

THE KANTO CHEMICAL CO., INC. Cica CHEMICAL TIMES

2015 No.4 (通巻238号)

ISSN 0285-2446

海洋微細藻類の光合成・物質生産と地球環境	白岩 善博	2
微生物の産生する高機能性バイオポリマーの産業応用	倉根隆一郎	10
流体物理洗浄(3) ジェット洗浄、ブラシ洗浄、その他	真田 俊之 渡部 正夫	16
1細胞ゲノミックスの為に試薬と環境 DNA-free phi29 DNAポリメラーゼの開発	高橋 宏和 岡村 好子 小堀 俊郎	22
最近のトピックス		28



海洋微細藻類の 光合成・物質生産と地球環境

Photosynthetic biomass production by marine microalgae and its impact on global environment

筑波大学 生命環境系 白岩 善博

Professor Yoshihiro Shiraiwa, PhD

Faculty of Life and Environmental Sciences, University of Tsukuba

1. はじめに

地球誕生直後は大気中に存在しなかった分子状酸素(O_2)は、水(H_2O)から還元力を獲得する光合成生物の出現によってその量を増大させ始め、その大気中の濃度は21%にまで上昇してきた。それは、太陽光エネルギーを利用して水(H_2O)を分解し、その結果得られた還元物質の作用により二酸化炭素(CO_2)を還元し有機物を合成する生命体の出現によるものである。一方、地球大気の大部分を占めていた CO_2 は減少を続け、氷期には180 ppm、間氷期には280 ppmにまで達した。しかし、産業革命後の化石燃料の消費に伴う CO_2 放出により、その濃度は急速に上昇し始め、2015年3月にはついに400 ppmを記録した。

地球環境の変遷は地殻変動などの地球科学的要因に加え、光合成生物をはじめとする生命活動の結果によって大きく影響されてきた。そして、それらの変化が光合成生物自身やその他の生物にも大きな影響をもたらし、生物進化による様々な生物の誕生にも関わってきた。例えば、海洋植物プランクトンの一種のハプト藻類円石藻は細胞殻として方解石型炭酸カルシウム結晶から成る構造体(円石、コクリス)を有する。円石藻は約2億年前に誕生し、中生代白亜紀に大量に繁茂したことで知られる。その大増殖の結果、円石藻が大量に海底へと沈降し、そして蓄積した。そこで細胞殻は石灰岩を形成し、細胞の有機質部分は地球化学的作用により原油・天然ガスの基となる有機物を大量に生産し、大気中の CO_2 を減少させたことが明らかにされている。英仏間海峡に面する英国・ドーバーの白い崖は円石藻の

細胞殻(コクリス)から成る石灰岩として著名である(図1)。また、英国・東方海域の北海には、北海油田で知られるように原油や天然ガスの埋蔵地域と石灰岩床の分布地域が広がっている¹⁾(図2)。

「藻類」とは、酸素発生型光合成機能を有する維管束植物とコケ植物以外の生物群を総称する。ほとんどは水中生活をするが、気生藻類のように木や壁などの表面で生活するものもある。また、進化の過程で光合成機能を消失した生物群もあり、それらも藻類に入れる場合が多い。生活環境は淡水性、海水性、高塩濃度湖沼性、気生性など多岐に渡る。

海洋微細藻類は光合成作用により CO_2 を固定し物質生産を担い、それを代謝過程により様々な物質に変換し細胞増殖に寄与すると共に、増殖した細胞体自身

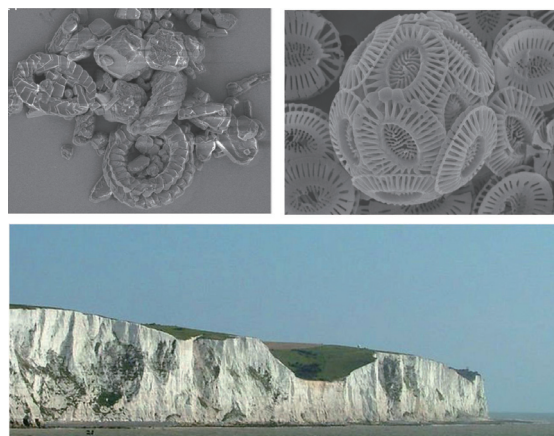


図1 (左上)化石になった白亜紀の円石藻。イギリスドーバー海峡のホワイトクリフを形成する白亜紀の円石藻化石の走査電子顕微鏡(SEM)写真。円石藻の膨大な増殖が白亜紀にあったことを示すものである。
(上右)現世のイギリス周辺海域で単離された生きた円石藻*E. huxleyi*の走査電子顕微鏡像
(下)ドーバー海峡の白い崖(インターネットより取得 Fanny. "White Cliffs of Dover" flickr. <https://www.flickr.com/photos/fanny/555925/>, (accessed 2015-08-26).)

は動物プランクトンの餌となるなど、海洋生態系を支える重要な一次生産者としての役割を果たしている。さらに、代謝産物の一部は生細胞から分泌されると共に、捕食などで死骸となった場合にも海水中に遊離し、バクテリアなどの増殖を支える。それと同時に、一部の揮発性化合物は大気中へと放出される。当然、光合成生成物としての酸素が放出される他、ジメチルスルフィド(DMS)等の揮発性化合物も大気中へと放出される。DMSは硫黄化合物であり、雲核となり、大気上空における雲の形成に寄与することが明らかにされている。したがって、海洋微細藻類の増殖は当該海域の天候にも影響を与えることが明らかにされている(図3)。

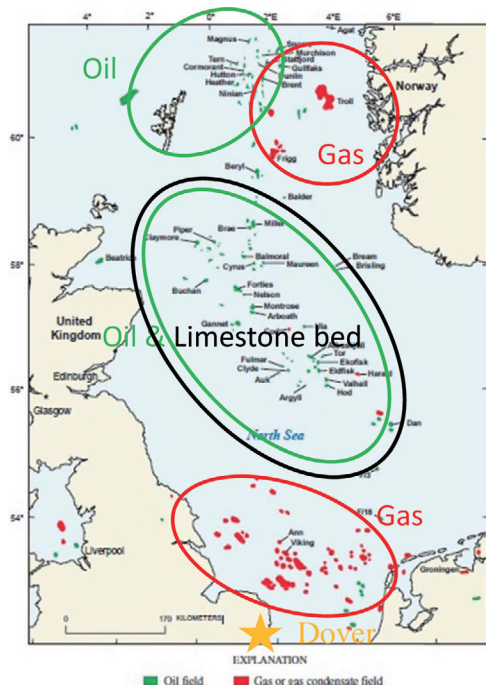


図2¹⁾ 北海における原油および天然ガスの埋蔵地域と石灰岩床の分布地域 (Gibson, 2014を一部改変)

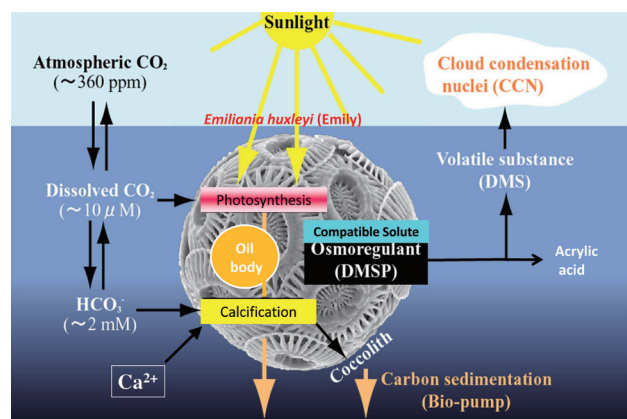


図3 海洋微細藻類円石藻の光合成及び石灰化反応による炭素固定・物質生産機構と海洋・大気環境との関わりとそのインパクト

本稿では、海洋微細藻類の光合成、代謝、物質生産について紹介すると共に、海洋微細藻類が担ってきた海洋・地球環境とのかかわりを俯瞰し、それらの機能を人類がどのように未来に役立てて行くべきかを考察する。

2. 海洋微細藻類のバイオマス

海洋光合成は現在の地球上の一次生産の約50%を占めるとされている²⁾。中でも、ハプト藻類(真核生物)は、円石形成種群(円石藻)および非円石形成種群を合わせて海洋における主要な光合成生物群の一つであり、他に優勢種として知られるシアノバクテリア(原核生物・ラン藻類)や珪藻類(真核生物)の2倍の光合成生産量を占めていると見積もられている³⁾(図4)。Brown (1995)によれば、Global Composites of Coastal Zone Color Scanner(CZCS)画像解析において、円石藻ブルームは乳白色もしくはトルコブルー色として観察され、その成果に基づき、高緯度海域(40-60°)における71%で円石藻のブルームが見られ、その面積は1400万km²に達すると報告されている⁴⁾。さらに、詳細な解析から、年間40-130万トンの炭酸カルシウムの生産と1万トンのDMSが生産されていると見積もられている。

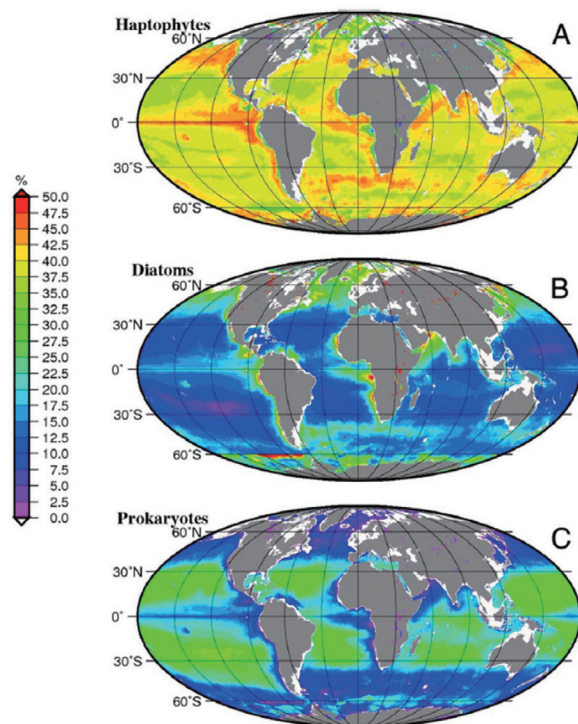


図4 西暦2000年における海洋微細藻類のクロロフィルaおよび補助色素に基づくバイオマス生産量の見積もり。A: ハプト藻、B: 珪藻、C: シアノバクテリア。³⁾

北大西洋における円石藻 *E. huxleyi* の大増殖(ブルーム)において、細胞数は850万個/L (8.5×10^6 /L)で海域はトルコブルーに変色した。細胞増殖は深度60mまで及び、1m²あたり40gの炭酸カルシウムが生産された。ブルーム海域は7,200km²に及んだことから、7.2万トンの方解石型炭酸カルシウムが生産されたと見積もられている。更に、高緯度海域において、円石藻 *Coccolithus pelagicus* のブルームにおいて、年間0.7-33.1 g/m²の炭酸カルシウムの生産があったと見積もられており、範囲を7,200km²と仮定すると、5-238 キロトンの炭酸カルシウム生産があったと見積もられる⁵⁾。過去の円石藻ブルームにおいて、数週間の増殖で約8メガトン(一日換算で約100キロトン)の炭酸カルシウムが形成され、沈降したとの見積もりもあり、その二酸化炭素固定化能と隔離のポテンシャルは現世の海洋においても膨大である。

円石藻が生産するジメチルスルヒド(DMS)は円石藻類の浸透圧調節機能を担う硫黄化合物であるジメチルスルヒドプロピオネートの分解産物として生産され、ガス体として海洋から大気中に放出される物質である。DMSは大気上空で二酸化硫黄や硫酸イオンに酸化されエアロゾルを形成し、雲核(Cloud Condensation Nuclei, CCN)となり雲の形成に寄与することが知られている(CLAW仮説⁶⁾)。

海洋植物プランクトン群集の全世界的な調査に基づく生物多様性研究から、バイオマス量が中間レベルの時にその多様性は最大となり、大発生期に最小となることが示されている⁷⁾。1997年には衛星に搭載されたSeaWiFS海色センサーによるクロロフィル *a* の画像化が

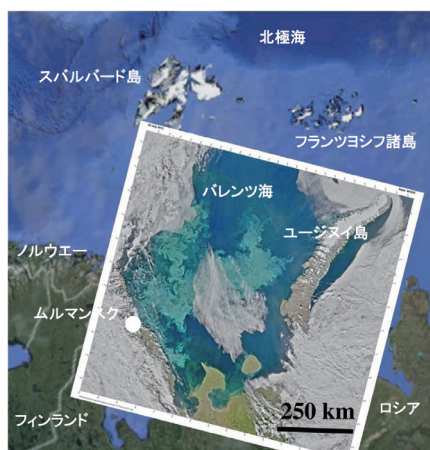


図5 2015年7月29日に観測されたバレンツ海における円石藻類の大増殖(ブルーム)。NASA's Ocean Color Web (<http://oceancolor.gsfc.nasa.gov/cms/>)のAqua-MODIS画像をGoogle Earth上に配置。

成功し、海洋における光合成生物(植物プランクトン)の分布やその変動が明らかにされ、その膨大なバイオマス生産量が見積もられてきた。現在、海洋における光合成生物の動態の指標となるそのデータは海洋開発研究機構(JAMSTEC)とアメリカ航空宇宙局(NASA)による解析を経て、SeaWiFS衛星画像としてほぼリアルタイムで公開されている(図5)。

何故、円石藻は世界中の海で繁茂し、その広い分布を保つことができるのか? 何故、多様な生息環境に適応し、その高い生息数を保ち続けることができるのか? なぜ、多様な変異を持つ株(種類)が存在するのか? それらは大きな謎となっていた(図6)。その解明のために円石藻 *E. huxleyi* CCMP1517株の核ゲノムの全塩基配列の解読・解析が行われた。その結果、海洋性植物プランクトンとしては最もゲノムサイズは大きく約168Mbpで、33,431個の遺伝子をコードすることが明らかとなった。さらに、13の地理的系統についてゲノム解析結果を比較した結果、光合成、栄養摂取、殻形成などに関与する塩基配列に系統間で大きな変異が見出された。それらの変異は33,431個の遺伝子を含む全ゲノムのうちの「パンゲノム」領域(約18,000個の遺伝子)であった。パンゲノムの存在が確認されたのは、真核微生物では初めてである⁸⁾。

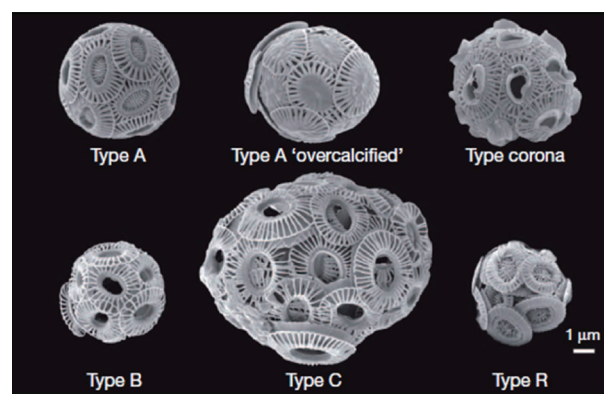


図6 世界の見られる円石藻 *E. huxleyi* の多様性(タイプ)を示す走査電子顕微鏡像⁸⁾

3. 海洋微細藻類の光合成

一次共生と二次共生:

酸素発生型光合成を最初に獲得した生物は原核生物のシアノバクテリア(ラン藻類)で、核膜やオルガネラ包膜を持たない生物群である。そして、光合成機能を

有しない真核細胞がシアノバクテリアを細胞内に取り込む形で、光合成機能を有する細胞器官(葉緑体)と分子状酸素を利用して有機物を酸化してエネルギーを取り出す細胞器官(ミトコンドリア)を獲得したのが一次植物(一次共生生物)である。それらは、緑藻類・緑色植物、灰色植物、紅藻類・紅色植物である。そして、それら一次植物を更に真核細胞が取り込む形で進化した生物群が二次植物(二次共生生物)である。そして、一次共生を経て様々な真核生物が光合成機能を獲得することとなり、さらに二次共生によってその多様性を拡大することとなった⁹⁾。

