(19)日本国特許庁(JP)　(12)公開特許公報(A)　(11)特許出願公開番号
特開2013-192559
(P2013-192559A)
(43)公開日　平成25年9月30日(2013.9.30)

(51)Int.Cl.		F I			テーマコード（参考）
C12N 15/09	(2006.01)	C12N	15/00	ZNAA	4B024
C12N 1/21	(2006.01)	C12N	1/21		4B063
C40B 40/06	(2006.01)	C40B	40/06		4B065
C12Q 1/02	(2006.01)	C12Q	1/02		
C12R 1/19	(2006.01)	C12N	1/21		

審査請求 未請求　請求項の数 14　ＯＬ　（全 15 頁）　最終頁に続く

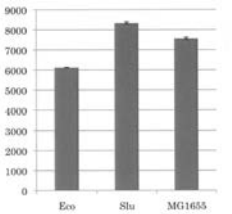
(21)出願番号　特願2012-102128 (P2012-102128)
(22)出願日　平成24年4月27日 (2012.4.27)
(31)優先権主張番号　61/611,827
(32)優先日　平成24年3月16日 (2012.3.16)
(33)優先権主張国　米国 (US)

(71)出願人　301021533
独立行政法人産業技術総合研究所
東京都千代田区霞が関１－３－１
(74)代理人　100100549
弁理士　川口　嘉之
(74)代理人　100126505
弁理士　佐貫　伸一
(74)代理人　100131392
弁理士　丹羽　武司
(72)発明者　宮崎　健太郎
北海道札幌市豊平区月寒東２条１７丁目２番１号　独立行政法人産業技術総合研究所　北海道センター内

最終頁に続く

(54)【発明の名称】翻訳特性の改変された大腸菌

(57)【要約】
【課題】大腸菌では発現の困難な未知微生物を含む様々な遺伝子発現を効率化する。
【解決手段】異種由来の16S rRNAを含む大腸菌を利用することによる。
【選択図】図２



【特許請求の範囲】
【請求項１】
異種生物由来の16S rRNA遺伝子を含む大腸菌変異株。
【請求項２】
16S rRNA遺伝子が、メタゲノム由来である、請求項１記載の大腸菌変異株。
【請求項３】
16S rRNA遺伝子が、プロテオバクテリア由来である、請求項１記載の大腸菌変異株。
【請求項４】
プロテオバクテリアが、γ－プロテオバクテリア由来である、請求項３記載の大腸菌変異株。
【請求項５】
プロテオバクテリアが、β－プロテオバクテリア由来である、請求項３記載の大腸菌変異株。
【請求項６】
γ－プロテオバクテリアが、セラチア（Serratia）属である、請求項４記載の大腸菌変異株。
【請求項７】
γ－プロテオバクテリア細菌が、セラチア フィカリア（Serratia ficaria）である、請求項４記載の大腸菌変異株。
【請求項８】
β－プロテオバクテリアが、ラルストニア（Ralstonia）属、カルディモナス属（Caldimonas）、ハイドロジェノファーガ（Hydrogenophaga）属、オリゲラ（Oligella）属、オキサリシバクテリウム（Oxalicibacterium）属、スピリラム（Spirillum）属、またはバークホルデリア（Burkholderia）属である、請求項５記載の大腸菌変異株。
【請求項９】
β－プロテオバクテリアが、ラルストニア ピケッティ（Ralstonia pickettii）、カルディモナス マンガノキシダンス（Caldimonas manganoxidans）、ハイドロジェノファーガ フラバ（Hydrogenophaga flava）、オリゲラ ウレトラリス（Oligella urethralis）、オキサリシバクテリウム ホルティ（Oxalicibacterium horti）、スピリラム ルナタム（Spirillum lunatum）、またはバークホルデリア サッカリ（Burkholderia sacchari）である請求項５記載の大腸菌変異株。
【請求項１０】
メタゲノム由来16S rRNA遺伝子が、配列番号２０～２６のいずれか1つ以上である、請求項２記載の大腸菌変異株。
【請求項１１】
請求項１～１０のいずれか一項に記載の大腸菌変異株を１または２以上含むライブラリー。
【請求項１２】
請求項１１記載の変異株ライブラリーに目的遺伝子を導入し、目的遺伝子の発現量を決定する工程を含む、目的遺伝子を高発現する宿主大腸菌株をスクリーニングする手法。
【請求項１３】
請求項１２記載の方法で得られる、目的とする遺伝子を高発現する宿主大腸菌株。
【請求項１４】
請求項１～１０のいずれか一項に記載の大腸菌変異株に目的遺伝子を導入し、目的遺伝子にコードされる蛋白質を発現させることを特徴とする蛋白質の発現方法。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
本発明は、蛋白質をコードする遺伝子を異種宿主発現する能力に優れた大腸菌変異株、その創成方法、該大腸菌株を用いた蛋白質の発現方法並びに生産された蛋白質に関する。

【背景技術】
【０００２】
遺伝子クローニング技術が開発されて以来、各種生物から蛋白質をコードする遺伝子を単離し、異種生物を宿主として発現することがなされている。宿主生物としては、大腸菌をはじめとして、放線菌、酵母、糸状菌など様々な微生物が利用されているが、中でも大腸菌は研究用宿主としても工業用宿主としても、最も多用されている微生物である。従来の、大腸菌による蛋白質の発現を最適化する手法としては、大腸菌に内在するRNAポリメラーゼ遺伝子(非特許文献1及び2)や、ファージ由来のRNAポリメラーゼ遺伝子を活用して転写活性を高め(非特許文献3及び4)、また誘導剤の添加などによりプロモーターの活性を制御し、最適な条件を検討するという手法が一般的に良く知られている。これらの方法を用いることにより、蛋白質発現の効率が劇的に改善する例が数多く報告されているが、試行錯誤を重ねても、目的蛋白質が全く生産されないか、生産されたとしても少量に留まってしまう例も多い。どのような蛋白質、あるいは塩基配列が発現困難であるかということは未だ明らかにされていないが、発現させたい遺伝子の生物起源と宿主生物とが進化系統的に乖離している場合、蛋白質発現が困難になることはよく知られている（非特許文献5）。
【先行技術文献】
【特許文献】
【０００３】
【特許文献１】特許第4441170号明細書
【特許文献２】特開2007-300858号公報
【非特許文献】
【０００４】
【非特許文献１】Weinstock, G. M., ap Rhys, C., Berman, M. L., Hampar, B., Jackson, D., Silhavy, T. J., Weisemann, J., Zweig, M. Open reading frame expression vectors: a general method for antigen production in Escherichia coli using protein fusions to beta-galactosidase. Proc Natl Acad Sci U S A 80:4432-4436,1983
【非特許文献２】Guo, L. H., Stepien, P. P., Tso, J. Y., Brousseau, R., Narang, S., Thomas, D. Y., Wu, R. Synthesis of human insulin gene. VIII. Construction of expression vectors for fused proinsulin production in Escherichia coli. Gene 29: 251-254,1984
【非特許文献３】Studier, F. W., and Moffatt, B. A. Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. J Mol Biol 189:113-130,1986
【非特許文献４】Rosenberg, A. H., Lade, B. N., Chui, D. S., Lin, S. W., Dunn, J. J., Studier, F. W. Vectors for selective expression of cloned DNAs by T7 RNA polymerase. Gene 56:125-135,1987
【非特許文献５】Uchiyama, T., Miyazaki, K. Functional metagenomics for enzyme discovery: challenges to efficient screening. Curr Opin Biotechnol 20:616-622,2009
【非特許文献６】Asai, T., Zaporojets, D., Squires, C., and Squires, C. L. An Escherichia coli strain with all chromosomal rRNA operons inactivated: complete exchange of rRNA genes between bacteria. Proc Natl Acad Sci U S A 96: 1971-1976.1999
【発明の概要】
【発明が解決しようとする課題】
【０００５】
本発明の課題は、蛋白質発現の効率化のために、多様な生物種由来の遺伝子を効率的に発現することが可能な宿主大腸菌を創成することである。
【課題を解決するための手段】
【０００６】

