

タイトル： 工業的放線菌の誘導発現システムの開発

申請者： 小林 達彦、 橋本 義輝、 東端 啓貴、 戸来 幸男

所属機関： 筑波大学大学院 生命環境科学研究科

-----

## 1. はじめに

現在、*Streptomyces* 属放線菌は、抗生物質や免疫抑制剤に代表される医薬品・医薬品中間体をはじめ様々な有用物質の実生産菌として世界中で広く利用されており、放線菌の産出する生理活性物質や酵素を工業利用する市場規模は極めて大きい<sup>1)</sup>。しかしながら、工業的に利用される様々な種類の放線菌株の改良プログラムの大部分は旧態依然のままである。すなわち、各種突然変異剤とスクリーニングを繰り返すという古典的な方法に依存し、(染色体への相同組換え、あるいは、多コピーベクターとしての遺伝子導入などの)遺伝子組換え操作による放線菌株改良は限られているのが現状である。これは、(放線菌に顕著に見られる制限修飾系や形質転換効率の悪さといった)未だに育種や組換え遺伝子操作の系が確立されていない菌株が多いことが原因である。一方、ゲノム解析時代の中、*Streptomyces* 属放線菌においても最近、初めて染色体ゲノム配列が決定され<sup>2,3)</sup>、ゲノム情報を利用した新規生理活性物質生産研究が今後、行われることが期待される時代になってきた。*Streptomyces* 属でしか発現しない産業用酵素・タンパク質も現に存在し、その内の一部(P-450等)は重要な医薬・農薬の合成に関わる。本属での有用生理活性物質や有用タンパク質生産の重要性を鑑み、*Streptomyces* 属放線菌において発現が制御可能な誘導型の高発現系の開発が現在、急務の課題となっている。

ポストゲノム時代、如何にして遺伝情報・遺伝子資源を有用物質およびタンパク質生産につなげるかが産業上、重要であり、そのためにはツールとなり得る発現系が必要不可欠である。しかしながら、大腸菌など極く一部の微生物を対象とした遺伝子発現系がこれまでに開発されているものの、これらの系で実際に(活性のある形で)発現するタンパク質は限られているのが現状である。遺伝子発現系の開発研究は、ある意味、地道で時間がかかり困難を伴うものであるが、(本稿の最後でも触れるが)*Streptomyces* 属放線菌による新規生理活性物質生産研究が今後も益々行われることが強く期待されることから、我々は*Streptomyces* 属における誘導型遺伝子高発現システムの開発に取り組み、世界に先駆け、これに成功したので、本稿で報告する。併せて、本システムの将来性および展望についても述べたい。

## 2. 研究の背景

ニトリルは  $R-C\equiv N$  の構造式を持つ化合物であり、シアノ基を有するが為に一般的に高い毒性を示す。しかしながら、ニトリルは、各種有用化合物生産の出発物質あるいは中間原料として広く使用されており、化学工業上、有用な物質である。我々はこれまで、これらニトリル関連化合物の様々な微生物の代謝を基礎および応用の観点から研究を行ってきた<sup>4)</sup>。特に、放線菌 *Rhodococcus rhodochrous* J1 菌によるニトリル化合物の分解代謝を研究中、イソバレロニトリルを誘導剤として培地に添加した場合、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動上、ニトリラーゼ(ニトリルを酸とアンモニアに分解する酵素)が菌体内の全可溶性タンパク質の 35%以上占める程、大量生産される現象を発見した<sup>5)</sup>。その後、本酵素の構造遺伝子をクローン化し<sup>6)</sup>、分子レベルでの構造・機能解析を行うとともに、放線菌としての *R. rhodochrous* J1 菌の遺伝子構造について解析を進めてきた。

また、*Rhodococcus* 属は今日、難分解性化合物の分解能が高く、かつ、有用物質生産能が高い微生物として知られ、本属を対象とした基礎および応用研究が世界中で広く行われるようになってきているが、我々は初期の頃から世界に先駆けて、放線菌としての *Rhodococcus* 属を対象とした研究を鋭意に行ってきた。

