

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) 実績報告書

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. 研究実施期間 平成23年2月10日～平成26年3月31日

2. 収支の状況

(単位:円)

	交付決定額	交付を受けた額	利息等収入額	収入額合計	執行額	未執行額	既返還額
直接経費	103,000,000	103,000,000	0	103,000,000	102,850,851	149,149	0
間接経費	30,900,000	30,900,000	0	30,900,000	30,855,255	44,745	0
合計	133,900,000	133,900,000	0	133,900,000	133,706,106	193,894	0

3. 執行額内訳

(単位:円)

費目	平成22年度	平成23年度	平成24年度	平成25年度	合計
物品費	367,887	33,884,933	19,636,778	13,708,720	67,598,318
旅費	0	152,900	730,964	851,540	1,735,404
謝金・人件費等	0	6,212,412	9,785,044	11,529,653	27,527,109
その他	217,350	984,848	2,970,457	1,817,365	5,990,020
直接経費計	585,237	41,235,093	33,123,243	27,907,278	102,850,851
間接経費計	175,571	12,370,527	9,936,972	8,372,185	30,855,255
合計	760,808	53,605,620	43,060,215	36,279,463	133,706,106

4. 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
超微量分光光度計	(株)エル・エム・エス製 NanoDrop-2000 NDT ND-2000	1	1,491,000	1,491,000	2011/5/17	筑波大学
純水製造装置	(株)ヤマト科学製 オートスチール WG1000	1	823,095	823,095	2011/7/7	筑波大学
温度制御付酸素電極コントローラー	英国 ハンサテック社製 OXYT-1	1	831,600	831,600	2011/8/8	筑波大学
高速液体クロマトグラフ質量分析計	(株)島津製作所製 LCMS-8030	1	13,877,254	13,877,254	2011/12/27	筑波大学
窒素ガス発生装置	(株)島津製作所製	1	913,461	913,461	2011/12/27	筑波大学
フリーズ超低温槽	日本フリースー CLN51UW 526L	1	1,776,075	1,776,075	2012/8/23	筑波大学
ゲル撮影装置	アト(株) AE6932GXE	1	756,000	756,000	2012/10/12	筑波大学
LCMSアップグレードキット	(株)島津製作所製 LCMS-8030	1	1,050,000	1,050,000	2013/3/21	筑波大学
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

様式20

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

5. 研究成果の概要

放線菌で利用可能な構成型高発現ベクター、構成型分泌型高発現ベクターを10種類以上新たに構築し、ベクタータイプの有用物質生産基盤技術を開発した。また、(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)の基盤技術も開発した。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・周辺技術は「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おり、本研究成果は有用物質生産基盤技術シリーズのさらなる拡充に貢献した。

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) 研究成果報告書

本様式の内容は一般に公表されます

研究課題名 (下段英語表記)	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
	Development of basic technology for practical production of useful compounds focusing on actinomycetes
研究機関・部局・ 職名 (下段英語表記)	筑波大学・生命環境系・准教授
	Associate Professor, Faculty of Life and Environmental Sciences, University of Tsukuba
氏名 (下段英語表記)	橋本 義輝
	Yoshiteru HASHIMOTO

研究成果の概要

(和文):

放線菌で利用可能な構成型高発現ベクター、構成型分泌型高発現ベクターを 10 種類以上新たに構築し、ベクタータイプの有用物質生産基盤技術を開発した。また、(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)の基盤技術も開発した。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・周辺技術は「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おり、本研究成果は有用物質生産基盤技術シリーズのさらなる拡充に貢献した。

(英文):

The basic technology for practical production of useful compounds focusing on actinomycetes was newly developed. More than 10 kinds of constitutive high-expression vectors and constitutive secretory expression vectors were constructed as vector-type technologies. A novel expression system using amplified DNA fragment was developed as a genome integration-type technology. Because the basic technology for practical production to improve

様式21

Streptomyces or *Rhodococcus* strains is a strong demand in the industry, these results would contribute to the further expansion of a series of the technology.

1. 執行金額 133,706,106 円
(うち、直接経費 102,850,851 円、間接経費 30,855,255 円)

2. 研究実施期間 平成23年2月10日～平成26年3月31日

3. 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、(1)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、(2)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、(3)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。

4. 研究計画・方法

(1)ベクタータイプの有用物質生産基盤技術開発

① 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、様々な培地で培養した放線菌から無細胞抽出液を調製し、(強力な構成型プロモーター支配下に ORF が位置するため)菌体内で著量発現しているタンパク質を SDS-PAGE で分離する。抽出したタンパク質をペプチドマスフィンガープリント法あるいは N 末

端アミノ酸配列決定により(全ゲノム情報を基に)本タンパク質をコードする ORF を特定し、その ORF の上流領域を検索することで、強力な構成型プロモーターを同定する。

