

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 8 月 19 日現在

機関番号：85301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26420805

研究課題名(和文)放線菌由来強発現プロモーターSCMPの機能解析とその応用

研究課題名(英文)Application and characterization of Streptomyces SCMPpromoter

研究代表者

畑中 唯史(HATANAKA, Tadashi)

岡山県農林水産総合センター生物科学研究所・その他部局等・専門研究員

研究者番号：00344408

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：SCMPプロモーター全長、前半領域、後半領域下流に、放線菌由来分泌型ロイシンアミノペプチダーゼを挿入した発現ベクターを作成し、*S. lividans* 1326株を宿主に用い、分泌されたアミノペプチダーゼ活性の変動を検討した。その結果、5'側には転写活性はなく、3'側63塩基対を用いた場合、大幅に発現量が増加することを見出した。また、この領域のみを用いると、培地成分の制限も解除されることが判明した。

研究成果の概要(英文)：To determine the essential region working as a promoter, I constructed expression vectors including a secreted leucine aminopeptidase gene from *Streptomyces* sp. under the SCMP promoter, which was identified a powerful promoter from *S. cinamoneus* TH-2. The vectors were containing of the first half, the last half, 63 bps from the 3' termini and 43 bps from the 3' termini of the SCMP promoter, respectively. By using *S. lividans* 1326 and above vectors, secreted aminopeptidase activities were compared. From the results, there is no working by using the first half of SCMP promoter. On the other hand, 63 bps from the 3' termini showed a strong activity. Moreover, it is possible to use various expression media when the region was used as a promoter.

研究分野：生化学

キーワード：放線菌 ストレプトマイセス プロモーター

1. 研究開始当初の背景

放線菌は、抗生物質をはじめとする、多種多様な二次代謝産物を生産し、産業上有用な微生物である。また、放線菌は、さまざまなタンパク質を菌体外に分泌することが知られ、タンパク質生産の有用宿主として、近年注目されつつある。しかしながら、放線菌 *Streptomyces* 属による有用タンパク質の菌体外発現に関する報告例は少ない。申請者は、従来から放線菌由来ペプチダーゼの研究を行ってきた。その中で、*S. cinnamonus* TH-2 株が、大量に金属プロテアーゼ (SCMP) を分泌することを見出した (T. Hatanaka et al., Arch. Biochem. Biophys. 434, 289-298 (2005))。SCMP は、培地中のリン酸塩の濃度、炭素源の種類および濃度によって、発現量が異なり、そのリン酸塩、炭素源を最適化した培地を PG 培地と名付けた。PG 培地を用いると、他の *Streptomyces* 属菌株も、SCMP と相同性の高い金属プロテアーゼを分泌した。リン酸、グルコースを豊富に含む培地で、放線菌を培養すると、プロテアーゼを分泌することは、古くから知られており (*S. Shirato et al., Appl. Microbiol.* 13(5), 669-672)。この現象は *Streptomyces* 属に共通な事象であると推測できる。この SCMP プロモーターを利用した酵素生産技術は、特許化され、共同研究先である民間企業により、2 種の酵素生産に応用されている。

申請者は、SCMP プロモーターによる放線菌用発現ベクター (pTONA5a) を構築し、SCMP 下流に、放線菌由来酵素遺伝子を挿入し、*S. lividans* を宿主に用い、発現を試みた。その結果、いくつかのものは分泌シグナルをもたないにも関わらず、大量に菌体外に分泌し、その発現は培養後期に盛んになった (T. Hatanaka et al., Protein Express. Purif. 62(2), 244-248 (2008))。この結果から、2 次代謝が盛んになる培養後期に、SCMP プロモーターは作動し、種々のペプチダーゼによって菌糸が溶解され、強制発現させたタンパク質が分泌することが示唆された。SCMP は、*S. griseus* において、2 次代謝のスイッチである転写因子 AdpA の支配下にある金属プロテアーゼ SgmA のホモログである (*J. Kato et al., J. Bacteriol.* 184(21), 6016-6025(2002))。SCMP プロモーターの配列を SgmA プロモーター配列と比較した結果、AdpA 結合様配列が SCMP プロモーター遺伝子には複数存在し、実際 AdpA が SCMP プロモーターの後半領域に結合することも確認済みである。この結果をもとに、発現ベクターに恒常発現型 AdpA 遺伝子をタンデムに挿入し、*S. lividans* を宿主とし、SCMP プロモーターによるタンパク質発現の時期・量的変化について検討したが、発現時期を早める、あるいは発現量を向上させることはできなかった。

