

コリネ型細菌を宿主とした
組換え RNA 分子の高生産基盤技術の開発

2020 年 1 月

羽城 周平

コリネ型細菌を宿主とした
組換え RNA 分子の高生産基盤技術の開発

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 (生物工学) 学位論文

羽城 周平

目次

第1章 序論

第1節 緒言	…2
第2節 研究の背景	
2.1 RNA分子の構造と機能	…4
2.2 RNA分解	…6
2.3 核酸医薬	…7
2.4 RNA干渉を利用したRNA農業資材	…8
2.5 RNA製造技術	…11
第3節 本研究の意義と目的	…17
第4節 本論文の構成	…18

第2章 pAM330系由来の高コピー数変異プラスミド

第1節 緒言	…21
第2節 方法	
2.1 使用菌株、プラスミド、プライマー	…22
2.2 培養条件	…26
2.3 プラスミドの構築	…27
2.4 DNA塩基配列の決定法	…29
2.5 pAM330プラスミドのキュアリング法	…29
2.6 コリネ型細菌からのプラスミド抽出法	…30
2.7 プラスミドのコピー数定量方法 (qPCR)	…30
2.8 RNA-seqでの転写領域の検定法	…31
2.9 転写開始点の決定	…32
2.10 プラスミドの安定性評価	…33
第3節 結果と考察	
3.1 pAM330のキュアリングによる <i>C. glutamicum</i> 2256L株の取得	…34
3.2 高コピー数変異プラスミド pVC7H1の取得	…36
3.3 pVC7H1の変異点解析および各種変異体のコピー数評価	…38
3.4 <i>cop</i> 領域による pVC7Nのコピー数への影響評価	…41
3.5 <i>cop</i> 領域における転写物の解析	…44
3.6 sRNA1の機能解析とコピー数制御機構のモデル	…46
3.7 高コピー数化プラスミドの安定性評価	…52

第4節 結言	…54
--------	-----

第3章 pHM1519系由来の高コピー数変異プラスミド

第1節 緒言	…56
第2節 方法	
2.1 使用菌株、プラスミド、プライマー	…57
2.2 培養条件	…59
2.3 プラスミドの構築	…59
2.4 DNA塩基配列の決定法	…61
2.5 タンパク質の構造予測	…61
2.6 コリネ型細菌からのプラスミド抽出法	…61
2.7 プラスミドのコピー数定量方法 (qPCR)	…62
2.8 コリネ型細菌破碎抽出液の SDS-PAGE 解析	…62
2.9 ウエスタンブロッティング	…63
2.10 GFP 蛍光強度測定法	…63
2.11 プラスミドの安定性評価	…64
第3節 結果と考察	
3.1 高コピー数変異体 pPC4H1 の取得	…65
3.2 高コピー数化を引き起こす変異の解析	…67
3.3 pPK4 の各種変異体のコピー数比較	…69
3.4 高コピー数化プラスミドの安定性評価	…73
3.5 クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ (CATase) の生産量の増加	…74
3.6 dGFP 生産量の増加	…75
第4節 結言	…76

第4章 組換え RNA の過剰発現系構築

第1節 緒言	…78
第2節 方法	
2.1 使用菌株、プラスミド、プライマー	…81
2.2 培養条件	…86
2.3 プラスミドの構築	…88
2.4 <i>rnc</i> 遺伝子欠損体取得法	…101
2.5 L字試験管培養法	…102

2.6	RNA 評価のための試験管培養法と RNA 抽出法	…102
2.7	rRNA の除去	…104
2.8	RNA-seq ライブラリー調製	…104
2.9	MiSeq によるシーケンス解析	…105
2.10	RNA-seq データ解析	…105
2.11	U1A-RBD タンパク質のコリネ型細菌分泌生産および N 末端アミノ酸解析	…106
2.12	5'-RACE および 3'-RACE	…107
2.13	ゲルシフトアッセイ	…108
2.14	プラスミドコピー数決定	…109
2.15	RNA 二次構造予測	…109
第 3 節 結果と考察		
3.1	<i>rnc</i> 欠損株の構築とその生育評価	…110
3.2	コリネファージ BFK20 由来のプロモーターの利用	…112
3.3	U1A*-RNA の転写系構築ならびに F1 プロモーターの活性評価	…116
3.4	<i>C. glutamicum</i> 2256L Δrnc /pPK4-Pf1-U1A*株のジャーファーマンター培養評価	…118
3.5	RNA-seq 解析からの強力な内在性プロモーターの選別	…120
3.6	<i>C. glutamicum</i> におけるモデル RNA (U1A*-RNA) の発現	…124
3.7	生産 RNA の構造解析	…126
3.8	U1A*-RNA と U1A 結合タンパク質との結合活性評価	…128
3.9	ジャーファーマンター培養による U1A*-RNA 過剰生産	…130
第 4 節 結言		

第 5 章 組換え二本鎖 RNA 生産菌の構築ならびにその摂食による標的害虫の生育抑制効果		
第 1 節 緒言		
第 2 節 方法		
2.1	使用菌株、プラスミド、プライマー	…136
2.2	培養条件	…138
2.3	プラスミドの構築	…139
2.4	RNA 評価のための試験管培養法と RNA 抽出法	…142
2.5	各種 RNase 処理による dsRNA 生成確認	…143
2.6	RT-PCR による目的 <i>diap1*</i> -dsRNA 生成確認	…143
2.7	dsRNA 生産菌の殺菌処理	…145
2.8	生菌数の評価	…146

2.9	ニジュウヤホシテントウへの dsRNA 投与試験	…146
2.10	<i>H. vigintioctopunctata</i> 発現遺伝子の定量リアルタイム PCR	…147
第3節 結果と考察		
3.1	<i>diap1*</i> -dsRNA 生産菌の構築	…148
3.2	<i>diap1*</i> -dsRNA の生成確認	…150
3.3	ジャーファーメンター培養による目的 dsRNA の生産評価	…154
3.4	<i>diap1*</i> -dsRNA 生産菌の殺菌処理方法検討	…156
3.5	<i>diap1*</i> -dsRNA 生産菌の害虫摂食試験	…160
第4節 結言		…165

第6章 総括		…166
謝辞		…170
付録		
培地組成		…172
引用文献		…173
発表論文		…182

第 1 章

序論

第1節 緒言

RNA はヌクレオチドの重合体である核酸であり、生命活動を行うのに必要な生体構成分子である。RNA は、mRNA、tRNA と rRNA の大きく3つに分類される。mRNA はタンパク質合成装置であるリボソームに DNA の遺伝子情報を伝え、tRNA はタンパク質合成の際に特定アミノ酸残基をリボソーム内まで運搬し、rRNA はタンパク質合成を担うリボソームを構成するといった役割を担っている。それ以外の役割も RNA は有することが Fire らにより報告された¹。ある特定遺伝子と相同なセンス鎖とアンチセンス鎖から構成される dsRNA は、細胞内でその対象遺伝子の発現を阻害し、この現象を RNA 干渉という。RNA 干渉を利用することで遺伝子機能を人為的に抑制することができ、遺伝子機能解析の汎用的ツールとして広く使われている^{2,3}。農業分野への応用検討も盛んに行われており、その1つの応用例として、農作物の植物ウイルス感染防除がある⁴。標的ウイルス由来配列の一部を用いた dsRNA を植物体に予め取り込ませることで、そのウイルス配列に対する RNA 干渉を引き起こし抵抗性が付与される結果、ウイルス感染の予防が可能となる。植物ウイルス感染予防に有効とされる化学農薬は未だ開発されていないため、新規なウイルス防除剤としての活用が期待される。また、その他の例として、害虫生育抑制がある。害虫の生育必須遺伝子を対象とした dsRNA を標的害虫に経口投与することで、RNA 干渉が作動し、その害虫の生育必須遺伝子の発現が阻害された結果、生育阻害が引き起こされる。近年、化学農薬による生態系攪乱の影響が問題視されており、環境低負荷でかつ種特異的な殺虫効果をもたらす害虫生育抑制剤としての dsRNA が注目されており、大手アグロケミカル企業を中心に開発が進められている⁵。

RNA を用いた核酸医薬は、従来の医薬では治療が困難であった疾患に対する医薬品として発展している⁶。これまでの低分子医薬や抗体医薬は疾患の原因となるタンパク質を標的とするのに対して、核酸医薬はそのタンパク質の合成反応そのものを標的とする。現在、アンチセンス、アプタマーや siRNA に分類される核酸医薬品が上市されており、臨床試験を実施中の品目数を考慮すると、低分子医薬、抗体医薬に次ぐ医薬品としての発展が期待されている。次世代の核酸医薬

の位置づけとして、CRISPR/Cas9 ゲノム編集⁷に用いる sgRNA⁸、遺伝性疾患に対するタンパク質補充療法⁹や癌・感染症に対するワクチン療法¹⁰としての mRNA 医薬¹¹の開発も急速に進んでいる。アンチセンス核酸や siRNA で必要とされる鎖長は 20 数塩基長であるのに対して、sgRNA や mRNA は 100 ~ 数千塩基長の長鎖 RNA が使用されている。

RNA 製造方法としては、固相化学合成法¹²が主流ではあるが、製造可能な鎖長としては 100 塩基長程度までであり、100 塩基長を超えるような長鎖の RNA 製造は困難である。長鎖 RNA 製造法としては *in vitro* 転写による酵素法¹³が用いられているが、グラムスケール以上での合成が困難であり、RNA ポリメラーゼ酵素や反応基質であるヌクレオシド三リン酸 (NTP) が高価であり製造コストが高くなることが課題とされてきた。つまり、農業資材用途としての dsRNA や核酸医薬用途としての長鎖 RNA の研究が先行する一方で、それらの産業化を実現するための大量製造法は確立されていなかった。化学合成法や酵素法とは別に、微生物を用いた RNA 製造開発¹⁴も行われてきたが、RNA は化学構造的に DNA よりも不安定であり、内在性の RNA 分解酵素によって分解されやすいことから、目的とする組換え RNA を大量生産することは困難とされてきた。そこで、本研究においては宿主としてコリネ型細菌 *Corynebacterium glutamicum* を用いて、独自の RNA 生産技術を構築することで、既存発酵法の RNA 生産成績を凌駕する目的 RNA 大量発現系を構築した。さらに、組換え RNA 製造技術の応用例として、dsRNA 生産系を構築し、害虫ニジュウヤホシテントウに対する生育阻害の効果を検証した。

第2節 研究の背景

2.1 RNA 分子の構造と機能

RNA の構造的特徴として、RNA はヌクレオチドが重合した生体高分子であり DNA と類似するが、塩基としてチミンではなくウラシルを持つ点、ヌクレオチド中の糖の 2' 位に水酸基を持つ点異なる。その水酸基によってリン酸ジエステル結合が求核攻撃を受けることで切断が起こりやすくなっている (図 1-1)。また、RNA 分解酵素である RNase は非常に安定なタンパク質であり、RNA サンプル中に RNase が極微量での混入することにより速やかに分解されることから、RNA は酵素的分解の影響を受けやすいとされる¹⁵。DNA は遺伝情報の蓄積や保存を行うのに対して、RNA はその遺伝情報から様々な機能を発揮させるためのつなぎの役割を担っている。遺伝情報である DNA と機能を発揮するタンパク質をつなぐ情報伝達の役割を担う以外にも、様々な機能性を発揮する RNA が知られている。

酵素のように触媒として働く RNA はリボザイムと呼ばれており、テトラヒメナ由来 rRNA のイントロンのスプライシング反応が rRNA 自身で進む自己切断型リボザイムとして最初に発見された¹⁶。また、フレキシザイムは人工進化手法を取り入れたスクリーニングによって見いだされた人工型リボザイムであり、エステル化アミノ酸と tRNA の 3' 末端リボース水酸基との反応を触媒することで、アミノアシル化 tRNA を形成させる¹⁷。いかなるアミノ酸も任意の tRNA に結合することが可能となるため、非天然アミノ酸や環状構造を形成する特殊ペプチドの創製が達成できる。

RNA アプタマーは、標的タンパク質の立体構造を特異的に認識し結合するといった抗体様の活性をもっている¹⁸。Macugen は加齢黄斑変性症治療剤として FDA に認可された世界初の RNA アプタマーであり、核酸医薬としての応用検討も進んでいる¹⁹。

RNA origami は、RNA 自身が自己組織化する技術²⁰であり、設計通りに複雑な高次構造を形成することが可能となっておりナノテクノロジー素材としての応用が期待されている。

二本鎖 RNA (dsRNA) は、RNA 干渉を誘起する RNA 分子としての機能を有しており、RNA 農業資材としての活用が検討されている。dsRNA はセンス鎖とアンチセンス鎖が会合した二本鎖

構造を有することで、一本鎖 RNA (ssRNA) と比較して、構造安定性や RNase 分解耐性が高いとされる。

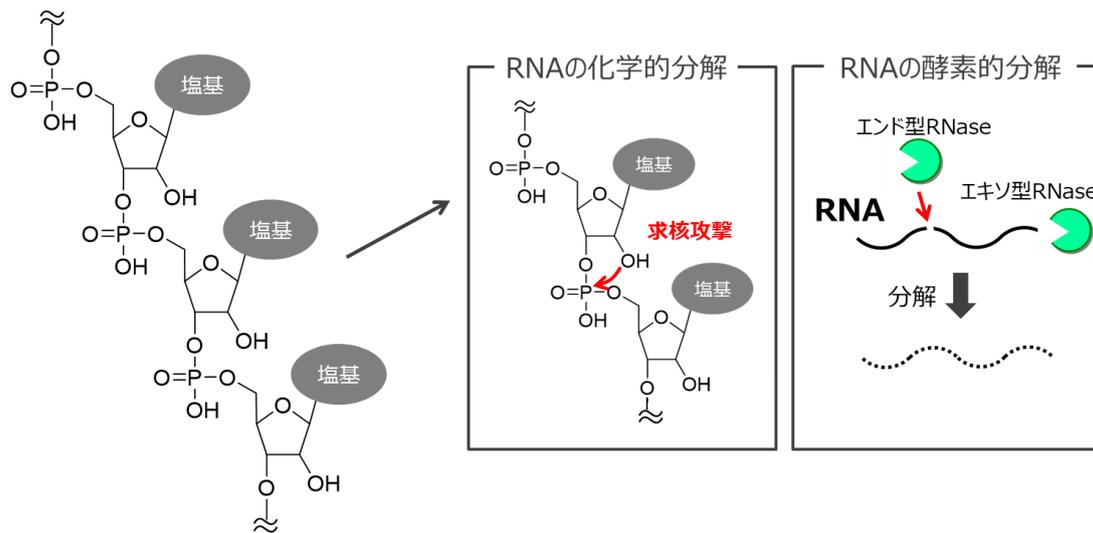


図 1-1 RNA の構造の説明図

2.2 RNA 分解

RNA 生産菌宿主の要件としては、菌体内に組換え RNA 分子を蓄積させるため、RNA 分解酵素 RNase の欠損が必要であると考えられる。RNase は遺伝子発現後の転写後調整として生命維持に重要な役割を担っているが、微生物毎に種類や分解機構が異なることが知られている²¹。*E. coli* や *C. glutamicum* が有しているとされる各種 RNase をまとめたものを表 1-1 に示す。*C. glutamicum* の RNA 分解機構に関しては未解明な部分が多い。*C. glutamicum* が属するグラム陽性菌である *Bacillus subtilis*、*Listeria monocytogenes* や *Enterococcus faecalis* では、遺伝子転写産物であるセンス RNA とは逆向きのアンチセンス RNA も同時に転写され対合することで、RNase III による分解を引き起こすことにより、タンパク質の生産レベルをグローバルに制御していることが報告されている^{22, 23}。すなわち、*C. glutamicum* において RNase III を欠損することは、主要な RNA 分解系の 1 つを抑制することになり、dsRNA のみならず、一部二本鎖構造を形成する ssRNA の安定性向上に寄与すると考えられる。同種の *Corynebacterium glutamicum* R 株²⁴ においては、RNase III をコードする *rnc* 遺伝子が同定されており、その欠損体の取得も報告されている²⁵。*rnc* 遺伝子の欠損は、細胞の伸長という形態変化をもたらすものの、マイクロアレイ解析結果からは遺伝子発現自体には影響しないことが明らかである。

表 1-1 *E. coli*、*C. glutamicum* が有しているとされる各種 RNA 分解酵素

	Endonuclease						
	RNase E/G	RNase J	RNase III	Ybe Y	RNase P	RNase Z	RNase H
<i>E. coli</i>	<i>rne, rng</i>	—	<i>rnc</i>	<i>ybeY</i>	<i>rnpAB</i>	<i>rbn</i>	<i>rnhA, rnhB</i>
<i>C. glutamicum</i>	NCgl2281	NCgl1895	NCgl1994	NCgl2207	NCgl2992	NCgl2422	NCgl0320, NCgl1957

	Exonuclease					
	PNPase	ase R, RNase	RNase PH	RNase D	Orn	NrnA
<i>E. coli</i>	<i>pnp</i>	<i>rnr, rnb</i>	<i>rph</i>	<i>rnd</i>	<i>orn</i>	—
<i>C. glutamicum</i>	NCgl1900	NCgl2153	NCgl2415	NCgl1826	NCgl2386	NCgl1908

2.3 核酸医薬

各種標的タンパク質をコードしたセンス鎖の RNA と相補的に結合することでそのタンパク質の発現量を抑制する”アンチセンス核酸”、特定タンパク質分子の構造を認識し結合することで機能障害を引き起こす”アプタマー”といった標的結合型が核酸医薬品として知られている。近年では、人工の 21-23 塩基対の二本鎖 RNA で RNA 干渉経路に取り込まれることで標的遺伝子発現を低減する”siRNA”といった RNA 干渉の作用機序に基づく核酸医薬品の開発が進められている²⁶。2019 年 6 月時点で、アンチセンス核酸、アプタマーや siRNA に分類される 9 品目もの核酸医薬品が上市されており、臨床試験を実施中の品目数を考慮すると、低分子医薬、抗体医薬に次ぐ医薬品としての発展が期待されている (表 1-2)。

表 1-2 上市された核酸医薬品 (2019 年 12 月時点)

商品名 (会社名)	分類	標的
Vitravene (Novartis)	アンチセンス	CMV IE2 mRNA
Macugen (Valeant Pharmaceuticals)	アプタマー	VEGF165 タンパク質
Kynamro (Kastle Therapeutics)	アンチセンス	ApoB-100 mRNA
Exondys 51 (Sarepta Therapeutics)	アンチセンス	Dystrophin pre-miRNA
Spinraza (Biogen)	アンチセンス	SMN2 pre-miRNA
HEPLISAV-B (Dynavax Technologies)	CpG オリゴ	TLR9 タンパク質
Tegsedi (Akcea Therapeutics)	アンチセンス	TTR mRNA
Onpattro (Alnylam Pharmaceuticals)	siRNA	TTR mRNA
Waylivra (Akcea Therapeutics)	アンチセンス	ApoCIII mRNA

2.4 RNA 干渉を利用した RNA 農業資材

人口増大に伴い食糧需要は拡大しており、生産効率を重視する近代化農業において病害虫を防除することは重要視されている。これまでは、主に化学農薬による害虫防除がなされてきたが、化学農薬は害虫に対する特異性が低いため生態系の攪乱が懸念されている。例えば、現在世界で広く使われているネオニコチノイド系農薬は、ニコチン様物質を活性成分として昆虫に対する強い神経毒性を示す²⁷。この農薬は、害虫以外の益虫を殺すこと以外にも、ヒトを含む生態系に対しての悪影響が危惧され、2018年、欧州ではネオニコチノイド系農薬の屋外での使用が禁止されている。ネオニコチノイド系農薬に限らず、世界中で化学農薬そのものに対する規制が強化される傾向にある。また、化学農薬は病害虫や雑草の防除に有効である一方で、その薬剤に抵抗を有した病害虫や雑草が出現することが課題となっており、同一系統の化学農薬の連続使用を控えるといった対応が求められている。このような化学農薬の欠点を克服する新しい農業資材として「RNA 干渉」を利用した RNA 農業資材に注目が集まりつつある^{28,29}。RNA 干渉とは、dsRNA と相補的な塩基配列を持つ mRNA が分解されるという真核生物で起こる反応機構であり、この機構を利用して、dsRNA を導入することにより、人為的に任意の遺伝子発現を抑制することが出来る(図 1-2)。つまり、RNA 干渉という作用機序に基づき、目的とする害虫の生育必須遺伝子由来の dsRNA を害虫防除剤として活用することで、化学農薬とは異なり環境低負荷かつ害虫特異的な新しい農業資材となる。dsRNA 投与による RNA 干渉機構の誘導は、特に甲虫類に属するもので効果的に機能するとされる³⁰。北米で農作物に甚大な被害をもたらしている害虫コロラドハムシは甲虫類の一種で、多くの化学農薬に抵抗性を発揮するとされておりその対応策の迅速な提案が望まれている³¹。コロラドハムシを対象とした RNA 農業資材の開発が進められており、vacuolar ATPase (v-ATPase)³² やアクチン³³ といった生育に重要な役割を果たす遺伝子を標的とした dsRNA を投与することで効果的な生育阻害効果をもたらすことが報告されている。新美らは、害虫ニジュウヤホシテントウを対象として、death-associated inhibitor of apoptosis protein 1 (*diap1*) 遺伝子を標的とした dsRNA を酵素法で合成し、ニジュウヤホシテントウ幼虫に投与する

という研究を行った³⁴。昆虫で広く保存されている Diap1 タンパク質は E3 ユビキチンリガーゼ活性を有しており、ユビキチン化を介してカスパーゼタンパク質を分解することでアポトーシスを強く抑制する。そして、*diap1* 遺伝子をノックダウンすることはアポトーシスを誘導し致死につながるため、*diap1*-dsRNA の投与は、生育阻害をもたらすことが分かっている (図 1-3)。基礎研究に留まらず、近年モンサント社やシンジェンタ社といった海外アグロケミカル企業が RNA 農業資材に関する研究開発を進めている。しかし、その主材料である dsRNA の安価な製法は確立されておらず、製造コストが高いことが課題とされてきた。

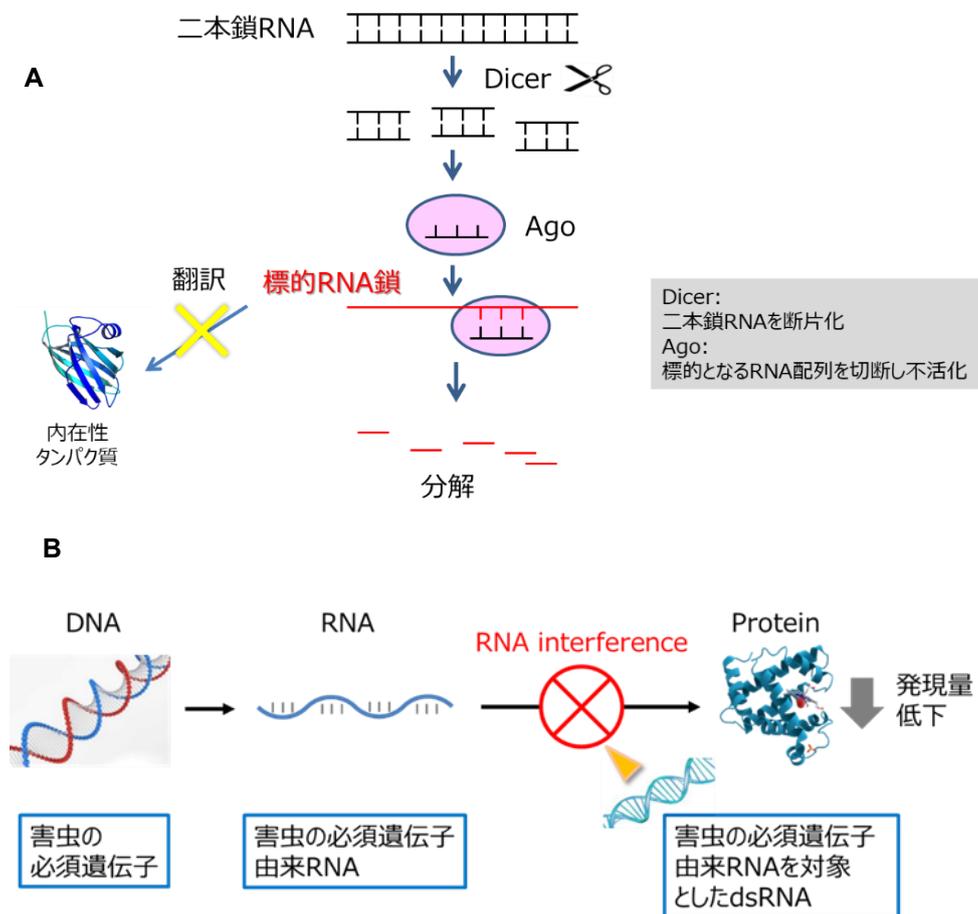
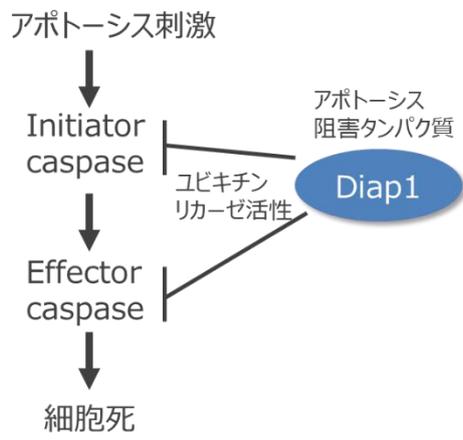


図 1-2 RNA 干渉による害虫生育抑制機構

(A) RNA 干渉機構の説明図 (B) RNA 干渉による害虫の遺伝子発現抑制機構。生育阻害害虫の生育に必須な遺伝子を選定し、その必須遺伝子由来 RNA を対象とした dsRNA を投与することにより、RNAi 作用が作動すれば、必須遺伝子発現量が減少し、その害虫の生育遅延や致死が誘導される。

A



B

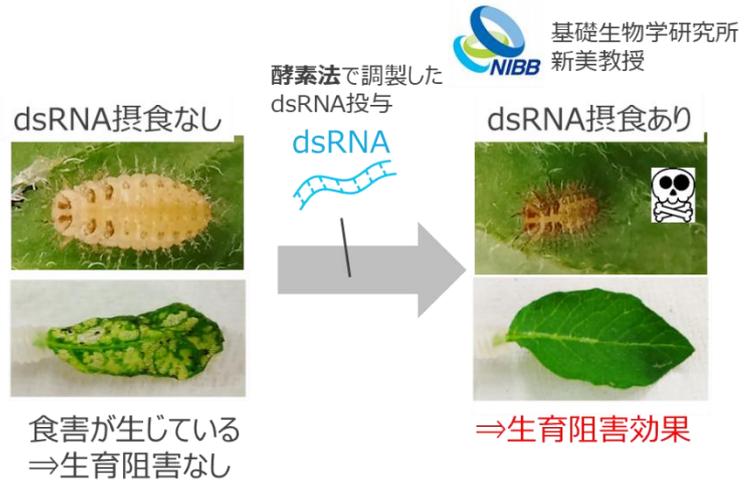


図 1-3 *diap1*-dsRNA 摂取による害虫生育抑制

(A) *diap* 遺伝子とアポトーシスとの関係性 (B) 害虫ニジュウヤホシテントウに対する *diap1*-dsRNA 投与試験の説明図

2.5 RNA 製造技術

RNA 製造法としては、化学合成法および酵素法の 2 種類に分類される (表 1-3)。化学合成法の中でも、ホスホロアミダイト法¹²と呼ばれる固相合成法を用いるのが主流であり、固相担体表面から順次結合伸長させていきオリゴ核酸を製造する (図 1-4)。液相合成法では固相担体に代えて無極性有機溶媒に可溶な高疎水性保護基を用いることで、均一溶液系での反応が進行し、合成の効率化に優れ、保護基の性質を利用した単離・精製を可能にし、製品の高純度化に優れているといった特徴を有する³⁵。一般的には、固相合成法は少量多品種、液相合成法は多量少品種と使い分けがなされている。化学合成におけるオリゴ核酸の製造コストは、ホスホロアミダイト試薬価格から概算し、\$500/g 以上と見積もられる。化学合成法の課題としては、鎖長の短い 20 塩基長から 30 塩基長程度のオリゴ核酸は高効率に生産可能だが、鎖長が長くなるに伴い反応効率は徐々に低下するため 100 塩基を超えるような長鎖オリゴ核酸の生成は困難であるとされる。また、化学合成法によるオリゴ核酸の製造においては、副生物を抑制することが品質管理面で重要視される。例えば、反応収率が 99.9%と仮定して、100 塩基まで伸長した場合最終産物の収率は 90%となり、目的鎖長のオリゴ核酸から 1 塩基または 2 塩基が除去された不完全長の N-1、N-2 オリゴ核酸を多く含むこととなり、逆相カラムによる精製を行ったとしても不完全長オリゴ核酸の除去は困難であるとされる。

長鎖の RNA 製造にあたっては、通常 *in vitro* 転写による酵素法を用いる¹³。T7 RNA ポリメラーゼを使用し、目的 RNA の配列のすぐ上流に T7 プロモーター配列を配置した鋳型 DNA を調製し、基質となる NTP (ATP、GTP、CTP、UTP) を加えた条件で *in vitro* 転写反応を進行させる。数十塩基長から数千塩基程度までの目的 RNA を作製することが可能である。ただし、T7 RNA ポリメラーゼ酵素だけでなく、NTP 試薬も高額 (試薬価格として数万円/g) であり、試薬価格ベースでの製造コストは \$10,000/g 以上と見積もられる。さらに、dNTP と比較して、NTP は 2'位にヒドロキシル基が付加されており不安定な物質であるため、大量調製にはコストがかかるとされる。

微生物を用いた組換え RNA 製造によって、鎖長が長い RNA を製造する取り組みがなされてきたものの、その目的 RNA 生産量は培養液あたり数 mg から数十 mg-RNA/L であり³⁶、アミノ酸発酵や核酸発酵といった微生物を用いた物質生産系³⁷と比べて、その生産量は低い。また、菌体内での安定的に存在できる構造を有する RNA を主として生産しており、生産可能な RNA 分子種が限定されている点が課題として捉えられる。

表 1-3 各種 RNA 製造法

	生産可能な鎖長	原料コスト概算 [※]	特徴
化学合成法			
- 固相合成法	約100塩基まで	> \$500/g	・オリゴ核酸の主流な製造法 ・修飾塩基を導入することが可能 ・液相法ではkgスケールの大量製造可能
- 液相合成法	約30塩基まで		
酵素法	数十塩基から 数千塩基まで	> \$10,000/g	・長鎖RNAの製造が可能 ・mgスケール程度までの合成に対応
従来の 微生物製造法	数十塩基から数百塩基まで (生成RNAの種類に依存)	— (低収率につき算出せず)	・目的RNA生産量は培養液あたり 数mgから数十mg-RNA/L ・目的RNAは菌体内で安定的に存在可能な 配列を有する必要あり
今回開発した 微生物製造法	数十塩基から数百塩基まで (生成RNAの種類に依存しない)	< \$1/g (RNA生産量: 300 mg/Lの場合)	・目的RNA生産量は培養液あたり 数十mgから1 g-RNA/L-培地 ・目的RNAは望みの配列のみを生成可能

※販売試薬価格に基づいて大まかに試算した原料価格。微生物製造法に関しては培地コストのみの概算した。製造原価は、設備費や人件費等が更に加わる。

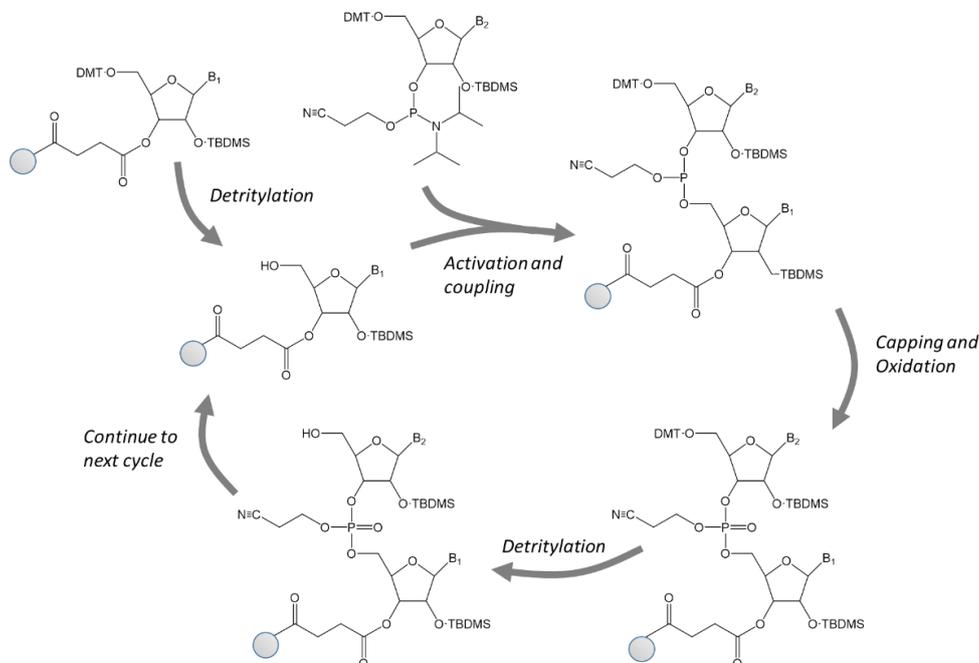


図 1-4 RNA の固相合成工程

B: 塩基, DMT: 4,4'-dimethoxytrityl 基, TBDMS: *tert*-Butyldimethylsilyl 基。灰色丸は固相担体を示す。

2.5.1 微生物を用いた組換え RNA 生産

菌体構成成分である RNA は、rRNA と tRNA が大部分を占めており、*E. coli* においては rRNA 80%、tRNA 15%、mRNA 5%であるとされる³⁸。このことは rRNA や tRNA を転写するプロモーター強度が高いこと、転写ユニット数が複数個あることに加えて、それらの菌体内での構造安定性が寄与していることが大きいと言える。そのため、*E. coli* を宿主とした組換え RNA 生産として、次のような dsRNA や tRNA 骨格 RNA の製造例が報告されてきた (図 1-5)。Timmons らは、dsRNA 分解酵素である *rnc* 遺伝子を欠損した λ ファージ DE3 溶原化大腸菌株 HT115(DE3) を宿主として、T7 RNA ポリメラーゼによる誘導発現系で菌体内に目的 dsRNA を生産する形質転換株を作製し、線虫 *Caenorhabditis elegans* に給餌することで標的遺伝子のノックダウン実験を行った³⁹ (図 1-5A)。Ponchon らは、菌体内で tRNA は熱変性やヌクレアーゼに対して耐性を有することに着目し、望みの RNA 配列に tRNA 骨格を付与することで分解を回避し、蓄積させることを達成した³⁶ (図 1-5B)。その他の、RNase による分解を回避する工夫が為された組換え RNA 発現事例として、*Pseudomonas syringae* を用いた dsRNA 生産系では、バクテリオファージ $\phi 6$ が宿主菌体内でキャピシドタンパク質を発現しカゴ状構造を形成することで、その内部で安定的に dsRNA 合成が行われた⁴⁰。また、海洋性光合成細菌 *Rhodovulum sulfidophilum* が能動的に菌体内 RNA を細胞外に漏出する能力および培養液中の RNase 活性が低いことに着目し、目的 RNA アプタマーを菌体外生産した例も報告されている^{41, 42}。このように組換え RNA 発現例は菌体内で安定的に存在可能な RNA の種類に限定されており、かつその生産量は数十 mg/L 程度であった (表 1-4)。

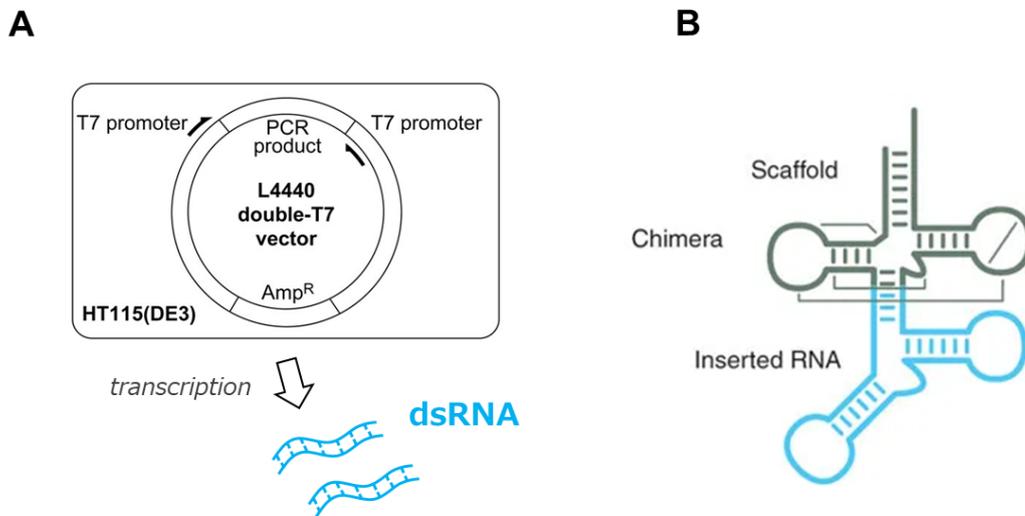


図 1-5 *E. coli* での組換え RNA 生産系

(A) T7 RNA ポリメラーゼを用いた dsRNA 生産系 (B) tRNA 骨格 RNA 生産系。発現・回収後に、tRNA 骨格部分配列に結合する DNA を添加し、RNase H 処理を行うことで、目的組換え RNA 分子の取得が可能となる。

表 1-4 微生物を用いた組換え RNA 生産例

宿主	RNAの種類	組換えRNA生産のための戦略	RNA生産量
<i>E. coli</i>	dsRNA	T7 RNAポリメラーゼ/ dsRNA分解酵素欠損	3 mg/L-培養液 (WSSV-dsRNA (約300 bp) の場合)
<i>E. coli</i>	tRNA骨格RNA	tRNA骨格による 菌体内高安定性	25 mg/L-培養液 (Sephadex RNAアプタマー (115 nt) の場合)
<i>P. syringae</i>	dsRNA	バクテリオファージφ6由来 菌体内カゴ状構造によるRNA保護	1.6 mg/g-湿菌体 (eGFP-dsRNAの場合)
<i>R. sulfidophilum</i>	RNAアプタマー	菌が元々有している 菌体外RNA漏出機構	20 μg/L-培養液 (ストレプトアビジンRNAアプタマー (約300 nt) の場合)

