

最先端・次世代研究開発支援プログラム
事後評価書

研究課題名	放線菌を利用した実用レベルの有用物質生産基盤技術の開発
研究機関・部局・職名	筑波大学・生命環境系・准教授
氏名	橋本 義輝

【研究目的】

本補助事業担当者らが開発した、*Streptomyces* 属放線菌や *Rhodococcus* 属放線菌で機能する誘導型高発現ベクターは、放線菌の育種改良に実用レベルで利用可能な新規基盤技術として注目されている。しかし、放線菌を宿主とした(誘導剤を必要としない)構成型高発現ベクターや、(目的タンパク質を菌体外へ大量に分泌させ、分離・精製を容易にする)分泌型高発現ベクターを開発し、有用物質生産技術シリーズとして手元に揃えておくことが「もの作り(グリーンバイオ)」の観点から産業界で切望されている。また、有用な抗生物質・生理活性物質を生産する放線菌は多種分離されており、形質転換系が開発されていない株も数多く存在するため、これらの株に利用可能な形質転換に関係する基盤技術も熱望されている。

本研究では、有用物質生産基盤技術シリーズをさらに揃えるべく放線菌で利用可能な構成型高発現ベクター、(誘導型/構成型)分泌型高発現ベクターを構築し、ベクタータイプの有用物質生産基盤技術を開発する。また、目的配列を複数回有する核酸の製造方法を、長い核酸でも製造できるように改良・改変し、(タンパク質をコードする遺伝子などの)目的配列が直鎖状に高密度に整列する二本鎖 DNA を作成し染色体 DNA に組み込むタイプ(染色体 DNA 組込型高度タンデム発現系)の基盤技術も開発する。さらに、タンパク質・有用物質生産に適した放線菌宿主の作成などの周辺技術も含め共通基盤性の高い技術を開発する。即ち、下記に掲げる目標を達成し、有用物質生産性およびタンパク質発現量が実用レベルまで向上した *Streptomyces* 属放線菌や *Rhodococcus* 属放線菌を育種する基盤技術・周辺技術を開発することを最終目的とする。

- (1) 有用物質生産基盤技術シリーズ：ベクタータイプの有用物質生産基盤技術開発
 - ・放線菌で利用可能な高発現ベクター構築
 - ・放線菌で利用可能な(誘導型/構成型)分泌型高発現ベクター構築
- (2) 有用物質生産基盤技術シリーズ：染色体 DNA 組込タイプの有用物質生産基盤技術開発
 - ・染色体 DNA 組込型高度タンデム発現系の構築
- (3) 有用物質生産周辺技術シリーズ：周辺技術開発
 - ・発現用宿主の開発や新規プラスミド構築方法の開発

【総合評価】	
	特に優れた成果が得られている
	優れた成果が得られている
○	一定の成果が得られている
	十分な成果が得られていない

【所見】
<p>① 総合所見</p> <p>放線菌は、応用酵素や抗生物質の生産工場として産業上重要な位置を占めている。その物質生産能を向上させるための基盤技術開発（企業では自社の問題解決に向けた研究が主なので、普遍的な技術開発をアカデミアで遂行する意義がある）は重要である。特に、<i>Streptomyces</i> 属、<i>Rhodococcus</i> 属で高発現し、大腸菌での操作が可能なシャトルベクターの構築は、基礎研究、応用研究の両面で重要である。</p> <p>本研究では、3つの達成目標を掲げて研究を展開した。目標達成に至らなかった重要な課題も残されているが、構築したプラスミドには、従来の手法に勝る生産性を示すものもあり、研究の方向性が妥当であることを示した。</p> <p>目標を達成した課題については、優位性を確保することを期待させる成果を上げていると評価できる。また、残された課題への対応策も示されている。しかしながら、目標を達成した項目についても、ジヒドロ葉酸還元酵素に関する例が示されているが、論文発表や特許出願などにより詳細なデータを示して、客観的な評価を得るには至っていない点が残念である。本 NEXT プログラムにおいては、成果の積極的な公表を推奨している。本研究課題においては、研究期間終了時においても学術的な論文発表、特許出願（申請準備中とはされている）などが、皆無という点は遺憾である。</p> <p>また、本研究課題は <i>Streptomyces</i> 属放線菌や <i>Rhodococcus</i> 属放線菌を育種する基盤技術・周辺技術を開発することを最終目的とすると謳って開始されたものであるが、有用物質生産に向けた宿主の開発は、現時点ではなされていない。開発したプラスミドを導入した宿主が期待通りの有用物質の生産性を示すことを確認して初めて高い評価を得られるものであり、現時点では優れた成果を上げたとは評価することはできない。</p>

