

氏名	三宅良磨
学位(専攻分野)	博士(農学)
学位記番号	農博第1669号
学位授与の日付	平成20年1月23日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
研究科・専攻	農学研究科応用生命科学専攻
学位論文題目	Construction of Protein Expression System by Using a Cold-adapted Bacterium, <i>Shewanella livingstonensis</i> Ac10, as a Host (低温菌 <i>Shewanella livingstonensis</i> Ac10 を宿主としたタンパク質生産系の開発)
論文調査委員	(主査) 教授 江崎信芳 教授 喜多恵子 教授 植田充美

### 論文内容の要旨

タンパク質の構造や機能を解析し、それらの応用開発を図る上で、目的とするタンパク質を高生産する手法の開発はきわめて重要である。これまでに大腸菌、酵母、動物細胞など、さまざまな生物を宿主としたタンパク質生産系が開発されてきた。しかしながら、従来の手法では高生産が困難なタンパク質も多い。従来の手法には見られない新しい特徴を備えたタンパク質生産系の開発が期待されており、低温菌を宿主とした生産系はそのような手法の一つとして注目される。低温菌が良好に生育する低温域ではタンパク質の熱変性が抑制され、またタンパク質の活性を抑制した状態での生産が可能であるため、熱安定性の低いタンパク質や、常温ではその活性により宿主細胞に毒性を与えるタンパク質の生産を効率的に行えるものと期待される。このような観点から本研究は低温菌 *Shewanella livingstonensis* Ac10 を宿主としたタンパク質生産系の開発を行ったものであり、その成果は以下のように要約される。

1. *S. livingstonensis* Ac10 のプロテオーム解析で同定された低温誘導性タンパク質20種と、いずれの温度でも生産量の多い2種のタンパク質、ならびに低温適応に関連があると推察される5種のタンパク質をコードする遺伝子上流域についてプロモーター活性を評価した。それぞれのDNA断片の下流に *Escherichia coli* 由来  $\beta$ -ラクタマーゼ遺伝子をレポーターとして連結し、広宿主域ベクター pJRD215 を用いて *S. livingstonensis* Ac10 に導入した。4℃と18℃におけるレポーター遺伝子の発現レベルを調べ、高い活性を示す3種のプロモーター LI3, AP2, OP4 を見いだした。これらはそれぞれペルオキシレドキシシン、熱ショックタンパク質、低温ショックタンパク質のホモログのプロモーターであった。各生育段階におけるレポータータンパク質の生産量を調べた結果、LI3を用いた場合、他のプロモーターを用いた場合と比較して最大の生産量が得られることを見いだした。本プロモーターには定常期シグマ因子の結合部位と考えられる配列が含まれ、実際にLI3の制御下におくことで外来タンパク質の生産量が定常期で最大になることを示した。

2. *S. livingstonensis* Ac10 を宿主とし、LI3プロモーターを用いて4℃と18℃で *E. coli* 由来の  $\beta$ -ラクタマーゼと  $\beta$ -ガラクトシダーゼを生産した。定常期後期まで培養することにより、4℃において培養液1リットルあたりそれぞれ91mgと42mg、18℃においてそれぞれ139mgと142mgのタンパク質が得られた。さらに、生産されたタンパク質の純度を上げる手法の一つとして、宿主タンパク質の熱処理による変性除去を検討した結果、40℃、30分間という比較的穏和な熱処理によって細胞抽出液中の  $\beta$ -ラクタマーゼの比活性を1.6倍上昇させることに成功した。一方、*S. livingstonensis* Ac10 を宿主とし、LI3プロモーターを用いて低温菌 *Desulfotalea psychrophila* 由来のペプチダーゼ (PepF, LAP, PepQ)、およびグルコシダーゼ (BglA) を生産した。4℃と18℃で培養を行い、4種のタンパク質がいずれも可溶性画分に発現することを示した。特にPepFとPepQの可溶性画分における生産量は、培養液1リットルあたり18℃においてそれぞれ48mgと28mgであり、T7プロモーターを用いた *E. coli* の発現系を用いた場合よりも生産量が多かった。