## 3. 強力遺伝子プロモーターの発見

*R. rhodochrous* J1 菌のニトリラーゼを対象とし、本酵素構造遺伝子近傍を詳細に解析した結果、ニトリラーゼの構造遺伝子 (*nitA*) の直ぐ下流に存在する遺伝子が (*nitA* の発現を正に調節する) 制御遺伝子 (*nitR*) であることを同定するとともに、*nitA* の開始コドン ATG より 26 塩基上流から転写が開始することを明らかにし本酵素遺伝子プロモーター領域を特定することに成功した(本プロモーターの特定は *Rhodococcus* 属のプロモーターにおける世界で最初の同定である)。

「種の壁」という言葉があるように、種（属）が異なると遺伝子発現系が働かないと思われがちであり、これまで、*Streptomyces* 属以外の（全ての微）生物の遺伝子発現調節機構を試してみよう、あるいは、働かせようという研究は全くなかった。上記のように、ポストゲノム時代の、*Streptomyces* 属における遺伝子発現のニーズを鑑み、我々は「種取り込み、全く新しいタイプ系を開発する実験に着手した。具体的には、*nitR* と *nitA* を *Streptomyces* 属用プロモーターとして、得られたプラスミド（pSH10）を（プロトプラスト法を用いた形質転換法によって）*S. lividans* に導入後（図1）、形質転換体のニトリラーゼ活性を高速液体クロマトグラフィーを用いて測定した。

### 図1 ニトリラーゼ遺伝子周辺領域の切縮め実験

その結果、基質として用いたベンゾニトリルが本酵素反応によって（反応生成物である）安息香酸へと変換される顕著な活性が認められたことから、*Rhodococcus* 属の誘導型発現調節機構が

*Streptomyces* 属においても強気に働くことが初めて明らかになった<sup>8)</sup>。*Rhodococcus* 属の遺伝子発現機構が *Streptomyces* 属でも機能することを発見できたことで、次に述べる *Streptomyces* 属における誘導型遺伝子発現システムの構築を行うことが可能となった。

## 4. *Streptomyces* 属における発現系の開発

### 4.1 発現ベクターの構築

*Streptomyces* 属における実用的な遺伝子発現ベクターを開発する上で、ベクターサイズを小さくすることが望ましいことから、ニトリラーゼ発現調節に必要とされる最小領域の決定を試みた。種々のDNA断片欠失実験(図1)および*Streptomyces*属放線菌体内での発現を(酵素活性測定およびSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動による解析で)検討した結果(図2)ニトリラーゼ遺伝子プロモーター(*PnitA*)・転写調節タンパク質(*NitR*)・誘導剤という3つのシンプルな構成要素のみで本誘導発現系(図3)が機能することが明らかとなった。次に、得られた結果を基に、ニトリラーゼ誘導発現系を用いた新規遺伝子発現系(*PnitA-NitR*)を保持する高発現ベクター-pSH19(図4)の構築を試みた<sup>8)</sup>。

2  
種  
質  
換  
の

図  
各  
形  
転  
体

Streptomyces  
nitR  
PnitA  
pSH19

SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動  
による解析および活性測定

QuaTm9 F  
TATA TAA TTTGAGGCGCA  
C\*CGAGGEECC\*APED C\*GC CGAGC C AB

誘導発  
機構お  
発現系  
な3つ

図 3  
現調節  
よび本  
に必要な  
の因子

QuaTm9 F  
TATA TAA TTTGAGGCGCA  
C\*CGAGGEECC\*APED C\*GC CGAGC C AB

#### 図 4 *Streptomyces*属放線菌用新規発現ベクター

本発現系はマルチクローニングサイトおよび*nitR*遺伝子のすぐ上流に*PnitA*を、また上流からの転写のリードスルーを防ぐために*PnitA*の上流にはターミネーターを配置した。本ベクター系を利用した発現系では、誘導物質を添加することにより転写活性化タンパク質 NitR が