前記課題を解決するために、本発明者は、細胞内における翻訳機能を担うリボソームに着目した。

リボソームの改変により蛋白質生産能を改変する試みは、大腸菌においては、リボソーマル蛋白質の一つであるS12の改変体を利用する方法（特許文献1）、L11の改変体を利用する方法（特許文献2）などが知られている。しかし、リボソーマルRNAを改変し、蛋白質発現能を改変するという試みは全くされていない。これは、16S rRNAが種の系統分類に利用されることからも明らかな通り、高度に種保存性の高い分子であり、異種生物由来のものに置き換えることは困難であると信じられてきたからである。16S rRNAの種間交換は学術研究として報告はあるが、変異リボソームの翻訳特性・蛋白質発現に与える影響という観点からの解析は全くなされていない（非特許文献6）。

【０００７】

このような状況下、本発明者は、リボソームの中核を占め、リボソーマル蛋白質と複雑な相互作用をする16S rRNAに着目し、リボソームの機能を大きく変えることを目指した。そして、宿主大腸菌の保有するリボソーマル蛋白質と異種生物由来の16S rRNAを宿主大腸菌細胞内で再構成し、こうして得られるハイブリッド型のリボソームを用いて異宿主発現能に変化を与え、その中に目的遺伝子の発現向上大腸菌変異株が含まれることを見出し、蛋白質の異宿主発現という、これまで多くの試行錯誤を要してきた問題を解決した。

【０００８】

すなわち本発明は以下の発明を包含する。

（１）異種生物由来の16S rRNA遺伝子を含む大腸菌変異株。

（２）16S rRNA遺伝子が、メタゲノム由来である、（１）記載の大腸菌変異株。

（３）16S rRNA遺伝子が、プロテオバクテリア由来である、（１）記載の大腸菌変異株。

（４）プロテオバクテリアが、γ－プロテオバクテリア由来である、（３）記載の大腸菌変異株。

（５）プロテオバクテリアが、β－プロテオバクテリア由来である、（３）記載の大腸菌変異株。

（６）γ－プロテオバクテリアが、セラチア（Serratia）属である、（４）記載の大腸菌変異株。

（７）γ－プロテオバクテリア細菌が、セラチア フィカリア（Serratia ficaria）である、（４）記載の大腸菌変異株。

（８）β－プロテオバクテリアが、ラルストニア（Ralstonia）属、カルディモナス属（Caldimonas）、ハイドロジェノファーガ（Hydrogenophaga）属、オリゲラ（Oligella）属、オキサリシバクテリウム（Oxalicibacterium）属、スピリラム（Spirillum）属、またはバークホルデリア（Burkholderia）属である、（５）記載の大腸菌変異株。

（９）β－プロテオバクテリアが、ラルストニア ピケッティ（Ralstonia pickettii）、カルディモナス マンガノキシダンス（Caldimonas manganoxidans）、ハイドロジェノファーガ フラバ（Hydrogenophaga flava）、オリゲラ ウレトラリス（Oligella urethralis）、オキサリシバクテリウム ホルティ（Oxalicibacterium horti）、スピリラム ルナタム（Spirillum lunatum）、またはバークホルデリア サッカリ（Burkholderia sacchari）である（５）記載の大腸菌変異株。

（１０）メタゲノム由来16S rRNA遺伝子が、配列番号２０～２６のいずれか1つ以上である、（２）記載の大腸菌変異株。

（１１）（１）～（１０）のいずれかに記載の大腸菌変異株を１または２以上含むライブラリー。

（１２）（１１）記載の変異株ライブラリーに目的遺伝子を導入し、目的遺伝子の発現量を決定する工程を含む、目的遺伝子を高発現する宿主大腸菌株をスクリーニングする手法。