② 構成型大量発現ベクターの開発

Streptomyces 属放線菌・*Rhodococcus* 属放線菌で複製可能なプラスミド(あるいは大腸菌とのシャトルベクター)上に、同定した強力な構成型プロモーター支配下に(様々な制限酵素サイトを持つ)マルチクローニングサイトを配置した構成型大量発現ベクターを構築する。

③ 分泌シグナル配列の検索・同定

様々な培地で培養した放線菌の培養液からタンパク質抽出液を調製し、(強力な構成型プロモーター支配下で発現し、分泌シグナル配列により)菌体外に排出され、著量発現しているタンパク質を SDS-PAGE で分離する。抽出したタンパク質の N 末端アミノ酸配列を決定することにより、(全ゲノム情報を基に)ORF を特定するとともに、菌体外に分泌された時に切断されたシグナル配列を同定する。その ORF の上流領域を検索し、プロモーターが同定できた場合には強力な構成型プロモーターの候補に加える。

④ 分泌型大量発現ベクターの開発

Streptomyces 属放線菌・*Rhodococcus* 属放線菌で複製可能なプラスミド(あるいは大腸菌とのシャトルベクター)上に、既に得られている誘導型プロモーター/本研究で得る強力な構成型プロモーター支配下に、同定した分泌シグナルペプチドをコードする遺伝子と(様々な制限酵素サイトを持つ)マルチクローニングサイトを配置した誘導型/構成型の分泌型大量発現ベクターをそれぞれ構築する。

(2) 染色体 DNA 組込タイプの有用物質生産基盤技術開発

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、種々の条件検討を行い、目的配列が長くても繰り返しを複数有する二本鎖 DNA を簡便に作成できる製造方法へ改良する。その後、(i) [タンパク質をコードする遺伝子]を目的配列として直鎖状に整列した二本鎖 DNA を作成し、強力なプロモーター支配下に連結した二本鎖 DNA すなわち、強力なプロモーター + [タンパク質をコードする遺伝子]_nを作成し、放線菌に導入し、目的タンパク質の生産能が向上した微生物が育種できるかどうか検討を行う。また、(ii) [強力なプロモーターとタンパク質をコードする遺伝子]を目的配列として直鎖状に整列した二本鎖 DNA すなわち、[強力なプロモーター + タンパク質をコードする遺伝子]_nを作成し、(繰り返し回数nに依存して)目的タンパク質の生産能が向上した微生物が育種できるかどうか検討を行う。

(3) 周辺技術開発

迅速な放線菌用プラスミド構築方法の開発、放線菌宿主の高効率形質転換法の開発、タンパク質発現・有用物質生産に適した宿主放線菌の開発など、*Streptomyces* 属放線菌・*Rhodococcus* 属放線菌を育種する周辺技術を開発する。

5. 研究成果・波及効果

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、現在、下記の3つの項目に関して得られている成果について以下に記載する。

(1)ベクタータイプの有用物質生産基盤技術開発

① *Rhodococcus* 属放線菌用構成型大量発現ベクターの開発

放線菌を種々の培地で培養し、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-PAGE により分離した放線菌内のタンパク質の中から生成する量が多いタンパク質を選択し、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、それらをコードする構成遺伝子を決定し、その上流に存在する構成型プロモーターを候補として取得した。これらの構成型プロモーター支配下に(様々な制限酵素サイトを持つ)マルチクロニングサイトを配置した(*Rhodococcus* 属放線菌で複製可能な大腸菌との)シャトルベクターの構築を行った。その結果、4種の構成型発現ベクターを構築した。

(上記の4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。

② *Streptomyces*属放線菌用分泌型大量発現ベクターの開発

放線菌の培養液からタンパク質抽出液を調製し、菌体外に排出され、著量発現しているタンパク質を評価することで、分泌シグナル配列を候補として取得した。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。

(2) 染色体 DNA 組込タイプの有用物質生産基盤技術開発

染色体 DNA 組込型高度タンデム発現系の構築

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目的配列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。

条件検討した工程により作成した[SD 配列+目的酵素構造遺伝子]が直鎖状に多く整列した二本鎖 DNA を、強力なプロモーター支配下に連結した二本鎖 DNA を作成することに成功した。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、それぞれを染色体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]が直鎖状に多く整列した二本鎖 DNA を作成することにも成功し、それぞれを染色体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) 周辺技術開発

新規プラスミド構築方法の開発

現在、(*Streptomyces* 属放線菌を宿主とする)プラスミドはシャトルベクターでないため、これまでの定法では目的プラスミドの構築成功頻度は低く、構築までに時間を要していた。そこで、新たなプラスミド構築方法を検討し、目的プラスミドの構築成功頻度が向上する方法を見いだした。1つの制限酵素により切断した DNA 断片を導入する場合には、従来法と比較して目的プラスミドの構築成功頻度が 10 倍以上高くなった。これにより、(分泌シグナル配列をコードする DNA 配列やマルチクローニングサイトのような)短い遺伝子断片の特定方向への導入が必要となるプラスミドについては、構築の迅速化が可能となった。