細胞内共生が成立する過程では、共生体(葉緑体)と宿主細胞のゲノムが統合されると共に、細胞器官(オルガネラ)がその機能を十分に発揮するためには、オルガネラ間の代謝産物輸送システムの確立など、ダイナミックな変化が不可欠であった。特に、二度の共生を経て誕生した二次植物では、ゲノムおよび代謝経路の改変の度合いも大きく、多様な藻類の比較ゲノム解析や生化学的解析によりその細胞機能が解明されなければならない。

一次植物の葉緑体には2枚の包膜があり、その外膜にはポーリン様タンパク質が存在し代謝産物の透過は自由である。しかし、内膜では代謝産物の輸送には輸送体が必要であり、その輸送体が細胞全体の代謝を制御する役割を果たしている。一方、二次植物の葉緑体は一次植物の葉緑体が有するものと同じ内膜と外膜に加え、そのさらに外側に、その進化の過程の違いにより3枚目、4枚目の包膜を持つこととなり、最も外側には核膜と連結した膜を有している。しかし、現状では二次植物の葉緑体における代謝産物輸送体の生化学的解析は不十分であり、更なる研究が必要である。

藻類の光合成と代謝系:

藻類の光合成系の多様性は非常に大きい。まずは多様な光環境に生育する中で獲得した形質やその環境への適応のために進化過程で藻類が獲得したものとして光合成色素の多様性が挙げられる。藻類の「色」はその分類上の重要な形質として長年利用され、藍藻、灰色藻、緑藻、褐藻、紅藻、黄金色藻、黄緑藻などの分類群が設定されてきた。光合成で光エネルギーを化学エネルギーに変換する光化学系において、最初に光を吸収するアンテナ色素系(光合成補助色素)には

多様性が大きい。しかし、それらの補助色素からエネルギーを受け取り最終的に光エネルギーを集約する機能を持つ光合成反応中心を構成する色素はクロロフィル a に限定されている点と、複数の種類があるクロロフィルのポルフィリン環に配位する元素はマグネシウムである点は共通している。ただし、パラオ島のクラゲに共生しているアカリオクロリス(シアノバクテリア)ではクロロフィル d が主要光合成色素として機能することが例外的に発見されている⁹⁾。

藻類の光合成による二酸化炭素固定と有機物合成はカルビン・ベンソン回路(C_3 回路、還元的ペントースリン酸回路)により行われる。それはリブローズ-1,5-ビスリン酸カルボキシラーゼ/オキシゲナーゼ(Rubisco)による CO_2 固定反応を起点とする代謝回路であり、 CO_2 固定段階→還元段階→ C_5 化合物再生段階の3段階から成る。最初の CO_2 固定反応生成化合物は3-ホスホグリセリン酸(3-PGA)である。それは更に光化学系で生産された高エネルギー物質であるアデノシン三リン酸(ATP)と還元物質ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド(NADPH)を利用したリン酸化反応と還元反応を経て、グリセロアルデヒドリン酸(GAP)およびジヒドロキシアセトンリン酸(DHAP)(合わせてトリオースリン酸(Triose-P)と呼ぶ)に転換される。そして、再生段階で生成される C_6 代謝中間体(フルクトースジリン酸、フルクトースリン酸)を経て、 C_5 化合物が再生されると共に、新たに固定された CO_2 に相当する炭素量の分がグルコースポリマー合成系に導かれ、その結果、光合成の最終産物として葉緑体に貯蔵性多糖(デンプンなど)として蓄積される。カルビン・ベンソン回路は各種の光合成生物間で非常に共通性の高い代謝系であり、その基本的な機構は一次植物や二次植物など、種や分類群による相違は見られない。

一方、カルビン・ベンソン回路の代謝速度やRubiscoの性質、 CO_2 固定効率、 O_2 による拮抗阻害の程度などは分類群により大きく異なっており、進化の過程において環境変動を反映する特徴を有している。さらに、炭素貯蔵体に関して、陸上植物や緑藻類を含む緑色植物の光合成炭素貯蔵体はデンプン(α -1,4-結合による主鎖に α -1,6-結合による分枝を有するグルコースポリマー)であるが、藻類のそれはその分類群によって大きな多様性がある。特に、パラミロンやクリソラミナラン(β -1,3-結合による主鎖に β -1,6-結合による分枝を有するグルコー

スポリマー)は水溶性であるなど、貯蔵物質としての性質が大きく異なり、それらを有する生物群の多糖合成代謝系がそれぞれの生物の性質にも大きく影響している。

一次植物と二次植物の葉緑体内代謝系の特徴:

一次植物の葉緑体包膜の内膜には、トリオースリン酸と無機リン酸(Pi)の対向輸送を行うトリオースリン酸/リン酸輸送体(TPT)が存在し、トリオースリン酸の一部は葉緑体から細胞質へ運び出される(図7)。細胞質に運び出されたトリオースリン酸は、細胞質でホスホエノールピルビン酸(PEP)に変換される。そして細胞質で作られたPEPの一部は、PEP/リン酸輸送体(PPT)を介して、再び葉緑体内に取り込まれる(図7)。葉緑体内では、PEPおよびピルビン酸から、イソプレノイド、芳香族アミノ酸、脂肪酸など、様々な物質が合成される。この代謝モデルは、陸上植物で確立されたものだが、緑藻や紅藻などの一次植物にも当てはまると考えられている。なお、一次植物である緑藻や紅藻では、葉緑体内にエノラーゼという酵素が存在しないため、葉緑体内で直接3-PGAからPEPを作ることはいできない^{10,11)}。

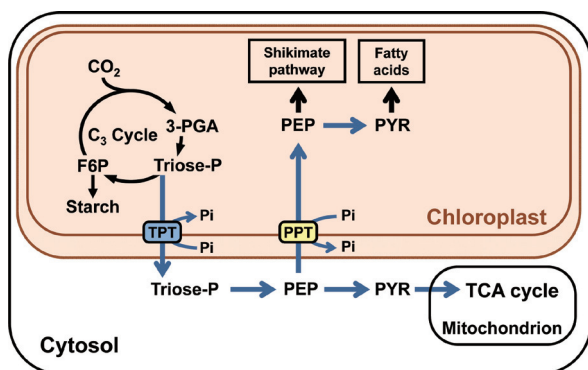


図7 緑藻・緑色植物(一次植物)の光合成初期代謝系^{10,11)}。紅藻(一次植物)はアミロベクチン様デンプン(紅藻デンプン)を合成しそれを細胞質に蓄積する点で異なるが、PEPを葉緑体独自で合成できない点は共通している。それは、3-PGA ムターゼとエノラーゼを持たないことに起因している。3-PGA, 3-phosphoglycerate; Triose-P, triose phosphate; F6P, fructose 6-phosphate; PEP, phosphoenolpyruvate; PYR, pyruvate; Pi, inorganic phosphate; TPT, triose phosphate/Pi translocator; PPT, PEP/Pi translocator.

二次植物の葉緑体の起源は多様であり、全ての二次植物に当てはまる代謝モデルは存在しないため、ここでは紅藻の二次共生により葉緑体を獲得した珪藻(不等毛植物)とハプト藻(ハプト植物)について、ゲノム情報から推測される代謝モデルについて概説する。それらの葉緑体は、一次植物の葉緑体にさらに2枚の包膜が加わり、計4枚の包膜に包まれ、光合成補助色素とし

てクロロフィルc(クロロフィルaと異なりフィトール鎖がない)を持つ点など共通点が多い。珪藻やハプト藻にもTPT相同遺伝子が存在している。しかし、4枚すべての包膜にTPTが存在するか否かは確認されておらず、またTPTの分子特性(基質特異性など)は実験的に確認されていない^{10,11)}。

一方、一次植物が持つPPTの相同遺伝子は、珪藻やハプト藻のゲノムには存在せず、PPTによる細胞質から葉緑体へのPEPの輸送は行われていない可能性が高い。一方、3-PGAをPEPに変換するために必要な2種の酵素(3-ホスホグリセリン酸ムターゼとエノラーゼ)が葉緑体に局在すると予測されている。そのため、葉緑体内での生合成に必要なPEPは、細胞質から取り込むのではなく、葉緑体内でC₃回路から直接合成される(図8)。また、ハプト藻や珪藻では、葉緑体局在と予測されるピルビン酸カルボキシラーゼ(PYC)という酵素をもち、葉緑体内でC₃化合物(ピルビン酸PYR)をC₄化合物(オキサロ酢酸OAA)に変換することが可能である。すなわち、C₃回路で合成されたC₃化合物をC₄化合物に変換する経路(図8)は、一次植物には存在せず、一部の二次植物に特異的な代謝経路であると考えられる^{10,11)}。二次植物では、教科書で標準とされている陸上植物の代謝モデルが当てはまらない例が多数あり、二次植物が多大なバイオマスを占める海洋の一次生産性や物質循環を解析する上で、今後、体系的な解明が必要である。

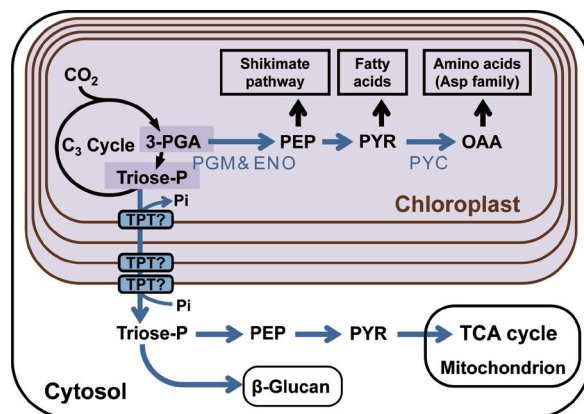


図8 珪藻と珪藻(二次植物)の光合成初期代謝系^{10,11)}。本生物群ではPPTの存在は見出されていないが、TPT様輸送体の存在がゲノム上で確認されている(局在は不明)。尚、珪藻 *T. pseudonana* のゲノムには葉緑体型エノラーゼは存在せず、二次植物内での多様性が存在する。3-PGA, 3-phosphoglycerate; Triose-P, triose phosphate; F6P, fructose 6-phosphate; PEP, phosphoenolpyruvate; PYR, pyruvate; Pi, inorganic phosphate; TPT, triose phosphate/Pi translocator; PPT, PEP/Pi translocator; OAA, oxaloacetate; PGM, 3-PGA mutase; ENO, enolase; PYC, pyruvate carboxylase.

4. 海洋微細藻類・円石藻の物質生産の特徴

現在世界のエネルギー源として経済・産業基盤を支える原油は化石燃料である。地球科学的知見によれば、有機物起源の原油および天然ガスの形成は、約6割程度が中生代白亜紀(1.4億年～6,500万年前)における植物プランクトンが生産した有機物が起源と考えられている。中でも、中東・中生代の石油は、石灰質ナノプランクトン(円石藻など)が生産者の主体であったとする知見があり、現在も海洋バイオマス生産に寄与している微細藻類種の祖先型が原油生成に寄与したと考えられている。石灰岩は生物起源と化学的沈殿によって形成されたとされているが、イギリスのドーバー海峡の白い崖(white cliff)は円石藻の大量堆積で形成されたもので、円石藻の細胞殻(ココリス)が走査電子顕微鏡で確認できる(図1)。

筆者らは、ハプト藻類円石藻株 *E. huxleyi* を対象に、光合成CO₂固定機構を解析した。その結果、「動物型」酵素として知られてきたピルビン酸カルボキシラーゼ(PYC)が、その葉緑体でRubiscoに続く2つ目のCO₂固定酵素として機能していることを発見した¹²⁾。14C-トレーサを用いた炭素代謝解析の結果、PYCが光合成器官においてアミノ酸合成(窒素化合物)と脂質・糖合成(炭水化物)への炭素の流れを調整する重要な機能があることも明らかになっている(図8)。さらに、生理学的な解析において、円石藻 *E. huxleyi* が、他の藻類とは異なり、多糖(β-グルカン)ではなく、アルケノン・アルケンなどの脂質を貯蔵物質とすることを明らかにした。光合成による物質生産の律速段階はCO₂吸収・固定段階であることやアルケノン・アルケン脂質体が主要炭素貯蔵体であり、光合成で固定された炭素の20%を占めることも明らかにした¹³⁾。

筆者らは、円石藻 *E. huxleyi* を実験室で培養し、円石藻が原油の起源生物となり得るかを確認した。円石藻の乾燥粉末をガラス管に封入して無酸素状態で熱分解(pyrolysis)を行った結果、300℃で液体炭化水素が多く得られ、それらの成分には炭素数31(C₃₁)以下の種々の炭化水素分子が含まれることを見出した。更に、400～500℃では、メタンやエタンを主とするガス状の炭化水素分子が生成されることを確認した。円石藻は、中性脂質成分として炭素数37を主とする長鎖不

飽和ケトン(アルケノン)を乾燥重量の20-30%程度有する。そのため、熱分解によって生成したこれらの化合物は、長鎖のアルケノンの分解産物であると考えられる^{14, 15)}。

アルケノンは、現在、化石や現世種を含め海洋種4種および湖沼種1種のハプト藻(円石藻も含まれる2次共生によって生じた生物群)のみで知られる種特異性の高い脂質化合物である。アルケノン分子の特徴は、炭素数37～40の長い炭素鎖、トランス型の炭素二重結合(2～4個)および末端にケト基を有することである。その分子の特徴は、炭素数16～22の炭素鎖、シス型の炭素二重結合(0～3)および末端にカルボキシル基を有する脂肪酸と比較すると明らかである(図9)。この化合物がハプト藻自身にとってどのような役割を担っているか、どのような合成経路を経て合成されるのかは未解明であり、今後の研究の進展が期待されている。トリグリセリド、糖脂質、リン脂質などの微細藻類の脂質は、細胞内でオイルドロップや膜脂質として存在する。円石藻は他の微細藻類が貯蔵脂質として合成するトリグリセリドを有しないため、細胞内のオイルドロップレットはアルケノンであると推測された。

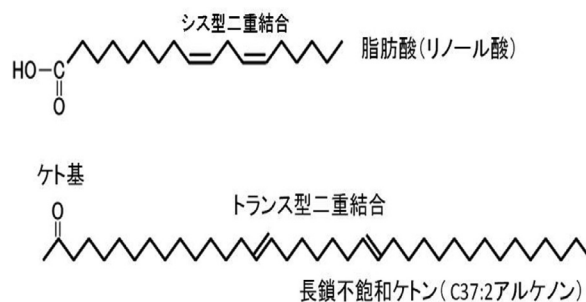
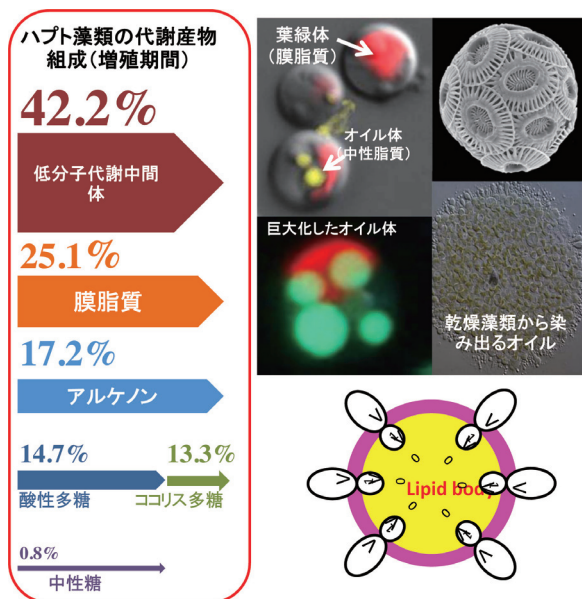


図9 脂肪酸(リノール酸)と長鎖不飽和ケトン(C_{37:2}アルケノン)の分子構造

そのオイルドロップの組成を解明するため、アルケノン合成ハプト藻類株 *Tisochrysis lutea* 細胞からアルケノン蓄積細胞小器官(脂質体)を単離・精製する技術開発が行われた。円石藻 *E. huxleyi* からのオイルボディ単離は困難であり、ココリスを有しないアルケノン合成株が用いられた。その結果、まずその脂質体の組成が、アルケノン(74%)、アルケン(1%)、ステロールを含むその他の脂質(25%)から成ることが明らかにされ、「アルケノンボディ」と命名された。さらに、プロテオミクス解析から、主なアルケノンボディタンパク質はV-ATPaseであることが明らかとなった¹⁶⁾(図10)。



