

研究課題名 低温での組換え蛋白質発現システムの研究開発

所属研究機関名 独立行政法人 産業技術総合研究所

研究者氏名 田村 具博

## 研究成果の概要

### 研究の趣旨・目的

ポストゲノムシーケンス時代を迎え、各種生物由来の遺伝子塩基配列決定に伴い、そこから得られる遺伝子情報を利用した未知蛋白質の機能と構造を解析することは今後益々重要になる。そのため標的蛋白質を大量に提供する基盤技術の確立が重要であるが、現状では蛋白質に応じて宿主 ベクター系を選択・利用しているのが実状である。それでも尚、既存のシステムでは生産できないタンパク質は少なくない。そこで多種・多様な蛋白質の生産要求に対応するためには、蛋白質生産系の多様化が必要になると考えられる。例えば、宿主細胞にとって特異的・非特異的に致命的ダメージを与える蛋白質の生産は、既存の生産システムを用いても容易ではない。考え得る理由の1つとしては、生産する標的蛋白質の機能発現のための至適温度と、組換え蛋白質発現に用いる宿主細胞の培養温度がほぼ重なっていることが考えられる。このことは、標的蛋白質の機能を抑制する条件下に、宿主細胞に対する細胞増殖阻害効果を軽減できればこれまで生産が困難であった蛋白質の大量生産が可能になる。そこで本研究では、低温から中温まで増殖可能な微生物を宿主として用い、既存のシステムでは提供困難な 4~10 度での低温温度下に生産する環境を提供するシステムの確立を目的とする。

この系が確立すれば、産業的利用価値が高いと予想される機能タンパク質などの中で、これまで宿主に対する細胞増殖阻害効果を示す蛋白質の大量生産が可能になると考えられる。その結果、付加価値の高い蛋白質の機能・構造解析が促進され、医薬・食品分野での新製品の開発等が期待できる。また、本研究で宿主細胞として用いる微生物内に機能蛋白質を過剰発現させた機能強化細胞を構築することで、バイオプロセスへの応用が可能になる。その結果、新規物質生産や汚染物質除去をはじめとする多様な応用が期待される。

### 研究計画の概要

実際の発現系構築に当たっては、低温環境下での組換え蛋白質発現系は、標的蛋白質の機能を抑制し宿主細胞に対するダメージを極力抑えることで大量生産を目指すシステムであるため、標的とする蛋白質が宿主細胞内に常に生産し続けることは好ましくない。このことは、構成的に蛋白質生産が行われると宿主細胞を増殖させることが出来ないことを意味する。従って、宿主細胞の増殖時には標的蛋白質の生産が行われずかつ宿主細胞の増殖に影響を及ぼさず、必要時に標的蛋白質の生産をオンにできる蛋白質生産の始動を制御できるようなシステムの構築が必要である。更に、本システムを用いることで蛋白質生産効率の至適化を培養条件の観点から検討すると共に、発現した蛋白質の回収率を上げるための宿主細胞の機能改変を進めることが重要であると考えられる。本研究では、低温から中温まで増殖可能な放線菌の一種 *Rhodococcus erythropolis* を宿主として選択し、以下の2点について研究開発を進める。

(1)発現ベクターの構築:*R. erythropolis* 細胞由来の内在性環状プラスミドを検索し、大腸菌でも自律増殖可能なシャトルベクターに改変する。その後、蛋白質発現制御可能なプロモーターを検索しレポーター遺伝子を用いてその発現条件や発現量などについて検討する。更に、蛋白質生産効率を上げるためのベクターの改良を進めると共に、多様な遺伝子を発現可能にするための遺伝挿入部位の改変を行い、利便性の高いベクターの開発を行う。

(2)低温環境下での組換え蛋白質発現:大腸菌では生産が困難な既知の蛋白質について、本研究で開発した宿主 ベクター系での生産効率を確認する。同時に、大腸菌では生産困難な動物由来蛋白質のスクリーニングを行い、得られた蛋白質群についてもその生産性について検討する。更に、*R. erythropolis* 細胞に紫外線で点変異を導入した母集団の中からリゾチーム感受性変異株の取得を目指し、該変異株を用いて組換え蛋白質精製効率の検討を行う。

・研究計画の詳細報告

(単位：百万円)

