの新生理機能と制御分子

本事業の中から新たな創薬標的分子としてカテプシンEの生理機能が九州大学の山本教授により明らかになり、その機能を制御するDNA及びペプチドアダプターの開発が埼玉大学西垣教授、ジェナシス（株）の共同で進んでいる。カテプシンEの生理機能の概要を図1に示したが、最近になりカテプシンEそのものが特異的にガン細胞のアポトーシスを誘導し、がん治療薬としての可能性も出てきた。カテプシンEの制御分子に関してはフェーズIではDNAアダプターの開発を目指したが、将来的な創薬シードとしてはペプチドの方が発展性が期待されることからフェーズIIではペプチドアダプターの開発に方針を切り換えた。既に、カテプシンE活性を特異的に阻害、或いは亢進するいくつかのペプチドアダプターが得られ、この開発研究は「都市エリア事業」に引き継がれ鋭意研究が進められている。これらの詳細に関しては今後の特許対策、企業秘密の都合上ここでは触れないがその概要は図2～4に示した。

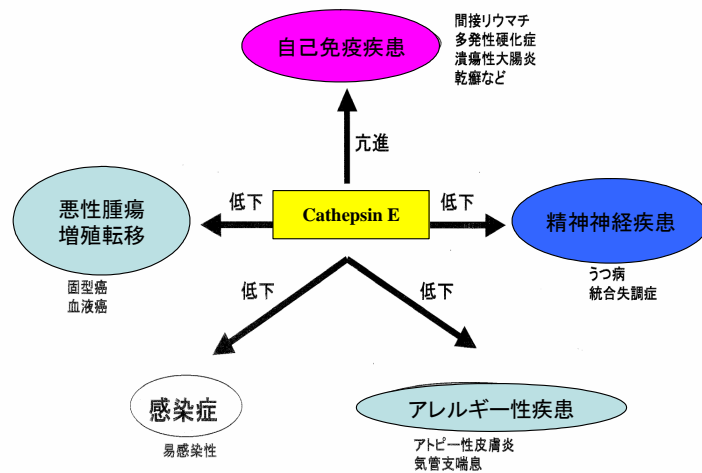


図1 カテプシンEと疾患との関連性

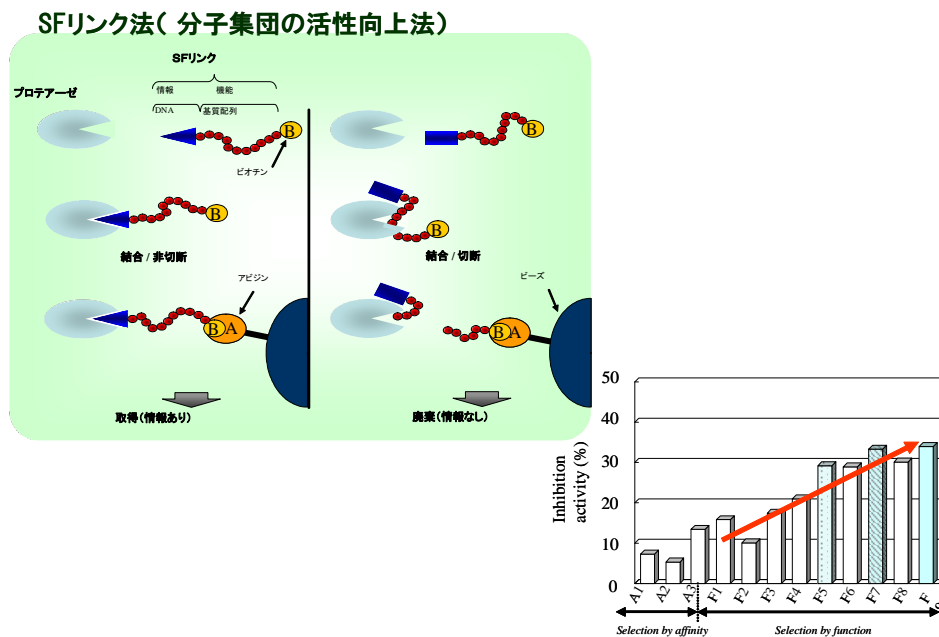


図2 カテプシンE制御ペプチドアダプターのスクリーニング法の概要

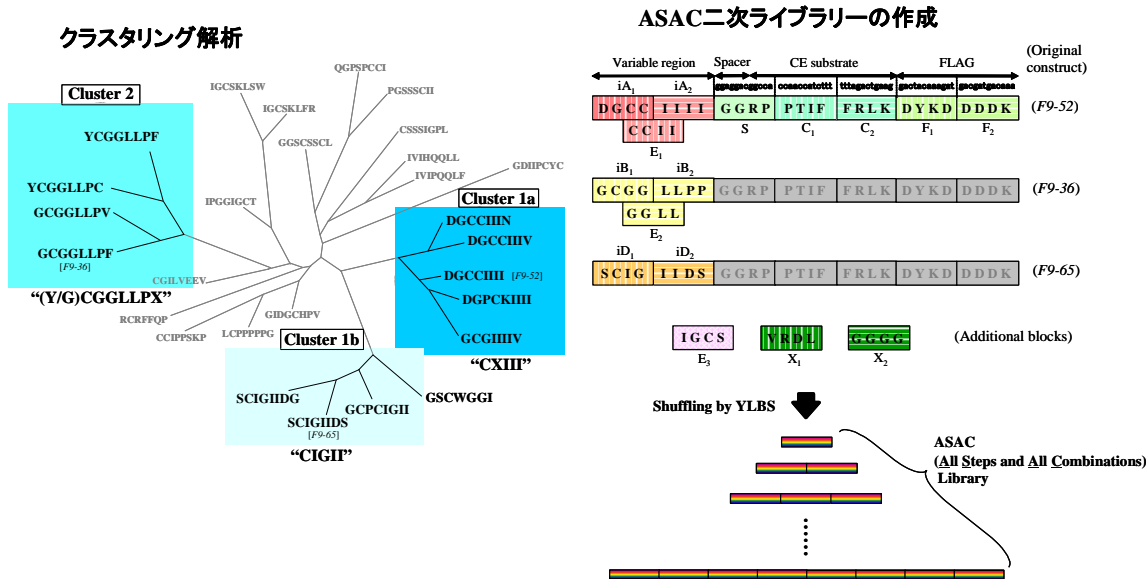


図3 二次ライブラリー作成法の概要

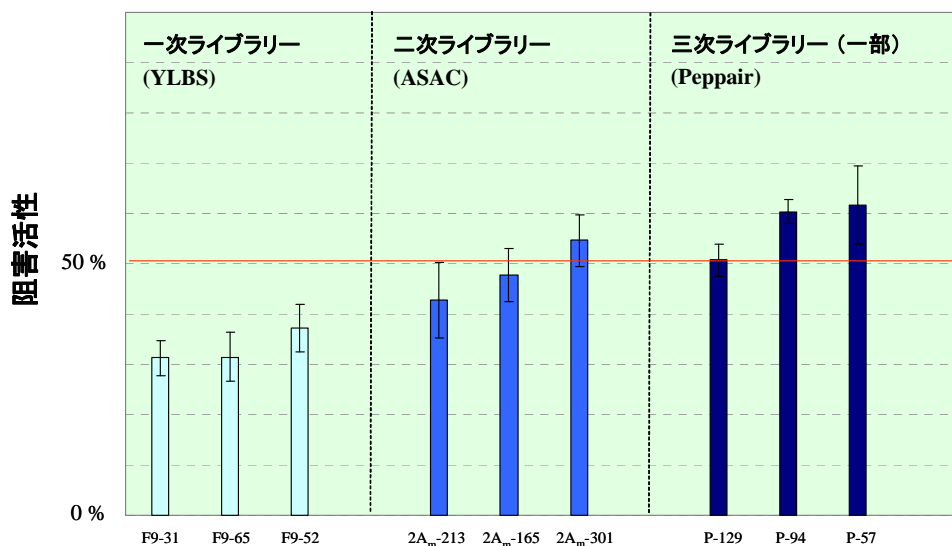


図4 ライブラリーの段階的作成による阻害活性の向上

2) 創薬のための分子標的の発見

1. マウス小児型神経軸索ジストロフィーの原因となる変異タンパク質を同定。
2. がん関連新規分泌タンパク質、somatogenin を発見。

今後、進化分子工学によってアンタゴニスト、アゴニストの開発を目指す

3. 腫瘍マーカーとしてのNNMT (特許出願中のため詳細は割愛)