2.5.2 RNA 生産菌宿主として用いるコリネ型細菌の特徴

Corynebacterium glutamicum 2256 株 (ATCC13869) は味の素社が分離したグラム陽性菌株であり、グルタミン酸やリジンを始めとする種々のアミノ酸生産菌の親株として用いられ⁴³、その物質生産宿主としての能力の高さから、化成品原料⁴⁴やタンパク質分泌生産⁴⁵にも用いられており有用物質生産プラットフォーム菌として産業界にとって重要な菌株である。グルタミン生産において通常の生育条件下では、グルタミン酸をほとんど排出しないが、ビオチン欠乏条件、界面活性剤やペニシリンの添加によって、細胞表層が変化することで膜の張力が低下し、メカノセンシティブチャンネルが開くことでグルタミン酸を排出する⁴⁶。飼料添加物として用いられている Lys 発酵の生産菌宿主として、*E. coli* よりも Lys 分解活性が低く Lys 生合成制御機構が単純な *C. glutamicum* が選定されており⁴⁷、発酵法において宿主の選定は重要である。*E. coli* では RNA 分解酵素複合体デグラドソームが細胞膜近傍で形成され RNA を分解する機構を有するが⁴⁸、*C. glutamicum* ではデグラドソームは見つかっていない。そのため、*C. glutamicum* は RNA 分解活性が低いことが予想され、RNA 生産菌の宿主として有望と考えられる。*C. glutamicum* の RNA 転写終結機構は、 ρ 因子非依存性転写終結と ρ 因子依存性転写終結に分類される。 ρ 因子の発現量や発現タイミングの影響を受けない ρ 因子非依存性のターミネーター配列は、RNA ポリメラーゼによる転写後に G と C に富んだヘアピン構造を形成しそれに続き T が並ぶことで、RNA ポリメラーゼが DNA 鎖から解離する。

C. glutamicum の生育速度は速く、*E. coli* と比較しても高い細胞密度を達成する。さらに、*C. glutamicum* を用いた遺伝子改変ツールは長年開発されており、信頼性の高い手法が数多く存在する。*E. coli* とは異なり、*C. glutamicum* は非病原性かつエンドキシンフリーであり、アメリカ食品医薬品局より安全基準を合格した菌として Generally Recognized As Safe (GRAS) 認定を受けている。2017 年にはその全ゲノム解析が完了し⁴⁹、Genbank データベースの Acc. No. AP017557 として遺伝子情報も整備されている。

2.5.3 コリネ型細菌プラスミド

E. coli と *C. glutamicum* との両方で複製出来るよう設計されたシャトルベクターで、*C. glutamicum* の形質転換において多用されているものに、pVC7 (Cm 耐性) や pPK4 (Km 耐性) がある。pVC7 は *C. glutamicum* 2256 株のクリプティックプラスミド pAM330 に、pPK4 は *C. glutamicum* ATCC13058 株の pHM1519 に、それぞれのコリネ型細菌で機能する複製起点領域が由来している。pAM330 および pHM1519 は、味の素社にて単離されたクリプティックプラスミドであり、各種遺伝学的解析がなされてきた⁵⁰。今までに、コリネ型細菌での天然のプラスミドは多数報告され、それらの配列情報は解析され ORF を始めとした構造的な特徴から各種のプラスミドファミリーへと分類されている。

pAM330 は、同じ *C. glutamicum* 2256 株から単離されたプラスミド pBL1⁵¹ のファミリーとして分類され、そのファミリーに属するプラスミドとしては、pWS101⁵² や pGX1901⁵³ も報告されてきた。また、 θ 型複製のプラスミドとしては、DNA ポリメラーゼ I 依存である pXZ10142 ファミリーと DNA ポリメラーゼ I 非依存である pCRY4 ファミリーが知られている^{54, 55}。最近では、2009 年に乾ら (RITE) のグループにより、*Corynebacterium casei* JCM 12072 株から 2.4 kb のサイズであるプラスミド pCASE1 が単離され、それは pXZ10142 ファミリーに属するプラスミドとして報告されてきた⁵⁶。

これまでに知られているコリネ型細菌プラスミドの複製機構は、ローリングサイクル型か θ 型の 2 系統に分かれており、pAM330 と pHM1519 はローリングサイクル型に分類される⁵⁵。ローリングサイクル型複製は、複製開始タンパク質 Rep のホモ二量体が複製起点に結合すると同時にニックを形成することで開始され、DNA ポリメラーゼ III とヘリカーゼが協働することで DNA 伸長が進行する。しかしながら、複製開始タンパク質 Rep は、構造が不安定で分解されやすいタンパク質であるとされ、結晶構造解析がほとんどなされておらず、その具体的な機構に関して未解明である。

第3節 本研究の意義と目的

RNA は、農作物の高品質化や害虫駆除といった効果をもたらす環境低負荷な農業資材や、核酸医薬原体への展開も見込まれる有用なバイオ高分子素材である。しかしながら、従来製法である化学合成法や酵素法では、大量生産が困難であり、かつ製造コストが高いという課題が顕在する。また、既報の微生物による組換え RNA 生産技術においては、菌体内で安定的に存在可能な RNA 種に限定されており、その RNA 生産量としても低いことが知られている。これらの課題を解決すべく、本研究では、コリネ型細菌 *C. glutamicum* を宿主とした組換え RNA の革新的生産技術開発に取り組んだ。

目的 RNA 大量発現のための基本戦略として、1) RNase 欠損株を宿主とすることによる目的 RNA の分解抑制、2) コリネ型細菌ファージ由来プロモーターを活用した高活性型 RNA 転写ユニットの整備、3) 従来のプラスミドのコピー数を大きく上回る高コピー数プラスミドの利用、の3点の要素技術を組み合わせることにより、既知の目的 RNA 生産量を超える RNA 生産基盤系を構築した。さらに、応用例として dsRNA 生産系を構築し、dsRNA 生産菌投与による害虫生育抑制効果の実証を行い、*C. glutamicum* を宿主とした生産した組換え dsRNA は害虫に対して生育阻害効果を有することを明らかにした。

第 4 節 本論文の構成

本論文は 6 章から構成される (図 1-6)。

第 1 章「序論」では、微生物による RNA 生産におけるこれまでの知見および課題を明らかにし、本研究の目的と意義を明らかにした。第 2 章「pAM330 系由来の高コピー数変異プラスミド」では、pAM330 型シャトルベクター pVC7N に対して、高コピー数変異体取得のための自然突然変異スクリーニング、取得した変異体の評価や推定されるコピー数制御機構を解析した。第 3 章「pHM1519 系由来の高コピー数変異プラスミド」では、pHM1519 型シャトルベクター pPK4 に対して、抗生物質を選択圧としたスクリーニングを行い、高コピー数変異プラスミドを取得すると共にそのコピー数制御機構について解析を行った。加えて、RNA 生産用途以外での高コピー数プラスミドの活用例として、標的タンパク質の発現量の増加のためのツールとしての有効性評価を実施した。第 4 章「組換え RNA の過剰発現系構築」では、目的の塩基配列を有する RNA をコリネ型細菌で過剰発現させる際に有用となる強力なプロモーターを選定し、組換え RNA の大量生産系の構築に活用した。さらに、コリネ型細菌ファージ由来プロモーターと高コピー数プラスミドを組み合わせることで、コリネ型細菌での目的 RNA の過剰発現系を構築すると共に、生産したモデル RNA の機能性を評価した。試験管培養だけではなく、より厳密な培養制御が可能なジャーファーマンター培養を実施し、目的 RNA 大量発現系としての生産性を評価した。第 5 章「組換え dsRNA 生産菌の構築ならびにその摂食による標的害虫の生育抑制効果」では、モデル害虫由来アポトーシス阻害タンパク質をノックダウンする機能を持った dsRNA を生産し、実際に害虫に投与することでその生育阻害効果を確認することで、生産 dsRNA の生育阻害用農業資材としての効果を実証することにした。第 6 章「結論」では、各章で得られた結果をまとめ、本研究を総括し、社会的意義や展望を示した。

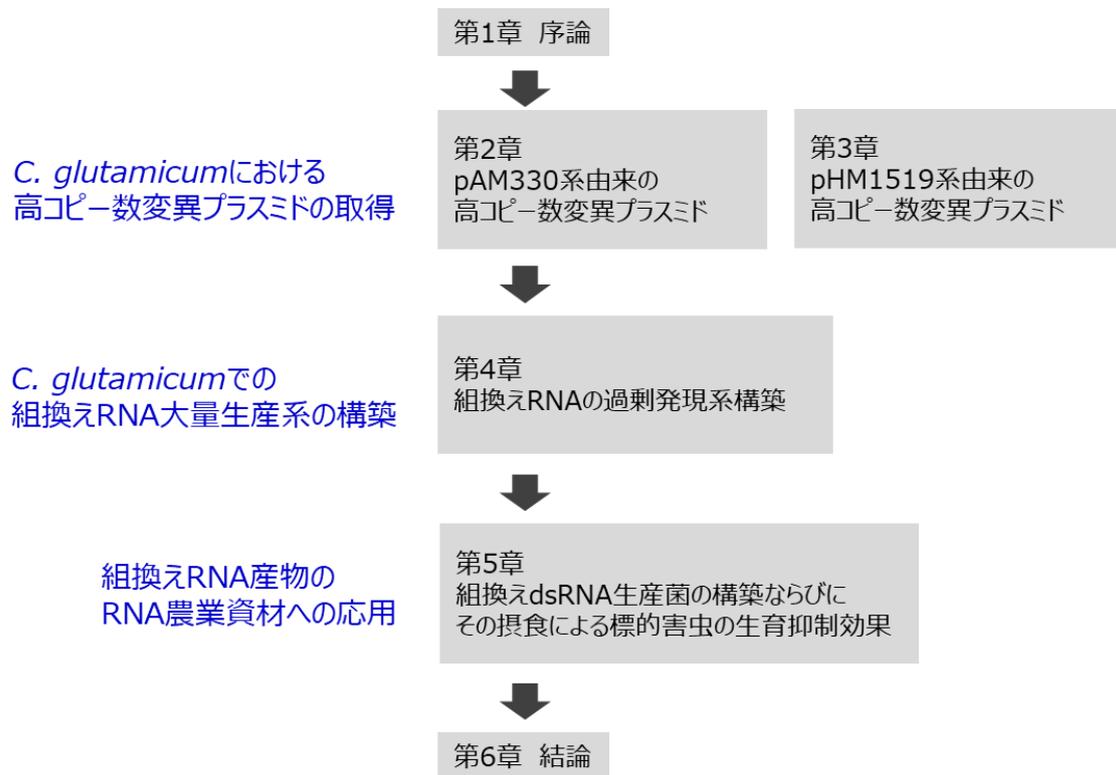


図 1-6 博士論文の構成

第 2 章

pAM330 系由来の高コピー数変異プラスミド

第1節 緒言

コリネ型細菌 *C. glutamicum* ATCC13869 株のクリプティックプラスミド pAM330 は、コリネ型細菌内で複製可能で、そのコピー数は 10 コピー程度である⁵⁰。pAM330 は *B. lactofermentum* BL0 株から単離された pBL1 プラスミドと類似しており⁵¹、ローリングサークル型複製機構によって複製される pBL1 ファミリーのメンバーとして分類される。その pAM330 プラスミドは 4448 塩基長であり、8 つの推定オープンリーディングフレーム (ORF) を含み、その内 ORF-1 と ORF-5 は自律複製に不可欠であるとされている⁵⁷。ORF-1 は複製開始タンパク質 RepA と定義されている一方で、ORF-5 は他の既知のタンパク質配列と相同性がなく、機能未知であった。これまでに、同じ pBL1 ファミリーに分類される pCG1 と pCGR2 において、短鎖アンチセンス RNA 分子が各々の *repA* 遺伝子のリーダー配列の相補的 DNA 領域にコードされていることが明らかとなっている⁵⁸。その短鎖アンチセンス RNA と *repA*-mRNA は、RNA-RNA 間の迅速なペアリングを促す U-turn モチーフ⁵⁹を含んだステムループ構造を形成することが予測され、そのループ構造部分を介し短鎖アンチセンス RNA と *repA*-mRNA が結合することで、細胞内でのプラスミドコピー数の制御がなされていると考えられている。

遺伝子工学ツールとして利用可能なプラスミドの種類が豊富であることは、*C. glutamicum* における遺伝子解析研究に有益であり、バイオテクノロジー技術を駆使した有用物質生産株の構築にも活用される⁶⁰。特に、目的物を大量生産する場合は標的遺伝子を高発現させることが一般的に有効であり、そのために高コピー数プラスミドを開発することは有意義であるといえる。これまでに pHSG399 と pAM330 を融合した *E. coli* - コリネ型細菌間のシャトルベクター pVC7 が構築されている⁶¹。まずは、pVC7 を用いて pAM330 由来複製領域がコピー制御にどのように影響するか評価することにした。味の素社に保存されていた pVC7 プラスミド配列を再解析したところ、元の報告された配列からいくつかの変異が存在していたため、そのプラスミドに pVC7N という名前を付けた。その後、*C. glutamicum* の pVC7N に由来する高コピー数変異 (*cop*) プラスミドを取得し、その遺伝的変異を解析することで pAM330 のコピー数制御機構を推定した。

第2節 方法

2.1 使用菌株、プラスミド、プライマー

2.1.1 菌株およびプラスミド

本章で使用した菌株およびプラスミドは表 2-1 に示す通りである。

表 2-1. 使用菌株およびプラスミド

菌株とプラスミド	説明	薬剤耐性	引用・入手先
Strains			
<i>C. glutamicum</i> 2256	pAM330を保持する野生株(ATCC13869)	—	50
<i>C. glutamicum</i> 2256L	2256株からpAM330を脱落させた株	—	本研究
<i>E. coli</i> JM109	<i>endA1</i> , <i>recA1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>thi-1</i> , <i>hsdR17</i> (<i>rk-</i> , <i>mk+</i>), <i>relA1</i> , <i>supE44</i> , λ^- , Δ (<i>lac-proAB</i>), F' [<i>traD36</i> , <i>proAB+</i> , <i>lacI^q</i> , <i>lacZ</i> Δ M15]	—	タカラバイオ
Plasmids			
pAM330	<i>C. glutamicum</i> 2256株が保持する天然クリプティックプラスミド 塩基配列再解析により旧配列情報GenBank Acc. No.: D00038からGenBank Acc. No.: LC406945に更新	—	57
pVC7	pHSG399(タカラバイオ)とpAM330を融合し構築した <i>E. coli</i> - コリネ型細菌シャトルベクター	Cm	61
pVC7N	正確な配列情報に更新したpVC7系プラスミド。GenBank Acc. No.: LC425431	Cm	本研究
pVC7H1	pVC7の1塩基置換(C1172A)変異体	Cm	本研究
pBS4S	スクロース資化性を付与する <i>sacB</i> 遺伝子を挿入し、 <i>C. glutamicum</i> において複製能を持たないプラスミド	—	46
pVC7-sacB	pVC7に <i>sacB</i> 遺伝子を挿入したプラスミド	Cm	本研究
pVC7(C1172A)	pVC7Nの+1172(pAM330のHindIII制限酵素認識配列5'-A↓AGCTT-3'(↓は切断箇所)のHindIII切断後の5'末端Aを+1とした)のCをAに1塩基置換したプラスミド。pVC7H1と同一配列を有する。	Cm	本研究
pVC7(C1172d, A1173d)	pVC7Nの+1172および+1173の2塩基が欠損したpVC7変異体	Cm	本研究
pVC7(C1172d)	pVC7Nの+1172の1塩基が欠損したpVC7変異体	Cm	本研究
pVC7(C1172G)	pVC7Nの+1172のC>G変異をもつpVC7変異体。pVC7H2と名する。	Cm	本研究
pVC7(C1172T)	pVC7Nの+1172のC>T変異をもつpVC7変異体	Cm	本研究
pVC7(C1171A)	pVC7Nの+1171のC>A変異をもつpVC7変異体	Cm	本研究
pVC7(C1171A, C1172A)	pVC7Nの+1171C>A変異、+1172C>A変異をもつpVC7変異体	Cm	本研究
pVC7(C1063d)	pVC7Nの+1063のCの欠失変異をもつpVC7変異体	Cm	本研究
pVC7(C1063G)	pVC7Nの+1063のC>G変異をもつpVC7変異体	Cm	本研究
pVC7(C1094d)	pVC7Nの+1094のCの欠失変異をもつpVC7変異体	Cm	本研究
pVC7(C1094G)	pVC7Nの+1094のC>G変異をもつpVC7変異体	Cm	本研究
pVC7(C1147d)	pVC7Nの+1147のCの欠失変異をもつpVC7変異体	Cm	本研究
pVC7(C1147G)	pVC7Nの+1147のC>G変異をもつpVC7変異体	Cm	本研究
pVC7(T1169d)	pVC7Nの+1169のTの欠失変異をもつpVC7変異体	Cm	本研究
pVC7(T1169A)	pVC7Nの+1169のT>A変異をもつpVC7変異体	Cm	本研究
pVC7(C1183d)	pVC7Nの+1183のCの欠失変異をもつpVC7変異体	Cm	本研究
pVC7(C1183G)	pVC7Nの+1183のC>G変異をもつpVC7変異体	Cm	本研究
pVC7(G1163d, C1183d)	pVC7Nの+1163のG欠失と+1183のC欠失の二重変異をもつpVC7変異体	Cm	本研究
pVC7(G1163C, C1183d)	pVC7Nの+1163のG>C変異と+1183のC欠失の二重変異をもつpVC7変異体	Cm	本研究
pVC7(G1163d, C1183G)	pVC7Nの+1163のG欠失と+1183のC>G変異の二重変異をもつpVC7変異体	Cm	本研究
pVC7(G1163C, C1183G)	pVC7Nの+1163のG>C変異と+1183のC>G変異の二重変異をもつpVC7変異体	Cm	本研究

菌株とプラスミド	説明	薬剤耐性	引用・入手先
pPK4	pHM1519とpHSG299とを融合したシャトルベクター	Km	61
pPK4-F1R2	<i>cop</i> 部位のF1-R2(+977~+1252, 276 bp)領域をpPK4に挿入したプラスミド	Km	本研究
pPK4-F1R3	<i>cop</i> 部位のF1-R3(+977~+1206, 230 bp)領域をpPK4に挿入したプラスミド	Km	本研究
pPK4-F2R1	<i>cop</i> 部位のF2-R1(+1034~+1320, 287 bp)領域をpPK4に挿入したプラスミド	Km	本研究
pPK4-F3R1	<i>cop</i> 部位のF3-R1(+1091~+1320, 230 bp)領域をpPK4に挿入したプラスミド	Km	本研究
pGEM-T Easy	PCR産物のクローニング用ベクターでEcoRVで切断後に、3'末端に1塩基チミジン(T)が付加されている。GenBank Acc. No.: X65308	Amp	プロメガ
pGEM-RD1	pGEM-T Easy上にpAM330由来部分配列(1056 bp)と <i>dnaA</i> 遺伝子部分配列(794 bp)を挿入。プラスミドコピー数定量解析のためのqPCR用標準プラスミド。	Amp	本研究

2.1.2 プライマー

本章で使用したオリゴ DNA の配列は表 2-2 に示す通りである。

表 2-2 使用プライマー

プライマー名	用途	塩基配列 (5'-3')	配列番号
【pVC7-sacB構築】			
sacB-amp_F	<i>sacB</i> 遺伝子増幅用	GACGTTGATCGGCACGACGATCCTTTTAAACCCATCAC	1
sacB-amp_R		AGACGTAGACAAGCTCATATGGGATTCACCTTTATGTTG	2
pVC7-amp_F	pVC7プラスミド増幅用	AGCTTGCTACGTCTGATGCTTTG	3
pVC7-amp_R		GTGCCGATCAACGTCTCATTTTC	4
【pGEM-RD1プラスミド構築】			
pGEM-Te_F	pGEM-T Easyプラスミド増幅用	AATCACTAGTGAATTCGCGGC	5
pGEM-Te_F		AATCGAATTCGCCGCGGC	6
pAM330_IF-F	<i>repA</i> 遺伝子断片増幅用	CGCGGGAATTCGATTGGGTCTGCAAACCTCTCACTCTC	7
pAM330_IF-R		TAATCCGCAGGCCAGGCATTTCAGATCAGCTTAGTAGC	8
dnaA_3'_F	<i>dnaA</i> 遺伝子断片増幅用	CTGGCCTGCGGATTAAGTACGTCTC	9
dnaA_3'_IF-R		AATCACTAGTGATTTTCATCGTAGGTATCGCGCTTTTCTG	10
【pVC7の+1172番目塩基周辺への変異導入】			
1172_R	pVC7変異体作製用	GTAGCTCGCACGGGGTGTCTTG	11
1172_F_C>A	pVC7(C1172A)作製用	GAACATCATATGCACGGGGGCCACATAAC	12
1172_F_del	pVC7(C1172d, A1173d)、 pVC7(C1172d)作製用	AACATCATATGCACGGGGGCCACATAAC	13
1172_F_C>G	pVC7(C1172G)作製用	GAACATCATATGCACGGGGGCCACATAAC	14
1172_F_C>T	pVC7(C1172T)作製用	TAACATCATATGCACGGGGGCCACATAAC	15
1172_2nt_R	pVC7(C1171A)、 pVC7(C1171A, C1172A)作製用	TAGCTCGCACGGGGTGTCTTG	16
1172_2nt_F_AC	pVC7(C1171A)作製用	ACAACATCATATGCACGGGGGCCACATAAC	17
1172_2nt_F_AA	pVC7(C1171A, C1172A)作製用	AAAACATCATATGCACGGGGGCCACATAAC	18
【sRNA1転写領域への変異導入】			
1063_F_del	pVC7(C1063d)作製用	TTTAACATTGAGTACGGGTAAGCTG	19
1063_F_C>G	pVC7(C1063G)作製用	GTTTAACATTGAGTACGGGTAAGCTG	20
1063_R	pVC7(C1063d)、 pVC7(C1063G)作製用	ATTTGCATCGACATGGGAGGGTTAC	21
1094_F_del	pVC7(C1094d)作製用	ATAGCCAAGCTAGGCGGCCAC	22
1094_F_C>G	pVC7(C1094G)作製用	GATAGCCAAGCTAGGCGGCCAC	23
1094_R	pVC7(C1094d)、 pVC7(C1094G)作製用	CGTGCCAGCTTACCCGTACTCAATG	24
1131_F_del	pVC7(A1131d)作製用	TTAATAGTTCCTAGACAAGACAAACCCC	25
1131_F_A>T	pVC7(A1131T)作製用	TTAATAGTTCCTAGACAAGACAAACCCC	26
1131_R	pVC7(A1131d)、 pVC7(A1131T)作製用	TTTTAGTGGTGTGGTGGCC	27
1147_F_del	pVC7(C1147d)作製用	AAGACAAACCCCGTGCAGAG	28
1147_F_C>G	pVC7(C1147G)作製用	GAAGACAAACCCCGTGCAGAG	29
1147_R	pVC7(C1147d)、 pVC7(C1147G)作製用	TCTAGGAATTAATTTTGTAGTGGTG	30
1163_F_del	pVC7(G1163d)作製用	CGAGCTACCAACTCATATGCACGG	31
1163_F_G>C	pVC7(G1163C)作製用	CCGAGCTACCAACTCATATGCACGG	32
1163_R	pVC7(G1163d)、 pVC7(G1163C)作製用	ACGGGGTGTCTGTCTAGG	33
1169_F_del	pVC7(T1169d)作製用	ACCAACTCATATGCACGGGG	34
1169_F_T>A	pVC7(T1169A)作製用	AACCAACTCATATGCACGGGG	35
1169_R	pVC7(T1169d)、 pVC7(T1169A)作製用	GCTCGCACGGGGTGTCTTG	36
1183_F_del	pVC7(C1183d)作製用	ACGGGGGCCACATAACCCGAAG	37
1183_F_C>G	pVC7(C1183G)作製用	GACGGGGGCCACATAACCCGAAG	38
1183_R	pVC7(C1183d)、 pVC7(C1183G)作製用	CATATGAGTTGGTAGCTCGCACG	39

プライマー名	用途	塩基配列 (5'-3')	配列番号
【cop 領域補充】			
pPK4_F	pPK4プラスミド増幅用	CGGGGATCCTCTAGAGTCG	40
pPK4_R		GTAATCATGGTCATAGCTGTTCC	41
sRNA_IF-F1	F1R2断片、F1R3断片増幅用	TATGACCATGATTACCGGTACAGACAGTGAGCAC	42
sRNA_IF-F2	F2R1断片増幅用	TATGACCATGATTACACACGTAACCCCTCCCATG	43
sRNA_IF-F3	F3R1断片増幅用	TATGACCATGATTACACGCATAGCCAAGCTAGG	44
sRNA_IF-R1	F2R1断片、F3R1断片増幅用	TCTAGAGGATCCCCGTCACCTTCTATTTTCAGTGTACCTAG	45
sRNA_IF-R2	F1R2断片増幅用	TCTAGAGGATCCCCGTTGTGCCCGTTGTCTTAG	46
sRNA_IF-R3	F1R3断片増幅用	TCTAGAGGATCCCCGCCTTCGGGTTATGTGGC	47
【pAM330除去確認用コロニーPCR】			
pAM330_colony PCR_F	<i>repA</i> 遺伝子断片増幅用	TTGGTCTAAAAACCTGCGTTCGTC	48
pAM330_colony PCR_R		GGCACATAACAGCATGACAGTTCC	49
【コピー数評価qPCR用】			
dnaA_1_F	<i>dnaA</i> 遺伝子断片増幅用	GGTCGATGACATCCAGTTCC	50
dnaA_1_R		GCTTATCTGCCTGGTGCAAT	51
dnaA_2_F		ATGGAGGTCACCTGCCGAATA	52
dnaA_2_R		CACAGGTACATCGCCAGTTG	53
dnaA_3_F		CGTGTGTCTGCCTATTCTTCGTT	54
dnaA_3_R		CGGTGCCGTGATTTCCA	55
pAM330_1_F	<i>repA</i> 遺伝子断片増幅用	TCACCTCTGGCTGAATTGGA	56
pAM330_1_R		GTCGAACAGTGCCCAACAAC	57
pAM330_2_F		GCTGGTCTGCTGGTGTGGTT	58
pAM330_2_R		GCGAGGTAGGTTGCCATTTT	59
pAM330_3_F		TGCGTGGATAAGGCTAAGGA	60
pAM330_3_R		TCCCCATGAGTAGGCAGAAC	61
【5'RACE】			
sRNA1_5'RACE_1	sRNA1 転写開始点同定用	CCATGTCGATGCAAATCTTTAACATTGAG	62
sRNA1_5'RACE_2		TACGGTAAGCTGGCACGCATAG	63
rep_5'RACE_1	<i>repA</i> 転写開始点同定用	CCCTTAGCGAGGTAGGTTGCCATTTTCG	64
rep_5'RACE_2		GATTACGCCAAGCTTACCCCCGTACCGTGCACGTTCTTTC	65

2.2 培養条件

プラスミド構築のために用いた *E. coli* JM109 株 (タカラバイオ) の形質転換株の培養は、Luria-Bertani (LB) 培地 (Difco) を用いた。必要に応じて寒天 (Difco) 15 g/L、抗生物質としてクロラムフェニコール (Cm)、カナマイシン (Km) をそれぞれ 25 µg/mL、50 µg/mL の終濃度となるよう添加した。培養は 37°C で実施し、液体培養の場合 120 rpm で 12 時間振とうを行った。

C. glutamicum の試験管培養は、CM-Dex 培地を使用した。必要に応じて寒天 (Difco) 20 g/L、抗生物質として Cm、Km をそれぞれ 5 µg/mL、25 µg/mL の終濃度となるよう添加した。培養は 30°C で実施した。*C. glutamicum* の形質転換はエレクトロポレーション (電気穿孔) 法にて実施した。CM-Dex 培地 2 mL に対し、プレートに生えてきた菌体を白エーゼ (Nunc、ループ容積 1 µL) 摺り切り 1 かき分植菌して 30°C、120 rpm で 3 時間振とう培養を行った。細胞壁を弱化するための細胞壁合成阻害剤としてアンピシリン (Amp) を 20 µg/mL の終濃度となるよう添加し、さらに 1 時間振とう培養を行った。その後、培養液を 2.0 mL チューブに移し、4°C で 14,400 x g、2 分間遠心した。上清を捨てた後、菌体を氷冷した滅菌水で 3 回洗浄した後、最終液量が約 80 µL になるよう菌体溶液を調製し、コンピテントセルとして用いた。コンピテントセルを 1 mm キュベット (Bio-Rad) に移し、約 200 ng のプラスミド DNA を混合し、Gene Pulser Xcell (Bio-Rad) を用いて、エレクトロポレーション (電場強度 18 kv/cm、コンデンサー容量 25 µF、抵抗値 200 Ω) を実施した。形質転換後のキュベットに 1 mL の CM-Dex 培地を加え、30°C で 2 時間振とうすることで回復培養を実施した。その後、回復培養後の培養液約 80 µL を各種薬剤を含んだ CM-Dex プレートに塗布した。

菌株培養評価は試験管培養系で行い、必要な抗生物質を含む CM-Dex 培地 2 mL に対し、プレートに生えてきた菌体を白エーゼ (Nunc、ループ容積 1 µL) 摺り切り 1 かき分を植菌して 30°C、120 rpm で 18 時間振とう培養を行った。プラスミド除去の場合には、スクロースを糖源とした S10 培地プレートを使用した。

2.3 プラスミドの構築

2.3.1 pVC7-sacB 構築

pVC7N に *sacB* 遺伝子を挿入した pVC7-sacB は以下のように作製した。DNA 鋳型として pBS4S プラスミド⁴⁶ を、プライマーとして 1 と 2 を使用し、PrimeSTAR GXL DNA Polymerase (タカラバイオ) を用いて、PCR により *sacB* 遺伝子断片を得た。また、DNA 鋳型として pVC7N プラスミドを、プライマーとして 3 と 4 を使用し、KOD FX NEO (東洋紡) を用いた PCR により pVC7N ベクター断片を得た。得られた断片を、In-Fusion HD Cloning Kit (クロンテック) を用いて融合した。次に、この反応溶液を用いて、*E. coli* JM109 株コンピテントセル (タカラバイオ) を形質転換し、Cm を終濃度 25 µg/mL で含む LB 寒天培地上に塗布して 37°C で一晩培養した。その後、LB 寒天培地上に出現したコロニーを選抜し、Cm を終濃度 25 µg/mL で含む LB 液体培地に植菌し振とう培養を実施した。こうして得られた形質転換株の培養菌体から QIAprep Spin Miniprep Kit (キアゲン) を使用しプラスミド DNA を抽出し、連結部分の DNA 配列解析により目的とするプラスミドの構築を確認し、これを pVC7-sacB と命名した。

2.3.2 pGEM-RD1 構築

プラスミドコピー数の精密定量のための標準品プラスミド作製にあたって、pAM330 由来の *repA* 遺伝子断片とゲノム DNA 由来の *dnaA* 遺伝子断片の 2 遺伝子断片を pGEM-T Easy プラスミドに組み入れた pGEM-RD1 を以下のように構築した。まずは、pGEM-T Easy プラスミドを鋳型としプライマー 5 と 6 を使用し、PrimeSTAR GXL DNA Polymerase を用いた PCR により、ベクター断片を得た。また、pVC7N または *C. glutamicum* 2256 株のゲノム DNA を鋳型とし、プライマー 7 と 8、プライマー 9 と 10 を使用し、KOD FX NEO を用いた PCR により *repA* 遺伝子断片および *dnaA* 遺伝子断片を取得した。このようにして得た 3 種の増幅断片を、In-Fusion HD Cloning Kit を用いて連結した。この反応溶液を用いて、*E. coli* JM109 株コンピテントセルを形質転換し、Amp を終濃度 100 µg/mL で含む LB 寒天培地上に塗布して 37°C で一晩培養した。その後、LB 寒天

培地上に出現したコロニーを選抜し、Amp を終濃度 100 µg/mL で含む LB 液体培地に植菌し振とう培養を実施した。こうして得られた形質転換株の培養菌体から QIAprep Spin Miniprep Kit を用いてプラスミド DNA を抽出し、DNA 配列の解析により目的とするプラスミドを確認し、これを pGEM-RD1 とした。

2.3.3 部位特異的変異の導入法

各変異または欠失プラスミド pVC7(C1172A)、pVC7(C1172d, A1173d)、pVC7(C1172d)、pVC7(C1172G)、pVC7(C1172T)、pVC7(C1171A)、pVC7(C1171A, C1172A) は KOD -Plus- Mutagenesis Kit (東洋紡) を用いて次のように作製した。pVC7N プラスミドを鋳型に、表 2-2 に示す組み合わせのプライマーを用いて PCR を行った。PCR 産物にキット付属の制限酵素 DpnI を加えて鋳型プラスミドの消化反応を行った後、その直鎖状プラスミドを含む反応液を用いてキット付属の T4 Polynucleotide Kinase および Ligation high によるセルフライゲーション反応を実施した。その反応液で *E. coli* JM109 株コンピテントセルを形質転換し、Cm を終濃度 25 µg/mL で含む LB 寒天培地上に塗布して 37°C で一晩培養した。その後、LB 寒天培地上に出現したコロニーを選抜し、Cm を終濃度 25 µg/mL で含む LB 液体培地に植菌し振とう培養を実施した。こうして得られた形質転換株の培養菌体から QIAprep Spin Miniprep Kit を用いてプラスミド DNA を抽出し、DNA 配列の解析により目的とするプラスミドを確認した。

2.3.4 sRNA1 コード領域の変異体プラスミドの構築

各変異または欠失プラスミド pVC7(C1063d)、pVC7(C1063G)、pVC7(C1094d)、pVC7(C1094G)、pVC7(A1131d)、pVC7(A1131T)、pVC7(C1147d)、pVC7(C1147G)、pVC7(G1163d)、pVC7(G1163C)、pVC7(T1169d)、pVC7(T1169A)、pVC7(C1183d)、pVC7(C1183G) は KOD -Plus- Mutagenesis Kit を用いて作製した。2.3.3 に記載した方法により、pVC7N プラスミドを鋳型に、表 2-2 に示す組み合わせのプライマーを用いて PCR を行った。

2.3.5 各種 *cop* 領域の DNA 断片保持プラスミドの構築

pVC7 系プラスミドの高コピー数化に関与すると考えられる各種 *cop* 領域を pPK4 プラスミドに導入した。pPK4 プラスミドを鋳型に、プライマー40 と 41 を使用し、KOD FX NEO にて PCR を行い、pPK4 増幅断片を得た。F1R2、F1R3、F2R1、F3R1 の各種増幅断片は、pVC7 プラスミドを鋳型として、プライマー42 と 46、プライマー42 と 47、プライマー43 と 45、プライマー44 と 45 を使用し、KOD FX NEO にて PCR を行った。得られた増幅断片を、In-Fusion HD Cloning Kit 使用して融合し、pPK4-F1R2、pPK4-F1R3、pPK4-F2R1、pPK4-F3R1 を取得した。

2.4 DNA 塩基配列の決定法

BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (アプライドバイオシステム) を用いてシーケンス反応を行い、BigDye XTerminator Purification Kit (アプライドバイオシステム) を用いて反応液の精製を行った。その後、Genetic Analyzer 3500xL (アプライドバイオシステム) にて精製サンプルの塩基配列解析を行った。

2.5 pAM330 プラスミドのキュアリング法

pVC7-sacB を *C. glutamicum* 2256 株に導入し、Cm を終濃度 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ で含む CM-Dex 寒天培地に塗布し 30°C で一晚培養後、複数個の形質転換体を取得した。続いて、その中から、pAM330 が除去された pVC7-sacB 保持株を選択し、これらの株をスクロース含有 S10 寒天培地に塗布し、30°C にて一晚培養することで、pVC7-sacB が脱落しスクロース非感受性となった株を取得した。pAM330 の除去確認のためのコロニーPCR として、pAM330 の *repA* 遺伝子領域内でアニールするプライマー48 と 49 を使用し、KOD FX NEO を用いて PCR を行った。予想される増幅断片長は 573 bp であり、PCR の伸長時間は 60 秒に設定した。PCR 反応溶液をアガロースゲル電気泳動により分析した。トリス-酢酸-EDTA 緩衝液 (TEA 溶液、ナカライテスク) と Agarose, Type II, Medium EEO (シグマアルドリッチ) を使用して 0.8% w/v アガロースゲルを作成し、1 ×

TAE 溶液を泳動緩衝液として用いた。サンプルは、10 × Loading Buffer (タカラバイオ) と混合しアガロースゲルにロードした。マーカーは 1 Kb Plus DNA Ladder (サーモフィッシャーサイエンティフィック) を使用した。

2.6 コリネ型細菌からのプラスミド抽出法

CM-Dex 培地を用いた試験管培養系で 18 時間 30°C で振とう培養した後、培養液 500 μ L を遠心分離 (14,400 x g, 2 min) し、集菌した。菌体に対して、QIAprep Spin Miniprep Kit を用いて次のようにプラスミド抽出を実施した。コリネ型細菌はグラム陽性菌で、強固な細胞壁に覆われているため、その細胞壁を分解するため、15 mg-Lysozyme (L6876、シグマアルドリッチ) /mL-Buffer P1 を調製した。その溶液 250 μ L で菌体を懸濁し、37°C で 30 分間 Lysozyme 酵素反応による細胞壁分解を行った。以降、Buffer P2 を添加するところからは通常のプラスミド抽出と同じ操作で実施し、カラムからの DNA 溶出工程では、30 μ L の Buffer EB (10 mM Tris·Cl, pH 8.5) で溶出を行った。

2.7 プラスミドのコピー数定量方法 (qPCR)

コピー数定量のための基準とする対象遺伝子は既往の方法⁵⁶を参考にして、染色体に関しては DNA 複製に関与する *dnaA* 遺伝子を、pVC7 由来プラスミドに関しては *repA* 遺伝子を選択し、DNA 増幅用のプライマーを設計した。*dnaA* 遺伝子は染色体上に 1 コピーであることが報告されて²⁴、*repA* 遺伝子はプラスミド上に 1 コピー存在することから、これら対象遺伝子を定量することで染色体あたりのプラスミドのコピー数を算出することができる。18 時間培養した菌体からプラスミド DNA とゲノム DNA を含む全 DNA は次のように抽出した。培養液 500 μ L 分の菌体を遠心分離 (14,400 x g, 2 min) により回収し、15 mg/mL lysozyme (ニワトリ卵白由来、シグマアルドリッチ) 含有 TE 緩衝液 300 μ L で懸濁し、37°C で 30 分間反応させた。その反応液に 2% SDS 溶液 300 μ L と 20 μ L proteinase K (タカラバイオ) を添加し、56°C で 30 分間加温した。その後、

