

## *Rhodococcus* 属細菌を利用した宿主-ベクター系の開発

### Development of a Host-Vector System in *Rhodococcus* Species

田村 具博\*, Sallam Khalid, 田村 範子, 中島 信孝, 三谷 恭雄  
TOMOHIRO TAMURA, SALLAM KHALID, NORIKO TAMURA, NOBUTAKA NAKASHIMA and YASUO MITANI

独立行政法人産業技術総合研究所ゲノムファクトリー研究部門 〒062-8517 札幌市豊平区月寒東2条17丁目2-1

\* TEL: 011-857-8935 FAX: 011-857-8980

\* E-mail: t-tamura@aist.go.jp

Research Institute of Genome-based Biofactory, National Institute of Advanced Industrial Science and Technology (AIST),  
2-17-2-1 Tsukisamu-Higashi, Toyohira-ku, Sapporo 062-8517, Japan

キーワード: ロドコッカス属細菌, タンパク質発現, 生物工場

Key words: *Rhodococcus*, protein expression, biofactory

(原稿受付 2007年5月13日/原稿受理 2007年5月20日)

#### 1. はじめに

放線菌である *Rhodococcus* 属細菌は、高 GC 含量のゲノムをもつグラム陽性菌で、有機溶媒に対して耐性を示し、脂肪族、芳香族および複素環式化合物などを変換する生体触媒活性が強い菌株なども見出されている<sup>4,13)</sup>。この細菌は、難分解性環境汚染物質の分解について研究が進められている一方、触媒反応を強化したコモディティケミカルの生産に初めて成功した菌としても知られる(本属細菌の、触媒能力やその特徴についての詳細については本誌他の解説を参照されたい)。

この細菌はゲノムに加え、巨大な線状・環状のプラスミドを保持しており、同属同種でも、株が異なると細胞内プラスミドの構成が異なる事が知られている<sup>14)</sup>。プラスミドの中には、接合により細胞間を移動できる事が確認されていることから<sup>3,27)</sup>、*Rhodococcus* 属細菌は、水平伝播による遺伝子の取り込みによって細胞内における遺伝子構成の多様性を獲得してきた可能性がある。この遺伝子の多様性が、上述した細胞株依存的な特徴ある触媒活性を示す大きな要因になっていると考えられる。

*Rhodococcus* 属細菌は、同菌を「反応場」として物質の生産や分解をはじめとして多目的用途に利用出来るほか、遺伝子資源として新規有用遺伝子の獲得が期待できる。しかしながら、これまで *Rhodococcus* 属細菌を宿主としたベクターの開発について報告はあるものの、必ずしも汎用性に長けているわけではなかった。また、同属細菌の機能改変技術については非常に限定された技術のみが使用可能であった。

このようなことから、*Rhodococcus* 属細菌を宿主として機能タンパク質を発見・精製しその利用を図る技術、機能タンパク質を高発現・蓄積した高機能型細胞の構築による物質の資化や生産に関する技術の開発には、本菌に

至適化された汎用型宿主-ベクター系の開発が必須である。本解説では、筆者らがこれまで開発してきた *Rhodococcus* 属細菌を利用した宿主-ベクター系を中心に紹介したい。

#### 2. 発現ベクター

放線菌 *Streptomyces* 属、*Mycobacterium* 属、*Corynebacterium* 属などでは、発現ベクターが既に構築され、誘導型ベクターについても系が確立しているが、*Rhodococcus* 属細菌においては、大腸菌とのシャトルベクターの開発が中心で、タンパク質発現に至適化した汎用型ベクターはこれまでほぼ皆無であったと言っても言い過ぎではない<sup>18,21)</sup>。

細胞内に組換えタンパク質を発現・蓄積させる場合、細胞増殖に対して阻害効果を示すタンパク質や不溶性しやすいタンパク質などの発現に対してはタンパク質の発現を制御可能な誘導型プロモーターを配したベクターが必要となる。これは、発現するタンパク質のもつ触媒機能を不必要に働かせないようにすることや、過剰発現による封入体形成を抑制する事によって可溶性タンパク質としての回収が期待できるからである。ここでは *R. erythropolis* 由来の複製起点の異なる2種の内在性プラスミド pRE2895 (θ-型複製) と pRE8424 (rolling circle型複製) を利用した発現ベクターについて紹介する。

##### 2.1. 誘導型および構成型発現ベクター

筆者らによって、pRE2895 と pRE8424 を基本骨格とした *Rhodococcus* 属細菌用の発現ベクター、pTip と pNit ベクターが開発されている(図1)<sup>22,23)</sup>。pTip、pNit ベクター共に大腸菌とのシャトルベクターで、pTip は誘導型、pNit は構成型発現ベクターである。

pTip には誘導型プロモーターとして、*Streptomyces* 属細菌で研究・利用されている *tipA* 遺伝子のプロモーターが導入されている<sup>10,19</sup>。このプロモーターは、各 6 塩基からなる -10 ボックスと -35 ボックスが 19 塩基を挟んで配置したヘアピンループ構造をとる DNA 配列をもち、*tipA* 遺伝子産物、TipAL タンパク質により活性化される<sup>2)</sup>。その作用機序は、まず最初に *tipA* 遺伝子の単一 ORF から翻訳される長さの異なるタンパク質、TipAL と TipAS の内、TipAL の C- 末端に局在する Cys 残基にチオストレプトンが共有結合する。ついで、*tipA* プロモーター領域に結合する TipAL- チオストレプトンを介して RNA polymerase の同領域への親和性が著しく上昇することで転写が誘導されると考えられる<sup>2)</sup>。チオストレプトンは、23S rRNA 上の翻訳伸長因子 EF-G 結合領域に結合し、タンパク質翻訳時のリボソーム転移を阻害する環状ペプチド構造を持つ抗生物質の一種として知られる。TipAL は微弱ながらも構成的に発現しており、チオストレプトンが結合する事で著しく自己発現誘導されると共に、他の *tipA* プロモーター下流の遺伝子群の発現を誘導する。本転写制御因子は、細菌由来転写制御