② 目的の達成状況
<p>・ 所期の目的が</p> <p>(<input type="checkbox"/> 全て達成された ・ <input checked="" type="checkbox"/> 一部達成された ・ <input type="checkbox"/> 達成されなかった)</p>
<p>達成目標に掲げた3項目のうち、ベクター開発においては、ベクター構築の一部については目標に到達していないものもあるが、おおむねその目標を達成している。また、<u>染色体 DNA 組込タイプについては、その構築と発現量の増加についての効果の確認が示されている。</u>一方、本課題の評価に最も大きなインパクトを持つ有用物質生産という面では宿主の開発も果たせていないことから、実用化レベルまで向上した <i>Streptomyces</i> 属放線菌や <i>Rhodococcus</i> 属放線菌を育種する基盤技術・周辺技術を開発するとした最終目的への到達が、十分視野に入ってきているとは言い難い状況にあ</p>

る。一方、残された課題への対応策は、適切に示されている。

以下、各項目について、具体的に述べる。

(1) 有用物質生産基盤技術シリーズ：ベクタータイプの有用物質生産基盤技術開発

① 放線菌で利用可能な高発現ベクター構築

本プログラム開始時までに関係していた *Streptomyces* 属放線菌用大量発現ベクターを改良し、シャトル型の *Streptomyces* 属放線菌用大量発現ベクターの複数種類の構築に成功した。一方、シャトル型の *Rhodococcus* 属放線菌用誘導型大量発現ベクターに関しては既に開発済であったが、本プログラムにより強力な構成型プロモーターを複数取得することに成功し、*Rhodococcus* 属放線菌用の5種の構成型発現ベクターを構築し、所期の目的を全て達成した。

② 放線菌で利用可能な(誘導型/構成型)分泌型高発現ベクター構築

分泌型高発現の構築に必要な分泌シグナル配列を検索・同定を行い、分泌特性の異なる複数種類の候補を選抜することに成功した。これらの分泌シグナルをそれぞれ導入し、*Streptomyces* 属放線菌用分泌型構成高発現ベクター、シャトル型の *Streptomyces* 属放線菌用分泌型構成高発現ベクターをそれぞれ8種類ずつ構築した。*Streptomyces* 属放線菌用の分泌型誘導型高発現ベクターや、シャトル型の *Rhodococcus* 属放線菌用(誘導型/構成型)分泌型高発現ベクターは構築できていないが、所期の目的の一部を達成した。

(2) 有用物質生産基盤技術シリーズ：染色体 DNA 組込タイプの有用物質生産基盤技術開発

目的配列が直鎖状に複数整列した二本鎖 DNA 合成に必要な工程で種々の条件検討を行い、各工程の改善に成功した。ジヒドロ葉酸還元酵素をコードする遺伝子をレポーターとして用いて高度タンデム化 DNA 断片の作成を行い、ジヒドロ葉酸還元酵素の発現量が増加した微生物の育種に成功し、所期の目的を全て達成した。

(3) 有用物質生産基盤技術シリーズ：周辺技術開発

発現用宿主の開発には成功していないが、目的プラスミドの構築成功頻度が向上する新たなプラスミド構築方法を開発することに成功し、所期の目的の一部を達成した。

③ 研究の成果

・これまでの研究成果により判明した事実や開発した技術等に先進性・優位性が
(ある ・ ない)