95°C で 15 分間加温することで酵素不活化を行い、室温まで下げてから 0.5 µg/µL RNase A (キアゲン) を 1 µL 添加し、5 分間反応させた。次に、タンパク質除去のため、反応液と等量のフェノール/クロロホルム/イソアミルアルコール (25:24:1、ナカライテスク) を添加し、室温で 21,600 x g、5 分間遠心した。その上清 500 µL に対して、50 µL 3M 酢酸ナトリウムと 500 µL 2-プロパノールを添加し、4°C で 21,600 x g、20 分間遠心した後、上清を除去し、氷冷した 70% エタノール 1mL を添加し、4°C で 21,600 x g、5 分間遠心した後、上清を除去し、室温で 5 分間風乾した。最後に TE 緩衝液で溶解し、吸光光度計 NanoDrop 2000 で核酸濃度を測定した。RT-qPCR の増幅ならびに解析法として、上記のように調製した total DNA 溶液約 5 ng を鋳型として、3 セット (50 と 51、52 と 53、54 と 55) の *dnaA* 遺伝子増幅用プライマーと 3 セット (56 と 57、58 と 59、60 と 61) の *repA* 遺伝子増幅用プライマーを用い、SYBR Premix Ex Taq (Tli RNaseH Plus) (タカラバイオ) を使用し LightCycler 96 (ロシュ) にて qPCR を実施した。また、検量線作成のため pGEM-RD1 プラスミド溶液の 10 倍希釈系列を作製し、*dnaA* 遺伝子と *repA* 遺伝子のコピー数定量用の DNA 量として 1×10^{-14} g から 1×10^{-10} g までの検量線作成用サンプルを調製し、qPCR を行った。pGEM-RD1 の結果を対照区として用いることで、*dnaA* 遺伝子と *repA* 遺伝子の増幅の差を補正し、各々の C_q 値の比を算出することでコピー数を決定した。

2.8 RNA-seq での転写領域の検定法

pAM330 の RNA 転写挙動を評価するため、pAM330 を保持する 2256 株の試験管培養 18 時間後の培養サンプルを回収し RNA-seq 解析に供した。培養液は RNAprotect Bacteria Reagent (キアゲン) で処理し、TRIzol (サーモフィッシャーサイエンティフィック) 処理後、Ribo-Zero rRNA Removal Kit (Gram-Positive Bacteria) (イルミナ) で rRNA 除去し、TruSeq Stranded mRNA Sample Prep Kit (イルミナ) でサンプル調製した。シーケンシングには MiSeq Reagent Kit v2 500 cycles (イルミナ) を用いた。調製したライブラリーを 4 mM に希釈し、等量ずつプールしたものを、NaOH 溶液で変性させ、7 pM になるように更に希釈した。このようにして調製したサンプル

を MiSeq (イリミナ) によるシーケンスに供した。得られたシーケンスデータは解析ソフトウェア CLC Genomics Workbench (キアゲン) を用いて解析した。FASTQ ファイルを Pair-end リードとしてインポートし、クオリティの低いリードのトリミングを実施後、トリミングされたリードデータを 2256 株のドラフトゲノム (GenBank: AP017557.1) に対してマッピングを行った。

2.9 転写開始点の決定

sRNA1 転写開始点の同定のため、まずは 2256 株 (pAM330 保持株) を試験管培養系で 18 時間培養し、TRIzol 処理による total RNA 抽出後、その RNA サンプルを Poly A tailing kit (サーモフィッシャーサイエンティフィック) によるポリ A 配列付加し、SMARTer RACE 5'/3' Kit (タカラバイオ) を用いて、first-strand cDNA サンプルを作製した。その後、SMARTer RACE 5'/3' Kit 付属のユニバーサルプライマーミックスと sRNA1 に対応する特異的プライマー (1st PCR としてプライマー-62、nested PCR 用 2nd PCR としてプライマー-63) を用いてキット付属の SeqAmp による PCR 反応を実施し sRNA1 由来の cDNA 断片を取得した。その後、キット付属の配列解析用の線状化した pRACE ベクターにサブクローニングし、配列解析を実施した。

repA 遺伝子転写開始点に関しては、*repA*-mRNA の 5'側が強固な二次構造を形成され逆転写反応が最後まで進行しないことが推測された。そこで、*repA*-mRNA 存在量が多いと考えられる高コピー数プラスミド形質転換体 2256L/pVC7H2 株由来 RNA サンプルを使用し、次のように逆転写反応温度を 42°C から 45°C へと高めた条件での解析を行うことにした。2256L/pVC7H2 株の 6 時間培養菌体から TRIzol 処理により抽出した total RNA を鋳型として SMARTer RACE 5'/3' Kit を用いて、*repA* 特異的プライマー-64 を使用し、反応温度 45°C で 90 分間逆転写反応を行い、*repA* 由来の first-strand cDNA サンプルを取得した。次に、その first-strand cDNA を鋳型として、SMARTer RACE 5'/3' Kit 付属のユニバーサルプライマーミックスと、In-Fusion 用相同配列を付加した *repA* 特異的プライマー-65 を使用し、キット付属の SeqAmp による PCR 反応を実施し *repA* 由

来の cDNA 断片を取得した。その後、キット付属の配列解析用の線状化 pRACE ベクターにサブクローニングし、配列解析を実施した。

2.10 プラスミドの安定性評価

2256L/pVC7N、2256L/pVC7H1、2256L/pVC7H2 の 3 株を、CM-Dex 培地 (抗生物質無添加) に植菌し、試験管培養を行い、半日おきに継代を行い、4 日間培養 (計 8 回の植え継ぎ) を実施した。植え継ぎは、200 分の 1 量の前培養液 10 μ L を、CM-dex 培地 2 mL に植菌した。培養後の培養液を CM-dex 培地に播種し、生えてきたコロニーを 100 個選別し、CM-dex 培地プレートおよび Cm を終濃度 5 μ g/mL で含む CM-dex 培地プレートに移し、各コロニーの抗生物質耐性能の保持を確認した。さらに、培養 4 日 (96 時間) 後の各々の培養液 500 μ L からプラスミド抽出を行い、制限酵素 BamHI 処理で線状化したサンプルを用いて 0.8%アガロースゲル電気泳動を行った。

第3節 結果と考察

3.1 pAM330 のキュアリングによる *C. glutamicum* 2256L 株の取得

C. glutamicum 2256 株は pAM330 を有するため、以降の育種親株として pAM330 を保持しない株を作成すべく、そのプラスミドキュアリングを実施した。*Bacillus subtilis* 由来 *sacB* 遺伝子 (Genbank Acc. No. X02730) を導入した pVC7-*sacB* プラスミドを作製した。pVC7-*sacB* プラスミドを *C. glutamicum* 2256 株に導入することで、pVC7-*sacB* と pAM330 が同一細胞内に存在することとなる。pVC7-*sacB* と pAM330 は同じ複製起点を有することから不和合性が生じるため pAM330 が除去され、Cm 存在下では Cm 耐性遺伝子を有した pVC7-*sacB* プラスミドの保持株が選択的に取得されることになる。*C. glutamicum* における *sacB* 遺伝子発現は、スクロース存在下ではネガティブマーカーとして機能し生育阻害を引き起こすことが知られている⁶²。そして、これらの pVC7-*sacB* プラスミド保持株をスクロース含有 S10 寒天培地に塗布し、30°C にて一晚培養することで、pVC7-*sacB* が脱落しスクロース非感受性となった株を 2 株取得した。2 株の試験管培養菌体からプラスミド抽出を行い、制限酵素 BamHI で 1 カ所切断した後、アガロースゲル電気泳動による分析を行ったところ、候補株#1、#2 では pAM330 に相当するプラスミド DNA バンドが確認されなかった (図 2-1A)。また *repA* 遺伝子領域内で設計したプライマーセットを用いたコロニー-PCR を実施しても、相当する DNA 断片は増幅されないことから、2256 株から pAM330 を除去した 2256L 株の取得を確認した (図 2-1B)。このことは、保持していた pAM330 を喪失した 2256 株を得たことを示し、この株を改めて 2256L 株と命名した。

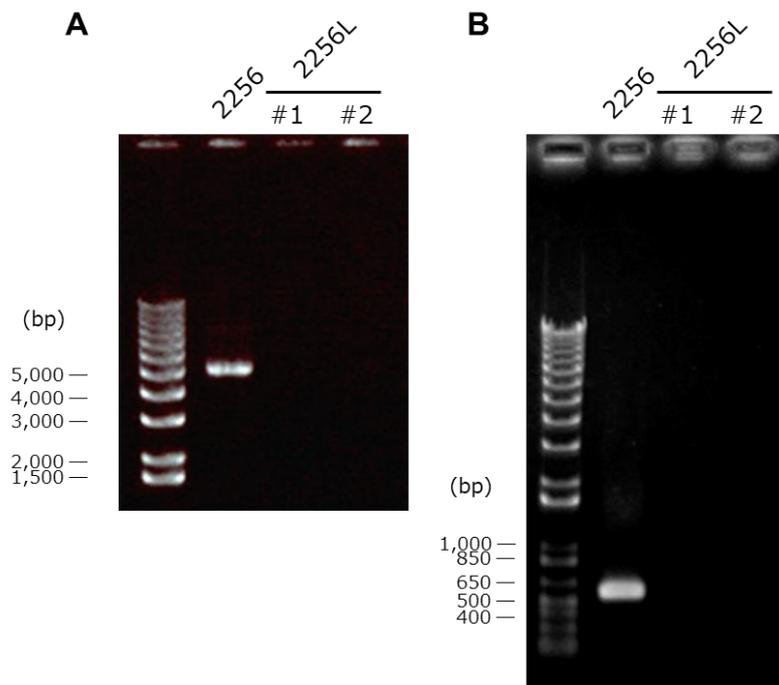


図 2-1 2256 株からの pAM330 プラスミドのキュアリング

(A) 抽出プラスミドのアガロースゲル電気泳動、(B) コロニーPCR 産物のアガロースゲル電気泳動

3.2 高コピー数変異プラスミド pVC7H1 の取得

C. glutamicum 2256 株に pVC7N を導入し Cm 耐性を指標に形質転換体を取得しようとする
と、Cm 含有寒天培地上に形成されるコロニーはサイズが小さいものが増加し、コロニー数も一般
的な形質転換時よりも減少する (図 2-2A)。形質転換後のコロニー形成が不均一化する現象か
ら、同じ複製起点を有する pAM330 と pVC7N 間で不和合性が発揮され、pVC7N プラスミドの複
製阻害が起こっていることが推定された (図 2-2B)。そこで、そのような条件下で Cm 含有プレー
トによる形質転換体の選抜を進めると、pVC7N に自然変異が導入されることによって pAM330-
pVC7N 間の不和合性が弱まった pVC7N 変異プラスミドが取得できると仮説を立てた。そして、
pVC7N 変異プラスミドの中に、pVC7N のプラスミド数制御機構が脱感作され、高コピー数化した
変異体が含まれていると考えられた。そこで、形質転換体選択時の Cm 濃度を高めることによ
って高コピー数化プラスミドを選抜することにした。

2256 株に対して pVC7N を形質転換し、通常使用する Cm 薬剤濃度 5 µg/mL に対して 2 倍の
Cm 薬剤濃度 10 µg/mL のプレートに播種した後、そこで生育してきたコロニーから 60 コロニーを
選抜した。各コロニーの試験管培養を行い 12 時間後の培養菌体からプラスミド抽出を行い、アガ
ロース電気泳動を行ったところ、pAM330 の DNA バンドが薄い、あるいは見えないクローンが多
く確認された (図 2-3)。そして、60 株のうち 1 株 (No. 39 と命名) から調製したプラスミドにおい
て明らかにプラスミドの DNA バンド量が増大したクローンを見出した。そこで、このクローン株か
ら抽出した pVC7N プラスミドを pVC7H1 と命名した。No.39 クローン株は、形質転換後のプレート
上でのコロニーサイズが大きいという特徴があったものの、その他のコロニーサイズが大きかった
クローンから抽出したプラスミドの DNA バンドの増大は確認できなかったことから、コロニーサイ
ズのみでの高コピー数化変異株の選別は難しいことが示唆された。

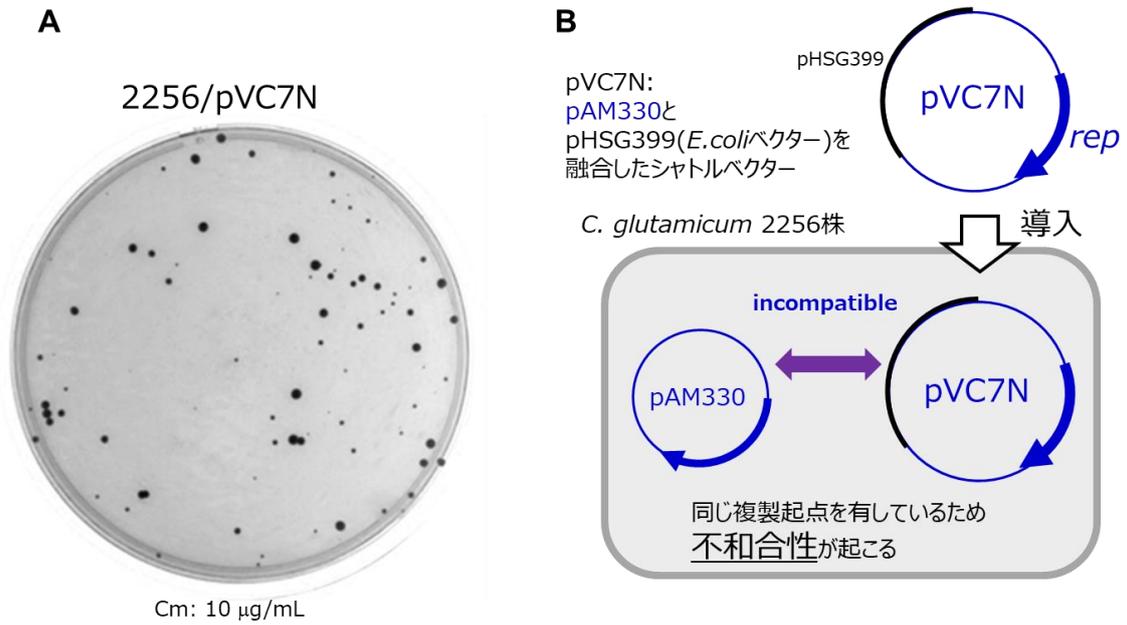


図 2-2 不和合性を利用した高コピー数化プラスミドスクリーニング

(A) 2256 株に pVC7N を形質転換した際のコロニー形成の様子 (B) 2 つのプラスミドが同一複製起点を有することによる不和合性起きることに対する説明図

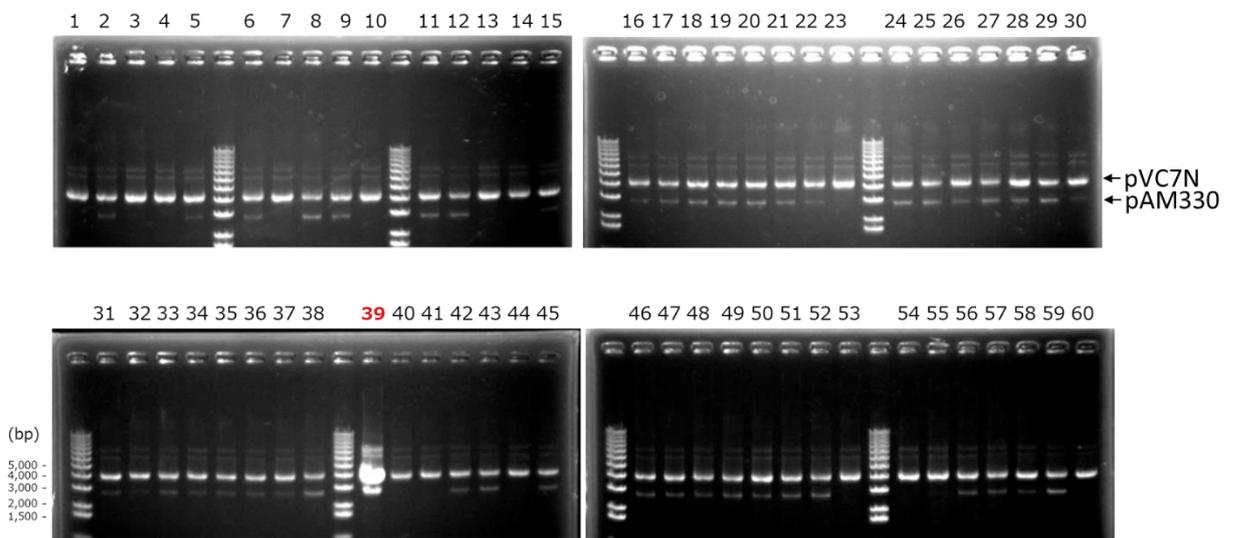


図 2-3 pVC7N 変異プラスミドのアガロースゲル電気泳動分析

3.3 pVC7H1 の変異点解析および各種変異体のコピー数評価

取得した pVC7H1 の塩基配列を解析したところ、pVC7H1 は、pVC7N での+1172 番目 (pAM330 の HindIII 制限酵素認識配列 5' -A ↓ AGCTT-3' (↓ は切断箇所) の HindIII 切断後の 5'末端 A を+1 とした) に位置するシトシン (C) がアデニン (A) へと変化するトランスバージョン型の 1 塩基置換が明らかになった。そこで、この変異をコピー数変異 *copA1* と命名した。また、部位特異的変異導入によって *copA1* 変異を導入した pVC7(C1172A)の 2256L 株の形質転換体を調べたところ、同様にプラスミド収量が高くなったことから、この *copA1* 変異が、pVC7N の高コピー数化につながる事が分かった。

copA1 変異箇所である+1172 番目の位置は、複製開始タンパク質 Rep のコード領域近傍に位置する。pAM330 プラスミドはローリングサイクル型の複製機構に分類され、複製開始タンパク質 RepA のホモ二量体が複製起点に結合することでプラスミド複製が開始される。RepA の発現量変化がプラスミドコピー数に影響を与えている可能性があった。pVC7N プラスミドにおいて、RepA の翻訳開始点は未同定であるが、+1215 番目の TTG の場合、*copA1* 変異点は RepA-ORF 上流に位置しており、この領域では RNA の二次構造形成が予想される (図 2-4)。また、RepA の翻訳開始点が+1161 番目の GTG の場合、この *copA1* 変異は開始コドンから 4 残基目 Thr をコードするコドンの 3 番目の塩基に位置し、シトシンからアデニンに変化しても同じ Thr をコードするサイレント変異であった。RepA 翻訳開始点の位置を見定めるため、pVC7N の+1172 番目の位置周辺に変異を導入し、その変異のプラスミドコピー数へ与える影響を調べることにした。

+1172 番目周辺における *copA1* 以外の *copA2*(C1172G)、*copA3*(C1172T)、*copA4*(C1171A)、*copA5*(C1171A, C1172A)、*copA6*(C1172d)、*copA7*(C1172d, A1173d)の 6 種の変異をもつプラスミド (図 2-5) を構築し、これらを 2256L 株へ導入し、形質転換体の取得を行った。その結果、4 種のプラスミド変異 *copA2*(C1172G)、*copA3*(C1172T)、*copA4*(C1171A)、*copA6*(C1172d)では形質転換体が取得できた。一方、*copA6*(C1172d)の変異では、+1172 番目の C を欠失させており、RepA の翻訳開始点を+1161 番目とした場合は RepA-ORF のフレームシフトが起こるため、プラスミド複

製が阻害されるため形質転換体が取得出来ないと考えられた。実際には *copA6*(C1172d)変異体は取得できたことから、RepA の翻訳開始点は+1215 番目以降である可能性が高いことが分かった。

各種形質転換体の培養サンプルから total DNA を抽出しコピー数を評価したところ、5 種いずれのプラスミド変異体においてもコピー数の増加が確認された。*copA1* 変異で見られた pVC7H1 のプラスミドコピー数は約 110 コピー/染色体であるのに対して、pVC7(C1172G)は、さらに高いコピー数（約 315 コピー/染色体）を示したことから、この塩基の変化を *copA2* 変異と命名し、pVC7(C1172G)を pVC7H2 と名付けた。以上より、+1172 番塩基周辺の配列は、pVC7 系プラスミドのコピー数制御機構に重要であることが判明した。

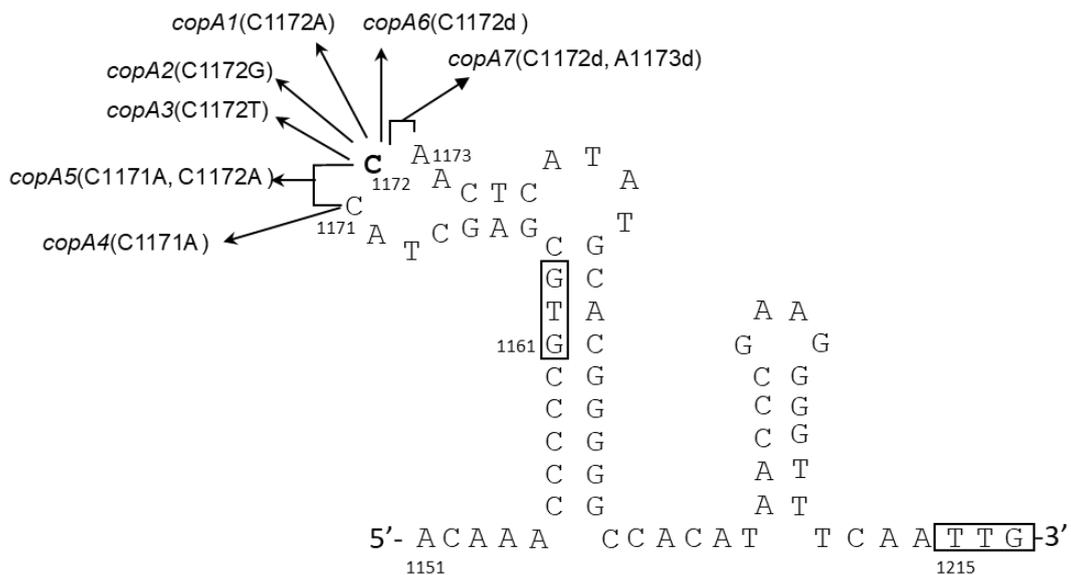


図 2-4 +1172 番目近傍の変異点位置の説明図

+1172 番目近傍の領域は、RepA-ORF の上流に位置している。変異点を DNA 配列上に示す。黒枠で囲った+1161~+1163 番目および+1215~+1217 番目の位置は、RepA-ORF の開始コドン候補位置を示す。

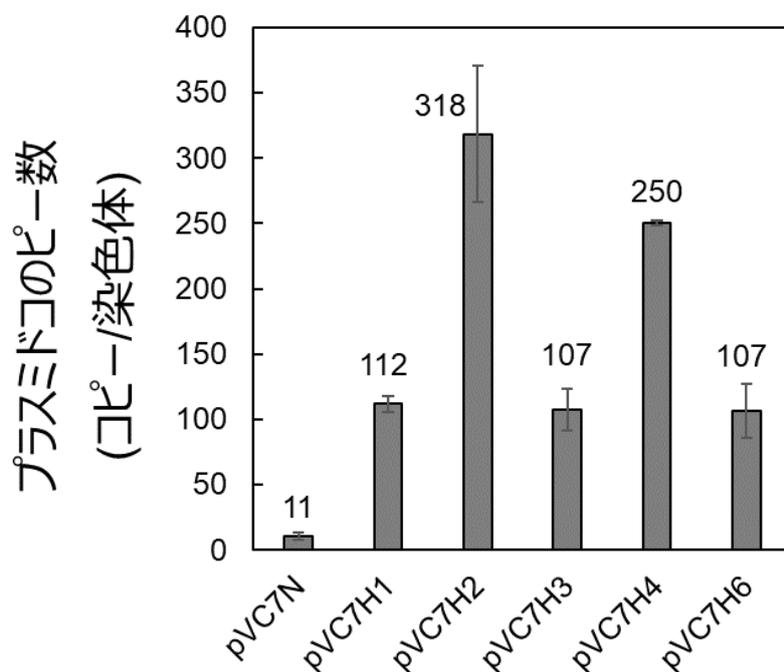


図 2-5 +1172 番目近傍の各種変異体のコピー数評価

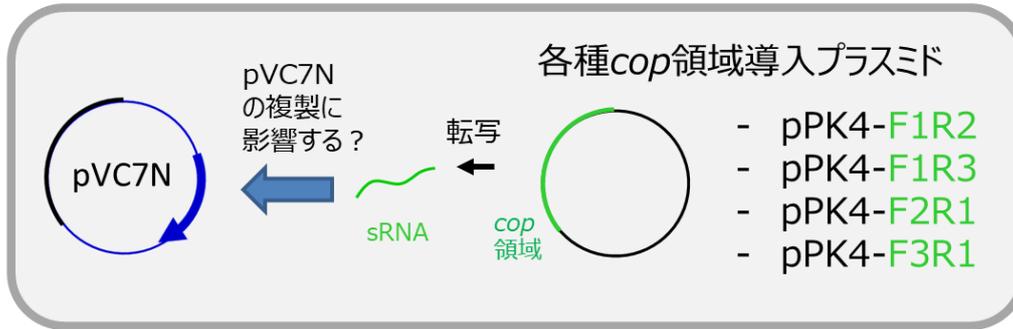
各プラスミドを保持する 3 クローンにて、そのプラスミドのコピー数を調べた。n=3 で、各値は平均 ±SD で示した。なお、各種プラスミド変異 *copA1*(C1172A)、*copA2*(C1172G)、*copA3*(C1172T)、*copA4*(C1171A)、*copA6*(C1172d)は、それぞれ pVC7H1、pVC7H2、pVC7H3、pVC7H4、pVC7H6 に相当する。

3.4 *cop* 領域による pVC7N のコピー数への影響評価

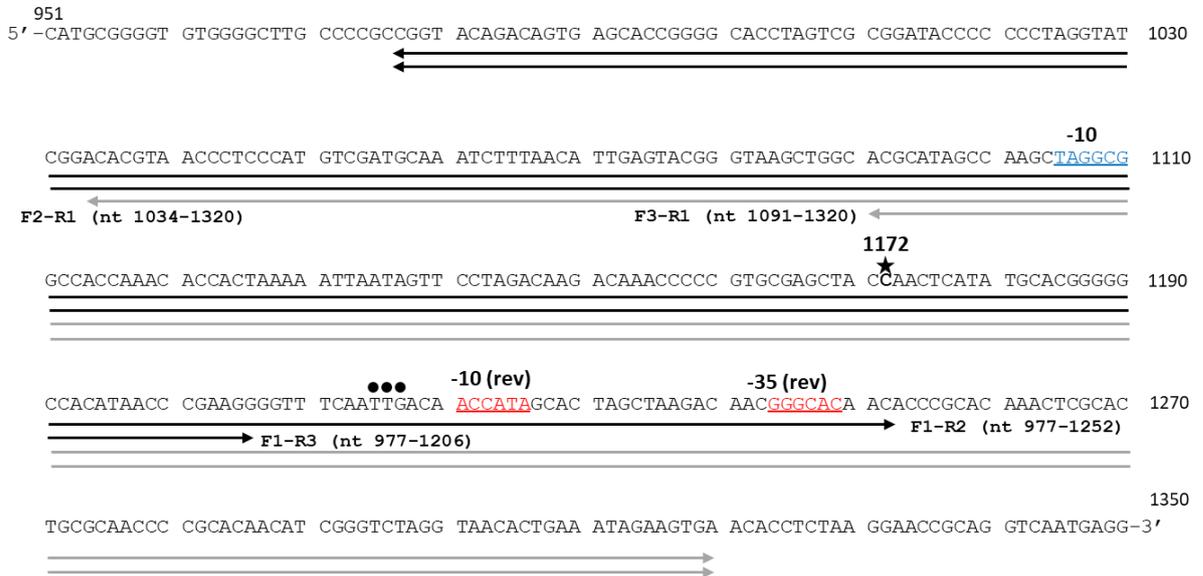
プラスミドの複製制御機構には、低分子の sRNA が自身のプラスミド複製をネガティブに制御している例が知られている⁶³。従って、pAM330 の場合も、この *cop* 領域からなんらかの低分子の機能性 RNA が産生され、それがトランスにターゲットに対して作用しているかどうかを検討することにした (図 2-6A) 。pVC7N (Cm 耐性) とは複製起点が異なり共存可能な pPK4 (Km 耐性) に *cop* 領域を含む各サイズの DNA 領域 (図 2-6B) を挿入することで、pPK4-F1R2 (+977 番目から+1252 番目までの領域を挿入) 、pPK4-F1R3 (+977 番目から+1206 番目までの領域を挿入) 、pPK4-F2R1 (+1034 番目から+1320 番目までの領域を挿入) 、pPK4-F3R1 (+1091 番目から+1320 番目までの領域を挿入) の 4 種を構築した。これらの各プラスミドで 2256L/pVC7N 株を形質転換した後に、Cm 及び Km を含むプレートで生えてきたコロニーを取得した。その後、Km のみを含む培地で各菌株を培養し、菌体内の pVC7N のコピー数を調べた。Cm 存在下では薬剤選択圧の影響により pVC7N のコピー数の低下が抑制される可能性があるため、Cm 無添加条件での試験管培養評価を行うこととした。

その結果、pPK4-F1R2 導入株および pPK4-F3R1 導入株では、pVC7N プラスミドのコピー数は染色体あたり 4 コピー数程度まで大幅に減少し、pPK4-F2R1 導入株や pPK4-F3R1 導入株においてもコピー数が減少する傾向が示された (図 2-6C) 。従って、トランスに作用し複製を負に制御する因子が *cop* 領域から産生されている可能性が示唆された。また pPK4-F1R3 導入株では、pVC7N プラスミドのコピー数がやや減少するに留まっていることから、+1207 番目から+1252 番目のまで領域が pVC7N プラスミド複製の負の制御に必須であることが示された。また、pVC7N のコピー数減少の程度から推測するに、その因子の産生に必要な領域は、F3-R2 に挟まれた +1091 番目から+1252 番目までの領域であることが示された。

A



B



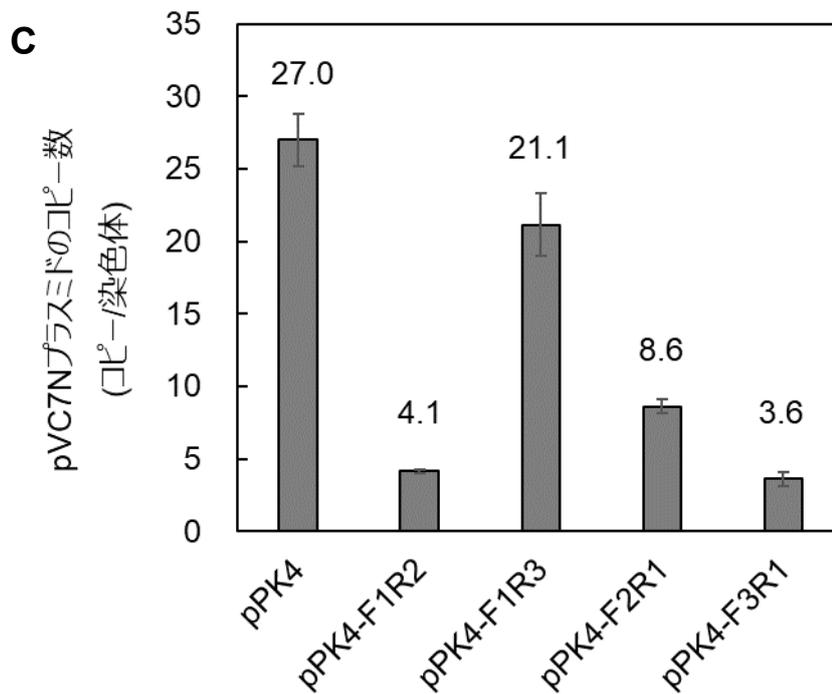
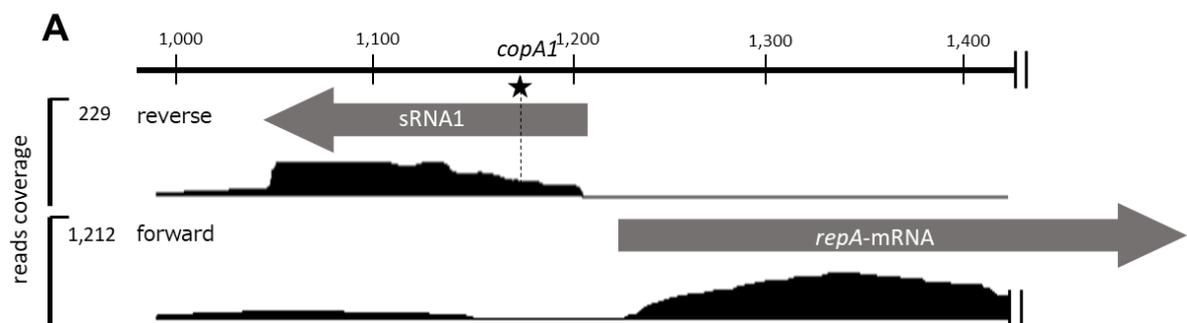


図 2-6 *cop* 領域による pVC7N のプラスミドコピー数への影響評価

(A) 各種 *cop* 領域の増強が pVC7N プラスミドのコピー数に与える影響を調査する説明図 (B) pPK4 に挿入した *cop* 領域の各 DNA 断片。各々下線部で示す塩基配列の *cop* 領域を pPK4 に挿入したものを作製した。星印は+1172 番目の *copA1* 変異箇所、丸印は開始コドン、赤文字は sRNA1 の推定プロモーターの位置、青文字は *repA* の推定プロモーターの位置を示す。(C) 各種 *cop* 領域断片を有するプラスミドとの共存による pVC7N のコピー数評価。各プラスミドを保持する 3 クローンにて、そのプラスミドのコピー数を調べた。n=3 で、各値は平均±SD で示した。

3.5 *cop* 領域における転写物の解析

上記の結果は、この+1091 番目から+1252 番目までの *cop* 領域にはなんらかの RNA がコードされ転写されている可能性を示唆している。そこで RNA-seq 解析により、*C. glutamicum* 2256L/pVC7N 株でのこの領域の RNA 転写を解析した。図 2-7A に示すように、低分子 RNA (約 170 塩基長) が *cop* 領域を含む領域 (pVC7N のマップ上で+1042 番目から+1200 番目までの領域) から、RepA の mRNA と思われる転写 (*repA*-mRNA) とは反対方向に転写されていることがわかり、前述の考察を支持する結果が得られた。さらに、それらの転写物の 5'末端を 5'-RACE にて調べたところ、その低分子 RNA の転写開始点は +1212 番目の G と決定された。また、*repA*-mRNA は +1120 番目の C と決定され、この 2 つの RNA の 5'末端は互いに 93 塩基ほど重なることがわかった (図 2-7B)。こうして、+1212 番目から +1042 番目の全長約 170 塩基長の *cop* 領域を含む低分子 RNA を small RNA1 (sRNA1) と命名した。また核酸二次構造予測ソフト mfold⁶⁴により sRNA1 の二次構造から、*copA1* 変異箇所はヘアピンループ構造のループアウト部分に位置することがわかった (図 2-8)。



B

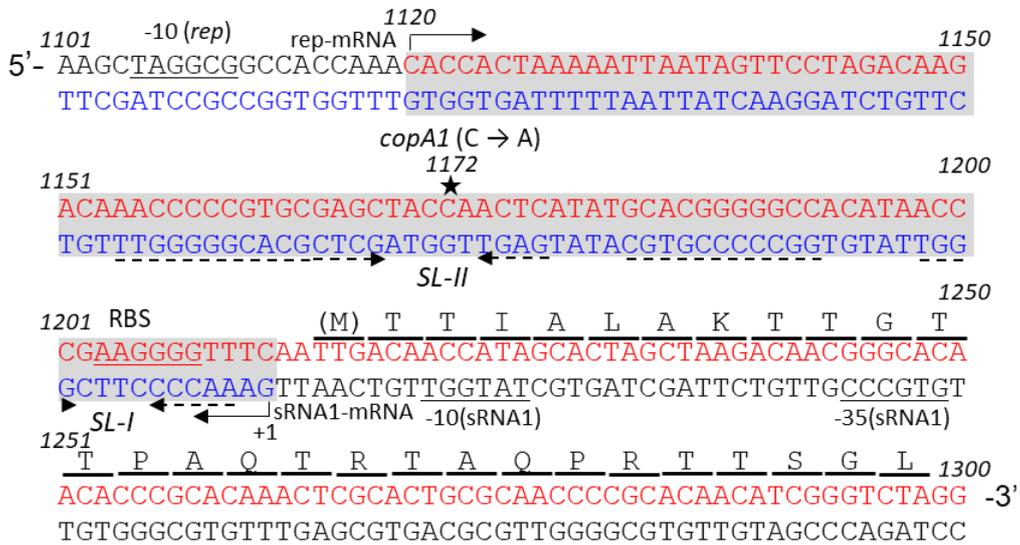


図 2-7 *copA1* 領域周辺の転写地図

(A) RNA-seq 解析に基づく RNA 転写地図 (B) *copA1* 領域周辺の配列説明。sRNA1 の転写開始点とその想定プロモーター (-10 及び -35 領域) 及び、*repA* の転写開始点、その想定プロモーター (-10) そして推定の SD 配列と翻訳開始コドンを示す。灰色箇所は sRNA1 と *repA*-mRNA の重なる領域、赤字は *repA*-mRNA 転写領域、青字は sRNA1 転写領域、破線はこの領域から転写される RNA がとると推定される二つのステム構造 (SL-I, SL-II) の領域を示す。

3.6 sRNA1 の機能解析とコピー数制御機構のモデル

sRNA1 が制御因子として働くのであれば、その二次構造は機能発現に重要であると想定される。pAM330 と同様にローリングサークル型複製機構であるコリネ型細菌由来クリプティックプラスミド pCG1 ファミリーにおいて、*repA*-mRNA の上流から逆向きに転写が開始される 70 塩基長程度の sRNA がコピー数制御に関与することが分かっており、sRNA の二次構造として 2 個のステム-ループ (SL) 構造を形成する⁵⁸。pAM330 由来 sRNA1 は 170 塩基長と、pCG1 由来の sRNA よりも長鎖であり、その推定構造では、SL-I から SL-V までの 5 つの SL 構造の存在が予想された (図 2-8)。この構造が機能に重要であるかどうかを検討するため、SL 構造箇所を中心に変異導入を行い、その影響を調べた。各ステム領域に変異を導入した pVC7N 変異プラスミドを作製し、2256L 株へ形質転換したところ、全てのプラスミドで形質転換体が取得できた。その後、各変異プラスミドの量をアガロースゲル電気泳動で確認すると共に qPCR によるコピー数評価を行った。SL-II 以外の領域、すなわち、+1063、+1094、+1131、+1147 の部位での変異では、それをもつプラスミドは、元の pVC7N と比べてそのコピー数はほぼ同程度であったが、+1169、+1183 の部位での欠失変異や塩基置換では、明らかにそのコピー数が増加することがわかった (図 2-9)。このことから、プラスミドのコピー数制御には sRNA1 の推定二次構造での 5' 末端から 2 つめのステム-ループ構造 (SL-II) が重要であることが示唆される。

