特集

「バイオものづくり」のための共通基盤技術　3

微生物パウダーを利用した新規微生物機能スクリーニング

バイオテクノロジーツール創出のための微生物機能探索技術

小川　順 Jun OGAWA　原　良太郎 Ryotaro HARA
竹内道樹 Michiki TAKEUCHI

環境親和性が高い物質生産形態として，微生物機能を活用したバイオプロセスに期待が集まっている。その多様な分野への展開や社会実装を実現するためには，多様な微生物機能の創出が望まれる。本稿では，新たな微生物機能の探索に有用な微生物パウダーライブラリーを紹介する。ゲノム情報の蓄積が目覚ましい反面，いまだに機能未知遺伝子が多い中，表現系レベルでの機能探索を支援する微生物パウダーライブラリーの重要性は高い。その特徴と，活用の実例，新規バイオテクノロジーツールの創出に向けた今後の展開を紹介したい。

微生物パウダーとは

循環型社会の構築に向け，環境負荷が低い物質生産形態として，微生物の物質変換能を活用するバイオプロセスに注目が集まっている。その開発には，多様な機能遺伝子の獲得が必要とされているが，ゲノム解析が進んでいる大腸菌ですら，いまだに3〜5割の遺伝子が機能未知であり，有用遺伝子の抽出が十分に容易な状況にあるとは言えない。また，遺伝子産物どうしの相互作用により発現する高度な機能や微生物間の相互作用により発現する機能を，個々の遺伝子に還元して理解する技術，さらには，そこから統合的に高次の生物機能を理解し応用する技術の開発は，まだまだこれからである。筆者らは，機能ならびに表現型レベルでの探索により，機能と関連付けられたゲノム情報を拡張し，有用遺伝子・宿主の選抜を効率化するための技術基盤構築に取り組んでおり，その1つが微生物パウダーライブラリーの整備とそれを活用する機能探索技術開発である。

微生物パウダーとは，微生物の培養細胞を乾燥し破砕した粉末である。一見古典的であるが，これらの粉末を試薬のように用いることで，微生物を扱うことに付随する様々な面倒を払拭することができる。結果，多菌種，多数の微生物を対象とした機能レベルでの探索，特に遺伝子情報の乏しい新規な機能を見いだす際の一次スクリーニングにおいて重要なツールとなる。

筆者らは，NEDO「バイオものづくりプロジェクト」の研究テーマ「データ駆動型統合バイオ生産マネジメントシステム（Data-driven iBMS）の研究開発」において，NBRC（独立行政法人製品評価技術基盤機構バイオテクノロジーセンター）と協力して，多菌種の微生物パウダーのライブラリー化に取り組んだ。京都大学では，細菌，放線菌，酵母，カビ，担子菌といった幅広い微生物種，食品用などの目的別菌種を包括する約2000株のライブラリーを構築した（図1）。NBRCにおいては，作製手順の最適化により，菌種間のばらつきを抑え品質の安定化を図った微生物パウダーが，「細菌セット」「放線菌セット」「酵母セット」「高温菌セット」の4種類，1セットあたり94株（96穴マイクロプレートに対応）にて整備され，市販体制が構築されつつある。

おがわ・じゅん
京都大学大学院農学研究科応用生命科学専攻　教授
〔経歴〕1995年京都大学大学院農学研究科農芸化学専攻博士後期課程修了，博士（農学）。日本学術振興会特別研究員，京都大学農学研究科助手，フランス国立農業研究所客員研究員，京都大学微生物科学寄附研究部門・特定教授を経て，2009年より現職。〔専門〕応用微生物学。〔趣味〕クラシック音楽（オーボエ，指揮），酒遊食楽。
E-mail: ogawa.jun.8a@kyoto-u.ac.jp