アルケノン合成生物による脂質の合成能を増強するためには、その合成・調節・不飽和化に関わる酵素を同定するなど、その合成機構を解明する必要がある。筆者らは、まず、ハプト藻類が高度不飽和脂肪酸 18:5 (炭素数 18 で 5 個の不飽和結合を有する) を合成することに注目した。次に、円石藻 *E. huxleyi* の酵素遺伝子をシアノバクテリアにおいて異種発現させる実験系を確立した。その上で、*E. huxleyi* のゲノム情報⁸⁾ から 18:5 脂肪酸合成に関与すると推定した 4 つの不飽和化酵素遺伝子を異種発現させ、解析した。その結果、その内の一種類の酵素の同定に成功した。興味あることに、当該酵素は、他の生物における $\Delta 15$ 不飽和化酵素とは系統学的に全く異なるクレードに属したことから、新規な $\Delta 15$ 不飽和化酵素であることを明らかにした。本酵素は、ハプト藻類のドコサヘキサエン酸 (DHA, 22:6) の合成にもかかわる重要な酵素であると考えられる¹⁷⁾。

アルケノンは炭素数 37~40、*trans* 型炭素不飽和結合を 2~4 個、酸素 1 原子を有する直鎖状分子であることは知られていたが、アルケンに関しては、*trans* 型に加えて、*cis* 型炭素不飽和結合を有する 2 種類の分子形が存在する。そこで筆者らは、アルケノン合成の中間体のバイオリファイナリーとしての利用に関する研究において、アルケノン合成中間体の定量解析を行うとともに、アルケンやステロールなどのアルケノン以外の脂質の分析を行い、構

造が未確定な化合物について、その構造決定を行った。その結果、 C_{29} アルケンを主要産物とする非常に珍しいハプト藻類円石藻 *E. huxleyi* と *Gephyrocapsa oceanica* の新規の株が見出された¹⁸⁾。

5. 原油起源生物・円石藻による再生可能エネルギー生産への技術開発

中生代原油の起源生物とされる海洋ハプト藻類で乾燥重量の 20-30% を占める脂質アルケノン (超長鎖不飽和ケトン) およびアルケンを活用し、海水利用の Drop-in-Fuel タイプのバイオ燃料や原油代替原料生産を人工的に強化するための基盤技術の開発を目的として研究を精力的に進めてきた。アルケノンは陸上植物や多くの藻類が生産する貯蔵脂質がトリグリセリドであることと大きく異なり、直鎖中性脂質分子である点でユニークである。

また、藻類エネルギー生産においては、膨大な量の培養液 (水資源) を必要とするため、今後世界的に淡水の供給が不足することが懸念される中、海水利用のバイオマスエネルギー生産は開発が期待される技術分野の一つである。円石藻は海洋性の藻類であることから淡水を必要とせず、近い将来予測される水不足問題を回避できるに点で期待に応えるポテンシャルを持っている。筆者らは、JST/CREST プロジェクト: 研究領域「藻類・水圏微生物の機能解明と制御によるバイオエネルギー創成のための基盤技術の創出」の研究代表者 (研究期間 2010~2015 年度) として、海洋微細藻類のメタボローム解析システムを作り上げ、全く未解析であったアルケノン生産生物の脂質合成機構の解明に取り組んできた。

また、原油生成の起源生物の代表種とされるハプト藻類円石藻 *E. huxleyi* の全ゲノム解読やアルケノン・アルケン生産生物を網羅的にスクリーニングして最適生物の同定に成功した。これらの成果を通して、海洋ハプト藻類が、藻類バイオマスエネルギー資源として高いポテンシャルを有することを明らかにした。

世界中のハプト藻株から、アルケノン・アルケン分子種の組成と含有量の定量解析を行い、最適株の選抜と燃料や化学改質に有利な C_{29} アルケンを主生産脂質とするハプト藻類株の取得に成功した¹⁹⁾。これらの成果は、Drop-in-fuel として使用できる更に炭素鎖の短いハプト藻類株がスクリーニングにより発見できる可能性を示唆している。

シアノバクテリア、ユーグレナ、緑藻ドナリエラはトリアシルグリセロールを貯蔵脂質として合成する。それらの藻類とアルケノン生産藻類であるハプト藻類円石藻 *E. huxleyi* 株の乾燥藻体を Pyrolysis 処理したところ、Crude Oil の生産性とオイル回収率に関して、ハプト藻類が最も優位であることを示した。この成果は、現有用藻類の中で、ハプト藻類が原油成分生産に最適であることを示すものである。

中生代白亜紀における原油生産に寄与した微細藻類の1種である海洋ハプト藻類の長鎖脂質生合成系の解明に実績を上げ、当該微細藻類を利用した現代におけるバイオ燃料生産においても大きなポテンシャルを有することについて実験的証拠を積み上げつつある。それによって、藻類バイオ燃料開発に向けた基盤研究を推進し、今後の研究や技術開発において生物工学的な手法を駆使する際に必要な知見の拡充に努めることで、マリンバイオテクノロジーの発展に大いに貢献するものと考えられる。

アルケノン分子は、他の脂質分子と比較してバクテリアの分解を受けにくく、海底堆積物として良く保存されている。また、炭素数37で不飽和結合を2個有するアルケノン分子($C_{37:2}$)と3個有する分子($C_{37:3}$)の比(アルケノン不飽和度指数)が培養温度を変化させた場合に变化する。これを利用すれば温度変化により性質の異なる化合物の生合成が可能である。また、アルケノン合成種を用いた代謝改変技術を確認することによって、燃料使用に最適な中間代謝産物を合成させることが出来れば、大量の熱エネルギーを使用する熱分解によらずとも燃料適合性の化合物の合成が可能であると考えている。大量培養規模の拡大技術の開発により低コストなバイオリファイナリー生産の道が開かれていくことが期待される。

参考文献

- Gibson, R. "October 14. The North Atlantic and North Sea". History of the Earth. <http://historyoftheearthcalendar.blogspot.jp/2014/10/october-14-north-atlantic-and-north-sea.html>.
- Field, C.B.; Behrenfeld, M.J.; Randerson, J.T.; Falkowski, P. Science. 1998, 281(5374), 237-240.
- Liu, H.; Probert, I.; Uitz, J.; Claustre, H.; Aris-Brosou, S.; Frada, M.; Not, F.; de Vargas, C. PNAS. 2009, 106(31), 12803-12808.
- Brown, C.W. Oceanography. 1995, 8(2), 59-60.
- Heimdal, B.R. "Modern Coccolithophorids". Marine phytoplankton. Thomas, C.R., ed. 1993. 147-248.
- Charlson, R.J.; Lovelock, J.E.; Andreae, M.O.; Warren, S.G. Nature. 1987, 326(6114), 655-661.
- Irigoiien, X.; Huisman, J.; Harris, R.P. Nature. 2004, 429(6994), 863-867.
- Read, B.A.; Kegel, J.; Klute, M.J.; Kuo, A.; Lefebvre, S.C.; Maumus, F.; Mayer, C.; Miller, J.; Monier, A.; Salamov, A.; Young, J.; Aguilar, M.; Claverie, J.-M.; Frickenhaus, S.; Gonzalez, K.; Herman, E.K.; Lin, Y.-C.; Napier, J.; Ogata, H.; Sarno, A.F.; Shmutz, J.; Schroeder, D.; de Vargas, C.; Verret, F.; von Dassow, P.; Valentin, K.; de Peer, Y.V.; Wheeler, G.; Emiliania huxleyi Annotation Consortium (Allen, A.E.; Bidle, K.; Borodovsky, M.; Bowler, C.; Brownlee, C.; Cock, J.M.; Elias, M.; Gladyshev, V.N.; Groth, M.; Guda, C.; Hadaegh, A.; Iglesias-Rodriguez, M.D.; Jenkins, J.; Jones, B.M.; Lawson, T.; Leese, F.; Lindquist, E.; Lobanov, A.; Lomsadze, A.; Malik, S.-B.; Marsh, M.E.; Mackinder, L.; Mock, T.; Mueller-Roeber, B.; Pagarete, A.; Parker, M.; Probert, I.; Quesneville, H.; Raines, C.; Rensing, S.A.; Riaño-Pachón, D.M.; Richier, S.; Rokitta, S.; Shiraiwa, Y.; Soanes, D.M.; van der Giezen, M.; Wahlund, T.M.; Williams, B.; Wilson, W.; Wolfe, G.; Wurch, L.L.), Dacks, J.B.; Delwiche, C.F.; Dyhrman, S.T.; Glöckner, G.; John, U.; Richards, T.; Worden, A.Z.; Zhang, X.; Grigoriev, I.V. Nature. 2013, 499(7457), 209-213.
- 渡邊信監修. 藻類ハンドブック. NTS, 2012, 824p.
- 辻敬典, 白岩善博. "炭素同化と初期代謝". 藻類ハンドブック. 渡邊信監修. NTS, 2012, 160-165.
- Tsuji, Y.; Shiraiwa, Y. Perspectives in Phycology. 2015, doi:10.1127/pip/2015/0029. https://www.schweizerbart.de/papers/pip/detail/prepub/84870/Distinctive_features_of_photosynthetic_carbon_metabolism_in_secondary_endosymbiotic_algae.
- Tsuji, Y.; Suzuki, I.; Shiraiwa, Y. Plant Cell Physiol. 2012, 53(6), 1043-1052.
- Tsuji, Y.; Yamazaki, M.; Suzuki, I.; Shiraiwa, Y. Mar. Biotechnol. 2015, 17(4), 428-440.
- Wu, Q.; Dai, J.; Shiraiwa, Y.; Sheng, G.; Fu, J. J. Appl. Phycol. 1999, 11(2), 137-142.
- Wu, Q.; Shiraiwa, Y.; Takeda, H.; Sheng, G.; Fu, J. Mar. Biotechnol. 1999, 1(4), 346-352.
- Shi, Q.; Araie, H.; Bakku, R.K.; Fukao, Y.; Rakwal, R.; Suzuki, I.; Shiraiwa, Y. Proteomics. 2015, doi:10.1002/pmic.201500010. <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/pmic.201500010/full>.
- Kotajima, T.; Shiraiwa, Y.; Suzuki, I. Biochim. Biophys. Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids. 2014, 1841(10), 1451-1458.
- Nakamura, H.; Sawada, K.; Araie, H.; Suzuki, I.; Shiraiwa, Y. Phytochemistry. 2015, 111, 107-113.
- Nakamura, H.; Sawada, K.; Araie, H.; Suzuki, I.; Shiraiwa, Y. Org. Geochem. 2014, 66, 90-97.

微生物の産生する 高機能性バイオポリマーの産業応用

Industrial application of the high functional polysaccharide by microorganism production

中部大学 応用生物学部 応用生物化学科 教授 倉根隆一郎

Ryuichiro Kurane (Professor)

Chubu University, Department of Biological Chemistry, Applied Microbiology

1. はじめに:「土は宝の山」は本当?

「土は宝の山」という言葉を聞いて一般の方々はどのような考え、感じ方を持たれるのでしょうか? ひょっとしたら、身の周りの「土」が「金」に変わるような“中世の錬金術”を思い浮かべ、PCの上を情報が走り回っている現代においては、“そんなばかな”と頭から切り捨ててしまわれるのではないのでしょうか?

私ども、応用微生物工学を専攻している者にとっては、極めて高い実感と真実性を持っており、まさに本当の言葉であります。例えば、皆さんが抗生物質として使用しているカスガマイシンは奈良の春日大社の土から分離された微生物が生産する抗生物質であるように、多くの抗生物質、抗真菌剤、各種のアミノ酸、各種の核酸、様々な環境汚染物質分解等は土壌等自然界から分離される微生物のなせる業であります。例えば、筑波山麓の土壌から分離された微生物が生産する医薬品で年商1,000億円にのぼる事例があげられます。すなわち、私ども人間の健康と環境を守っているものが、土壌など自然界から分離された微生物が基になっているのです。また、企業にも莫大な利益をもたらしております。

このような背景のもと、微生物に携わる多くの研究者は新たな微生物資源を求めて、生物多様性が豊富なアマゾンの奥地、東南アジアなどの熱帯雨林、温度差を求めて極寒の南極大陸、北極やツンドラ地帯、灼熱の火山地帯、高低差を求めてヒマラヤへと土壌採取に出かけてきました。勿論、生物多様性条約が国際条約として発効している今日においては、これらの微生物資源が存在している国々とMOUなどの覚書をきちんと締結してか

ら遂行していることは当然のことです。生物多様性条約に従うと、海外での土壌等から分離した微生物を利用して商業化した場合には、条約に従い、利益をもたらす微生物がもともと住んでいたその国に利益の相当部分を支払うことが義務付けられています。そのため、経済産業省・NEDOによる複合生物系プロジェクト(筆者がプロジェクトリーダーを務めました)が行われてきました。

ところで、皆さんは土壌1グラムにどの位の微生物数が存在しているかご存知でしょうか? 例えば、肥沃な畑土壌1グラムにはなんと1億もの微生物が住みついているのです。この途方もない微生物群の中から目的の微生物を見つける為には、確かな知恵、工夫と眼が必要であると共に女神様の優しい微笑みの幸運に恵まれることが必要です。

2. 女神様の微笑みに恵まれた有用微生物の産業応用例

“でん粉”と聞いてだれしも植物を考えるといます。微生物がまさか“でん粉”を生産するとは考えつかないと思います。カイコが繭として絹蛋白を生産するように、ある種の微生物も菌体の外に“でん粉”を生産してきます。この微生物でん粉はわずかさスプーン1杯(1グラム)で実に最高で自重の2,000倍すなわち2リットルの水を吸水保水する性能を有しております。この微生物でん粉は国内では大手化粧品メーカーによって保湿剤として実用化商品化され、さらに海外においては世界第2位及び第4位の化粧品メーカーにより欧米にて商品化されており、世界の先進諸国のご婦人、ご令嬢など多くの方々に使って頂いておりますと共に、海外旅行をされる方々は

空港等免税店にて購入して頂いていると思われます。

本稿では「微生物の産生する高機能性バイオポリマーの産業応用」について以下に記すことに致します。

3. 微生物が生産する高機能性吸水保水性バイオポリマー

①はじめに

21世紀型産業を考える時に、産業の持続的発展と環境との調和が大きな問題となってきます。その為には、新しい工業的アプローチが必要不可欠であり、21世紀の産業を考えると、製造時・廃棄後に発生する汚染物質を未来の子孫に付け残すのではなく、現時点で処理・浄化することは当然のこととして、同時にその発生を事前に防止・予防することに発想自体を広げなければならないと考えられます。

すなわち、人と環境に優しくかつ高機能性の製品を開発することにより、汚染の発生を事前に防止すること（プリベンション）に産業構造を切り替える必要があります。生分解性を持ち、安全で人と環境に優しく、かつ各種の優れた高機能性を有する環境調和型次世代「高機能バイオポリマー」の開発は多方面より期待されています。例えば、カイコが絹蛋白という素晴らしい機能性素材を体外に生産するように、微生物もさまざまなバイオポリマーを菌体外に生産しています。「人と環境に優しい」という視点からバイオポリマーをバイオ新素材（バイオニューマテリアル）として捉え、環境調和型の微生物が生産する高機能バイオポリマーの実用化への道を切り開く事を目的として研究開発を開始しました。

本技術的特徴は、自然界で水と炭酸ガスにまで完全に分解される生分解性を持ち、安全で各種の優れた高機能性、すなわち既存の合成吸水剤をはるかに凌駕する性能を有する次世代型の吸水保水性バイオポリマーの微生物生産とその実用化に関するものです。以下に概説します。

②吸水保水性バイオポリマー生産菌

菌体外にバイオポリマーを生産することを指標として、土壌よりの分離株をスクリーニングした結果、B-16株と名付けた細菌が吸水保水性バイオポリマーを最も良く生産することを見出した。本細菌はグラム陰性細菌で *Alcaligenes latus* と同定された。

