

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 8 日現在

機関番号：12614

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010 年度 ～ 2011 年度

課題番号：22710204

研究課題名（和文） マリンメタゲノムからの新たな組換えタンパク質高次構造形成促進因子の探索

研究課題名（英文） Screening of new promoting factor for active recombinant-protein from marine metagenomic library

研究代表者

寺原 猛 (TERAHARA TAKESHI)

東京海洋大学・大学院海洋科学技術研究科・助教

研究者番号：70547059

研究成果の概要（和文）：一般に遺伝子発現系で使用される大腸菌でさえも、産生タンパク質が失活することが多い。そこで、マリンメタゲノム・ライブラリー約 2000 クローンから組換えタンパク質の活性を補助・促進する新たな因子を探索した。その結果、既知のものとは異なる因子が含まれ、低温での大腸菌の増殖能を向上させる 3 クローンを発見した。これらのクローンは、大腸菌を用いた低温での組換えタンパク質産生系の構築に役立つ可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：*Escherichia coli* expression system has generally been used for producing recombinant proteins, whereas it often results in insoluble and/or non-functional proteins. In this study, approximately 2,000 *E. coli* strains of marine metagenomic library were screened for new promoting factor for active recombinant-proteins. Three positive clones, which promote growth of *E. coli* at low temperature, were obtained. In addition, these clones contained putative new factors. The results indicate that these clones may be useful for the construction of new *E. coli* expression system at low temperature in order to produce active recombinant-proteins.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2011年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
年度			
総計	1,900,000	570,000	2,470,000

研究分野：環境ゲノム科学

科研費の分科・細目：ゲノム科学・応用ゲノム科学

キーワード：環境ゲノム、メタゲノム、遺伝子資源

## 1. 研究開始当初の背景

原核生物は 99% が難培養性であるが、近年のゲノム解析が示すように機能遺伝子の宝庫である。しかし、機能遺伝子の取得（たと

えばメタゲノム解析の activity-based screening) は効率的ではない。また、現在までの発現系の改良は、既知の活性を持つ分子シャペロン等の活用に留まっている。

(1) 原核生物は、新規・有用遺伝子の宝庫であるが、効率的な取得には至っていない。

原核生物は地球上のあらゆる環境に適応し、その種類は億を超える<sup>1)</sup>と言われ、真核生物にはない特殊な機能を有している。現在進行中のゲノム解析プロジェクトでは約3,000の生物の2/3以上が原核生物(主に細菌)であり<sup>2)</sup>、基礎および応用研究に利用できそうな新規遺伝子が、塩基配列データベースから続々と発信されている。ただし、現在まで培養できたのは1%である。そこで、分離培養に依存せずに環境試料から抽出したDNA(環境DNA)を解析する、メタゲノム解析<sup>3)</sup>が近年、注目されている。メタゲノム解析では従来見過ごされてきた難培養微生物の遺伝子資源にアクセスできる。しかし、機能遺伝子の取得(たとえば、メタゲノム解析 activity-based screening)は効率的ではない。その理由は、大腸菌等の宿主に遺伝子(培養可能なもの、あるいはメタゲノム)を組換え、活性ある形での発現が困難な場合が多いからである。

(2) 原核生物の遺伝子から活性型組換えタンパク質を発現させる技術は未成熟である。

活性ある形で発現させることが困難な原因は様々であるが<sup>4,5)</sup>、(i) 転写の効率の問題、(ii) 翻訳の効率の問題、(iii) 翻訳後のタンパク質修飾および高次構造形成の問題とそれに付随したタンパク質分解の問題、(iv) タンパク質の蓄積による細胞質内生理バランス変化(毒性発現)の問題等に分類できる。(i)および(ii)については、一定の解決策が準備されている。(iii)の主要な問題は、高次構造形成の不調およびその結果生ずるタンパク質の分解である。タンパク質の正しい折り畳み(folding)を助け、タンパク質の高次構造の形成を促進するため、シャペロンの利用、disulfide bridge 形成に関与する酵素の活性の調節等が提案されているが、問題すべてを解決するには至っていない。(iv)の問題の解決法として、生産された異種タンパク質をペリプラスムあるいは細胞外に移動させる方法が開発されているが、一般性を持った技術には未だ成熟していない<sup>6)</sup>。

## 2. 研究の目的

分子生物学的知識が蓄積されている大腸菌でさえも、活性型の組換えタンパク質を発現させることができる割合は前述のように低い。組換えタンパク質発現系の開発は分子シャペロンや PPase 等の既知の活性を持つタンパク質を利用して行われてきたため、現在の知識から予想される範囲での改良しか行われず、それゆえ技術改良には手詰まり感が漂っている。そこで、難培養微生物を豊富に