はら・りょうたろう
京都大学大学院農学研究科産業微生物学講座（産学共同講座）　特定准教授
〔経歴〕2009年早稲田大学大学院理工学研究科応用化学専攻博士後期課程修了，博士（工学）。同大学理工学術院先進理工学部応用化学科助手，同大学理工学術院総合研究所研究院講師を経て，18年より現職。〔専門〕応用生物化学，酵素工学。〔趣味〕ツーリング，ジム通い。
E-mail: hara.ryotaro.4w@kyoto-u.ac.jp



たけうち・みちき
京都工芸繊維大学分子化学系　助教
〔経歴〕2015年京都大学大学院農学研究科応用生命科学専攻博士後期課程修了，博士（農学）。日本学術振興会特別研究員，京都大学農学研究科研究員，同大学大学院農学研究科産業微生物学講座特定助教を経て，24年より現職。〔専門〕応用微生物学。〔趣味〕ドライブ，パン屋巡り。
E-mail: michiki@kit.ac.jp





図 1　微生物パウダーの作成とライブラリー化ならびに活用

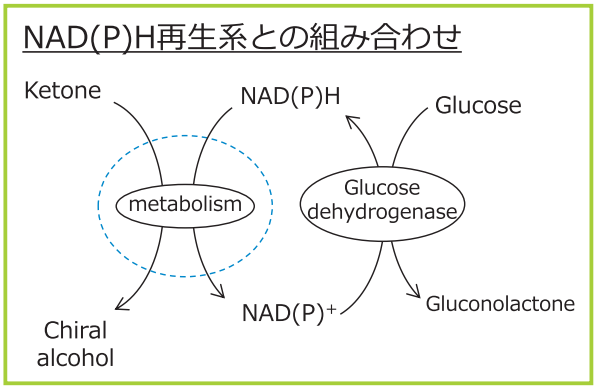


図 2　還元型補酵素再生系を共役させたカルボニル還元群の探索系（青点線がパウダー化微生物）

微生物パウダーを用いる機能探索の特徴

微生物パウダーライブラリーの利用により，スクリーニング時の菌体培養の手間を省くことができ，以下の特徴から，効率的な物質変換機能の探索が可能となる。

1）培養済みであり生育阻害因子への配慮が不要。
2）膜処理により基質，補酵素（NAD(P)H，PLP，ATP，CoA など），生成物などの膜透過性に秀でている。
3）補酵素添加で補酵素要求性反応を顕在化できる。
4）水分が少なく疎水性物質や有機溶媒と相性が良い。
5）菌体が丸ごと使えることにより，一酵素のみならず一連の代謝系までを評価可能。
6）細胞間の物質のやり取りが容易なため，複合酵素系や複合微生物系の機能を評価可能。
7）作成処理に耐えた高安定性ツールが獲得可能。

一方，デメリットもある。パウダー化菌体は，誘導基質を含まない条件で培養しているため，誘導酵素には適用できない。また，膜タンパク質群など，タンパク質相互作用が機能維持に必要な酵素系の場合，高次構造の破壊により機能が弱化する可能性がある。

微生物パウダーを用いた探索事例

酵素探索では，アミドヒドロラーゼ[1]，リパーゼ/エステラーゼ[2]，グリコシダーゼ[3]といった加水分解酵素のような単一酵素系の場合，基質と微生物パウダーを緩衝液中で混合，インキュベートするだけでも活性が検出され，実用化につながったものもあった[4]。この際，微生物パウダーにおける基質・生成物の膜透過性向上が功を奏し，洗浄菌体では観測されない活性が微生物パウダーを用いる場合は検出可能となる事例が見られた。加水分解酵素以外でも，芳香族カルボン酸脱炭酸酵素，アミノ酸酸化酵素において，この傾向を観察した。また，反応系への金属イオン等の補因子の添加も容易で，金属依存性活性なども顕在化できた。また，pH，温度などの条件の多様化も容易である。