（１３）（１２）記載の方法で得られる、目的とする遺伝子を高発現する宿主大腸菌株。

（１４）（１）～（１０）のいずれかに記載の大腸菌変異株に目的遺伝子を導入し、目的遺伝子にコードされる蛋白質を発現させることを特徴とする蛋白質の発現方法。

【発明の効果】
【０００９】
本発明で開発された16S rRNA改変型のリボソームを含む大腸菌宿主を利用し、16S rRNAを改変していない大腸菌宿主では発現レベルの低い遺伝子を高発現することができる。
【図面の簡単な説明】
【００１０】
【図１】各種の宿主における各緑色蛍光蛋白質の蛍光強度。
【図２】各種宿主内でのGFP/Abi発現比較。縦軸は相対蛍光強度。横軸はクローン名。
【図３】各種宿主内でのGFP/Bsu発現比較。縦軸は相対蛍光強度。横軸はクローン名。
【図４】各種宿主内でのGFP/Eco発現比較。縦軸は相対蛍光強度。横軸はクローン名。
【図５】各種宿主内でのGFP/Hsa発現比較。縦軸は相対蛍光強度。横軸はクローン名。
【図６】各種宿主内でのGFP/Sce発現比較。縦軸は相対蛍光強度。横軸はクローン名。
【図７】各種宿主内でのGFP/Sco発現比較。縦軸は相対蛍光強度。横軸はクローン名。
【図８】各種宿主内でのGFP/Tre発現比較。縦軸は相対蛍光強度。横軸はクローン名。
【図９】宿主ライブラリー内でのDsRed2の蛍光スクリーニング。縦軸は相対蛍光強度。横軸はクローン数。
【図１０】DsRed2の発現比較。縦軸は相対蛍光強度。横軸はクローン名。
【図１１】宿主ライブラリー内でのDsRed2-mutの蛍光スクリーニング。縦軸は相対蛍光強度。横軸はクローン数。
【図１２】DsRed2-mutの発現比較。縦軸は相対蛍光強度。横軸はクローン名。
【発明を実施するための形態】
【００１１】
異種生物由来の16S rRNA遺伝子とは、大腸菌、すなわち、エシェリヒア・コリ以外の生物、好ましくはエシェリヒア・コリ以外の細菌、より好ましくはエシェリヒア・コリ以外のプロテオバクテリアに由来する16S rRNA遺伝子を意味する。例えば、セラチア属細菌、ラルストニア属細菌、カルディモナス属細菌、ハイドロジェノファーガ属細菌、オリゲラ属細菌、オキサリシバクテリウム属細菌、スピリラム属細菌、バークホルデリア属細菌などが例示される。
【００１２】
異種生物由来の16S rRNA遺伝子は、例えば、異種生物由来のゲノムDNAを鋳型にし、配列番号１，２のプライマー対を用いてPCRを行うことにより得ることができる。
あるいは、異種生物由来のゲノムDNAからエシェリヒア・コリ由来の16S rRNA遺伝子をプローブにしたハイブリダイゼーションにより得ることもできる。
【００１３】
大腸菌変異株としては、大腸菌自身の16S rRNA遺伝子が欠損し、その代わりに異種生物由来の16S rRNA遺伝子に導入されているものが好ましい。
【００１４】
蛋白質の発現方法は、異種生物由来の16S rRNA遺伝子を含む大腸菌変異株に目的蛋白質をコードする遺伝子を導入し、該目的蛋白質を発現させる工程を含むことが好ましい。
【００１５】
蛋白質の種類は制限されないが、酵素、サイトカイン、転写因子、蛋白質ライブラリーなどが例示される。
【００１６】
発現に用いる大腸菌は、大腸菌細胞そのものでもよいし、リボソーム画分のみでもよい。
【００１７】
目的とする遺伝子を高発現する宿主をスクリーニングする際には、自身の16S rRNA遺伝子が欠損した大腸菌に異種生物由来の16S rRNA遺伝子のライブラリーを導入し、得られた大腸菌変異株ライブラリーに目的蛋白質をコードする遺伝子を導入して目的蛋白質を発現させ、目的蛋白質を高発現する変異株を選択すればよい。目的蛋白質を高発現する変異株

は例えば、大腸菌野生株における目的蛋白質の発現量より多く目的蛋白質を発現する株として選択することができる。遺伝子導入には大腸菌で汎用されるプラスミド等を用いることができる。

なお、自身の16S rRNA遺伝子が欠損した大腸菌に異種生物由来の16S rRNA遺伝子のライブラリーを導入する際には、自身の16S rRNA遺伝子が欠損した大腸菌は生育が低下することがあるので、16S rRNA遺伝子が欠損した大腸菌においてプラスミド等で脱落可能に自身の16S rRNA遺伝子を保持させ、自身の16S rRNA遺伝子を脱落させると同時に異種生物由来の16S rRNA遺伝子を導入することが好ましい。例えば、sacB遺伝子を保持したプラスミド上に自身の16S rRNA遺伝子を保持させ、ショ糖を含む培地で培養することにより自身の16S rRNA遺伝子を脱落させることができる。

選択された変異株において導入された16S rRNA遺伝子を同定することにより、目的蛋白質の発現に適した16S rRNA遺伝子を選択することができる。

【００１８】

メタゲノムとは、微生物を単離・培養することなく、環境試料から直接DNAを抽出して得られるDNAライブラリーのことを意味する。メタゲノム由来の16S rRNA遺伝子（ライブラリー）は、種々の微生物の16S rRNA遺伝子を含み、例えば、環境試料からのDNAを鋳型にし、配列番号１，２のプライマー対を用いてPCRを行うことにより得ることができる。

【実施例】

【００１９】

以下に本発明の実施例を説明するが、ここで挙げる実施例は単なる具体的例示に過ぎず、本発明の技術的範囲を何ら限定するものではない。

【００２０】

＜実施例１＞異種由来16S rRNAを含む大腸菌の創成

（１）分離微生物からの16S rRNA遺伝子の調製

16S rRNA遺伝子の給源として、製品評価技術基盤機構より入手した下記の菌株を用いた。括弧内は菌株の整理番号である。セラチア フィカリア（Serratia ficaria、NBRC 102596）、ラルストニア ピケッティ（Ralstonia pickettii、NBRC 102503）、カルディモナス マンガノキシダンス（Caldimonas manganoxidans、NBRC 16448）、ハイドロジェノファーガ フラバ（Hydrogenophaga flava、NBRC 102514）、オリゲラ ウレトラリス（Oligella urethralis、NBRC 14589）、オキサリシバクテリウム ホルティ（Oxalicibacterium horti、NBRC 13594）、スピリラム ルナタム（Spirillum lunatum、NBRC 13958）、研究室保有のバークホルデリア サッカリ（Burkholderia sacchari）、及び研究室保有の大腸菌MG1655より得られる16S rRNA遺伝子をPCR増幅した。

16S rRNA遺伝子断片の増幅には、配列番号1及び2のオリゴヌクレオチド（ともに北海道システムサイエンス社製）をプライマーとして利用した。各微生物由来の染色体DNAを鋳型として16S rRNA遺伝子のほぼ全長に相当する領域をポリメラーゼチェーンリアクション（PCR）法により増幅した。反応溶液（総量25μL）は、1x PCR Buffer for KOD FX Neo（東洋紡社製）、各0.2mM dATP、dGTP、dCTP、dTTP(以上、東洋紡社製)、各25pmol プライマー、1μL ゲノムDNA（約30ng）、0.5ユニット KOD FX Neo（東洋紡社製）を含む。本溶液を98℃ 2分間の保温後、98℃ 10秒、55℃ 30秒、68℃ 45秒の温度サイクルを25回繰り返し、最後に68℃で5分間保温した。得られたPCR産物をアガロースゲル電気泳動により分離し、マッハライナーゲル社製のDNA精製キット（NucleoSpin Extract II）を用いてマニュアルに従って精製し、30μLの水で溶出した。

【００２１】

（２）環境試料からのメタゲノム由来16S rRNA遺伝子の調製

北海道札幌市豊平区にて採取した土壌より環境ゲノムDNAを調製した。土壌試料1gより、J-Bio 21社製Extrap Soil DNA Plus ver.2を使用し、キットマニュアルに従いゲノムDNA約500ng(100μL)を取得した。

16S rRNA遺伝子の増幅には、配列番号1及び2のオリゴヌクレオチドをプライマーとして利用した。各微生物由来の染色体DNAを鋳型として16S rRNA遺伝子のほぼ全長に相当する

領域をPCR法により増幅した。PCR条件は以下の通りである。反応溶液（総量25μL）は、終濃度1x PCR Buffer for KOD FX Neo（東洋紡社製）、各0.2mM dATP、dGTP、dCTP、dTTP(以上、東洋紡社製)、各25pmol プライマー、1μL ゲノムDNA（約30ng）、0.5ユニット KOD FX Neo（東洋紡社製）を含む。本溶液を98℃ 2分間の保温後、98℃ 10秒、55℃ 30秒、68℃ 45秒の温度サイクルを25回繰り返し、最後に68℃で5分間保温した。得られたPCR産物を定法に従いアガロースゲル電気泳動により分離し、マッハライナーゲル社製のDNA精製キット（NucleoSpin Extract II）を用いてマニュアルに従って精製し、30μLの水で溶出した。