含む多様な原核生物ゲノムから、遺伝子が活性ある形で発現することを補助・促進する新たな因子を広く探索する。

本研究では、カイメン・サンゴに多くの微生物が共生・共存していることに着目し、カイメン、サンゴ共生細菌のマリンメタゲノム・ライブラリーを用いる。この探索により、従来から知られていた因子、たとえば GroEL/ES ファミリー遺伝子も取得すると思うが、それ以外に、今まで想像できなかったようなタンパク質高次構造形成促進因子を取得できる可能性がある。さらに、見出されてきた高次構造形成促進因子をコードする遺伝子を検証して、特徴的な塩基配列情報を抽出する。その情報を利用して、塩基配列ベースでのタンパク質高次構造形成促進因子の探索も試みる。以上より、新たなタンパク質高次構造形成促進因子を取得し、それを用いて組換えタンパク質を活性ある形で生合成できる発現系を構築する。

## 3. 研究の方法

本研究では、カイメン共生細菌のマリンメタゲノム・ライブラリーを用いた。無脊椎動物であるカイメンは、食物を濾過して接種する濾過食性の動物で、体を構成している細胞分化の程度が低く、系統学上最も原始的な後生生物である。このようなカイメンの体内には多くの細菌が共生していることが知られており、このカイメン共生細菌は天然物資源として非常に興味をもたれている。沖縄で採集したカイメンに共生する細菌からゲノムを抽出し、構築したマリンメタゲノム・ライブラリーを用いた。

### (1) スクリーニング系

細菌の平均的なゲノムサイズは4-5 Mbp であり、3,000-4,000 個の遺伝子がコードされている。これらの遺伝子をクローン化し、適当なプロモーターの支配下に発現させるとする。この条件で発現する遺伝子はそれほど多くはない(1-2 個)と考えられるから、一種類の細菌の遺伝子を網羅的にクローン化し、大腸菌で発現させるには相当数のクローンが必要となる。メタゲノムの場合、含まれる細菌の数は100を下らないだろうから、膨大な数のクローンが必要となる。そのため、目的とする因子をコードする遺伝子を持つクローンを探索するには、強力なスクリーニング系が必要となる。

本研究では、目的とする促進因子をコードした遺伝子を持つクローンのみが生育するようなスクリーニング系を使用した。スクリーニング系の原理は以下の通りである。出発材料は、普通のクローニングベクター(たと

えば pUC18) である。また、用いる大腸菌は封入体を作ってしまう等の理由で機能発現できないタンパク質を有しているため、スクリーニング系の条件下では増殖できない。ここに、メタゲノム由来 DNA 断片を含んだクローニングベクターを用い、大腸菌を形質転換する。外来の促進因子をコードする遺伝子が導入されれば、機能発現できなかったタンパク質が発現されて、大腸菌が増殖できるようになる。その後、増殖した大腸菌からクローニングベクターを抽出し、促進因子を取得する。

促進因子をスクリーニングする系に用いる大腸菌の宿主と培養条件には様々なものが考えられるが、本研究では、宿主：野生型大腸菌、培養条件：クロラムフェニコール含有 LB 培地で 15°C 以下の低温での培養とし、コロニー形成能を観察した。

## (2) アノテーション

マリンメタゲノム・ライブラリーのアノテーションデータを用い、スクリーニングに用いたクローンやスクリーニングで得られたクローンに既知の因子が含まれているかを調べた。

## 4. 研究成果

### (1) スクリーニング

低温での遺伝子発現は組換えタンパク質が正しくフォールディングするためには有効であるが、組換え大腸菌の生育自体が阻害されるのが難点である。マリンメタゲノム・ライブラリーの大腸菌クローンを 15°C で培養し、コロニー増殖能を観察した。また、ポジティブコントロールとして、37°C でも培養した。約 2000 個のクローンをスクリーニングした結果、他のクローンよりも増殖が速く、大きめのコロニーを形成したクローンが 3 個確認された。さらに、10°C で培養した結果、その中の 1 クローンで増殖が速かった。

大腸菌は 15°C 以下ではシャペロンが機能しないために増殖しないことが知られている<sup>7)</sup>。そのため、マリンメタゲノム由来 DNA 断片を含んだクローニングベクターを用いて形質転換された大腸菌は、15°C 以下で機能するシャペロン、あるいはそれと同等の機能を持つ促進因子がクローニングベクターに含まれる場合に限り、15°C 以下でも増殖できるようになることが推察される。

### (2) アノテーション

マリンメタゲノム・ライブラリーのアノテーションデータを用い、スクリーニングに用いたクローンやスクリーニングで得られた 3

個のクローンに既知の因子が含まれているかを調べた。ここでは、組換えタンパク質発現系でよく用いられている分子シャペロンに着目した。結果を表 1 に示す。

表 1 マリンメタゲノム・ライブラリーの機能推定とスクリーニング結果

機能推定	クローン数 (個)	ポジティブ数 (個)
Chaperone	36	0
Cold protein	6	0
Others	2070	3

スクリーニングしたクローンの中には、既知のシャペロンに類似したものを含むクローンが 36 個、低温で活性を示すものを含むクローンが 6 個あったが、それらの増殖能はいずれも向上していなかった。一方、得られた 3 個のクローンには既知のシャペロンは含まれていないことがわかった。このことから、得られた 3 個のクローンには、低温で大腸菌の増殖を補助・促進する新規な因子が含まれていることが示唆された。

