

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25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・生命環境系・准教授
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25年度には、前年度に引き続き、同定した構成型強力プロモーターを用いて *Streptomyces*属放線菌や *Rhodococcus*属放線菌で機能する構成型大量発現ベクター(シャトルベクターを含む)の構築を行い、さらに様々なタンパク質遺伝子を連結し、実際に機能(細胞内での目的タンパク質の大量発現)するかどうかについて検討することを目的とした。

また、前年度の検索で得られた分泌シグナル配列を用いて分泌型大量発現ベクターの構築を行うことも目的とした。

さらに、染色体DNA組込型高度タンデム発現系の基盤技術の開発を引き続き行うとともに、有用物質生産に適した放線菌発現用宿主の開発を行うことも目的とした。

2. 研究の実施状況

本研究で構築予定の放線菌を利用した有用物質生産基盤技術シリーズの中で、(他に關しては繼續して研究を進めているが) 現在、下記の3つの項目に關して得られている成果について以下に記載する。

構成型大量発現ベクターの構築

今年度は(前年度構築の3種の構成型発現ベクターのプロモーターとは異なる) 強力な構成型プロモーターを利用し、*Rhodococcus* 属放線菌用のシャトル型構成型発現ベクターの構築を行った。本ベクターに各種タンパク質遺伝子を連結・導入した結果、目的タンパク質は複数の異なる *Rhodococcus* 属放線菌内で大量発現し、*Rhodococcus* 属放線菌で機能する非常に有益な構成型大量発現ベクターの開発に成功した。

分泌型大量発現ベクターの構築

前年度までに評価・選抜した複数の分泌シグナル配列をそれぞれ、*Streptomyces*属放線菌で機能する構成型発現ベクターのマルチクロニングサイト上流に連結し、*Streptomyces*属放線菌用の分泌型大量発現ベクターを複数種、構築することに成功した。

染色体 DNA 組込型高度タンデム発現系の開発

強力なプロモーター支配下に[SD 配列+目的酵素構造遺伝子]が直鎖状に複数整列した様々な長さの二本鎖 DNA 断片を作成し、それぞれをゲノム上に導入した微生物を育種し目的酵素の発現を試みた結果、繰り返し数に依存して目的酵素の発現量は増加した。さらに、[強力なプロモーター+SD 配列+目的酵素構造遺伝子]が直鎖状に複数整列した様々な長さの二本鎖 DNA 断片についても作成し、それぞれをゲノム上に導入した微生物を育種し発現量を比較した。繰り返し数に依存して目的酵素の発現量は増加し、その発現量は同じ繰り返しの[SD 配列+目的酵素構造遺伝子]を導入した微生物での発現量よりも高く、本方法が微生物の新しい育種改良方法として利用できる可能性が示唆された。

3. 研究発表等

雑誌論文	(掲載済み一査読有り) 計0件
計0件	(掲載済み一査読無し) 計0件
	(未掲載) 計0件

様式19 別紙1

<p>会議発表</p> <p>計 6 件</p>	<p>専門家向け 計 6 件</p> <ul style="list-style-type: none"> ○ 橋本 義輝、劉 瑞、小林 達彦 <i>"Rhodococcus</i> 属での構成型発現ベクターの構築" 2013 年度 日本放線菌学会大会 平成 25 年 9 月 5 日 広島 ○ 齋藤 結希、松本 雅子、橋本 義輝、小林 達彦 <i>"Streptomyce</i> 由来シグナルペプチドの探索" 2013 年度 日本放線菌学会大会 平成 25 年度 9 月 5 日 広島 ○ 橋本 義輝、中砂 隆司、小林 達彦 <i>"ローリングサークル型複製反応産物を利用した新規タンパク質高発現系の改良"</i> 第 86 回日本生化学会大会 平成 25 年 9 月 13 日 横浜 ○ Masako Matsumoto, Yoshiteru Hashimoto, Rui Liu, Takuto Kumano, and Michihiko Kobayashi <i>"Construction of a constitutive expression plasmid for Rhodococcus"</i> 2014 International Symposium on New Frontiers in Microbiology and Biotechnology 無錫 (Wuxi) 中国 (China) 平成 26 年 3 月 14 日 ○ 齋藤 結希、松本 雅子、橋本 義輝、熊野 匠人、小林 達彦 <i>"放線菌を宿主とした構成型分泌発現ベクターの構築"</i> 2014 年度日本農芸化学会大会 東京 平成 26 年 3 月 28 日 ○ 松本 雅子、橋本 義輝、劉 瑞、熊野 匠人、小林 達彦 <i>"Rhodococcus</i> 由来ニトリルヒドラターゼ遺伝子プロモーターを利用した <i>Rhodococcus</i> 属放線菌における構成型発現ベクターの構築" 2014 年度日本農芸化学会大会 東京 平成 26 年 3 月 28 日 <p>一般向け 計 0 件</p>
<p>図 書</p> <p>計 0 件</p>	
<p>産業財産権 出願・取得状 況</p> <p>計 0 件</p>	<p>(取得済み) 計 0 件</p> <p>(出願中) 計 0 件</p>
<p>Webページ (URL)</p>	<p>「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」 http://www.u.tsukuba.ac.jp/~hashimoto.y.gu/research.html</p>
<p>国民との科 学・技術対話 の実施状況</p>	<p>筑波大学キッズユニバーシティ 一日筑波大学生になろう!、平成 25 年 4 月 20 日、茨城県つくば市(筑波大学)、児童・生徒を含む一般市民 100 名、体験実験および展示</p> <p>筑波大学生物資源学類 2013 年度大学説明会、平成 25 年 8 月 25 日、茨城県つくば市(筑波大学)、高校生および保護者 100 名、研究内容紹介展示および研究室訪問</p>
<p>新聞・一般雑 誌等掲載</p> <p>計 0 件</p>	

様式19 別紙1

その他	
-----	--

4. その他特記事項

実施状況報告書(平成25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	既返還額(前 年度迄の累 計)
直接経費	103,000,000	77,100,000	25,900,000	0	0
間接経費	30,900,000	23,130,000	7,770,000	0	0
合計	133,900,000	100,230,000	33,670,000	0	0

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	当該年度返還 額
直接経費	2,156,427	25,900,000	0	28,056,427	27,907,278	149,149	0
間接経費	646,930	7,770,000	0	8,416,930	8,372,185	44,745	0
合計	2,803,357	33,670,000	0	36,473,357	36,279,463	193,894	0

3. 当該年度の執行額内訳

(単位:円)

	金額	備考
物品費	13,708,720	実験試薬、超高速液体クロマトグラフ等
旅費	851,540	研究成果発表旅費等
謝金・人件費等	11,529,653	研究員人件費等
その他	1,817,365	ペプチドシーケンス外注費等
直接経費計	27,907,278	
間接経費計	8,372,185	
合計	36,279,463	

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
LabSolution LC/GC PCセット	モニターアーム付	3	694,761	2,084,283	2014/1/31	筑波大学
LabSolution LC/GC PCセット	モニターアーム無	1	687,717	687,717	2014/1/31	筑波大学
超高速液体クロマト グラフ	Nexera X2	1	6,825,000	6,825,000	2014/3/13	筑波大学