

<p>サブテーマ名：A 高速分子進化のための基盤技術の開発 小テーマ名：A2 配列空間適応歩行技術の展開</p>
<p>サブテマリーダー：埼玉大学大学院理工学研究科、教授、西垣 功一 (○:小テーマ代表者) 研究従事者：(財)埼玉県中小企業振興公社、雇用研究員、○相田 拓洋、二木 類 埼玉県産業技術総合センター北部研究所、主任、仲島日出男、富永 達矢 豊橋技術科学大学大学院工学研究科、准教授、後藤 仁志</p>
<p>研究の概要、新規性及び目標</p> <p>①研究の概要</p> <p>進化分子工学におけるダーウィン進化とは配列空間における適応度の山を登山することである。山の地形の統計的性質がわかっていると合理的な山登りができる。これを適応歩行技術という。具体的には逐次の突然変異体ライブラリーを地形の性質に合わせて作製するのである。次の2つの分子の進化を例題として、適応歩行技術を改良する。</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>・ペディオシン（抗菌ペプチド）の抗菌スペクトルの改変： 配列空間適応歩行技術を利用して、ペディオシンの進化工学実験を行い、抗菌活性が上昇した改良体の取得を目指す。</li> <li>・アルデヒド還元酵素の耐熱化： 偏向変異集積（BMA）法をアルデヒド還元酵素の耐熱化に適用する。BMA法一般のための1次ライブラリー作成法の改良を行う。また、実験室内分子進化の理論を発展させる。</li> </ul> <p>②研究の独自性・新規性</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>・ペディオシンの抗菌スペクトルの改変： 様々なペディオシンの変異体が、これまでに多くの研究室で得られているが、そのほとんどで抗菌活性は低下している。本研究では、ペディオシンの改変に配列空間適応歩行技術を用いるが、本技術は進化分子工学理論により裏付けられており、独自性が高い技術である。</li> <li>・アルデヒド還元酵素の耐熱化： BMA法は少数のスクリーニングサイズで効率的に進化させる点において、世界的にも独自性・優位性があり、その改良は新規性がある。アルデヒド還元酵素は耐熱化により人工透析等に使用できる新規性がある。</li> </ul> <p>③研究の目標</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>・ペディオシンの抗菌スペクトルの改変： フェーズⅠでは、ペディオシン1アミノ酸変異体ライブラリーの作製。フェーズⅡでは、ペディオシン1アミノ酸有利突然変異体のスクリーニングと得られた変異体の分子交雑。フェーズⅢでは、交雑ペディオシンの抗菌剤、食品工業への展開。</li> <li>・アルデヒド還元酵素の耐熱化： フェーズⅠでは、BMA法を適用するためのアルデヒド還元酵素耐熱化の1次スクリーニングを行う。また、実験室内分子進化の理論を構築する。フェーズⅡでは、フェーズⅠの結果を受けて、当初計画を変更しBMA法における一次スクリーニングに関する方法論をより詳細に検討する。これを用いてアルデヒド還元酵素の人工透析法への活用を目指して機能改変を行う。BMA法一般のための1次ライブラリー作成法の改良を行う。フェーズⅢでは、実益性を有する新規機能性生体高分子（医療用酵素、工業用酵素）を創出する。</li> </ul> <p>研究の進め方及び進捗状況（目標と対比して）</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>・ペディオシンの抗菌スペクトルの改変：フェーズⅠで、約1200種類からなるペディオシン1アミノ酸変異体ライブラリーを構築した。フェーズⅡで、ライブラリーから6種類の有利突然変異体を選抜し、その交雑体を全ての組み合わせについて作製した。そのうち1種類の変異体ではもとのペディオシンよりも大幅に抗菌活性が上昇していることが確認された。ペディオシンとその変異体による抗菌スペクトルを得た。</li> <li>・アルデヒド還元酵素の耐熱化： フェーズⅠでは、アルデヒド還元酵素における効率的な変異体スクリーニングシステムを確立した。次いで耐熱化の第一段階として<i>in silico</i>スクリーニングにより予測した部位への網羅的な1アミノ酸変異を導入し、耐熱性クローンをスクリーニングし1次ライブラリーを獲得した。フェーズⅡでは、1次ライブラリーの情報に基づき、アミノ酸残基の統計的な加算性を利用した多重置換体を作製し耐熱性クローンを獲得した。理論面では、適応度地形の統計的描像を得た。</li> </ul>