2. 研究の目的

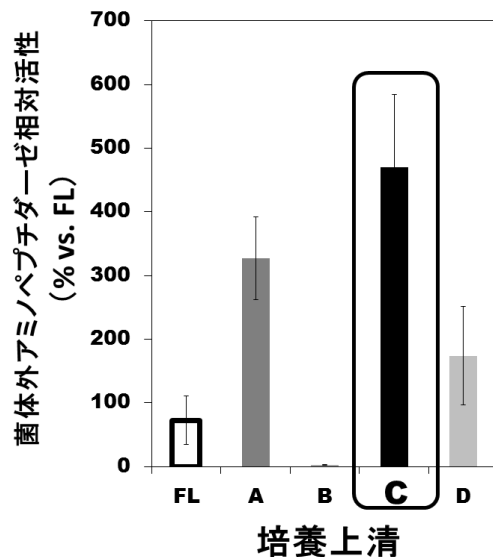
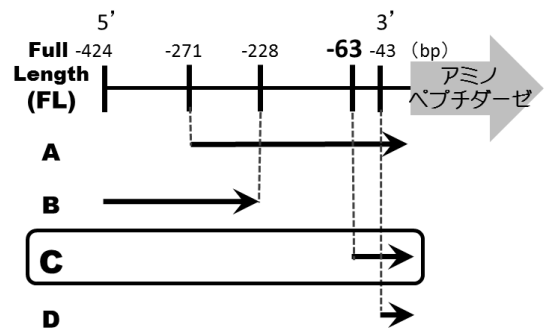
応用面で利用されつつある SCMP プロモーターではあるが、培養後期に発現が盛んになるため、培養時間が長いといった弱点がある。また、その発現に関わる培地条件、転写因子、分泌機構などの詳細は不明のままである。そこで、本研究の目的は、SCMP プロモーターの必須領域を特定した後、発現に関わる条件と因子を同定し、その知見を生かした発現系の構築である。

3. 研究の方法

SCMP プロモーターは、図に示すように約 420bp である。本課題では、SCMP プロモーター下流に、放線菌由来分泌型ロイシンアミノペプチダーゼを挿入した発現ベクターを作成し、*S. lividans* 1326 株を宿主に用い、アミノペプチダーゼ活性の変動を検討する。

4. 研究成果

SCMP プロモーター全長、前半領域、後半領域下流に、放線菌由来分泌型ロイシンアミノペプチダーゼを挿入した発現ベクターを作成し、*S. lividans* 1326 株を宿主に用い、分泌されたアミノペプチダーゼ活性の変動を検討した。その結果、5'側には転写活性はなく、3'側 63 塩基対 (図の C に相当) を用いた場合、大幅に発現量が増加することを見出した。また、この領域のみを用いると、培地成分の制限も解除されることが判明した。



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 4件)

Y. Kumagai, M. Uraji, K. Wan, M. Okuyama, A. Kimura and T. Hatanaka, Molecular insights into thermal stabilized mechanism in actinomycete mannanase, FEBS Lett., doi: 10.1002/1873-3468.12322

K. Wan, M. Uraji, J. Arima, T. Hatanaka, Characterization of a novel metalloprotease from *Streptomyces cinnamoneus* TH-2, Bioresour. Bioprocess. 3:21 1-8(2016)

Y. Kumagai, K. Yamashita, T. Tagami, M. Uraji, K. Wan, M. Okuyama, M. Yao, A. Kimura and T. Hatanaka, The loop structure of Actinomycete glycoside hydrolase family 5 mannanases governs the substrate recognition

M. Uraji, J. Arima, Y. Inoue, K. Harazono and T. Hatanaka, Application of two newly identified and characterized feruloyl esterases from *Streptomyces* sp. in the enzymatic production of ferulic acid from agricultural biomass, PLoS One 2014 Aug 5; 9(8): e104584 (2014)

〔学会発表〕(計 6件)

裏地美杉、湯野川春信、万クン、畑中唯史、次世代シーケンサーと網羅的発現解析手法 (HiCEP)法の組み合わせによる遺伝子発現データベースの構築、日本放線菌学会 2015年度(第30回)大会

裏地美杉、万クン、畑中唯史、放線菌メタロプロテアーゼプロモーターの解析、第67回日本生物工学会大会

裏地美杉、万クン、畑中唯史、放線菌メタロプロテアーゼ SCMP プロモーターの5'領域の欠失はタンパク質生産性の向上をもたらす、日本農芸化学会 2017年度大会

K. Wan, M. Uraji, T. Hatanaka, Sequence-based screening and characterization of secreted exopeptidases from *Streptomyces cinnamoneus* TH-2, Asian Congress on Biotechnology (ACB-2015), Kuala Lumpur

M. Uraji, I. Mori, N. Tamura, K. Wan, T. Hatanaka, Characterization of feruloyl esterase activity attached to methyl

esterase3 protein in Arabidopsis, Asian Congress on Biotechnology (ACB-2015), Kuala Lumpur

M. Uraji, I. H. Tamura, E. Mizohata, K. Wan, K. Ogawa, T. Inoue, T. Hatanaka, Relationship between enzyme activity and structure of *Streptomyces* feruloyl esterase, International Biotechnology Symposium (IBS) 2016, Melbourne

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 2件)

名称: 新規カルボキシペプチダーゼ
発明者: 原園幸一、畑中唯史、万クン
権利者: ナガセケムテックス(株)
種類: 特許
番号: 特許願 2015-119480
出願年月日: 2015年6月12日
国内外の別: 日本

名称: 新規アミノペプチダーゼ
発明者: 原園幸一、畑中唯史、万クン
権利者: ナガセケムテックス(株)
種類: 特許
番号: 特許願 2015-119481
出願年月日: 2015年6月12日
国内外の別: 日本

取得状況(計 0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
取得年月日:
国内外の別:

〔その他〕
ホームページ等

<http://www.pref.okayama.jp/soshiki/203/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

畑中 唯史 (HATANAKA Tadashi)
岡山県農林水産総合センター生物科学研究所・専門研究員

研究者番号: 00344408

(2) 研究分担者

該当なし ()

研究者番号:

(3)連携研究者
該当なし ()

研究者番号：

(4)研究協力者
該当なし ()