因子 MerR ファミリーの一つに分類され生化学的な解析等が行われているが、*tipA* 遺伝子産物においては TipAS についてその構造が決定されており<sup>12)</sup>、TipAL にを介した遺伝子発現の分子レベルでの詳細な制御機構は不明である。

この *tipA* 遺伝子を放線菌 *S. coelicolor* よりクローニングし、TipAL が構成的に発現するよう *Rhodococcus* 属細菌由来プロモーターの下流に連結した遺伝子断片とチオストレプトン耐性遺伝子を上記シャトルベクターへ組み込みこんだ。そして、*tipA* 遺伝子上流域にコードされている *tipA* プロモーターとその下流に外来遺伝子を導入できるようにマルチクローニングサイトを導入し、誘導型発現 pTip ベクターを構築した (図 1)。このベクターは、*R. erythropolis*, *R. facians*, *R. opacus* などへ形質転換可能であるが、*R. rhodochrous* や *R. ruber* への効率是非常に低く、この形質転換効率の違いは、後者の 2 種は、形質転換可能な前者の 3 種が示すグループとは進化的に早い時期に分岐しており、プラスミドの複製に関与する因子群が機能的に相補できない可能性が考えられる<sup>23)</sup>。

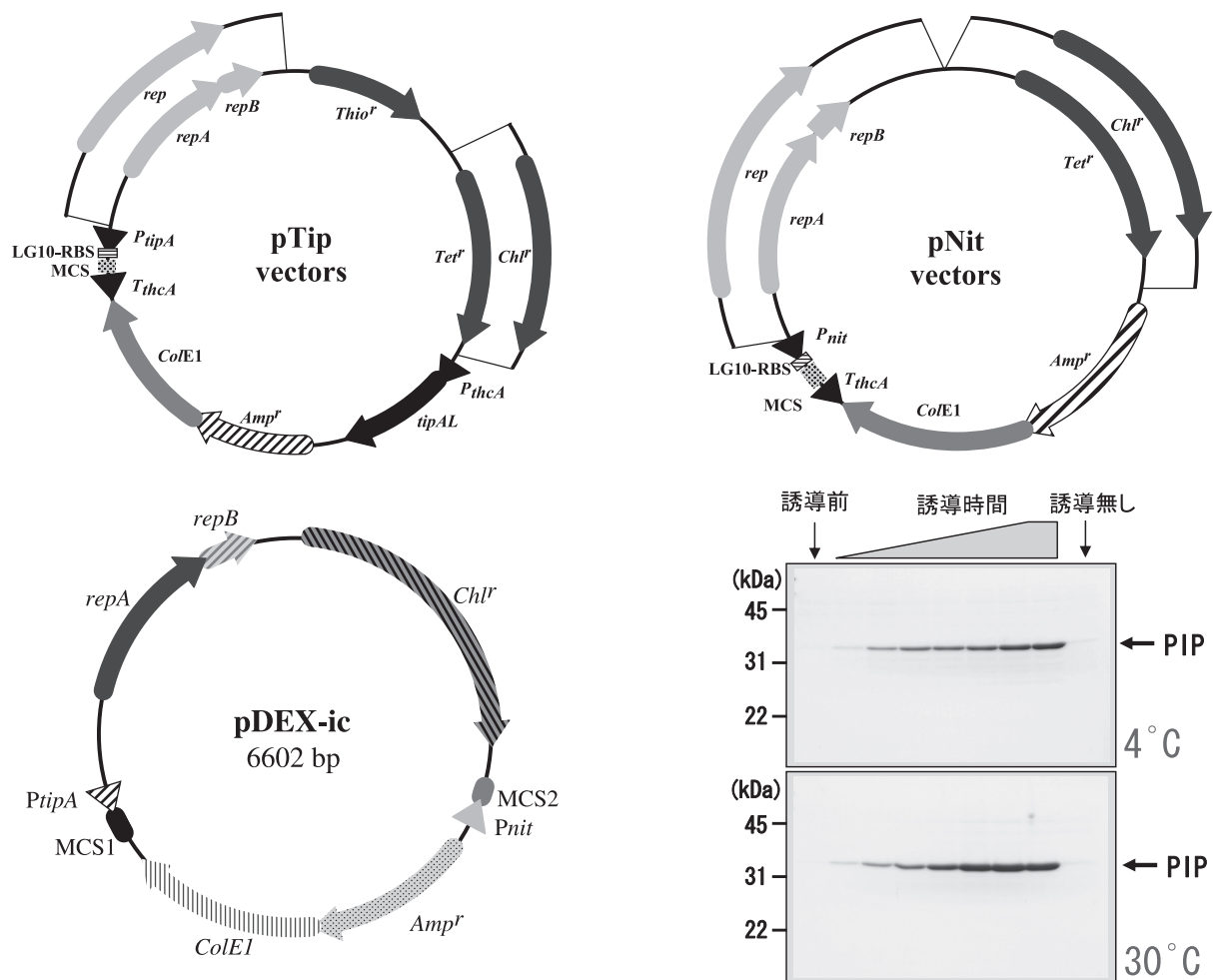


図 1. *Rhodococcus* 属細菌を宿主とした各種発現ベクター。

誘導型発現ベクター (上図左)、構成型発現ベクター (上図右)、共発現ベクター (下図左) の各発現ベクターは大腸菌とのシャトルベクターで、*Rhodococcus* 属細菌で自律増殖に必要な遺伝子、*rep* (rolling circle 型) あるいは *repAB* ( $\theta$ -型) のどちらかが組み込まれている。抗生物質耐性遺伝子も *Tet<sup>r</sup>* あるいは *Chl<sup>r</sup>* のどちらかが組み込まれており複製様式と抗生物質耐性遺伝子の組合せにより使用するベクターを選択できる。下図右は、レポーター遺伝子として古細菌由来プロリンイミノペプチダーゼ遺伝子 (*pip*) を利用して、誘導型プロモーター支配下におけるチオストレプトン依存的な発現変動を確認。

