超好熱菌由来の新規DNA ポリメラーゼの発見とその産業利用

①　②　③

東洋紡株式会社　バイオケミカル事業部部員　北　林　雅　夫①
東洋紡株式会社　ライフサイエンス事業部マネジャー　小松原　秀　介②
立命館大学　生命科学部教授，学部長　今　中　忠　行③

はじめに

われわれの生活になじみのある微生物のほとんどは，常温，中性付近，豊富な栄養条件の下で活発に増殖できる．しかし，これらは地球に存在する微生物のごく一部であって，通常の培養設備で増殖可能な微生物は土壌中の全微生物の約1～10％に過ぎないことが分かってきた．そして，火山付近などの高温環境，深海などの高圧環境，北極や南極域などの低温環境にも，その環境に見事に適応した極限環境微生物が多数生息していることが明らかになった．これらの極限環境微生物は，従来の微生物に見られない特性を有し，基礎･応用両面で興味深い研究対象になっている．

極限環境微生物の中でも，好熱菌は，一般に55℃以上で生育可能な微生物をいう．好熱菌は高温環境下で生育できるため，その構成成分であるタンパク質も変性し難い性質を持ち，耐熱性酵素の宝庫といえる．好熱菌のうち，75℃以上で生育できるものが高度好熱菌であり，その例としては，*Taq* DNA ポリメラーゼの生産菌として有名な *Thermus aquaticus* などが挙げられる．

これらに対し，90℃以上で生育できるのが超好熱菌である。超好熱菌は生物の進化系統樹の源流に位置しており，現存する生物の中で原始生命体に最も近いと考えられている．その生育条件は，水素，硫化水素，硫黄，2価鉄イオンなどをエネルギー源とし，二酸化炭素を唯一の炭素源として化学独立栄養増殖を行なうものが多く，火山活動の盛んな原始地球環境（高温，嫌気的，無機的）に近いと考えられる．

東洋紡は1882年に繊維事業を創業し，1952年に生化学関連研究に着手して，1970年に診断薬原料酵素事業，1972年に臨床検査薬事業を開始した．そして，この原料酵素の開発で培った微生物培養，酵素精製の技術を用い，遺伝子工学研究用試薬の開発に着手して，1982年に制限酵素の販売を開始している．東洋紡の遺伝子工学研究用試薬事業は後発であり，特徴ある製品の開発に取り組むことにより，存在感を発揮する必要があった．一方，当時，大阪大学大学院工学研究科今中研究室では様々な極限環境から多種多様な微生物を採取して，これら微生物を用いた基礎および応用研究を進めていた．超好熱始原菌 *Thermococcus kodakarensis* KOD1株由来の新規耐熱性DNA ポリメラーゼ（KOD DNA ポリメラーゼ）は，今中研究室で進めていた応用研究の１つであり，産学の共同研究により製品開発されたものである．

1.　KOD DNA ポリメラーゼの酵素特性

特定の DNA 断片だけを増幅する PCR法は，遺伝子の研究分野のみならず，感染症や遺伝子検査といった診断分野など，広く産業利用されている．この PCR法の酵素として用いられるのが耐熱性DNA ポリメラーゼである．

Taq DNA ポリメラーゼの利用により PCR法の簡便化，自動化への道が開かれ，幅広く応用可能な手法として発展したのであるが，この酵素は伸長反応の速度は高いが，3′-5′エキソヌクレアーゼ（プルーフリーディング）活性を持たないため，DNA 合成時の正確性が低いという欠点があった．そこで，*Thermus* よりも更に高温（90℃以上）で生育する超好熱菌が探索され，3′-5′エキソヌクレアーゼ活性を持つ *Pyrococcus furiosus* の酵素（*Pfu* DNA ポリメラーゼ）が開発された．この酵素は *Taq* DNA ポリメラーゼと比較して，耐熱性と正確性は高いが伸長能力が低く，PCR増幅効率が低いという欠点があった．超好熱菌の中で，耐熱性と合成速度と正確性の全てが優れる DNA ポリメラーゼの開発が待望されていた．

