

■ はじめに

大腸菌は、遺伝子組換え技術が最も整備されている微生物の一つである。その利用は、学術的な研究から工業的な物質生産(各種有用化合物、蛋白質、酵素等)まで多様である。大腸菌を用いた異種遺伝子発現の効率化には、転写・翻訳・蛋白質フォールディングなど、様々な過程での最適化が要求される。なかでも、転写レベルについては強力プロモーターや厳密な制御系等の開発も進み、多くの研究者が日常的に利用している。一方、翻訳については転写を最適化しても目的の発現量を得られないなど、未解決な問題が多い。

我々は大腸菌における翻訳レベルの諸問題を解決するため、リボソームに着目した。リボソーム改変に伴う翻訳効率の変化は単なる異種遺伝子発現の変化にとどまらず、ゲノムにコードされる遺伝子全体の発現変動や代謝フラックスも変化させると考えられ、細胞機能工学としての発展も期待される。

■ 活動内容

1. 大腸菌リボソームの改変技術の確立

リボソームは、あらゆる生物に共通する翻訳装置である。バクテリアのリボソームは、3つのRNA (16S, 23S, 5S rRNA) と57種の蛋白質からなる極めて複雑な生体高分子である。リボソームの構成成分のなかでも、16S rRNAは、mRNA上のSD領域と相互作用するアンチSD領域(ASD)領域を3'末端に含み、翻訳の律速となる開始段階で重要な役割を担う。

我々はこれまでに、16S rRNAに着目しリボソームの改変技術を模索してきた。その結果、大腸菌において、大腸菌とは異なる生物種の16S rRNAが機能しうることを明らかにした(Kitahara & Miyazaki, *Nat. Commun.*, 2011; Kitahara et al., *PNAS*, 2012)。この発見から、異種16S rRNAの大腸菌への置換を工学応用すべき方法の最適化を重ね、ハイスループット化に成功した。16S rRNAの置換法の樹立により、保守性が高いと考えられてきた16S rRNAが大規模に分子改変可能なことを見出し、翻訳装置の機能改変への道筋をつけることができた。

2. メタゲノムソースの活用

大腸菌内で十分な発現量が獲得されない遺伝子には、それぞれに様々な原因があると予想される。そのため、その都度、異種遺伝子の特性に合わせて宿主を改変することは効率的でなく、様々な発現様式を持つ宿主をあらかじめ備えておくことが重要である。そこで我々は、様々な機能を付与された改変リボソームを保有する大腸菌ライブラリーの構築を試みた。

多様な改変リボソームを創成するには、置換に用いる16S rRNAの多様度が最も重要である。微生物は、地球上で最大の種数と個数を有す分類群であり、環境中の土壤には、1 gあたり 10^9 程度の微生物が存在していると言われている。しかし、単離・培養ができるものはそのうちの1%にも満たない。そこで我々は、土壤や海水などの環境サンプルから、培養過程を経ずに直接抽出した微生物ゲノムの混合物、メタゲノムを、リボソーム改変において置換に用いる16S rRNAの給源として活用した。

3. 翻訳効率が向上した大腸菌のスクリーニング

メタゲノムソースを用い、大腸菌において16S rRNAの大規模な置換実験を行った。その結果、多種多様な微生物由来の16S rRNAの置換により改変された様々なリボソームを保有する4,000規模の大腸菌宿主ライブラリーの構築に成功した。

この宿主ライブラリーには、異種遺伝子の種類によっては、改変前(野生型)の大腸菌宿主よりも高い効率で発現するものも含まれていた。このことから、当研究室の独自技術、「16S rRNAの置換」によるリボソームの改変は、大腸菌宿主創成の点において有効な手法であることが明らかとなった。

■ 関連情報等(特許関係、施設)

「翻訳効率の改変された大腸菌」宮崎健太郎、佃美雪

13/802256

(米国、2011年3月13日出願、公開)

特願2012-102128

(日本、2011年4月27日出願、公開)

代表発表者 佃 美雪(つくだ みゆき)
所 属 東京大学大学院 新領域創成科学研究科
産業技術総合研究所 生物プロセス研究部門
問合せ先 宮崎 健太郎(みやざき けんたろう)
〒305-8566 つくば市東1-1-1 第6-1 224室
TEL:029-861-6033 FAX:029-861-6033

■キーワード: (1)微生物
(2)生産
(3)リボソーム