③ *Alcaligenes latus* B-16株の生産する新規な吸水保水性バイオポリマー

ライフスタイルの変化と共に、種々様々な使い捨て紙オムツや衛生用品が汎用されてきており、これらに人工の合成高分子吸水剤が使用されている。これら合成高分子吸水剤はコストパフォーマンスが良く高い吸水率を示すが、しかしながら、使い捨てであるが故に環境中では容易には分解されず長期間留まり、かつこれらの合成高分子吸水剤の重合用モノマーはアクリル酸又はアクリルアミドであるアクリル酸は人体に強いかゆみを生ずる恐れがあり（Merck Indexより）、またアクリルアミドは神経毒（Merck Indexより）と共に人体に強い発ガン性を示す¹⁾²⁾。このように生態系への影響を解決するために、生分解性があり人と環境に優しい吸水保水機能を持つ代替品の開発が求められていた。

(1) 吸水能

後述の培地で *Alcaligenes latus* B-16株を培養すると多量のバイオポリマーを菌体外に生産してくる。このバイオポリマーを電気泳動的に均一にまで精製した。この精製バイオポリマーを用いて、いわゆるティーバック法にて吸水能力を調べたところ Table 1 に示すように、本精製バイオポリマーは自重の1,300倍（最高値：自重の2,000倍の水を吸水）の水を吸水する高い能力を示した。この値は汎用合成高分子吸水剤の約4～5倍の吸水能力を持つことを示している。

Table 1. Water Absorption Capacities of Various Absorbents

Sample Description		Water absorption Capacity (g) per gram of dried sample
Test Group	SP ^{a)}	1349
	FP ^{a)}	1295.4
Control Group	Pulp	3.8
	Silica Gel	1.4
	Ion-Exchange Resin	2.5
	PVA	4.6
	High-Grade Synthetic High-polymer Absorbent ^{b)}	249.4
	Anionic Synthetic High-polymer Absorbent ^{c)}	363.6

a) Bioabsorbent samples were produced using different culture conditions, i.e., by changing the culture medium's carbon sources; SP: Sucrose, FP: Fructose

b) High Grade Synthetic High polymer Absorbent : poly acrylate / PYA derivative (co-polymer of acrylate and vinyl alcohol.)

c) Anionic Synthetic High-polymer Absorbent : Polyacrylamide derivative, MW. 350 X 10⁴

(2) 保水能

3つの異なる相対湿度、64.8%, 34%, 33% (いずれも20℃ 室温下)において本精製バイオポリマーがどの程度保水能力を有しているかを合成高分子吸水剤等と比較検討した。その結果、例えば、Fig. 1に示すように、相対湿度33%の乾燥条件下に24時間放置しても保水率80%以上を保持していた。一方、合成吸水剤等は乾燥条件下にての保水性は低い。このように *Alcaligenes latus* B-16株が菌体外に生産してくる本バイオポリマーは冬の乾燥下においても保水性が極めて優れていることが判明した。

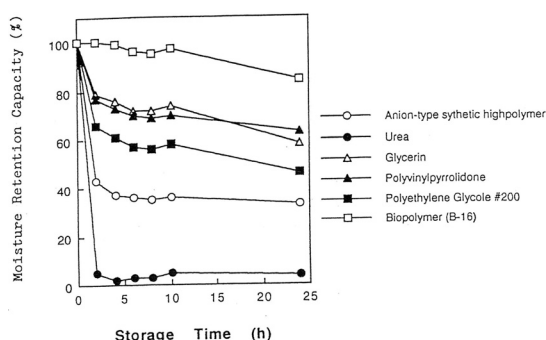


Fig. 1.
Moisture retention capacities of various absorbents.
Conditions : 33% relative humidity, 20℃,
in desicator containing a saturated of magnesium
chloride.

(3) 食塩存在下での吸水能

各濃度の食塩存在下での本精製バイオポリマーの吸水能力をFig. 2に示した。この結果、合成高分子吸水剤が食塩中でその機能を大幅に低下させるのに対し、*Alcaligenes latus* 由来の本バイオポリマーは0.9%の

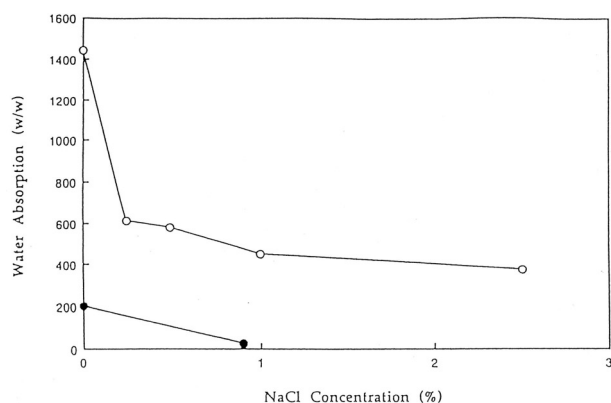


Fig. 2. Bioabsorbent and Synthetic High Polymer Absorbent Water Absorption Capacities in the Presence of Various NaCl Concentrations.
○, bioabsorbent (SP sample); ●, high-grade water absorbing synthetic high-polymer (Sumika Gel S-50).

食塩水中でも自重の約500倍の水を吸水する能力を示し、汎用合成高分子吸水剤の20倍近い能力を持っていた。この500倍という値は合成高分子吸水剤の真水における吸水量の約2倍の値である。

(4) *Alcaligenes latus* B-16株の生産する吸水保水性バイオポリマーの培養条件と精製

本吸水保水性バイオポリマーの生産には、炭素源としてグルコース、シュクロース、キシロース、フラクトース、ラムノース、セロビオースが好ましく、リンの濃度はリン酸として0.03%~0.6%、無機窒素源としては尿素が、また有機窒素源等としての酵母エキスの濃度は0.5%が最も好ましいことが検討の結果判かった。このような結果から *Alcaligenes latus*による本吸水保水性バイオポリマーの生産培地として、1リットル当たり、Sucrose (又は Glucose) 10g, K_2HPO_4 4.5g, KH_2PO_4 1.5g, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.2g, NaCl 0.1g, Urea 1g, Yeast Extract 0.5g (pH7.2)と決定し、30℃にて5~7日間培養生産することとした。以上のような結果より、本菌は本バイオポリマーを培養液1リットル当たり乾燥重量で20~25g菌体外に生産する。

ところで、*Alcaligenes latus*が菌体外に生産するバイオポリマーは精製の過程より2種類存在する事が判明した。その精製工程をFig. 3に示す。一方は高分子酸

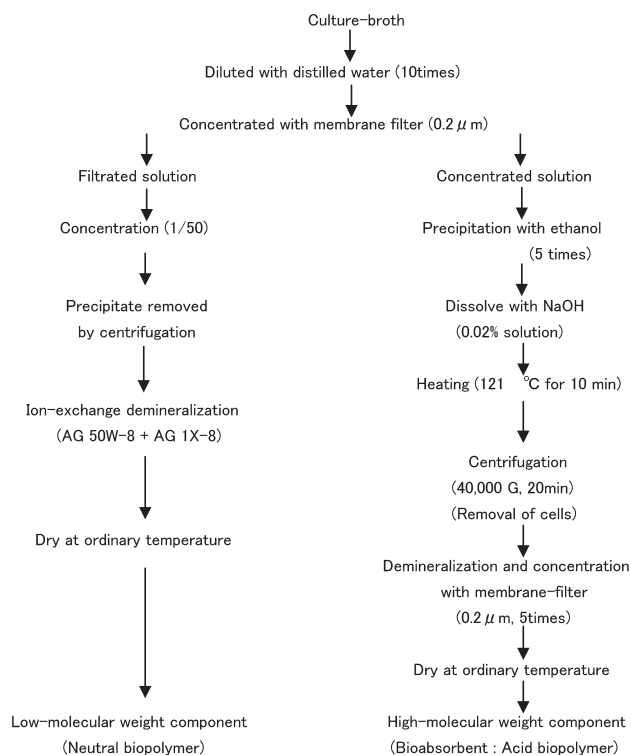


Fig. 3. Biopolymer purification

性多糖(分子量; 約 5×10^9)であり、他方は低分子中性多糖(分子量; 50,000~100,000)であった。その生産比は高分子酸性多糖が20に対し低分子中性多糖は1にすぎない。このうちどちらの多糖が吸水保水性バイオポリマーであるかを調べたところ、高分子酸性多糖が自重の約1,400倍の吸水の値を示したことにより *Alcaligenes latus* が生産する吸水保水性バイオポリマーは分子量が 5×10^9 である巨大高分子酸性多糖であることが判明した。この吸水保水性バイオポリマーはFig. 3に示すフローで精製したところ、電気泳動的に均一であった。

(5) *Alcaligenes latus* の生産する多糖性吸水保水性バイオポリマーの構成糖の決定と結合様式の決定

(5-1) 吸水保水性バイオポリマーの構成糖の決定

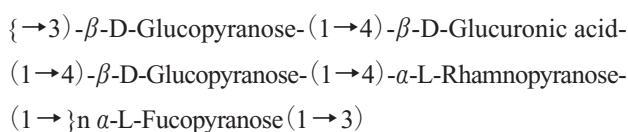
電気泳動的に均一にまで精製した本吸水保水性バイオポリマーを2M H_2SO_4 で100℃ 2時間加水分解してから、TLC, HP, LC, GC 及び GC-MSにて構成糖を調べた。一例としてHPLCの分析チャートをFig. 4に示した。

4種類の分析結果より、本吸水保水性バイオポリマーはグルコース、ラムノース、フコース、グルクロン酸の4種類の糖より構成されている多糖類であることを明らかにした。

各々の構成糖比は、加水分解条件をいろいろとふることにより、グルコース:ラムノース:フコース:グルクロン酸=1.8:1.1:1:1とした。

(5-2) 吸水保水性バイオポリマー等の多糖結合様式の決定

電気泳動的に均一にまで精製した本バイオポリマーを用いて、単糖類分析、メチレーション分析、一次元及び二次元の 1H 及び ^{13}C NMR分析と酵素分解を駆使し、MALDI-TOF-MSとLC-MS機器分析を行うことによって、その繰り返し構造(リピートユニット)の結合様式を決定した。吸水性バイオポリマーは、特定のユニットの繰り返しで構成されており、下記の特定のユニットの繰り返し構造を有すると結論された。



5-1 及び 5-2 の結果より、*Alcaligenes latus* の生産する吸水保水性バイオポリマーは4種の糖より構成されており、その主鎖としてはグルコース、ラムノース、グルクロン酸の3種類の糖が結合し、側鎖としてフコースより構成されている事が判明した。これら4種の糖の中で特に注目されるのはフコースである。フコースは小麦や稲等の陸上の植物からは見つからず、わずかにヒジキや海藻等の海の植物中に検出される極めてめずらしい糖である。吸水保水性バイオポリマーは、合成高分子吸収剤

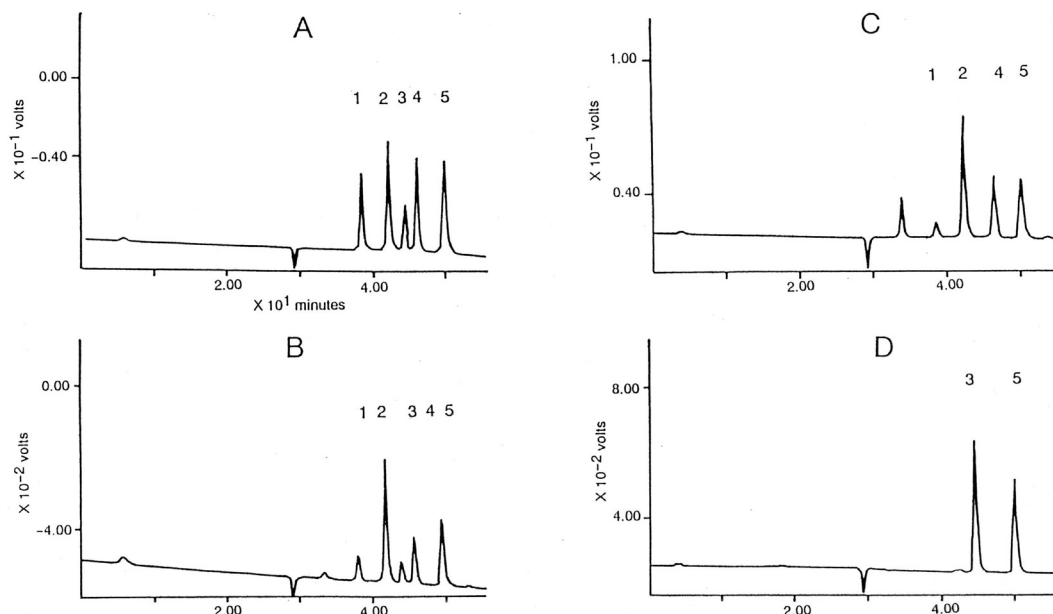


Fig. 4. HPLC Charts for Standard Samples and the Hydrolyzate of the Bioabsorbent.

A: Standard samples. 1. Glucuronic acid 2. Glucose 3. Mannose 4. Rhamnose 5. Fucose.
B: Hydrolyzate of polysaccharide component including high and low-molecular-weight biopolymer before separation.
C: Hydrolyzate of the high-molecular-weight acid biopolymer (the bioabsorbent).
D: Hydrolyzate of the low-molecular-weight neutral biopolymer.

がイオン結合の力で水分を取り込んでいるのに対して、特定の繰り返し構造を構成する4種の糖が、特に手に相当するフコースが水分子をまるで抱きかかえるようにして水を吸水しているものと強く示唆された。

(6) 大量工業品の実生産プロセスならびに高純度精製実生産プロセスの開発

酵母エキ스는 *Alcaligenes latus* B-16株が吸水保水性バイオポリマーを生産する上で有効な培地成分である。しかしながら、実規模で大量に実生産プロセスに乗せる上で少なからず問題点を含んでいる。例えば酵母エキスそのものに基準品(スタンダード)がなく、かつ工業上で大量に使用するには高価格である。これらの問題点を解決するために完全合成培地の検討を行った。酵母エキスの代替としてアミノ酸の効果について Table 2 に示した。Table 2 に示すように、数種のアミノ酸の培地への添加が、特に価格等を考慮すると Glycine の添加が有効であった。同様に微量なミネラルの効果について検討したところ鉄イオンの添加が有効であることが示された。

以上のような結果より、完全合成培地として培地 1 リットル当たり、Glucose 10g, K_2HPO_4 4.5g, KH_2PO_4 1.5g, Urea 1g, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 10mg, Glycine 0.1g, pH7 と決定した。

また、吸水保水性バイオポリマーは高い増粘性も示す。この増粘性をコントロールする手段としてアルカリ条件下での熱処理を試みたところ Table 3 に示すようにその粘性をコントロール出来ることが示された。

Table 2. Effects of amino acid and yeast extract on biopolymer production (viscosity : cps)

Amino acid	Viscosity (cps)	Amino acid	Viscosity (cps)
Yeast extract	2,140	Valine	900
Methionine	1,200	Tyrosine	920
Leucine	120	Histidine	540
Isoleucine	200	Proline	20
Phenylalanine	540	Aspartic acid	40
Tryptophan	32	Glycine	3,400
Threonine	480	Citrulline	4,000
Glutamic acid	2,656	Lysine	520
Alanine	320	Arginine	2,440
Serine	240	Cysteine	320
Ornithine	800	none	—

— : No viscosity was found,

Rotary viscometer, no.3 rotor, 30rpm.

Culture conditions : Glucose 1%, urea 0.1%, vitamin mixture, metal mixture, pH7.2, Erlenmeyer flask (300ml), rotary shaker, 180rpm/min, 7d at 30°C.

Vitamin mixture : p-aminobenzoic acid 20 µg, inositol 0.2mg, vitamin A 2 µg, nicotinic acid 40 µg, vitamin B₁₂ 0.5µg, vitamin B₁ 40 µg, Ca-pantothenate 0.4 mg, vitamin B₂ 40 µg, vitamin B₆ 40µg / 1,000ml of the medium.

Metal mixture : $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 5mg, $Na_2WO_4 \cdot 2H_2O$ 0.5 mg, $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$ 0.5 mg, $MnSO_4 \cdot 5H_2O$ 0.5 mg, $CaCl_2$ 10mg / 1,000 ml of the medium.