QuaTm9 F  
TATA TAA TTTGAGGCGCA  
C\*CGAGGEECC\*APED C\*GC CGAGC C AB

目的タンパク質の発現を顕著に促進するだけでなく、NitR自身の発現も促進し、そこに再び誘導物質が作用することで、目的タンパク質の自己増幅的な発現が期待できる（図5）。

図5 発現ベクターのマルチクローニングサイト周辺構造

マルチクローニングサイトには9種の制限酵素サイトを設け、両方向が使用できるように利便性を計って設計した。コピー数は300に及ぶ高copy型であり、また、安定性は薬剤選択をかけない場合、20世代の培養によっても67.4%が保持され、一方、薬剤選択圧下では100%が保持され極めて安定なベクターであった。

おける大量使用においても実用的な誘導剤であると言える。

#### 4.2 発現ベクターの機能性

本発現ベクターが実際に機能し得るかを確認するため、実際に様々な遺伝子をマルチクローニングサイトに導入し、対応するタンパク質の発現を検討した。ここでは、*Pseudomonas* 由来の(イソニトリル化合物を分解する)イソニトリルヒドラーゼ<sup>9)</sup>、そしてカテコール 2,3-ジオキシゲナーゼ<sup>10)</sup>、そして *N*-置換ホルムアミドデフォルミラーゼ<sup>11,12)</sup>の実験結果を記載させていただくが、イソニトリルヒドラーゼについてはイソニトリルから *N*-置換ホルムアミドに変換する活性を測定し、カテコール 2,3-ジオキシゲナーゼについてはカテコールから 2-ヒドロキシムコニックセミアルデヒドへの変換活性を測定し、また、*N*-置換ホルムアミドからアミンへの変換活性を測定した。その結果、二つのおいても誘導剤の添加により発現が引き起こされ、本発現ベクターが実際に機能することた(図6)。しかも、SDS-ポリア

クリルアミドゲル電気泳動上による解析の結果、全可溶性タンパク質の 40%にもおよぶ著量な発現量を示し、本発現ベクターの有用性が確認された。

## 図 6 各酵素発現の SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動による解析および活性測定

以上の結果は *S. lividans* を宿主としたものであることから、続いて、他の種の *Streptomyces* においても本発現系が機能するかを検討した。各発現プラスミドを種々の *Streptomyces* 属に導入し、得られた形質転換体に対する酵素活性測定および SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動による解析の結果、最近、全ゲノムが決定された 2 種の *Streptomyces*、すなわち、*S. coelicolor*<sup>2)</sup> や *S. avermitilis*<sup>3)</sup>、そして *S. griseus* など幅広い宿主で著量の誘導発現が起こり、この系の汎用性が確認された(図 7)。特に、*S. avermitilis* は現在、(人の寄生虫感染症や家畜の駆虫に使われている)エバームクチン(家畜薬として世界で毎年 1500 億円以上売れている)を工業的に生産する放線菌であり、染色体ゲノムの全塩基配列が決定されたことから現在、北里大では

有用遺伝源を持つ  
よび有用としてさ  
鋭意に研  
進められ  
る。

子資  
菌お  
宿主  
らに  
究が  
てい

## 図7 *Streptomyces* 属の各種放線菌における発現の SDS- ポリアクリルアミドゲル電気泳動による解析

### 5. 誘導発現システムの利用と展望

大腸菌を宿主とした誘導型遺伝子発現系は幾つか知られているが、我々が知る限り、大腸菌以外の微生物において、今回我々が開発したシステムほど実用的な誘導型高度発現系は無い。本システムは、誘導剤の培地への添加の有無で、遺伝子の発現制御のOn/Offが利く画期的かつオリジナルな系である。従って、発現させたい時期に、菌体内に大量の目的タンパク質・酵素を誘導的に生産させることが可能であり、また、それらによって対応する各種生理活性物質が著量に生産され得る。一般的に、生理活性物質のような二次代謝産物は菌の培養後期（定常期）に生産されることが多く、培養の最初から構成的に遺伝子を発現させることは必ずしも生理活性物質生産上、好ましいものではなく、この意味においても、我々の誘導発現システムは有効である。*Streptomyces*属での本システムは、（生理活性物質を含む）各種有用物質や有用酵素（放線菌のP-450等）の生産開発を行う上でブレークスルーとなる世界に先駆けた新規の基盤技術であり、国内外の産業界から高い評価を得ている。