研究項目	所要経費					合計
	12年度	13年度	14年度			
1. 発現ベクターの構築						
(1) R. erythropolis-大腸菌シャトルベクターの構築	←→					10.0
	10.0					10.0
(2) 発現ベクターに用いるプロモーターの検索	←→	←→				8.6
	4.6	4.0				8.6
(3) 発現ベクターの構築と蛋白質発現条件の最適化		←→	←→			7.0
		3.5	3.5			7.0
2. 低温環境下での組換え蛋白質発現						
(1) 低温特異的に発現可能な蛋白質の検索		←→	←→			10.3
		5.3	5.0			10.3
(2) 組換え蛋白質生産の効率化と宿主細胞の機能改変		←→	←→			8.5
		4.0	4.5			8.5
所要経費(合計) (管理費を含む)	14.6	16.8	13.0			44.4

## 研究成果の概要

### 研究成果の概要

本研究により、*Rhodococcus erythropolis*を宿主とした組換え蛋白質生産システムを開発した。構築した発現ベクターは、単離した複製開始起点の異なる2種のベクターを基本に構築し、両ベクター種共に*R. erythropolis*細胞内での組換え蛋白質生産を可能にした。また、本発現システムと最も汎用されている大腸菌を宿主とした系との組換え蛋白質生産性の比較から、本発現システムには明らかに大腸菌より有意な点がいくつか確認された。

本研究による主な成果を以下箇条書きに記す。

- 1 *R. erythropolis*を宿主とした誘導型、構成型発現ベクターを構築した(最終的に、抗生剤耐性マーカーや遺伝子導入部位を異にした計16種類のベクターを構築)。
- 2 本システムを用いることで、4~35度の範囲内で組換え蛋白質を生産することが可能になり、既存のシステムでは困難な10度以下での組換え蛋白質生産が可能になった。
- 3 *R. erythropolis*細胞を宿主として用いることで、大腸菌では生産困難な蛋白質の生産が可能になるケースが確認された。
- 4 不和合性を示さない異なる複製開始起点をもつ発現ベクターを用いることにより、同一細胞内に2種のベクター由来蛋白質の共生産が可能になった。
- 5 *R. erythropolis*細胞がリゾチーム感受性になる変異株を単離し、組換え蛋白質の回収率を著しく高めた。

以上の成果により、国内特許3件出願し、現在2件については国際特許出願を行う予定になっている。また、学会発表後、新聞社より取材を受け、研究内容が紙面で紹介された。

### 波及効果、発展方向、改善点

本研究で開発したシステムを使用することで、大きく2つの展開が図れると予想される。ひとつは、組換え蛋白質生産システムとしての利用。もう一点は、*R. erythropolis*細胞を用いた、バイオプロセスへの利用である。

組換え蛋白質生産については、ポストゲノムシークエンス時代を迎え、蛋白質の構造と機能解析が益々重要になっており、蛋白質供給手段としての基盤技術となる組換え蛋白質生産技術は今後益々重要になると考えられる。また、生産する蛋白質の多様化に伴い、生産系の多様化も進めていく必要があり、本研究で開発した*R. erythropolis*を宿主とした組換え蛋白質生産系はまさに、大腸菌とは異なる特徴を持つ生産系として利用可能である。今後の改善点としては、蛋白質生産能を更に上げるための研究開発と、細胞内に生産した蛋白質の安定性を高める系の開発を進めていく必要があると考えられる。

バイオプロセスの観点から考えると、ロドコッカス属細菌は有機溶媒耐性を持ち、強い酸化還元能を有していることから、次世代宿主微生物候補としてNEDOのプロジェクトとして平成14年度から、宿主ベクター系の開発が開始されている状況である。このことから、*R. erythropolis*細胞内に機能蛋白質を生産した機能強化細胞を構築して、物質生産や物質除去を含めたあらゆるバイオプロセスへの利用が可能になると考えられる。しかし一方では、*R. erythropolis*細胞を用いることでどのようなプロセスが出来るのかと言う点について情報が少なく、企業等と連携を取りながら応用研究をいかに推進していかかが今後の課題になると考えられる。

## . 研究成果の公表等の状況

### (1) 研究発表件数

	原著論文による発表	左記以外の誌上発表	口頭発表	合 計
国 内	0 件	0 件	3 件	3 件
国 際	0 件	0 件	0 件	0 件
合 計	0 件	0 件	0 件	3 件

### (2) 特許等出願件数

合計 3 件 (うち国内 3 件、国外 0 件)

国内出願した 3 件の内、2 件について国外出願準備中

### (3) 受賞等

0 件 (うち国内 0 件、国外 0 件)

### (4) 主な原著論文による発表の内訳

国外誌

1 報 投稿中、

2 報 準備中

### (5) 主要雑誌への研究成果発表

Journal	Impact Factor
投稿中または準備中	

# 低温での組換え蛋白質発現システムの研究開発