1 は埼玉がんセンターで発見された自然発症マウス小児神経軸索ジストロフィー症 (INAD) の原因遺伝子であり、2 は埼玉大学井上教授によって発見された somatogenin である。

INAD 原因遺伝子は神経軸索の輸送に係わる分子であるがこの分子の点突然変異によって発症することが、埼玉県立がんセンターと公社の共同で解明された。現在、新潟大学脳研究所でヒト神経変性疾患で同様な変異が見られる症例があるか検討が進められている (図5)。研究の機密上その詳細は割愛する。

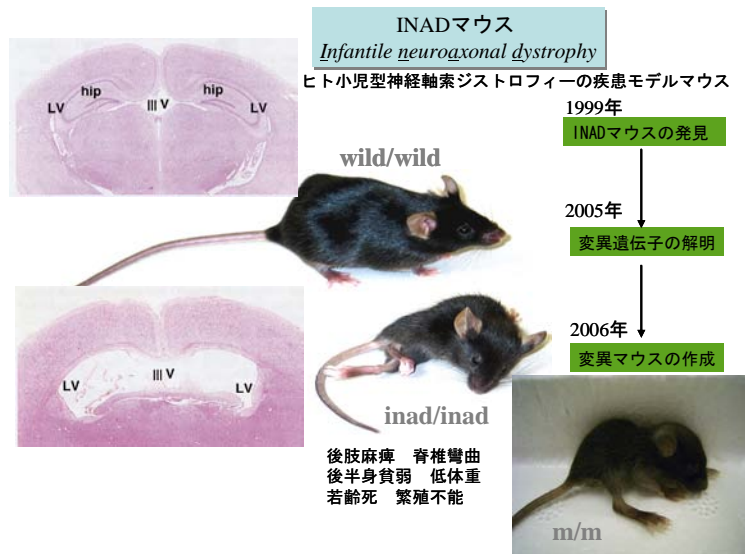


図5 新たな創薬標的分子の発見

Somatogenin は最初マウスから発見されたが、ヒトでも同様の分子が確認され共通の作用を有する生理活性分子であることが分かった。Somatogenin はがんとの関連性、或いはエネルギー代謝との関連性がトランスジェニックマウスの作成、リコンビナント somatogenin を用いた *in vitro*, *in vivo* 解析、さらにはヒト病理標本での解析等から明らかになりつつある (図6~12)。

創薬標的としての可能性研究は現在大手製薬企業との共同研究の交渉が進んでいるので秘密保持の点からここでは詳細については触れない。本物質の研究はその一部が「都市エリア事業」に継承される。