次に、この SL-II の構造が重要であることを確認するため、SL-II ステム構造中の +1183 の塩基 C と対合すると予測されている +1163 の塩基 G の変異体を組み合わせて、それらの変異がコピー数の表現型にどのような効果をもたらすかを調べた。+1183 の C を G へ置換した変異体 C1183G は上記のようにコピー数が増大するが、C1183G 変異体に対して +1163 部位での G を欠失した C1183G, G1163d 変異体では、C1183G 変異体と同程度の高コピー数を維持した。一方で、+1163 部位での G を C へ置換した C1183G, G1163C 変異体では、コピー数が元の pVC7N 程度に低減することがわかった (図 2-10)。このことは、この部位の塩基配列は変わるものの、sRNA1 としての二次構造の大きな崩れがない場合は、sRNA1 によるコピー数抑制機構は十分に

機能することを示唆している。一方、+1163 の G と +1183 の C をともに欠失させた変異体では、二次構造上ではステム構造が 1 塩基対分短縮されるだけで大きな変化は無いと予測されたが、コピー数は増加することが分かった。このことは、SL-II 領域の長さも、その機能発揮に重要であることを示唆している。

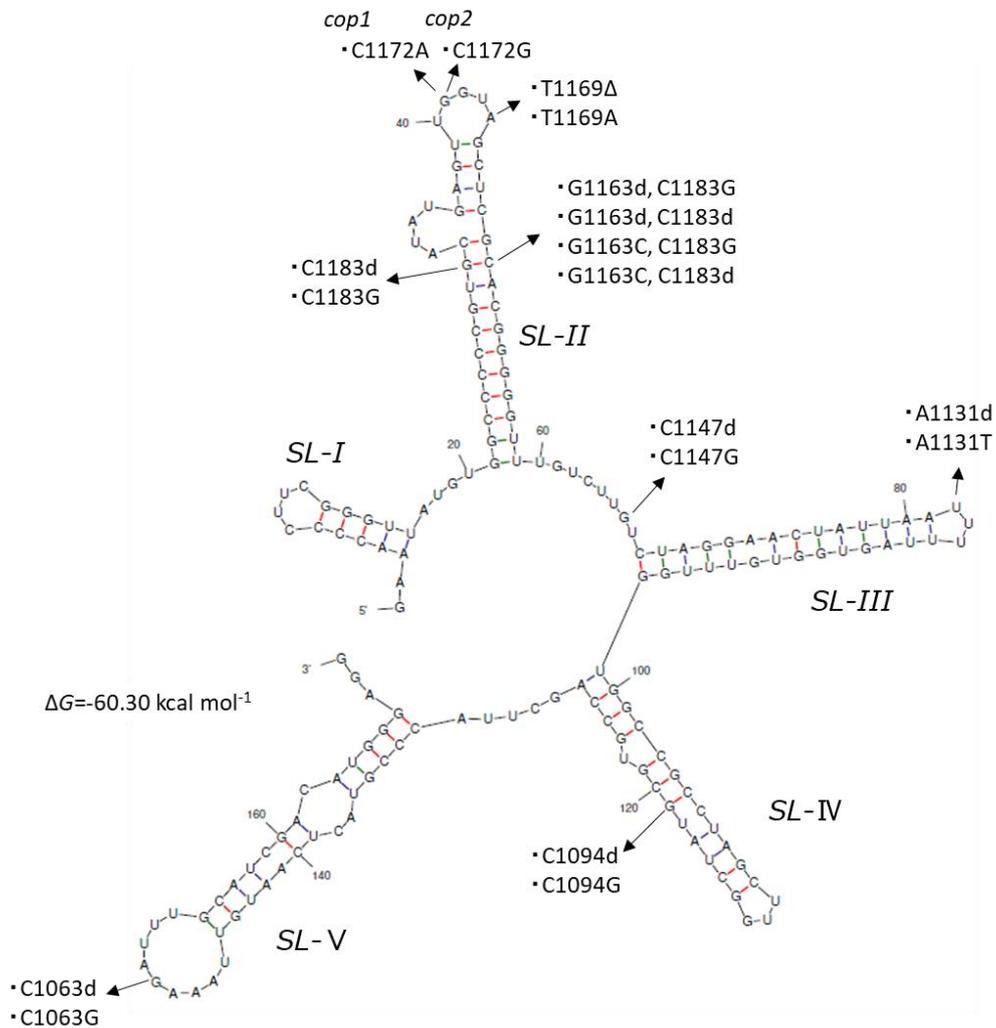


図 2-8 sRNA1 の推定二次構造

RNA の二次構造予測を mfold ソフトにて実施した。ステム-ループ構造として、5' 末端より、それぞれ SL-I から SL-V までのステム-ループ構造の形成が予測された。各変異点を矢印で示した。なお、C1183G は、DNA 鎖上での +1183 の位置の C を G へ置換したことを、C1183d は、その C を欠失させたことを意味する。

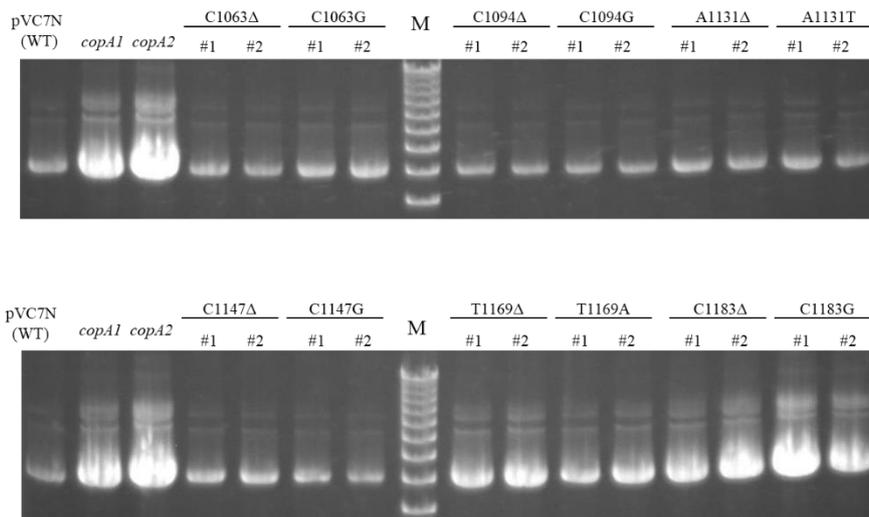


図 2-9 sRNA1 領域での各種変異をもつ pVC7N 変異体のコピー数比較

各プラスミドを保持する *C. glutamicum* 2256L 株の、2 クローンから調製したプラスミド DNA を HindIII 制限酵素で処理し、一カ所切断にて線状化したプラスミドを泳動した。図 2-7 で示す通り、SL-V、SL-IV、SL-III、SL-III と SL-II の間、SL-II の各箇所に変異を導入したプラスミドを評価した。*copA1* は pVC7H1、*copA2* は pVC7H2、M は、DNA マーカー (2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 kbp バンド) を示す。

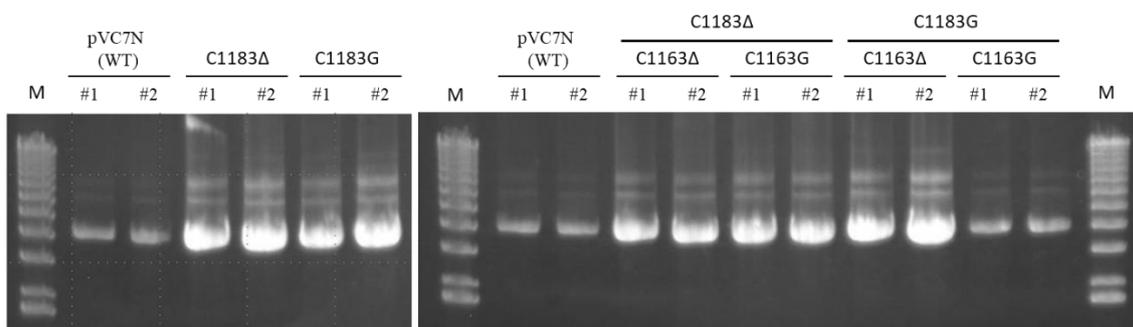


図 2-10 変異の相補実験

各プラスミドを保持する 2 クローンずつから調製したプラスミド DNA を HindIII 制限酵素で処理し、一カ所切断にて線状化したプラスミドを泳動した。図 2-7 で示す通り、SL-II の各箇所に変異を導入したプラスミドを評価した。M は、DNA マーカー (1.5, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 kbp バンド) を示す。

sRNA1 の転写開始点の上流には、-10 領域として 5'-TATGGT-3'、-35 領域として 5'-GTGCCC-3'が見出された (図 2-7B)。これらはそれぞれ *C. glutamicum* での σ^A プロモーターにおけるコンセンサス配列⁵⁵ (-10 領域, 5'-TA(t/c)aaT-3': -35 領域 (一般的に-35 領域は保存性が低いとされる)、5'-ttGcca-3') と同源性を有する。*repA*-mRNA のプロモーターについては、-35 領域に相当する配列は見いだせなかったものの、-10 領域として 5'-TAGGCG-3'を転写開始点から 10 塩基上流の位置に見出した。RepA の翻訳開始位置が +1215 番目 (開始コドン TTG) であるならば、その 5 塩基上流に、翻訳開始に重要とされる *C. glutamicum* の 16S rRNA の 3'末端の 5'-ACCTCCTTT-3'に対応した配列を持つ、5'-GAAGGGGTT-3'が RBS として想定できた。一般的に考えられる低分子 RNA による遺伝子発現の調整機構として、その RNA による目的 mRNA の RBS を露出させることで発現を活性化するか、逆に RBS を覆い隠すことで発現を抑制することが知られている⁶⁵。

pAM330 の近縁プラスミド pCC1⁶³ では、*repA*-mRNA リーダー配列はステム-ループ構造を形成し、RBS が突出した位置にあるとされている (図 2-11A)。pCC1 プラスミドにおいて、*repA*-mRNA リーダー配列近傍から相補的な sRNA の転写は報告されていないが、類似したコピー数制御機構を有していると仮定した場合、pAM330 においても pCC1 と似た構造を形成すると考えられる。pAM330 プラスミドから転写される sRNA1 が *repA*-mRNA と対合すると、その 5'末端領域が RNA-RNA 間結合を形成することで、*repA*-mRNA 上の RBS を覆い隠すような配置となる。その結果、16S rRNA 末端との結合が上手く機能せず *repA* 遺伝子の発現を負に制御され、プラスミドのコピー数が減少すると考えられる (図 2-11B、図 2-11C)。また、このモデルに基づくと、sRNA1 量を増強することはプラスミドのコピー数を低減させることになり、3.4 の結果と一致する。

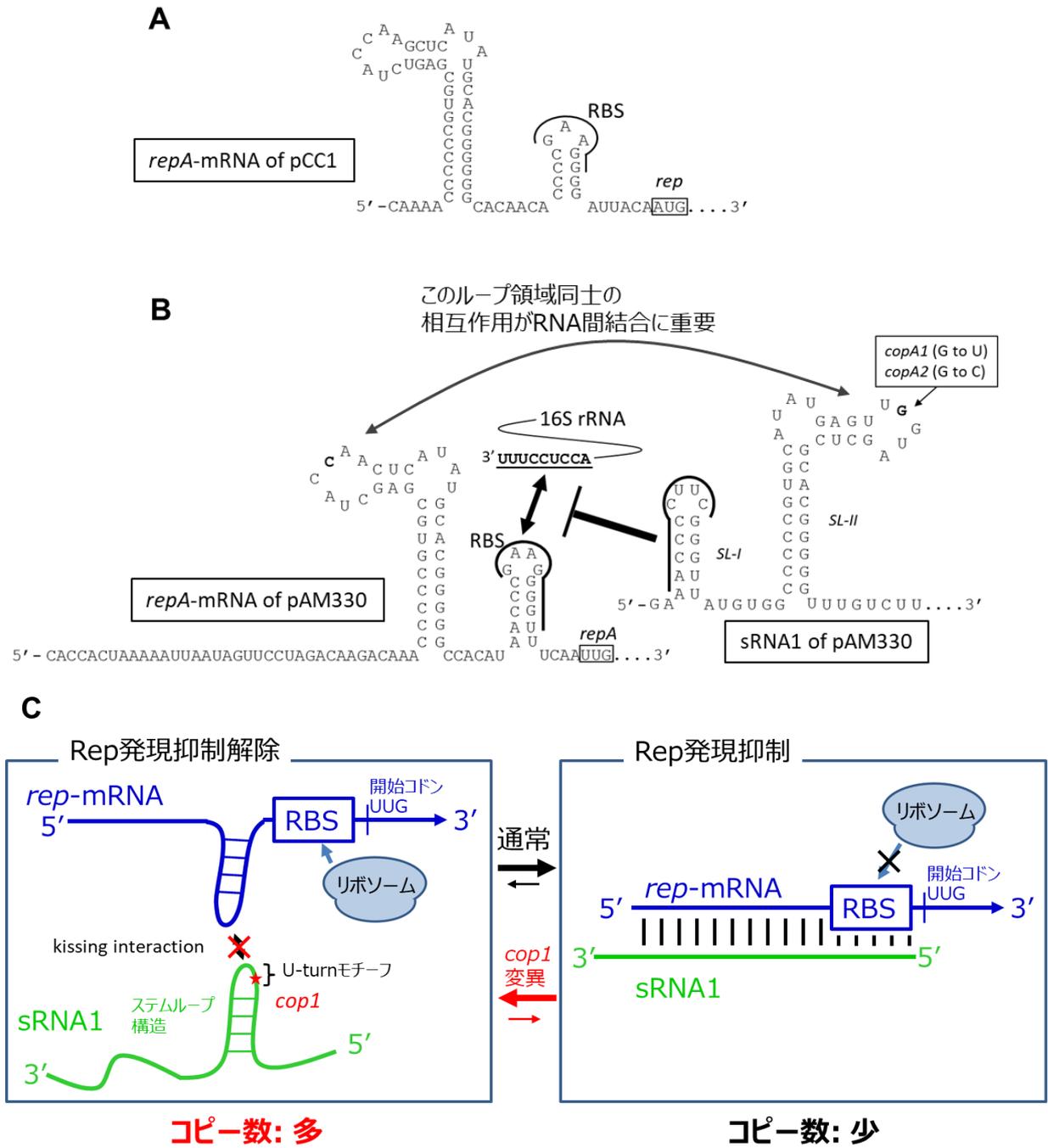


図 2-11 pAM330 の *repA* 遺伝子発現抑制機構のモデル

- (A) pCC1 での *repA*-mRNA の推定二次構造 (B) pAM330 での *repA*-mRNA と sRNA1 との関係
(C) 推定される Rep 発現抑制機構

高コピー数化につながる *cop* 変異部位は sRNA1 の SL-II のループ領域に位置しており、ループ配列 (5'-UUGGUAG-3') は U-turn モチーフに分類される (図 2-11B)。これは、原核生物におけるアンチセンス RNA やそのターゲットとなる RNA における U-turn のコンセンサス配列 (5'-YUNR-3', Y はピリミジン、N はプリンの場合が多いがすべての塩基、R はプリン塩基) に一致する (表 2-3)。なお、U-turn モチーフは RNA - RNA 間の対合相互作用を促進するため原核生物が元々有している機能構造であり、ループ構造が足場となり U-turn モチーフの YUNR 部分を露出することで、ループ-ループ間での迅速な結合でもたらすことが知られている^{59, 63, 66}。*repA*-mRNA に結合することで翻訳を抑制すると考えられる sRNA1 だが、結合開始時にはこの U-turn モチーフが対象 RNA 領域と結合することが重要であると考えられる。つまり、U-turn モチーフへの変異、または U-turn モチーフのステム領域の構造変化を引き起こす変異は、*repA*-mRNA - sRNA1 間の結合を阻害し、結果 RepA タンパク質の翻訳抑制が解除されその当該プラスミドのコピー数が増加すると考えられる。実際、sRNA1 に各種変異を導入した変異体プラスミドのコピー数評価を行った際、SL-II のループ部分の U-turn モチーフおよび U-turn モチーフのステム領域に変異導入した場合に限って、プラスミドのコピー数増加が起こった結果と一致する (図 2-8)。

表 2-3 各種 U-turn 配列との相同性比較

RNA species	Plasmid	stem - loop - stem 5'- YUNR -3'
sRNA 1 (SL-II)	pAM330	AG - UUGGUAG - CU
RNA I (loop II) ⁵⁹	ColE1	AG - UUGGUAG - CU
RNA I (loop II) ⁵⁹	p15A	AG - UUGGUAG - CU
RNA I (loop II) ⁵⁹	RSF1030	AG - UUGGUAG - CU
RNA I (loop I) ⁵⁹	ColE1	CG - UUGGUAG - CG
RNA I (loop I) ⁵⁹	RSF1030	CG - UUGGUAG - CG
putative RNA ⁶⁶	pCC1	AG - CUGGUAA - CU
ctRNA (S1) ⁶³	pGA1	AG - CUGAUGA - CU

E. coli や *C. glutamicum* 由来のプラスミドでの small RNA における U-turn モチーフ (5'-YUNR-3') を整列した。sRNA1 で確認された保存配列 (5'-UUGG-3') 部分を灰色で示す。

3.7 高コピー数化プラスミドの安定性評価

本研究において取得した高コピー数化プラスミド pVC7H1 および pVC7H2 がコリネ菌体内で安定的に保持されるかどうかの評価を行った。*C. glutamicum* 2256L/pVC7N、2256L/pVC7H1、2256L/pVC7H2 の 3 株を CM-dex 培地 (Cm 無添加) に植菌し、試験管培養を行い、12 時間毎に継代を行い、トータルで 96 時間の培養を行った。各サンプリング時間で取得されたコロニー 100 個の Cm 耐性能の有無を基準として、プラスミド保持確認を行った。2256L/pVC7N 株、2256L/pVC7H1 株ではほぼプラスミド脱落は確認されなかったが、2256L/pVC7H2 株は継代 48 時間で 22 個、96 時間で 3 個のプラスミド保持数を示し、Cm 無添加培養条件ではプラスミド脱落頻度が高いことが示された (表 2-4)。また、継代 96 時間、計 8 回の植え継ぎを実施した培養液から抽出したプラスミドを電気泳動した結果、2256L/pVC7H2 株のプラスミド量は 2256L/pVC7N 株のプラスミド量を下回ることからも、pVC7H2 は抗生物質無添加条件でコリネ菌体内での安定性が低いことが示された (図 2-12)。この原因として、pVC7H2 プラスミドはコピー数の増加に伴って Cm 耐性遺伝子の発現量も増加することで生育に負荷がかかる状況が予想され、その結果 pVC7H2 プラスミドが培養途中に脱落していくものと考えられる。Cm 添加培養条件では、pVC7N、pVC7H1、pVC7H2 のすべてのプラスミドが安定保持可能であることが分かっている。

表 2-4 各培養時間でのプラスミド保持コロニー数 (100 コロニーあたり)

	24 h	48 h	72 h	96 h
pVC7N	100	100	100	100
pVC7H1	100	100	100	100
pVC7H2	90	22	15	3

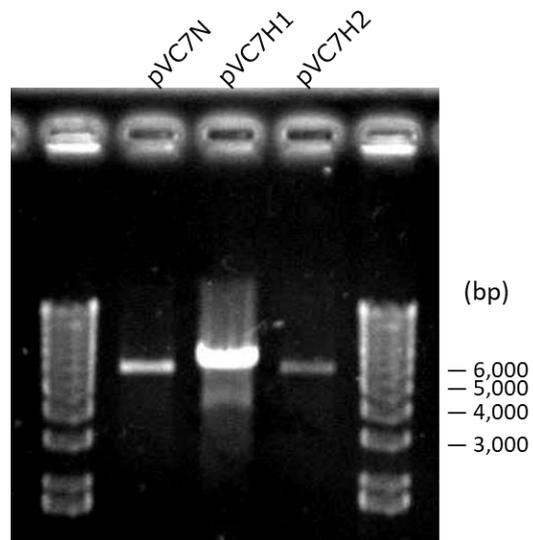


図 2-12 Cm 無添加条件での継代培養後のプラスミド泳動確認

プラスミド DNA を HindIII 制限酵素で処理し、一カ所切断にて線状化したプラスミドを泳動した。
また、プラスミド DNA は継代培養 96 時間目の培養液から抽出した。

第4節 結言

コリネ型細菌由来クリプティックプラスミド pCG1 ファミリーにおいて、*repA*-mRNA の上流から逆向きに転写が開始される sRNA がコピー数制御に関与すること⁵⁸が分かっていたが、本研究においても pAM330 から転写される sRNA1 が発見された。pBL1 ファミリーに分類される pAM330 プラスミドでも pCG1 プラスミドと同様の複製制御機構が存在しておりことが今回初めて示された。本研究では、sRNA1 が *repA*-mRNA の RBS 領域に結合することでリボソームの結合を阻害し翻訳抑制が起こり RepA タンパク質の発現が抑制されコピー数が抑制されるといった制御モデルを提案した。実際、*copA1* 変異点を含む SL-II 領域に変異導入することで、そのほとんどがコピー数の増加につながっていることから、sRNA1 の中でも SL-II はコピー数制御に重要なドメインであることを明らかにした。さらに、野生型の約 20 倍のコピー数である変異 *copA2* を見出し、*C. glutamicum* 菌での高コピー数ベクター pVC7H2 (約 300 コピー/染色体) の取得を達成した。これは pAM330 プラスミドにおける高コピー数変異体取得、ならびにコピー数制御機構推定の最初の報告例である。また、pAM330 プラスミドと同属の pBL1 ファミリーグループ内の pCC1、pAG3 においても、*repA*-mRNA リーダー配列の比較において類似構造がみられることから共通の複製制御機構があることが推定された。このことは、pAM330 の場合と同様な変異導入操作を行うことで、それらのプラスミドも高コピー数化できることが期待される。本研究で開発できた高コピー数ベクターは、RNA 生産を含めたコリネ型細菌を宿主とした各種物質生産、遺伝子解析研究といった用途への展開についても期待される。

第 3 章

pHM1519 系由来の高コピー数変異プラスミド

第1節 緒言

コリネ型細菌内在性プラスミド pHM1519 は *C. glutamicum* ATCC 13058 株から見い出され⁵⁰、他の *C. glutamicum* 株から類似のプラスミドとして pCG1⁶⁷、pSR1⁵²、pCG100⁶⁸ が単離されている。これまでに、pHM1519 (3,070 bp) と pCG1 (3,069 bp、GenBank: AB027714.1) の全長塩基配列が決定され、1 つの塩基の違いのみでほぼ同一のプラスミドであることが明らかになっている⁶⁹。pCG1 ファミリーに属する pHM1519、pCG100、pSR1 はいずれも、同程度のサイズで塩基配列の相同性も高い。pCG100 および pSR1 の分子学的解析から、pHM1519 の自律複製領域は、必須の複製タンパク質 RepA をコードする *repA* 遺伝子を含む 1.9 kbp の DNA 領域と特定されている。pHM1519 の RepA は、ローリングサークル型複製の複製開始タンパク質であり、複製開始タンパク質で広く保存された Yuxk モチーフ⁷⁰ を含む 485 アミノ酸残基で構成される。pCG100 および pSR1 のコピー数は 30 コピー程度であり、沖部らの報告内で pCG1 ファミリープラスミドにおけるアンチセンス RNA を介したプラスミドコピー数制御機構が推定され⁵⁸、複製開始タンパク質 RepA コード領域のアンチセンス鎖にコードされる small RNA (sRNA) が、*rep*-mRNA リーダー配列と相互作用することで複製を負に制御することが示された。pHM1519 を用いた代表的な *E. coli* - コリネ型細菌間のシャトルベクターとして pPK4 が構築されており、そのコピー数は 40 コピー程度であるとされてきた⁶¹。pPK4 プラスミドは、遺伝子工学ツールとして利用され、バイオテクノロジー技術を駆使した有用物質生産株の構築にも活用される。特に、目的物を大量生産する場合は標的遺伝子を高発現させることが一般的に有効であり、そのために高コピー数プラスミドを開発することは有意義であるといえる。したがって、本研究では、pHM1519 と *E. coli* とのシャトルベクター pPC4 (Cm 耐性遺伝子導入) の高コピー数化体取得を行った。そして、その高コピー数化変異を、Km 耐性遺伝子を保持する同じベクター、pPK4 に移行し、その pPK4 を高コピー数化した。また、高コピー数化変異について解析を行うとともに、その高コピー数ベクターの有効活用の事例として、目的タンパク質の高生産化の検討を行った。

第2節 方法

2.1 使用菌株、プラスミド、プライマー

2.1.1 菌株およびプラスミド

本章で使用した菌株およびプラスミドは表 3-1 に示す通りである。

表 3-1. 使用菌株およびプラスミド

菌株とプラスミド	説明	薬剤耐性	引用・入手先
Strains			
<i>C. glutamicum</i> 2256L	2256株からpAM330を脱落させた株	—	第2章
<i>E. coli</i> JM109	<i>endA1</i> , <i>recA1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>thi-1</i> , <i>hsdR17</i> (<i>rk-</i> , <i>mk+</i>), <i>relA1</i> , <i>supE44</i> , λ^- , Δ (<i>lac-proAB</i>), <i>F'</i> [<i>traD36</i> , <i>proAB+</i> , <i>lacI^q</i> , <i>lacZ</i> Δ M15]	—	タカラバイオ
Plasmids			
pHM1519	<i>C. glutamicum</i> ATCC13058株が保持するクリプティックプラスミド	—	50
pPC4	pHSG399とpHM1519断片を融合したシャトルベクター	Cm	本研究
pPC4H1	pPC4の1塩基変異(G2497A)により高コピー数化したプラスミド。RepAタンパク質429番目のGlyがGluに置換。	Cm	本研究
pPK4	pHSG299とpHM1519断片を融合したシャトルベクター	Km	61
pPK4H1	pPK4の1塩基変異(G2497A)により高コピー数化したプラスミド。RepAタンパク質429番目のGlyがGluに置換。	Km	本研究
pPK4(1nt-del)	pPK4の1塩基欠損体(G2497 Δ)	Km	本研究
pPK4(1nt-sub)	pPK4の1塩基置換体(A2498C)	Km	本研究
pPK4(1aa-del)	pPK4の +2496~+2498(GGA) までの3塩基欠損体	Km	本研究
pPK4(G>A)	pPK4の1塩基置換体(G2497C)	Km	本研究
pPK4(G>K)	pPK4の2塩基置換体(G2496A, G2497A)	Km	本研究
pPK4(G>D)	pPK4の2塩基置換体(G2497A, A2498C)	Km	本研究
pPK4(G>P)	pPK4の2塩基置換体(G2496C, G2497C)	Km	本研究
pPK4(G>Q)	pPK4の2塩基置換体(G2496C, G2497A)	Km	本研究
T5-Dasher GFP	I緑色蛍光タンパク質発現ベクター。オペリアクラゲ由来GFPを使用し、T5プロモーター下流にGFP配列が位置する設計となっている。	Km	ATUM
pPK4-dGFP	pPK4の +5588部位に「SD配列-dasher GFP」を挿入したGFP発現用プラスミド。	Km	本研究
pPK4H1-dGFP	pPK4-GFPの1塩基変異(G2497A)により高コピー数化したプラスミド。	Km	本研究

2.1.2 プライマー

本章では表 3-2 に記載の DNA プライマーを使用した。

表 3-2 使用プライマー

プライマー名	用途	塩基配列 (5'-3')	配列番号	
[pGEM-RD2プラスミド構築]				
pGEM-Te_F	pGEM-T Easyプラスミド増幅用	AATCACTAGTGAATTCGCGGC	1	
pGEM-Te_R		AATCGAATTCCTCGCGGC	2	
pHM1519_IF-F	<i>repA</i> 遺伝子断片増幅用	CGCGGAATTCGATTCGGAAGTTATACCGAGTTGGTTC	3	
pHM1519_IF-R		TAATCCGCAGGCCAGCAGACATAGCTTCATTGATTGTCG	4	
dnaA_3'_F	<i>dnaA</i> 遺伝子断片増幅用	CTGGCCTGCGGATTAAGTACGTCTC	5	
dnaA_3'_IF-R		AATCACTAGTGATTTTCATCGTAGGTATCGCGCTTTTCTG	6	
[pPK4変異体作製]				
G>E_F	pPK4(G>E)作製用	AAAATCGCTTGACCATTGCAGGTTG	7	
G>E_R		CTTTAGCTTTCTAGCTTGTGCGTTGAC	8	
Int-del_F	pPK4(Int-del)作製用	AAATCGCTTGACCATTGCAGGTTG	9	
Int-del_R		CTTTAGCTTTCTAGCTTGTGCGTTGAC	10	
Int-sub_F	pPK4(Int-sub)作製用	CAATCGCTTGACCATTGCAGGTTG	11	
Int-sub_R		CCTTTAGCTTTCTAGCTTGTGCGTTGAC	12	
laa-del_F	pPK4(laa-del)作製用	AATCGCTTGACCATTGCAGGTTG	13	
laa-sub.A_F	pPK4(G>A)作製用	GCAAATCGCTTGACCATTGCAGGTTG	14	
laa-sub.K_F	pPK4(G>K)作製用	AAAAATCGCTTGACCATTGCAGGTTG	15	
laa-sub.D_F	pPK4(G>D)作製用	GACAATCGCTTGACCATTGCAGGTTG	16	
laa-sub.P_F	pPK4(G>P)作製用	CCAAATCGCTTGACCATTGCAGGTTG	17	
laa-sub.Q_F	pPK4(G>Q)作製用	CAAAATCGCTTGACCATTGCAGGTTG	18	
laa_R	pPK4(laa-del), pPK4(G>A), pPK4(G>K), pPK4(G>D), pPK4(G>P), pPK4(G>Q)作製用	TTTAGCTTTCTAGCTTGTGCGTTGAC	19	
[GFP発現プラスミド]				
pPK4_F	pPK4プラスミド増幅用	CATGATTACGAATTCGAGCTCGGTAC	20	
pPK4_R		GTCATAGCTGTTTCCTGTGTGAAATTG	21	
dGFP_IF-F	Dasher GFP遺伝子増幅用	GGAACAGCTATGACTGAGCGGATAACAATTCCTCTAGA	22	
dGFP_IF-R		AATAATTTGTTTAACTTTAAGAAGGAGATATACATATGAC GGCATTGACGGAAGG		
dGFP_IF-R		GAATTCGTAATCATGTTACTGATACGTGTCCAGATCAACC	23	
[コピー数評価用qPCRプライマー]				
dnaA_1_F	<i>dnaA</i> 遺伝子断片増幅用	GGTCGATGACATCCAGTTCC	24	
dnaA_1_R		GCTTATCTGCCTGGTGCAAT	25	
dnaA_2_F		ATGGAGGTCCTGCGGAATA	26	
dnaA_2_R		CACAGGTACATCGCCAGTTG	27	
dnaA_3_F		CGTGTGTCTGCCTATTCTTCGTT	28	
dnaA_3_R		CGGTGCGGTGATTTCCA	29	
pHM1519_1_F		<i>repA</i> 遺伝子断片増幅用	CGGTGCCAGTATGTTGCTCT	30
pHM1519_1_R			GGGGTTTACGTGCTCGATTT	31
pHM1519_2_F			ACTGCGGAAGCAAAAGCAC	32
pHM1519_2_R	AGTCAAAGCGTGGCGAAAA		33	
pHM1519_3_F	AACGCTGGAAGACCCAAAC		34	
pHM1519_3_R	AACCAACCTGCAATGGTCAA		35	

2.2 培養条件

プラスミド構築のために用いた *E. coli* JM109 株の形質転換株の培養は、LB 培地を用いた。必要に応じて寒天 15 g/L、抗生物質としてクロラムフェニコール (Cm)、カナマイシン (Km) をそれぞれ 25 µg/mL、50 µg/mL の終濃度となるよう添加した。培養は 37°C で実施し、液体培養の場合 120 rpm で 12 時間振とうを行った。*C. glutamicum* の試験管培養は、CM-Dex 培地を使用した。必要に応じて寒天 20 g/L、抗生物質として Cm、Km をそれぞれ 5 µg/mL、25 µg/mL の終濃度となるよう添加した。培養は 30°C で実施した。*C. glutamicum* の形質転換はエレクトロポレーション法にて実施した。

菌株培養評価は試験管培養系で行い、必要な抗生物質を含む CM-Dex 培地 2 mL に対し、プレートに生えた菌体を白エーゼ (ループ容積 1 µL) 摺り切り 1 かき分を植菌し 30°C、120 rpm で 18 時間振とう培養を行った。

2.3 プラスミドの構築

2.3.1 pGEM-RD2 構築

精密定量のための標準品プラスミド作製にあたって、pHM1519 由来の *repA* 遺伝子断片とゲノム DNA 由来の *dnaA* 遺伝子断片の 2 遺伝子断片を pGEM-T Easy プラスミド (プロメガ) に組み入れた pGEM-RD2 を設計しコンストラクトを構築した。pGEM-T Easy プラスミドを鋳型としプライマー 1 と 2 を使用し、PrimeSTAR GXL DNA Polymerase を用いた PCR によりベクター増幅断片を得た。pPK4 または *C. glutamicum* 2256 株のゲノム DNA を鋳型としプライマー 3 と 4、プライマー 5 と 6 を使用し、KOD FX NEO を用いた PCR により *repA* 遺伝子断片および *dnaA* 遺伝子断片を取得した。得られた 3 種の増幅断片を混合し、In-Fusion HD Cloning Kit にて、3 つの DNA 断片を連結した。次に、この反応溶液を用いて、*E. coli* JM109 株コンピテントセルを形質転換し、アンピシリン (Amp) を終濃度 100 µg/mL で含む LB 寒天培地上に塗布して 37°C で一晩培養した。その後、LB 寒天培地上に出現したコロニーを選抜し、Amp を終濃度 100 µg/mL で含む LB 液体

培地に植菌し振とう培養を実施した。こうして得られた形質転換株の培養菌体から QIAprep Spin Miniprep Kit によりプラスミド DNA を抽出し、DNA 配列の解析により目的とするプラスミドを確認し、これを pGEM-RD2 とした。

2.3.2 pPK4 変異体作製

各変異または欠失プラスミド pPK4(G>E)、pPK4(1nt-del)、pPK4(1nt-sub)、pPK4(1aa-del)、pPK4(G>A)、pPK4(G>K)、pPK4(G>D)、pPK4(G>P)、pPK4(G>Q)は KOD -Plus- Mutagenesis Kit (東洋紡) を用いて次のように作製した。pPK4 プラスミドを鋳型に、表 2-2 に示す組み合わせのプライマーを用いて PCR を行った。キット付属の T4 Polynucleotide Kinase および Ligation high によるセルフライゲーション反応を実施した。その反応液で *E. coli* JM109 株コンピテントセルを形質転換し、Km を終濃度 50 µg/mL で含む LB 寒天培地上に塗布して 37°C で一晩培養した。その後、LB 寒天培地上に出現したコロニーを選抜し、Km を終濃度 50 µg/mL で含む LB 液体培地に植菌し振とう培養を実施した。こうして得られた形質転換体の培養菌体から QIAprep Spin Miniprep Kit を用いてプラスミド DNA を抽出し、DNA 配列の解析により目的とするプラスミドを確認した。

2.3.3 dGFP 発現プラスミド

オベリアクラゲ由来緑色蛍光タンパク質 Dasher GFP (dGFP) の発現プラスミド pPK4-dGFP は次の通り構築した。pPK4 を鋳型としてプライマー 20 と 21 を、T5-Dasher GFP を鋳型としてプライマー 22 と 23 を使用し、KOD FX NEO を用いた PCR により、pPK4 ベクター断片と dGFP 遺伝子断片を取得した。得られた増幅断片を、In-Fusion HD Cloning Kit を用いて連結した。次に、この反応溶液を用いて、*E. coli* JM109 株コンピテントセル (タカラバイオ) を形質転換し、Km 50 µg/ml を終濃度として含む LB 寒天培地上に塗布して 37°C で一晩培養した。その後、LB 寒天培地上に出現したコロニーを選抜し、Km を終濃度 50 µg/mL で含む LB 液体培地に植菌し振とう培

養を実施した。こうして得られた形質転換体の培養菌体から QIAprep Spin Miniprep Kit を使用し、プラスミド DNA を抽出し、連結部分の DNA 配列解析により目的とするプラスミドの構築を確認し、これを pPK4-dGFP と命名した。高コピー数プラスミドの pPK4H1-dGFP は、KOD -Plus- Mutagenesis Kit を用いて作製した。2.3.2 に記載した方法により、pPK4-dGFP を鋳型にプライマー 7 と 8 を使用した PCR により G2497A 変異導入を実施した。

2.4 DNA 塩基配列の決定法

BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (アプライドバイオシステム) を用いてシーケンス反応を行い、BigDye XTerminator Purification Kit (アプライドバイオシステム) を用いて反応液の精製を行った。その後、Genetic Analyzer 3500xL (アプライドバイオシステム) にて精製サンプルの塩基配列解析を行った。

2.5 タンパク質の構造予測

RepA タンパク質のアミノ酸配列からその二次構造を予測するツールとして、PSIPRED⁷¹ を使用した。RepA タンパク質のアミノ酸配列からヘリックス-ターン-ヘリックス (HTH) モチーフを予測するツールとして、GYM 2.0 software⁷² を使用した。

2.6 コリネ型細菌からのプラスミド抽出法

CM-Dex 培地を用いた試験管培養系で 18 時間 30°C で振とう培養した後、培養液 500 μ L を遠心分離 (14,400 \times g, 2 min) し、集菌した。菌体に対して、QIAprep Spin Miniprep Kit を用いて次のようにプラスミド抽出を実施した。コリネ型細菌はグラム陽性菌で、強固な細胞壁に覆われているため、その細胞壁を分解するため、15 mg-Lysozyme (L6876、シグマアルドリッチ) /mL-Buffer P1 を調製した。その溶液 250 μ L で菌体を懸濁し、37°C で 30 分間 Lysozyme 酵素反応による細胞壁分解を行った。以降、Buffer P2 を添加するところからは通常のプラスミド抽出と同じ操作で実

施し、カラムからの DNA 溶出工程では、30 μ L の Buffer EB (10 mM Tris \cdot Cl、pH 8.5) で溶出を行った。

2.7 プラスミドのコピー数定量方法 (qPCR)