遺伝子発現系はできれば様々なタイプを取りそろえておくことが望ましく、ユーザーの目的とする遺伝子によってはタンパク質発現量や生理活性物質生産量等が変わることもあり得る。従って、我々は、今回開発した誘導発現システムとは別のタイプの発現システムの構築にも新たに取りかかっている。*R. rhodochrous* J1菌のニトリル代謝研究を行っていた過程で、培地にコバルトを添加した場合、ニトリラーゼによるニトリル分解経路とは全く異なるニトリル分解様式を本株が示すことを以前、我々は発見した<sup>5)</sup>。すなわち、培地にコバルトを添加することによって、本菌のニトリル代謝ががらりと変わり、別の酵素であるニトリルヒドラターゼ（ニトリルをアミドに分解する酵素）活性が出現する現象を認めた。その後、本菌は、コバルト存在下で誘導剤として尿素を用いた場合、ニトリルヒドラターゼが菌体内全可溶性タンパク質の50%以上生成することが判明し、現在、本酵素によって（アクリロニトリルからの）アクリルアミドの工業生産が



行われるに至っている。また、本酵素による(3-シアノピリジンからの)ニコチンアミドの工業生産も稼働している。産業酵素であるニトリルヒドラターゼにおいても、これ程までに大量にしかも誘導的に酵素が菌体内に生成されることから、我々は本酵素の発現調節機構を解明し、その機構および本酵素遺伝子プロモーターを利用することで、(ニトリラーゼ遺伝子プロモーターを利用した誘導発現システム開発と同様に)誘導型高度遺伝子発現システムを開発できるのではないかと考え、現在、研究を進めている。既に、構成的な大量発現系の構築に成功しており、現在、誘導機能を付与できるかどうか検討を行っているところである。

一方、近年、Metabolic engineering(代謝工学)の手法により、代謝経路中の特定の酵素の発現を調節し、目的産物の生産促進を行う有用微生物の育種改良が行われつつある。代謝工学の中でも、近年、有機化学合成分野のコンビナトリアル・ケミストリーのような“組み合わせの合成”を微生物細胞内で行うコンビナトリアル・バイオシンセシス研究<sup>13,14)</sup>が盛んになってきている(図8)。

© 2013 CMC  
CMC, INC. All rights reserved.  
CMC, INC. All rights reserved. CMC, INC. All rights reserved.

## 図8 二次代謝産物生合成遺伝子のコンビナトリアル生合成への利用

(初発のA1、A2の物質に対し、縮合酵素が作用した物質をB1、作用しなかった物質をB2と表し、以下同様に、酵素が作用した物質を1、作用しなかった物質を2で表すと、最終的には指数関数的に膨大な種類の新規な反応産物が得られる)

(抗生物質や免疫抑制作用を持つ生理活性物質の生合成経路を有し、それらを生産する)放線菌は、本来保有している種々の(生合成)段階から成る生合成経路を組み換える、あるいは、組み合わせるコンビナトリアル・バイオシンセシスに最適な微生物であり、この手法によって、合成された様々な非天然の類似化合物の中から新規な生理活性物質のスクリーニングが可能である。しかしながら現在、本手法によって膨大な数の新規化合物が合成されるようになっている(図9)にも関わらず、菌体内におけるその生成量は微量なため、(様々な生理活性の有無を調べる)アッセイに供給できる量が確保できていないのが現状である。今回、我々が開発した *Streptomyces* 属における遺伝子発現システムを利用することでこれら微量の生理活性物質を初めて大量に合成できる可能性が出、医薬品等の新しい用途開発への道を切り開くものと強く期待される。

Copyright © 2014, All Rights Reserved. Daiichi Sankyo Co., Ltd.

