

平成 30 年 6 月 18 日現在

機関番号：12102

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K14878

研究課題名(和文)放線菌におけるユニークな遺伝情報発現の制御機構研究

研究課題名(英文)Studies on unique inducible protein expression system for streptomycetes

研究代表者

小林 達彦(KOBAYASHI, Michihiko)

筑波大学・生命環境系・教授

研究者番号：70221976

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：100種類以上の様々な化合物がタンパク質生産の誘導剤となり得るかを試した結果、培地への特定の誘導剤化合物の添加により著量誘導生産するタンパク質を発見するとともに、そのタンパク質遺伝子を同定することに成功した。当該遺伝子の転写開始点を決定し、プロモーターとして機能する領域を同定した。さらに、誘導発現調節に関与する新たなタンパク質遺伝子を同定した。誘導型プロモーターや誘導発現調節タンパク質などの制御機構の一端を解明し、放線菌を宿主とする新規誘導型高発現系の開発に利用可能な知見を得た。

研究成果の概要(英文)：Using *Streptomyces avermitilis* strain whose whole genome sequence has been completely determined, we searched for proteins that are formed inducibly by the addition of each of various inducers, and identified the gene encoding one of the resultant inducible proteins. The transcriptional start site for the gene was determined by the primer extension analysis with RNA extracted from *S. avermitilis* cells that were grown in the medium in the presence of the inducer. Around the transcriptional start site, a possible promoter sequence and Shine-Dalgarno sequence were found, respectively. We constructed the disruptant mutant lacking the adjacent region including the gene. By the deletion analysis using the disruptant mutant as a host, we identified the regulatory gene responsible for the inducible formation of the gene in the presence of the inducer.

研究分野：応用微生物学

キーワード：微生物

1. 研究開始当初の背景

放線菌の中の *Streptomyces* 属放線菌は、抗生物質や免疫抑制剤を始めとする多種多様な有用生理活性物質を工業的に生産する今日の応用微生物学上、最も重要な微生物群である。本属でしか生産されない産業用酵素やタンパク質も存在することから、本属での高発現系の開発が強く望まれている。従って、我々は放線菌を対象とし、その開発に取り組んだ。まず、*Rhodococcus rhodochrous* J1 株放線菌のニトリル分解・代謝機構を分子レベルで解析する過程で、(イソバレロニトリルで大量に誘導生成される) *R. rhodochrous* J1 株由来ニトリラーゼの強力な誘導型遺伝子プロモーターが *Streptomyces* 属放線菌で機能することを初めて発見した。さらに、本プロモーターを利用することによって、*Streptomyces* 属で機能する誘導型高発現ベクター (pSH19) の開発に初めて成功した [*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **101**, 14031 (2004)]。また、本誘導型高発現ベクターを用いることで、種々の放線菌において様々な有用酵素の大量発現に成功している。しかし、誘導剤として用いるイソバレロニトリルが毒性化合物であるが故、宿主によっては低濃度での誘導剤添加で生育阻害が起こったり、(より高い誘導効果が期待できる) 高濃度の誘導剤添加で菌体量が極端に減少したりする場合があります、改善の余地があった。

2. 研究の目的

本研究では、全ゲノム決定放線菌 *Streptomyces avermitilis* を対象とし、著量のタンパク質発現を引き起こす誘導物質のスクリーニングを行う。続いて、誘導物質により誘導発現するタンパク質を同定し、その上流に位置すると予想される誘導型プロモーターや誘導発現調節タンパク質などの制御機構を解明し、*Streptomyces* 属放線菌を宿主とする高性能新規誘導型高発現系の開発に利用可能な知見を得ることを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 誘導剤化合物添加により誘導発現するタンパク質の探索

誘導剤候補となる様々な化合物を添加した培地で *S. avermitilis* の培養を行う。培養終了後の菌体から調製した無細胞抽出液を SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動に供することで、誘導剤候補化合物を添加した場合にのみ誘導的に生成するタンパク質を探

索する。得られた高発現タンパク質のバンドが存在する電気泳動ゲルは PVDF 膜に転写後、誘導的に発現したタンパク質バンド部分を切り出し、プロテインシーケンサーにより、当該タンパク質バンドの N 末端部分アミノ酸配列を決定する。

(2) 誘導剤化合物添加により誘導発現するタンパク質の遺伝子プロモーター・制御領域の探索

決定した N 末端部分アミノ酸配列の情報を基に、著量誘導発現するタンパク質をコードする遺伝子を同定する。さらに、同定した遺伝子の周辺領域から、遺伝子プロモーターや誘導発現調節に関与するタンパク質を推定する。

(3) 遺伝子プロモーターおよび誘導発現制御機構の解析

当該タンパク質遺伝子を含むクラスター領域の切り縮め実験を行い、誘導発現調節に関与するタンパク質遺伝子を特定するとともに、誘導発現調節因子として機能する最小領域を決定する。さらに、当該タンパク質遺伝子については、転写開始点を決定し、プロモーター領域を推定する。