染色体に関しては DNA 複製に関与し染色体上に 1 コピー存在するとされる *dnaA* 遺伝子を、pVC7 由来プラスミドに関しては *repA* 遺伝子を選択し、DNA 増幅用のプライマーを設計した。18 時間培養した菌体から抽出した total DNA 溶液約 5 ng を鋳型として、3 セット (24 と 25、26 と 27、28 と 29) の *dnaA* 遺伝子増幅用プライマーと 3 セット (30 と 31、32 と 33、34 と 35) の *repA* 遺伝子増幅用プライマーを用い、SYBR Premix Ex Taq (Tli RNaseH Plus) を使用し LightCycler 96 にて qPCR を実施した。また、検量線作成のため pGEM-RD2 プラスミド溶液の 10 倍希釈系列を作製し、*dnaA* 遺伝子と *repA* 遺伝子のコピー数定量用の DNA 量として 1×10^{-14} g から 1×10^{-10} g までの検量線作成用サンプルを調製し、qPCR を行った。pGEM-RD2 の結果を対照区として用いることで、*dnaA* 遺伝子と *repA* 遺伝子の増幅の差を補正し、各々の C_q 値の比を算出することでコピー数を決定した。

2.8 コリネ型細菌破碎抽出液の SDS-PAGE 解析

試験管培養後の培養液 500 μ l を回収し、遠心分離 (14,400 x g、2 min、4 $^{\circ}$ C) により集菌した。氷冷した 20 mM Tris-HCl (pH 8.0) で一回洗浄し、800 μ l の 20 mM Tris-HCl (pH 8.0) で懸濁し、0.1 mm ガラスビーズによるマルチビーズショッカー (安井器械、2,500 rpm、(ON : OFF = 30 s : 30 s) \times 10 サイクル、4 $^{\circ}$ C) で破碎処理を実施した。その破碎液を遠心分離 (5,000 x g、5 min、4 $^{\circ}$ C) し、上清画分を粗抽出液とした。粗抽出液 4 μ l に対して 2.5 μ l 滅菌水、2.5 μ l LDS Sample Buffer (インビトロジェン) と 1 μ l Sample Reducing Agent (インビトロジェン) を加え 70 $^{\circ}$ C、10 分間加熱処理し、MES SDS 泳動バッファーで泳動を実施した。SDS-PAGE のゲルは NuPAGE 4-12% Bis-Tris Protein Gel (インビトロジェン) を使用し、また粗抽出液の総タンパク質濃度は、Pierce BCA

Protein Assay Kit (サーモフィッシャーサイエンティフィック) により決定し、本キット付属の BSA を標準物質として使用した。

2.9 ウェスタンブロットニング

2.8 で実施した SDS-PAGE ゲルを、iBlot 2 Dry Blotting System (サーモフィッシャーサイエンティフィック) を使用し、転写条件 (20 V で 1 分、23 V で 4 分、25 V で 2 分) で iBlot 2 PVDF メンブレン (サーモフィッシャーサイエンティフィック) に転写した。転写後メンブレンを、Pierce Fast Western Blot Kit, ECL Substrate (サーモフィッシャーサイエンティフィック) を使用し、免疫染色を実施した。一次抗体反応として 10 $\mu\text{g/ml}$ の anti-CATase antibody (ウサギ由来、シグマアルドリッチ) で室温 30 分間反応させ、二次抗体反応としてホースラディッシュ・ペルオキシダーゼ (HRP) 標識二次抗体を含む、Pierce Fast Western Blot Kit, ECL Substrate 付属の Fast Western Optimized HRP Reagent で室温 10 分間反応させた。免疫染色のシグナル検出には ChemiDoc XRS imaging system (バイオラッド) を使用した。標準物質として、CATase (16 mg/mL、シグマアルドリッチ) を使用した。

2.10 GFP 蛍光強度測定法

2.8 で調製した粗抽出液を、透過型 LED 光源 CyanoView (アトー、励起波長 505 ± 25 nm) で照射し、オレンジカバー (アトー、製品番号 2006122) で遮光した蛍光画像を撮影した。また、同じく 3.7 で調製した粗抽出液 50 μl を、蛍光測定用白色 96 穴プレート (Nunc、FluoroNunc Maxisorp plate) にロードし、マイクロプレートリーダー SpectraMax Me2 (モレキュラーデバイス) を使用し、蛍光測定を行った。20 mM Tris-HCl (pH 8.0) をブランクとして使用した。プレートリーダー測定条件は、励起波長 485 nm、検出波長 538 nm (カットオフ 530 nm) とした。

2.11 プラスミドの安定性評価

2256L/pPK4 株または 2256L/pPK4H1 株を、CM-Dex 培地（抗生物質無添加）に植菌し、試験管培養を行い、半日おきに継代を行い、4 日間培養（計 8 回の植え継ぎ）を実施した。植え継ぎは、200 分の 1 量の前培養液 10 μ L を、CM-dex 培地 2 mL に植菌した。培養後の培養液を CM-dex 培地に播種し、生えてきたコロニーを 100 個選別し、CM-dex 培地プレートおよび Km を終濃度 25 μ g/mL で含む CM-dex 培地プレートに移し、各コロニーの抗生物質耐性能の保持を確認した。さらに、培養 4 日（96 時間）後の各々の培養液 500 μ L からプラスミド抽出を行い、制限酵素 KpnI 処理で線状化したサンプルを用いて 0.8%アガロースゲル電気泳動を行った。

第3節 結果と考察

3.1 高コピー数変異体 pPC4H1 の取得

高コピー数化したプラスミドを保持する菌は、薬剤耐性遺伝子の発現量が増加するため、通常より高濃度の薬剤存在下においても生育が可能になる。そこで、薬剤耐性遺伝子を有するプラスミドを保持する菌を当該薬剤の高濃度添加プレートに播種しコロニー形成する株を選抜すれば、自然変異が導入され高コピー数化したプラスミド変異体を取得出来ると考えた。

C. glutamicum 2256 株は、Km と Cm の両方の薬剤に対して感受性を有しているものの、Km 感受性よりも Cm 感受性が高いとされているため、スクリーニング用薬剤として Cm を選択した。pHM1519 系シャトルベクターとして pPC4 (Cm 耐性) を本研究にて構築し使用した。

2256L 株に pPC4 プラスミド 1 µg を電穿孔法により導入した後、Cm の添加濃度 5 µg/ml (Cm-5 と表記。以下同様)、20 µg/ml (Cm-20)、50 µg/ml (Cm-50) の CM-dex 培地寒天プレートに播種し、得られた形質転換体が有するプラスミドのコピーを評価した。その結果、Cm-50 プレートにはコロニーが全く出現しない一方で、Cm-5 プレートには多数のコロニーが形成され、Cm-20 プレートにはサイズの異なる 20 個程度のコロニーが形成された。Cm-5 プレートから 2 個、Cm-20 プレートからサイズの異なるコロニー 8 個を選択し、それらを培養後にプラスミド抽出し、アガロースゲル泳動を行った (図 3-1)。試験管培養後の菌体濃度は同等であり、コロニーサイズ間での到達菌体量の違いは見られなかったものの、Cm-20 培地で大きなコロニーを形成していたものの一つ (大コロニー#1) から、他に比べて明らかに高コピー数となっているものを取得できた。そこで、改めて、そのプラスミドを 2256L 株へ導入し、そのプラスミドを調べたところ、やはり、高コピー化していることが判明した。したがって、その高コピー数化は、プラスミド上の変異によるものであることがわかった。取得したプラスミドを pPC4H1 と名付けた。

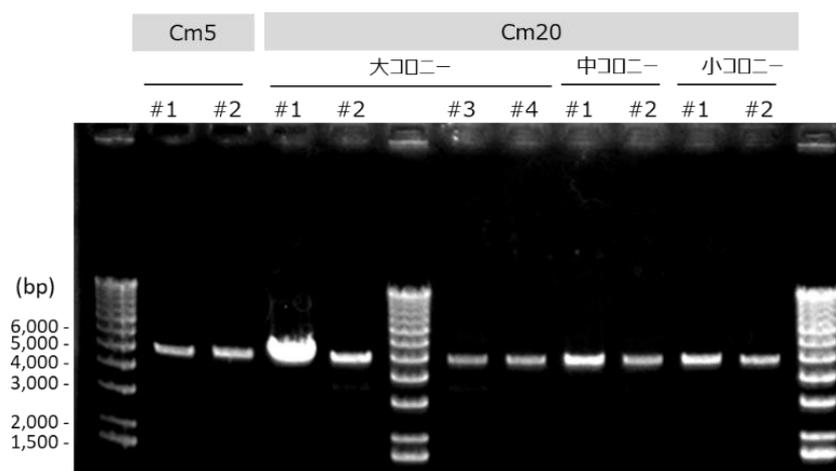


図 3-1 高コピー数化プラスミドのスクリーニング

Cm-5 培地から 2 個のコロニーを、Cm-20 培地からは 8 個のコロニーをピックアップし、試験管培養後の菌体から抽出したプラスミドを制限酵素 KpnI にて 1 カ所切断し、線状化したプラスミドを電気泳動した。

3.2 高コピー数を引き起こす変異の解析

pPC4H1 全長の塩基配列を解析したところ、その変異位置は pHM1519 由来の DNA 領域に位置しており、複製開始タンパク質 RepA をコードする *repA* 遺伝子の内部に 1 塩基変異があることが明らかになった。プラスミドマップ上で、*repA* 遺伝子上流に位置する PstI 認識配列 (5'-CTGCAG-3') の 5' 端 C を +1 としたときに、+2497 の位置にあるグアニン (G) がアデニン (A) に置換している 1 塩基変異であり *copB1* 変異と命名した (図 3-2) 。pPC4 は pHSG399 (Cm 耐性遺伝子を含む) と pHM1519 断片を連結したシャトルベクターであり、pPK4 は pHSG299 (Km 耐性遺伝子を含む) と pHM1519 断片を連結したシャトルベクターである。pPK4 にて、*repA* 遺伝子の同箇所 (PstI 認識配列の 5' 端 C を +1 としたときの +2497) で、同様に G を A とするよう 1 塩基置換を行った pPK4H1 を構築したところ、pPK4H1 も 2256L 株にて pPC4H1 と同様に高コピー数化することが明らかになった (図 3-3) 。

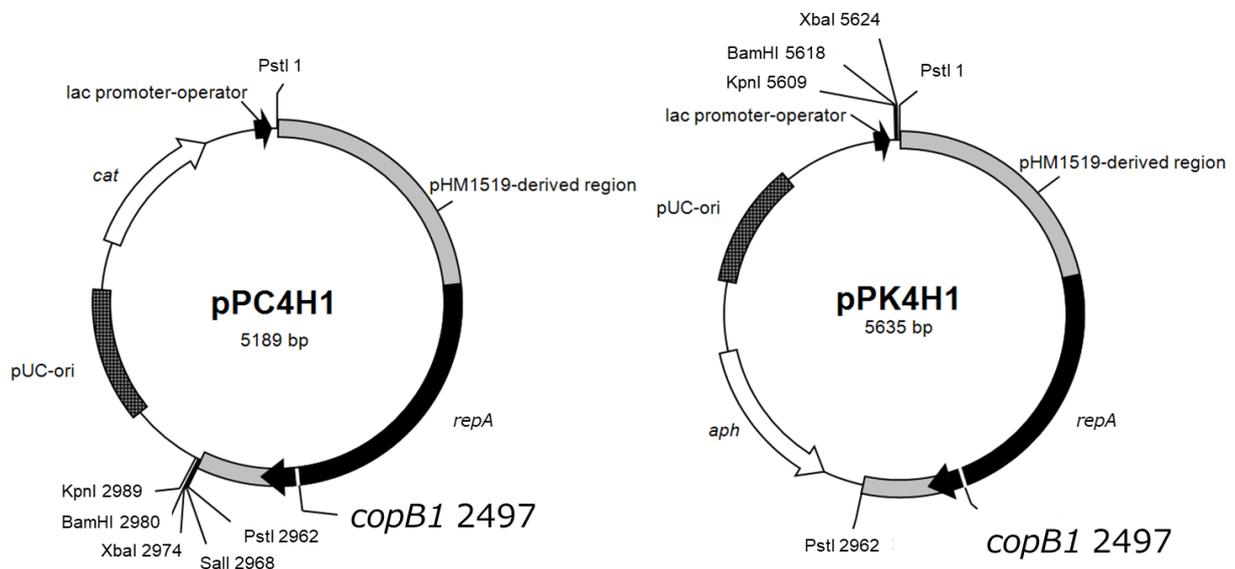


図 3-2 pPC4H1 及び pPK4H1 の高コピー数化変異箇所

copB1 変異は、*repA* 遺伝子内に位置する。+1 は、*repA* 遺伝子上流側にある PstI の切断認識配列 (5'-CTGCAG-3') における 5' 末端の C とした。

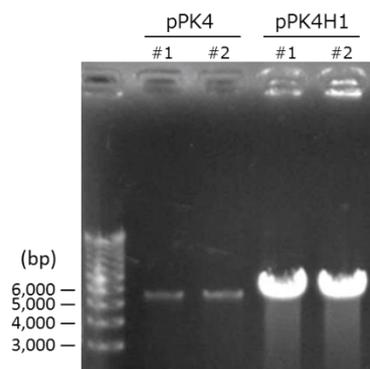


図 3-3 pPK4H1 の高コピー数化確認

2256L/pPK4、2256L/pPK4H1 の形質転換体を 2 個ずつ取得し、試験管培養した後の菌体からプラスミド抽出し、制限酵素 KpnI による 1 カ所切断によって線状化したプラスミドサンプルを泳動した。

3.3 pPK4 の各種変異体のコピー数比較

copB1 変異は、pHM1519 の *repA* 遺伝子内の 1 塩基変異 (G→A) であり、RepA タンパク質の 429 番目のアミノ酸残基グリシン (Gly) をグルタミン酸 (Glu) に置換する。したがって、*copB1* 変異は、アミノ酸レベルで RepA タンパク質の活性を変えることによって、高コピー数化を引き起こすことが推察された。そこで、*copB1* 変異部位における各種アミノ酸置換体を作製し評価することにした。pPK4 に対して、2497 番目の塩基付近 (+2496 ~ +2498) に部位特異的変異を導入し、それら変異のプラスミドのコピー数へ及ぼす影響を評価した。コンストラクト設計として、1 塩基欠損 (フレームシフトにより終始コドンが出現)、1 塩基置換 (サイレント変異)、1 アミノ酸欠損 (Gly-429 の欠損)、1 アミノ酸置換 (Ala (疎水性)、Lys (極性・塩基性)、Asp (極性・酸性)、Pro (構造的剛性)、Gln (極性・非電荷)) を pPK4 プラスミドへ導入し、各変異体プラスミドを構築した (図 3-4)。

それらを *C. glutamicum* 2256L 株に導入を試みたところ、1 塩基欠損 pPK4 (1nt-del) および 1 アミノ酸欠損 pPK4 (1aa-del) に関しては、形質転換体を取得出来なかった。それ以外の変異プラスミドの場合では形質転換体を取得でき、その形質転換体の培養菌体からプラスミド抽出した後に、アガロースゲル電気泳動分析を行った。サイレント変異である pPK4 (1nt-sub) では、そのコピー数は pPK4 と同程度であった。このことから、*copB1* 変異は DNA レベルではなくアミノ酸レベルで RepA タンパク質の活性に影響を与えていることを示唆している。Gly 以外のアミノ酸残基に置換した 5 種の変異体の場合、それら全てにおいて、コピー数は増加することが分かった (図 3-5)。コピー数増加の程度としては、Ala や Pro の非極性アミノ酸への置換でもコピー数は増加したが、Glu, Lys, Asp や Gln の極性アミノ酸に置換した方がコピー数の増加度合いは高かった。pPK4 は染色体あたり約 50 コピーであるのに対し pPK4H1 は約 800 コピーと約 16 倍に高コピー数化していた。Gly-429 部分が直接 DNA と結合すると仮定した場合、Gly-429 を Glu や Asp といった酸性アミノ酸に置換すると DNA との結合親和性が弱まり、Lys といった塩基性アミノ酸に置換すると DNA との結合親和性が強まることが予想されるが、実際にはどちらも高コピー数になり

大きな差はみられないことから、Gly-429 部分は直接的には DNA と結合していないことが示唆された。

pHM1519 由来 RepA タンパク質の立体構造予測に関しては、その類似タンパク質においても立体構造が明らかにされていないため、その三次構造の予測は困難である。しかし、タンパク質二次構造予測ソフト PSIPRED により、RepA タンパク質の変異箇所は長い α -ヘリックス形成の領域内か、二つの α -ヘリックスを連結する部位に位置するものと予測された (図 3-6)。RepA タンパク質の変異箇所が二つの α -ヘリックスの連結部に位置すると仮定すると、2つの α -ヘリックスが短いペプチド鎖でつながった構造を持ち DNA に結合する性質を持つ Helix-turn-helix (HTH) モチーフであると予想できた。そこで、HTH モチーフ検索プログラム GYM 2.0 software により、RepA の C 末端領域に 2カ所に HTH モチーフがあることが予測された (図 3-4)。HTH モチーフは、10 残基程度の二つの α -ヘリックスが 3 残基からなるターン構造を介してつながった共通の立体構造を有する⁷³。興味深いことに、そのうちの一つ (HTH-1) は、Gly-429 を中心とした HTH モチーフであるので、この G-429 残基は、二つのヘリックス構造をつなぐループアウト部分にある。

今回、G-429 残基を様々なアミノ酸残基に置換しても、全て RepA としての機能を維持し、かつ高コピー数となったことから、この G-429 残基は、RepA の立体構造を大きく変えない領域に位置すると考えられる。そして、G-429 残基を別のアミノ酸に置換した場合、二つのヘリックス部分の相対的な配置具合の変化が、RepA の DNA への結合親和性を変化させていると予想される。

3.4 高コピー数化プラスミドの安定性評価

本研究において取得した高コピー数化プラスミド pPK4H1 が *C. glutamicum* 菌体内で安定的に保持されるかどうかの評価を行った。2256L/pPK4、2256L/pPK4H1 の 2 株を CM-dex 培地(Km 無添加)に植菌し、試験管培養を行い、12 時間毎に継代を行い、トータルで 96 時間培養を行った。各サンプリング時間の培養液から取得されたコロニー 100 個の Km 耐性能の有無を基準としたプラスミド保持確認を行った。継代培養 96 時間時点でプラスミドを保持しているコロニー数は 2256L/pPK4 株は 99 個、2256L/pPK4H1 株は 100 個であり、ほぼプラスミド脱落は確認されなかった。したがって、pPK4H1 は抗生物質無添加条件においても高いプラスミド安定性を示すことが分かった (表 3-3、図 3-7)。

表 3-3 各培養時間でのプラスミド保持コロニー数 (100 コロニーあたり)

	24 h	48 h	72 h	96 h
pPK4	100	99	99	99
pPK4H1	100	100	100	100

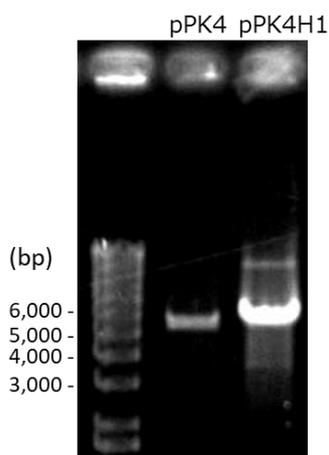


図 3-7 Km 無添加条件での継代培養後のプラスミド泳動確認

プラスミド DNA を制限酵素 KpnI で処理し、一カ所切断にて線状化したプラスミドを泳動した。また、プラスミド DNA は継代培養 96 時間目の培養液から抽出した。

3.5 クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ (CATase) の生産量の増加

pHM1519 系シャトルベクターの高コピー数化変異体 pPC4H1 や pPK4H1 は様々な用途において、使用されることが期待される。pPC4 は、そのベクター上に Cm 耐性遺伝子である *cat* 遺伝子を有しているため、まずは、その遺伝子産物である CATase の生産量について調べた。pPC4 と pPC4H1 のそれぞれの保持菌 *C. glutamicum* 2256L を、Cm 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ を終濃度として含む CM-Dex 培地で試験管培養後に、菌体粗抽出液中にある CATase 生産量を SDS-PAGE およびウエスタンブロットングにより調べた。2256L 株、2256L/pPC4 株、2256L/pPC4H1 株を試験管培養し、培養 18 時間後の菌体を回収、ビーズ破碎し、可溶性画分を SDS-PAGE 解析に供した。その結果、pPC4H1 形質転換株において CATase と思われるタンパク質発現量の明らかな増加が確認できた (図 3-8)。

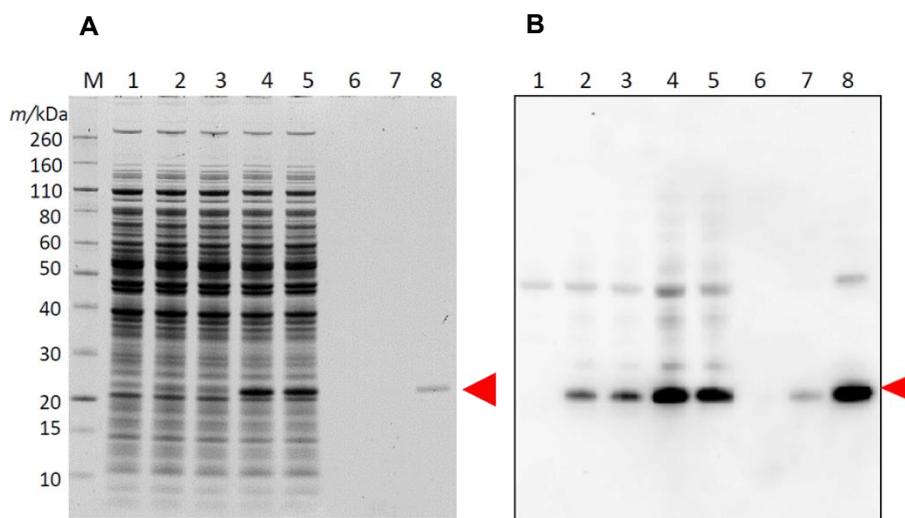


図 3-8 *cat* 遺伝子産物の生産量比較

(A) SDS-PAGE。レーン M はタンパク質マーカー、1 は 2256L (コントロール)、2 および 3 は 2256L/pPC4、4 および 5 は 2256L/pPC4H1 を、そして、6、7 および 8 は試薬である CATase の 1,000 倍希釈液、100 倍希釈液、10 倍希釈液の泳動を示す。粗抽出液および標準物質希釈液ともに 4 μl ずつ使用した。赤矢印は CATase タンパク質のバンドを示す。CATase の推定分子量は 25.6 kDa、等電点は pI 5.91 と計算される。(B) 抗 CATase 抗体による免疫染色

3.6 dGFP 生産量の増加

遺伝子発現のレポーター遺伝子として多岐にわたり使用される dGFP の発現量が高コピー数化した pPK4H1 を用いることで、向上するかどうかを調べた。pPK4 及び pPK4H1 のマルチクロニングサイト領域近辺に「SD 配列-dGFP コード DNA」断片を挿入した。強力なプロモーターを用いた場合、多量の dGFP 生産が見込まれ、使用プラスミドのコピー数の差が反映されにくいと考えた。そこで、本系では *dGFP* 発現用の特別なプロモーターは使用せず、上流域からのリーク転写によって発現する dGFP を検出することにした。各プラスミドを保持する菌体からの細胞抽出液の SDS-PAGE 解析では、dGFP タンパク質の理論分子量は 26.6 kDa であるが、dGFP の確かなバンドは確認出来なかった（図 3-9A）。一方、細胞抽出液に対して励起光を照射した場合、緑色蛍光を検出することが出来た。蛍光プレートリーダーでの測定値として pPK4H1-dGFP は pPK4-dGFP の 8 倍程度の蛍光強度を示すことが分かった（図 3-9B、C）。

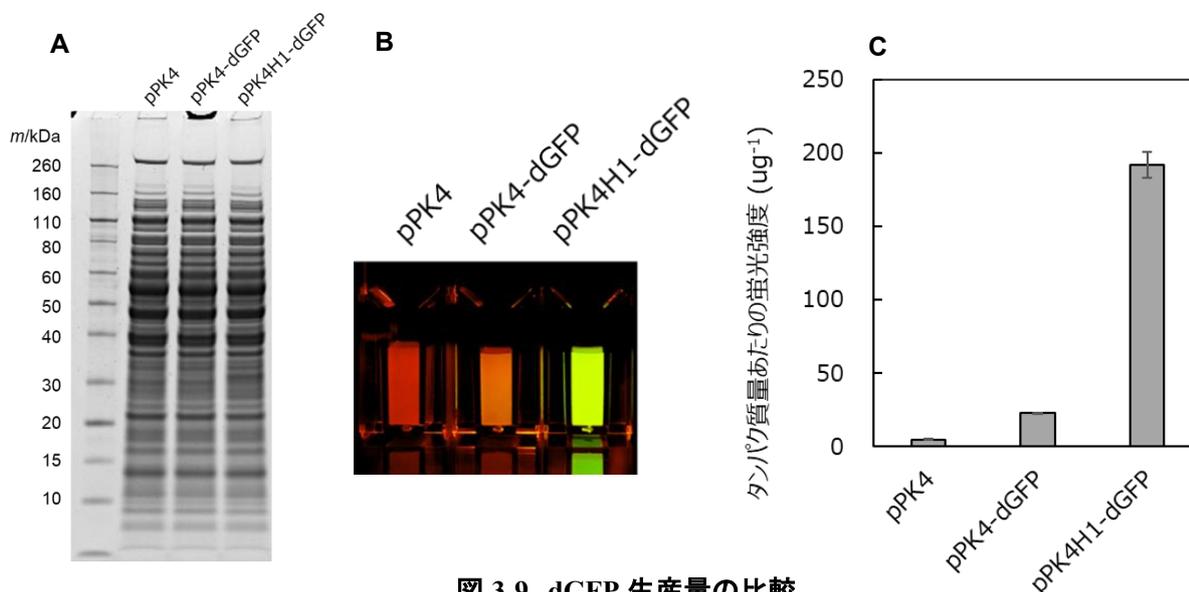


図 3-9 dGFP 生産量の比較

(A) SDS-PAGE (B) 細胞抽出液の蛍光検出画像 (C) 細胞抽出液の蛍光強度測定。菌体破碎後の細胞抽出液を蛍光プレートリーダーで測定した。励起波長 485 nm、検出波長 538 nm (カットオフ 530 nm) で測定した。n=3 で、各値は平均±SD で示した。

第4節 結言

高濃度薬剤添加プレートにおいてもコロニー形成が可能な株を取得するという手法を採用し、pPC4のコピー数増加を引き起こす新規な変異 *copB1* を見出した。そして、その変異位置は *repA*-ORF 内部に位置し、RepA の C 末端領域で 1 アミノ酸残基置換（G から E）を引き起こしていることを明らかにした。既往研究として、pHM1519 と同系統の pCG1 シヤトルベクターにおいて、アンチセンス sRNA の転写強度を弱めることで取得した高コピー数化変異体は 20-30 コピーであり⁵⁸、pPK4H1 は約 800 コピーと、本研究で得られた pPK4H1 の方がコピー数は大きい。この pPK4H1 のコピー数は、前章で見出した pAM330 系の高コピー数化プラスミド pVC7H2 のコピー数よりも高かった。pPK4H1 のコピー数増加の要因としては、第 2 章で明らかにしたプラスミドのコピー数を負に制御する sRNA の転写を抑制する機構とは異なり、RepA タンパク質の 1 アミノ酸残基置換によるものであった。RepA タンパク質は構造が不安定で分解されやすいタンパク質であるとされ、立体構造情報はほとんど無いものの、HTH-motif 予測プログラムによると、高コピー数化を引き起こす 1 アミノ酸置換は、ヘリックス間に挟まれたループアウト領域に位置していた。一般的に HTH-motif は DNA に結合する機能を有するとされ、*copB1* 変異はループ領域にアミノ酸残基置換を引き起こし、二つのヘリックス部分の相対的な配置具合の変化が、RepA の DNA への結合親和性に影響を与えていることが予想された。高コピー数化した pPK4H1 のプラスミド安定性を調べたところ、抗生物質（Km）非添加条件下での継代培養 96 時間目でも、プラスミド保持率は 100%と高く、pPK4H1 プラスミドは安定保持されることが分かった。

高コピー数化プラスミドの有用性として、pPC4H1 や pPK4H1 を使用することで、目的タンパク質の生産量増加を達成することが出来た。これらの高コピー数化プラスミドは、コリネ型細菌を宿主とし、タンパク質や RNA などの物質生産をする上で有用なプラスミドの一つとなりうる。

第 4 章

組換え RNA の過剰発現系構築

第1節 緒言

近年、RNA は医薬品や害虫駆除剤としての有効性が実証されつつあり、特に核酸医薬では、アンチセンスオリゴや siRNA などの核酸医薬の原薬としての期待が高まっている。現在の核酸医薬品は、鎖長が短い核酸分子が主流であり化学合成法によって製造されている。しかし、次世代の核酸医薬として研究開発が進んでいる mRNA 医薬の場合、長鎖の RNA を効率的かつ正確に合成する必要があり、酵素法や微生物製法の合成が期待されている。また、RNA は RNA 殺虫剤⁷⁴ という新しい農業資材としても注目を集めており、標的害虫に対して二本鎖 RNA (dsRNA) を摂食させることで、RNA 干渉を介し生育必須遺伝子の発現抑制し、害虫の生育を阻害することが可能である。RNA 殺虫剤を実用化につなげるためには、低コストで大規模に目的の標的 RNA 分子を生産することが必要不可欠である。微生物を使用した組換え RNA 生産では、大腸菌 *E. coli* で T7 RNA ポリメラーゼと T7 プロモーターを組み合わせた系が報告されている⁷⁵。しかしながら、微生物による組換え RNA 製法の場合、菌体内で安定的に存在可能な RNA の種類に限定され、その RNA 生産量も少ないことが課題であった。

本研究では、コリネ型細菌 *C. glutamicum* 株を基本宿主とし、微生物による組換え RNA の高生産系の構築を目指した。*C. glutamicum* 株はアミノ酸生産菌として工業的に使用されており、大規模生産や多くの発酵工程において堅牢性を発揮することから⁷⁶、RNA 大量生産系にも適していると考えられる。*C. glutamicum* 株を宿主とした目的 RNA 大量発現のための基本戦略として、1) RNase 欠損株を宿主とすることによる目的 RNA の分解抑制、2) コリネ型細菌ファージ由来プロモーターを活用した高活性型 RNA 転写ユニットの整備、3) 従来のプラスミドのコピー数を大きく上回る高コピー数プラスミドの利用、の3点の要素技術を組み合わせることにした。RNA 生産系構築のための必要な条件は、効率的な転写のための強力なプロモーターの使用である。そこで、コリネ型細菌に感染する Corynephage BFK20 由来のプロモーターに着目した。Corynephage BFK20 のゲノム配列は完全に決定されており⁷⁷、プロモーター活性を持つ DNA フラグメントは F1 プロモーターと名付けられているが⁷⁸、詳細な解析はなされていなかった。ま

た、目的 RNA 転写系をプラスミドで保持する場合、高コピー数の安定なプラスミドを使用するのが望ましい。第 2 章の結果から、高コピー数プラスミドとして、染色体あたり約 100 コピーである pVC7H1、約 300 コピーである pVC7H2 を使用することにし、目的 RNA 転写ユニット数を増加させることにした。RNA 代謝は、生合成と分解のバランスによって決定する。様々な RNase が RNA の分解に関与しており、RNase III は dsRNA に特異的なエンド型 RNase に分類されるが、RNase III 活性を抑制することは、dsRNA および複雑な二次構造を形成する RNA 分子の生成において重要であると考えた。

本 RNA 生産系で発現するモデル RNA として、特定タンパク質との結合活性を有する組換え RNA を生産することにした。スプライシング機構に関与する U1 リボ核タンパク質の構成因子 U1 snRNA は、U1A タンパク質と特異的に結合する機能性 RNA であり、その構造中のステムループ II (SL-II) 領域を介して U1A タンパク質と結合することが知られている^{79, 80} (図 4-1)。その SL-II 領域を有するよう設計した RNA (U1A*-RNA と命名) をモデル RNA として、その生産を検討することにした。*C. glutamicum* で生産した組換え RNA 分子は、本来有するはずの機能を発揮しないことも考えられる。そこで、生産した U1A*-RNA の特異的タンパク質結合活性を評価すべく、U1A タンパク質の RNA 結合領域を含むタンパク質 (U1A-RBD タンパク質と命名) をコリネ型細菌分泌発現系で生産し、U1A*-RNA と U1A-RBD タンパク質との相互作用分析を実施した。さらに、コリネファージ由来の強力なプロモーターおよび高コピー数プラスミドを活用した独自の RNA 生産系にて、目的 RNA の大量発現系が実現出来ているか確認するためにジャーファーマンター培養評価を実施した。

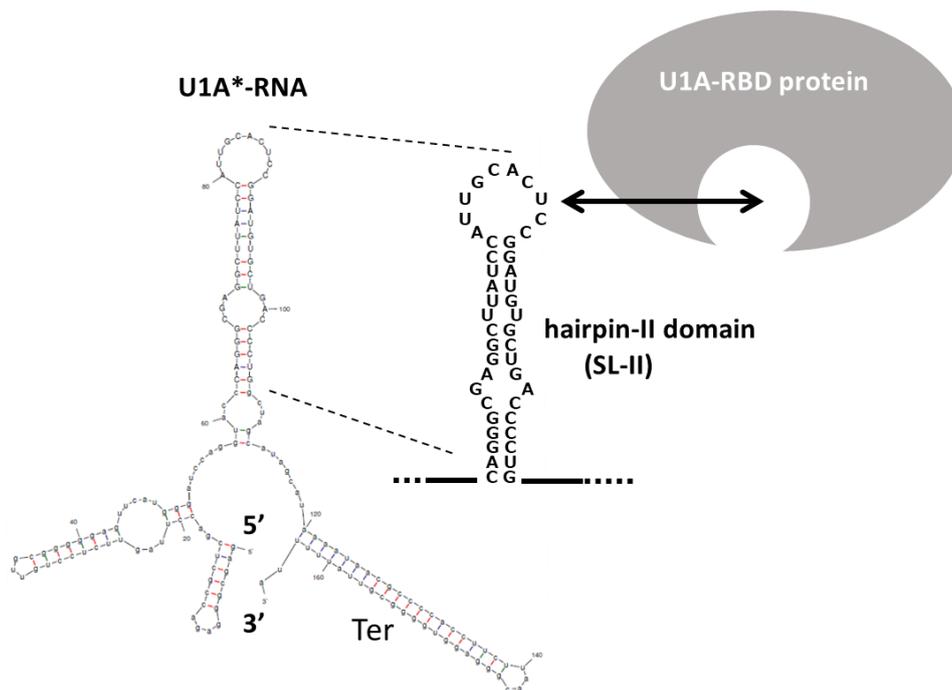


図 4-1 U1A*-RNA の構造と U1A-RBD タンパク質との相互作用

U1A*-RNA の予測される二次構造 (左)、Ter は BFK20 由来ターミネーター配列を示す。U1A*-RNA と U1A-RBD タンパク質との特異的相互作用を示した模式図。U1A*-RNA はステムループ II (SL-II) 領域を介して U1A タンパク質の RNA 結合ドメイン (RBD) と結合する。

第2節 方法

2.1 使用菌株、プラスミド、プライマー

2.1.1 菌株およびプラスミド

本章で使用した菌株およびプラスミドは表 4-1 に示す通りである。

表 4-1 使用菌株およびプラスミド

菌株とプラスミド	説明	薬剤耐性	引用・入手先
Strains			
<i>C. glutamicum</i> 2256L	2256株からpAM330を脱落させた株	—	第2章
<i>C. glutamicum</i> 2256LΔ <i>rnc</i>	2256L株の <i>rnc</i> 遺伝子欠損株	—	本研究
YDK010	2256株に対してN-メチル-N'-ニトロ-N-ニトロソグアニジンで自然変異導入した株。 <i>cspB</i> 遺伝子を欠損しており、育種過程でpAM330プラスミドは脱落している。	—	84
YPS010	YDK010株のPhoSタンパク質の302番目を1アミノ酸置換(TrpからCys)した株	—	85
<i>E. coli</i> JM109	<i>endA1</i> , <i>recA1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>thi-1</i> , <i>hsdR17</i> (<i>rk-</i> , <i>mk+</i>), <i>relA1</i> , <i>supE44</i> , λ-, Δ(<i>lac-proAB</i>), F' [<i>traD36</i> , <i>proAB+</i> , <i>lacI^q</i> , <i>lacZΔM15</i>]	—	タカラバイオ
Plasmids			
pBS4S	スクロース資化性を付与する <i>sacB</i> 遺伝子を有し、 <i>C. glutamicum</i> において複製能を持たないプラスミド	—	46
pBS4S-Δ <i>rnc</i>	<i>rnc</i> 遺伝子欠損用に作製したプラスミド	—	本研究
pPK4	pHSG299とpHM1519断片を融合したシヤトルベクター	Km	61
pPK4H1	pPK4の1塩基変異(G2497A)により高コピー数化したプラスミドで、Repタンパク質429番目のGlyがGluに置換	Km	第3章
pTAKN-2	TAクローニング用ベクター	Km	バイオダイナミクス研究所
pTAKN-2- <i>chlI</i>	pTAKN-2のPCR産物挿入部分473塩基目にクロロフィル生合成酵素サブユニットChlIの部分領域をコードする150塩基を全合成し挿入したプラスミド。	Km	本研究
pPK4-PcspB- <i>chlI</i> -PcspBrev	対合する <i>cspB</i> プロモーター間に <i>chlI</i> 配列を配置したプラスミド	Km	本研究
pPK4-Pf1- <i>chlI</i> -Pf1rev	対合するF1プロモーター間に <i>chlI</i> 配列を配置したプラスミド	Km	本研究
pPK4-Pf2- <i>chlI</i> -Pf2rev	対合するF2プロモーター間に <i>chlI</i> 配列を配置したプラスミド	Km	本研究
pPK4-Pf3- <i>chlI</i> -Pf3rev	対合するF3プロモーター間に <i>chlI</i> 配列を配置したプラスミド	Km	本研究
pPK4-Pf1-U1A*	F1プロモーター-U1A結合配列転写系挿入プラスミド	Km	本研究
pPK4-PcspB-U1A*	<i>cspB</i> プロモーター-U1A結合配列転写系を挿入したプラスミド	Km	本研究
pPK4-PgapA-U1A*	<i>gapA</i> プロモーター-U1A結合配列転写系を挿入したプラスミド	Km	本研究
pPK4-PncRNA744-U1A*	ncRNA744由来プロモーター-U1A結合配列転写系を挿入したプラスミド	Km	本研究
pPK4-Prg0322-U1A*	RgRNA0322由来プロモーター-U1A結合配列転写系を挿入したプラスミド	Km	本研究
pPK4-PncRNA1799-U1A*	ncRNA1799由来プロモーター-U1A結合配列転写系を挿入したプラスミド	Km	本研究
pPK4-PncRNA1161-U1A*	ncRNA1161由来プロモーター-U1A結合配列転写系を挿入したプラスミド	Km	本研究
pPK4-Prg2918-U1A*	Rg2918由来プロモーター-U1A結合配列転写系を挿入したプラスミド	Km	本研究
pPK4-Prg3060-U1A*	Rg3060由来プロモーター-U1A結合配列転写系を挿入したプラスミド	Km	本研究
pPK4-Prrn1-U1A*	リボソームRNA (<i>rrn</i>) オペロン由来プロモーター1-U1A結合配列転写系を挿入したプラスミド	Km	本研究
pPK4-Prrn2-U1A*	リボソームRNA (<i>rrn</i>) オペロン由来プロモーター2-U1A結合配列転写系を挿入したプラスミド	Km	本研究