Table 3. Viscosity comparison of various thickening agents

	Apparent viscosity (mPa·s)		
	30°C	50°C	78°C
B-16 polymer (untreated)	50	45	45
Xanthan gum	56	36	11
Wellan gum	46	40	20
Rhamzan gum	76	70	65
B-16 polymer (pH 12.25, 5 min)	175	168	147
B-16 polymer (pH 12.25, 80 min)	515	380	230

The viscosities were measured with a BM-type rotational viscometer (no.2 rotor, 30rpm, 1 min) after storing each polymer aqueous solution (0.1wt%) overnight at 30°C, 50°C and 78°C.

(7) 実用商品化

(7-1) 吸水保水性バイオポリマーの基本的性状

実用・商品化を行う上での本吸水保水性バイオポリマーの基本的な性状を検討した。本吸水保水性バイオポリマーはシュウドプラスチック性を示すと共に、温度安定性も極めて優れていた。粘度を指標として各種のポリマーの温度安定性を Fig. 5 に示した。Fig. 5 に示すように本吸水保水性バイオポリマーは 5°C~80°C まで完全に安定であることが示された。さらに、pH 安定性も pH4-12 の範囲で一定である (pH3 でゲル化)。塩濃度安定性も 0.025%NaCl 濃度以上でわずかに上昇した後 1% まで一定の安定性を示すと共に保存安定性も極めて優れており、また、5°C、32°C、50°C の保存下で 4 週間の高い安定性を示し、商品の販売における様々な環境条件下にて何ら問題点が無いことが示された。

<The viscosity vs. temperature>

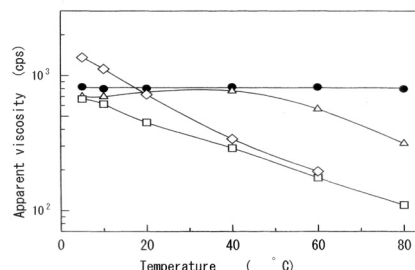


Fig. 5. Apparent Viscosities vs. Temperature of the bioabsorbent from *A.latus* B-16 and other polymers.

● : B-16 polymer (0.2%), △ : Xanthan gum (0.5%),
□ : Sodium alginate (1.0%), ◇ : HPMC (1.0%).

(7-2) 化粧品等への適用による実用・商品化

Alcaligenes latus B-16株が生産する吸水保水性バイオポリマーの化粧品への実用・商品化はカネボウ化粧品研究所により開発された。化粧品の分野においては

人間の肌にいかに水分を与えてうるおいを与えるかが極めて重要であり、人と環境に優しいバイオポリマーをその素材として用途開発がなされ、厚生省(当時)の審査を経て発売され、今日に至るまでその使用量は年々増加してきている。最初に発売された新しいタイプのパックと共に現在では化粧水や乳液にも採用されている。また、海外の世界第2位および第4位の化粧品メーカーにも本吸水保水性バイオポリマーは輸出されている。今後とも様々な化粧品の可能性が大きく開けるものと期待されている。

さらに、工業品グレードの本吸水保水性バイオポリマーがボールペンにも書きやすさと途中で途切れないことから採用され販売されている。

(7-3) さらなる可能性を目指して;砂漠の緑化

21世紀をおびやかす地球規模でのグローバルな問題として地球温暖化と共に砂漠化の急速な拡大がある。国連等の統計によると、地球全体で毎年20年前には60,000km²(ほぼ日本の四国の総面積に匹敵)が、そして今日では砂漠化面積は年々増加し日本の九州の総面積が砂漠化していると報告されている。

*Alcaligenes latus*の生産する吸水保水性バイオポリマーを砂とわずかに混ぜて保水力を調べてみた。Fig. 6にその結果を示した(Fig. 6 左 20℃、真ん中 45℃、右 70℃)。Fig. 6に示すように他の吸水保水剤と比較して、極少量の添加量で本吸水保水性バイオポリマーの保水力が極めて優れていることが判かる。この基本的な性質を基にして、ホウレン草レベルであるが種子の発芽割合及び苗の成長速度が極めて少量の水を供給しているに

過ぎない極乾燥条件下においても、十分な水を散水している時と同様な発芽割合と成長速度が確認された。微生物が産生する吸水保水性バイオポリマーは砂漠緑化という地球規模での大問題に、もしかしたら寄与できうる可能性を秘めているものと考えている。すなわち、微生物が作り出す吸水保水性バイオポリマーは、4種類の糖より構成されている人と環境に優しいバイオポリマーである。土に混ぜてもいづれは生分解されると共に、環境に悪影響がなく、わずかな水で水分豊かな肥沃な大地を作り出せる可能性を秘めている。21世紀が直面する大きなグローバルイシューとして地球全体で進む砂漠化防止に役立つ大きなポテンシャルがある可能性が期待できる。

【謝 辞】

本吸水保水性バイオポリマーは伯東(株)四日市研究所の野畑靖浩氏と黒宮友美氏との共同研究成果です。心より感謝の念を示します。また、吸水保水性バイオポリマーの構成糖結合様式の決定については京都大学大学院(農学系)東 順一教授に、実生産培養については(株)興人 久芳啓資氏をはじめ関係者の皆様に、化粧品の実用化については当時のカネボウ(株)化粧品研究所の大西重樹博士はじめ、さらに多くのご賛同者・ご協力者の皆さまに対して、本紙面を借りまして厚くお礼申し上げます。

参考文献

- 1) Vanherrick, M.; and Moens, W. Carcinogenesis, 1983, 4(11), 1459-1463.
- 2) Dearfield, K. L.; Abermathy, C.O.; Ottley, M. S. Brantner, J. H.; Hayes, P. F. Mutat. Res. 1988, 195(1), 45-77.

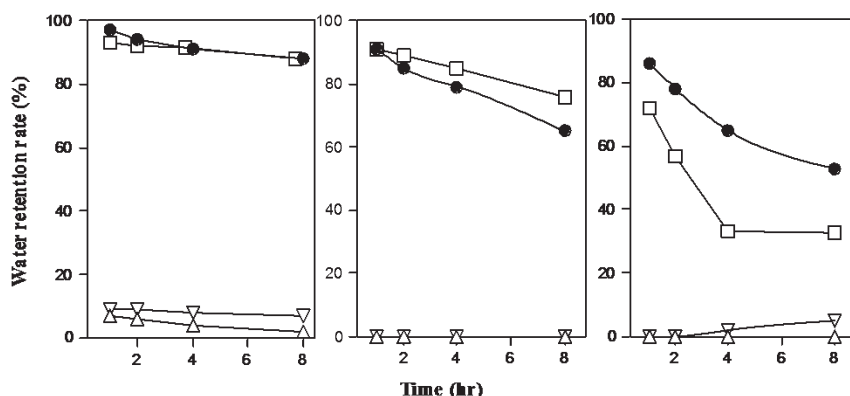


Fig. 6. Effect of temperature on reducing drainage activities of the bioabsorbent from *A. latus* B-16 and other polymers.

●, bioabsorbent 213 ppm; □, sodium alginate 3,077 ppm; △, xanthan gum 611 ppm; ▽, anionic polymer 868 ppm. Apparent viscosity of each sample was 50 cps. The particle diameter of sand was 50-80 mesh.

流体物理洗浄(3)

ジェット洗浄、ブラシ洗浄、その他

Physical Fluid Cleaning (3) Jet, Brush, and other topics

静岡大学 学術院 工学領域 准教授 真田 俊之

Sanada Toshiyuki (Associate Professor)

College of Engineering, Academic Institute, Shizuoka University

北海道大学 大学院工学研究院 機械宇宙工学専攻 教授 渡部 正夫

Watanabe Masao (Professor)

Division of Mechanical and Space Engineering, Faculty of Engineering, Hokkaido University

1. はじめに

3度目となる流体物理洗浄の紹介は、前回の超音波に引き続き、幅広く使用されている洗浄手法であるジェット洗浄やブラシ洗浄について、現在理解されているメカニズムを紹介する。このようなシンプルな現象でさえ、未解決な物理がふんだんに含まれていることを強調したい。その後、微細な孔やパターンの中などの洗浄で問題になる、細孔内への液体侵入について私見を述べたい。

微細な液滴群であるスプレーは、工業上幅広い分野で使用されている。しかしジェット洗浄を行うには一工夫が必要である。その工夫や、液滴を衝突させることによって発生する高い圧力や速い流れはどのように形成されるのかを紹介する。

一方、接触式のブラシ洗浄はどうやって不純物を除去しているのだろうか。ブラシの種類にもよるが、まだ完全には理解されていない。半導体デバイス製品から洗車まで幅広く使用されているPVAブラシの洗浄メカニズムについて現在提案されているモデルを述べると共に、研究者によって行われてきた議論を紹介する。

最後に、表面を濡らしたい場合、表面張力は低い方が良いのか、それとも高い方が良いのであろうか。どうやって液体は細孔へと侵入しているのであろうか。表面張力という分かりにくい物理量と、洗浄で重要となる濡れについて議論したい。

2. ジェット洗浄

ジェットとは英語のJetのことで、広辞苑では、「孔口から流体が連続的に噴出する形態。また、その噴出物。噴流。」となっている。第一回で紹介したように、気体の噴流のみでは洗浄効果は低い。そのため、物理的作用が必要な洗浄物では、液滴などを衝突させることによって高い圧力や局所的な高速な流れを発生させ洗浄を可能としている。このような気体と液体を混合させ高速で噴射し洗浄する技術を2流体ジェットと呼ぶが、この2流体にすることのメリットや周囲気体の影響などについては他にもレビュー記事を執筆しているのでそちらを参考にしていきたい¹⁻²⁾。簡単に述べれば、簡単に圧縮できる気体を用いて高速な流れを作り、密度が気体の1,000倍近い液体を加速させて被洗浄物へと衝突させるのである。今回は高い圧力や高速な流れが発生する理由について紹介する。

前回の記事において、非圧縮性流体のベルヌーイの定理と呼ばれる式を紹介した。ベルヌーイの式は、速度と圧力の関係を示した式であり、

$$p + \frac{1}{2}\rho V^2 = \text{const}$$

と示された。ここで、 p は圧力、 V は速度、 ρ は密度である。この式によれば、流れが遅くなる地点では圧力が高くなる。一方で、流体の流れを急にせき止めた場合には、流体が圧縮され、その際の圧力上昇 Δp は次式で示される。

$$\Delta p = \rho C \Delta V$$

ここで、 C は音速、 ΔV は速度の変化である。この圧力

の急激な上昇は密度や音速の大きな液体で顕著に観察され、流体が水の場合には水撃 (Water hammer) と呼ばれている。水道などで急激に蛇口を閉めるとカーンという音がすることがあるが、これはこの水撃現象と関係しており、バルブ等を破壊する恐れがあり注意が必要である。

それでは、この一次元の水撃理論によって発生する圧力を見積もってみよう。また流れをせき止めて発生するベルヌーイの定理から導かれる圧力とも比較してみる。 $V = 10 \text{ m/s}$ 程度の水の流れを考える。水の密度は $1,000 \text{ kg/m}^3$ 程度、音速は 1500 m/s 程度となる。ベルヌーイの定理から導かれる圧力は $1/2 \times 1,000 \times 10^2 = 5 \times 10^4 \text{ Pa}$ 程度と、1 気圧が $101.3 \text{ kPa} \approx 10^5 \text{ Pa}$ であることを考えるとそれほど大きな値では無い。一方、水撃圧力は、 $1,000 \times 1,500 \times 10 = 1.5 \times 10^7 \text{ Pa}$ と 150 気圧程度となる。非常に大きな値である。さらに高速な場合、例えば数 100 m/s 程度になると、水撃圧力はさらに大きくなってしまい、材料の降伏応力と同程度の値となってしまう。これが、液滴衝突によって発生するエロージョン (前回のキャビテーションエロージョンも同じ) の原因となる。このように、液体の流れを急激にせき止めると非常に高い圧力が発生する。なお、液滴が衝突した際に発生する圧力は、液滴が曲率を持つため、さらに複雑となり、局所的にはこの水撃圧力よりも高い圧力が発生し、水撃圧程度では破壊されない材料でさえも、エロージョンが観察されることが知られている³⁾。

液滴などを高速で衝突させ、局所的に高圧を発生させると、表面が振動し、その振動の加速度による慣性力が付着力を上まわれれば、表面の粒子を除去することができる。これは Hopping や Trampling と呼ばれる粒子除去モデルとして知られている。実際にレーザーを使って局所的にかつ短時間で対象物を熱膨張させ、その作用によって不純物が除去できることが観察されている⁴⁾。

一方、第一回で紹介したように、流体の流れを使用して微粒子を除去する場合には粒子を回転させる Rolling が主たるメカニズムである。液滴が衝突した際には高速な横方向流れが観察されることが知られているが、何故だろうか。場合によっては、衝突速度の数倍にもなる高速な流れを発生させることができる。その理由の一つとして液滴の曲率が挙げられる。簡単な 2 次関数 (放物線) を使って説明する⁵⁾。

図 1 にモデル図を示す。原点で対称な放物線が $x = 0$ の壁面へと衝突することを考える。この時、壁は剛体壁 (変形しない) とする。 $t = 0$ で衝突したと仮定し、その後の時刻の放物線を求めると、次式で示される。

$$y = \frac{x^2}{L} - Vt$$

ここで、 L は液滴径程度の大きさで、長さの次元を持つ量、 V は衝突速度である。液滴が衝突して圧縮されると考えると、 $y < 0$ の領域の面積が圧縮されることになる。そのとき、接触点 (X_e, Y_e) の座標を考える。この接触点の x 座標の値は液滴が衝突後どのように変化するかを見るため、 X_e を求めると

$$X_e = \sqrt{VtL}$$

となる。この接触点の速度は時間微分となるため

$$V_e = \frac{dX_e}{dt} = \sqrt{\frac{VL}{4t}}$$

と表される。すなわち、横方向速度 V_e は、衝突時 $t = 0$ では無限大となって発散してしまう (数学的には特異点と呼ばれる)。実際には無限大の速度は無いので、 $t = 0$ を除いて考えれば良い。速度は時間と共に放物線的に減少するものの、初期の段階では非常に高速となる。実際に、数値解析や実験の観察結果においても、衝突速度の数倍に達することが観察されており⁶⁾、条件によっては液中の音速を大きく超える。

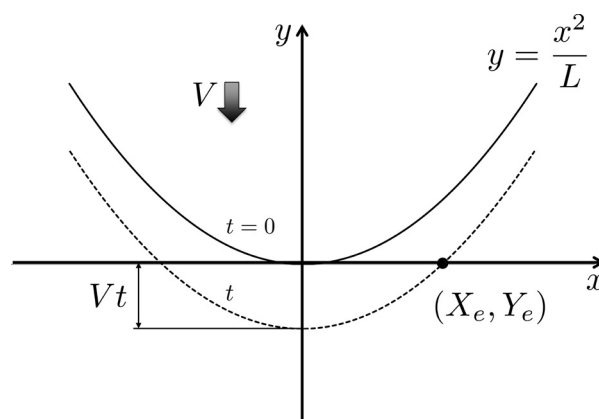


図 1 放物線を持つ曲率の衝突

以上のように曲率を持った液滴を高速で衝突させると、単純には予想できないような様々な物理現象があり、このような現象が洗浄に絡んでいるのである。なお、今回は接触線の詳細物理については割愛したが、固体と液体および気体の三相界面は非常に深い物理があり、

多くの研究者が熱心に研究を続けている⁷⁾。

これまで説明したように、二流体ジェットでは高速な液滴衝突が重要となる。一方で、気体と液体を混合して噴射するノズルは様々な目的のために開発されており、二流体ノズルと呼ばれるものであってもそれが洗浄に適しているとは限らない。特に二流体用のノズルは、微細な液滴を発生させ、液滴の表面積を増加させることを目的にしたものが多い。そのため状況に応じてノズルは自作する必要がある。このような場合には混相用のノズル、例えば溶射技術などを参考にすれば良いだろう⁸⁾。気相の加速だけでなく、液相の加速区間も十分に考慮する必要がある点が重要である。すなわち液体と気体には相対速度が存在する。このことは数値解析によってノズル設計を行う際にも重要である⁹⁾。

3. ブラシ洗浄

筆者の経験ではブラシ洗浄は大きく2種類に分けられる。1つは歯ブラシのようにナイロン系樹脂を使用したもので、他方は水を十分に染み込ませたスポンジ状のものである。この2種類の特長について、ある展示会にて洗浄用スポンジを販売しているメーカーより聞いた言葉が的を射ており、ここで紹介したい。その説明とは、ナイロンは「ほうき」、スポンジは「雑巾」というものである。