## 図9 コンビナトリ から得られる未知の生理活性物質探索源

アル生合成か

我々はさらに、今回開発したプラスミド型発現系(図10)にとどまらず、染色体ゲノム組み込み型の発現系の開発をも目指しており、ここにその新規な系の概要を提案したい。すなわち、今回開発した「ニトリラーゼ遺伝子プロモーター(*PnitA*)・転写調節タンパク質(*NitR*)・誘導剤」という3つのシンプルな構成要素のみから構成される誘導発現システム(図3)を一つのユニットととらえることで、本ユニットを直接、*Streptomyces* 属放線菌染色体ゲノムに組み込み、その機能を発揮させることで、染色体ゲノムの有用遺伝子を強力に発現させ、それによって各種生理活性物質を大量生産させようと考えている。具体的には、*Streptomyces* 属放線菌染色体ゲノム上にあるが、弱い遺伝子プロモーターあるいは潜在性遺伝子プロモーター領域を、上記の我々の誘導発現システムユニット(を導入すること)で置き換えることによって、(対応するプロモーターの下流に存在する)有用遺伝子の発現を強力に行わせようとするものである(図11)。生理活性物質生合成に關与する各種酵素遺伝子は群(クラスター)を形成している場合があり、従



心より感謝致します。

< 引用文献 >

- 1) A.L. Demain, and A. Fang: *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* **69**, 1-39 (2000)
- 2) H. Ikeda, J. Ishikawa, A. Hanamoto, M. Shinose, H. Kikuchi, T. Shiba, Y. Sakaki, M. Hattori, and S. Omura: *Nature Biotechnol.*, **21**, 526-531 (2003)
- 3) S.D. Bentley, K.F. Chater, A.M. Cerdeno-Tarraga, G.L. Challis, N.R. Thomson, K.D. James, D.E. Harris, M.A. Quail, H. Kieser, *et al.* : *Nature*, **417**, 141-147 (2002)
- 4) M. Kobayashi, and S. Shimizu: *Nature Biotechnol.*, **16**, 733-736 (1998)
- 5) M. Kobayashi, T. Nagasawa, and H. Yamada: *Trends Biotechnol.*, **10**, 402-408 (1992)
- 6) M. Kobayashi, H. Komeda, N. Yanaka, T. Nagasawa, and H. Yamada: *J. Biol. Chem.*, **267**, 20746-20751 (1992)
- 7) H. Komeda, Y. Hori, M. Kobayashi, and S. Shimizu: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **93**, 10572-10577 (1996)
- 8) S. Herai, Y. Hashimoto, H. Higashibata, H. Maseda, H. Ikeda, S. Omura, and M. Kobayashi: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **101**, 14031-14035 (2004)
- 9) M. Goda, Y. Hashimoto, M. Takase, S. Herai, Y. Iwahara, H. Higashibata, and M. Kobayashi: *J. Biol. Chem.*, **277**, 45860-45865 (2002)
- 10) C. Nakai, H. Kagamiyama, M. Nozaki, T. Nakazawa, S. Inoue, Y. Ebina, and A. Nakazawa: *J. Biol. Chem.*, **258**, 2923-2928 (1983)
- 11) H. Fukatsu, Y. Hashimoto, M. Goda, H. Higashibata, and M. Kobayashi: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **101**, 13726-13731 (2004)
- 12) H. Fukatsu, S. Herai, Y. Hashimoto, H. Maseda, H. Higashibata, and M. Kobayashi: *Protein Expr. Purif.*, **40**, 212-219 (2005)
- 13) D. Cane, C.T. Walsh, and C. Khosla: *Science*, **282**, 63-68 (1998)
- 14) 池田治生、大村 智: 蛋白質核酸酵素, **43**, 1265-1277 (1998)