

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23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製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23年度には、前年度に引き続き、*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プロモーターの検索および同定を行うとともに、同定した構成型強力プロモーターを用いて構成型大量発現ベクター(シャトルベクターを含む)の構築を行うことを目的とした。さらに、分泌型高発現ベクターの構築に必要な分泌シグナル配列の検索・同定を行うことを目的とした。

また、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、(他に関しては継続して研究を進めているが)現在、構成型大量発現ベクターと高度タンデム発現系の構築に関して得られている成果について以下に記載する。

構成型強力プロモーターの検索・同定

前年度に引き続き以下の実験を行った。種々の培地で培養した放線菌から、菌体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、生成量が多い複数のタンパク質のバンドを切り出した。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、マトリックス支援レーザー脱離イオン化飛行時間型質量分析計で決定し、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、(前年度とは異なる)タンパク質について、それらをコードする構造遺伝子を決定し、その上流に存在する構成型プロモーターをいくつか候補として取得した。

構成型大量発現ベクターの構築

(上記で同定した)一部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)マルチクロー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)シャトルベクターを1種構築した。

染色体 DNA 組込型高度タンデム発現系の構築

前年度に条件検討した(PCR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)工程により作成した[特定のタンパク質をコードする遺伝子]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。さらに、[強力なプロモーター + 特定のタンパク質をコードする遺伝子]を目的配列として、上記工程を一部改良した方法により[強力なプロモーター + 特定のタンパク質をコードする遺伝子]が直鎖状に多く整列した二本鎖DNAを作成することに成功した。

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 計0件</p>	<p>専門家向け 計0件 一般向け 計0件</p>
<p>図書 計0件</p>	
<p>産業財産権 出願・取得状 況 計0件</p>	<p>(取得済み) 計0件 (出願中) 計0件</p>
<p>Webページ (URL)</p>	<p>HP (<a href="http://www.u.tsukuba.ac.jp/~hashimoto.yoshite.gu/research.html">http://www.u.tsukuba.ac.jp/~hashimoto.yoshite.gu/research.html</a>) 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 (<a href="http://www.life.tsukuba.ac.jp/topixarchive/topix_20111202.pdf">http://www.life.tsukuba.ac.jp/topixarchive/topix_20111202.pdf</a>)</p>
<p>国民との科 学・技術対話 の実施状況</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、平成24年2月28日、筑波大学大学会館、WEB 発信、2011 BEST FACULTY MEMBER 表彰式での研究内容の講演、</p>
<p>新聞・一般雑 誌等掲載 計0件</p>	
<p>その他</p>	

4. その他特記事項

## 実施状況報告書(平成23年度) 助成金の執行状況

本様式の内容は一般に公表されず

## 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	44,100,000		58,900,000	
間接経費	30,900,000	13,230,000		17,670,000	
合計	133,900,000	57,330,000	0	76,570,000	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	43,514,763	0		43,514,763	41,235,093	2,279,670	
間接経費	13,054,429	0		13,054,429	12,370,527	683,902	
合計	56,569,192	0	0	56,569,192	53,605,620	2,963,572	0

## 3. 当該年度の執行額内訳

(単位:円)

	金額	備考
物品費	33,884,933	超微量分光光度計、純水製造装置、実験試薬等
旅費	152,900	情報収集旅費(京都女子大)等
謝金・人件費等	6,212,412	研究員人件費
その他	984,848	機器修理料、HP作成料等
直接経費計	41,235,093	
間接経費計	12,370,527	
合計	53,605,620	

## 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
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	国立大学法人筑 波大学
純水製造装置	(株)ヤマト科学製 オートスチル WG1000	1	823,095	823,095	2011/7/7	国立大学法人筑 波大学
温度制御付酸素電 極コントローラー	英国 ハンザテッ ク社製 OXYT-1	1	831,600	831,600	2011/8/8	国立大学法人筑 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	国立大学法人筑 波大学
窒素ガス発生装置	(株)島津製作所 製 SSOT-	1	913,461	913,461	2011/12/27	国立大学法人筑 波大学
				0		
				0		