

# 放線菌で機能する有用な発現ベクターの構築

2016年 1月

松本 雅子

# 放線菌で機能する有用な発現ベクターの構築

筑波大学大学院

生命環境科学研究科

生物機能科学専攻

博士（学術）学位論文

松本 雅子

## 論文の要約

放線菌はグラム陽性の真正細菌で、広く土壌に存在しているが、海洋等からも発見されており様々な自然環境に生息している。また、強固な細胞壁を持ち、非常に GC 含量が高い (約 70 %) という特徴を有している。放線菌の中でも一番良く知られているのは *Streptomyces* 属放線菌である。*Streptomyces* 属放線菌は、抗生物質や農薬・免疫抑制剤・抗寄生虫剤など我々の生活に重要な物質を生産することで知られている(Demani and Fang. 2000)。一般的に、酵素の異種発現を行う際は大腸菌が宿主として用いられることが多く、発現ベクターなどの実験ツールも数多く存在する (Studier and Moffatt. 1986, Yanisch-Perron *et al.* 1985)。しかしながら、放線菌由来の酵素を大腸菌で発現させることはコドン頻度などの問題から容易ではない。そこで大腸菌ではなく、放線菌で機能する発現系の開発が行われるようになった。これまでに放線菌で機能するプラスミドの報告はいくつかなされているものの(Kieser *et al.* 1982, Katz *et al.* 1983, Nakashima and Tamura. 2004)、大腸菌における多様な発現系と比較するとその数は非常に限られている。そこで本研究では、大腸菌と *Streptomyces* 属放線菌の両菌で複製可能なシャトルベクターの構築を行った。

供試菌株は、大腸菌 *Escherichia coli* 5 種、放線菌 *Streptomyces* 属 1 種を用いた。形質転換は大腸菌においては Sambrook *et al.* (1989) の方法を改良したものを用い、*S. lividans* の形質転換は PEG 法 (Kao and Michayluk. 1974) を用いた。構築した各プラスミドの大腸菌における安定性は以下のようにして評価した。まず、構築したシャトルベクターを保持した大腸菌の形質転換体を、適当な抗生物質を含む 2 × YT 培地で 24 時間培養した。この培養液の 1% を適当な抗生物質を含む 2 × YT 培地に新たに植菌し、さらに 24 時間培養した。この操作を 2 回繰り返した。3 回の継代培養の後に、集菌した菌体からプラスミドを抽出し、制限酵素処理後、アガロース電気泳動によりサイズの確認を行った。次に、*S. lividans*

における各シャトルベクターの安定性を、大腸菌と同様の方法で試験した。*S. lividans* を用いた安定性試験では、培地に 2 × YT 培地の代わりに YEME 培地を用いて行った。

新たに構築した 6 つの *Streptomyces-E. coli* シャトルベクターのうち、3 つについてレポーター遺伝子の発現の有無を確認することで、機能性の評価を行った。今回の実験では、3 つのレポーター遺伝子を用いてシャトルベクターの *S. lividans* 内における異種発現実験を行った。まず、レポーター遺伝子を組み込んだシャトルベクターを *E. coli* を宿主に用いて構築した。次に、構築したプラスミドを *E. coli* から抽出し、*S. lividans* を形質転換した。*S. lividans* の形質転換体は 10 ml の YEME 培地に植菌し、28°C で 120 時間振とう培養器で培養した。培養開始から 96 時間で誘導剤であるε-カプロラクタム を添加した。調製した無細胞抽出液を用いて、吸光光度計または HPLC により各レポータータンパク質の活性を測定した。また、無細胞抽出液を SDS-PAGE に供し、目的遺伝子の発現の有無を確認した。

今回、大腸菌のプラスミド複製開始起点と 3 つの異なる薬剤耐性遺伝子を組み込んだ 6 つのシャトルベクターの構築に成功した。次に、シャトルベクターの大腸菌内における安定性を調べるため、5 つの異なる大腸菌を宿主に用い試験を行った。宿主として用いた大腸菌は大きく 2 種類に分けられる。1 つは DNA クローニングの実験に広く用いられている一般的な宿主であり、もう一方は、不安定なインサートのクローニングのために設計された宿主である。大腸菌における安定性試験の結果、4 種の大腸菌でいくつかのシャトルベクターの欠損がみられた。一方で 1 種の大腸菌では、全てのシャトルベクターが安定的に保持されており、プラスミドと宿主大腸菌の組合せが非常に重要であるということがわかった。プラスミドを構築する際に、1 種類の宿主だけではなく、数種類の宿主を検討することは、プラスミド構築を成功させる上で有効な方法であると考えられる。

新たに構築したシャトルベクター3つの機能解析の結果、レポータータンパク質それぞれの基質に対する酵素活性を確認した。一方で、誘導剤を添加しなかった形質転換体ではレポータータンパク質の生産並びに酵素活性は検出できなかった。無細胞抽出液を用いた SDS-PAGE 解析においても、レポーターに用いた3つの遺伝子産物全ての生産を、誘導剤を添加して培養した形質転換体で確認した。一方で、誘導剤を添加しなかった形質転換体ではレポータータンパク質の生産は検出できなかった。これらの結果は、今回新たに構築された *Streptomyces-E. coli* シャトルベクターが、レポータータンパク質を *S. lividans* 内で異種生産させることができることを証明している。今回構築したシャトルベクターには異なる3つの抗生物質に対する耐性遺伝子をそれぞれ組み込んだが、これら抗生物質耐性遺伝子の違いによるレポーター遺伝子発現並びに酵素生産量への影響の差は確認されなかった。このことから、機能解析を行った3つの *Streptomyces-E. coli* シャトルベクターは同等の機能を有することが示唆された。さらに目的プラスミドの構築をより早く行えるという点で、非常に有用な実験ツールであると言える。

本『論文の要約』は、論文概要をより詳細にまとめた要約であるが、インターネット公表のため、未発表データの記載は控えさせて頂きました。