（様式第９　別紙２：公開版）

養成技術者の研究・研修成果等

１．養成技術者氏名：　　辻村　昌也

２．養成カリキュラム名：安定有用酵素と磁気微粒子を利用した次世代型反応システムの構築

３．養成カリキュラムの達成状況

本年度後期に予定していた養成カリキュラムは 4 項目である。１）安定有用蛋白質の大量発現技術の検討について、前期にクローニングを行った 50 種の蛋白質に加えて 212 種、合計 262 個の好熱古細菌由来の遺伝子をクローニングした。そのうち、123 種の蛋白質については、熱耐性のある可溶性蛋白質として発現を確認する事が出来た。２）酵素蛋白質の安定性の検討について、生化学的可溶化手法を用いて封入体タンパク質の可溶化・安定化について効率的な検討を行った。また、遺伝子工学的手法を用いた分子シャペロンによる融合発現系を用いる際の封入体タンパク質の可溶化・安定化について検討した結果、この系では不安定状態からの回避を行なえる事が判明した。３）生体材料を磁気微粒子に固定化する技術の検討について、生体材料側である蛋白質部分に磁気微粒子との結合部位を導入する為の改変の第一段階として His-tag を有する蛋白質の発現に取り組み、ほぼ全てのタンパク質についてクローンの作製が終了した。４）固定化生体材料の評価と耐久性の検討について、固定化した蛋白質が機能を有しているかを確認する為の手法として、分光学的手法、液体高速クロマトグラフィーによる手法の検討及び予備実験を行った。以上のように、平成 15 年度に予定した実施項目はほぼ 90%以上が達成できたものと思われる。

４．成果

現在の工業生産は主に高温高圧な条件を必要とし、それに伴う膨大なエネルギーを必要とする。さらにその生産過程で多くの副産物や廃棄物を同時に生産しており、地球温暖化の要因の一つとされている。一方、このようなエネルギーを浪費する生産法では無く、消費するエネルギーを減らそうとする動きがある。その中でも、生物の有する機能を最大限に利用した方法に期待が集まっている。生物が有している様々な機能は、現在用いられている化学反応による物質生産に較べて遙かに効率が良く、さらに、生物では異性体等の識別も行うので、生産効率・有効性を格段に上げることが出来る。ただし、生物そのものを用いることが出来る例は、非常に限られているので、生体内でそれらの反応を司っている酵素を利用する事が最も有効な手段だと考えられる。特に、特殊な環境に生息する微生物が有する酵素・蛋白質には、非常に安定性の高いものがあるのでそれらの酵素・蛋白質の大量生産、安定化等の問題を解決すると利用の可能性が大きく広がると思われる。さらに、磁気微粒子を用いた Magtration 技術を組み合わせることによって反応生成物の分離・精製が格段に簡略化され、トータルコストの削減が可能となる。しかし、現段階では、酵素自体を磁気微粒子上に固定化する最適な方法は確立されておらず、利用できる知見・情報は限られている。そこで、本カリキュラムでは生物が有する酵素・蛋白質を有効に利用して、磁気微粒子技術との融合を図ることで、今まで大量にエネルギーを消費していた化学反応に変わる生物生産プロセス・システムの構築を目的としている。

本年度後期に行った事業内容は以下の４項目なので、それぞれについて報告する。

（1）安定有用蛋白質の大量発現技術

様々な特殊環境に生息する微生物等が有する機能を有効に利用することを想定したモデル系として、ゲノム配列が公開されている超好熱古細菌 *Sulfolobus tokodaii* strain 7 のゲノム情報を利用した。有用な酵素・蛋白質であろうと予測された候補蛋白質を効率良く発現・生産する技術の習得を行った。

S. tokodaii strain7 は、至適生育温度 80℃、至適生育 pH2～3 のクレンアーキオータに属する好酸性好気性超好熱古細菌である。ゲノムサイズは、約 2.7M塩基対であり、ゲノム配列から見いだされた ORF は 2,821 個であった。また、46 個の tRNA 遺伝子のうち 24 個にイントロンが見いだされ、さらにトランスポゾンや IS 等の転移因子がゲノム上に見いだされてきた。これらの特徴は、他の超好熱古細菌と比べて、*S. tokodaii* strain7 が真核生物に近いことを意味しており、これらの研究が真核生物の良いモデルとなることが期待される。