### (3) 今後の展望

マリンメタゲノム・ライブラリーから、タンパク質高次構造形成促進因子を強力なスクリーニング系を用いて選抜した。今回のスクリーニング系を用いることで、今まで想像できなかったようなタンパク質高次構造形成促進因子が数多く発見されると思われる。取得した高次構造形成促進因子に関しては、当該遺伝子を確定し (コスミド・クローンの場合、数十の遺伝子群の中から当該遺伝子を同定しなければならない)、塩基配列を決定することが必要であり、現在、更なる解析を試みている。

新規な遺伝子が分離された場合は、生化学的特性の解析等も重要課題となると思われるが、できるだけ多様な高次構造形成促進因子の取得を最優先課題に考えている。また、分離された高次構造形成促進因子の評価を、*in vivo* でのアッセイで行うことも必要である。前述の高次構造形成促進因子のスクリーニング法はそのままアッセイ法としても用いることができるし、*luciferase*<sup>8)</sup> や *GFP*<sup>9)</sup> を用いたアッセイ等も併用し、分離された高次構造形成促進因子をコードする遺伝子産物の *protein-folding* 活性などを評価してもよい。

このようにして得られた因子を活用した発現系を構築し利用できれば、従来法よりも活性ある形の組換えタンパク質が得られることが予想されるため、たとえばメタゲノム解析 *activity-based screening* で活性ある形で発

現できずに見過ごしていた機能遺伝子の取得が可能になる。また、バイオインダストリー協会の調査によれば、産業界が欲している最重要基礎バイオ技術として、「組換えタンパク質を機能ある形で確実に発現させる技術」が挙げられている。さらに、原核生物由来のみならず、真核生物由来のタンパク質を大腸菌内で大量発現することも、多くの基礎科学の研究者がてこずり、この困難を克服する技術を熱望しているところである。すなわち、広範な組換えタンパク質を、活性を持つ形で合成できる技術は、応用および基礎サイエンス関係者からの強い要請に応えるものであり、高い社会的意義を持つ。本研究の成果はその第一歩であると考えらる。

低温での遺伝子発現は組換えタンパク質が正しくフォールディングするためには有効であるが、組換え大腸菌の生育自体が阻害されるのが難点であった。本研究で得られたクローンには、既知のものとは異なる促進因子が含まれ、低温での大腸菌の増殖能を向上させたことから、組換えタンパク質の構造安定に有効であるが、大腸菌の生育阻害の恐れがある、組換え大腸菌を用いた低温での遺伝子発現に役立つことが示唆された。今後、さらなる解析が期待される。

(参考文献)

- 1) Gans J, Wolinsky M, Dunbar J. (2005) Computational improvements reveal great bacterial diversity and high metal toxicity in soil. *Science*, 309:1387-1390.
- 2) GOLD: Genomes Online Database (<http://www.genomesonline.org/>)
- 3) Handelsman, J. (2004) Metagenomics: Application to uncultured microorganisms. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 68, 669.
- 4) Baneyx F, Mujacic M. (2004) Recombinant protein folding and misfolding in *Escherichia coli*. *Nat. Biotechnol.*, 22:1399-1408.
- 5) Gabor, EM, Alkema WBL, Janssen DB. (2004) Quantifying the accessibility of the metagenome by random expression cloning techniques. *Environ. Microbiol.*, 6:879-886.
- 6) Georgiou G, Segatori L. (2005) Preparative expression of secreted proteins in bacteria: status report and future prospects. *Curr. Opin. Biotechnol.*, 16: 538-545.
- 7) Ferrer M, Chernikova TN, Yakimov MM, Golyshin PN, Timmis KN. (2003) Chaperonins govern growth of *Escherichia coli* at low temperatures. *Nat. Biotechnol.*, 21:1266-1267.

- 8) Manukhov IV, Eroshnikov GE, Vyssokikh MY, Zavilgelsky GB. (1999) Folding and refolding of thermolabile and thermostable bacterial luciferases: the role of DnaKJ heat-shock proteins. *FEBS Lett.*, 448:265-268.
- 9) Cabantous S, Rogers Y, Terwilliger TC, Waldo GS. (2008) New molecular reporters for rapid protein folding assays. *PLoS ONE.*, 3:e2387.

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 1 件)

1. 寺原 猛, 竹山 春子, マリンメタゲノムからの組換え大腸菌生育促進因子の探索, 第6回日本ゲノム微生物学会年会, 2012年3月12日, 立教大学池袋キャンパス(東京)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

寺原 猛 (TERAHARA TAKESHI)  
東京海洋大学・大学院海洋科学技術研究科・助教  
研究者番号: 70547059

(2) 研究分担者

( )

研究者番号:

(3) 連携研究者

( )

研究者番号: