

平成22年 6月 1日現在

研究種目：若手研究 (B)
 研究期間：2008～2009
 課題番号：20780079
 研究課題名 (和文) 放射線抵抗性細菌を用いた耐熱性タンパク質生産系の開発
 研究課題名 (英文) Development of thermostable protein production system using the radioresistant bacterium
 研究代表者
 佐藤 勝也 (SATO KATSUYA)
 独立行政法人 日本原子力研究開発機構・量子ビーム応用研究部門・研究員
 研究者番号：90370402

研究成果の概要 (和文)：従来法で生産が困難な高度好熱菌のタンパク質を放射線抵抗性細菌内で生産することのできる有用タンパク質生産系を開発するために、遺伝子発現に有用なプロモーター配列を探索し、発現プラスミドを作製した後、遺伝子発現解析を行った。その結果、従来の大腸菌を宿主とした発現系では、高度好熱菌タンパク質が不溶化するが、放射線抵抗性細菌を宿主として用いることで、不溶化することなくタンパク質の生産を確認することができた。

研究成果の概要 (英文)：Some proteins originated from thermophile had difficulty with production by the conventional method using *Escherichia coli* as a host cell. In this study, to develop a novel system for thermostable protein production using the radioresistant bacterium, we searched a useful promoter sequence for gene expression and constructed a novel expression plasmid vector. As a result, the production of thermostable protein without insolubilization could be confirmed using a radioresistant bacterium as a host cell.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2009年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：放射線分子生物学

科研費の分科・細目：農芸化学・応用生物化学

キーワード：生物学、遺伝子工学、放射線抵抗性細菌、高度好熱菌、耐熱性タンパク質、タンパク質生産系、シャトルベクター、プロモーター配列

1. 研究開始当初の背景

(1) 遺伝子解析技術の急速な進展により、既に多数の生物で全ゲノム配列が解読済みである。DNA塩基配列情報は有用な遺伝子資源ではあるが、実際に生命現象で機能している

のは、多くの場合、タンパク質である。

(2) 高度好熱菌サーモフィルスのタンパク質は耐熱性や構造安定性といった特性から、遺伝子工学試薬や食品・医薬品の製造など産

業利用も期待され、有用遺伝子資源として注目されている。従来の構造生物学では、遺伝子工学技術を用いて、大腸菌を宿主として目的の組換えタンパク質を生産している。しかしながら、高度好熱菌のタンパク質生産において、目的タンパク質が不溶化するなど、全タンパク質の内およそ3分の1は、大腸菌での効率的なタンパク質生産が困難であることが報告されている。

(3) 高度好熱菌と進化的にごく近縁種である放射線抵抗性細菌 *Deinococcus* は常温菌であり、高度好熱菌とは至適生育温度が異なっている。しかしながら、両細菌に共通の酵素は、遺伝子レベル及びタンパク質レベルで非常に高い相同性を持つ。さらに、代謝系についても非常に類似していることから、放射線抵抗性細菌内で不溶化することなく高度好熱菌の耐熱性タンパク質を生産できる可能性が高い。

2. 研究の目的

効率的なタンパク質生産技術は、タンパク質の機能解析によって生命現象を解明する研究に必須の基盤技術である。そこで、本研究の目的は、これまでに開発してきた *Deinococcus*・ *Grandis* (以下、 *Grandis*と略す)の遺伝子操作技術を改良し、大腸菌で生産が困難な高度好熱菌の耐熱性タンパク質を大量に生産することのできる有用タンパク質生産系を開発することである。

3. 研究の方法

(1) 放射線抵抗性細菌／大腸菌シャトルベクターをベースとして、プロモーター配列を含まないホタル由来ルシフェラーゼ遺伝子を挿入したプロモーター解析用プラスミドを構築した。

(2) 構築したプロモーター解析用プラスミドのルシフェラーゼ遺伝子の開始コドンの上流に放射線抵抗性細菌のゲノム情報を基に合成した推定プロモーター配列を含む DNA断片を挿入した。挿入したプロモーター配列の活性をルシフェラーゼ遺伝子の発現活性を指標としたレポーターアッセイでタンパク質生産への有用性を検証した。

(3) プロモーター領域の欠失変異体を作製し、ルシフェラーゼ遺伝子の発現活性を指標としたレポーターアッセイにより、プロモーター配列の最小領域の同定を試みた。

(4) レポーターアッセイによって同定したプロモーター配列を用いて、タンパク質生産用プラスミドを構築した。このプラスミドのプロモーター配列の下流に、高度好熱菌 *recJ*

遺伝子を挿入し、耐熱性タンパク質発現プラスミドを構築した。

(5) 耐熱性タンパク質発現プラスミドを *Grandis*に導入し、高度好熱菌 *RecJ* タンパク質の生産を検証した。

(6) 内在性プロテアーゼによる目的タンパク質の分解を抑制するために、抗生物質耐性遺伝子挿入法を用いて、 *Grandis*の ATP 依存性プロテアーゼをコードする *lon* 遺伝子の破壊株を作製し、この遺伝子破壊株を宿主として高度好熱菌 *RecJ* タンパク質の生産を検証した。

4. 研究成果

(1) 放射線抵抗性細菌のトランスクリプトーム解析及びゲノム情報を基に設計した7種の遺伝子 (*dr0003*, *dr0422*, *dra0016*, *pprA*, *lexA1*, *groES* 及び *EF-Tu*) のプロモーター配列を含む領域について、構築したプロモーター活性解析用プラスミド (*pZSL1*) を用いて、タンパク質生産への有用性を検証したところ、放射線抵抗性細菌内で高次に遺伝子発現を誘導することのできる2種のプロモーター配列 (*groES_P*; 136 bp、及び *EF-Tu_P*; 204 bp) を同定した (図1)。

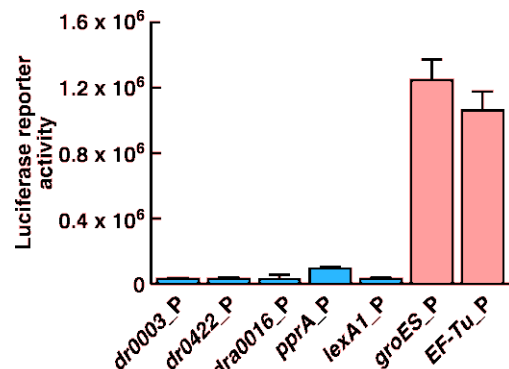


図1. ルシフェラーゼレポーターアッセイによるプロモーター配列の探索。

(2) *groES_P* 配列の最小領域を同定するために、RNAポリメラーゼ結合領域、転写開始点及びリボソーム結合領域 (RBS) を除く部位を欠失させた変異プロモーター配列 (*groES_P75*; 75 bp) を作製し、プロモーター活性の解析を試みたが、プロモーター活性の低下が見られ、欠失させた領域がプロモーター活性に重要な領域であることが明らかになった (図2)。

(3) 放射性抵抗性細菌／大腸菌シャトルベクター *pZT29* と同定した2種のプロモーター配列 (*groES_P* 及び *EF-Tu_P*) を組み合わせてタンパク質生産用プラスミド (*pgroP_His*; 4.5 kb 及び *pgeoFF_His*; 4.6 kb) を構築し、

これらプラスミドのプロモーター配列の下方に、高度好熱菌 *recJ* 遺伝子を挿入することで発現プラスミド (pgroP_His_ttrecJ; 6.1 kb 及び pgeoFF_His_ttrecJ; 4.6 kb) を作製した (図 3)。

