

## D126

放線菌を用いた様々なタンパクの大量分泌系の構築  
 (神戸大院工)○(学)野田 修平・(神戸大研究環) (正)田中 勉・  
 (神戸大院工) (正) 近藤 昭彦・(正)荻野 千秋\*

## 【緒言】

放線菌 *Streptomyces* 属は、グラム陽性の菌糸形成細菌である。その中でも特に、*Streptomyces lividans* が多量の異種タンパクを培養液上清に分泌発現させるホストとして優れている。しかし、*Streptomyces* 属を用いた有用タンパクの分泌発現に関する報告はあまり報告されていない。

当研究室では、*S. lividans* 1326 をホストに用いて *Stv. cinnamoneum* 由来ホスホリパーゼ D (PLD) の大量分泌生産に成功している。この発現系の有用性を示し更に汎用性を高める為に、本研究では、この *Stv. cinnamoneum* の PLD 由来のプロモーター領域、分泌シグナル、ターミネーター領域をもつベクターを構築し、様々な有用タンパクの分泌発現の検討を行った。

## 【実験方法】

放線菌と大腸菌のシャトルベクターである pUC702 に *Stv. cinnamoneum* の PLD 由来のプロモーター領域、PLD の分泌シグナル、ターミネーター領域をクローニングし、基礎ベクターとして pUC702-pro-sig-term を構築した。

構築したこのベクターに中度高熱性放線菌 *Thermobifida fusca* YX 由来の耐熱性セルラーゼであるβ-グルコシダーゼ (BGL)、エンドグルカナーゼ (EG) 及び、*Stv. cinnamoneum* 由来のトランスグルタミナーゼ (StvcMTG) をそれぞれ導入し、タンパク分泌生産ベクターを構築した。

構築したベクターをそれぞれプロトプラスト-PEG 法を用いて *S. lividans* 1326 に導入し、形質転換体を得た。得られた形質転換体を 3～8 日間培養した後に、培養上清を回収し、SDS-PAGE によりタンパク発現を確認した。また、BGL は p-ニトロフェニル-β-D-グルコピラノシド (pNPG) を基質として、EG はカルボキシメチルセルロース (CMC) を基質として酵素活性を評価した。

## 【結果と考察】

StvcMTG について本培養 5 日目の培養上清を SDS-PAGE で分析した結果を Fig.1 に示す。Lane2-4 において、StvcMTG と一致する 38 kDa のバンドが確認された。コントロールとして pUC702 を持つ形質転換体の培養上清には、StvcMTG の発現は見られなかった (Fig. 1, Lane5)。また、この StvcMTG は活性を持つ事ことも確認できた。続いて *T. fusca* YX 由来の BGL 分泌発現ベクターをもつ形質転換体について本培養 3 日目の培養上清を SDS-PAGE で分析した結果を Fig. 2 に示す。こちらにも 53 kDa にバンドが観察され、BGL の発現の確認に成功した。また、pNPG を基質とした活性測定では測定温度 40℃ で最大で約 1900 U/L の活性を示した。同様に、EG の発現にも成功し、EG は CMC を基質とした活性測定で最大で約 45 U/L の活性を示した。

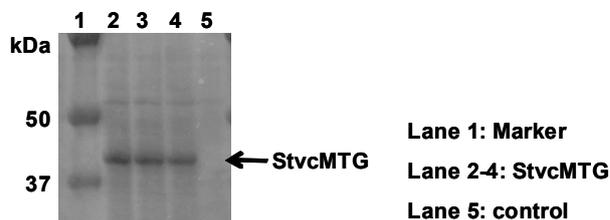


Fig. 1 SDS-PAGE analysis of StvcMTG

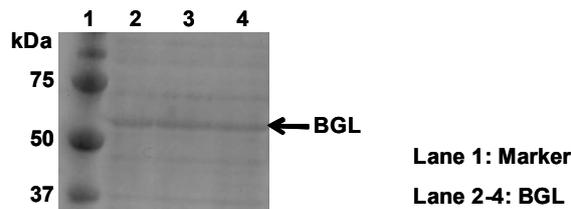


Fig. 2 SDS-PAGE analysis of BGL

## 【結言】

*S. lividans* を用いて様々な有用タンパクを、活性を保ったまま大量に分泌生産することに成功した。今後、このシステムを応用した更なる有用タンパクの分泌発現が期待できる。

Tel:078-803-6193

E-mail:ochiaki@port.kobe-u.ac.jp