【００２２】

（３）異種由来16S rRNA遺伝子のクローニングと発現系の構築

上記（１）および（２）で得られた16S rRNA遺伝子断片をMegawhop法(非特許文献7)により、非特許文献８記載の大腸菌rrnBオペロン含有プラスミドpRB103中の大腸菌由来16S rRNAと交換した。反応溶液（総量25μL）は、1x PCR Buffer for KOD Neo（東洋紡社製）、各0.2mM dATP、dGTP、dCTP、dTTP(以上、東洋紡社製)、各25pmol プライマー、5μL 上記（３）で得られた16S rRNA遺伝子断片、0.5ユニット KOD Neo（東洋紡社製）を含む。本溶液を68℃ 5分間、続けて98℃ 2分間の保温後、98℃ 10秒、55℃ 30秒、68℃ 45秒の温度サイクルを18回繰り返し、最後に68℃で5分間保温した。各反応後溶液に制限酵素DpnＩ（NEB社製）を0.5μL加え、37℃で終夜保温した。その後、マッハライナーゲル社製のDNA精製キット（NucleoSpin Extract II）を用いて精製し、30μLの水で溶出した。その溶液の一部を分取し、非特許文献８記載の大腸菌KT101 rna$^-$株（大腸菌の染色体上の７つのrrnオペロンを全て欠失し、rrnBオペロンを含有するpRB101を保持する株）を形質転換した。

[非特許文献７] Miyazaki K, Takenouchi M. Creating random mutagenesis libraries using megaprimer PCR of whole plasmid. Biotechniques. 33(5):1033-4, 1036-8. 2002

[非特許文献８] Kitahara, K., Suzuki, T. The ordered transcription of RNA domains is not essential for ribosome biogenesis in Escherichia coli. Mol Cell. 34:760-7666. 2009

【００２３】

（４）異種由来16S rRNA遺伝子を含む宿主株の創成

大腸菌KT101 rna$^-$は染色体上のすべてのrrnオペロンを欠失しているが、pRB101にコードされた大腸菌のrrnBオペロンにより生育が相補されている。pRB101にはBacillus subtilis由来のsacB遺伝子がコードされており、ショ糖含有培地で選択することでプラスミドを脱落させることが可能である。そのため、ショ糖存在下で（３）の工程で形質転換された大腸菌を生育相補性により選択すれば、大腸菌内で機能する16S rRNA遺伝子を選抜することができる。

実験手順は以下の通りである。

【００２４】

〈分離菌株由来16S rRNA遺伝子を含むプラスミドpRB103を含む変異株の創成〉

まず、形質転換体を、100μg/mLゼオシン（インビトロジェン社製）を含むLB Lennox寒天培地（LB培地、寒天ともにメルク社製）上に播種した。次に、プレート上に出現したコロニーをチップの先で突っつき、100μL LB培地に懸濁後、100μg/mLゼオシン及び5%ショ糖（和光純薬社製）を含むLB寒天培地上に再度播種した。37℃で一晩培養し、生育してきたコロニーを選抜した。この結果、セラチア フィカリア由来の16S rRNA遺伝子（配列番号３）、ラルストニア ピケッティ由来の16S rRNA遺伝子（配列番号４）、カルディモナス マンガノキシダンス由来の16S rRNA遺伝子（配列番号５）、ハイドロジェノファーガ フラバ由来の16S rRNA遺伝子（配列番号６）、オリゲラ ウレトラリス由来の16S rRNA遺伝子（配列番号７）、オキサリシバクテリウム ホルティ由来の16S rRNA遺伝子（配列番号８）、スピリラム ルナタム由来の16S rRNA遺伝子（配列番号９）、バークホルデリア サッカリ由来の16S rRNA遺伝子（配列番号１０）について生育が確認された。こうして得られた改変宿主を以下の蛋白質発現実験に供した。特に、セラチア フィカリア由来の16S

rRNA遺伝子を含む変異株をKT103 rna⁻/Sfi、ラルストニア ピケッティ由来の16S rRNA遺伝子を含む変異株をKT103 rna⁻/Rpi、カルディモナス マンガノキシダンス由来の16S rRNA遺伝子を含む変異株をKT103 rna⁻/Cma、ハイドロジェノファーガ フラバ由来の16S rRNA遺伝子を含む変異株をKT103/Hfl、オリゲラ ウレトラリス由来の16S rRNA遺伝子を含む変異株をKT103 rna⁻/Our、オキサリシバクテリウム ホルティ由来の16S rRNA遺伝子を含む変異株をKT103 rna⁻/Oho、スピリラム ルナタム由来の16S rRNA遺伝子を含む変異株をKT103rna⁻/Slu、バークホルデリア サッカリ由来の16S rRNA遺伝子を含む変異株をKT103 rna⁻/Bsa、また大腸菌rrnB由来の16S rRNA遺伝子を含む宿主株をKT103rna⁻/Ecoと命名した。なお、配列番号３～１０および後述の配列番号２０～２６の塩基配列は、16S rRNA遺伝子の増幅プライマーで挟まれた領域の遺伝子配列に対し、増幅プライマーを含む、増幅領域外側の配列は大腸菌由来の16S rRNAの相同領域と組み合わせて表記してある。

【００２５】

〈メタゲノム由来16S rRNA遺伝子を含むプラスミドpRB103を含む変異株の創成〉

環境微生物より得た16S rRNA遺伝子を保持した変異株の創成においては、100μg/mLゼオシンを含むLB Lennox寒天培地で生育したコロニーをLB培地3mLに懸濁し、ボルテックスミキサーで1分間撹拌し、その一部を100μg/mLゼオシン及び5%ショ糖を含むLB寒天培地上に再度播種した。

【００２６】

＜実施例２＞分離株由来16S rRNA遺伝子を含む宿主による蛋白質発現

（１）変異宿主株の形質転換

実施例１で創製された分離菌株由来の16S rRNA遺伝子で機能相補された宿主をもとに非特許文献９に従いコンピテントセルを作成した。該宿主を以下の７種の緑色蛍光蛋白質を発現するプラスミドにより形質転換した。緑色蛍光蛋白質の該発現プラスミドはDNA 2.0社製プラスミドpJexpress402（クロラムフェニコール耐性マーカーを含む）に緑色蛍光蛋白質をコードする遺伝子をクローニングしたものである。クローニングされた緑色蛍光蛋白質は、アミノ酸配列は同一であるが、塩基配列が異なる。緑色蛍光蛋白質はオワンクラゲ由来の蛋白質であるが、上記7種の合成遺伝子は、系統的に異なる7種の生物種、すなわちアガリクス ビスポラス（Agaricus bisporus）、枯草菌（Bacillus subtilis）、大腸菌（Escherichia coli）、ヒト（Homo sapiens）、サッカロマイセス セレビシエ（Saccharomyces cerevisiae）、ストレプトマイセス セリカラー（Streptomyces coelicolor）、トリコデルマ リーセイ（Trichoderma reesei）の遺伝子特性に合わせ設計された。遺伝子の合成アルゴリズムはDNA2.0社の方法によるものである。以下、これらの緑色蛍光蛋白質をGFP/Abi、GFP/Bsu、GFP/Eco、GFP/Hsa、GFP/Sce、GFP/Sco、GFP/Treと略記する。配列番号１１～配列番号１７は、それぞれの緑色蛍光蛋白質に対する塩基配列を示す。なお、16S rRNAの改変されていない野生型大腸菌としてMG1655（研究室所蔵）をコントロールとして利用した。