最先端・次世代研究開発支援プログラムでのサポートにより、新規目的プラスミドの迅速構築方法の開発や、*Streptomyces* 属放線菌および *Rhodococcus* 属放線菌で機能する 10 種以上の大量発現ベクターの構築を行い、ベクタータイプの有用物質生産技術シリーズはかなり拡充することができた。本プログラム期間中に研究成果を学会発表としてしか公表できなかったが、データを蓄積して早急に特許出願および論文投稿し広く公表する予定である。

本有用物質生産技術シリーズは、応用微生物学上重要な *Streptomyces* 属放線菌や今後益々使用されることが期待される *Rhodococcus* 属放線菌を実用レベルへ育種改良可能な基盤ツールであり、産業上大きな波及効果を生むと考えられる。これまでに構築した有用物質生産技術シリーズについては多くの研究者(企業を含む)に配布し、基礎研究のみならず応用研究で利用されている。配布した有用物質生産技術シリーズを利用した成果によるハイ・インパクト・ジャーナル掲載や特許申請なども数多くあり、様々な研究に貢献できている。

6. 研究発表等

<p>雑誌論文</p> <p>計 0 件</p>	<p>(掲載済み一査読有り) 計 0 件</p> <p>(掲載済み一査読無し) 計 0 件</p> <p>(未掲載) 計 0 件</p>
<p>会議発表</p> <p>計 11 件</p>	<p>専門家向け 計 11 件</p> <ul style="list-style-type: none"> ○ 劉 瑞、橋本 義輝、小林 達彦 <i>"Rhodococcus</i> 属微生物での新規構成型高発現ベクターの構築" 2012 年度日本放線菌学会大会 平成 24 年 9 月 6 日 東京 ○ 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開発"</i> 第 85 回日本生化学会大会 平成 24 年 12 月 16 日 福岡 ○ 劉 瑞、橋本 義輝、小林 達彦 <i>"Rhodococcus</i> 属放線菌を宿主とする構成型新規発現ベクター" 第 85 回日本生化学会大会 平成 24 年 12 月 16 日 福岡 ○ 松本 雅子、齋藤 結希、橋本 義輝、小林 達彦 <i>"AcGFP をレポーター遺伝子に用いた Streptomyces 由来シグナルペプチドの探索"</i> 2013 年度日本農芸化学会 平成 25 年 3 月 25 日 仙台 ○ 小林 達彦、橋本 義輝 <i>"酵素のユニークな特性を利用したタンデム型遺伝子増幅技術の開発"</i> 2013 年度日本農芸化学会 平成 25 年 3 月 27 日 仙台 ○ 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 由来シグナルペプチドの探索"</i> 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 平成 26 年 3 月 14 日 無錫(Wuxi) 中国(China) ○ 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 平成 26 年 3 月 28 日 東京

様式21

	<p>○ 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 平成 26 年 3 月 28 日 東京</p> <p>一般向け 計 0 件</p>
図 書	
計 0 件	
産 業 財 産 権 出 願 ・ 取 得 状 況	<p>(取得済み) 計 0 件</p> <p>(出願中) 計 0 件</p>
計 0 件	
Webページ (URL)	<p>HP (http://www.u.tsukuba.ac.jp/~hashimoto.y.gu/research.html)</p> <p>筑波大学大学院生命環境科学研究科 HP 上での研究トピックス紹介 (http://www.life.tsukuba.ac.jp/topixarchive/topix_20111202.pdf)</p>
国民との科 学・技術対 話の実施 状況	<p>2011 BEST FACULTY MEMBER 表彰式 WEB 発信、平成 24 年 2 月 28 日、茨城県つくば市(筑波大学大学会館)、2011 BEST FACULTY MEMBER 表彰式での研究内容の講演(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)</p> <p>筑波大学生物資源学類 2012 年度大学説明会(筑波大学)、平成 24 年 7 月 31 日、高校生および保護者、100 名、研究展示および研究室訪問</p> <p>つくば科学フェスティバル 2012(つくばカピオ)、平成 24 年 11 月 17 日、児童・生徒を含む一般市民、150 名、放線菌の展示および紹介("放線菌のふしぎ")</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>FIRST シンポジウム「科学技術が拓く 2030 年」へのシナリオ、平成 26 年 3 月 1 日、東京都新宿区(ベルサール新宿グランド)、一般市民、ポスター展示</p>
新聞・一般 雑誌等掲 載	
計 0 件	
その他	

様式21

7. その他特記事項