*tipA* プロモーターは、*S. coelicolor* より *Rhodococcus* 属細菌由来宿主の同プロモーターがより強い活性を示すと考え、*Rhodococcus opacus* PD630 株より *tipA* 遺伝子を単離し、そのプロモーター活性を測定してみると確かに *S. coelicolor* 由来のものよりも誘導活性は高い事が判明した<sup>9)</sup>。しかし、*R. opacus* 由来 *tipA* プロモーターはチオストレプトン無添加の状態でも細胞内にレポーター遺伝子の発現が確認され、チオストレプトン非存在下における発現がある程度高いことが示唆された。*S. coelicolor* 由来プロモーターでは誘導剤非存在下では非常に低い発現しか確認されない事から、*tipA* プロモーターに関しては、使用する宿主の近縁細菌よりはむしろ遠縁の細菌由来のものを使用することでより発現制御が容易になったと言える。

構築した発現ベクターによるタンパク質発現は *R. erythropolis* を宿主とした場合、4 度から 30 度のいずれにおいても可能で、チオストレプトン添加により有意な発現を確認する事が出来る (図 1)。また発現時に使用するチオストレプトン量も 10 ng/ml 程度の濃度から発現が誘導され、最大発現量は 1 µg/ml 程度の終濃度で確認される。タンパク質の発現速度は、30 度で培養した場合 16 時間程度でレポーター遺伝子産物の細胞内蓄積量が最大になることが確認されているが、発現温度を低くするとそれだけ誘導に時間を要する<sup>20)</sup>。この発現誘導は、チオストレプトンが TipAL タンパク質に共有結合するため、一旦発現が ON になると培地からチオストレプトンを取り除いても転写活性は OFF にはならない。細胞増殖や分解などにより細胞内チオストレプトン結合型 TipAL の濃度が下がるまでは発現が継続されるため、継続的な発現系の構築には適した系であると考えられる。

pNit ベクターに用いた構成型プロモーターは、誘導型発現ベクターの改良を進めている際、偶然発現レベルの高いプロモーターとして利用できるものが見つかった。*tipA* プロモーターの -35 ボックスはそのままに、-10 ボックス配列 (CAGCGTG) のみ細菌のプロモーターとしてよく保存されている同ボックス配列 (TATAAT) に改変すると、もはやチオストレプトンによる発現制御が不能になり、構成型プロモーターへと機能改変されることが見出された<sup>23)</sup>。レポーター遺伝子を用いた発現解析から、改変プロモーターにより構成的に発現されるタンパク質レベルは、pTip ベクターによる最大誘導活性時のほぼ半分であり、タンパク質の発現レベルとしては充分であった。この改変プロモーターを導入した構成型発現ベクター (pNit ベクター) の開発により、誘導型ベクターと組み合わせた多様な発現系が可能となった。

## 2.2. 発現系の多様性と応用

上述した、pTip、pNit ベクターにはそれぞれ 2 つの異なる複製開始起点 (pRE2895 と pRE8424 由来) を組込んであるため、複製開始起点の異なる 2 種のベクターを組合せて形質転換すれば両プラスミドは不和合性を示さず細胞内に保持させる事が可能である。また、pRE2895 由来複製開始起点は、抗生剤による選択圧をかけていないと細胞から抜け落ちるように細胞内安定性をあえて下げて構築している。そのため、プラスミドシャ

フリリング様の使い方も可能で、2 種のプラスミドを細胞内に保持させておいて片方のプラスミドだけ細胞から欠落させる事も可能となる。最近、37 度の培養条件下ではプラスミドの複製・維持が困難なプラスミド (pB264) も報告されており<sup>15)</sup>、こうした温度感受性プラスミドを利用した発現系構築や機能解析も有用なツールになると考えられる。

上記、2 種のプラスミドによる共発現系に限らず、同一ベクター上に 2 種のプロモーターを配した共発現用ベクターの構築も行われている<sup>18)</sup>。一方が構成型プロモーターに対して他方が誘導型プロモーターであるため、遺伝子の発現タイミングをずらしたタンパク質の発現も可能となる。本ベクターの使用には、宿主細胞に *tipA* 遺伝子とチオストレプトン耐性遺伝子をあらかじめ導入しておく必要があるが、複数のタンパク質を同一ベクターより発現させる系としては有用であると思われる。

以上記載した各種ベクターの開発により、タンパク質生産時におけるプロモーター (誘導型・構成型) の選択や、ベクターがもつ複製開始起点の選択により、単一タンパク質から複数のタンパク質共発現系の構築まで、多様な発現系の構築が可能となった。筆者らはこれまで 500 種以上のタンパク質について発現系を構築し発現を試みてきたが、遺伝子情報からそのタンパク質の発現や可溶性の可否、発現量を予測することは非常に難しい。現状での大腸菌を宿主とした発現系と比較して *R. erythropolis* を宿主とした場合の特徴的な発現例を以下に記載する。

