

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24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、長い核酸でも創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射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 24 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)の構築を行うことを目的とした。

また、前年度に引き続き、構成型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・同定を行い、得られた分泌シグナル配列(および同定した構成型強力プロモーター)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、大量発現ベクターや分泌型高発現ベクターの迅速な構築方法など周辺技術の開発・改良も目的とした。

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の構築、分泌型高発現ベクター構築に必要な分泌シグナル配列の取得、およびプラスミド構築方法の改良に関して得られている成果について以下に記載する。

構成型大量発現ベクターの構築

前年度までに構成型強力プロモーターの検索・同定を行い、複数の候補の取得に成功している。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)シャトルベクターの構築を行った。その結果、(前年度までに構築に成功している構成型発現ベクター以下に)さらに3種の構成型発現ベクターを構築した。

分泌シグナル配列の検索・同定

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評価することで、分泌シグナル配列をいくつか候補として取得した。

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。

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 5 件	専門家向け 計 5 件 ○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 東京 平成 24 年 9 月 6 日 ○橋本 義輝、中砂 隆司、小林 達彦 “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” 第 85 回日本生化学会大会 福岡 平成 24 年 12 月 16 日

様式19 別紙1

	<p>○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 福岡 平成 24 年 12 月 16 日</p> <p>○松本 雅子、齋藤 結希、橋本 義輝、小林 達彦 “AcGFP をレポーター遺伝子に用いた <i>Streptomyces</i> 由来シグナルペプチドの探索” 2013 年度日本農芸化学会 仙台 平成 25 年 3 月 25 日</p> <p>○小林 達彦、橋本 義輝 “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” 2013 年度日本農芸化学会 仙台 平成 25 年 3 月 27 日</p> <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>HP (http://www.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>研究内容紹介、平成 24 年 7 月 31 日、筑波大学生物資源学類 2012 年度大学説明会(筑波大学)、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>“放線菌のふしぎ”、平成 24 年 11 月 17 日、つくば科学フェスティバル 2012(つくばカピオ)、児童・生徒を含む一般市民、150 名、放線菌の展示および紹介</p>
<p>新聞・一般雑 誌等掲載</p> <p>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24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	33,000,000	25,900,000	
間接経費	30,900,000	13,230,000	9,900,000	7,770,000	
合計	133,900,000	57,330,000	42,900,000	33,670,000	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	2,279,670	33,000,000	0	35,279,670	33,123,243	2,156,427	
間接経費	683,902	9,900,000	0	10,583,902	9,936,972	646,930	
合計	2,963,572	42,900,000	0	45,863,572	43,060,215	2,803,357	0

3. 当該年度の執行額内訳

(単位:円)

	金額	備考
物品費	19,636,778	フリーズ超低温槽、ゲル撮影装置等
旅費	730,964	情報収集旅費(広島大学)等
謝金・人件費等	9,785,044	研究員人件費
その他	2,970,457	DNAシーケンス解析等
直接経費計	33,123,243	
間接経費計	9,936,972	
合計	43,060,215	

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
フリーズ超低温槽	日本フリーザー 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)AE6932GXES	1	756,000	756,000	2012/10/12	筑波大学
LCMSアップグレード キット	島津製作所 LCMS-8030用	1	1,050,000	1,050,000	2013/3/21	筑波大学