

課題番号	GS003
------	-------

**先端研究助成基金助成金(最先端・次世代研究開発支援プログラム)
実施状況報告書(平成 22 年度)**

本様式の内容は一般に公表されます

研究課題名	放線菌を利用した実用レベルの有用物質生産基盤技術の開発
研究機関・ 部局・職名	筑波大学・大学院 生命環境科学研究科・講師
氏名	橋本 義輝

1. 当該年度の研究目的

本申請者らが開発した、*Streptomyces* 属放線菌や *Rhodococcus* 属放線菌で機能する誘導型高発現ベクターは、放線菌の育種改良に実用レベルで利用可能な新規基盤技術として注目されている。しかし、放線菌を宿主とした(誘導剤を必要としない)構成型高発現ベクターや、(目的タンパク質を菌体外へ大量に分泌させ、分離・精製を容易にする)分泌型高発現ベクターを開発し、有用物質生産技術シリーズとして手元に揃えておくことが「もの作り(グリーンバイオ)」の観点から産業界で切望されている。また、有用な抗生物質・生理活性物質を生産する放線菌は多種分離されており、形質転換系が開発されていない株も数多く存在するため、これらの株にも利用可能な形質転換に関する基盤技術も熱望されている。

本研究では有用物質生産基盤技術シリーズをさらに揃えるべく放線菌で利用可能な構成型高発現ベクター、(誘導型/構成型)分泌型高発現ベクターを構築し、ベクタータイプの有用物質生産基盤技術を開発する。また、目的配列を複数回有する核酸の製造方法を、長い核酸でも製造できるように改良・改変し、(タンパク質をコードする遺伝子などの)目的配列が直鎖状に高密度に整列する二本鎖 DNA を作成し染色体 DNA に組み込むタイプ(染色体 DNA 組込型高度タンデム発現系)の基盤技術も開発する。さらに、タンパク質・有用物質生産に適した放線菌宿主の作成などの周辺技術も含め共通基盤性の高い技術を開発する。即ち、有用物質生産性およびタンパク質発現量が実用レベルまで向上した *Streptomyces* 属放線菌や *Rhodococcus* 属放線菌を育種する基盤技術・周辺技術を開発することを最終目的とする。

平成 22 年度は、*Streptomyces* 属放線菌や *Rhodococcus* 属放線菌で機能する構成型高発現ベクターと構成型分泌型高発現ベクターの構築に必要な構成型強力プロモーターの検索および同定、さらには、染色体 DNA 組込型高度タンデム発現系の基盤技術の開発に必要な高度タンデム発現系の改良を行うことを目的とした。

2. 研究の実施状況

構成型強力プロモーターの検索・同定

一般的に、強力な構成型プロモーターの下流に位置する遺伝子から生成するタンパク質はその生成量が多い。そこで、放線菌をいくつかの培地で培養し、無細胞抽出液を調製することで放線菌内で生成したタンパク質を取得した。SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法により放線菌内のタンパク質を分離し、その中から生成する量が多いタンパク質をいくつか選択し、バンドを切り出した後トリプシン処理を行い、さらにマトリックス支援レーザー脱離イオン化法によりイオン化し飛行時間質量分析計で(トリプシン処理により生じた生成量が多いタンパク質に由来する)ペプチドの質量を決定した。ペプチドマスフィンガープリンティング法を行うことで、一部のタンパク質については、それらをコードする構造遺伝子を決定することができた。

染色体DNA組込型高度タンデム発現系の構築

これまで、目的配列が短い場合(約 200 bp)は二本鎖 DNA を直鎖状に多く整列させることに成功しているが、目的配列が長くなると多く整列させることは困難であった。そこで、[あるタンパク質をコードする長い遺伝子]を目的配列として、PCRによる目的配列の増幅、一本鎖 DNA の回収・精製、一本鎖 DNA の環状化・精製、増幅反応、二本鎖 DNA 化反応などの行程で種々の条件検討を行った。その結果、電気泳動後のアガロースゲル上で [あるタンパク質をコードする長い遺伝子]を用いた場合でも直鎖状に多く整列した二本鎖 DNA を作成することに成功した。

3. 研究発表等

雑誌論文 計 0 件	(掲載済み一査読有り) 計 0 件 (掲載済み一査読無し) 計 0 件 (未掲載) 計 0 件
会議発表 計 0 件	専門家向け 計 0 件 一般向け 計 0 件

様式19 別紙1

図書 計0件	
産業財産権 出願・取得状 況 計0件	(取得済み) 計0件 (出願中) 計0件
Webページ (URL)	
国民との科 学・技術対話 の実施状況	実施不可能であった。
新聞・一般雑 誌等掲載 計0件	
その他	

4. その他特記事項

実施状況報告書(平成22年度) 助成金の執行状況

本様式の内容は一般に公表されます

1. 助成金の受領状況(累計)

(単位:円)

	①交付決定額	②既受領額 (前年度迄の 累計)	③当該年度受 領額	④(=①-②- ③)未受領額
直接経費	103,000,000	0	44,100,000	58,900,000
間接経費	30,900,000	0	13,230,000	17,670,000
合計	133,900,000	0	57,330,000	76,570,000

2. 当該年度の収支状況

(単位:円)

	①前年度未執 行額	②当該年度受 領額	③当該年度受 取利息等額 (未収利息を 除く)	④(=①+②+ ③)当該年度 合計収入	⑤当該年度 執行額	⑥(=④-⑤) 当該年度未執 行額
直接経費	0	44,100,000	0	44,100,000	585,237	43,514,763
間接経費	0	13,230,000	0	13,230,000	175,571	13,054,429
合計	0	57,330,000	0	57,330,000	760,808	56,569,192

3. 当該年度の執行額内訳

(単位:円)

	金額	備考
物品費	367,887	分析天秤、実験試薬、プラスチック器具など
旅費	0	
謝金・人件費等	0	
その他	217,350	分析外注費
直接経費計	585,237	
間接経費計	175,571	
合計	760,808	

4. 当該年度の主な購入物品(1品又は1組若しくは1式の価格が50万円以上のもの)

物品名	仕様・型・性能 等	数量	単価 (単位:円)	金額 (単位:円)	納入 年月日	設置研究機関 名
				0		
				0		
				0		