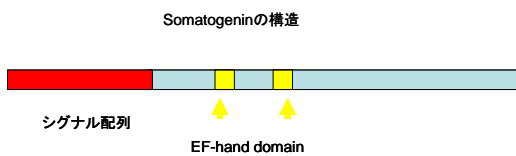


図6 Somatogenin 分子構造

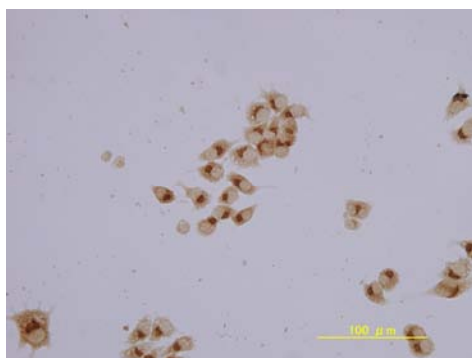


図7 Somatogenin の分泌

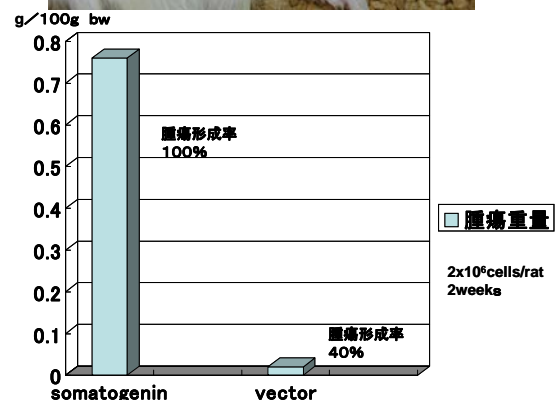


図8 Somatogenin による腫瘍形成

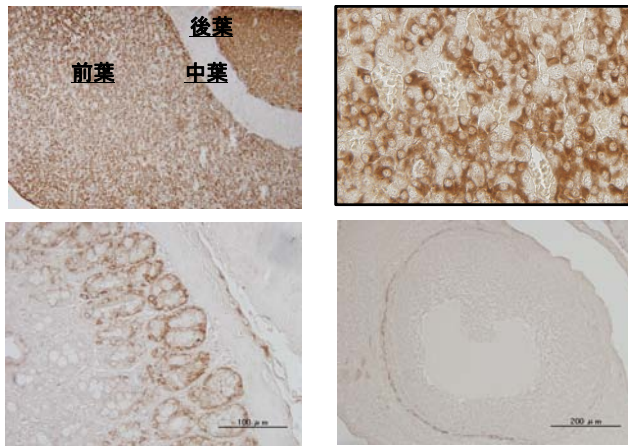


図 9 Somatogenin の病理染色

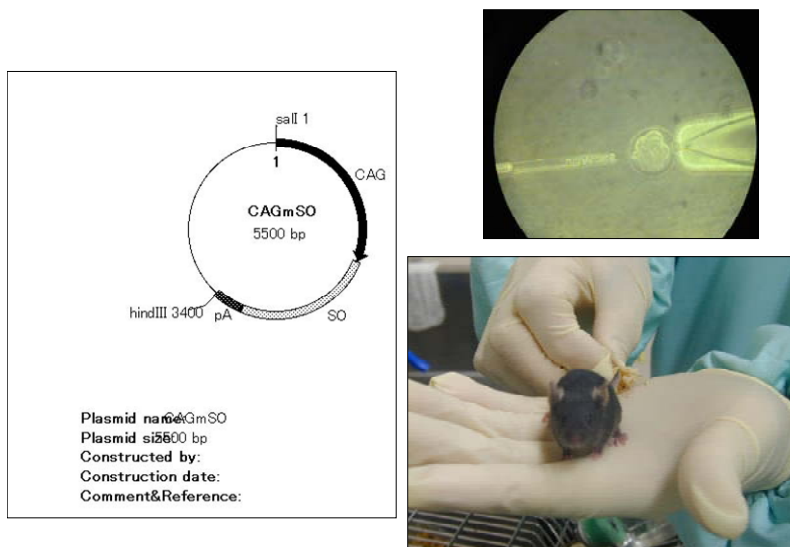


図 10 Somatogenin の TG マウスの作成

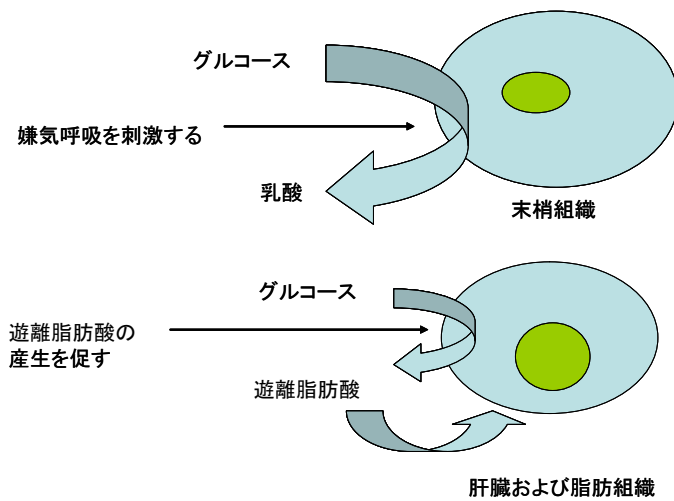


図 11 Somatogenin の作用機構

Somatogenin に関しては今後次の検討を進め、新たな創薬資源として利用する予定である。

- ・腫瘍の治療・診断薬、治療薬の開発
- ・脳や心臓の梗塞・老化の治療・診断薬の開発
- ・細胞保存
- ・その他