まず最初は大腸菌では細胞増殖阻害活性を示す酵素や不溶化する酵素について、低温環境下で発現させる事によって発現可能になる場合が観察された。低温でのタンパク質生産は、タンパク質の機能 (酵素) 活性を抑制することのみならず、タンパク質の不溶化 (封入体形成) を防ぐ別の効果を示すと考えられる。タンパク質の不溶化要因としては、1) タンパク質生産速度が速すぎるために局所的にタンパク質濃度が高まったこと、2) 細胞内還元状態の違い、3) 翻訳後修飾系が存在しないこと、4) シャペロンやフォルダーゼなどの不適切な相互作用、5) 非特異的なジスルフィド結合などが予想される。*Rhodococcus* 属細菌では、還元状態をはじめ細胞内環境が大腸菌とは異なると推定されるため、低温での発現によるタンパク質合成速度を低下させる事との相乗効果により結果として既存の系とは異なるタンパク質生産能を示すのかもしれない。

次に、GC 含量の高い微生物由来のタンパク質の方が平均的に発現効率が高いようである。*Streptomyces* 属細菌をはじめとして GC 含量が 60-70% と高い遺伝子と、GC 含量の低い生物種由来の遺伝子を用いたタンパク質発現では平均的に前者の遺伝子によるタンパク質発現が高い。一般的に、発現する遺伝子と宿主のコドン使用頻度の違いがタンパク質発現効率と有意な相関を示すのか未だ決着は付いていないと思われるが、本発現系では上述のようにある程度の傾向が見て取れる。また同一微生物由来の遺伝子について大腸菌では発現できても *R. erythropolis* では発現できない場合もある。しかし、大腸菌では発現できなかったタンパク質の 3 割程度に

については *R. erythropolis* では発現が可能になるなど、明らかに大腸菌とは異なる成績が得られている。一方、組換えタンパク質精製の観点からは、His-tag を融合したタンパク質精製時に、Ni-NTA Sepharose などの精製担体に対して非特異的に吸着する宿主由来タンパク質が大腸菌に比べて少ないことから、大腸菌の発現系より精製度が高いタンパク質を調製出来るという利点もある。いずれにしても、発現するタンパク質に応じて本発現系と大腸菌の系を併用する事で互いの欠点を補う発現系の構築が可能であると思われる。

### 3. 宿主細胞の機能改変

#### 3.1. リゾチーム感受性株

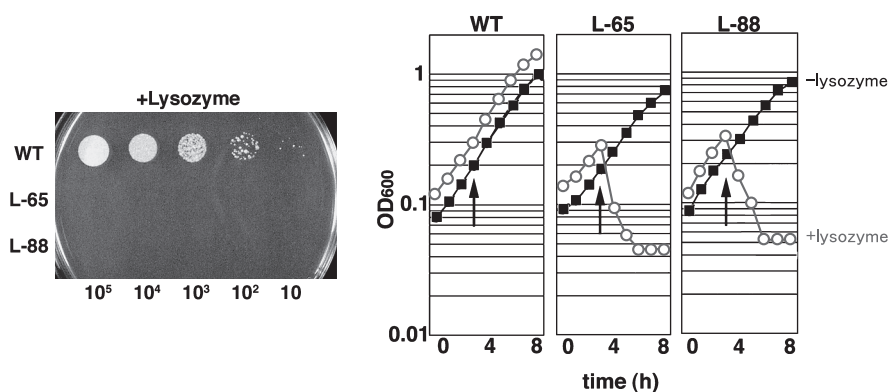
宿主細胞として利用した *Rhodococcus* 属細菌は、グラム陽性菌であるため一般的にリゾチーム (EC3.2.1.17) (細菌細胞壁のムコペプチドなどに存在する N-アセチルムラミン酸 (MurNAc) と N-アセチルグルコサミン (GlcNAc) 間の  $\beta$ -1,4 結合間を加水分解する酵素) に対して感受性を示すと予想されるが、実際は強い耐性を示す。リゾチームを数 mg/ml の濃度になるよう培地に添加しても細胞増殖には何ら影響を示さない。また細胞壁は強固で破砕が非常に困難であることから、細胞内タンパク質の回収効率は著しく低い。そこで、発現したタンパク質の精製効率を高めるため、UV 照射による変異 *R. erythropolis* ライブラリーからリゾチーム感受性を示す L-88 と L-65 と名付けられた変異株が取得された (図 2)<sup>17)</sup>。得られた変異株 L-65 と L-88 は、リゾチーム濃度が 12.5  $\mu$ g/ml 程度で溶菌する非常に感受性が高い株であった。リゾチーム感受性を引き起こした原因遺伝子を探索すると、L-65 と L-88 株の両株で同一のもので、コリネ属細菌で同定されていた *ltsA* 遺伝子のホモログである事が判明した。*ltsA* 遺伝子は、グルタミンからグルタミ

ン酸へ触媒するグルタミナーゼ活性と、脱アミノ化により得られるアンモニアを ATP 依存的に基質にアミド化する 2 反応を触媒するグルタミンアミドトランスフェラーゼファミリーに属する酵素をコードしている遺伝子として知られる<sup>9)</sup>。L-88 と L-65 株における *ltsA* はともに点突然変異が確認されており、グルタミナーゼ活性を指標とした生化学的な活性測定でも明らかに野生型酵素に比べて触媒活性の低下が示された。*Rhodococcus* 属細菌ではペプチドグリカンの D-Glu と meso-DAP (diaminopimelic acid) がアミド化されている事から<sup>8,26)</sup>、*LtsA* タンパク質は、ペプチドグリカンの架橋構造に影響を及ぼしていると考えられる。

本リゾチーム感受性変異株は、細胞増殖や発現ベクター導入効率、そして組換えタンパク質発現量において野生株と何ら遜色もないことから、組換えタンパク質発現系の宿主として非常に有用な菌株である。