本年度前期では、あらゆる生物間に普遍的に存在する機能である転写・翻訳に関する蛋白質を選択し、それらの蛋白質の発現系を構築することで、ゲノム解析から得られた情報との一致を検証した。その結果、転写・翻訳に関する目的蛋白質をコードしていると思われる 54 種の領域についてクローンを作製して蛋白発現の検討を行ったところ、63%のものでは熱耐性を有する可溶性蛋白質として得ることに成功した。また、封入体の形ではあるが、大腸菌中でのタンパク質生産が見られるものを含めれば、約 85%の蛋白質の発現が確認されたことになる。後期には、その蛋白質の種類を増やし、この発現系を網羅的に用いる事が可能か検証を試みた。蛋白質合成に関わる蛋白質、DNA 代謝に関わる蛋白質、エネルギー代謝に関わる蛋白質などについて、260 を超えるクローンの作製を行い、蛋白質発現を検討した。その結果、123 種の蛋白質について、熱耐性の可溶性画分として得ることに成功した。また、60 種については封入体の形で発現蛋白質が得られている。網羅的な発現解析から得られた知見として、DNA の代謝に関わる蛋白質は、可溶性発現率が 30%に届かず、他の蛋白質に比べ発現系の構築が困難であることが解った。発現させる蛋白質のサイズに関しては、分子量 6 万までは比較的差は見られないが、6 万以上の大きさになると発現効率が落ちる結果が得られた。蛋白質の一次構造を基にした発現効率を検討したが、優位な配列が発現の状態（可溶性発現、不溶性発現、非発現など）を左右することは見出せなかった。今後、発現数を増やすことで、規則性を見出せる情報を得る事が出来ると思われる。

（2）酵素・蛋白質の安定性向上技術

蛋白質の安定性を向上させる技術として、緩衝液中に保護剤になる試薬を入れる方法や、蛋白質自身に変異を導入して、構造的に安定化するなどの方法が考えられる。今回は、発現段階で正確な構造を持たないために不安定・不溶性になる封入体タンパク質を安定な本来の形に再構築する方法の検討を行った。発現系作製において、最も問題となる封入体形成は今回の場合も約 20%がそれにあたる。封入体タンパク質を正常な形で発現させるか正常な形に再構築する方法は大変重要であり、蛋白質の安定化の解析につながると考えられる。

一つ目の方法として、変性剤（尿素、グアニジン塩酸）により封入体タンパク質を可溶化した後、透析によって巻き戻す手法を検討した。その結果、8 種の封入体蛋白質のうち 6 種については可溶化することに成功した。さらにそのうち 2 種については、一定の熱耐性もあることが確認され、本来の構造を取り戻していることが示唆された。二つ目の方法として、分子シャペロンを用いる構造安定化を試みた。分子シャペロン遺伝子の下流に封入体形成が確認された蛋白質の遺伝子を組み込んだプラスミドを構築した。その結果、14 種の蛋白質について発現状態の確認を行ったところ、9

種については可溶性画分にタンパク質が得られた。また、大腸菌を宿主として、蛋白質の発現が確認できなかった 6 種においても、2 種の蛋白質が発現していることが明らかになった。現在、詳細な条件検討をしている段階であり、これらの手法によってタンパク質の安定性を高めることが出来、格段に利用可能な蛋白質を増やすことが出来ると考えられる。

（3）生体材料を磁気微粒子に固定化する技術

蛋白質・酵素を磁気微粒子に固定化する目的は、最終的に Magtration システムによる全自動化を行うためである。よって、まず初めに自動化システムにおける蛋白質の分離・精製が可能かどうか検証する必要がある。そこで、今回は、既存のシステムである、His-tag と Ni との親和性を用いて実際に目的蛋白質の分離・精製を行うことにした。まず、His-tag を発現蛋白質に融合させるようにプライマーを設計し、PCR による目的遺伝子の増幅を行った。さらに、大腸菌に形質転換し、目的蛋白質の発現を確認した。可溶性の熱耐性蛋白質が確認された試料について、PSS 社が保有する全自動システムによる分離・精製をおこなう予定になっている。既に、当社は Ni 磁気微粒子によるタンパク質精製に関する知見も得始めているので、精製段階での最適化を今後検討して行く予定である。Ni を担体に含有したカラムの場合でこれまで行われてきた遠心分離を使用した処理に代わる新たなシステムが構築できるものと考えられる。この自動化適応が確認された後、次の段階である蛋白質の固定化を行う手法の検討・開発に進む予定である。

（4）固定化生体材料の評価と耐久性の向上技術

蛋白質・酵素を磁気微粒子に固定化した後、生体材料として評価する際には、その機能が十分に固定化されているかについて判断する必要がある。酵素の場合、活性中心、または反応中心が最も重要であり、固定化の際にその部位がマスクされてしまう可能性が考えられる。そこで酵素機能を測定する手法を検討した。一般的な可視・紫外分光光度計を用いた単位時間における吸収変化を検出するため、NAD→NADH 変化を 340nm の吸収で追跡した。酵素はソルビトール脱水素酵素を用いたところ、酵素活性の指標として十分に対応できる事が判明した。また、NAD を用いた酵素活性測定法は共役酵素活性測定としても使用可能なので汎用性があり、固定化量を定量することにも十分に使用できると考えられる。

