

論文の内容の要旨

論文題目 「ヨーグルト乳酸菌の安全な遺伝子操作系の構築に関する研究」

氏名 伊藤喜之

ヨーグルト乳酸菌 *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* (*L. bulgaricus*; LB)と *Streptococcus thermophilus* (*S. thermophilus*; ST)の遺伝子操作法を確立し、実用レベルで安全性を追求した組換え菌を作製することを目的として、以下のような研究を行った。

第1章 *L. bulgaricus* 宿主・ベクター系の構築

それまで非常に困難で全く前例がなかった LB の形質転換を可能にするために、ベクターの材料となる LB の native プラスミドの検索を行った。LB 50 株以上を調べた結果、唯一 M-878 株中にプラスミド pBUL1 (7894 bp) を見出した。配列中には 4 つの ORF が存在した。intergenic な *Xba* I サイトにエリスロマイシン(Em)耐性遺伝子(*ermA*)を結合し、*Lactococcus lactis* subsp. *lactis* (*Lc. lactis*) IL1403 株へ形質転換したところ、Em 耐性の形質転換体を得られ組換えプラスミド(pX3)を保持していた。pBUL1 の複製には、8-nt. モチーフと繰り返し配列を含む *ori* 領域とその上流の DNA primase と推定される 2559-bp の ORF が必要であった。既知の類縁菌由来プラスミドのうち、pWS58 との類似性が認められた。

M-878 株の pBUL1 キュアリング株 BG を宿主とし、pX3 を用いてエレクトロポレーションによる形質転換条件を検討した。パルスによるダメージを抑えるため菌内の電圧差が

少なくなるように菌形ができるだけ短くなる培養条件を検討した結果、培地の初発 pH を 5.5 とすることが有効であった。さらに 48°C で 5~10 分間処理することにより自己溶菌活性を誘導して細胞壁を弱化させること、パルス後の培養にミルク成分を主体とする EXBG 培地を用いること、などを組み合わせて、1~10 / μg pX3 と低い頻度ながら初めて LB の形質転換に成功した。本法法で LB の他株および同種 2 亜種 (*Lactis, delbrueckii*) でも形質転換が可能であった。

LB の形質転換株から pX3 を調製し、BG 株へ形質転換したところ、 4×10^4 / μg と頻度が 10^3 倍以上向上した。さらに、pX3 をキュアリングした形質転換株の一株 (T-11) では、IL1403 から調製した pX3 でも高い頻度で形質転換が可能で、T-11 由来の pX3 を BG 株に形質転換しても頻度が向上しなかったことから、BG (= M-878) 株に制限修飾 (RM) 系があり、T-11 は両活性の欠損株であると考えられた。BG (RM⁺) と T-11 (RM⁻) の形質転換体から調製した pX3 を種々の制限酵素で切断すると前者では *TthHB8 I* (5'-TCGA-3') で一部の認識部位だけが切れなくなっていた。また RM⁺ 株の染色体は *Xho I* (5'-CTCGAG-3') で全く切断されないが、T-11 株染色体は切断が可能であった。そこで、M-878 由来ライブラリを *Xho I* で切断し、耐性を発現するクローンとして RM 遺伝子をクローニングした。R 遺伝子 (4443 bp) は DNA/RNA helicase モチーフ DEAD-box と ATP/GTP 結合モチーフを持ち、III 型の RM 系であると推定された。M 遺伝子 (792 bp) には N6 アデニン・メチレーズの保存モチーフがあったが、4 つのうち 2 つしかなく、残り 2 つは R 遺伝子の後半部に存在していた。修飾活性の認識は、新規な配列 5'-CTCGA-3' と推定された。修飾活性の発現に R 遺伝子の後半部が *trans* に必要である点で極めて特徴的であった。修飾活性に必要な R 遺伝子後半と M 遺伝子を染色体に組み込んだ中間宿主を作製してプラスミドを修飾することにより、M-878 株系統の RM⁺ 野生株へも高頻度で形質転換を行うことが可能となった。

第 2 章 *Lactococcus lactis* 由来プラスミド pSY1 の解析および乳酸菌用ベクターへの利用

Lc. lactis M-128C 株中に新規なプラスミド pSY1 (2763 bp) を見出した。pSY1 に *ermA* を結合して作製した pSYE2 でも T-11 株を形質転換することができた。pSY1 は *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* Wg2 株由来の pWVO1 と非常に類似しており、特に *repA* は 99% 以上相同で、pWVO1 と同様に rolling-circle 型の複製を行うと推定された。pSY1 と pWVO1 上の同じ部位に *ermA* を同方向に挿入したプラスミドを構築して比較し