ナイロン系の樹脂での洗浄は、ほうきとしての機能が重要となる。不純物を掃いて取り除くのである。そのため、どの程度の弾性を持っているかが重要となり、たわみを持たせた後にどの程度の時間で元に戻り、その際にどの程度の力を発生させるかが詳細に調査されている¹⁰⁾。また歯磨きなどで使用される場合には、歯磨き粉などとの相性や歯磨きの方法が重要となるようである。このようなほうきにおいては、対象物に応じて工夫が必要だが、洗浄のメカニズムとしては樹脂などに蓄えられた弾性エネルギーを開放する際に、その樹脂が高速で動き、粒子を除去すると言えよう。そのため、ブラシが変形してしまい、へたってしまったら交換時期となる。

一方、スポンジによる洗浄は、十分に水を保有しているため弾性を持つ固体と粘性を持つ液体とが混在し表面をこする。この固液混相状態が洗浄メカニズムの理解を難しくしている。本稿では、この点について議論してみたい。スポンジをこすることによって一部脱落させ、

研磨剤のように扱うメラミン系のスポンジも存在するが、今回は除外して検討する。

雑巾のようなスポンジによる洗浄も複数の研究者によって調査されてきた。しかし、その文献を見る限りとても混乱しているように思う。例えばCMPと呼ばれる半導体製造プロセスの工程後の洗浄のモデルにおける提案を見てみると、主として2つのメカニズムが提案され、同一の著者であっても、時期によって主張が異なったり、その2つのメカニズムが同時に発生しているという説明が多い。この洗浄工程ではPVAブラシと呼ばれる高分子が使用されるが、そのPVAブラシで提案されている2つの洗浄メカニズムを見てみよう。

一つは第一回で紹介したせん断流れによって粒子がRollingを行うというものである。この洗浄メカニズムを主張している論文では、図2に示すように、スポンジと洗浄対象物とは接しておらず、その間の流体に速度勾配が存在し、その速度勾配によって除去されるというものである。このような速度勾配は固体表面間では十分に考えられる(軸受けは、おおよそこのような速度分布と考えられている)。しかしこの仮定には、筆者は疑問を感じる。多孔質体とも見なせ、複数の孔が開いているスポンジにおいて、表面は滑り無し境界条件(速度がゼロ)とは限らない。そのため、このような速度勾配がそもそも発生しているかは自明ではなく、また信頼できる観察結果も報告されていない。

さて、PVAブラシの研究では摩擦力を測定して、その摩擦力からどのような接触状態になっているかを予測する研究が多い。固体と表面との間に液膜があり、一定の速度勾配が形成される条件になると摩擦はどうなるのであろうか。固体間が液体で満たされて相対運動する状態を流体潤滑と呼ぶが、このような状態での摩擦係数は0.001から0.01程度と言われている。一方でPVAブラシの表面との摩擦係数は、様々な研究者が測定しており液体のpHに依存するが、0.1から1.0程度である¹¹⁻¹³⁾。これは流体潤滑とは言いがたい。そのため、単純なせん断流れによって粒子が除去されているモデルは、現実とは異なると予想する。

なお、ロールブラシを回転させるためのトルクは測定しやすい物理量である。その際に、どの程度の粒子が除去可能かを見積もるため、トルクと粒子除去の関連も検討されている¹⁴⁾。しかしその解析手法は、一定の速度

勾配を持つ液膜が存在すると仮定し、この速度勾配によって散逸するエネルギーとブラシを回転させるためのトルクによる仕事釣り合うとの仮定によって、液膜厚さを見積もる解析となる。しかしながら、そもそもブラシを回転させるための仕事は、液膜内での粘性散逸のみとは限らず、ブラシを回転させるための仕事と表面摩擦による仕事の組み合わせであるため、その仮定から間違っており、結果が正しい保証は無い。

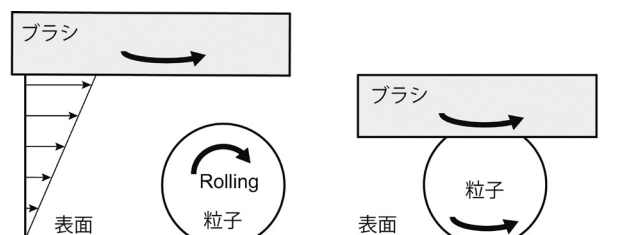


図2 PVA ブラシの洗浄モデル 左：rolling、右：full-contact ¹⁵⁾

もう一つのモデル洗浄モデルは、付着である。図2に示すようにブラシが接触する際に、表面に存在する不純物がブラシと付着し、取り除かれるというメカニズムである。雑巾等で表面を掃除すれば、雑巾が汚れるため、まず予想するメカニズムである。しかし、微小なスケールの不純物の除去を考えると、それほど現象は単純では無い。

例えば、ブラシ洗浄のモデルに関する Northeastern University のグループの論文では ¹⁵⁾、様々な理論を用いて表面に存在する微粒子除去メカニズムを検討している。前述した rolling による作用では、微粒子を除去することは困難で、直接接触 (full-contact) によるモーメントを評価している。直接接触で得られるモーメントは、除去に必要な値に比べ 10^{15} 倍以上も大きなオーダーであり、このメカニズムであれば 100% 除去可能である。しかし現実には 100% 除去することは困難であり、このような付着力が発生していれば、洗浄後ブラシに接触した粒子は取り除くことが出来ないだろう。しかし、実際のプロセスでは、PVA ブラシは繰り返し使用され、洗浄時には粒子を表面から取り除き、その後クロスコンタミネーション防止のため、ブラシから粒子を取り除く必要があるため、それほど単純では無いことが予想される。

一般的に摩擦は、真実接触面積と呼ばれるミクロスケールで実際に表面と接している面積に強く関連しており、見かけの接触面積とは大きく異なる。ここで一般的な固体において、真実接触面積は荷重に比例し、みか

けの接触面積の 1% 程度、1 つの真実接触点の大きさは $10\mu\text{m}$ 程度かそれ以下と言われている ¹⁶⁾。接触しているように見えても、ミクロスケールで見れば接触している箇所は非常に限られている。そのため、PVA ブラシの場合を考えてもブラシと表面の微小パーティクルが直接接触する確率は極めて低いことが予想される。以上のように接触と言っても未だに未解明な点は多い。

なお、筆者らの研究によって、ブラシと表面の摩擦は、特にロール型ブラシを使用する際に対象物濡れ性に依存することや、ブラシの粘弾性とノジュール（表面の突起物）によって局所的に摩擦力を増加させることができることなどを示した。詳細は文献を参照されたい ¹⁷⁻¹⁸⁾。今後、よりミクロな領域での研究を続ける予定である。

4. 微細パターンへの液体侵入

洗浄対象物は平坦とは限らない。このような表面を洗浄する際には、液体と表面の濡れ性や液体自身の表面張力が重要となる。微細パターン内の洗浄を行う際に、洗浄液がパターンに入らない限り効果的な洗浄が期待できないためである。本節ではこのような凹凸を持つ表面において、表面はどのように濡れるのかを検討する。表面張力の説明には力の考え方とエネルギーの考え方があがるが、筆者には界面近傍分子の圧力テンソルの非等方性という力の概念が分かりやすい ¹⁹⁾。しかし、この表面張力の概念は難解であり、その説明のみで一つの解説になってしまうためここでは省略する。参考のため、表面張力をイメージするのに優れた文献を引用しておく ²⁰⁻²¹⁾。なお、最近、細管内に液体が侵入している際の現象を説明するにはエネルギーのみでは不十分で、力の概念が必要だという主張の論文も報告されている ²²⁾。

さて、表面張力と濡れおよび洗浄に関して以下のような説明が一般的である。例えば、なぜフッ素系洗浄剤が精密部品などの微粒子洗浄に用いられるか、という質問であれば、洗浄液の表面張力が小さいからという答えである。表面の微細な隙間に洗浄液が入り込むことが容易であるからである。表面張力が低い方が微細な隙間に洗浄液が入りやすいのだろうか。ここで、力学的視点から表面張力による濡れを考えてみよう。

まず、表面張力が低いほど濡れるとは、どのような場合であろうか。例えば同じ表面エネルギーを持った固体

の場合には、液体の表面張力が低いほど、接触角は小さくなる。例えば図3に示すように、比較的表面エネルギーの小さな高分子の膜の上では、表面張力の大きな水は丸くなり接触角は大きく、表面張力の小さなアルコールは接触角が小さい。先ほどの回答は、このような考え方に依存していると予想する。これは、油污などの除去のイメージ図と一致する。例えば図4のような油が水中の表面に存在した際に、界面活性剤を添加したとする。界面活性剤の添加は接触角を徐々に変化させ、最終的に油が離脱する。ローリングアップと呼ばれる現象である。この際には、表面張力を低くすることで水の濡れが促進し、油の除去が可能となる。すなわち表面張力を低くすることで、表面と油の間にその液体が濡れていくのである。

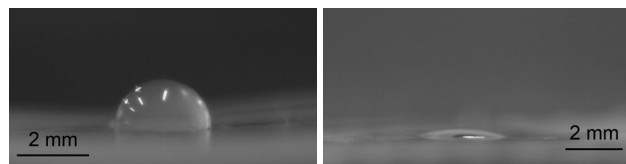


図3 シリコンラバー上の液滴(左: 水 右: エタノール)

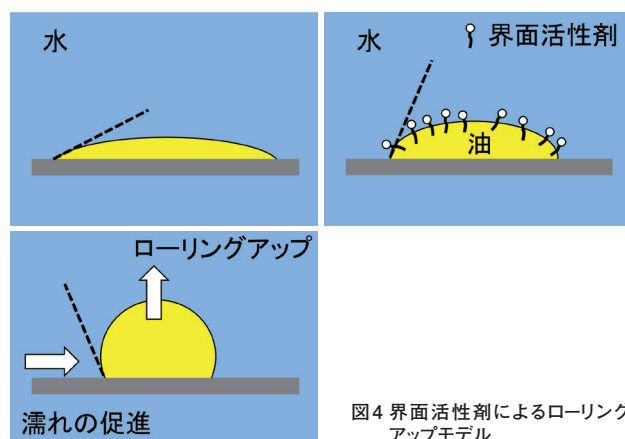


図4 界面活性剤によるローリングアップモデル

一方、凹凸や微細なパターンなどを持った表面の場合どうであろうか? 例えば毛細管現象という微細な管の中を液体が上昇(もしくは下降)する場合を考える。図5に示すように固体表面上の接触角と同様に考え、濡れやすい細管、例えばガラスなどは液体が上昇する。逆に、濡れにくいテフロンなどの細管では下降してしまう。この際の上昇(下降)量 h は、

$$h = \frac{4\sigma \cos \theta}{\rho g d}$$

で示される。ここで σ は表面張力、 d は細管径である。

接触角 θ で正負が逆転することからも、濡れやすさを接触角によって整理できることが理解できるだろう。この点においても、同じ材料であれば、接触角が重要となる。

視点を変えこの毛管現象について、細管の大きさについて考えてみる。式によれば、管が小さいほど上昇量は大きくなる(図5)。接触角が異なる場合でも、管が小さくなることで上昇量を同じにすることができる。これは検討している系における表面張力の支配度を示しており、微細な管では重力などの作用に比べ表面張力が支配的になることを意味する。

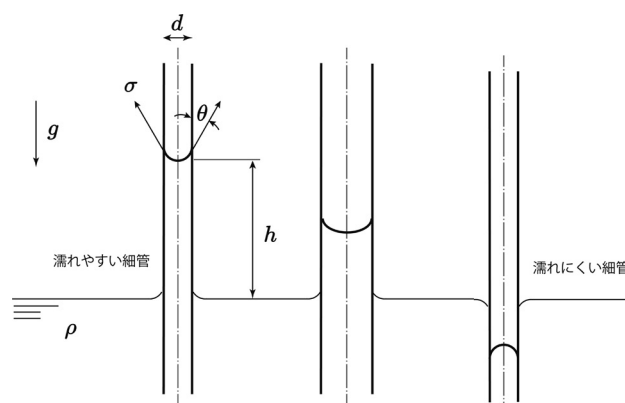


図5 毛細管現象

このような視点から表面張力を考えるとどうであろうか? つまり細管では、通常の管に比べて表面張力が支配的であり、表面張力が(相対的に)大きいから上昇量が大きくなるといえる。例えば、筆者は以下のような質問を頻繁に受ける。近年のパターンの微細化によって洗浄液が細孔に入らなくなる。どうすれば良いか。この回答として言えることは、同じ材料である限り、孔が小さくなることで洗浄液が入らなくなることは無い。むしろ、小さな孔の方が表面張力が(相対的に)大きくなって、入りやすくなるはずである。入らないのは、新規材料等を導入することによって、そもそも接触角が大きな液体と材料の組み合わせであることが多い。これらの効果は微細になればなるほど強調されるため、問題が表面化するのであろう。

細管の先端が封じられている場合はどうであろうか。このような場合には、表面張力と空気の溶解、外部圧力が重要となる。液体が侵入するということは、気体の体積を小さくすることで、気体の液体への溶解や気体排出のための流路が確保されない限り、圧力が上昇してしまうためである。これらに関しては、空気の溶解の

みでの見積もり²³⁾や実験による調査²⁴⁾が報告されている。著者らの見積もりによれば、数ミリメートルから数十マイクロメートルまでは表面張力は支配的では無く、侵入のためには外圧が必要となる。すなわち二流体ジェット等の液滴の衝突が必要である。さらにサブマイクロメートルの微細管になれば、表面張力が支配的となり気体が圧縮され高压に、気体が高压になればヘンリーの法則によって溶解が促進されるという現象が予測できる。すなわち、管が小さいほど液体侵入は問題では無くなるのである。なおナノスケールの表面では表面ナノバブルなど、まだ物理学の問題としても活発に議論がされている話題もある。また、ナノスケールでは表面張力の作用を大きくすれば(接触角が小さければ)液体は簡単に侵入するが、一方で乾燥時のパターン倒壊の原因となりうる。そのため接触角の制御が重要となる²⁵⁾。

6. 流体物理洗浄のまとめと謝辞

3回に渡って流体が絡む物理洗浄について紹介を行った。今回紹介したように、その物理現象は非常に複雑であり、未だに解明されていない事項も多い。そのため技術開発の際には試行錯誤になり易い。一方で、単なる試行錯誤のみによらず、原理原則に従えば、様々な洗浄可能性も見えてくる場合が多い。試行錯誤の際にも、メカニズムを再考することで、検討しなかったパラメータが浮上する可能性もある。ぜひ、再検討していただきたい。なお、この物理洗浄という技術は広範囲で使用されているにも関わらず、その基本概念が体系的に整理されているとは言い難い。他の技術と比べ、論文等も極めて少ない。そのため、これからも体系化に向けて研究を続ける予定である。

最後に、本研究遂行には科研費等の支援を受けたものが多く、また多く知見は、共同研究の成果として得られたものである。特にアクアサイエンス株式会社との2流体ジェットの共同開発、および株式会社荏原製作所とのPVAブラシの洗浄メカニズム解明の共同研究による経験に依存している点が多い。また応用物理学会界面ナノ電子化学研究会での交流によっても様々な知見を得た。ここに記して関係者への謝辞としたい。

