T7 ファージ RNA ポリメラーゼを利用した新しい外来遺伝子発現系の開発

宮崎大学工学部物質工学科 廣瀬 遼

T7, T3, Sp6 などのバクテリオファージ由来の RNA ポリメラーゼは、転写速度が非常に速く、しかもファージ由来のプロモーターとターミネーターを特異的に認識するために、その間に目的遺伝子を挿入することにより、その遺伝子産物を選択的かつ大量に得ることが可能である。大腸菌 T7 ファージ由来のポリメラーゼ (T7 RNAP) による $\phi 10$ プロモーター (以下、T7 プロモーター) からターミネーターまでの転写を利用した遺伝子発現系は、pET システムとしてすでに大腸菌を宿主とした外来遺伝子の発現に頻繁に用いられている。一方 T7 RNAP は、他のタイプの RNA ポリメラーゼのような複雑なサブユニット構成をとらず、単一のポリペプチドから構成されるために、それ自身をコードする遺伝子を種々の細胞中に導入して異種タンパク質として容易に発現できる。そこで、ここ10年来 T7 RNAP 転写系を動物培養細胞に導入した宿主を用いたいくつかの外来遺伝子発現系の構築が試みられてきた。また、この小型高性能な T7 RNAP を大腸菌以外の種々の微生物での異種タンパク質発現に用いることは、微生物利用という見地から興味もたれ、ここではそれに関する最近の報告を紹介する。

Herrero らは、*Pseudomonas putida* を宿主とし、芳香族化合物を誘導物質とする外来遺伝子の特異的発現系の構築を試みた。¹⁾ トルエン分解系プラスミド (TOL) 由来の芳香環メタ開裂オペロンプロモーター (*Pm*) の下流に連結した T7 RNAP 遺伝子が、トランスポゾン Tn5 を介して *P. putida* の染色体上に導入され、さらに目的の外来遺伝子 *lacZ* も同様に、T7 プロモーターとともに Tn5 を介して同一染色体の異なる位置に挿入された。*Pm* の誘導物質である *m*-トルイル酸の存在下で T7 RNAP が供給され、 β -ガラクトシダーゼ (*LacZ*) 活性が発現した。一方、*m*-トルイル酸非存在下での発現は完全に抑制された。本発現系では、目的遺伝子が染色体中に組み込まれているため安定であり、また安価な誘導物質による発現の厳密な制御が可能であるために、環境微生物中での種々の有用遺伝子の発現への利用が期待されている。

T7 RNAP のプロモーター特異的転写能を用いた遺伝子発現は、組換えタンパク質の取得だけではなく種々のマーカー遺伝子の選択的発現を行う場合にも有利である。Christensen らは、T7 RNAP の強力な転写能と緑色蛍光色素タンパク質 (GFP) の発現を共役することによって、トルエン分解系プラスミド (TOL) の *P. putida* 間の接合伝達をモニタリングする系を構築した。²⁾ すなわち、TOL にマーカーとして GFP 遺伝子を T7 プロモーターの下流に挿入した TOL-*gfp* をプラスミド供与菌に導入し、また、あらかじめ T7 RNAP 遺伝子を染色体に組み込んだ菌株をプラスミド受容菌として用いた。接合伝達によって TOL-*gfp* を獲得した受容菌は、T7 RNAP の強力な転写により GFP を大量発現し、照射下で供与菌と区別して発光検出される。彼らは、この巧妙な系を利用して、TOL-*gfp* の供与菌と受容菌との間の寒天培地上での接合伝達の過程を経時的かつ視覚的に追跡することに成功した。

一方、グラム陽性菌のタンパク質分泌能と強力な T7 RNAP 転写系の組み合わせによって、異種タンパク質を培養上清に大量生産させる系の構築も試みられている。Wells らは、破傷風毒素フラグメント C (TTFC) をモデルタンパク質として、その *Lactobacillus lactis* を宿主とした菌体外生産を試みた。³⁾ T7 プロモーターとターミネーターの間に、同菌由来の細胞壁プロテアーゼ遺伝子 (*prt*) に由来するの SD 配列と分泌シグナル配列を挿入した発現ベクター pLET3 を構築し、これを用いて TTFC 遺伝子を *L. lactis* にて発現したところ、2.9 mg/l の TTFC が培地中へ分泌生産された。また同様に Conrad らは、⁴⁾ *Bacillus subtilis* に T7 RNAP 転写系を導入し、*Thermoactinomyces vulgaris* 由来の α -アミラーゼ遺伝子の発現を行った結果、培養上清に 70 mg/l の α -アミラーゼが確認されたと報告している。*L. lactis*, *B. subtilis* のいずれを宿主を用いた場合でも、分泌シグナルのプロセッシングを受けていない前駆体の細胞質内での蓄積が起こっており、細胞膜透過およびシグナルのプロセッシング能力の改善が菌体外生産量向上の課題であると指摘されている。

以上のように T7 RNAP 転写系は、各種組換えタンパク質の取得の目的だけではなく、厳密な制御を要する遺伝子の発現系の構築や、マーカー遺伝子の高感度な検出法の開発に利用された。これらの実例は、その新たな利用法を考案するうえで多くの示唆を与えるものと考えている。

- 1) Herrero, M. *et al.*: *Gene*, **134**, 103 (1993).
- 2) Christensen, B. B. *et al.*: *Gene*, **173**, 59 (1996).
- 3) Wells, J. M. *et al.*: *Appl. Environ. Microbiol.*, **59**, 3954 (1993).
- 4) Conrad, B. *et al.*: *Mol. Gen. Genet.*, **250**, 230 (1996).