われわれは鹿児島県小宝島の硫気坑から超好熱始原菌を分離し，*Thermococcus kodakarensis* KOD1 と名付けた．本菌は，65～100℃で生育し，有機物をエネルギー源および炭素源とし，硫黄を電子受容体にした嫌気的従属栄養生育が確認されていた．その菌体の生理特性は，既報の *P. furiosus* と極めて類似している．しかし，KOD1株からクローニングされた KOD DNA ポリメラーゼは，*Pfu* DNA ポリメラーゼとアミノ酸レベルにおいて高い相同性（約80％）を有しているものの，その酵素特性は大きく異なっていた．そのプロセッシビティー（DNA ポリメラーゼが基質DNA に結合してから離れるまでに合成できるヌクレオチドの数）は，既報の耐熱性DNA ポリメラーゼの中で最高水準であった（表1）．この特長を明らかにするため，X線結晶構造解析が行なわれ，立体構造が明らかにされている．DNA ポリメラーゼには Palm 領域と Fingers 領域と呼ばれる領域があり，基質となる dNTP の取り込みに関与している．KOD DNA ポリメラーゼの Fingers 領域にはリジン，アルギニンなどの塩基性アミノ酸が Palm 側に向かって数多く並んでおり，これが効率的な dNTP の取り込みに関与していることが示唆されている．

2.　KOD DNA ポリメラーゼの PCR への応用

KOD DNA ポリメラーゼは，米国で開発された *Taq* DNA ポリメラーゼ，*Pfu* DNA ポリメラーゼとは異なる純然たる**メイド・イン・ジャパン**の酵素である．*Taq* DNA ポリメラーゼと比較して，**耐熱性が約7倍，合成速度が約2.5倍，正確性が約50倍と優れた酵素特性を有する**，これまでに類の無い酵素であった（表1）．しかし，その高い DNA 伸長能力や強すぎる3′-5′エキソヌクレアーゼ活性のため，PCR に使用するには制御が難しく，使いづらいという欠点があった．われわれは，

表 1　耐熱性DNA ポリメラーゼの特性比較

DNAポリメラーゼ	KOD	*Taq*	*Pfu*
起源	*Thermococcus kodakarensis* KOD1	*Thermus aquaticus*	*Pyrococcus furiosus*
分子量	90.0kDa	93.9kDa	90.1kDa
3′→5′エキソヌクレアーゼ活性	+	−	+
プロセッシビティー（塩基数/反応）	＞300	n.t.	＜20
熱安定性（半減期）	95 ℃,12hr	95 ℃,1.6hr	95 ℃,6hr
DNA合成速度（塩基/秒）	100–130	54	20
変異導入率（PCR）	0.10%	4.8%	0.15%

KOD DNA ポリメラーゼを使い易い PCR酵素とするため，以下に示すような様々な工夫を行った．

（1）　KOD DNA ポリメラーゼの機能改変

まず，PCR成功率を向上するため，タンパク質工学技術を用いたKOD DNA ポリメラーゼの酵素特性の改変を試みた．PCR において 3′-5′エキソヌクレアーゼ活性は正確性を保つため重要となる．しかし，KOD DNA ポリメラーゼの強すぎる 3′-5′エキソヌクレアーゼ活性は伸長を阻害する原因になっていた．そこで，ファミリーB DNA ポリメラーゼのエキソヌクレアーゼ活性領域に共通して存在する Exo Ⅰドメイン，および，その近接するアミノ酸を改変することにより，3′-5′エキソヌクレアーゼ活性の強弱を制御することを試みた．その結果，3′-5′エキソヌクレアーゼ活性が様々な強さを持った変異体を取得でき，幾つかの変異体では PCR の成功率を格段に向上することができた．

（2）　PCR反応Buffer組成の最適化検討

KOD DNA ポリメラーゼは，その高い DNA伸長能力から，もともと GC リッチなど DNA配列の影響を受けにくく，夾雑する阻害物質の持込みにも耐性がある．しかし，その高い伸長能力のため，誤って結合した Primer からも遺伝子を増幅してしまい，非特異的な増幅が多かった．