参考文献

- 1) 真田俊之, 渡部正夫, 関映子, 林田充司. 砥粒化工学会誌. 2011, 55(11), 640-643.
- 2) 真田俊之, 渡部正夫. エアロゾル研究. 2014, 29(4), 236-240.
- 3) Kennedy, C.F.; Field, J.E. J. Mater. Sci. 2000, 35(21), 5331-5339.
- 4) Kudryashov, S.I.; Allen, S.D. J. Appl. Phys. 2002, 92(9), 5159-5162.
- 5) Lesser, M. Drop-Surface Interactions CISM International Centre for Mechanical Sciences. Rein, M., ed. Springer Vienna, 2002, 456, 39-102.
- 6) Tatakura, Y.; Fujikawa, T.; Jinbo, Y.; Sanada, T.; Kobayashi, K.; Watanabe, M. ECS J. Solid State Sci. Technol. 2015, 4(9), N117-N123.
- 7) Snoeijer, J.H.; Andreotti, B. Ann. Rev. Fluid Mech. 2013, 45, 269-292.
- 8) 片野田洋, 山本秀樹, 松岡武司, 松尾一泰. 日本機械学会論文編集B編. 2006, 72(714), 271-278.
- 9) Sanada, T.; Mitsuhashi, Y.; Mizutani, H.; Saito, T. Nuclear Engineering and Design. 2010, 240(12), 3974-3983.
- 10) Vanegas Useche, L.V.; Abdel Wahab, M.M.; Parker, G.A. J. Sound Vib. 2007, 307(3-5), 778-801.
- 11) Philipossian, A.; Mustapha, L. J. Electrochem. Soc. 2004, 151(7), G456-G460.
- 12) Dedy, N.; Hong, L. J. Tribol. 2008, 130(2), 021603-021603-5.
- 13) Fujiwara, T.; Sanada, T.; Fukunaga, A.; Hiyama, H. Solid State Phenomena. 2013, 195, 213-216.
- 14) Xu, K.; Vos, R.; Vereecke, G.; Doumen, G.; Fyen, W.; Mertens, P.W.; Heyns, M.M.; Vinckier, C.; Fransae, J.; Kovacs, F. J. Vac. Sci. Technol. B. 2005, 23(5), 2160-2175.
- 15) Busnaina, A.A.; Lin, H.; Moumen, N.; Feng, J.; Taylor, J. IEEE Transactions on Semiconductor Manufacturing. 2002, 15(4), 374-382.
- 16) 松川宏. 摩擦の物理. 岩波書店, 2012, 116p.
- 17) Hara, Y.; Sanada, T.; Fukunaga, A.; Hiyama, H. Solid State Phenomena. 2015, 219, 148-152.
- 18) Hara, Y.; Sanada, T.; Fukunaga, A.; Hiyama, H. ECS J. Solid State Sci. Technol. 2015, 4(5), 141-148.
- 19) 小野周. 表面張力. 共立出版, 1980, 146p.
- 20) Berry, M.V. Phys. Educ. 1971, 6(2), 79-84.
- 21) Marchand, A.; Weijis, J.H.; Snoeijer, J.H.; Andreotti, B. Am. J. Phys. 2011, 79(10), 999-1008.
- 22) Extrand, C.W.; Moon, S.I.; Langmuir. 2012, 28(44), 15629-15633.
- 23) Olim, M. J. Electrochem. Soc. 1997, 144(12), 4331-4335.
- 24) Ota, K.; Tsutsumi, A. ECS Trans. 2007, 11(2), 299-306.
- 25) Ogawa, Y. Solid State Phenomena. 2012, 195, 7-12.

1 細胞ゲノミックスの為の試薬と環境

DNA-free phi29 DNA ポリメラーゼの開発

Reagents and environment for single cell genomics

高橋 宏和^{①,②,③}、岡村 好子^{①,②}、小堀 俊郎^③

Hirokazu Takahashi, Yoshiko Okamura, Toshiro Kobori

①広島大学大学院 先端物質科学研究科
Graduate School of Advanced Sciences of Matter, Hiroshima University

②独立行政法人科学技術振興機構, CREST, 広島
CREST, Japan Science and Technology Agency (JST), Hiroshima

③(独)農業・食品産業技術総合研究機構 食品総合研究所
National Food Research Institute, National Agriculture and Food Research Organization

はじめに

人類にとって微生物は重要な生物資源であり、これまでに様々な酵素が微生物から発見され、食品加工や医薬品製造など多くの産業分野で利用されている。しかし、従来の微生物研究は単離・培養を基本技術としていることから、これまでは培養可能な微生物しか有用酵素の探索対象にされてこなかった。このため、地球上に存在する微生物種の99%以上を占めると言われている培養が困難または不能な難培養微生物の生態については現在もほとんど解析が進んでいない。従って、難培養微生物は生物資源として非常に大きな潜在的可能性を秘めているにも関わらず、未だ手付かずの状態である¹⁾。

これら難培養微生物を解析する方法としてメタゲノム解析という手法が主に利用されてきた。メタゲノム解析は、海水や土壌など環境サンプルに含まれる微生物群集や、糞便に含まれる腸内細菌群集のDNAをまとめて回収し、その塩基配列をそのまま大量解読する手法である²⁾。メタゲノム解析はサンプルに含まれる微生物の種類やその構成等を解析するには非常に有効な手法であり、特に次世代シーケンサー(NGS)の登場によって解析量が飛躍的に拡大してからは、メタゲノム解析の報告は年々増加傾向にあり、例えば、腸内細菌の種類比が肥満に関与していることや病気との因果関係などが示唆されている。しかしながら、シーケンサーで解読できる個々の塩基配列長は長くても600 bp程度と

短く、特にNGSではさらに短いため、様々な微生物種の膨大な短い断片情報の中から、断片化前のゲノム配列を再構築して有用遺伝子を探索することは非常に困難である。そのため、メタゲノム解析で新規有用遺伝子を単離したという報告は、メタゲノム解析の報告数に比べて格段に少ない。

そこで近年では難培養微生物の生態や生理機能を解析する方法として、シングルセルゲノミクス(single cell genomics)と呼ばれる手法が提案されている³⁾。これは、環境中の微生物群集から微生物1細胞を単離し、全ゲノム増幅(Whole genome amplification, 以下WGA)と呼ばれる手法でゲノムDNA全体を複製し、複製したゲノムDNAの塩基配列を決定する方法である。微生物1細胞から全ゲノム配列の解析が可能となれば、培養することができない微生物であってもゲノムDNAの情報から生態や生理機能を推測することができ⁴⁻⁵⁾、さらにはゲノム配列情報から難培養性微生物の培養条件の推定や、新規有用遺伝子群を探索することも可能であるとされている。このWGAに最適な増幅方法として、10年ほど前からphi29 DNAポリメラーゼ(以下、phi29 DNAP)を利用したMultiple displacement amplification(MDA)法⁶⁾が有力な方法として今日最も多く利用されている。しかしながら、実際にMDAをシングルセルゲノミクスに適用するためにはいくつかの問題が存在している。

本報ではまず初めに、シングルセルゲノミクスのキープイントであるWGAに適した試薬としてのDNA-free phi29 DNAPの開発について報告する。

phi29 DNAPとMDA法

phi29 DNAPは、枯草菌 (*Bacillus subtilis*) に感染するバクテリオファージphi29が持つDNAポリメラーゼである⁷⁾。phi29 DNAPは、(1) 30℃付近で活性を持つ、(2) 強い3'→5'エキソヌクレアーゼ活性を持ち、複製のエラー率が極めて低い、(3) DNA合成速度が速い、(4) 一度の反応で長いDNA (70 kb 以上) を合成できる、そしてなにより(5) 強い鎖置換活性を持ち、伸張方向にある2本鎖DNAをほどこしながらDNA合成を進めることができる(図1)、といった他のDNAポリメラーゼにはないユニークな特徴を持つ。phi29 DNAPのこのような特徴を最大限に利用したMDAの増幅原理⁶⁾は図2に示す。MDAの特性とし

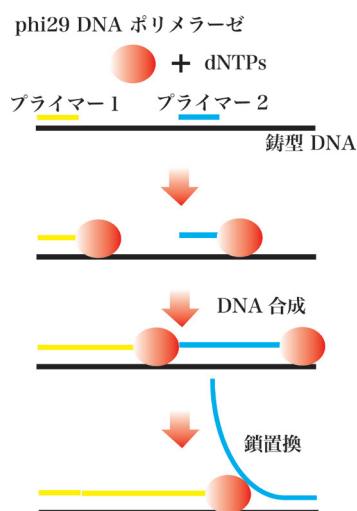


図1 phi29 DNAポリメラーゼによるDNA合成の模式図
phi29 DNAポリメラーゼは強い鎖置換活性を持ち、伸張方向にある2本鎖DNAをほどこしながら（鎖置換反応）、DNA合成はそのまま継続される。

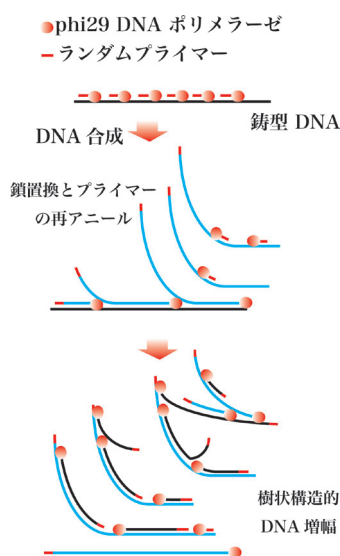


図2 MDA法の全ゲノム増幅模式図

て、(1) 増幅バイアスが起きにくい、(2) 全ゲノム配列に対するカバー率が高い、(3) 増幅後の収量がマイクログラムからミリグラムオーダーと非常に高い、などがあり、限られた数の細胞や貴重なサンプルもMDAで試料DNA全体を複製することにより、様々な遺伝子解析に用いることが可能になる。実際MDAは現時点で最も主力となるWGAであり、既に海外メーカーでキット化されている。

MDAの問題点

MDAは極わずかな試料DNAでもDNA全体を正確かつ大量に複製することができる革新的な技術である。しかし、MDAはその増幅原理から、反応溶液に含まれる全てのDNAが増幅されてしまう。そればかりか反応溶液に試料DNAを添加していないにも関わらず、試料DNAを添加した場合とほぼ同等量の増幅産物が検出され(図3)、何らかのDNAが非特異的な増幅産物として生成されたことが分かる。また、極めて微量の試料DNAをMDAに用いた場合、試料DNAに対する夾雑DNAの割合が高くなり、結果として非特異産物が大部分を占めることになり、実験結果の信頼性を揺るがす大きな問題になる。このように、増幅産物の有無または増幅量だけでは目的のDNAが増幅されたかどうかを判断できないため、増幅産物が目的の試料DNAに由来するかどうかを検証する何らかの方法、例えば制限酵素切断によるバンドパターンの解析やPCRによる既知領域の増幅等が必要である⁸⁻⁹⁾。

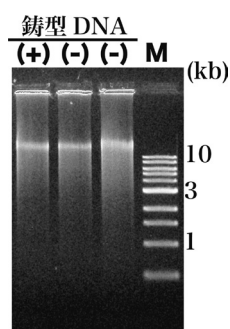


図3 MDA反応産物のアガロース電気泳動結果
(+) 鋳型有り、(-) 鋳型無し、MはDNAサイズマーカー。全ゲノムMDA反応産物は非常に大きな長さになるため、ゲノムDNAの電気泳動同様に約20 kb 近辺に滞留する。

例として、既に市販されているphi29 DNAPを用いて試料DNA (pUC19) でMDA反応を行い、増幅産物を制限酵素 (BamH I/EcoR I) で切断した結果を示す(図

4). pUC19 DNAに由来する増幅産物は図中に黄色の矢印で示した約 2.7 kb の明瞭なバンドとして検出され、pUC19 DNA に由来しない非特異産物 (赤矢印) と区別することができる。試料 DNA が多い場合は pUC19 DNA 由来の増幅産物が検出されるが、試料 DNA が少なくなるにつれ pUC19 DNA 由来の増幅産物は認められず、非特異産物だけが検出されることが分かる。しかしながら、配列情報が不明な難培養微生物ではこのような検証を行うことができないため、配列解析の結果が出るまで「何が増幅されたか判らない」という状況にある。

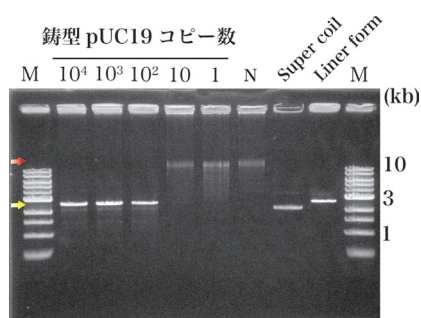


図4 増幅産物を制限酵素 BamHI/EcoRI で切断後に電気泳動した結果
pUC19 由来の産物は 2.7 kb の明瞭なバンド (黄矢印) を示すのに対し、非特異産物 (赤矢印) は制限酵素で切断されないため区別が可能。

このように試料 DNA が少ないほど、非特異産物のリスクが高まるため、既報の MDA 法の推奨プロトコルでは、安定した増幅産物を得るために、1 ナノグラム以上 (ヒト細胞で 10^3 細胞分、大腸菌で 10^6 細胞分) の試料 DNA を要求している。したがって、MDA による再現性・信頼性の高いシングルセルゲノミクスを行うためには、この非特異産物の問題を原因から解決する必要がある。その原因は、増幅に使用するランダム DNA プライマー同士による増幅と phi29 DNAP に夾雑している DNA 由来の増幅であるとされ、国内外の研究者がこの問題におよそ 10 年以上も取り組んでいる。

我々はまず、プライマーの構成を DNA から RNA に変更することによって、プライマー由来の非特異産物を抑制することに成功した⁹⁾。phi29 DNAP は逆転写酵素活性を持たないため、RNA を鋳型としては使えないが、プライマーとしては使えるためである。しかしながら、RNA プライマーの利用によって、phi29 DNAP に夾雑している DNA が増幅結果に直接影響すること、すなわち phi29 DNAP 製品のロット間差がより明確に結果に現れるようになってきた。

phi29 DNAP は遺伝子組換え大腸菌で生産されるため、生産過程や精製過程において、phi29 DNAP が大腸

菌のゲノム DNA を吸着し、精製した酵素溶液に夾雑 DNA として混入するものと考えられている。このような夾雑 DNA による DNA 合成酵素の汚染は、PCR で用いられる耐熱性 DNA ポリメラーゼでも報告¹⁰⁾されており、このため PCR は非常に高感度であるにもかかわらず、これまで特に原核微生物感染症診断には積極的に利用されてこなかった経緯がある¹¹⁾。そこで我々は関東化学株式会社と共同で、phi29 DNAP の DNA-free 化を図ることで、MDA における非特異産物の抑制を目指すこととした。

従来法による phi29 DNAP の精製

DNA に高い親和性を示す酵素の精製方法として、DNA 分解酵素 (以下、DNase) により夾雑 DNA を分解除去する方法が一般的に用いられてきた¹²⁾。PCR 法に使用される耐熱性の DNA ポリメラーゼでは、非耐熱性の DNase を用いて夾雑 DNA を分解した後、加熱処理により DNase だけを熱変性により失活させることができる。しかし、phi29 DNAP は中温性の酵素であるため、DNase だけを熱変性させることはできない。そこで、phi29 DNAP を精製用タグとの融合タンパク質として大腸菌に発現させ、アフィニティレジンにタグを介して phi29 DNAP を固定化し、DNase と分解した夾雑 DNA を洗浄除去する方法をまず始めに検討した (図 5A)。

本精製方法を用いて、DNase として DNA 断片の末端から分解する酵素、DNA 断片の内部から分解する酵素、2 本鎖 DNA を分解する酵素、1 本鎖 DNA を分解する酵素など種々の DNase を用いて夾雑 DNA の分解除去を試みた。しかし、何れの DNase を用いて調製した phi29 DNAP も全ゲノム増幅法において、非特異産物を抑えることはできなかった (図 5B)。この原因として、phi29 DNAP と DNase が立体的に干渉し、phi29 DNAP と結合した DNA 分子に DNase が接触できなかったのではないかと推測した。また、逆に DNase 由来と思われる DNA の混入が一部で観察された (図 5C)。さらには、本精製方法は大量の DNase を使用するため、phi29 DNAP から DNase を完全に洗浄・除去することが非常に困難であることも判明した。同様な DNase 残存や DNA 混入は、耐熱性 DNA ポリメラーゼの DNA-free 化でも報告¹¹⁻¹²⁾があったため、DNase に依存しない全く新しい精製方法を検討することとした。

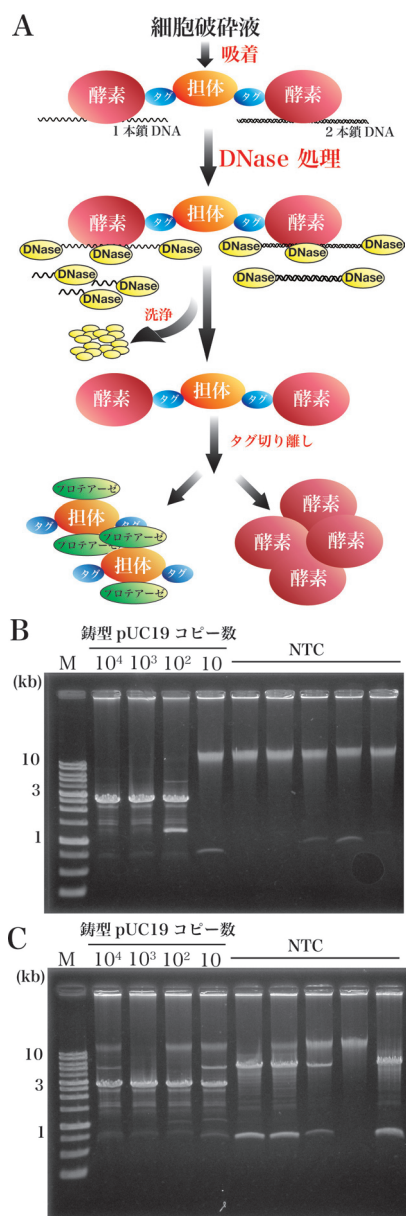


図5 従来法によるphi29 DNAPの精製
(A) DNaseを用いた非耐熱性酵素の精製工程。(B) 従来法で精製した酵素による増幅結果その1。(C) 従来法で精製した酵素による増幅結果その2。増幅産物はBamHI/EcoRIで切断後、電気泳動している。M, 1kb DNA サイズマーカー; NTC, no template control.