・ブレークスルーと呼べるような特筆すべき研究成果が
(創出された ・ 創出されなかった)

・当初の目的の他に得られた成果が (ある ・ ない)

本研究課題において得られた成果を目標に掲げた項目ごとに以下に記載する。

(1) 有用物質生産基盤技術シリーズ：ベクタータイプの有用物質生産基盤技術開発

① 放線菌で利用可能な高発現ベクター構築

(a) *Rhodococcus* 属放線菌用構成型大量発現ベクターの開発

放線菌を種々の培地で培養し、無細胞抽出液を調製することで放線菌内で生成したタンパク質を取得した。SDS-PAGEにより分離した放線菌内のタンパク質の中から生成する量が多いタンパク質を選択し、ペプチドマスフィンガープリンティング法を行うことで、それらをコードする構造遺伝子を決定し、その上流に存在する構成型プロモーターを候補として取得した。これらの構成型プロモーター支配下に(様々な制限酵素サイトを持つ)マルチクローニングサイトを配置した(*Rhodococcus* 属放線菌で複製可能な大腸菌との)シャトルベクターの構築を行った。その結果、4種の構成型発現ベクターを構築した。

(上記の4種の構成型発現ベクターのプロモーターとは異なる)強力な構成型プロモーターを利用し、*Rhodococcus* 属放線菌用のシャトル型構成型発現ベクターの構築を行った。本ベクターに各種タンパク質遺伝子を連結・導入した結果、目的タンパク質は複数の異なる *Rhodococcus* 属放線菌内で大量発現した。グラム陰性細菌由来の芳香環化合物分解酵素の場合には、細胞内全可能性タンパク質の40-50%以上を占めるほど著量発現し、その発現量は *Rhodococcus* 属放線菌用のシャトル型誘導型発現ベクター pREIT19 での発現量を凌駕しており、*Rhodococcus* 属放線菌で機能する非常に有益な構成型大量発現ベクターの開発に成功した。

(b) *Streptomyces*属放線菌用誘導型大量発現ベクターの改良

本プログラム開始時に既に開発していた *Streptomyces* 属放線菌用誘導型大量発現ベクターは *Streptomyces* 属放線菌でしか複製せず、大腸菌でも複製可能なシャトル化を熱望されていた。大腸菌のプラスミド複製に關与する領域や宿主の検討を行うことで、抗生物質耐性などが異なる6種のシャトル型 *Streptomyces* 属放線菌用誘導型大量発現ベクターを構築することに成功した。

(2) 放線菌で利用可能な(誘導型/構成型)分泌型高発現ベクター構築

(c) *Streptomyces*属放線菌用分泌型大量発現ベクターの開発

放線菌の培養液からタンパク質抽出液を調製し、菌体外に排出され、著量発現しているタンパク質を評価することで、分泌シグナル配列を候補として取得した。培養液中に存在する全タンパク質の70%以上を占めるほどの分泌が認められるなど分泌特性の異なる8つの分泌シグナル配列を選抜し、それぞれを *Streptomyces* 属放線菌で機能する構成型発現ベクターのマルチクローニングサイト上流に連結し、*Streptomyces* 属放線菌用の分泌型大量発現ベクターを8種、構築することに成功した。

上記の8種の *Streptomyces* 属放線菌用分泌型大量発現ベクターを大腸菌でも複製できるように改良し、8種のシャトル型の *Streptomyces* 属放線菌用分泌型大量発現ベクターを構築することに成功している(未公表)。

(2) 有用物質生産基盤技術シリーズ：染色体 DNA 組込タイプの有用物質生産基盤技術開発

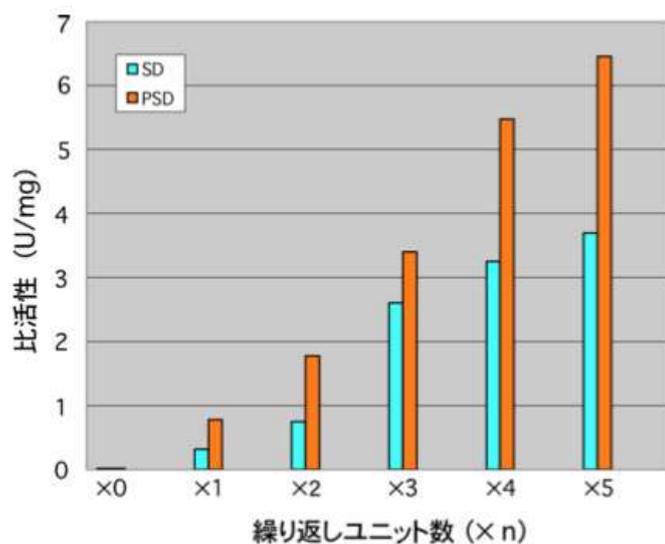
染色体 DNA 組込型高度タンデム発現系の構築

PCRによる目的配列の増幅、一本鎖DNAの回収・精製、一本鎖DNAの環状化・精

製、増幅反応、二本鎖 DNA 化反応などの行程で種々の条件検討を行った。その結果、電気泳動後のアガロースゲル上で目的配列を用いた場合でも直鎖状に多く整列した二本鎖 DNA を作成することに成功した。

大腸菌由来のジヒドロ葉酸還元酵素をレポータータンパク質として、以下の実験を行った。条件検討した工程により作成した[SD 配列+ジヒドロ葉酸還元酵素遺伝子]が直鎖状に多く整列した二本鎖 DNA を作成することに成功した。強力な *lac* プロモーター支配下に[SD 配列+ジヒドロ葉酸還元酵素遺伝子]が直鎖状に複数整列した様々な長さの二本鎖 DNA 断片を配置し、それぞれを 1 コピーで導入した大腸菌を育種した。ジヒドロ葉酸還元酵素の発現を試みた結果、繰り返し数に依存してジヒドロ葉酸還元酵素の発現量は増加した。(下図中の水色バー：繰り返し数 1 と比較して、繰り返し数 5 では比活性が 1.7 倍に上昇)。さらに、[強力な *lac* プロモーター+SD 配列+ジヒドロ葉酸還元酵素構造遺伝子]が直鎖状に多く整列した二本鎖 DNA を作成することにも成功し、それぞれを 1 コピーで導入した大腸菌を育種し発現量を比較した。繰り返し数に依存してジヒドロ葉酸還元酵素の発現量は増加し、その発現量は同じ繰り返しの[SD 配列+ジヒドロ葉酸還元酵素遺伝子]を導入した微生物での発現量より

も増加した(下図中のオレンジ色バー：繰り返し数 1 同士の比較では比活性が 2.5 倍、繰り返し数 5 同士の比較でも比活性が 1.7 倍に増加)。さらに、大腸菌が元来持っているジヒドロ葉酸還元酵素の発現量(下図中の×0)と比較すると、[*lac* プロモーター+(SD 配列+ジヒドロ葉酸還元酵素遺伝子)×



5]で 20.5 倍(下図中の×5の水色バー)、[*lac* プロモーター+SD 配列+ジヒドロ葉酸還元酵素遺伝子]×5では 35.9 倍に発現量を増強した微生物の育種に成功し、本方法が微生物の新しい育種改良方法として利用できる可能性が示唆された。

(3) 有用物質生産基盤技術シリーズ：周辺技術開発

新規プラスミド構築方法の開発

(本事業開始時までには構築が完了していた) *Streptomyces* 属放線菌を宿主とするプラスミドはシャトルベクターでないため、これまでの定法では目的プラスミドの構築成功頻度は低く、様々なプラスミドを構築するまでに時間を要していた。そこで、新たなプラスミド構築方法を検討し、目的プラスミドの構築成功頻度が向上する方法を見いだした。1つの制限酵素により切断した DNA 断片を導入する場合には、従来法と比較して目的プラスミドの構築成功頻度が 10 倍以上高くなった。これにより、(分泌シグナル配列をコードする DNA 配列やマルチクローニングサイトのような)短い遺伝子断片の特定方向への導入が必要となるプラスミドについては、構築の迅速化が可