スクリーニングにおいては，ハイスループットな検出系（蛍光・吸光度分析など）が選択されるケースが多いが，微生物パウダーの場合は，菌体を丸ごと用いていることから予想外の生成物の蓄積も想定される。筆者らは，反応基質や生成物の分析に，薄層クロマトグラフィー（TLC），高速液体クロマトグラフィー（HPLC），ガスクロマトグラフィー（GC）といった分離分析を用いる場合が多い。また，スループット性を鑑み，検出感度は低いが（高活性なものの取得を期待して）TLC を採用する場合が多い。

この分離分析の導入により，単一酵素反応にとどまらず，引き続く代謝物の検出も可能となり，ひいては，一連の化合物代謝経路を見いだすとともに，想定外の有用酵素の取得につながったこともあった[5]。

微生物パウダーを用いる探索系は，補酵素要求性酵素の機能探索にて威力を発揮する。パウダー化により補酵素分子の膜透過性が向上し，細胞内の補酵素要求性酵素の機能を，制限要素を排除して顕在させ，評価できる。ここでの制限要素とは，エネルギー（ATP 量），還元力（NAD(P)H 量），CoA などの補酵素量，電子伝達メディエーター量などである。筆者らの事例では，カルボニル基の不斉還元により光学活性アルコールを生成するカルボニル還元酵素群の探索において[6,7]，グルコース脱水素酵素を用いる還元型補酵素再生系との共役により，目的酵素の探索を効率化している（図 2）。本酵素群に関しては，多数の酵素が実用化された[8,9]。

複合酵素系探索への展開

上述の補酵素要求性酵素の探索技術を，より複雑な複合酵素系の探索技術に展開している。その一例が，脂肪酸変換酵素系への展開である。脂肪酸変換は，アシル CoA を高エネルギー反応中間体とする場合が多

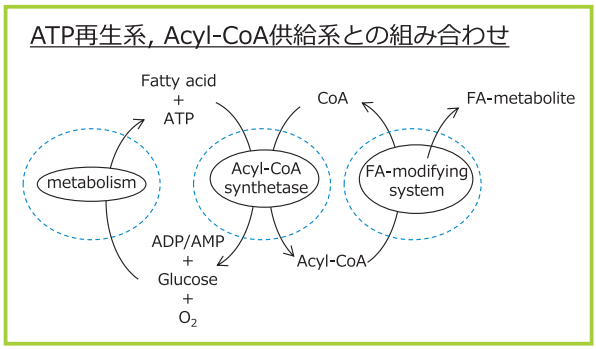


図 3　ATP 産生系，アシル CoA 合成系，アシル CoA 変換系が共役した脂肪酸変換複合酵素系の探索（青点線がパウダー化微生物）

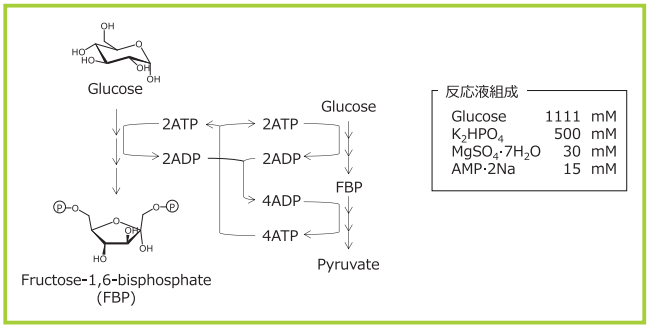


図 4　ATP 再生能の検出に基づくエネルギー産生機能評価系

く，アシル CoA の誘導にあたっては，ATP 供給系との共役が必要となる。また，アシル CoA が細胞間でやり取りされる必要もあり，多菌種が共役した反応系となるが，このような複雑な系も微生物パウダーを用いるとデザイン可能である（図 3）。

複合酵素系においては，酵素間の共役のみならず，酵素安定化因子や活性化因子との共役も想定される。例えば，多様な反応が触媒でき，その活用が期待される一方で不安定性から応用が難しい P450 モノオキシゲナーゼに関して，微生物パウダーが安定化因子の探索に活用されている。この探索系も，P450 モノオキシゲナーゼ反応系に微生物パウダーを加える単純なものであるが，一定の安定化効果が観察されている。