新たな精製方法の開発

(1) PEIによるゲノムDNAの沈殿除去

phi29 DNAPを大腸菌から抽出する過程で、ゲノムDNAを速やかに分離することが有効と考え、既に古典的な方法となりつつあるが、マイナスに荷電したDNA分子をプラスに荷電した分子、特に現存する素材の中で最もカチオン密度が高いポリマーであるポリエチレンジアミン(以下、PEI)で電気的に中和することでDNA分子を沈殿させる方法を検討した¹³⁾。

一方で菌体を破碎すると、菌体から溶出される高分子ゲノムDNAが破碎液粘度の上昇を引き起こすため、一般的には超音波処理やDNaseによるDNA断片化処理が行われる。しかし、この断片化処理が強いとゲノムDNAとphi29 DNAPの吸着を促進する傾向が見られた。そのため、菌体破碎液の粘度低下を確保しつつ、ゲノムDNAの断片化を極力抑える条件を検討した。その結果、DNase (Benzonase™, Millipore社)を用い、100 mM NaCl存在下で氷温下、5分間処理する条件が最適と判断された。さらにこの菌体破碎液にPEI溶液を添加することでゲノムDNAを不溶化させ、遠心分離により菌体破碎物残渣と一緒にゲノムDNAを沈殿物として除去した。結果的に菌体破碎液で検出されたDNAは、PEI添加後の遠心上清にはアガロースゲル電気泳動レベルでの確認では全く検出されず、大部分のゲノムDNAを菌体破碎液から速やかに除去することが可能となった。

(2) EMAによるdsDNAの不活化

PEI処理により大部分のゲノムDNAは除去されるが、phi29 DNAPと結合したDNA断片は残存したままである。耐熱性DNAポリメラーゼの場合、残存DNAに対し短波長の紫外線(260 nm)を照射することにより、DNAを不活化することがこれまでも行われてきた。しかしながら、紫外線照射はphi29 DNAPそのものにもダメージを与え活性の低下を引き起こすばかりか、完全に残存DNAを不活化することができないことが報告されている¹⁴⁾。

そこで、酵素活性には影響を与えない可視光を照射することで、2本鎖DNA(以下、dsDNA)を架橋可能なエチジウムブロミドモノアジド(以下、EMA)を利用して、残存するDNA分子を不活化する方法¹⁵⁾を検討することとした。EMAは低分子の化学物質であるため、高分子であるDNaseのように立体障害を受けることなく、phi29 DNAPに結合したdsDNAにも作用することができると考えられる。

光源としては、これまで利用されてきたハロゲンランプや蛍光灯では無く、市販品の白色発光ダイオード(LED)ランプを利用した。白色LEDランプは酵素にとって有害な紫外線領域の波長を一切含まず、EMAの吸収波長(456 nm, 青色波長)を含む。また、LEDランプは発熱量が低いため、40℃以上ではすぐに失活してしまうphi29 DNAPにとっては、熱の影響を回避しながら、不

活化に必要な量の可視光を照射することが可能となり、結果的にphi29 DNAPの失活を防ぎながらEMAによるdsDNAの不活化に成功した。

(3) phi29 DNAPによるssDNAの分解

EMAによるDNA不活化処理はdsDNAを架橋するものであり、1本鎖DNA(以下、ssDNA)を不活化することはできない。その一方で、phi29 DNAPはdsDNAよりssDNAに対して親和性が高い。さらにphi29 DNAPを利用したDNA増幅ではssDNAも非特異産物の原因になることから¹⁶⁻¹⁷⁾、ssDNAの混入に対しても新たな対策が必要であった。そこで、我々はphi29 DNAP自身が持つ強い3'→5'エキソヌクレアーゼ活性に着目し、ssDNAを分解することができないか検討することとした。

phi29 DNAPは30℃付近で高い活性を持つため、ssDNAを分解するためには30℃付近で加温する必要がある。しかし、精製途中のphi29 DNAPは非常に不安定であり、30℃付近で加温すると凝集体を生じ、収量が著しく減少する問題が生じた。そこで、phi29 DNAPの凝集

を抑制する方法、例えば非イオン性の界面活性剤等の添加物を検討した。その結果、酵素溶液にトレハロースを添加することで、phi29 DNAPの凝集を抑制できることを見出した。トレハロースはphi29 DNA合成酵素の活性を阻害しないため¹⁸⁾、phi29 DNAPを30℃付近で加温することができ、かつphi29 DNAPの3'→5'エキソヌクレアーゼ活性を利用したssDNAの分解除去が可能となった。

これまでに検討してきた(1)PEIによるゲノムDNAの迅速な沈殿除去、(2)白色LEDとEMAによる夾雑2本鎖DNAの不活化、(3)phi29 DNAPによる夾雑ssDNAの分解除去の3工程を組み合わせ、新たなDNAポリメラーゼの精製方法として確立した(図6)。

本精製方法で調製したphi29 DNAPのSDS-PAGEの結果を図7に示した。本精製方法により、タンパク質の純度としてシングルバンドのphi29 DNAP(約67 kDa)を調製することができた。収量は大腸菌1 g当たり約1.5 mgであり、phi29 DNAP精製の原著論文¹⁹⁾とほぼ同程度(50 mg/40 g of cells)かそれ以上を確保できている²⁰⁾。

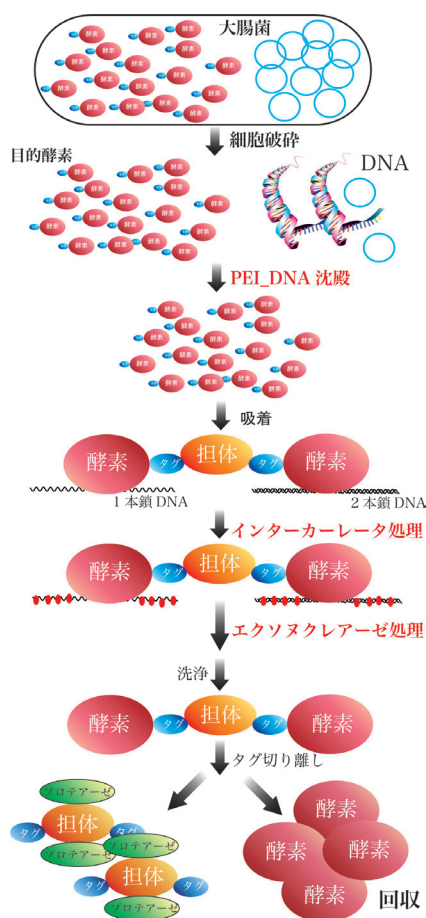


図6 新しく開発した非耐熱性ポリメラーゼの精製工程の模式図

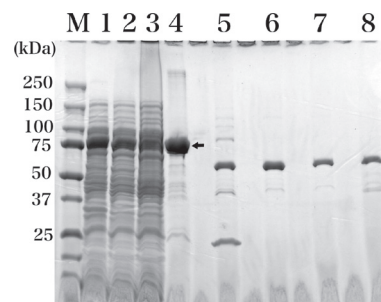


図7 各精製工程のSDS-PAGE結果
M, サイズマーカー; 1, 大腸菌破碎液; 2, PEI沈殿後上清; 3, カラム非吸着画分; 4, タグ切断前レジン; 5, タグ切断後レジン; 6, 精製画分(グリセロール添加前); 7, 精製画分(グリセロール添加前); 8, 市販酵素(1μg)。黒矢印はGST-phi29、赤矢印はphi29 DNAP(64kDa)を示す。

(4) DNA-free phi29 DNAPの品質評価

新たに開発した精製方法で調製した高純度phi29 DNAPの品質を評価するため、本酵素をMDAに適用した(図8)。試料DNAとしてpUC19 DNAを用いて、MDAでの検出下限を調査した結果、わずか10コピーのpUC19 DNAを特異的に増幅することが可能であった。10コピーのpUC19 DNAは約30アトグラム(3×10^{-17} g)であり、大腸菌1細胞のゲノムDNAが約5フェムトグラム(5×10^{-15} g)であることから、10コピーのpUC19 DNAは大腸菌ゲノムDNAの約100分の1量に相当する。

このことから、今回我々が開発したDNA-free phi29 DNAPを利用してMDAを行うことにより、微生物1細胞

分のゲノムDNAを試料としても、十分に特異的に増幅できるものと考えられる。

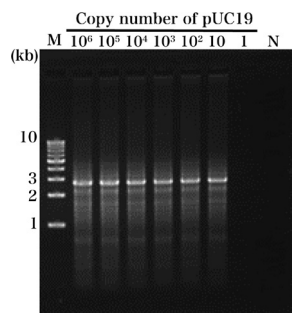


図8 MDA増幅産物の電気泳動

増幅反応には開発した精製方法で精製したphi29 DNAポリメラーゼを用いた。増幅産物はBamHI/EcoRIで切断後、電気泳動している。M, 1kb DNA サイズマーカー; N, no template control.

まとめ

今回我々はDNA合成酵素の新たな精製方法を開発し、DNA-free phi29 DNAポリメラーゼの生産に成功した。本酵素をMDAに適用することで、夾雑DNAの混入による非特異的なDNA増幅を大幅に抑制することが可能となった。この結果、適切な条件で本酵素をMDAに用いれば、十分に1細胞分のDNAでも全ゲノム解析が可能まで増幅可能となる。本方法で精製されたphi29 DNAPは、平成26年12月に「phi29 DNAポリメラーゼセット」として販売が開始されている。

その一方で、本酵素とMDAを利用してDNA増幅に使用する際には非常に注意しなければならない別の問題もより明確となった。ある程度予想はしていたことではあるが、MDA増幅反応を行う実験環境そのものが、増幅結果に多大な影響を与えることがこれまで以上に明確になってきた。実験環境そのもの、特に空气中に浮遊している微生物や細胞の死骸由来のDNAが、直接DNA増幅結果に影響をもたらすことは、これまでも感染症検査や、古生物のDNA増幅、法医学検査でもしばしば指摘されていた。MDAではその増幅原理のため影響が大きく、これまでPCRで取られてきた実験環境対策では不十分であることがより顕著になった(論文投稿中)。すなわち、内在性のDNAコンタミネーション問題を解決した先にあったのは、外因性DNAコンタミネーション問題である。

次の機会に、シングルセルゲノミクスのみならず、DNA増幅を行う為の実験環境の重要性とその対策について報告する。

参考文献

- 1) Uchiyama, T.; Miyazaki, T. *Curr. Opin. Biotechnol.* 2009, 20 (6), 616-622.
- 2) Venter, J.C.; Remington, K.; Heidelberg, J.F.; Halpern, A.L.; Rusch, D.; Eisen, J.A.; Wu, D.; Paulsen, I.; Nelson, K.E.; Nelson, W.; Fouts, D.E.; Levy, S.; Knap, A.H.; Lomas, M.W.; Nealson, K.; White, O.; Peterson, J.; Hoffman, J.; Parsons, R.; Baden-Tillson, H.; Pfannkuch, C.; Rogers, Y.-H.; Smith, H.O. *Science*. 2004, 304 (5667), 66-74.
- 3) Lasken, R.S. *Nat. Rev. Microbiol.* 2012, 10 (9), 631-640.
- 4) Hongoh, Y.; Sharma, V.K.; Prakash, T.; Noda, S.; Taylor, T.D.; Kudo, T.; Sakaki, Y.; Toyoda, A.; Hattori, M.; Ohkuma, M. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2008, 105 (14), 5555-5560.
- 5) Hongoh, Y.; Sharma, V.K.; Prakash, T.; Noda, S.; Toh, H.; Taylor, T.D.; Kudo, T.; Sakaki, Y.; Toyoda, A.; Hattori, M.; Ohkuma, M. *Science*. 2008, 322 (5904), 1108-1109.
- 6) Dean, F.B.; Hosono, S.; Fang, L.; Wu, X.; Faruqi, A.F.; Bray-Ward, P.; Sun, Z.; Zong, Q.; Du, Y.; Du, J.; Driscoll, M.; Song, W.; Kingsmore, S.F.; Egholm, M.; Lasken, R.S. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2002, 99 (8), 5261-5266.
- 7) Meijer, W.J.; Horcajadas, J.A.; Salas, M.; *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 2001, 65 (2), 261-287.
- 8) Hutchison, C.A. III.; Smith, H.O.; Pfannkuch, C.; Venter, J.C. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2005, 102 (48), 17332-17336.
- 9) Takahashi, H.; Yamamoto, K.; Ohtani, T.; Sugiyama, S. *BioTechniques*. 2009, 47 (1), 609-615.
- 10) Rand, K.H.; Houck, H. *Mol. Cell. Probes*. 1990, 4 (6), 445-450.
- 11) Niimi, H.; Mori, M.; Tabata, J.; Minami, H.; Ueno, T.; Hayashi, S.; Kitajima, I. *J. Clin. Microbiol.* 2011, 49 (9), 3316-3320.
- 12) Corless, C.E.; Guiver, M.; Borrow, R.; Edwards-Jones, V.; Kaczmarek, E.B.; Fox, A.J. *J. Clin. Microbiol.* 2000, 38 (5), 1747-1752.
- 13) Burgess, R.R. *Meth. Enzymol.* 1991, 208, 3-10.
- 14) Woyke, T.; Sczyrba, A.; Lee, J.; Rinke, C.; Tighe, D.; Clingenpeel, S.; Malmstrom, R.; Stepanauskas, R.; Cheng, J.-F. *PLoS One*. 2001, 6 (10), e26161. <http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0026161>, (accessed 2011-10-20).
- 15) Rudi, K.; Nogva, H.K.; Moen, B.; Nissen, H.; Bredholt, S.; Moretro, T.; Naterstad, K.; Holck, A. *Int. J. Food Microbiol.* 2002, 78 (1-2), 171-180.
- 16) Kobori, T.; Matsumoto, A.; Takahashi, H.; Sugiyama, S. *Anal. Sci.* 2009, 25 (12), 1381-1383.
- 17) Takahashi, H.; Matsumoto, A.; Sugiyama, S.; Kobori, T. *Anal. Biochem.* 2010, 401 (2), 242-249.
- 18) Pan, X.; Urban, A.E.; Palejev, D.; Schulz, V.; Grubert, F.; Hu, Y.; Snyder, M.; Weissman, S.M. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2008, 105 (40), 15499-15504.
- 19) Blanco, L.; Salas, M. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1984, 81 (17), 5325-5329.
- 20) Takahashi, H.; Yamazaki, H.; Akanuma, S.; Kanahara, H.; Saito, T.; Chimuro, T.; Kobayashi, T.; Ohtani, T.; Yamamoto, K.; Sugiyama, S.; Kobori, T. *PLoS One*. 2014, 9 (2), e82624. <http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0082624>, (accessed 2015-02-20).