主な成果

具体的な成果内容：

(1) 配列空間適応歩行技術を利用することにより、酸敗食品から分離された細菌株に対する抗菌効果がもとのペディオシンよりも大幅に向上した変異体の取得に成功し、さらに、変異型ペディオシンの抗菌活性スペクトルを改変することに成功した。

(2) アルデヒド還元酵素構造安定性スコアが高い20箇所のアミノ酸部位に変異を導入し各変異導入箇所につきスクリーニングした結果、9箇所のアミノ酸部位において耐熱性に優れた(60℃で1時間処理後の酵素活性が野生型の2倍程度)クローンを獲得。1次ライブラリーの情報を基にピンポイント配列予測による多重置換体を獲得、耐熱性は野生型の4倍程度であった。

(3) 適応度地形の探査法を理論的観点から考案し、それを実在の蛋白質に適用したことで、適応度地形の統計的描像を世界で初めて得た。

特許件数：1件 論文数：12件 口頭発表件数：18件

研究成果に関する評価

1 国内外における水準との対比

・様々なペディオシンの変異体が、これまでに多くの研究室で得られているが、それらはError-Prone PCR法などにより変異体を作製したもので、そのほとんどで抗菌活性は低下している。今回の研究では、配列空間適応歩行技術を変異体取得のために用いており、この点に独自性がある。

・コンピュータによる理論計算によって、蛋白質の耐熱化部位の予測の正答率が9/20であったことは、これまでの国内外における予測の精度からして有意に大きな値である。適応度地形の合理的探査法を実在の蛋白質に適用したことで、適応度地形の統計的描像を得たが、これは世界で初めての知見であると思える。

2 実用化に向けた波及効果

・ペディオシンはペプチドであるため、既存の抗生物質・抗菌剤と比較して生体への影響が少なく、食品保存剤あるいは食品製造素材への展開が見込まれる。

・アルデヒド還元酵素を耐熱化するアミノ酸置換が複数同定されたことは実用面から意義がある。コンピュータを用いた理論計算による蛋白質の耐熱化部位の予測法は実用化できる可能性が見いだされた。

残された課題と対応方針について

(1) 今回得られた改変ペディオシンは、食品腐敗菌のある株に対しては非常に高い抗菌活性を示したものの、ほかのある株に対しては効果を示さなかった。今後、この効果を示さなかった細菌株を対象として同様の進化工学実験を行い、今回得られた改変ペディオシンとは配列が異なるペディオシンの取得を目指す必要がある。

(2) アミノ酸置換による耐熱性の向上の程度が、天然配列に比較して数倍であることから、未だ実用化レベルではない。これらの寄与をBMA法でさらに複数集積することで大きな向上をもたらす。常温での活性が低下する傾向もあるので、BMA法を活用してこの低下を抑える。

	J S T 負担分 (千円)							地域負担分 (千円)							合計
	H 14	H 15	H 16	H 17	H 18	H 19	小計	H 14	H 15	H 16	H 17	H 18	H 19	小計	
人件費	96	3,069	6,629	12,118	15,641	7,451	45,004	922	12,198	10,830	5,515	2,225	1,367	33,057	78,061
設備費	9,909	2,981	1,717	40			14,647							0	14,647
その他研究費 (消耗品費、 材料費等)	1,152	6,247	5,191	5,647	5,800	3,600	27,637	200	1,190	2,250	2,910	3,146	1,250	10,946	38,583
旅費		82	140	299	205	53	779				189	154		343	1,122
その他		365	627	928	1,162	626	3,708	43,809	1,048	1,048	873	873	873	48,524	52,232
小 計	11,157	12,744	14,304	19,032	22,808	11,730	91,775	44,931	14,436	14,128	9,487	6,398	3,490	92,870	184,645

代表的な設備名と仕様 [既存 (事業開始前) の設備含む]

J S T 負担による設備：PCR装置、蛍光偏光プレートリーダー

地域負担による設備：

※複数の研究課題に共通した経費については按分する。