菌株とプラスミド	説明	薬剤耐性	引用・入手先
pVC7N	pHSG399(タカラバイオ)とpAM330を結合し構築したE. coli - コリネ型細菌シャトルベクターで、正確な配列情報に更新したpVC7系プラスミド。GenBank Acc. No.: LC425431。	Cm	第2章
pVC7H1	pVC7Nの1塩基置換(C1172A)変異体で、コリネ型細菌内での高コピー数化する形質を獲得したプラスミド	Cm	第2章
pVC7H2	pVC7Nの1塩基置換(C1172G)変異体で、コリネ型細菌内での高コピー数化する形質を獲得したプラスミド	Cm	第2章
pVC7-U1A*-1	U1A*-RNA転写ユニットをpVC7に挿入したプラスミド	Cm	本研究
pVC7H1-U1A*-1	U1A*-RNA転写ユニットをpVC7H1に挿入したプラスミド	Cm	本研究
pVC7H2-U1A*-1	U1A*-RNA転写ユニットをpVC7H2に挿入したプラスミド	Cm	本研究
pPK4-U1A*-1	U1A*-RNA転写ユニットをpPK4に挿入したプラスミド	Km	本研究
pPK4H1-U1A*-1	U1A*-RNA転写ユニットをpPK4H1に挿入したプラスミド	Km	本研究
pPK6	<i>C. glutamicum</i> 由来のtatACB遺伝子をpPK4に挿入したプラスミド	Km	85
pPK6-tU1A-RBD	U1A-RBDタンパク質分泌発現用プラスミド	Km	本研究
pRACE	In-Fusionクローニング用ベクター。pUC系複製起点保有。	Amp	タカラバイオ
p5'RACE-U1A	U1A*-RNAの5'RACE PCR断片を挿入したpRACE変異体	Amp	本研究
p3'RACE-U1A	U1A*-RNAの3'RACE PCR断片を挿入したpRACE変異体	Amp	本研究
p5'RACE-U1AS	U1A*S-RNAの5'RACE PCR断片を挿入したpRACE変異体	Amp	本研究
p3'RACE-U1AS	U1A*S-RNAの3'RACE PCR断片を挿入したpRACE変異体	Amp	本研究
pGEM-RD1	pGEM-T Easy上にpAM330由来部分配列(1056 bp)と <i>dnaA</i> 遺伝子部分配列(794 bp)を挿入。プラスミドコピー数定量解析のためのqPCR用標準プラスミド。	Amp	本研究

2.1.2 プライマー

本章では表 4-2 に記載の DNA プライマーと DNA 配列を使用した。

表 4-2 使用プライマーと DNA 配列

プライマー名または配列名	用途	塩基配列 (5'-3')	配列番号
【pBS4S-Δrncプラスミド構築】			
rnc-5'_F	<i>rnc</i> 遺伝子上流領域の増幅用	AAAACGACGGCCAGTGGCTGAATCTGAGCGCCTGG	1
rnc-5'_R		TCAACTTCAGGCAGTAGGAACTTCTCCAAACCAGC	2
rnc-3'_F	<i>rnc</i> 遺伝子下流領域の増幅用	ACTGCCTGAAGTTGAGGTGGTG	3
rnc-3'_R		GACCATGATTACGCCAAGAAAAATCGACACTGTCAG	4
pBS4S_F	pBS4プラスミド増幅用	GGCGTAATCATGGTCATAGCTGTTTTC	5
pBS4S_R		ACTGGCCGTCGTTTTACAACGTCG	6
rnc-del_check_F	コロニーPCR用	GGCTGAATCTGAGCGCCTGGTC	7
rnc-del_check_R		AAGAAAAATCGACACTGTCAGCCAG	8
【pPK4-P-KpnI-NheIプラスミド構築】			
Pf1	F1プロモーター配列	GATCTACTCGTTACTCAAGGCAAGCTCGAGCGGGACGGTCGAAC CAGCTTCAAGCAGCGGATGAGTATGTTACAGTAGATAGCGAGC GGGAGACCGCTCGACCTTAGTTCTCTGTTGCGGGGAGTTTCAT GGGATCC CTCGAGGTTGCTAACGCTCGGTGCGCTCACCTACGCGCGCTAGG	9
Pf2	F2プロモーター配列	TGTTGACCTCACTCCTGAGGTCACCGAGCCGTCAACGCTAAAAAT ATGACGCGCTCGGTGGTACGGGCGCGCGCTGGGAACACGGCCGG TGGATCC	
Pf3	F3プロモーター配列	GATCTATCCGAAGTCATGATGTCGAGCGTAGATAGTACCGTTGA AGCTATCCACACTCACGCCCT	11
pPK4_KpnI-NheI-F	KpnI, NheIの認識配列挿入用	AGGTACCTGGCTAGCCGGGGATCCTCTAGAGTCGAC	12
pPK4_R		GCCTGGGGTGCCATAATGAGTGAG	13
PcspB_IF-F	<i>cspB</i> プロモーター増幅用	TTAGGCACCCAGGCAAATTCCTGTGAAGTAGCTGATTTAG	14
PcspB_IF-R		GCTAGCCAGGTACCTCAGCTTAGCAGCCTGTCGTTGAGAAAAAC	15
Pf1_IF-F	F1プロモーター増幅用	TTAGGCACCCAGGCGATCTACTCGTTACTCAAGGCAAG	16
Pf1_IF-R		GCTAGCCAGGTACCTGGATCCCATGAACCTCCCGCAAC	17
Pf2_IF-F	F2プロモーター増幅用	TTAGGCACCCAGGCTCGAGGTTGCTAACGCTCGGTG	18
Pf2_IF-R		GCTAGCCAGGTACCTGGATCCACCGCCGCTGTTCCAC	19
Pf3_IF-F	F3プロモーター増幅用	TTAGGCACCCAGGCGATCTATCCGAAGTCATGATGTC	20
Pf3_IF-R		GCTAGCCAGGTACCTAGGGCGTGAGTGTGGATAGCTTC	21
【pTAKN-2-chlI-Prevプラスミド構築】			
chlI	クロロフィル生合成酵素サブユニットChlIの部分領域	ATATCACACCCGCCCCGGTTATCCTTATGGTTGCGGTAATCC TGAAGAAGGAGAACTTAGGCCACAACCTTGTGATCGATTTGGAA TGCAATGCCAAGTGGGGACCGTGAGAGATGCAGAGCTGAGAGTG AAGATAGTTGAGGAAAGA	22
pTAKN-2-chlI_F	pTAKN-2-chlIプラスミド増幅用	CGCTCTAGAGTCGACCTGCAG	23
pTAKN-2-chlI_R		TCTTTCCTCAACTATCTTCACTC	24
PcspBrev_IF-F	<i>cspB</i> プロモーター増幅用	ATAGTTGAGGAAAGACAGCTTAGCAGCCTGTCGTTGAGAAAAAC	25
PcspBrev_IF-R		GTCGACTCTAGAGCGAAATTCCTGTGAAGTAGCTGATTTAG	26
Pf1rev_IF-F	F1プロモーター増幅用	ATAGTTGAGGAAAGAGGATCCCATGAACCTCCCGCAAC	27
Pf1rev_IF-R		GTCGACTCTAGAGCGGATCTACTCGTTACTCAAGGCAAG	28
Pf2rev_IF-F	F2プロモーター増幅用	ATAGTTGAGGAAAGAGGATCCACCGCCGCTGTTCCAC	29
Pf2rev_IF-R		GTCGACTCTAGAGCGCTCGAGGTTGCTAACGCTCGGTG	30
Pf3rev_IF-F	F3プロモーター増幅用	ATAGTTGAGGAAAGAGGGCGTGAGTGTGGATAGCTTC	31
Pf3rev_IF-R		GTCGACTCTAGAGCGGATCTATCCGAAGTCATGATGTC	32
【pPK4-P-chlI-Prevプラスミド構築】			
chlI-Prev_KpnI-F	KpnI認識配列挿入用	AGGTACCTGATATCACACCCGCCCCGGTTTATC	33
chlI-PcspBrev_NheI-R	NheI認識配列挿入用	GGCTAGCCAAAATTCCTGTGAAGTAGCTGATTTAG	34
chlI-Pf1rev_NheI-R		GGCTAGCCAGATCTACTCGTTACTCAAGGCAAG	35
chlI-Pf2rev_NheI-R		GGCTAGCCACTCGAGGTTGCTAACGCTCGGTG	36
chlI-Pf3rev_NheI-R		GGCTAGCCAGATCTATCCGAAGTCATGATGTC	37

プライマー名または配列名	用途	塩基配列 (5'-3')	配列番号
[pPK4-P-U1A*プラスミド構築]			
Tb1k	コロナ型細菌感染ファージBFK20由来ターミネーター配列	ATAGCATAAAATAACGCCCCACCTTCTTAACGGGAGGTGGGGCG TTATTT	38
U1A-binding seq.	U1Aタンパク質結合配列	GGGCATTGCACTCCGCC GATCTACTCGTTACTCAAGGCAAGGTCGAGCGGGACGGTCGAAC CAGCTTCAAGCGACCGGATGAGTATGTTACAGTAGATAGCGAGC GGGAGACCGCTCGACCTTAGTTCTCTGTTGCGGGGAGTTCAT	39
Pf1-linker-U1A-binding seq.- Tb1k	F1プロモーター配列-リンカー配列-U1Aタン パク質結合配列-ターミネーター配列	GGGATCCACGTACCCTGCGAGACAGGAGTAATCCTAAACAGGGC ATTGCACTCCGCCCTTGCTAGCATAGCATAAAATAACGCCCCAC CTTCTTAACGGGAGGTGGGGCGTTATTTTTACGGGGATC	40
pPK4_F	pPK4プラスミド増幅用	CGGGGATCCTCTAGAGTCGAC	41
pPK4_R		GCCTGGGGTGCCATAATGAGTG	42
Pf1-U1A* (pPK4)_F	U1A*-RNA転写ユニット増幅用	TTAGGCACCCAGGCATCTACTCGTTACTCAAGGCAAG	43
Pf1-U1A* (pPK4)_R		TCTAGAGGATCCCGTAAAAATAACGC	44
espB_F	espBプロモーター増幅用	TTAGGCACCCAGGCAAAATCCTGTGAAGTAGCTGATTTAG	45
espB_R		GCTCGTATCTACTGCAGCTTAGCAGCCTGCTGTTGAGAAAAAC	46
gapA_F	gapAプロモーター増幅用	TTAGGCACCCAGGCATGATTGAGGCATAAAACGACC	47
gapA_R		GCTCGTATCTACTGGTGTGTCTCCTCTAAAGATTGTAG	48
ncRNA744_F	ncRNA744由来プロモーター増幅用	TTAGGCACCCAGGCATTAAGGGAATCAACGCG	49
ncRNA744_R		GCTCGTATCTACTGTGAGCCCAATGATTTCTTACTG	50
Rg0322_F	Rg0322由来プロモーター増幅用	TTAGGCACCCAGGCATATTGCTCGTCAAAACCCCTGAG	51
Rg0322_R		GCTCGTATCTACTGTTGAGGTTTTTGTGACCCCCAC	52
ncRNA1799_F	ncRNA1799由来プロモーター増幅用	TTAGGCACCCAGGCGCCGCACTGGGAATGAAAGTAC	53
ncRNA1799_R		GCTCGTATCTACTGGTTGCCTCATTGCAACGTTTAC	54
ncRNA1161_F	ncRNA1161由来プロモーター増幅用	TTAGGCACCCAGGCTGCGATCAGCTGGAAAACAATTG	55
ncRNA1161_R		GCTCGTATCTACTGGTGTGTTAGAGCAACAACCTTG	56
Rg2918_F	Rg2918由来プロモーター増幅用	TTAGGCACCCAGGCGAAGAAGAACTGGCTCATCGCAG	57
Rg2918_R		GCTCGTATCTACTGTGATGCGATCCTTCGAGATC	58
Rg3060_F	Rg3060由来プロモーター増幅用	TTAGGCACCCAGGCCGAGAAGTACTGGATCATCTTC	59
Rg3060_R		GCTCGTATCTACTGCCTGGATAGCTTCTCTCCTAAGAG	60
rrn1_F	rrn1プロモーター増幅用	TTAGGCACCCAGGCCGACAAACCAACACTTCATCG	61
rrn1_R		GCTCGTATCTACTGTGAGCCAGGATCAAACCTCCAC	62
rrn2_F	rrn2プロモーター増幅用	TTAGGCACCCAGGCGGTTACAAGCTGGTTAAGACATGC	63
rrn2_R		GCTCGTATCTACTGGTCTGAGCCAGGATCAAAC	64
pPK4-U1A*_F	pPK4プラスミド増幅用	CAGTAGATAGCGAGCGGGAG	65
[U1A*-RNA転写プラスミド構築]			
U1A-1_F1	U1A*-RNA転写ユニット増幅用	TAGGCACCCAGGCTGATCTACTCGTTACTCAAGGCAAG	66
U1A-1_R1		GGAAGCGAAGAAGCGATCCCGTAAAAATAACGC	67
pVC7_F	pVC7プラスミド増幅用	GCTTCTCCGCTTCTCGCTC	68
pVC7_R		AGCCTGGGGTGCCTAATGAG	69
U1A-1_F2	U1A*-RNA転写ユニット増幅用	GATCTACTCGTTACTCAAGGCAAG	70
U1A-1_R2		GATCCCGTAAAAATAACGCCCCACCTC	71
pPK4_F	pPK4プラスミド増幅用	ATTTTTACGGGGATCCTCTAGAGTCGAC	72
pPK4_R		AGTAACGAGTAGATCGCCTGGGGTGCCTAATGAGTG	73
[U1A-RBD分泌発現プラスミド構築]			
U1A-RBD_F	U1A-RBDタンパク質発現ユニット増幅用	TATTTAGGGGTACCCAAATCCTGTGAAGTAGCTGATTTAG	74
U1A-RBD_R		CCCCGGAATGGGCCCTTAGACGAAGGTGCCTTTCATCTTC	75
pPK6_F	pPK6プラスミド増幅用	GGGCCATTCGGGGATCCTCTAGAG	76
pPK6_R		GGGTACCCCTAAATAATATCGGTC	77
[RACE法]			
5'-RACE_IF-CDS	5'-RACE用プライマー	GATTACGCCAAGCTTGATTACTCCTGTCTCGAGGGTAC	78
3'-RACE_IF-CDS	3'-RACE用プライマー	GATTACGCCAAGCTTTCTGTTGCGGGGAGTTCATG	79
pRACE_seq_F	シーケンス解析用	TTCAGGCTGCGCAACTGTTG	80
pRACE_seq_R		GAGCGCAACGAATTAATGTG	81

プライマー名またはオリゴDNA名	用途	塩基配列 (5'-3')	配列番号
【コピー数評価qPCR用】			
dnaA_1_F	<i>dnaA</i> 遺伝子断片増幅用	GGTCGATGACATCCAGTTCC	82
dnaA_1_R		GCTTATCTGCCTGGTGCAAT	83
dnaA_2_F		ATGGAGGTCACCTGCGGAATA	84
dnaA_2_R		CACAGGTACATCGCCAGTTG	85
dnaA_3_F		CGTGTGCTGCCTATTCTTCGTT	86
dnaA_3_R		CGGTGCGGTGATTTCCA	87
pAM330_1_F	<i>repA</i> 遺伝子断片増幅用	TCACCTCTGGCTGAATTGGA	88
pAM330_1_R		GTCGAACAGTGCCACAAAC	89
pAM330_2_F		GCTGGTCTGCTGGTGTGGTT	90
pAM330_2_R		GCGAGGTAGGTTGCCATTTT	91
pAM330_3_F		TGCGTGGATAAGGCTAAGGA	92
pAM330_3_R		TCCCCATGAGTAGGCAGAAC	93

2.2 培養条件

プラスミド構築のために用いた *E. coli* JM109 株の形質転換株の培養は、LB 培地を用いた。必要に応じて寒天 15 g/L、抗生物質としてアンピシリン (Amp)、クロラムフェニコール (Cm)、カナマイシン (Km) をそれぞれ 100 µg/mL、25 µg/mL、50 µg/mL の終濃度となるよう添加した。培養は 37°C で実施し、液体培養の場合 120 rpm で 12 時間振とうを行った。*C. glutamicum* の試験管培養は、CM-Dex 培地を使用した。必要に応じて寒天 20 g/L、抗生物質として Cm、Km をそれぞれ 5 µg/mL、25 µg/mL の終濃度となるよう添加した。培養は 30°C で実施した。*C. glutamicum* の形質転換はエレクトロポレーション法にて実施した。

菌株培養評価は試験管培養系で行い、必要な抗生物質を含む CM-Dex 培地 2 mL に対し、プレートに生えてきた菌体を白エーゼ (ループ容積 1 µL) 摺り切り 1 かき分を植菌して 30°C、120 rpm で 18 時間振とう培養を行った。L 字試験管での培養は、グルコースを単一炭素源とする最小培地 MM-Glc 培地で培養を実施し、30°C、72 時間培養を行った。*rnc* 遺伝子の欠損株取得用培地として、S10 培地プレートを用いた。

RNA-seq 解析用のジャーファーマンター培養としては、CM-Dex プレート培地にて培養して得た株から青エーゼ (Nunc、ループ容積 10 µL) 1 かき分を植菌し、シード培地 40 mL に接種し、坂口フラスコ培養系で 30°C、120 rpm で終夜振とう培養した。その培養液 15 mL をメイン培地 240 mL に接種し、1 L 容量培養装置 (BSS-01NP、エイブル) にて培養を実施した。培養温度 30°C、培養 pH 7、攪拌速度 650rpm (一定攪拌)、培養 pH 7.0 になるようにアンモニアガスで制御し、培養液量あたりの通気量 (vvm) として 1/2 vvm に制御して培養した。

U1A*-RNA 生産量評価のためのジャーファーマンター培養は、CM-Dex 培地プレートに生えてきた菌体を青エーゼ (Nunc、ループ容積 10 µL) 摺り切り 5 かき分をメイン培地 5 mL に懸濁した。その懸濁液 5 mL をメイン培地 300 mL に接種し、1 L 容量培養装置にて培養を実施した。培養温度 30°C、培養 pH 7、培養開始時は攪拌速度 650 rpm でその後は溶存酸素濃度を 5%以上

に保つよう攪拌速度を制御し、培養 pH 7.0 になるようにアンモニアガスで制御し、培養液量あたりの通気量 (vvm) として 1/2 vvm に制御して培養を行った。

2.3 プラスミドの構築

2.3.1 pBS4S- Δ rnc 構築

C. glutamicum R 株の RNase III のアミノ酸配列情報²⁵と配列比較を行うことにより、*C. glutamicum* 2256 株のゲノム上の *rnc* 遺伝子を特定した。その *rnc* 遺伝子を欠損させるために必要な情報として、その ORF 領域と、その上流領域と下流領域の各々約 1 kbp ずつの DNA 塩基配列情報を用いた。

2256 株の菌体から、DNeasy Blood & Tissue Kit (キアゲン) を用いてゲノム DNA (gDNA) を取得し、これを鋳型として、プライマー1と2を使用して *rnc* 遺伝子上流約 1 kb 分の DNA 断片を、プライマー3と4を使用して *rnc* 遺伝子下流約 1 kb 分の DNA 断片を、PrimeSTAR GXL DNA Polymerase (タカラバイオ) を用いた PCR により取得した。続いて、これらの DNA 断片を、*sacB* 遺伝子を有するプラスミド pBS4S に以下の手順で連結した。まず、pBS4S を鋳型とし、プライマー5と6を使用して、PrimeSTAR GXL DNA Polymerase を用いた PCR により、pBS4S の増幅断片を取得した。次に上記で取得した *rnc* 遺伝子上流域と下流域の両 DNA 断片と pBS4S の増幅断片を、In-Fusion HD Cloning Kit により連結した (図 4-2)。その反応溶液を用いて、*E. coli* JM109 株コンピテントセルを形質転換し、Km を終濃度 50 μ g/mL で含む LB 寒天培地上に塗布して 37°C で一晚培養した。その後、LB 寒天培地上に出現したコロニーを選抜し、Km を終濃度 50 μ g/mL で含む LB 液体培地に植菌し振とう培養を実施した。こうして得られた形質転換株の培養菌体から QIAprep Spin Miniprep Kit によりプラスミド抽出し、シーケンス解析により、*rnc* 遺伝子上流域と下流域の DNA 断片を含むプラスミドを確認し、これを pBS4S- Δ rnc と命名した。

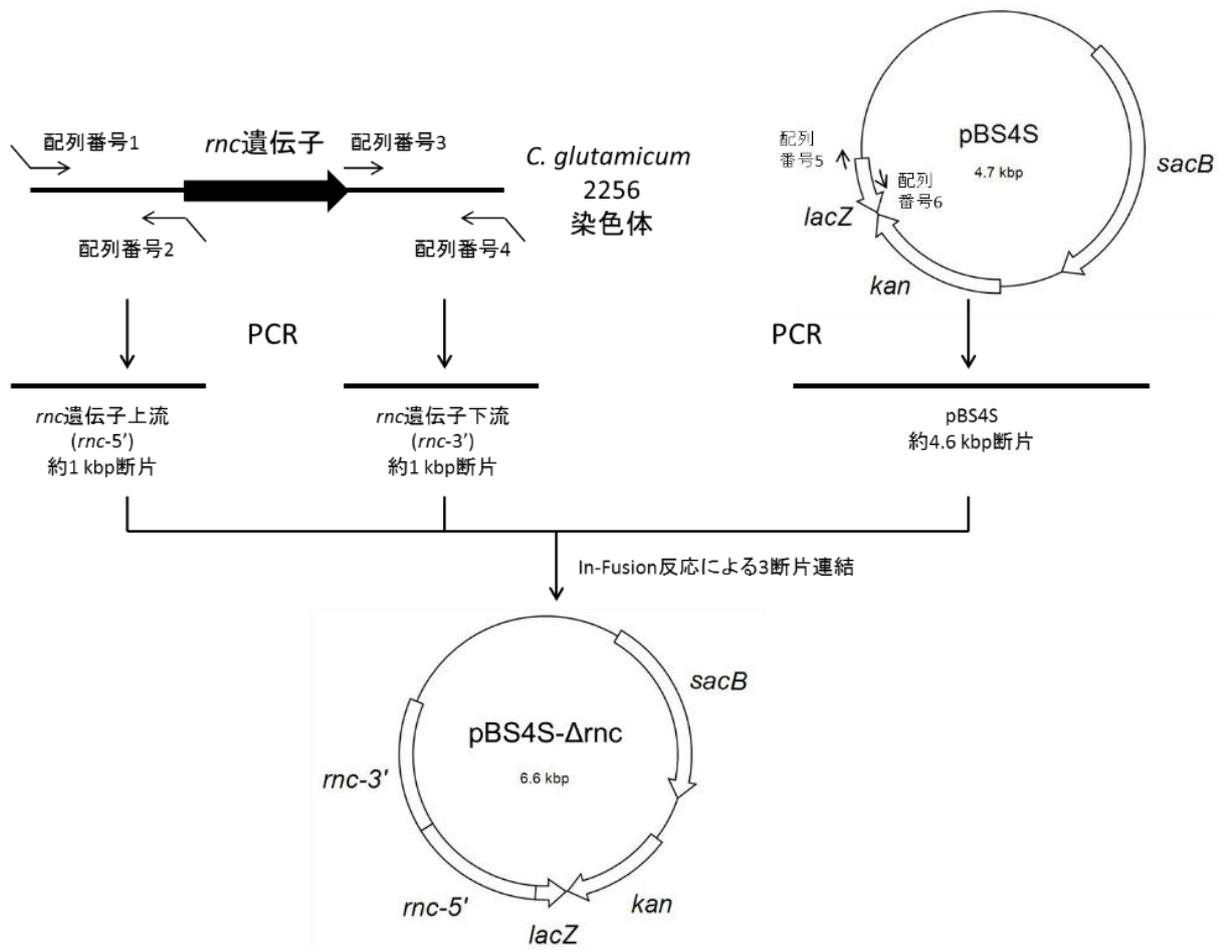


図 4-2 pBS4S-Δrnc プラスミド構築の説明

2.3.2 *chlI* 遺伝子部分配列 dsRNA 生産プラスミド構築

「各種プロモーター配列 - KpnI 認識部位 - NheI 認識部位」を導入した pPK4-P-KpnI-NheI を、次のように構築することにした。*cspB* プロモーター配列の増幅断片は 2256 株由来 gDNA を鋳型としてプライマー14と15を使用し、F1 プロモーター配列の増幅断片は人工遺伝子合成品の F1 プロモーター配列 9 を鋳型としてプライマー16と17を使用し、F2 プロモーター配列の増幅断片は人工遺伝子合成品の F2 プロモーター配列 10 を鋳型としてプライマー18と19を使用し、F3 プロモーター配列の増幅断片は人工遺伝子合成品の F3 プロモーター配列 11 を鋳型としてプライマー20と21を使用し、PrimeSTAR HS DNA Polymerase (タカラバイオ) を用いた PCR による各種プロモーターの増幅断片を取得した。また、pPK4 を鋳型としてプライマー12と13を用いて、PrimeSTAR GXL DNA Polymerase を用いた PCR による KpnI 認識部位-NheI 認識部位を導入した pPK4 増幅断片を取得した。各種プロモーター断片と pPK4 の増幅断片を混合し、In-Fusion HD Cloning Kit を使用して 2 つの断片を連結し、*E. coli* JM109 コンピテントセルに形質転換し、取得したコロニーからプラスミド抽出を行い、pPK4-P*cspB*-KpnI-NheI、pPK4-P*f1*-KpnI-NheI、pPK4-P*f2*-KpnI-NheI、pPK4-P*f3*-KpnI-NheI の 4 種のプラスミドを取得した (図 4-3)。

次に、クロロフィル合成遺伝子サブユニット *chlI* 配列 22 が pTAKN-2 に挿入された pTAKN-2-*chlI* を人工遺伝子合成品の購入によって入手した。pTAKN-2-*chlI* に各種プロモーター配列を組み込み、pTAKN-2-*chlI*-Prev を次のように構築することにした。*cspB* プロモーター配列の増幅断片は 2256 株由来 gDNA を鋳型としてプライマー25と26を使用し、F1 プロモーター配列の増幅断片は人工遺伝子合成品の F1 プロモーター配列 9 を鋳型としてプライマー27と28を使用し、F2 プロモーター配列の増幅断片は人工遺伝子合成品の F2 プロモーター配列 10 を鋳型としてプライマー29と30を使用し、F3 プロモーター配列の増幅断片は人工遺伝子合成品の F3 プロモーター配列 11 を鋳型としてプライマー31と32を使用し、PrimeSTAR HS DNA Polymerase を用いた PCR により各種プロモーター増幅断片を取得した。また、pTAKN-2-*chlI* を鋳型として、プライマー23と24を使用し、PrimeSTAR GXL DNA Polymerase を用いた PCR により pTAKN-2-*chlI* の増

幅断片を取得した。各種プロモーター断片と *chlI* 遺伝子部分配列を有する pTAKN-2-*chlI* の増幅断片を混合し、In-Fusion HD Cloning Kit を使用して 2 つの断片を連結し、*E. coli* JM109 コンピテントセルに形質転換し、取得したコロニーからプラスミド抽出を行い、pTAKN-2-*chlI*-PcspBrev、pTAKN-2-*chlI*-Pf1rev、pTAKN-2-*chlI*-Pf2rev、pTAKN-2-*chlI*-Pf3rev を取得した。各々のプラスミドを鋳型として、プライマー33 と 34、プライマー33 と 35、プライマー33 と 36、プライマー33 と 37 を使用して、PrimeSTAR HS DNA Polymerase を用いた PCR により、各々の DNA を調製した後、制限酵素 KpnI と NheI の二カ所同時切断を行った。さらに、pPK4-PcspB-KpnI-NheI、pPK4-Pf1-KpnI-NheI、pPK4-Pf2-KpnI-NheI、pPK4-Pf3-KpnI-NheI に対して、制限酵素 KpnI と NheI の二カ所同時切断を行った後、各々に対応する先の制限酵素 KpnI と NheI の処理産物を混合し、Ligation high Ver.2 (東洋紡) を使用して 2 つの断片の連結を行った。連結反応溶液を用いて JM109 コンピテントセルを形質転換し、取得したコロニーからプラスミド抽出を行い、pPK4-PcspB-*chlI*-PcspBrev、pPK4-Pf1-*chlI*-Pf1rev、pPK4-Pf2-*chlI*-Pf2rev、pPK4-Pf3-*chlI*-Pf3rev の 4 種のプラスミドを取得した。

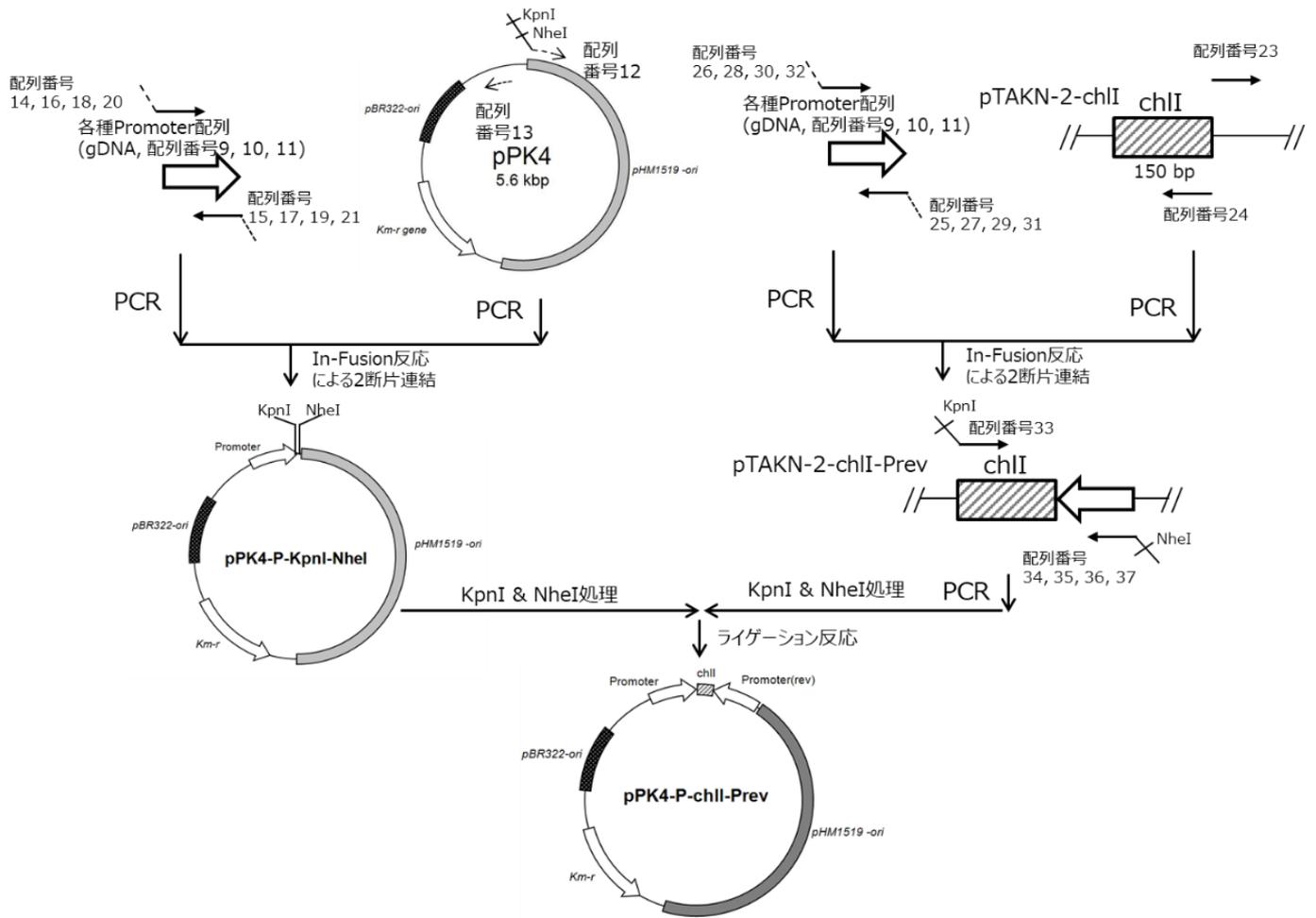


図 4-3 *chII* 遺伝子部分配列発現用ベクターの設計図

2.3.3 F1 プロモーターを用いたモデル U1A*-RNA 生産用プラスミド構築

コリネ型細菌に感染するバクテリオファージ BFK20 由来の F1 プロモーター配列 (GenBank Acc. No. L13772)⁷⁸ からプロモーター作用領域 9 およびターミネーター領域 38⁷⁷、核小体低分子リボ核タンパク質 U1A への結合能を有する U1A タンパク質結合配列 39⁸⁰ からなる「F1 プロモーター配列 - リンカー配列 - U1A タンパク質結合配列 - ターミネーター配列」と配置した RNA 転写ユニット (U1A*-RNA 転写ユニット 40) の人工遺伝子合成品をユーロフィンジェノミクスより購入した。U1A*-RNA 転写ユニット増幅断片は、その人工遺伝子を鋳型として、プライマー43と44を使用し、PrimeSTAR HS DNA Polymerase を用いた PCR により取得した。さらに pPK4 ベクター増幅断片は、pPK4 を鋳型とし、プライマー41と42を使用し、KOD FX NEO を用いた PCR により取得した。これらの DNA 断片を混合し、In-Fusion HD Cloning Kit にて、両 DNA 断片を連結した。この反応溶液を用いて、*E. coli* JM109 株コンピテントセルを形質転換し、km を終濃度 50 µg/mL で含む LB 寒天培地上に塗布して 37°C で一晚培養した。その後、LB 寒天培地上に出現したコロニーを選抜し、Km を終濃度 50 µg/mL で含む LB 液体培地に植菌し振とう培養を実施した。こうして得られた形質転換株の培養菌体から QIAprep Spin Miniprep Kit を用いてプラスミド DNA を抽出し、DNA 配列の解析により目的とするプラスミドを確認し、これを pPK4-Pf1-U1A*と命名した (図 4-4)。

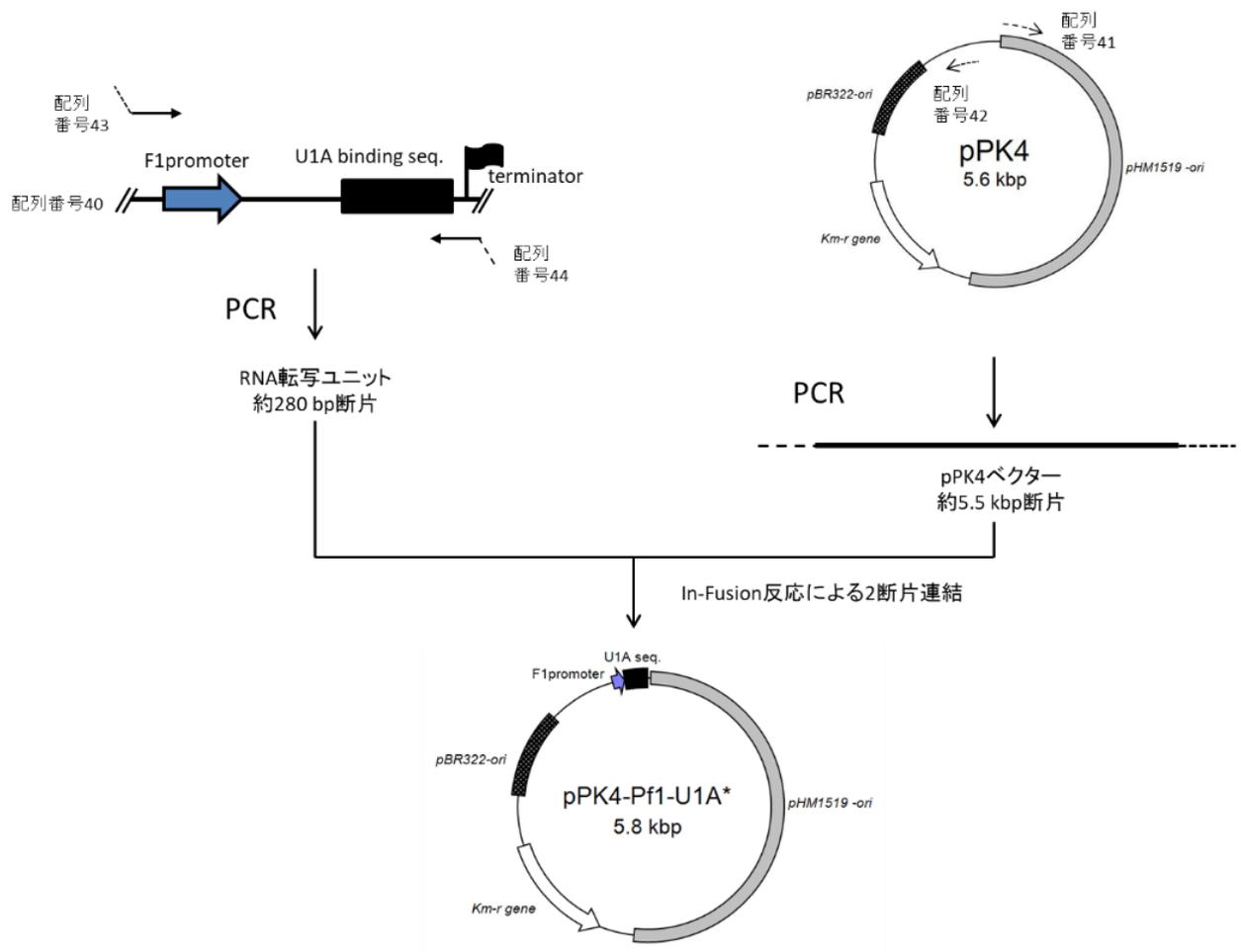


図 4-4 pPK4-Pf1-U1A*ベクターの設計図

2.3.4 内在性プロモーター評価のための各種 U1-RNA 生産用プラスミド構築

グラム陽性菌の S 層を構成する細胞表層タンパク質をコードする *cspB* 遺伝子のプロモーター⁸¹と、グリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼをコードする *gapA* 遺伝子のプロモーター⁸²を、内在性プロモーター活性比較のための基準プロモーターとして選択した。*cspB* 遺伝子プロモーターと *gapA* 遺伝子プロモーターの増幅断片は、2256 株由来 gDNA を鋳型として、プライマー45と46、プライマー47と48を使用し、PrimeSTAR GXL DNA Polymerase を用いた PCR により取得した。

高転写活性プロモーターとして RNA-seq 解析により予測される領域を搭載したプラスミドを製作した。ジャーファーメンター培養評価における RNA-seq 解析によって抽出された高活性なプロモーターとして、CDS および ncRNA 領域の RNA-seq により転写が確認された転写開始点の周辺 600 bp（予想される転写開始点より上流 500 bp + 下流 100 bp）を予測プロモーター領域とした。ncRNA744、Rg0322、ncRNA1799、ncRNA1161、Rg2918、Rg3060 由来プロモーター領域の増幅断片を、2256 株由来 gDNA を鋳型として、プライマー49と50、51と52、53と54、55と56、57と58、59と60を使用し、PrimeSTAR GXL DNA Polymerase を用いた PCR により取得した。

rRNA 遺伝子は、一般的に強力なプロモーターにより転写されることが分かっている。rRNA 除去処理をせずに RNA-seq 解析に供したサンプルのデータを元に転写量の多い 2 種の rRNA のプロモーター領域 *rrn1*、*rrn2* を、プライマー61と62、63と64を使用し、PrimeSTAR GXL DNA Polymerase を用いた PCR によりプロモーター増幅断片を取得した。pPK4-U1A*ベクター増幅断片は、pPK4-Pf1-U1A*を鋳型としてプライマー65と42を使用し、PrimeSTAR GXL DNA Polymerase を用いた PCR により取得した。各プロモーター断片と pPK4-U1A*ベクター断片をそれぞれ混合し、In-Fusion HD Cloning Kit にて、両 DNA 断片を連結した。この反応溶液を用いて、*E. coli* JM109 株コンピテントセルを形質転換し、Km を終濃度 50 µg/mL で含む LB 寒天培地上に塗布して 37°C で一晚培養した。その後、LB 寒天培地上に出現したコロニーを選抜し、Km を終濃度 50 µg/mL で含む LB 液体培地に植菌し振とう培養を実施した。こうして得られた形質転

換株の培養菌体から QIAprep Spin Miniprep Kit を用いてプラスミド DNA を抽出し、DNA 配列の解析により目的とするプラスミドを確認し、これを pPK4-PcspB-U1A*、pPK4-PgapA-U1A*、pPK4-Pf1-U1A*、pPK4-PncRNA744-U1A*、pPK4-Prg0322-U1A*、pPK4-PncRNA1799-U1A*、pPK4-PncRNA1161-U1A*、pPK4-Prg2918-U1A*、pPK4-Prg3060-U1A*、pPK4-Prn1-U1A*、pPK4-Prn2-U1A*と命名した (図 4-5)。

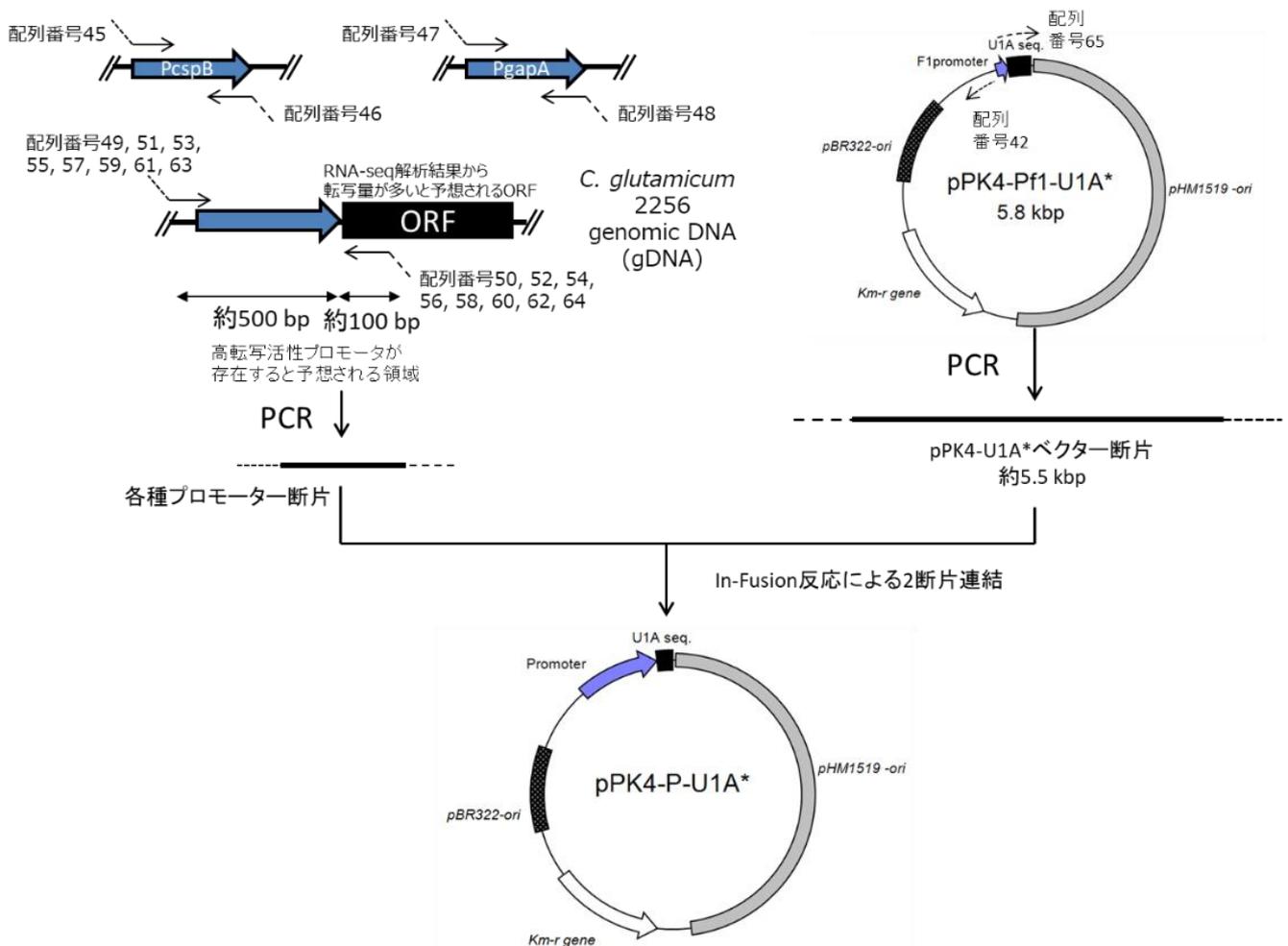


図 4-5 内在性プロモーターを用いた各種 U1A*-RNA 転写用ベクターの設計図

2.3.5 U1A*-RNA 生産用プラスミド構築

pVC7-U1A*-1、pVC7H1-U1A*-1、pVC7H2-U1A*-1 プラスミドの構築を行った。U1A*-RNA 転写ユニット増幅断片は、pPK4-Pfl-U1A*プラスミドを鋳型として、プライマー66と67を使用し、PrimeSTAR GXL DNA Polymerase を用いた PCR により取得した。pVC7N、pVC7H1、pVC7H2 プラスミドの増幅断片は、pVC7N、pVC7H1、pVC7H2 を鋳型とし、プライマー68と69を使用し、KOD FX NEO を用いた PCR により取得した。このようにして得た増幅断片を混合し、In-Fusion HD Cloning Kit にて、両 DNA 断片を連結した。この反応溶液を用いて、*E. coli* JM109 株コンピテントセルを形質転換し、Cm を終濃度 25 µg/mL で含む LB 寒天培地上に塗布して 37°C で一晩培養した。その後、LB 寒天培地上に出現したコロニーを選抜し、Cm を終濃度 25 µg/mL で含む LB 液体培地に植菌し振とう培養を実施した。こうして得られた形質転換株の培養菌体から QIAprep Spin Miniprep Kit を用いてプラスミド DNA を抽出し、DNA 配列の解析により目的とするプラスミドを確認し、これを pVC7-U1A*-1、pVC7H1-U1A*-1、pVC7H2-U1A*-1 と命名した (図 4-6)。

pPK4-U1A*-1、pPK4H1-U1A*-1 プラスミドの構築を行った。U1A*-RNA 転写ユニット増幅断片は、pVC7-U1A*-1 プラスミドを鋳型として、プライマー70と71を使用し、PrimeSTAR GXL DNA Polymerase を用いた PCR により取得した。pPK4、pPK4H1 プラスミドの増幅断片は、pPK4、pPK4H1 を鋳型として、プライマー72と73を使用し、PrimeSTAR GXL DNA Polymerase を用いた PCR により取得した。このようにして得た増幅断片を混合し、In-Fusion HD Cloning Kit にて、両 DNA 断片を連結した。この反応溶液を用いて、*E. coli* JM109 株コンピテントセルを形質転換し、Km を終濃度 50 µg/mL で含む LB 寒天培地上に塗布して 37°C で一晩培養した。その後、LB 寒天培地上に出現したコロニーを選抜し、Km を終濃度 50 µg/mL で含む LB 液体培地に植菌し振とう培養を実施した。こうして得られた形質転換株の培養菌体から QIAprep Spin Miniprep Kit を用いてプラスミド DNA を抽出し、DNA 配列の解析により目的とするプラスミドを確認し、これを pPK4-U1A*-1、pPK4H1-U1A*-1 を命名した。

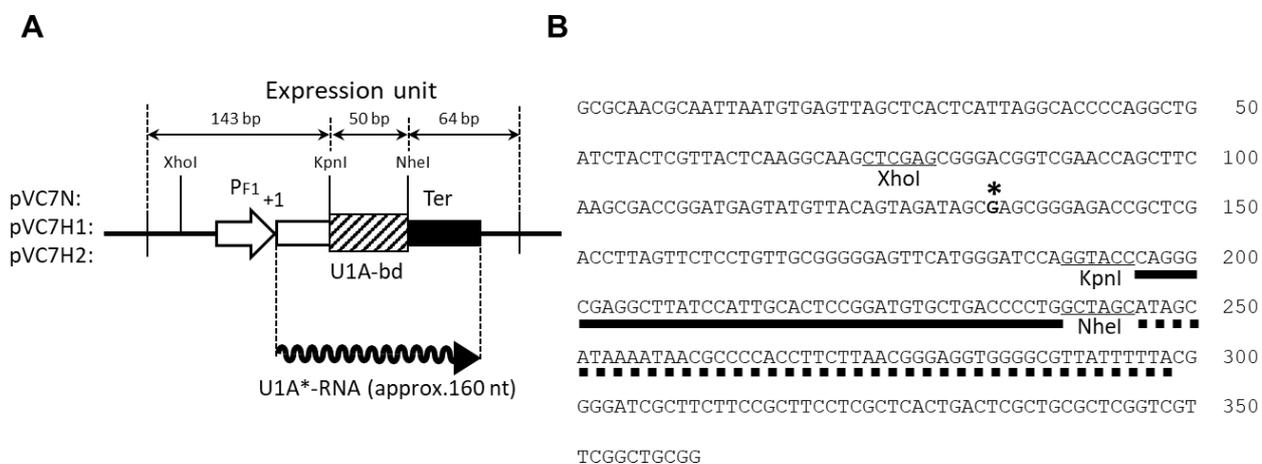


図 4-6 U1A*-RNA 発現系の説明図

(A) U1A*-RNA 発現系の模式図。Pfl は白矢印、ターミネーター (Ter) は黒線で示す。斜線部分 U1A-bd は U1 snRNA の SL-II 領域を含む。U1A*-RNA 発現ベクターとしては、pVC7、pVC7H1 と pVC7H2 を採用し、波線は転写後の U1A*-RNA (約 160 塩基長) を示す。(B) Pfl 配列、U1A*-RNA をコードする配列とターミネーターを含む DNA 配列情報。星印は Pfl の転写開始点、太線は SL-II 領域、点線はターミネーター領域を示す。

2.3.6 U1A-RBD タンパク質分泌発現用プラスミド構築

Tat 分泌機構を介した U1A-RBD タンパク質分泌発現系を次のように構築した。*cspB* 遺伝子のプロモーターの下流に、TorA タンパク質に由来する分泌シグナル配列 (TorA-ss)、プロプロテイングルタミナーゼ (pro-PG)⁸³、リンカーペプチド (PL)、U1A タンパク質結合ドメイン、ヒスチジンタグ (His-tag) 配列をコードした DNA 配列を設計し、それを人工遺伝子合成品として購入した (図 4-7)。U1A-RBD タンパク質分泌発現ユニットの増幅断片は、その人工遺伝子合成品を鋳型としてプライマー 74 と 75 を使用した PCR により取得した。pPK6 の増幅断片は、pPK6 プラスミドを鋳型としプライマー 76 と 77 を使用した PCR により取得した。このようにして得た増幅断片を混合し、In-Fusion HD Cloning Kit にて、両 DNA 断片を連結した。この反応溶液を用いて、*E. coli* JM109 株コンピテントセルを形質転換し、Km を終濃度 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ で含む LB 寒天培地上に塗布して 37°C で一晚培養した。その後、LB 寒天培地上に出現したコロニーを選抜し、Km を終濃度 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ で含む LB 液体培地に植菌し振とう培養を実施した。こうして得られた形質転換株の培養菌体から QIAprep Spin Miniprep Kit を用いてプラスミド DNA を抽出し、DNA 配列の解析により目的とするプラスミドを確認し、これを pPK6-tU1A-RBD と命名した。

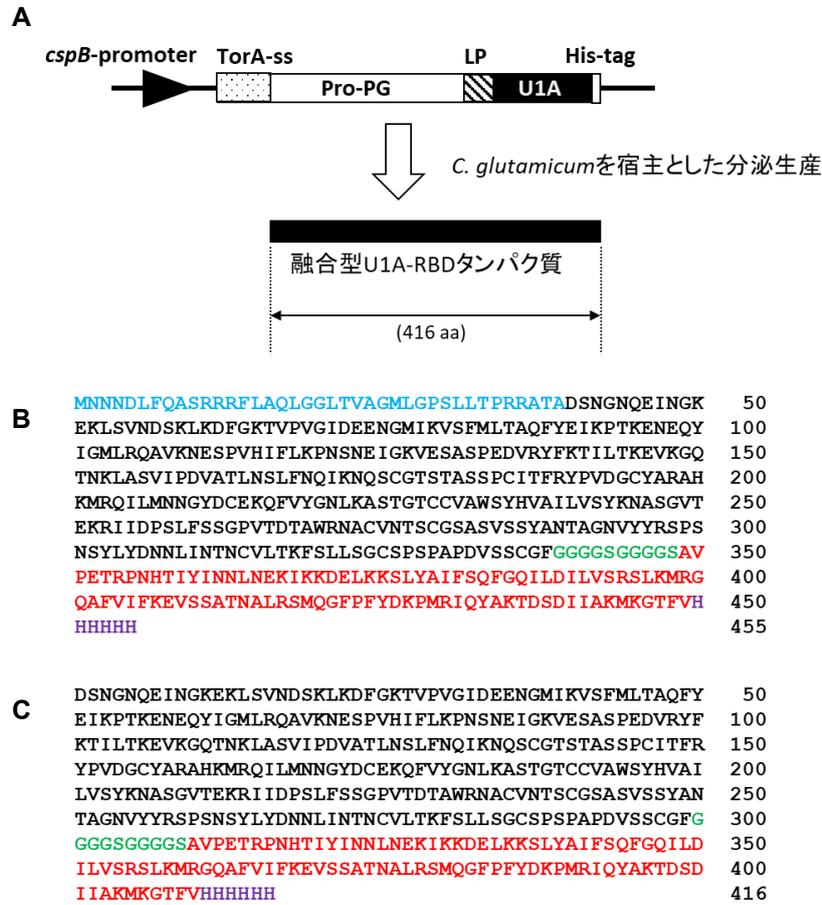


図 4-7 融合型 U1A*-RBD タンパク質発現系の説明図

(A) TorA-ss は *Escherichia coli* TorA シグナル配列、Pro-PG はプロ型プロテイングルタミナーゼ配列、LP はリンカーペプチド配列、U1A は U1A*-RNA との結合領域をコードする配列、His-tag は His の 6 アミノ酸残基(His(x6))コード配列を示す。(B) 分泌前の融合型 U1A*-RBD タンパク質のアミノ酸配列。シグナルペプチド TorA (青色), pro-PG (黒色), リンカーペプチド(緑色), U1A-RBD タンパク質(赤色)、His-tag (紫色)で示す。(C) 分泌後の融合型 U1A*-RBD タンパク質のアミノ酸配列。Tat 分泌機構により、TorA シグナルペプチド部分は除去される。全長 416 アミノ酸残基。

2.4 *rnc* 遺伝子欠損体取得法

pBS4S プラスミドは、コリネ型細菌内で複製するための複製起点を有しておらず、スクロース存在下ではネガティブマーカーとして機能し生育阻害を引き起こす *Bacillus subtilis* 由来 *sacB* 遺伝子⁶² (Acc. No. X02730) を有しており、相同組換え用プラスミドとして使用する。pBS4S に *rnc* 遺伝子上流 1 kbp と下流 1 kbp の領域を導入した pBS4S- Δrnc プラスミドは、コリネ型細菌内で自律複製できないため、本プラスミドをコリネ型細菌へ導入した場合、低頻度であるが、本プラスミドが相同組換え反応により染色体に組み込まれ、Km 耐性を示す形質転換株が出現する。そこで、2256L 株を電気パルス法により高濃度の上記プラスミド pBS4S- Δrnc を用いて形質転換し、Km を終濃度 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ で含む CM-Dex 寒天培地に塗布し 30°C で一晩培養した。その寒天培地に出現したコロニーを選抜し、1 回組換え株とした。

次に、1 回組換え体を、グルコースおよび Km を含まない 10% (w/v) スクロース含有 S10 寒天培地に塗布し、30°C にて一晩培養した。その寒天培地に出現したコロニーを選抜し、2 回組換え株とした。この 2 回組換え株は *sacB* 遺伝子が脱落することでスクロース非感受性となった株とである。得られた株の中には、その *rnc* 遺伝子が欠損型に置き換わったものと野生型に戻ったものが含まれる。これら 2 回組換え株を鋳型として、*rnc* 遺伝子の有無を確認するためのプライマー 7 と 8 を使用した KOD FX NEO を用いたコロニー PCR をした後、PCR 産物をアガロースゲル電気泳動で分析を行い、2256L 株から *rnc* 遺伝子が欠損した株を選別し、2256L Δrnc 株と命名した。

2.5 L 字試験管培養法

グルコースを単一炭素源とする最少培地 MM-Glc 培地で *C. glutamicum* 2256L 株と *C. glutamicum* 2256L Δrnc 株を培養した。2 つの株を CM-Dex 寒天培地に菌体を塗り広げ、30°C で一晩培養した後、寒天培地から菌体をかきとり、MM-Glc 培地に懸濁した。その後、波長 660 nm に対する吸光度 (OD_{660}) が 0.01 となるように、MM-Glc 培地 5 mL に植菌し L 字培養管 (縦 55 mm、横 80 mm、外径 17 mm) で培養を行った。小型振盪培養装置 TVS062CA (アドバンテック東洋) を用い、培養温度 30°C、振盪速度 70 rpm で培養し、各時間の OD_{660} を測定した。

2.6 RNA 評価のための試験管培養法と RNA 抽出法

Cm または Km を含む CM-Dex 培地 2 ml に白エーゼ (Nunc、ループ容積 1 μ L) 1 かき分を植菌し、レシプロ培養装置 ML-1216-TN (エイブル) を用い、培養温度 30°C、振盪速度 120 rpm で培養後の培養液 200 μ l を回収した。培養液 200 μ l に対して、RNAprotect Bacteria Reagent (キアゲン) 400 μ l を添加して処理した後、上清を除去し菌体画分を回収した。次に、菌体画分に 15 mg-Lysozyme (シグマアルドリッチ) /ml-TE 緩衝液 225 μ l を添加し室温で 30 分間反応させた後、20 mg/mL Proteinase K (タカラバイオ) 25 μ l を添加して室温で 30 分間反応させた。TRIzol LS (サーモフィッシャーサイエンティフィック) を用いて total RNA 抽出を行った後、イソプロピルアルコール沈殿精製を行い、RNase-free 水 50 μ l で溶解し total RNA 溶液を調製した (図 4-8) 。ジャーファーメンター培養サンプルに関しては、各培養時間の培養液 100 μ l に対して、RNAprotect Bacteria Reagent 200 μ l を添加し処理した後、上記と同様に RNA 抽出を行った。最後の溶出工程に関しては、RNase-free 水 100 μ l で溶解し、total RNA 溶液を調製した。

得られた total RNA 溶液について、Novex TBE Gels, 6% (サーモフィッシャーサイエンティフィック) を用いて total RNA 分析を実施した。抽出した total RNA の濃度は NanoDrop 2000 (サーモフィッシャーサイエンティフィック) を使用し OD_{260} の値から算出した。各 total RNA 溶液 1 μ l 分

を、Novex Hi-Density TBE Sample Buffer (5X) (サーモフィッシャーサイエンティフィック) 2 μ l および RNase-free 水 7 μ l と混合し、ゲルのレーンへアプライし、非変性条件下でのポリアクリルアミドゲル電気泳動 (PAGE) を実施した。1 \times TBE (インビトロジェン) を泳動緩衝液として用い、200V, 28 分の条件で泳動を行った。dsRNA 用マーカーとして DynaMarker dsRNA (バイオダイナミクス研究所)、ssRNA マーカーとして DynaMarker RNA Low II (バイオダイナミクス研究所) を使用した。

泳動後のポリアクリルアミドゲルは、SYBR Green II (タカラバイオ) で蛍光染色した後、ゲル撮影装置 ChemiDoc XRS (バイオラッド) で画像取得し、解析ソフト Quantity One (バイオラッド) で定量をした。

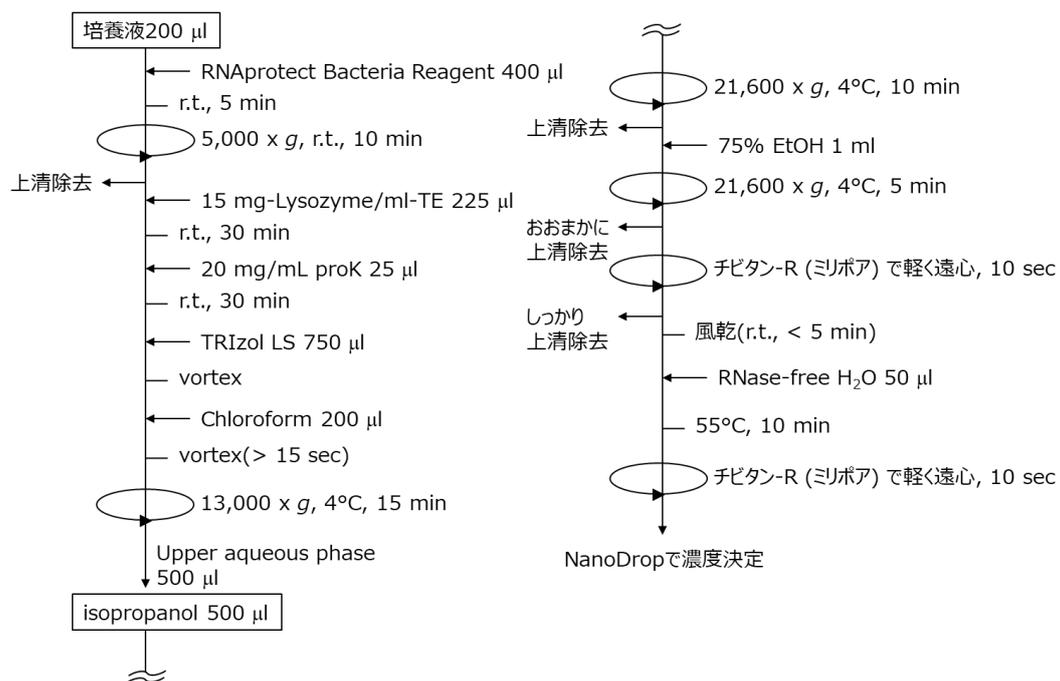


図 4-8 コリネ菌からの total RNA 抽出手順

2.7 rRNA の除去

抽出された total RNA 中には rRNA、tRNA、mRNA、ncRNA が含まれている。真核生物を対象とした RNA-seq では通常 poly-A 鎖を利用し mRNA のみを精製し発現解析に使用することが出来るが、原核生物の mRNA には poly-A 鎖が付加していないため、真核生物と同様に mRNA のみを精製することはできない。しかし、rRNA は total RNA 中における含有量が一番多いとされ、十分な深度をもって解析を行うには rRNA を除去することが望ましい。そのため、rRNA 除去処理を行った。抽出した total RNA を RNase-Free DNase Set (キアゲン) で処理し DNA を除去し、Trizol LS Reagent を使用し再度 RNA 抽出した。DNA 除去済み total RNA 各 4 µg から Ribo-Zero rRNA Removal Kit (Gram-Positive Bacteria) (イルミナ) を用いて rRNA を除去した。

2.8 RNA-seq ライブラリー調製

rRNA を除去したサンプルと除去未実施サンプルについて、どちらも RNA-seq に供するためのライブラリー調製を実施した。ライブラリー調製には Truseq stranded mRNA Sample Prep kit (イルミナ) を使用した。cDNA 合成、3'末端のアデニル化、アダプターライゲーション、PCR 増幅、ライブラリーのバリデーション、ライブラリーのノーマライゼーションおよびプーリングを実施して、調製したライブラリーの定量は Qubit dsDNA HS Assay Kit (サーモフィッシャーサイエンティフィック) を用いて行った。

2.9 MiSeq によるシーケンス解析

Qubit で測定した各ライブラリーの DNA 濃度を、平均断片長の数値を用いて nM に換算し、それぞれ 4 nM になるように希釈した後に等量ずつ混合した。混合後のサンプル 5 μ L と 0.2N の NaOH 5 μ L を混合し室温で 5 分間インキュベートして変性させ、キット付属の HT1 溶液で希釈し 8 pM に調製した。こうして調製したサンプル 600 μ L を MiSeq V2 500 Cycle Kit (イルミナ) に使用し MiSeq による Run を実施した。

2.10 RNA-seq データ解析

得られたシーケンスデータは、次世代シーケンスデータ解析ソフトウェア CLC Genomics Workbench (キアゲン) を用いて以下の通りに解析した。FASTQ 形式データを Illumina Paired-end リードとしてインポートし、トリミングを行った。quality scores は 0.01 に設定し、その他の設定はデフォルトで行った。次に、*C. glutamicum* 2256 株のゲノム配列へのアノテーション付けを行い、トリミング後のリードをマッピングした。トリミング後のシーケンスデータを読み込み、アノテーショントラックを作成した後、マッピングを行った。転写量の評価は各 CDS、および ncRNA 領域にマッピングされたリード数を、その領域の長さと同サンプルごとの総リード数にて正規化した RPKM 値を用いて行った。

$$\text{RPKM} = \frac{C}{LN}$$

C: マップされたリードの総数
N: リードの総数 (Million)
L: トランスクリプトの長さ (kbase)

2.11 U1A-RBD タンパク質のコリネ型細菌分泌生産および N 末端アミノ酸解析

エレクトロポレーション法により、pPK6-tU1A-RBD を *C. glutamicum* YPS010 株^{84, 85} へ導入し、形質転換体 YPS010/ pPK6-tU1A-RBD 株を取得した。得られた形質転換体を、Km を終濃度 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ で含む MM 液体培地 4 mL に植菌し 30°C で振とう培養した。培養 58 時間後の培養液を遠心分離 (13,800 $\times g$, 2 分) した後、その上清を Mini-UniPrep (孔径 0.45 μm 、GE ヘルスケア) を用いて除菌し培養上清液を調製した。この上清液 4 μL に対して NuPAGE LDS Sample Buffer (4X) 2.5 μL 、NuPAGE Reducing Agent (10X) 1 μL 、水 2.5 μL を加え、総液量 10 μL にした後、70°C で 10 分間熱処理を行ったサンプルを SDS-PAGE により分析した。泳動ゲルは NuPAGE 4-12% Bis-Tris Protein Gels を使用し、泳動後のゲルは SimplyBlue SafeStain (サーモフィッシャーサイエンティフィック) を用いて染色した。また、培養上清タンパク質は Capturem His-Tagged Purification Kit (タカラバイオ) に吸着させ 500 mM イミダゾール溶液で溶出させた。溶出サンプルは、Amicon Ultra centrifugal filters (30 kDa、メルクミリポア) で脱塩濃縮を行い 20 mM TrisHCl (pH 7.1) でバッファー交換し、ゲルシフトアッセイに用いた。タンパク質濃度は Pierce BCA Protein Assay Kit (サーモフィッシャーサイエンティフィック) を使用し、キット付属の牛血清アルブミン (BSA) を標準物質とした。

N 末端アミノ酸解析を行うために、上記の U1A-RBD タンパク質培養サンプル (8 μg 分) の SDS-PAGE を行った後、iBlot 2 Dry system (サーモフィッシャーサイエンティフィック) を用いて PVDF 膜 (孔径 0.2 μm) に転写した。転写後の PVDF 膜は SimplyBlue SafeStain にて染色を行い、バンドを切り出しプロテインシーケンサー PPSQ-33A (島津) を使用しエドマン反応による配列解析を実施した。

2.12 5'-RACE および 3'-RACE

2256L $\Delta rnc/pVC7H2-U1A^*-1$ 株を用いて、試験管培養後の菌体サンプルから TRIzol LS を使用して RNA を抽出し、total RNA 溶液を調製した。調製した total RNA 溶液を用いて非変性 PAGE を行い、泳動後のゲルを核酸染色試薬 SYBR Green II で染色した。トランスイルミネーター CyanoView (アトー) を使用し、染色ゲルから U1A^{*}-RNA バンド (約 160 塩基長) とその低分子量側に位置する副生バンド (U1A^{*}S-RNA、約 110 塩基長) の 2 つの位置を切り出し、メスで細かく切り刻んだ後に、500 μ L TBE 緩衝液 (100 mM Tris, 90 mM boric acid, 1 mM EDTA) に浸し 37°C で 3 時間静置した。その上清を回収し、イソプロパノール沈殿を行い、U1A^{*}-RNA 溶液および U1A^{*}S-RNA 溶液を調製した。ゲル切り出し精製により調製した各々 2 μ g 分の RNA 溶液に対して、Poly(A) Tailing Kit (サーモフィッシャーサイエンティフィック) を用いて RNA 分子の 3'末端に poly(A)付加を行った。その反応溶液を、TRIzol LS を用いて精製した。次に、SMARTer RACE 5'/3' Kit (タカラバイオ) を使用し first-strand cDNA 合成を行い、各々の 5'-RACE 用 cDNA 溶液および 3'-RACE 用 cDNA 溶液を調製した。5'-RACE 断片は 5'-RACE 用プライマー78 を、3'-RACE 断片は 3'-RACE 用プライマー79 を使用し、SMARTer RACE 5'/3' kit プロトコルに従った PCR により取得した。5'-RACE 断片と 3'-RACE 断片は、キット付属のクローニング用線状化プラスミド pRACE と In-Fusion 反応で連結し、U1A^{*}-RNA 分析用の p5'RACE-U1A および p3'RACE-U1A、U1A^{*}S-RNA 分析用の p5'RACE-U1AS および p3'RACE-U1AS の 4 種のプラスミドを取得し、その 4 種に対してプライマー80 と 81 を使用しシーケンス解析を実施した。

2.13 ゲルシフトアッセイ

2.12 で poly(A)付加した U1A*-RNA サンプルに対して、RNA 3'-End Biotinylation kit (サーモフィッシャーサイエンティフィック) でビオチン化修飾を施した。ビオチンラベル化 U1A*-RNA 0.85 ng 分に対して、His-tag 精製した U1A-RBD タンパク質 0.5 ng、5 ng、50 ng 分を混合し、LightShift Chemiluminescent RNA EMSA Kit (サーモフィッシャーサイエンティフィック) を使用し 20 μ L binding buffer (10 mM HEPES (pH 7.3), 20 mM KCl, 1 mM MgCl₂, 1 mM DTT, 5% (v/v) glycerol, 0.1 μ g/ μ L of tRNA) 反応系で 25°C、30 分間反応した。競合阻害サンプルには、ビオチンラベル化 U1A*-RNA の 200 倍のモル濃度の SL-II の合成 RNA (5'-GGGCAUUGCACUCCGCCC-3') を添加した。反応溶液は 6% PAGE で泳動した後、そのゲルを Biodyne B Nylon Membrane (サーモフィッシャーサイエンティフィック) に転写した。転写条件は、0.5 \times TBE 緩衝液を使用し、400 mA で 30 分間行った。転写後のメンブレンは Ultraviolet crosslinker (GE ヘルスケア) を用いて 120 mJ/cm² の UV 照射で固定化した。その後、Chemiluminescent Nucleic Acid Detection Module Kit (サーモフィッシャーサイエンティフィック) を使用し、メンブレン上のビオチンラベル化 RNA を化学発光検出した。

2.14 プラスミドコピー数決定

染色体に関しては DNA 複製に関与する *dnaA* 遺伝子を、pVC7 由来プラスミドに関しては *repA* 遺伝子を選択し、DNA 増幅用のプライマーを設計した。18 時間培養した菌体からプラスミド DNA とゲノム DNA を含む total DNA を抽出し、total DNA 溶液約 5 ng を鋳型として、3 セット (82 と 83、84 と 85、86 と 87) の *dnaA* 遺伝子増幅用プライマーと 3 セット (88 と 89、90 と 91、92 と 93) の *repA* 遺伝子の増幅用プライマーを用い、SYBR Premix Ex Taq (Tli RNaseH Plus) を使用し LightCycler 96 にて qPCR を実施した。また、検量線作成のため pGEM-RD1 プラスミド溶液の 10 倍希釈系列を作製し、*dnaA* 遺伝子と *repA* 遺伝子のコピー数定量用の DNA 量として 1×10^{-14} g から 1×10^{-10} g までの検量線作成用サンプルを調製し、qPCR を行った。pGEM-RD1 の結果を対照区として用いることで、*dnaA* 遺伝子と *repA* 遺伝子の増幅の差を補正し、各々の Cq 値の比を算出することでコピー数を決定した。

2.15 RNA 二次構造予測

RNA 二次構造予測プログラムとして、mfold⁶⁴ および CentroidFold⁸⁶ を使用した。

第3節 結果と考察

3.1 *rnc* 欠損株の構築とその生育評価

C. glutamicum 2256L 株の RNase III 欠損体を作製した。RNase III は、*rnc* 遺伝子にコードされ、二本鎖 RNA を特異的に分解する。既往の研究²⁵で *C. glutamicum* R 株の *rnc* 遺伝子欠損株を作製し、その *rnc* 遺伝子欠損株は生存可能であることが分かっている。*C. glutamicum* 2256L 株において同様に *rnc* 遺伝子欠損体の作製を試みた。*C. glutamicum* 2256L 株に対して、pBS4S- Δrnc を用いて取得した 2 回組換え体について、*rnc* 遺伝子欠損を PCR により確認した。*rnc* 遺伝子領域をコロニー-PCR により増幅して、増幅された DNA 断片の長さを評価した結果、*rnc* 遺伝子非欠損体の増幅 DNA 断片長は約 3 kbp である一方、*rnc* 遺伝子欠損体の増幅 DNA 断片長は約 2 kbp と減少し、*rnc* 遺伝子の欠損が確認された (図 4-9)。その内の 1 株を *rnc* 遺伝子欠損株として選抜し、2256L Δrnc 株と命名した。L 字試験管培養の結果、培養 12 時間の時点で 2256L 株の OD₆₆₀ は 0.62 \pm 0.03 に対して 2256L Δrnc 株の OD₆₆₀ は 0.40 \pm 0.01 と低い値を示すことから、*rnc* 遺伝子欠損することによる若干の生育遅延が確認された (図 4-10A)。また、CM-Dex 培地で試験管系終夜培養した後の細胞形状を、生物顕微鏡 (オリンパス、BX51) を用いて位相差観察したところ、野生型 2256L 株と比較して、2256L Δrnc 株では細胞が伸長しているような形態が確認された (図 4-10B)。 *C. glutamicum* R Δrnc 株においても細胞形状の伸長が確認されており²⁵、*C. glutamicum* 2256L Δrnc 株もそれと同様の形質が備わったことが示された。*rnc* 遺伝子がコードする RNase III は rRNA のプロセッシングに寄与していることから、タンパク質合成系の攪乱が生育遅延や細胞伸長につながっていると考えられる。

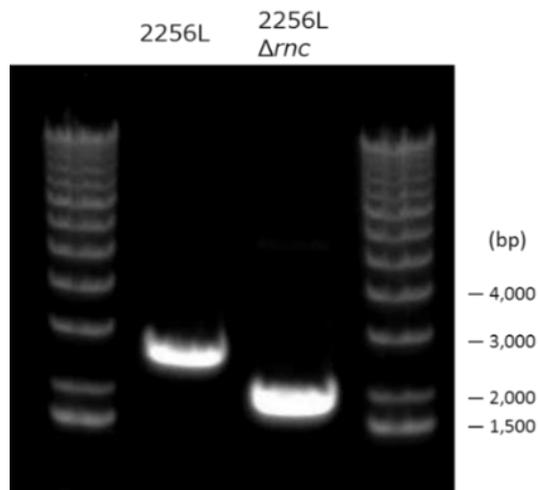


図 4-9 コロニー-PCR 産物のアガロース泳動による *rnc* 遺伝子欠損確認

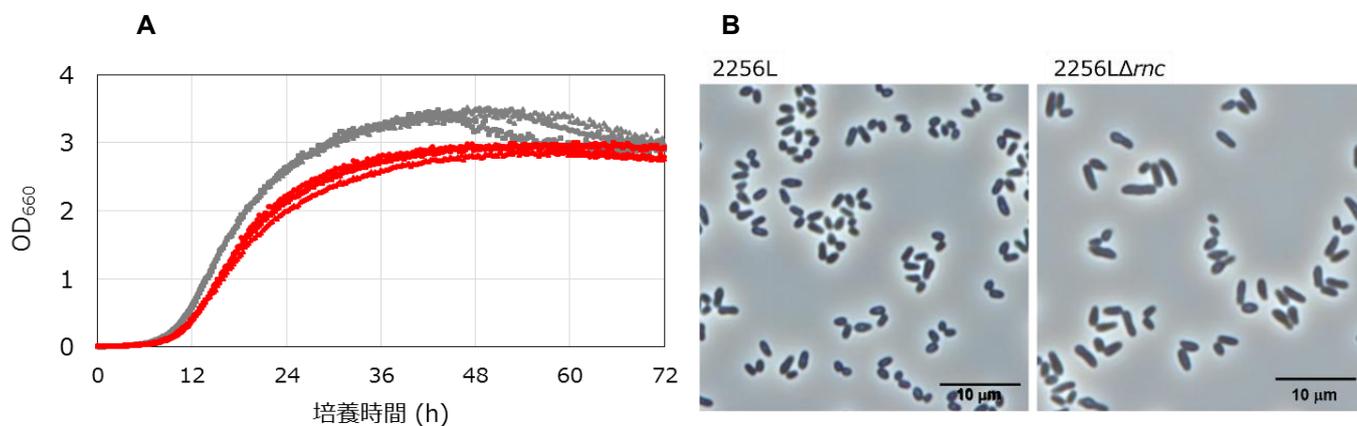


図 4-10 Δrnc 株の生育および細胞形状

(A) 野生株と Δrnc 株の生育曲線。灰色は 2256L 株、赤色は 2256L Δrnc 株の生育曲線を示す。各々3クローンにて、その生育を評価した。(B) 野生株と Δrnc 株の位相差顕微鏡画像。ともに CM-Dex 培地にて培養し、対数増殖後期からのサンプルを、顕微鏡 (オリンパス、BX51) で 1000 倍 (接眼レンズ: $\times 10$ 、対物レンズ: $\times 100$) の倍率にて検鏡した。