能となった。

先進性・優位性

本プログラムで、構成型高発現ベクターの構築したこと、大腸菌とのシャトル化に成功したこと、分泌特性の異なるシグナル配列が目的に応じて利用可能なベクターを構築したことなど、放線菌で利用可能な構成型高発現ベクターの構築に成功し有用物質生産基盤技術シリーズを拡充したことは、本研究の優位性を示していると言える。一方、同様な発想に基づく研究、技術開発は現状世界中の研究機関や企業で展開されている。研究レベルでのプロセスそのものには特段の先進性は無いと判断する。

ブレークスルーと言える効果については、本研究課題は有用物質大量生産型への改良という、いわばツールの開発であり、従って社会的にどのようなブレークスルーが実現出来るか、現状ではまだ見えてこない。

④ 研究成果の効果

・研究成果は、関連する研究分野への波及効果が
(見込まれる ・ 見込まれない)

・社会的・経済的な課題の解決への波及効果が
(見込まれる ・ 見込まれない)

放線菌に関する学術上の研究の推進や、効率的に産業上の利用開発を目指す気運の醸成に結びつく可能性がある。但し、本研究課題の有用な実用化とそのレベル如何による。成果を他の研究グループに提供して活用されるなど、波及効果が認められる。一方、実用化については、その兆しは感じられるものの、現時点では社会的、経済的課題やその解決に向っての貢献は見込むことはできない。

目標が達成されれば、社会的・経済的課題の解決に貢献することができよう。もっと産学連携によって産業界のパワーを活用することが望まれる。

放線菌における高発現あるいは分泌型のベクターが開発されれば、放線菌を生産工場として物質を作ろうとしている研究者(アカデミア、インダストリーの両方)には、重宝されると期待されるが、現状では、関連研究分野の進展に大きな寄与を見込むことはできない。

かつて、日本は応用酵素や抗生物質の生産に関わる産業で、世界を牽引していた。しかし、最近では、発酵産業の活力が衰えているので、どのような業種でどのようなタンパク質の発現向上が求められているかを考慮する必要がある。その問題解決に貢献するテーマではある。今後の一層の進展に期待したい。

⑤ 研究実施マネジメントの状況

・適切なマネジメントが (行われた ・ 行われなかった)

研究マネジメントについては、次世代研究開発支援プログラムと銘打って、高額な研究費でかつ柔軟な運用の認められている研究課題において、知的財産権の出願、論文成果がないという状況は遺憾である。研究課題の性格からして、知的財産権の取得が優先すると考えられ、学術論文としての公表が少ないことは理解できる。研究期間

終了時点において学術論文の発表が全くなく、特許についても出願準備中（5件）という状況は、公表への取り組みに積極性を欠くと言わざるを得ない。この時点においても、客観的評価を受けた研究成果がないことは、マネジメントが適切に行われているとは言い難い。本研究費で採用したポスドク、技術員（テクニカルスタッフ）も本課題を遂行することによる十分な評価を得られなかったのではないかと懸念される。

助成金の活用については、概ね妥当であると判断するが、23年度約620万円、24年度約980万円、25年度約1,150万円の謝金・人件費が使われている。これに対し、成果の公表が極めて低調であり、費用対効果の面では疑問が残る。

得られた成果を他の研究者へ提供し、それに基づく成果が公表されている旨が述べられている。また、成果を企業に配布し、企業はそれをもとに特許出願している旨も述べられているが、本研究の成果として評価される形がなぜとれていないのか、本研究推進の主体性の問題あるいはマネジメントに問題があったともいえる。

一般社会への発信については、ホームページでの紹介、筑波大学の国民との対話実施支援を利用した取り組み、「つくば科学フェスティバル」への参加などの6件のアウトリーチ活動を行っており、中間評価時からの改善が認められる。