#### 3.2. プロテアーゼ欠損株

大腸菌を利用した発現系でよく利用される宿主は、*ompT* と *lon* の両プロテアーゼ遺伝子が欠失しておりタンパク質発現時そして精製時における非特異分解を抑制するような変異株である。微生物における細胞内タンパク質は、そのほとんどが ATP-依存性プロテアーゼによりオリゴペプチドへの初期分解を受けた後に、各種ペプチダーゼによりアミノ酸までの分解を受ける。このことから、細胞内 ATP-依存性プロテアーゼの欠損により、組換えタンパク質の細胞内蓄積効率が高まる可能性がある。そこで、*Rhodococcus* 属細菌に発現しているプロテアソームについてその欠損株を作製し、組換えタンパク質の蓄積量が調べられた。プロテアソームは、 $\alpha$  と  $\beta$  の 2 成分からなる高分子量複合体プロテアーゼで、ATPase 複合体と相互作用しながらタンパク質を分解する、高等動物まで広く保存されている酵素である。この、 $\beta$  サブユニットの遺伝子破壊株を作製しタンパク質



	MIC ( $\mu$ g/mL)	Transformation efficiency (cfu)
WT	>1000	$4.0 \times 10^5$
L-65	12.5	$2.6 \times 10^5$
L-88	12.5	$2.5 \times 10^5$

図 2. リゾチーム感受性変異株。

L-65 と L-88 変異株におけるリゾチーム感受性は、リゾチーム濃度を 12.5  $\mu$ g/ml に添加する事でプレート上では培養不能となり (上図左)、液体培養でも同濃度のリゾチーム添加により溶菌が確認される (上図右)。下図では、両変異株における形質転換効率が野生株と遜色ないことを示している。

発現を検討すると、タンパク質によっては明らかに細胞内蓄積量が増加している事が判明した。*Streptomyces lividans* を用いた同様の実験でも、プロテアソーム欠損株での発現タンパク質の蓄積量が増加する結果が報告されており<sup>14)</sup>、蓄積増加が見られたタンパク質は、野生株ではプロテアソームによって優先的にあるいは選択的に分解を受けていた可能性がある。大腸菌では ClpPX により分解される細胞内タンパク質の同定と、分解シグナルについての解析が行われている<sup>7)</sup>。ClpP は真生細菌には広く保存されていることから、*Rhodococcus* 属細菌でも同様の分子認識と分解が行われている可能性が高い。今後は、プロテアソームを介したタンパク質分解系の解析により細胞内タンパク質の安定性を高めるための基盤情報が得られる可能性がある。

#### 4. トランスポゾンベクター

タンパク質の発現、あるいは宿主細胞の機能改変や有用遺伝子探索に向けて更なる研究を進展させるため、*R. erythropolis* NI86/21 より挿入配列 IS21 ファミリーに属する IS1415 を利用したトランスポゾンベクターが開発された<sup>20,24,25)</sup>。IS21 ファミリーはトランスポザーゼ (IstA) とコインテグラーゼ (IstB) それぞれをコードする遺伝子がオペロン構造をとり、その両端に反復配列が配置している<sup>1)</sup>。そして IstAB の働きにより、反復配列に挟まれた領域をゲノム中に転位する事が可能になる。そこで、この反応を利用して、IS1415 を改変した図 3 に示すようなトランスポゾンベクター pTNR が構築された<sup>24)</sup>。本ベクターの特徴は、大腸菌での自律増殖が可能であるが *Rhodococcus* 属細菌内での自律複製が出来ないこと、istAB を挟んでいた反復配列を、大腸菌と *Rhodococcus* 属細菌内の両細胞で機能するカナマイシン耐性遺伝子 (kan) と大腸菌の ori を挟むように逆向きに配し、この

挟まれた領域が宿主細胞のゲノム内に転位されること等である。このような特徴から、pTNR により遺伝子挿入された部位が容易に同定する事が可能になる。即ち、ゲノムに挿入されるのは、上述した抗生剤耐性遺伝子と ori であるため、挿入された両遺伝子領域を消化しない制限酵素でゲノムを切断し、閉環化した環状 DNA を大腸菌に形質転換すると、ゲノム挿入部位周辺を含むプラスミドとして回収する事が可能になる (図 4)。

IS1415 における転位は任意の 5 から 7 塩基配列 (認識される配列の 9 割は 6 塩基配列) を認識して起こる。認識配列が短いため、非特異部位に DNA 断片が転位した変異ライブラリーの構築が可能である。また、*R. erythropolis* を宿主とした場合の変異体作製効率は、これまで報告されている *Rhodococcus* 属細菌を宿主としたトランスポゾンベクターによる変異効率より非常に高いゲノム挿入効率を示す ( $1.23 \times 10^6 / \mu\text{g}$  pTNR)<sup>6,16,24)</sup>。このことから、同ベクターは、宿主細胞の機能改変や新規有用遺伝子探索に大きな威力を発揮するものと期待される。

pTNR ベクターによるゲノムへの外来遺伝子挿入が可能であるという事実から、新たな展開としてタンパク質を発現する発現カセットをゲノムに導入する、ゲノム挿入型発現系が構築された<sup>25)</sup>。更に、複数の発現カセットを同一ゲノム上へ転位する技術も開発された。pTNR を改変しカナマイシン耐性遺伝子領域を、チオストレプトン、クロラムフェニコール、アプラマイシン耐性遺伝子にそれぞれ置き換えた pTNR-KA, pTNR-TA, pTNR-CA, pTNR-AA が構築され、同一ゲノム上へ最大 4 種の外来遺伝子の挿入が可能となった。

また各ベクターには DNA の挿入が容易になるようマルチクローニングサイトが用意され、同サイトに *S. coelicolor* 由来プロテアソームの  $\alpha$  あるいは  $\beta$  サブユニット遺伝子の発現カセットを導入したベクター 2 種