[非特許文献9] Joseph Sambrook, David W. Russell. Molecular Cloning a laboratory manual third edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press. 1.105. 2001

【００２７】

（２）形質転換体の培養と緑色蛍光蛋白質の蛍光評価

（１）で得た緑色蛍光蛋白質遺伝子の形質転換体を34μg/mLクロラムフェニコールを含む2xYT培地1mL中、37℃で一晩培養した（N=8）。培養器はグライナー社製96穴深型プレートを、振盪培養器としてはタイテック社製M・BR－024を用いた。一晩培養された菌体1μLを2xYT培地（34μg/mLクロラムフェニコール、0.1mM イソプロピル‐β－チオガラクトシドを含む）1mLに移し、37℃で20時間培養した。培養液の一部（100μL）を分取し、ブラックボトムの浅型96穴マイクロプレートで菌体の蛍光を励起波長488nm、蛍光波長530nmにて測定した。測定にはMolecular Devices社製プレートリーダーGemini XSを用いた。図１では、各種の宿主における各緑色蛍光蛋白質の蛍光強度を示している。ここから、宿主間で蛋白質の発現効率が異なることと、遺伝子特性が異なる遺伝子に対する発現の特異性があることが分かった。図２～図８は、各緑色蛍光蛋白質の発現が野生型であるMG1655よりも

高いものをKT103 rna⁻/Ecoと共に比較したグラフである。図中、KT103 rna⁻/Ecoを単にEcoなどと表記し、他生物種、クローンについても同様に略記した。

【００２８】

この図で明らかなように、野生株であるMG1655よりも発現効率が高くなる宿主－レポーター遺伝子の組み合わせがあり、それは以下の通りであった。すなわち、GFP/Abiの発現ではKT103 rna⁻/Slu、GFP/BsuではKT103 rna⁻/SfiとKT103 rna⁻/Slu、GFP/EcoではKT103 rna⁻/Slu、GFP/HsaではKT103 rna⁻/Eco、KT103 rna-/Sfi、KT103 rna-/Our、KT103 rna-103 rna⁻/Sfi、KT103 rna⁻/Rpi、KT103 rna⁻/Cma、KT103 rna⁻/Hfl、KT103 rna⁻/Our、KT103 rna⁻/Oho、KT103 rna⁻/Slu、KT103 rna⁻/Bsa、GFP/ScoではKT103 rna⁻/Slu、GFP/TreではKT103 rna⁻/Eco、KT103 rna⁻/Sfi、KT103 rna⁻/Rpi、KT103 rna⁻/Cma、KT103 rna⁻/Our、KT103 rna⁻/Oho、KT103 rna⁻/Slu、KT103 rna⁻/Bsaにおいて、MG1655よりも高い発現効率を示した。以上の結果より、野生型リボソーム（KT103 rna⁻/Eco）の発現効率は遺伝子ごとに異なること、遺伝子によっては野生型大腸菌よりも、異種由来の16S rRNAと複合体を形成したハイブリッド型リボソームの方が高い発現効率を示すことが判明した。特に顕著な例として、KT103 rna⁻/Sluはいずれの種類の緑色蛍光蛋白質でもMG1655よりも発現効率が高いことが分かった。

すなわち、本願で作成される異種16S rRNAを含む大腸菌変異株の中には、野生株での発現が困難であったタイプの遺伝子を効率的に発現する株が存在しうることが判明した。

【００２９】

＜実施例3＞メタゲノム由来の16S rRNA遺伝子を含む宿主ライブラリーによる蛋白質発現

（１）変異宿主株の形質転換

実施例１で創成されたメタゲノム由来の16S rRNA遺伝子で機能相補された宿主ライブラリーをもとに、非特許文献９に従いコンピテントセルを作成した。そのコンピテントセルを赤色蛍光蛋白質を発現するプラスミドにより形質転換した。赤色蛍光蛋白質としてはクロンテック社製DsRed2（配列番号１８）及び2塩基置換部位を含む変異体のDsRed2-mut（配列番号１９）を使用した。

【００３０】

（２－１）赤色蛍光蛋白質DsRed2の蛍光評価

（１）で得た赤色蛍光蛋白質遺伝子の形質転換体480コロニーを100μg/mLアンピシリンを含むLB培地1mLに移し（グライナー社製96穴深型プレート）、タイテック社製M・BR-024を用いて37℃で振盪培養した（N＝8）。一晩培養された菌体1μLをLB培地（100μg/mLアンピシリン、0.1mM イソプロピル－β－チオガラクトシドを含む）1mLに移し、37°Cで20時間培養した。その後、遠心分離（4000rpm、5分間）により培地を除去し、沈殿した菌体を250μLの滅菌水に再懸濁した。菌液の一部（100μL）を分取し、ヌンク社製ブラックボトムの96穴マイクロプレートで菌体の蛍光を励起波長554nm、蛍光波長580nmにて、Molecular Devices社製プレートリーダーGemini XSを用いて測定した。その結果を図９に示す。図９は、蛍光強度が高いクローンから低いクローンに並び替えてグラフ化したものである。ここから、変異株によって、赤色蛍光蛋白質の発現に大きく差があることが判明した。この結果は、〈実施例１〉で示す方法により創成される16S rRNA変異型の大腸菌変異株が、発現対象となる遺伝子に対して固有の発現特性を示すことを意味している。変異体ライブラリーの構築により、野生型で発現しにくい遺伝子を効率的に発現させうる。また、コントロールとなるKT103 rna⁻/Ecoよりも高蛍光性である数種のクローンを抜粋して、再度測定し直した。その結果、確かにKT103 rna⁻/Ecoよりも高蛍光性を示すクローンを得た。それらのクローンとKT103 rna⁻/Ecoの蛍光値を図１０に示した。各棒グラフの下に16S rRNAの由来が記載してある。

これらのクローンに含まれる16S rRNAの遺伝子配列を配列番号２０～２４に示した。

【００３１】

（２－２）赤色蛍光蛋白質DsRed2-mutの蛍光評価

（２－１）と同様の方法で、メタゲノム宿主ライブラリーの形質転換体ライブラリーを培養し、測定した。

その結果、図１１に示すように、変異株によって、赤色蛍光蛋白質の発現に大きく差があることが判明した。この結果は、〈実施例１〉で示す方法により創成される16S rRNA変異型の大腸菌変異株が、発現対象となる遺伝子に対して固有の発現特性を示すことを意味している。変異体ライブラリーの構築により、野生型で発現しにくい遺伝子を効率的に発現させうる。