このような非特異的な増幅を防ぐには，PCR の反応組成が最も重要になる．一般的には，核酸と相互作用する陽イオンの検討が行われ，Primer の結合状態を安定化するイオンと不安定化するイオンのバランスや組み合わせにより，非特異的な増幅を防ぐことが行われている．KOD DNA ポリメラーゼの反応組成も様々な検討を行い，陽イオンだけでなく陰イオンが反応の特異性改善に関与することを見出し，特異性の高い PCR を実現した．

（3）　アクセサリータンパク質の利用

生体内では DNA ポリメラーゼが連続的に効率よく DNA合成を行うため，様々なタンパク質と共同して働いている．このような DNA ポリメラーゼに協力して働くアクセサリータンパク質を PCR に利用した．

伸長能力を向上させたものの例としては増殖細胞核抗原（proliferating cell nclear antigen: PCNA）が挙げられる．真核生物では PCNA が DNA ポリメラーゼを DNA鎖状にとどめておくクランプ分子として働いており，DNA ポリメラーゼと結合して，ポリメラーゼの DNA鎖上のスムースな移動を助けると考えられている．その他独自のアクセサリータンパク質を開発し，KOD DNA ポリメラーゼに組み合わせることにより PCR の増幅効率を向上することに成功した．

高効率リアルタイムPCRマスターミックス
KOD SYBR® qPCR Mix

全自動遺伝子解析装置GENECUBE®

図 1　最近の KOD DNA ポリメラーゼ関連製品

（4）　ホットスタートPCR技術の採用

PCR の成功率は，Primer ダイマーなどの非特異的な増幅により低下する傾向がある．中でも PCR の最初の昇温の際に起こる非特異的な酵素反応は PCR の成功率を著しく低下させる．我々は，DNA ポリメラーゼドメインと 3′-5′エキソヌクレアーゼドメインをそれぞれ認識する 2種類のモノクローナル抗体を KOD DNA ポリメラーゼに結合させて，常温での酵素活性を完全に封じ込むことに成功した．この抗体の添加によって，目的とする DNA断片のみを潤沢に得ることを可能にした．

3.　最近の KOD DNA ポリメラーゼ関連製品の開発動向

1995年に「KOD DNA ポリメラーゼ」を PCR用酵素として開発以来，上記の技術開発を重ね，最近，「KOD DNA ポリメラーゼ」をベースに，用途別に 2種類の PCR用酵素を開発した．1つは KOD DNA ポリメラーゼの高い正確性を更に向上して，**PCR の成功率を上げた「KOD-Plus-Neo」（正確性は *Taq* DNA ポリメラーゼの約80倍）**である．もう1つが，KOD DNA ポリメラーゼの安定性，伸長能力を最大源に活かして，**マウステールや植物葉などから DNA を精製することなく，直接PCR に持込むことを可能にした「KOD FX Neo」（正確性は *Taq* DNA ポリメラーゼの約20倍）**である．**「KOD-Plus-Neo」はヒトゲノムから 24 kb，「KOD FX Neo」はヒトゲノムから 40 kb** の目的産物を増幅することができる．

更に，2013年には，これまでのリアルタイム PCR用酵素の常識を覆し，**難配列，ロングターゲット，クルードサンプルで高効率リアルタイム PCR を可能にした「KOD SYBR® qPCR Mix」**を開発した（図1）．また，KOD DNA ポリメラーゼは研究用途のみならず，**遺伝子診断でも優れている（東洋紡(株)全自動遺伝子解析装置GENECUBE®の反応試薬として販売）**．その優れた伸長速度を活かし，素早く正確な判定が必要な診断の用途でも大いに活躍することが期待されている．

われわれは多くの研究者が望む製品の開発を心がけ，この18年間に 13個の KOD関連製品群を開発している．これからも「KOD DNA ポリメラーゼ」が **PCR酵素の 1 つの理想形**と信じて，更なる応用研究を進めている．

謝　辞　本研究を行うにあたり，北陸先端科学技術大学院大学・高木昌宏先生，関西学院大学理工学部・藤原伸介先生に，ご指導をいただきました．ここに深く感謝の意を表します．また，本研究開発に携わった，東洋紡関係者の皆様に深謝申し上げます．さらに，本賞にご推薦いただきました広島大学大学院生物圏科学研究科・江坂宗春先生，および選考委員の先生方に厚く御礼申し上げます．