た結果、pSY1 ベースのプラスミドは pWVO1 ベースに比べて T-11 株への形質転換頻度が約 10^2 高く、この違いは両プラスミドで異なる single-strand origin を含む領域に起因していると推定された。

pSYE2 に *Streptococcus bovis* α -アミラーゼ遺伝子 (*amyA*) のプロモーターおよびシグナル配列を結合して異種遺伝子分泌発現ベクター pSECE1 を構築した。レポーターとして *Staphylococcus aureus nuc*、*B. subtilis amyErt*、*E. coli bla* の mature 部を結合して LB などの乳酸菌に形質転換し、これらが培地中に分泌発現していることを確認した。また、*amyA* プロモーターだけを結合した発現ベクター pSBEA1 も構築した。これらによりヨーグルト乳酸菌での異種遺伝子発現を容易に行えるようになった。

乳酸菌での染色体への組み込みでは、温度感受性 (ts) 複製ベクターを用いて低温で形質転換体を取得した後、複製できなくなる高温で組み込みを誘起させることが一般的である。ts ベクターとしてよく利用される pWVO1 ベースの pG⁺host5 では LB T-11 を形質転換することができなかったが、pG⁺host5 *repA* の ts 変異を pSYE2 に移植した pSG⁺E2 では T-11 を形質転換することができた。pSG⁺E2 は LB および ST 中で、32°C ではプラスミドとして複製するが 42°C では複製できずに染色体に組み込まれ、再度 32°C に下げると組み込まれていたプラスミドが染色体から切り出される。pSG⁺E2 を利用することによりヨーグルト乳酸菌染色体上の遺伝子の操作と余分なベクター配列の除去が可能となった。

第 3 章 ヨーグルト乳酸菌で利用可能な、安全な選択系の開発

組換え体の安全性という観点からは、薬剤耐性遺伝子の使用を避けること、導入した遺伝子が容易に伝播しないこと、歴史的に安全とみなされている (GRAS) な生物由来の材料のみを用いること、が望ましい。ヨーグルト乳酸菌で利用可能な、薬剤耐性を用いない安全な形質転換体選択法として、以下を検討した。

チミジン合成酵素遺伝子 (*thyA*) を LB および ST から新規にクローニングし、選択マーカールとしての利用を検討した。ST ATCC 19258 株から高濃度のトリメトプリム処理により、チミジン要求性を示す *thyA* 変異株を取得し、宿主とした。野生型 *thyA* を pSY1 あるいは pBUL1 に結合したプラスミドを形質転換するとチミジン要求性が相補され、*thyA* が安全な選択マーカールとして利用できることが示された。また、pSY1 の ts 複製変異を用いて、ST 染色体への *thyA* と *amyA* 遺伝子の組み込みを行うことができた。

また、乳糖資化性による選択の利用を検討した。LB、ST では、乳糖は lactose permease

によって取り込まれ、菌体内β-ガラクトシダーゼによって分解される。両菌のβ-ガラクトシダーゼ遺伝子 *lacZ* を破壊して宿主とするため、遺伝子内部を欠失させた断片を pSG⁺E2 に結合し、LB T-11 株および ST ATCC 19258 株に導入して二重交叉(DCO)による遺伝子破壊を行った。得られた *lacZ* 遺伝子破壊株は、乳糖を主糖源とするスキムミルク(SM)培地では生育できず、グルコースを加えると生育した。野生型の ST *lacZ* あるいは LB *lacZ* と pSY1 を連結し、ATCC 19258 *lacZ* 破壊株を形質転換したところ、グルコースを含まない SM 培地プレートでコロニーが出現し、pSY1 に *lacZ* が結合したプラスミドを保持していた。これらのプラスミドで LB T-11 *lacZ* 破壊株を形質転換し乳糖資化性で選択することも可能であった。

両菌の *lacZ* は DNA 相同性が約 50% しかないため、LB *lacZ* 破壊株に対して ST *lacZ* を選択マーカーとして持つ ts プラスミドを用いて LB 染色体上の遺伝子操作ができる(逆の組み合わせも可能)。さらにその遺伝子改変株に対して pSY1(ts) と *lacZ* だけからなるプラスミドを用いて DCO を行うことにより *lacZ* を再生させ乳糖資化性を元に戻すことができる。これら一切の操作を薬剤耐性を使わず乳糖資化性のみでの選択により行うことが可能である。実例として、LB *lacZ* 遺伝子破壊株の D-乳酸脱水素酵素(LDH)遺伝子を ST 由来の L-LDH 遺伝子と交換し、最後に *lacZ* を野生型に戻した例を示す。

これらにより、ヨーグルト乳酸菌 LB および ST において、効率的で安全性が追求された遺伝子操作が可能となり、今後ますます進展が期待される両菌の遺伝的解析を基に、より魅力的なヨーグルト菌の創生への応用が期待できる。