また、コントロールとなるKT103 rna⁻/Ecoよりも高蛍光性である数種のクローンを抜粋して、再度測定し直した。その結果、確かにKT103 rna⁻/Ecoよりも高蛍光性を示すクローンを得た。それらのクローンとKT103 rna⁻/Ecoの蛍光値を図１２に示した。

これらのクローンに含まれる16S rRNAの遺伝子配列を配列番号２５～２６に示した。

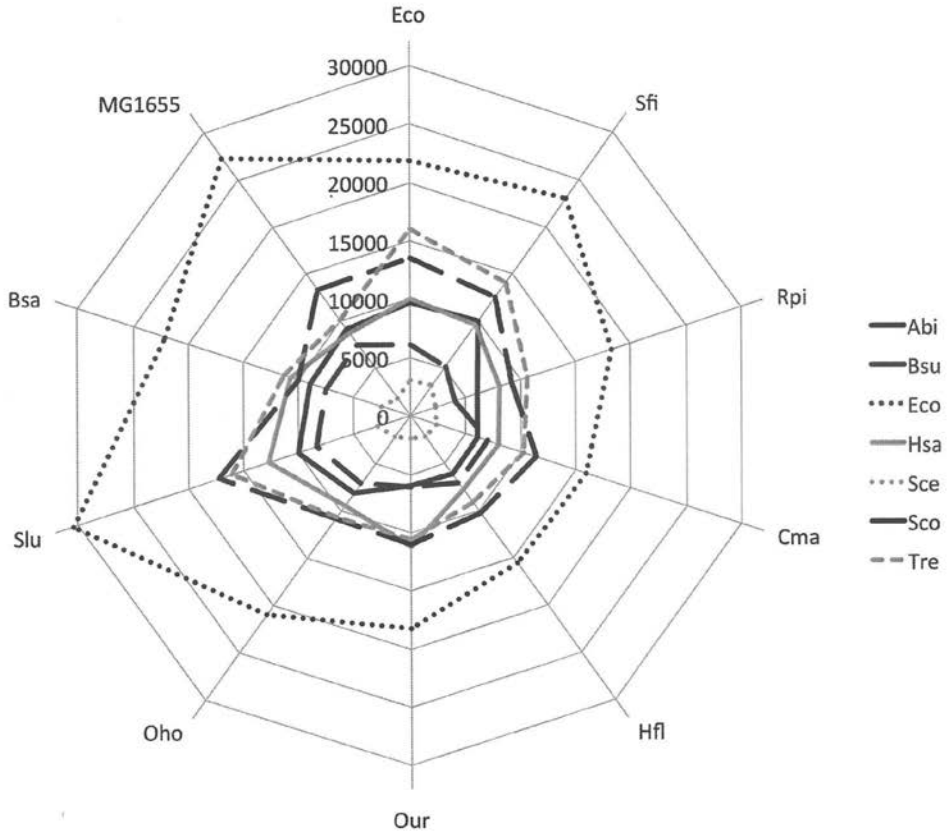
以上、様々な16S rRNAを用いてハイブリッドリボソームを構築することで、大腸菌野生株を使用した際に比べて高い発現レベルを達成できる。

【産業上の利用可能性】

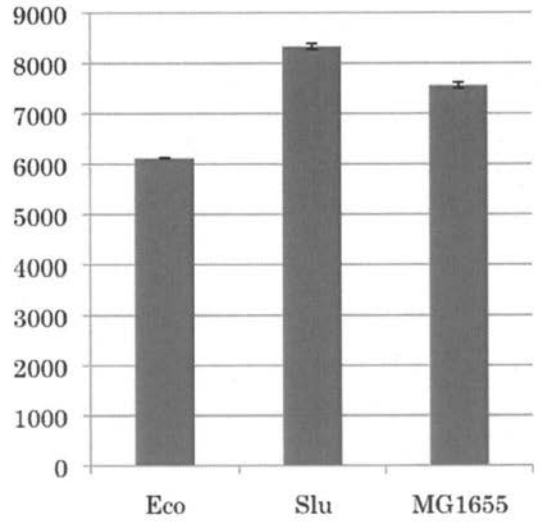
【００３２】

本発明の大腸菌から派生した株を宿主として用いれば、従来野生型大腸菌では発現が困難とされてきた遺伝子の発現を可能とできる。それ故、該宿主を利用してメタゲノムライブラリーを構築するなどの方法により、新規遺伝子探索が効率化する。また、種々の難発現性の遺伝子の発現を向上することで、食品産業、畜産産業、エネルギー産業等の様々な分野に貢献し得る。