4. 研究成果

(1) 誘導剤化合物添加により誘導発現するタンパク質の探索およびその遺伝子プロモーター・制御領域の探索

YEME 寒天培地上で孢子形成させた *S. avermitilis* 1 cm² 相当を寒天培地ごと YEME 培地 100 ml に植菌し、28°C で 36 時間前培養を行った。誘導剤候補となる 100 種類以上の様々な化合物を各々添加した培地 10 ml に、前培養液を 1% となるように植菌し、28°C で 72 時間の本培養を行った。各種化合物が *S. avermitilis* の生育阻害を引き起こす可能性を考慮し、複数の濃度での添加を試みた。培地についても、栄養培地を中心に複数の培地を検討した。

培養終了後の菌を緩衝液に溶解後、破碎し、遠心上清を回収することで調製した無細胞抽出液を SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動に供した。誘導剤候補化合物を添加せずに培養し同様に調製したサンプルと比較し、化合物の添加に応答して誘導的に発現したタンパク質バンドが電気泳動ゲル上で複数確認できた。誘導的に発現したタンパク質バンドが存在する電気泳動ゲルを PVDF 膜に転写し、誘導発現したタンパク質の N 末端部分アミノ酸配列を決定した。

(2) 誘導剤化合物添加により誘導発現するタンパク質の遺伝子プロモーター・制御領域の探索

S. avermitilis のゲノム配列の情報を基に、決定した N 末端部分アミノ酸配列をもつタンパク質をコードする遺伝子（以下、当該遺伝子）の同定に成功した。当該遺伝子の周辺領域を検索した結果、近くには、少なくとも 2 つの転写調節タンパク質と相同性を示す遺伝子が存在し、遺伝子クラスターを構成していることを見いだした。しかし、どの遺伝子産物が当該遺伝子の誘導発現に関わるかは同定できなかった。

(3) 遺伝子プロモーターおよび誘導発現制御機構の解析

まず、当該遺伝子や周辺の転写調節タンパク質遺伝子を含む周辺 9 遺伝子（以下、本領域）をスペクチノマイシン耐性遺伝子に置換した破壊株作成用プラスミドを構築した。本プラスミドを保持する大腸菌と *S. avermitilis* から調製した孢子液を混和後、接合伝達により本プラスミドを *S. avermitilis* に導入し、本領域の破壊候補株を作成した。破壊候補株の中から、サザンハイブリダイゼーションにより、二回交叉による本領域破壊株（以下、本領域欠損株）を選抜した。誘導剤化合物を添加した培地で本領域欠損株を培養後、菌体から調製した無細胞抽出液を SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動に供した結果、当該タンパク質は誘導的に生成されなくなり、表現型においても目的遺伝子（および周辺領域）が破壊された株であることが示唆されたので、以降の実験に用いた。

次に、切り縮め実験を行うために、当該遺伝子を含む本領域について様々な断片を染色体組込みベクターに連結することで、各種相補用プラスミドを構築した。本プラスミドを保持する大腸菌と、（前述で作成した）本領域欠損株から調製した孢子液を混和後、接合伝達により相補用プラスミドを本領域欠損株に導入し、本領域欠損株の染色体 DNA 上に相補用プラスミドを組込んだ株を作成した。これらの株について、誘導剤化合物を添加した培地で培養後、菌体から調製した無細胞抽出液を SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動に供し、誘導剤化合物添加による当該タンパク質の誘導発現の回復を指標として切り縮め実験を行った。その結果、誘導発現調節に関与するタンパク質遺伝子を同定した。フレームシフトで破壊した本タンパク質遺伝子と当該遺伝子を含む DNA 断片を本領域欠損株の染色体 DNA 上に組込んだ株では、誘導剤化合物添加による当該タンパク質の誘導発現は回復せず、同定した本タンパク質遺伝子が当該遺伝子の誘導発現調節に関

与することが強く示唆された。

さらに、誘導剤化合物を添加した培地で培養した *S. avermitilis* の菌体から RNA を調製した。当該遺伝子の開始コドン下流の DNA 配列と相補的なオリゴヌクレオチドを合成し、プライマー伸長法により、当該遺伝子の転写開始点を決定することに成功した。本転写開始地点と当該遺伝子の開始コドンとの間にはリボソーム結合部位と考えられる SD 配列として機能する配列を、本転写開始地点上流にはプロモーター領域と推測される配列をそれぞれ見いだした。また、インバーテッドリピートとして機能すると推測される配列も見いだした。一方、誘導剤化合物を添加しない培地で培養した *S. avermitilis* 菌体から調製した RNA を用いた場合には、プライマー伸長法で、当該遺伝子の転写開始点にシグナルが得られなかった。以上の結果より、当該遺伝子の誘導剤化合物の添加による誘導発現は転写レベルでコントロールされていることが強く示唆され、本研究で探索した遺伝子プロモーターおよび誘導発現制御機構を利用した *Streptomyces* 属放線菌を宿主とする高性能新規誘導型高発現系の開発に利用可能な知見を得ることができた。

5. 主な発表論文等

（研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線）

〔雑誌論文〕（計 0 件）

〔学会発表〕（計 0 件）

〔図書〕（計 0 件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0 件）

○取得状況（計 0 件）

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小林 達彦 (KOBAYASHI, Michihiko)
筑波大学・生命環境系・教授
研究者番号：70221976

(2) 研究分担者

橋本 義輝 (HASHIMOTO, Yoshiteru)
筑波大学・生命環境系・准教授
研究者番号：00323254

(3)連携研究者
なし

(4)研究協力者
なし