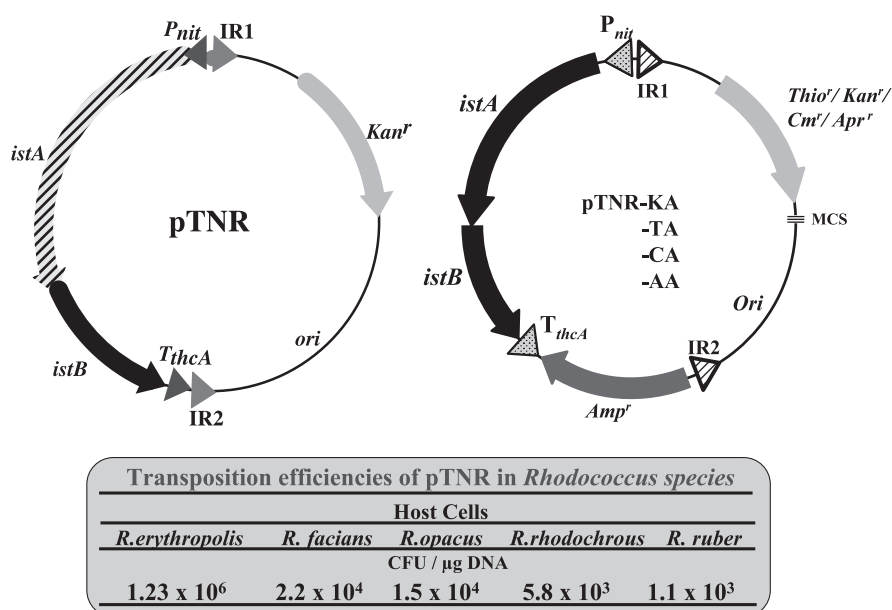


図 3. トランスポゾンベクター。

トランスポゾンベクター (pTNR) とその改変型ベクター (pTNR-KA, pTNR-TA, pTNR-CA, pTNR-AA)。下図には、pTNR の *Rhodococcus* 属細菌における転位効率を示す。

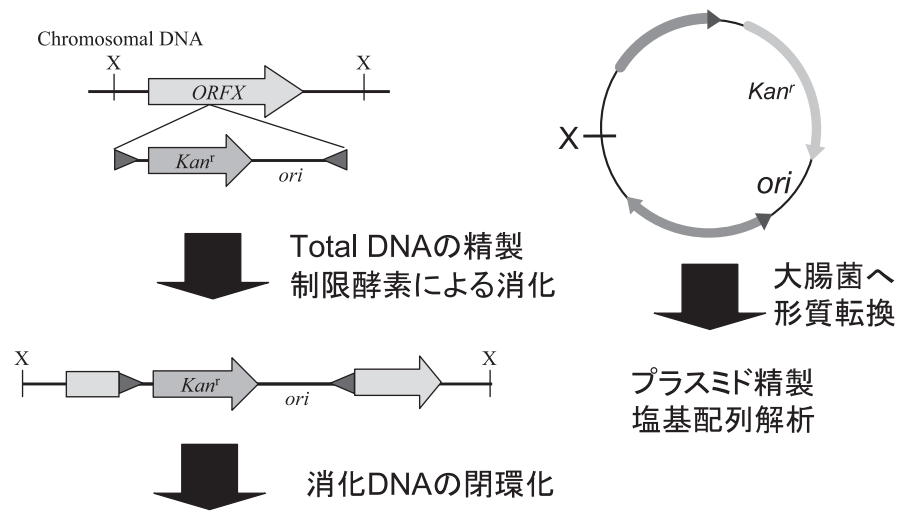


図4. トランスポゾンベクター挿入領域の解析。

pTNRをはじめとするトランスポゾンベクターによりゲノムに挿入される DNA 領域には、抗生剤耐性遺伝子と大腸菌クローニングベクターの複製開始起点 (*ori*) が含まれる。ゲノムを任意の制限酵素で消化した後、閉環化して大腸菌に形質転換することでプラスミドとしてゲノムに挿入されていた部位を含む領域領域を回収する事が可能になる。