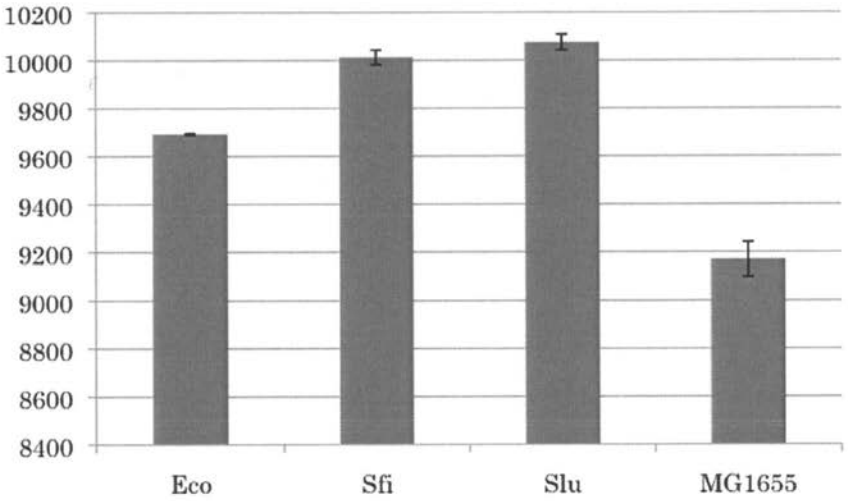
【図１】



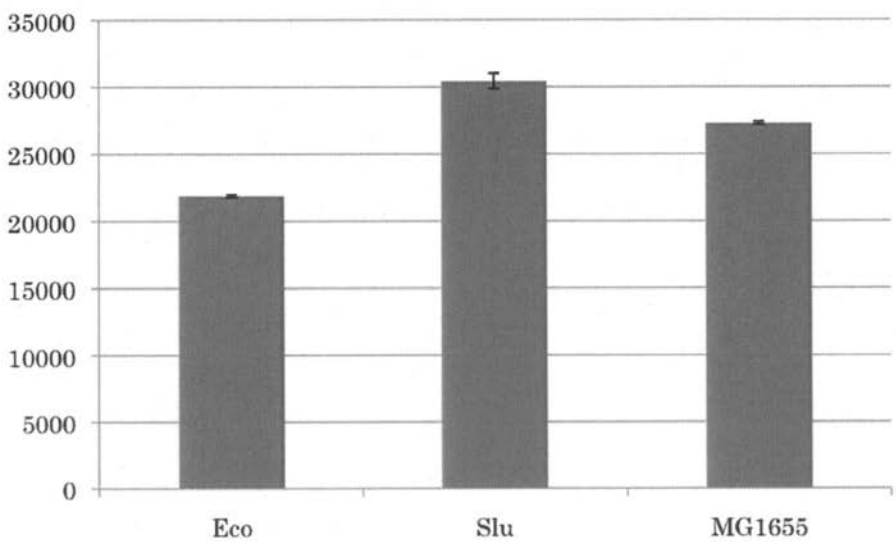
【図２】


9000
8000
7000
6000
5000
4000
3000
2000
1000
0
Eco
Slu
MG1655

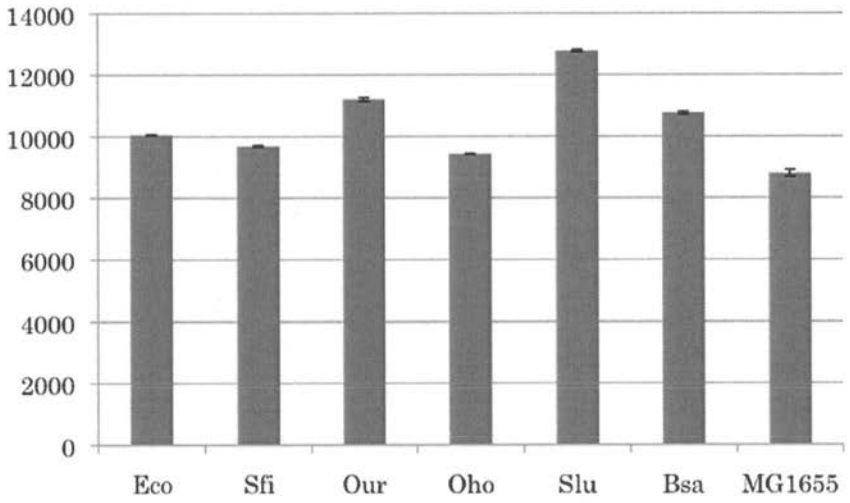
【図３】


10200
10000
9800
9600
9400
9200
9000
8800
8600
8400
Eco
Sfi
Slu
MG1655

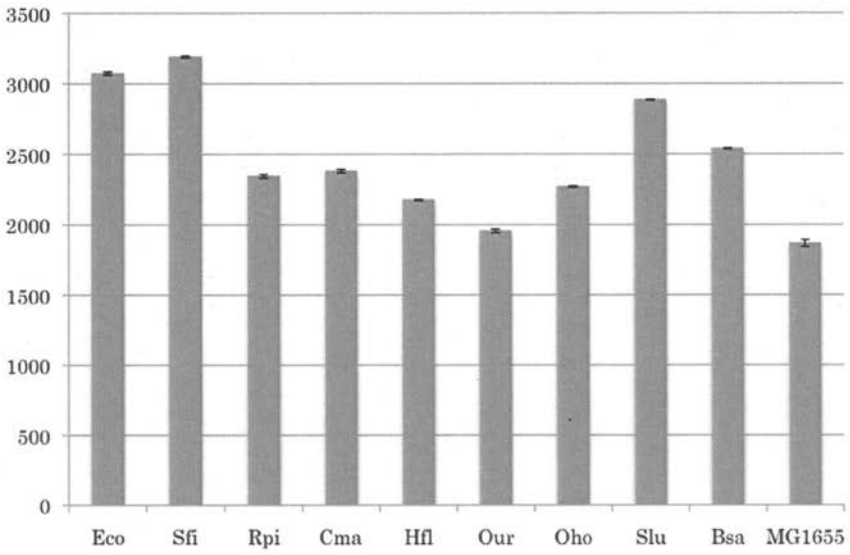
【図４】


35000
30000
25000
20000
15000
10000
5000
0
Eco
Slu
MG1655

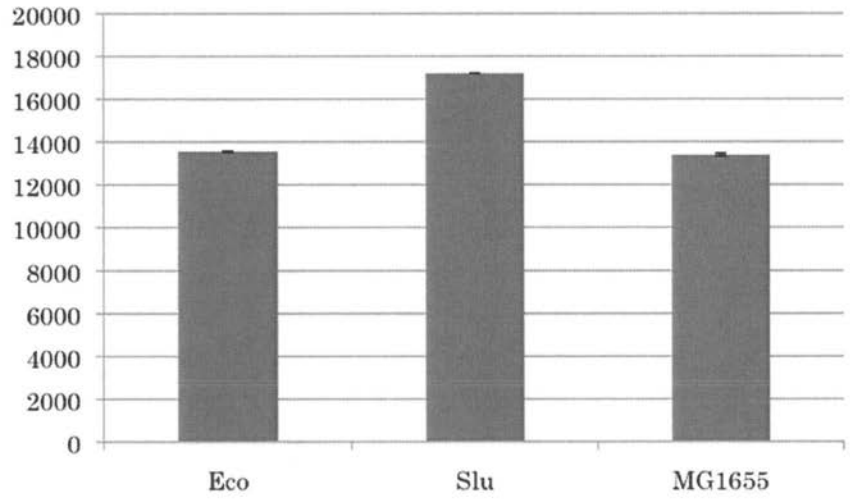
【図５】


14000
12000
10000
8000
6000
4000
2000
0
Eco
Sfi
Our
Oho
Slu
Bsa
MG1655

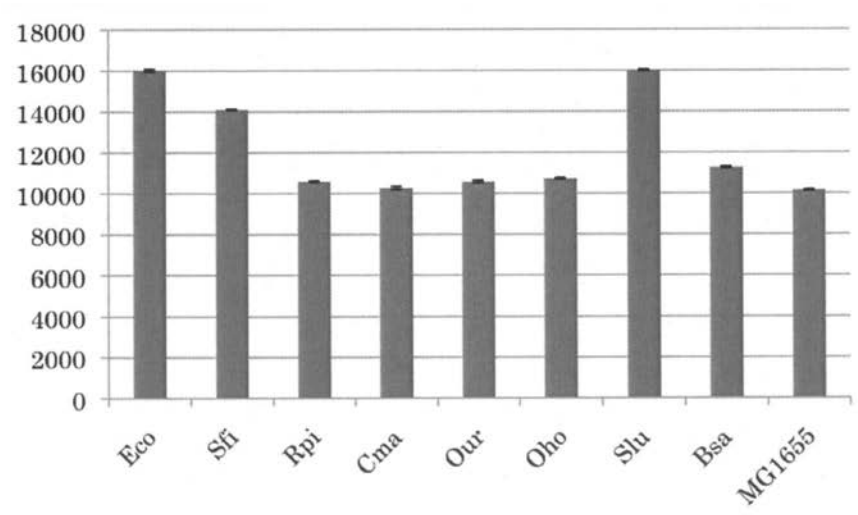
【図６】


3500
3000
2500
2000
1500
1000
500
0
Eco
Sfi
Rpi
Cma
Hfl
Our
Oho
Slu
Bsa
MG1655

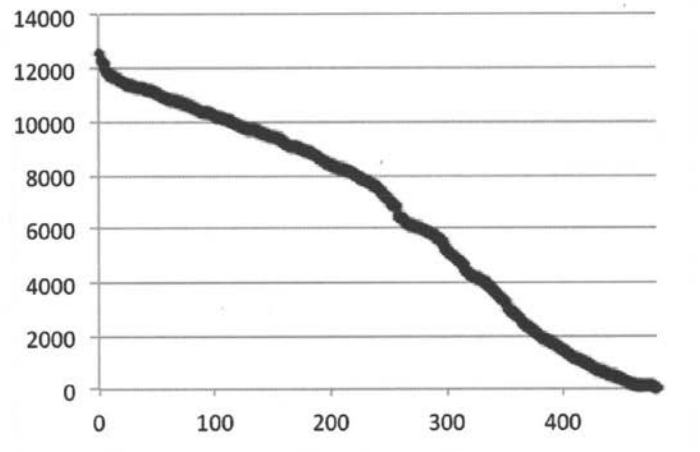
【図７】


20000
18000
16000
14000
12000
10000
8000
6000
4000
2000
0
Eco
Slu
MG1655

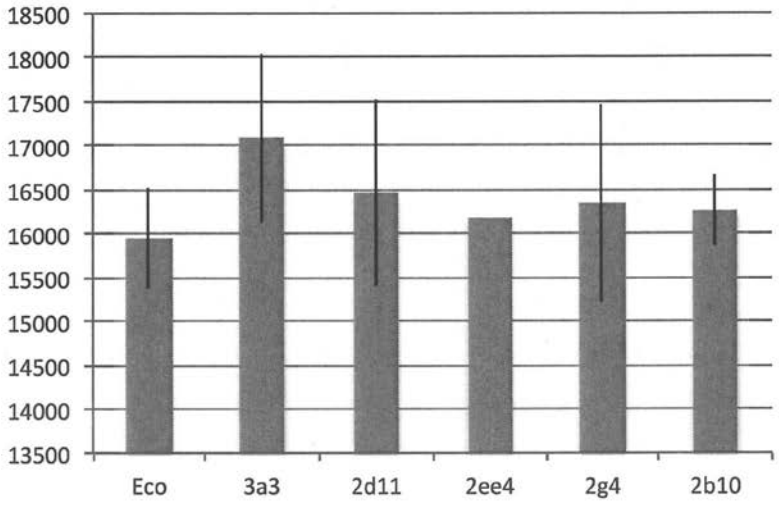
【図８】


18000
16000
14000
12000
10000
8000
6000
4000
2000
0
Eco
Sfi
Rpi
Cma
Our
Oho
Slu
Bsa
MG1655

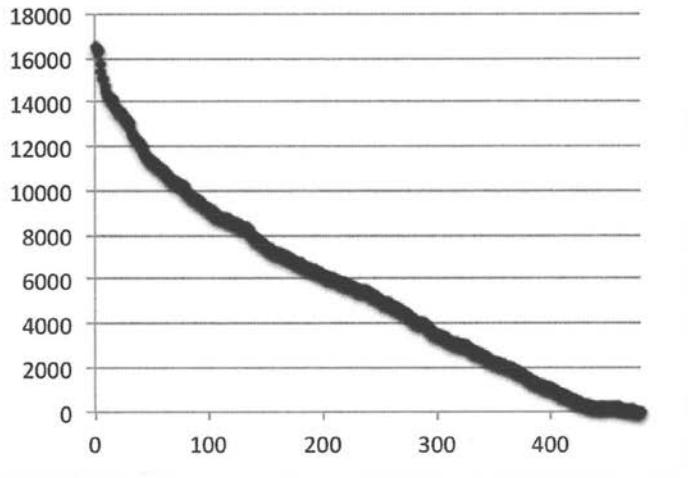