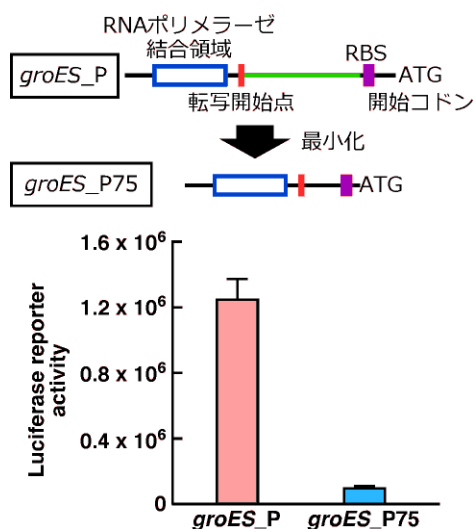


図 2. *groES_P* の改変及びプロモーター活性.

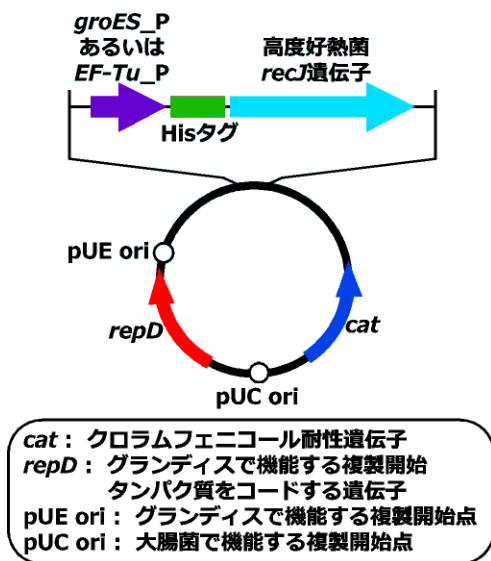


図 3. 高度好熱菌 *recJ* 遺伝子発現プラスミドの構造.

(4) 構築した発現プラスミドをグランディスに導入し、高度好熱菌 RecJ タンパク質の生産を試みた。その結果、従来の大腸菌を宿主とした発現系では、RecJ タンパク質が不溶化や分解が起こるが、グランディスを宿主として用いることで、不溶化することなく RecJ タンパク質の生産を確認することができた (図 4)。

(6) グランディスの *lon* 遺伝子破壊株 (XDGLN1) を用いて、RecJ タンパク質の生産

を確認したところ、RecJ タンパク質の分解の低減が見られ、宿主としての有用性を明らかにすることができた (図 4)。

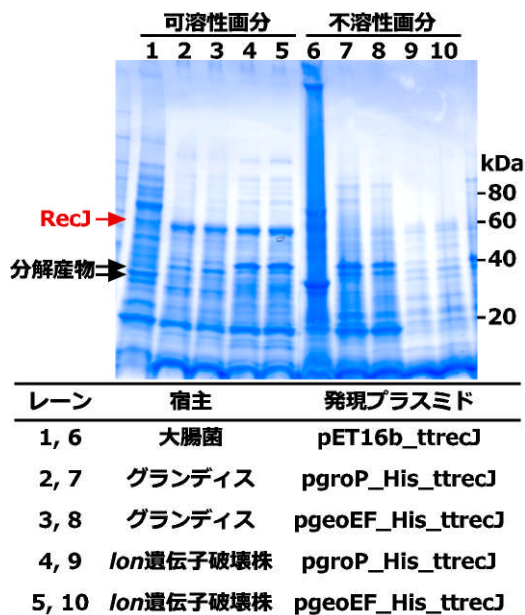


図 4. 高度好熱菌 RecJ タンパク質の生産.