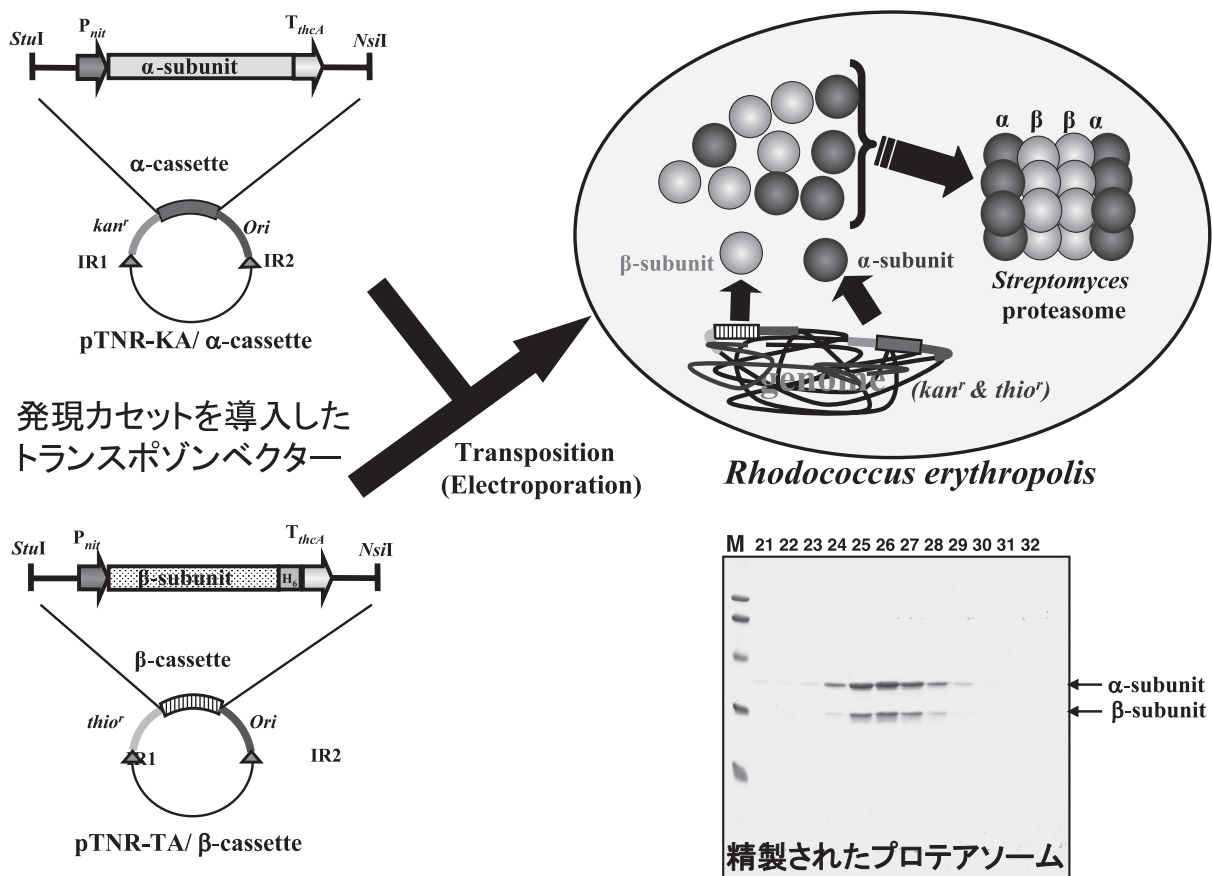


図5. トランスポゾンベクターを用いたゲノム挿入型発現系。

プロテアソームの構成サブユニットそれぞれに対する発現ベクターを構築し、それらを挿入したトランスポゾンベクターを2種を宿主細胞に転位させた。両発現カセットがゲノムに挿入された細胞から、両サブユニットが発現し会合した活性型プロテアソームを精製する事が出来た。

を構築し *R. erythropolis* ゲノム内へ転位させると、ゲノムへ挿入された発現カセットより両サブユニットが発現し、予想された複合体形成が確認された (図 5)。この結果より、ゲノムへ挿入された 1 コピーの発現カセットでも十分な発現量が期待できることを示している。そして、挿入した発現カセットはゲノムへ安定に保持されることから、プラスミドを用いた発現とは異なり、発現カセット保持のために選択圧をかけなくとも安定な発現が期待できる。

## 5. おわりに

本総説で紹介した宿主-ベクター系は、筆者らの成果を中心に記述したが、*Rhodococcus* 属細菌の研究を展開する上で汎用性をもったシステムが構築されつつある。タンパク質発現系は、宿主細胞からタンパク質を回収するばかりが主目的ではないはずで、タンパク質を細胞内に蓄積した高機能型細胞を構築して多様な表現型を示す触媒細胞を構築し利用する事も可能になる。特に、*Rhodococcus* 属細菌をはじめとする放線菌では、表現型が多様である事から新規遺伝子の探索源として有望視されているにも関わらず、それら遺伝子の機能解析は大腸菌では困難なケースが少なくなかった。筆者らは、大腸菌では発現が困難な放線菌由来の遺伝子を発現した高機能化細胞の構築や、複数の酵素からなる反応系をゲノム挿入型発現系と発現ベクターを併用する形で共発現し、それら酵素群による微生物触媒の創成にも成功している。また、大腸菌では膜透過が困難な物質についても、*Rhodococcus* 属細菌では微生物触媒による変換反応が可能になる例などを確認している。*Rhodococcus* 属細菌を宿主とする事で大腸菌とは異なる触媒反応を再構築できることは、今後の研究を進める上で非常に重要なポイントになると思われる。これら微生物触媒の詳細については、別の機会に改めて紹介する事にしたい。

最後に本総説で記述した実験材料は供与可能であり、発現ベクター類は、*R. erythropolis* 以外の *Rhodococcus* 属細菌への利用、トランスポゾンベクターは *Rhodococcus* 属細菌以外の放線菌やグラム陽性菌にも利用できる可能性があります。興味を持たれた方は是非御一報頂ければ幸いです。

## 謝 辞

本研究は、産業技術総合研究所ゲノムファクトリー研究部門遺伝子発現工学研究グループ (URL : <http://unit.aist.go.jp/rigb/gf-ppt/index.html>) で行われた研究成果であり、これまで一緒に研究をした全てのメンバーに深く感謝します。