【図９】


14000
12000
10000
8000
6000
4000
2000
0
0
100
200
300
400

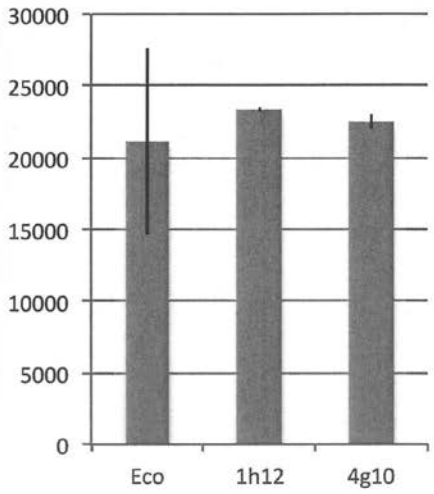
【図１０】


18500
18000
17500
17000
16500
16000
15500
15000
14500
14000
13500
Eco
3a3
2d11
2ee4
2g4
2b10

【図１１】



【図１２】



【配列表】

2013192559000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I テーマコード（参考）
C12R 1:19

特許法第３０条第２項適用申請有り ＮＡＴＵＲＥ ＣＯＭＭＵＮＩＣＡＴＩＯＮＳ ２，Ａｒｔｉｃｌｅ Ｎｕｍｂｅｒ ５４９ 掲載日 平成２３年１１月２２日 掲載アドレス ｈｔｔｐ：／／ｗｗｗ．ｎａｔｕｒｅ．ｃｏｍ／ｎｃｏｍｍｓ／ｊｏｕｒｎａｌ／ｖ２／ｎ１１／ｆｕｌｌ／ｎｃｏｍｍｓ１５５３．ｈｔｍｌ 独立行政法人産業技術総合研究所のプレスリリース 掲載日 平成２３年１１月２３日 掲載アドレス ｈｔｔｐ：／／ｗｗｗ．ａｉｓｔ．ｇｏ．ｊｐ／ａｉｓｔ＿ｊ／ｐｒｅｓｓ＿ｒｅｌｅａｓｅ／ｐｒ２０１１／ｐｒ２０１１１１２３／ｐｒ２０１１１１２３．ｈｔｍｌ

（出願人による申告）平成２３年度 独立行政法人科学技術振興機構 研究シーズ探索プログラム「リボソーム工学に基づく細胞機能の多様化」、産業技術力強化法第１９条の適用を受ける特許出願

(72)発明者 佃 美雪
北海道札幌市豊平区月寒東２条１７丁目２番１号 独立行政法人産業技術総合研究所 北海道センター内

Ｆターム(参考) 4B024 AA20 BA80 CA11 CA20 DA06 EA04 GA11 GA27 HA20
4B063 QA08 QA17 QA18 QQ06 QQ12 QQ13 QR56 QR60 QS05 QS38
QX02
4B065 AA26X AB01 AC14 BA02 BA25 CA24 CA46 CA60