未知機能性遺伝子探索への展開

微生物パウダーライブラリーを活用する機能スクリーニングは，遺伝子情報がない未開拓な酵素や，ものづくり現場で有用な統合的な微生物機能の探索においても有効である。

筆者らが，核酸医薬の合成中間体となる 2′-*O*-メチルヌクレオシドの合成に有用なヌクレオシダーゼの探索を行った際には，目的反応を触媒し得る酵素の報告がなかったことから，遺伝子情報は活用できず，酵素反応の機能レベルでの探索に頼らざるを得なかった。しかし，多菌種，多数の簡便な評価が可能な微生物パウダーライブラリーの活用により，目的活性を見いだすことができた。その結果，たどり着いた酵素遺伝子配列は，新規なヌクレオシダーゼファミリーを形成していた[10]。微生物パウダーライブラリーを活用する機能レベルの探索は，このような新たな遺伝子情報をもたらし得る。

育種技術の向上により，上述のような新規遺伝子の活用も活発化し，実生産レベルへのスケールアップが課題となってきている。その際，大型発酵槽内での様々なストレスに耐え得るための機能遺伝子が必要となってきている。筆者らは，このような機能遺伝子の探索にも微生物パウダーライブラリーを活用している。例えば，油脂酵母の培養初期の生育立ち上がり不全を解消すべく，類縁油脂酵母を対象にエネルギー産生機能を ATP 再生能の観点から網羅的に評価した（図 4）。選抜された酵母の解糖系遺伝子の解析から，効率的な ATP 産生に関与する候補遺伝子が浮かび上がりつつある。

おわりに

バイオものづくりを支援する微生物機能の探索に有用な微生物パウダーライブラリーを紹介した。多菌種を反応・機能レベルで複合的かつ直接的に評価可能な微生物パウダーライブラリーの活用は，新規機能ならびにそれを担う機能遺伝子の発見確率向上をもたらし得る。今後，さらなる複合酵素系の拡充[11]，複合微生物系の展開にむけた共培養因子の特定[12]，共培養技術を活用した複合微生物系の新機能創出[13, 14]につながることを期待したい。また，実生産スケールでの培養時に求められる細胞の基礎代謝力や環境耐性など，バイオものづくりの社会実装を支援する機能を担う遺伝子群や細胞群を特定するための機能探索基盤として，微生物パウダーライブラリーが活用されることを期待したい。

1) M. Nojiri et al., *Appl. Microbiol. Biotechnol*. **2015**, *99*, 9961.
2) J. Ogawa et al., *Appl. Microbiol. Biotechnol*. **1999**, *51*, 53.
3) S. Kimoto et al., *J. Biosci. Bioeng*. **2022**, *134*, 213.
4) J. Ogawa et al., *Trends Biotechnol*. **1999**, *17*, 13.
5) H. Fujii et al., *Biosci. Biotech. Biochem*. **2022**, *86*, 1247.
6) M. Hibi et al., *Bioorg. Med. Chem*. **2018**, *26*, 1327.
7) U. Shino et al., *Appl. Microbiol. Biotechnol*. **2026**, *110*, 131.
8) J. Ogawa et al., *Curr. Opinion Biotechnol*. **2002**, *13*, 367.
9) H. Gröger et al., *Chem. Asian J*. **2012**, *7*, 1138.
10) Y. Mitsukawa, *Biosci. Biotechnol. Biochem*. **2016**, *80*, 1568.
11) N. Horinouchi et al., *Biotechnol. Lett*. **2006**, *28*, 877.
12) H. Watanabe et al., *J. Biosci. Bioeng*. **2020**, *129*, 552.
13) S. Saijai et al., *Biosci. Biotechnol. Biochem*. **2016**, *80*, 2247.
14) H. Inzali et al., *Biosci. Biotechnol. Biochem*. **2026**. doi:10.1093/bbb/zbag131

© 2026 The Chemical Society of Japan