以上のように本年度後期では、新たな実施項目についても、充分に目的を達成する事が出来たと考える。前期から続いている蛋白質の発現系構築、また、蛋白質の安定化を目的とした封入体回避に関する検討成果について、学会報告をする機会が得られ、同様な研究を行っている研究者達との意見交換が盛んに行えた。この蛋白質発現に関しては、本研究項目に対して興味を持った生化学会の方から、学会誌への掲載を要望され、「テクニカルノート」という形で報告できる機会も頂けた。現在、取り組んでいる内容が、蛋白質の有効利用分野で大いに必要とされていることを痛感でき、さらに情報を発信できるよう努力していきたいと考えている。また、自動化に関しても、着実に準備を進めており、有用な機能を持った蛋白質を容易に扱えるシステムの構築を行っていきたい。

５．成果の対外的発表等

（1）論文発表

なし

（2）口頭発表

1. Masanari Tsujimura, Hideji Tajima, Yutaka Kawarabayasi：“ Study on refolding of thermophilic archaeal proteins expressed as inclusion form ”、第 76 回日本生化学会大会、パシフィコ横浜、横浜、10 月 15～18 日(2003)

2. Zilian Zhang, Masanari Tsujimura, Hideji Tajima, Yutaka Kawarabayasi ：“ Characterization of the dTDP-L-rhamnose biosynthetic genes from thermoacidophilic crenarcharon, Sulfolobus tokodaii Strain 7 ”、第 76 回日本生化学会大会、パシフィコ横浜、横浜、10 月 15～18 日(2003)

3. Junichi Akutsu, Masanari Tsujimura, Masafumi Yohda, Yutaka Kawarabayasi ：“ Evaluation of protein expression system from aerobic thermoacidophilic crenarcharon, Sulfolobus tokodaii Strain 7 ”、第 76 回日本生化学会大会、パシフィコ横浜、横浜、10 月 15～18 日(2003)

4. 辻村昌也、阿久津純一、田島秀二、河原林裕：“ 好酸性超好熱古細菌 *Sulfolobus tokodaii* strain7 由来転写・翻訳に関する組換え蛋白質発現系の網羅的構築 ”、酵素工学研究会第５０回講演会、東京大学、山上会館、10 月 24 日(2003)

5. Zilian Zhang, Masanari Tsujimura, Hideji Tajima, Yutaka Kawarabayasi ：“ Characterization of the thermo-stable enzymes involved in the biosynthesis of dTDP-L-rhamnose from a thermoacidophilic crenarcharon, Sulfolobus tokodaii Strain 7 ”、酵素工学研究会第５０回講演会、東京大学、山上会館、10 月 24 日(2003)

6. 辻村昌也、河原林裕：“ 超好熱古細菌たんぱく質の発現の状況 ”、超好熱古細菌の構造ゲノミクスのためのワークショップ、播磨 Spring8、11 月 17～19 日(2003)

7. 今野聡、阿久津純一、辻村昌也、河原林裕：“ 霧島地区温泉中の微生物群集への遺伝子的アプローチ ”、第 4 回極限環境微生物学会年会、理化学研究所、鈴木梅太郎記念ホール、12 月 1、2 日(2003)

8. Zilian Zhang, Masanari Tsujimura, Junichi Akutsu, Shinta Nakano, Hideji Tajima, Yutaka Kawarabayasi：“ Characterization of thermostable multifunctional enzyme for biosynthesis of polysaccharide identified from S. tokodaii Strain 7 ”第 26 回日本分子生物学会年会、神戸ポートアイランド、12 月 10～13 日(2003)

9. 辻村昌也、阿久津純一、田島秀二、河原林裕：“ 好熱古細菌由来組換え蛋白質の大腸菌大量発現系による封入体形成の回避とその解決 ” 第 26 回日本分子生物学会年会、神戸ポートアイランド、12 月 10～13 日(2003)

10. 阿久津純一、辻村昌也、張子蓮、中野新太、今野聡、養王田正文、河原林裕 “ 好酸性超好熱古細菌 *Sulfolobus tokodaii* strain7 由来タンパク質発現の検討 ” 第 26 回日本分子生物学会年会、神戸ポートアイランド、12 月 10～13 日(2003)

（3）特許等

なし

（4）その他

生化学会誌「生化学：テクニカルノート」掲載

辻村昌也、河原林裕　“好酸性超好熱古細菌タンパク質の網羅的発現への取り組み”生化学第 76 巻　第 2 号、149-154　（2004）