(7) 今後は、さらなる高次のタンパク質生産に向けて、プロモーター配列の改変及び新規探索、あるいは発現誘導条件の検討が課題である。

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 5 件)

- ① Yinjie Yang, Takashi Itoh, Shin-ichi Yokobori, Haruo Shimada, Shiho Itahashi, Katsuya Satoh, Hirofumi Ohba, Issay Narumi, Akihiko Yamagishi, *Deinococcus aetherius* sp. nov., isolated from the stratosphere, International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 査読有, Vol. 60, No. 4, 2010, pp. 776-779
- ② Yinjie Yang, Takashi Itoh, Shin-ichi Yokobori, Shiho Itahashi, Haruo Shimada, Katsuya Satoh, Hirofumi Ohba, Issay Narumi, Akihiko Yamagishi, *Deinococcus aeri* sp. nov., isolated from the high atmosphere, International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 査読有, Vol. 59, No. 8, 2009, pp. 1862-1866
- ③ Katsuya Satoh, Zhenli Tu, Hirofumi

Ohba, Issay Narumi, Development of versatile shuttle vectors for *Deinococcus grandis*, Plasmid, 査読有, Vol. 62, No. 1, 2009, pp. 1-9

- ④ Hirofumi Ohba, Katsuya Satoh, Haitham Sghaier, Tadashi Yanagisawa, Issay Narumi, Identification of PprM: a modulator of the PprI-dependent DNA damage response in *Deinococcus radiodurans*, Extremophiles, 査読有, Vol. 13, No. 3, 2009, pp. 471-479

- ⑤ 大庭寛史、佐藤勝也、鳴海 一成、放射線抵抗性細菌の放射線耐性の謎に迫る、放射線と産業、査読無、Vol. 118、2008、pp. 50-53

[学会発表] (計 10 件)

- ① 佐藤勝也、放射線抵抗性細菌における新規遺伝子操作系の開発、第 10 回極限環境微生物学会年会、2009 年 10 月 28 日、東京
- ② 山田貢、放射線抵抗性細菌由来 DNA 修復促進タンパク質 PprA の構造機能解析、第 82 回日本生化学会大会、2009 年 10 月 21 日、神戸
- ③ 佐藤勝也、放射線抵抗性細菌のプラスミドを用いた新規遺伝子操作系の開発、第 4 回高崎量子応用研究シンポジウム、2009 年 10 月 9 日、高崎
- ④ 佐藤勝也、DNA 鎖切断の効率的検出法、第 8 回産学官連携推進会議、2009 年 6 月 20 日、京都
- ⑤ 大庭寛史、プロテオーム解析による新規 DNA 修復関連タンパク質の同定、第 31 回日本分子生物学会年会第 81 回日本生化学会大会合同大会、2008 年 12 月 10 日、神戸
- ⑥ 大庭寛史、放射線抵抗性細菌 *Deinococcus radiodurans* の放射線応答機構に関する新規タンパク質の発見、第 3 回高崎量子応用研究シンポジウム、2008 年 10 月 10 日、高崎
- ⑦ Katsuya Satoh, Role of RecF in radiation-induced DNA double-strand breaks repair pathway in *Deinococcus radiodurans*, The 7th International conference on

Extremophiles (Extremophiles 2008), 2008 年 9 月 9 日, Cape Town, South Africa

- ⑧ Hirofumi Ohba, Functional characterization of a novel modulator for radiation response mechanism in *Deinococcus radiodurans*, The 7th International conference on Extremophiles (Extremophiles 2008), 2008 年 9 月 9 日, Cape Town, South Africa

- ⑨ Issay Narumi, Three-dimensional architecture of the *Deinococcus radiodurans* PprA protein, The 7th International conference on Extremophiles (Extremophiles 2008), 2008 年 9 月 9 日, Cape Town, South Africa

- ⑩ 佐藤勝也、放射線抵抗性細菌の DNA 修復機構の研究、第 39 回 UV/EB 研究会、2008 年 9 月 24 日、大阪

[その他]

http://www.taka.jaea.go.jp/rab_div/grr/index_j.html

6. 研究組織

(1) 研究代表者

佐藤 勝也 (SATO KATSUYA)
独立行政法人 日本原子力研究開発機構
量子ビーム応用研究部門・研究員
研究者番号：90370402

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：