3.  $\beta$ -タマーゼ遺伝子をレポーターとしたプロモーター探索用ベクターに *S. livingstonensis* Ac10 のゲノムDNA断片を挿

入し、ライブラリーを構築した。これを *S. livingstonensis* Ac10 に導入し、4℃でβ-ラクタマーゼ活性の高いクローンを選抜した。これらに含まれるプロモーターが本菌のゲノム上で占める位置を全ゲノム配列情報に基づいて明らかにし、それらの下流にある遺伝子の転写量をリアルタイム RT-PCR で解析した。これにより、低温で転写レベルが増加する13種の遺伝子 (*fusA*, *proS*, *dksA*, *sirB*, *suhB*, *fadL*, *acnB*, *hcp*, ならびに5種の機能未知遺伝子) を見いだした。

4. *S. livingstonensis* Ac10の低温での生育に重要な因子を解析した。トランスポゾン変異導入によって低温感受性となった株を分離し、トランスポゾンの挿入箇所を解析した。その結果、細胞外多糖合成遺伝子クラスター中のグリコシルトランスフェラーゼをコードする *wcaJ* 遺伝子上流にトランスポゾンが挿入されていることを見だし、*wcaJ* が低温での生育に重要な役割を果たすことが示唆された。

## 論文審査の結果の要旨

遺伝子組換え細胞を用いた外来タンパク質生産系は、タンパク質の構造・機能解析や応用開発に大きく寄与している。これまで、外来タンパク質を高生産するための種々の手法が開発されてきたが、これらを用いてもなお高生産が困難なタンパク質が多い。本研究は、熱安定性の低いタンパク質などの生産に有用な、低温菌を宿主とした新しいタンパク質生産系を開発したものであり、評価すべき点は以下の通りである。

1. *S. livingstonensis* Ac10において低温誘導性や高生産性が認められるタンパク質を解析するとともに、これらのタンパク質遺伝子のプロモーター活性をレポーターアッセイ系を用いて評価した。特に高活性を示した3種のプロモーターについて解析を進め、宿主の生育温度や生育段階と、発現量の関係を詳細に解析した。また、シグマ因子の結合部位や転写開始点の解析を行い、各プロモーターの特性を明らかにした。外来タンパク質高生産の鍵となる強力なプロモーターの取得に成功したことは高く評価できる。

2. 新たに取得したプロモーターを用い、*S. livingstonensis* Ac10を宿主としたシステムで、*E. coli* 由来の2種のタンパク質を高生産することに成功した。さらに、穏和な条件下で宿主細胞由来のタンパク質を変性除去し、外来タンパク質の純度をあげることに成功した。低温菌である宿主に由来するタンパク質の多くが、常温菌由来のタンパク質よりも不安定であることを巧みに利用した方法であり、簡便に目的タンパク質の純度を向上させる方法として注目に値する。また、本生産系を用いることにより低温菌 *D. psychrophila* 由来の熱安定性の低いタンパク質を高生産することにも成功した。最も強力な生産系の一つとみなされている *E. coli* を宿主とする T7プロモーター系を上回る生産量が得られたことは特筆に値する。

3. プロモーター探索ベクターを用いることにより、13種の低温誘導性プロモーターを得た。低温培養することで発現制御できる新しい生産系として幅広い応用面が期待され、意義深い成果といえる。

4. トランスポゾンを用いたランダム変異によって低温感受性変異株を取得し、その結果、*S. livingstonensis* Ac10の低温適応に関与する遺伝子を見いだした。宿主細胞の改良に道をひらく意義深い成果といえる。

以上のように本論文は、外来タンパク質生産の宿主として低温菌を用いる系を開発し、熱安定性の低いタンパク質の高生産などに適用できることを明らかにしたものであり、応用微生物学、分子微生物学に寄与するところが大きい。

よって、本論文は博士（農学）の学位論文として価値あるものと認める。

なお、平成19年11月8日、論文並びにそれに関連した分野にわたり試問した結果、博士（農学）の学位を授与される学力が十分あるものと認めた。