## 文 献

- Berger, B., and D. Haas. 2001. Transposase and integrase: specialized transposition proteins of the bacterial insertion sequence IS21 and related elements. *CMLS, Cell. Mol. Life Sci.* 58: 403–419.
- Ciu, M.L., P.H. Viollier, T. Katoh, J.J. Ramsden, and C.J. Thompson. 2001. Ligand-induced changes in the *Streptomyces lividans* TipAL protein imply an alternative mechanism of transcriptional activation for Mer-Like proteins. *Biochemistry* 40: 12950–12958.
- Dabrock, B., M. Kessler, B. Averhoff, and G. Gottschalk. 1994. Identification and characterization of a transmissible linear plasmid from *Rhodococcus erythropolis* BD2 that encodes isopropylbenzene and trichloroethane catabolism. *Appl. Environ. Microbiol.* 60: 853–860.
- de Carvalho, C.C.C.R., and M.M.R. da Fonsaca. 2005. The remarkable *Rhodococcus erythropolis*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 67: 715–726.
- Dong, L., N. Nakashima, N. Tamura, and T. Tamura. 2004. Isolation and characterization of the *Rhodococcus opacus* thioestrepton-inducible genes *tipAL* and *tipAS*: application for recombinant protein expression in *Rhodococcus*. *FEMS Microbiol.* 237: 35–40.
- Fernandes, P.J., J.A.C. Powell, and J.A.C. Archer. 2001. Construction of *Rhodococcus* random mutagenesis libraries using Tn5 transposition complexes. *Microbiology* 147: 2529–2536.
- Flynn, J.M., S.B. Neher, Y.-I. Kim, R.T. Sauer, and T.A. Baker. 2003. Proteomic discovery of cellular substrates of the ClpXP protease reveals five classes of ClpX-recognition signals. *Mol. Cell.* 11: 671–683.
- Ghuysenm, J.M. 1968. Use of bacteriologic enzymes in determination of wall structure and their role in cell metabolism. *Bacteriol. Rev.* 32: 425–464.
- Hirasawa, T., M. Wachi, and K. Nagai. 2001. A mutation in the *Corynebacterium glutamicum* *ltsA* gene causes susceptibility to lysozyme, temperature-sensitive growth, and L-glutamate production. *J. Bacteriol.* 182: 2696–2701.
- Holmes, D.J., J.L. Caso, and C.J. Thompson. 1993. Autogenous transcriptional activation of a thioestrepton-induced gene in *Streptomyces lividans*. *EMBO J.* 12: 3183–3191.
- Hong, B., L. Wang, E. Lammertyn, N. Geukens, L.V. Mellaert, Y. Li, and J. Anné. 2005. Inactivation of the 20S proteasome in *Streptomyces lividans* and its influence on the production of heterologous proteins. *Microbiology* 151: 3137–3145.
- Kahmann, J.D., H.-J. Saa, M.G. Allan, H. Seto, C.J. Thompson, and S. Grzesiek. 2003. Structural basis for antibiotic recognition by the TipA class of multidrug-resistance transcriptional regulator. *EMBO J.* 22: 1824–1834.
- Larkin, M.J., L.A. Kulakov, and C.C. Allen. 2006. Biodegradation of members of the genus *Rhodococcus*: biochemistry, physiology, and genetic adaptation. *Adv. Appl. Microbiol.* 59: 1–29.
- Larkin, M.J., R. De Mot, L.A. Kulakov, and I. Nagy. 1998. Applied aspects of *Rhodococcus* genetics. *Antonie van Leeuwenhoek* 74: 133–153.
- Lessard, P.A., X.M. O'Brien, D.H. Currie, and A.J. Sinsky. 2004. pB264, a small, mobilizable, temperature sensitive plasmid from *Rhodococcus*. *BMC Microbiol.* 4: 15.
- Mangan, M.W., and W.G. Meijer. 2001. Random insertion mutagenesis of the intracellular pathogen *Rhodococcus equi* using transposomes. *FEMS Microbiol. Lett.* 205: 243–246.
- Mitani, Y., X.Y. Meng, Y. Kamagata, and T. Tamura. 2005. Characterization of *LtsA* from *Rhodococcus erythropolis*, an enzyme with glutamine amidotransferase activity. *J. Bacteriol.* 187: 2582–2591.
- Mitani, Y., N. Nakashima, K.I. Sallam, T. Toriyabe, K. Kondo, and T. Tamura. 2006. Advances in the development of genetic tools for the genus *Rhodococcus*. *Actinomycetologica* 20: 55–61.
- Murakami, T., T.G. Holt, and C.J. Thompson. 1989. Thioestrepton-induced gene expression in *Streptomyces lividans*. *J. Bacteriol.* 171: 1459–1466.
- Nagy, I., G. Schoofs, J. Vanderleyden, and R. De Mot. 1997. Transposition of the IS21-related element IS1415 in *Rhodococcus erythropolis*. *J. Bacteriol.* 179: 4635–4638.
- Nakashima, N., Y. Mitani, and T. Tamura. 2005. Actinomycetes as host cells for production of recombinant proteins.

- Microbial. Cell Fact. 4: 7.
- 22) Nakashima, N., and T. Tamura. 2004. A novel system for expressing recombinant proteins over a wide temperature range from 4 to 35°C. *Biotechnol. Bioeng.* 86: 136–148.
  - 23) Nakashima, N., and T. Tamura. 2004. Isolation and characterization of a rolling-circle-type plasmid from *Rhodococcus erythropolis* and application of the plasmid to multiple-recombinant-protein expression. *Appl. Environ. Microbiol.* 70: 5557–5568.
  - 24) Sallam, K.I., Y. Mitani, and T. Tamura. 2006. Construction of random transposition mutagenesis system in *Rhodococcus erythropolis* using IS1415. *J. Biotech.* 121: 13–22.
  - 25) Sallam, K.I., N. Tamura, and T. Tamura. 2007. A multipurpose transposon-based vector system mediates protein expression in *Rhodococcus erythropolis*. *Gene* 386: 173–182.
  - 26) Schleifer, K.H., and O. Kandler. 1972. Peptidoglycan types of bacterial cell walls and their taxonomic implications. *Bacteriol. Rev.* 36: 407–477.
  - 27) Simizu, S., H. Kobayashi, E. Masai, and M. Fukuda. 2001. Characterization of the 450-kb linear plasmid in a polychlorinated biphenyl degrader, *Rhodococcus* sp. strain RHA1. *Appl. Environ. Microbiol.* 67: 2021–2028.