3.2 コリネファージ BFK20 由来のプロモーターの利用

コリネ型細菌のプロモーターの中では、*cspB* 遺伝子や *gapA* 遺伝子のプロモーターが、タンパク質生産によく利用されている^{87, 88}。しかし、菌体内での RNA 転写に特化した内在性のプロモーターの検討はされていなかった。また、タンパク質高生産系としては、植物細胞ではカリフラワーモザイクウイルス由来 CaMV プロモーター⁸⁹、動物細胞ではサイトメガロウイルス由来 CMV プロモーター⁹⁰といった、宿主感染し自身の遺伝子産物を優先的に増幅させる感染源由来のプロモーターが使用されることが一般的に多い。これらウイルス由来プロモーターは内在性プロモーターと比較して強力である。そこで、コリネ型細菌に感染するファージのうち、遺伝子解析が進んでいた BFK20 に由来するプロモーターを用いた転写系を構築し、目的 RNA の転写量を評価することにした。

BFK20 由来のプロモーターを選択するにあたっては、先行研究⁷⁸を参考にした。先行研究では、BFK20 ファージ DNA を調製し、制限酵素 *Sau3AI* により断片化されたファージ DNA を、線状化したシャトルベクター (pJUP05 プラスミド⁹¹) に挿入することで DNA ライブラリーが作製されている。pJUP05 は pBL1 由来複製起点を有する *E. coli* - *C. glutamicum* シャトルベクターであり、Km 耐性遺伝子をレポーターとしたプロモーター活性評価用プラスミドである。その BFK20 ファージ断片が組み込まれた DNA ライブラリーに対して、選別されてきた BFK20 断片配列が「F1」「F2」と命名されている。しかしながら、*C. glutamicum* 株を用いてのプロモーター活性強度は評価されていなかった。

Gen Bank データベース上には、F1 配列 (Gen Bank Acc. No. L13772、269 塩基) と F2 配列 (GenBank Acc. No. L13364、451 塩基) が登録されている。F1 配列は、制限酵素 *Sau3AI* で断片化した産物であるはずが、その内部に *Sau3AI* 認識配列が位置しており、別々の *Sau3AI* 断片配列が 2 個連なったものと考えられた。F1 配列の前半部分は gp33 の内部、後半部分は gp43 の C 末端側に位置しており、後者の配列を F1 プロモーター (Pfl) と記すこととした (図 4-11)。F2 配列は、先行研究⁹²によって、プロモーター作用領域が決定されており、そのプロモーター配列を

F2 プロモーター (Pf2) として記すこととした。またデータベース上には、F1 配列や F2 配列とは別に、BFK20 由来プロモーター配列が 1 つ登録 (Gen Bank Acc. No. L20780) されており、本配列を F3 プロモーター (Pf3) と命名した。Pfl は gp43 の C 末側領域、Pf2 は gp19 内領域、そして、Pf3 は gp41 内領域にそれぞれ位置しており、Pfl と Pf3 はファージ増殖初期に、Pf2 はファージ増殖後期に活性化すると考えられる。以上、内在性プロモーターとして *cspB* 遺伝子プロモーター (PcspB) 、BFK20 由来の 3 種のプロモーター Pfl, Pf2, Pf3 を使用し、それらの RNA 転写能を評価することにした。

RNA 生産にあたり、そのモデル RNA として、まずは、ベンサミアナ由来クロロフィル合成関連遺伝子 *chlI* の部分配列 (150 塩基長) を選択し、その領域を、プロモーターとそれに対向する向きと同じプロモーターの間に配することにより、二本鎖 RNA (dsRNA) の生成状況を確認することとした。PcspB、Pfl、Pf2、Pf3 のプロモーター配列を用いた dsRNA 転写用プラスミドを構築し、2256 株及び 2256L Δrnc 株に導入することで各形質転換体を取得した。それらの試験管培養を行い、培養菌体から抽出した total RNA 溶液を用いて非変性 PAGE を実施した。PcspB、Pf2、Pf3 プロモーターを使用した dsRNA 転写用プラスミドの、2256L 株および 2256L Δrnc 株への形質転換株において、rRNA や tRNA といった内在性 RNA 以外のバンドは確認されなかった。Pfl プロモーターを用いた dsRNA 転写用プラスミド pPK4-Pfl-*chlI*-Pflrev 導入株において、2256L 株を用いた場合ではバンドは検出されなかった一方、2256L Δrnc 株を用いた場合では、約 300 塩基対の位置にバンドが確認された (図 4-12A)。*chlI* 配列部分の鎖長は 150 塩基長であったが、Pfl による転写開始点から *chlI* 配列までの距離が 80 塩基長程度あり、その結果として 300 塩基長程度の dsRNA が生成されたと考えられる。すなわち、検出されたバンドは *chlI* 部分配列および Pfl 部分配列のキメラ型 dsRNA であると推察された (図 4-12B)。以上より、Pfl プロモーターによる dsRNA 転写系において、RNA バンドが検出され菌体内で dsRNA の蓄積が起こっていると予想される。BFK20 ファージは自身の成長段階に応じて、タンパク質発現の切り替えが起こるとされており、Pfl 及び Pf3 は増殖初期に、Pf2 は、宿主菌の増殖後期に機能するものと推定される

(図 4-11)。つまり、Pf2 がプロモーターとしての機能が弱かった原因として、宿主 *C. glutamicum* 由来のシグマ因子以外に BFK20 ファージ由来のシグマ因子の存在が必要だった可能性がある。

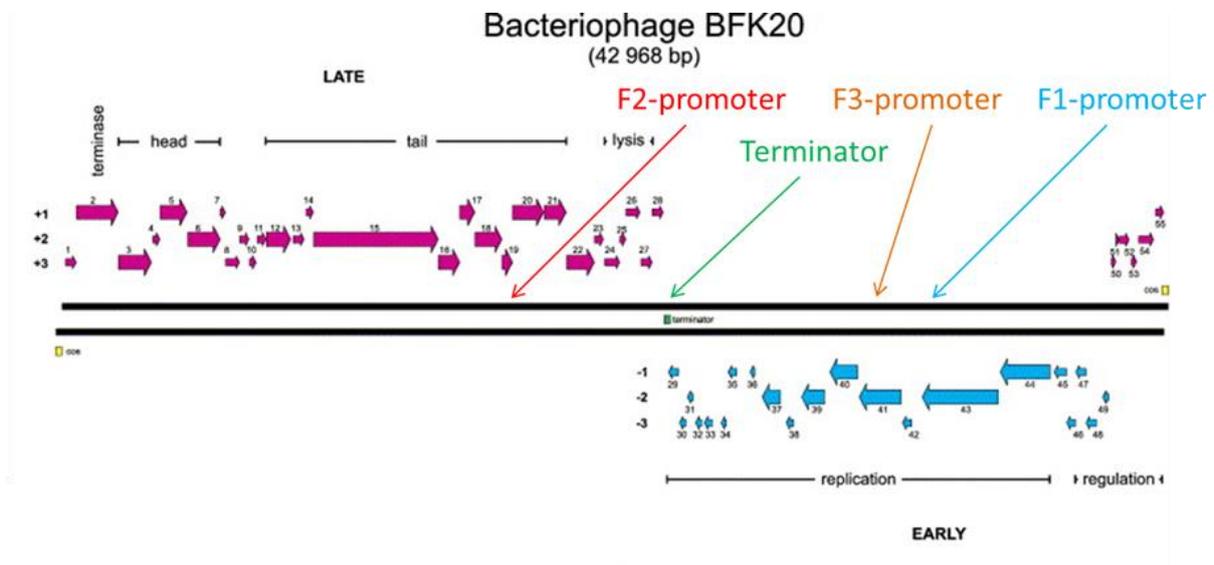


図 4-11 コリネファージ BFK20 のゲノム編成

青矢印は増殖初期、赤矢印は増殖後期に増幅される CDS として決定されている。Pf1、Pf2 および Pf3 のプロモーター配列以外には、これまでにプロモーターとして特定された配列は無かった。

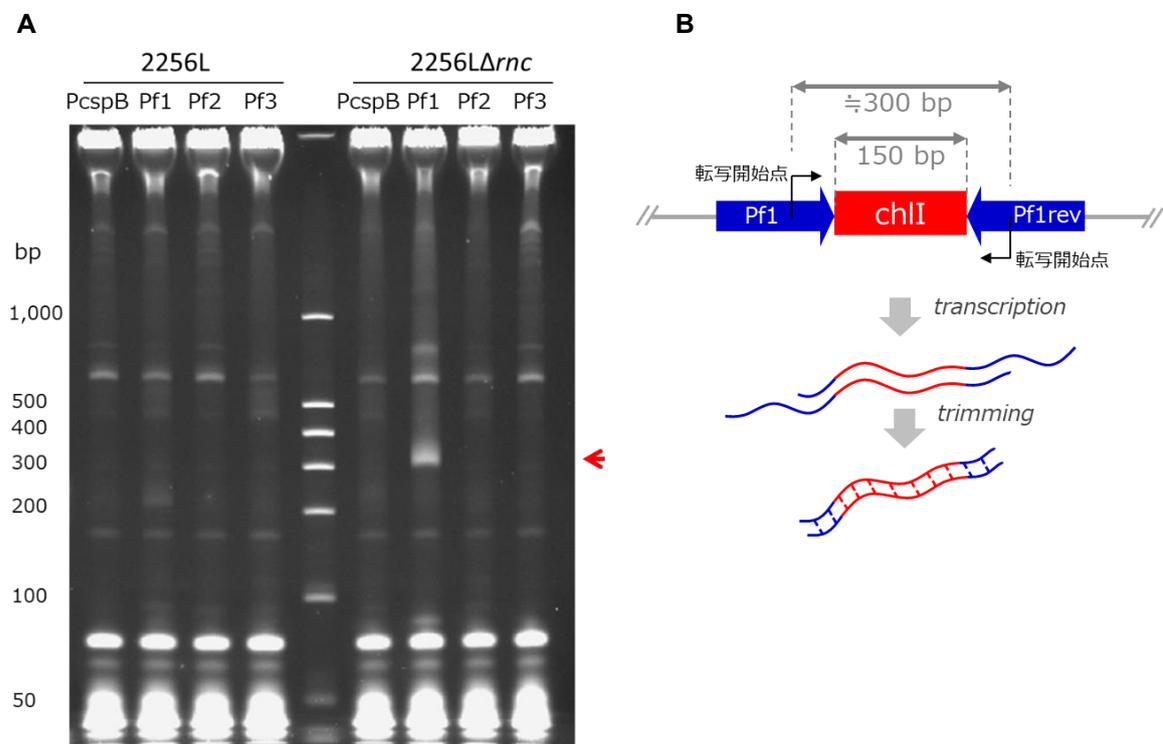


図 4-12 ファージ由来プロモーターの転写活性評価

(A) *chII* 部分配列を発現する各種の発現プラスミドをもつ形質転換株から抽出した total RNA の非変性 PAGE 分析。PcspB: pPK4-PcspB-*chII*-PcspBrev、Pf1: pPK4-Pf1-*chII*-Pf1rev、3: pPK4-Pf2-*chII*-Pf2rev、4: pPK4-Pf3-*chII*-Pf3rev。赤矢印は Pf1 により *chII* 部分配列を含む領域が転写され生成された RNA バンドを示す。(B) Pf1 使用時の *chII* 部分配列の転写予想図。赤色部分は *chII* 部分配列、青色部分は Pf1 領域を含む DNA 断片を示す。二つの Pf1 による対向転写により、双方向から ssRNA 転写が起こり互いに相補的結合をすることで dsRNA が生成されることが予想される。

3.3 U1A*-RNA の転写系構築ならびに Pfl プロモーターの活性評価

次に、一方向からの ssRNA 転写系において、*C. glutamicum* の内在プロモーターと Pfl との比較を行うことにした。対象のモデル RNA として、真核生物での RNA スプライシングに関与する U1A-RNA の部分配列を採用した。シャトルベクター-pPK4 に RNA 発現系として、「各種プロモーター配列 - ヒト由来 U1A-RNA 部分配列 - BFK20 由来ターミネーター」を挿入したものを作製し (図 4-13A)、転写される RNA を U1A*-RNA と命名した。RNA 転写終結に要するターミネーター配列は、 ρ 因子の発現量や発現タイミングの影響を受けない ρ 因子非依存性のターミネーター配列として、コリネ型細菌ファージ BFK20 から抽出したターミネーター配列 (53 塩基長) を使用することにした (図 4-11)。BFK20 ファージが感染したコリネ型細菌内では、転写された RNA がその ρ 因子非依存性ターミネーター配列で転写終結をすることが分かっている。mfold による RNA 二次構造予測の結果から、BFK20 由来ターミネーターは 17 塩基対のステムを形成するヘアピン構造を形成することで、 ρ 因子非依存性の転写終結につながると考えられる (図 4-13A)。転写 RNA のサイズとしては 160 塩基長程度であることが予想された。用いたプロモーターとしては、Pfl 以外に、*cspB* 遺伝子プロモーター (P_{cspB})⁸¹、*gapA* 遺伝子プロモーター (P_{gapA})⁸² の二種類を選定し、比較した。目的 RNA の発現プラスミドを構築した後、*C. glutamicum* 2256L Δrnc 株への形質転換体を取得し、試験管培養を実施した。U1A*-RNA の発現評価を実施したところ、Pfl を使用した場合には、160 塩基長のサイズに特異的 RNA バンドが検出され、他の P_{cspB} や P_{gapA} を使用した場合には、特異的バンドは検出されなかった (図 4-13B)。

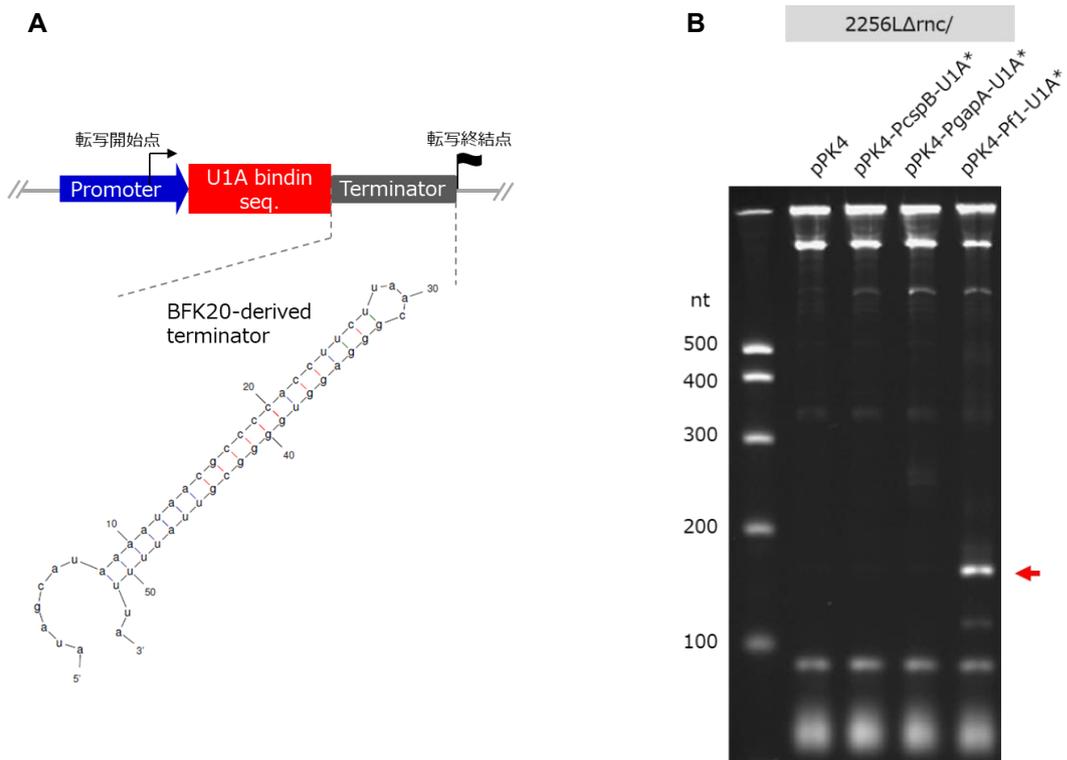


図 4-13 U1A*-RNA の転写

(A) モデルとしての U1A*-RNA の一方向な転写系の概要図。なお、U1A*-RNA は鎖長として約 160 塩基になる。(B) total RNA の非変性 PAGE 分析。赤矢印は Pfl により転写され生成されたと予想される U1A*-RNA バンドを示す。

3.4 *C. glutamicum* 2256L $\Delta rnc/pPK4$ -Pfl-U1A*株のジャーファーマンター培養評価

C. glutamicum 2256L $\Delta rnc/pPK4$ -Pfl-U1A*株の培養時間ごとの U1A*-RNA 蓄積量を調べるため、ジャーファーマンター培養を実施した。培養開始後、各々、8, 12, 24, 30, 33, 36, 48 時間での、OD₆₂₀ ($\times 101$)、グルコース消費量、total RNA 量を調べた (図 4-14)。36 時間の時点でグルコースは完全に消費し、生育が停止したことが確認された。回収した菌体から抽出された total RNA 量は、培養 8 時間時点で最も多く、それ以降徐々に減少する傾向があることが分かった (図 4-14C)。非変性 PAGE の結果から、目的とする U1A*-RNA と思われるバンドは 8 時間時点で検出され、30 時間以降と比較し、顕著な差はみられなかった (図 4-15)。なお、培養開始後 12 時間、24 時間での U1A*-RNA のバンドの乱れは、RNA 抽出時に持ち込まれる培養菌体由来の何らかの夾雑物による影響と推察している。以上の結果から、培養開始後 8 時間、24 時間、36 時間、48 時間後の菌体抽出 total RNA サンプルを用いて RNA-seq に使用することで、強力な転写活性を有するプロモーターを選別することにした。

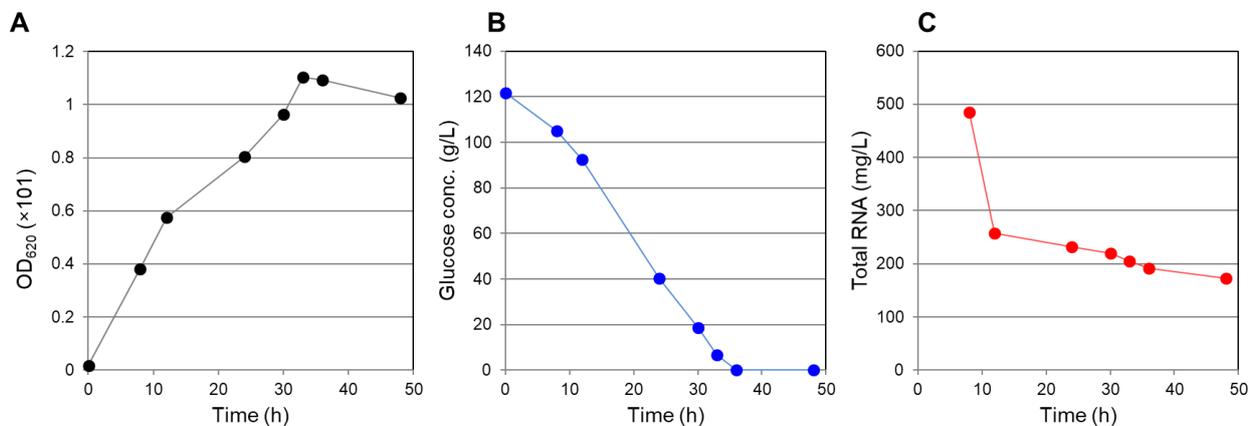


図 4-14 ジャーファーマンター培養時の培養プロファイル

(A) 生育曲線 OD₆₂₀ ($\times 101$) (B) 残存グルコース濃度 (g/L) (C) 培養液 1 L あたりの total RNA 濃度 (mg/L)

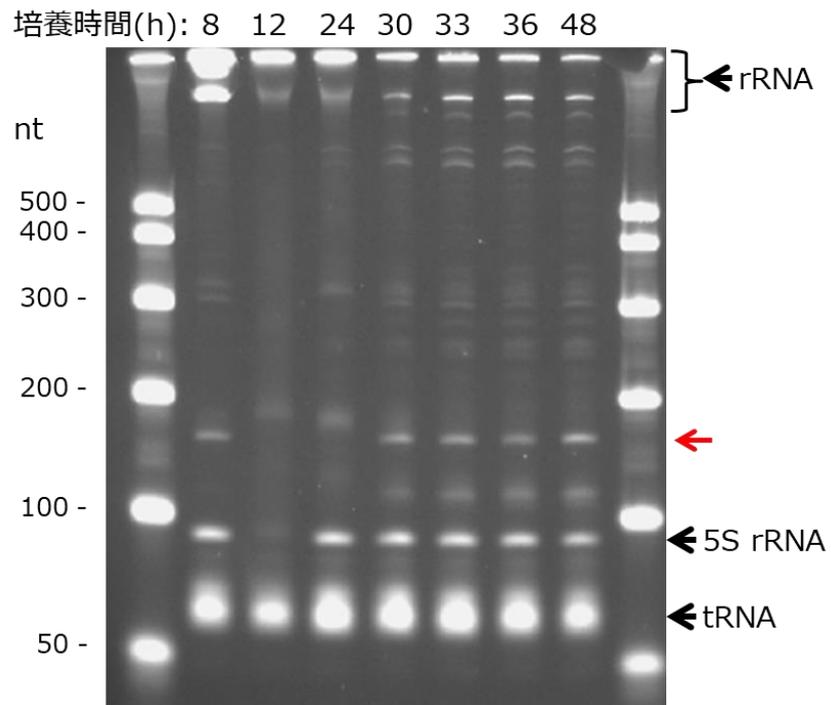


図 4-15 培養経時サンプル抽出 RNA の非変性 PAGE 結果
赤矢印は Pfl により転写され生成されたと予想される UIA*-RNA バンドを示す。

3.5 RNA-seq 解析を用いた強力な内在性プロモーターの選別

既往研究では、菌体内での RNA 転写のみに特化した内在性プロモーターの検討はされていなかった。そこで RNA-seq 解析結果に基づき、強力な転写活性を有するプロモーター候補を抽出し、F1 プロモーター配列との比較を行うことにした。3.4 で取得した培養サンプルから抽出した RNA サンプルを元に、各種調製を行い RNA-seq 解析を行った。本研究で RNA-seq のサンプル調製時に使用した TruSeq Stranded mRNA Sample Preparation Kit (イルミナ) を利用して、シーケンスで得たリードをリファレンスにマップする際に各リードの転写された方向を考慮し、forward と reverse それぞれに特異的なマッピングを行った。得られた各遺伝子の転写量データを表 4-3 に示す。

表 4-3A Forward にマッピングした際の転写量上位の遺伝子

アノテーション名	アノテーション位置	RPKM			
		8h	24h	36h	48h
2256_ncRNA_1161_ex	1470800..1471923	76848	88304	222940	393914
2256_ncRNA_744_ex	956600..957745	175060	273396	249572	315525
Blact2256Rg2918	相補的転写 (2689736..2689909)	69806	26831	33841	9005
Blact2256Rg0322	284770..284973	5045	7770	36593	5866
Blact2256Rg3060	相補的転写 (2819307..2819507)	28212	10587	15994	2158
U1A*-RNA	プラスミド上の目的 RNA 転写関連領域	12366	26728	3055	16612
Blact2256Rg2591	相補的転写 (2395132..2395413)	25837	1202	167	234
Blact2256Rg2744	相補的転写 (2530051..2531664)	25590	15368	21538	1192

表 4-3B Reverse にマッピングした際の転写量上位の遺伝子

アノテーション名	アノテーション位置	RPKM			
		8h	24h	36h	48h
2256_ncRNA_1799_ex	2289300..2289822	637297	846306	791611	953108

転写量の指標である RPKM 値を使用して、転写量の高い発現を示すアノテーションを評価した結果、U1A*-RNA を転写する目的でプラスミド上に搭載した Pfl から転写された RNA よりも RPKM 値が高かった遺伝子が数個抽出された。これら RNA 転写量が多い領域として抽出された遺伝子については Pfl よりも強力な内在性プロモーターにより転写されている可能性があると考えられたため、表 4-3 において赤字で示すアノテーションのプロモーターと思われる領域を、U1A*-RNA のコード領域の上流に挿入し、転写活性を評価することとした。また、rRNA をコードする遺伝子 (*rrn* gene) は一般的に強力なプロモーターによって転写されると言われているため、*rrn* のプロモーターも転写活性評価の対象とした。rRNA 除去の工程を経ずに調製した RNA を用いた RNA-seq の結果 (表 4-4) から、*rrn* gene のうち発現量が高かった 2 個 (Blact2256Rg3607 を *rrn1*、Blact2256Rg3609 を *rrn2* とした) を選び、表 4-4 において赤字で示すアノテーションのプロモーターと思われる領域を、U1A*-RNA のコード領域の上流に挿入し、転写活性を評価することとした。表 4-4 で転写量が多い ncRNA は rRNA 除去を行った表 4-3 の結果では U1A*-RNA より上位に入っていないが、これは rRNA 除去処理により何らかの影響を受けたためと考えられる。

表 4-4 転写量上位遺伝子 (rRNA 除去処理なし、ストランド情報非特異的にマッピング)

アノテーション名	アノテーション位置	説明	RPKM			
			8h	24h	36h	48h
2256_ncRNA_1282	1622939..1626162	-	44843	47528	57415	47171
Blact2256Rg3607 (<i>rrn1</i>)	114954..118044	23S rRNA	43604	17745	56568	44881
2256_ncRNA_2080	2632828..2634277	-	52496	34873	39126	40535
2256_ncRNA_2406	3094626..3096524	-	50623	30206	27710	30513
Blact2256Rg3609 (<i>rrn2</i>)	965379..966903	16S rRNA	34566	23089	33235	40438
U1A*-RNA	プラスミド上の目的 RNA 転写関連領域	-	5041	37037	4825	12021

構築した各 RNA 発現プラスミドを 2256L Δrnc 株に導入し、菌体内の U1A*-RNA 蓄積量を評価した結果を図 4-16 に示す。試験管培養系にて 14 時間後の培養サンプルを回収し total RNA 抽出し、非変性 PAGE 解析を行った。Pfl によって生成される U1A*-RNA 量と比較し、新しく構築した株のうち 4 つのプロモーター Prg0322、PncRNA774、Pnc1161、Prg2918 において、予想される U1A*-RNA に近いサイズと一致するバンド（水色矢印）が確認できた。内在性プロモーターによる転写物のサイズが均一でないのは、使用したプロモーターによる転写開始点から U1A*-RNA 領域までの距離に差異があることや転写 RNA が個々に形成する立体構造の違いによるものと考えられる。3.3 の結果では、PcspB や PgapA のプロモーターでは、U1A*-RNA 転写に由来するバンドは確認できなかったことから、これら 4 つは PcspB や PgapA よりも高いプロモーター活性を有していることが示された。しかし、これら 4 つのプロモーターは、Pfl よりも転写活性の低いプロモーターであることが明らかとなった。RNA-seq の結果で発現量が高かった遺伝子については、本来転写されていた RNA の構造的な安定性が良いためか、あるいは菌体内での結合タンパク質による分解系からの保護により、その蓄積量が高くなっている可能性があり、そのために U1A*-RNA の発現量評価の結果につながらなかったと考えられる。その点、宿主感染し自身の遺伝子産物を優先的に増幅させるファージ由来プロモーターに着目し、コリネファージ BFK20 からプロモーターを選抜するアプローチは、強力なプロモーターの取得に適していたといえる。

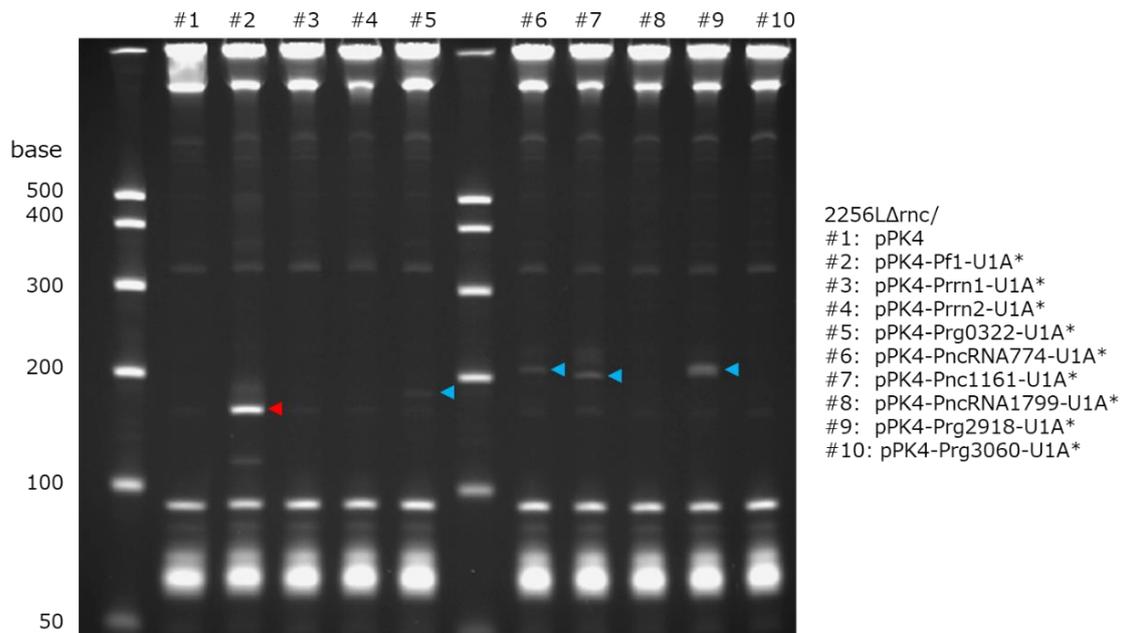


図 4-16 各種のプロモーターによって転写された U1A*-RNA の蓄積量の比較

赤色矢印は Pf1 により転写された U1A*-RNA を、水色矢印は内在性プロモーターにより転写された U1A*-RNA を示す。

3.6 *C. glutamicum* におけるモデル RNA (U1A*-RNA) の発現

Pfl プロモーターを使用した U1A*-RNA 発現系において高コピー数プラスミドを使用することにより転写ユニット数を増加させることで U1A*-RNA 蓄積量が増大するのかを調べた。そのために、U1A*-RNA 発現系を、pVC7 系プラスミドである pVC7N、pVC7H1 または pVC7H2 に導入した pVC7-U1A*-1、pVC7H1-U1A*-1、pVC7H2-U1A*-1 を、pPK4 系プラスミドである pPK4 または pPK4H1 に導入した pPK4-U1A*-1、pPK4H1-U1A*-1 を構築した。*C. glutamicum* 2256L 株または 2256L Δrnc 株の各形質転換株を取得し、その培養菌体における U1A*-RNA の蓄積状況を分析した (図 4-17)。2256L/pVC7-U1A*-1 株では U1A*-RNA のバンドは検出されない一方で、*rnc* 遺伝子を欠損した 2256L Δrnc /pVC7-U1A*-1 株では U1A*-RNA のバンドが検出された。U1A*-RNA は分子内結合を行うことでヘアピン構造を含む二本鎖 RNA 構造 (図 4-1) を形成すると予測され、二本鎖 RNA 分解酵素をコードする *rnc* 遺伝子の欠損は U1A*-RNA の安定化に寄与すると考えられる。また、より高コピー数プラスミドを使用した pVC7H1-U1A*-1、pVC7H2-U1A*-1、pPK4H1-U1A*-1 の場合、pVC7-U1A*-1 と比較し、U1A*-RNA のバンドは増加し、内在性 RNA である 5S、16S、23S rRNA や tRNA よりも明瞭なバンドとして検出され、著量の U1A*-RNA が菌体内に蓄積していることが示された。第 2 章および第 3 章で測定したプラスミドのコピー数と、それに対応するプラスミドから転写された U1A*-RNA 蓄積量の相関係数を算出したところ 0.66 となり正の相関を示すことが分かった。

また、PAGE 上に、U1A*-RNA バンド (約 160 塩基長) とは別に、低分子量側に位置する約 110 塩基長のバンドが確認された。このバンドは、U1A*-RNA よりも少量で、U1A*-RNA の増減に比例することから、内在性 RNA 由来ではなく U1A*-RNA 由来バンド (U1A*S-RNA) であると推測された。

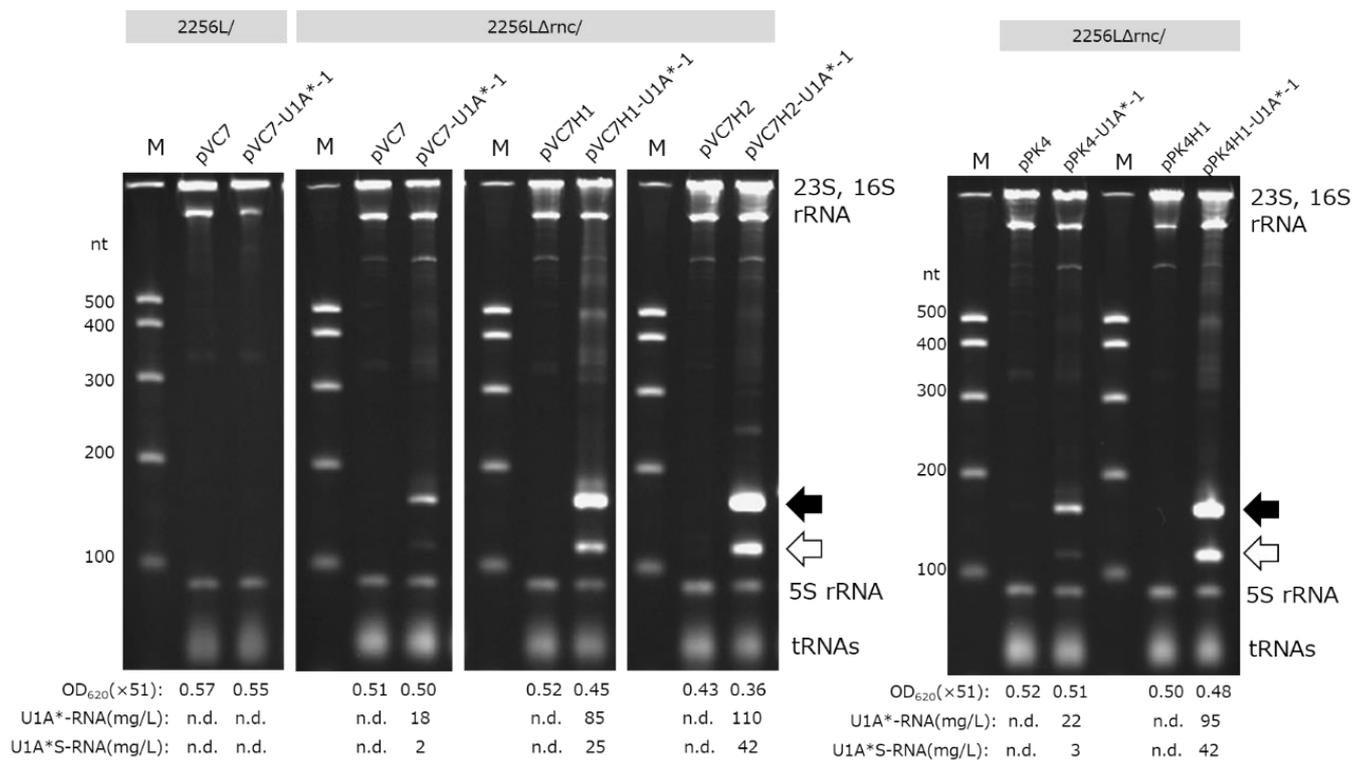
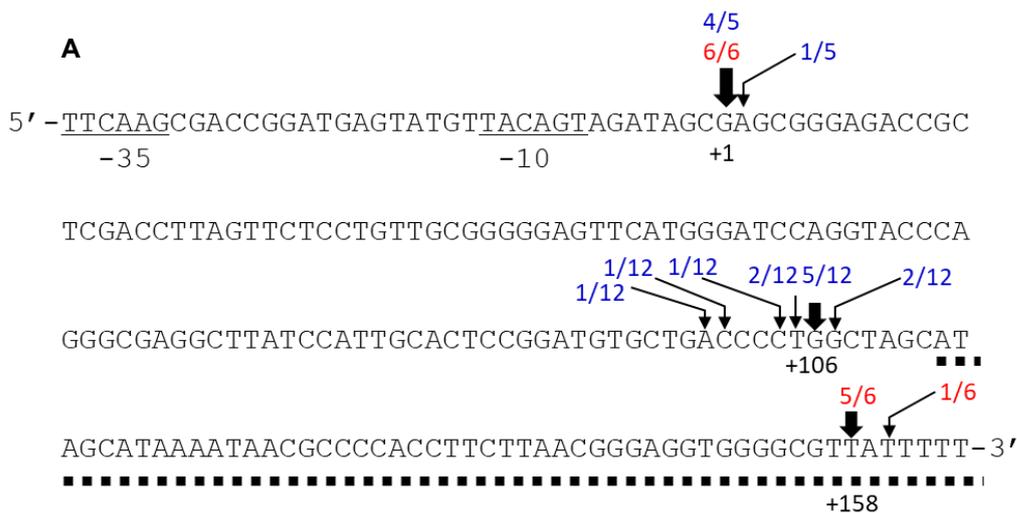


図 4-17 高コピー数プラスミド使用時の U1A*-RNA の生産

各種株を試験管にて培養したのち、菌体から抽出した total RNA の非変性 PAGE 分析を行った。非変性 PAGE 結果の下には、培養サンプルを 51 倍希釈した時の OD₆₂₀ の値 (OD₆₂₀ (×51))、U1A*-RNA と U1A*S-RNA の生産量を示す。レーン M は ssRNA マーカーであり、本マーカーのバンド強度を元に定量を行った。U1A*-RNA に相当するバンドを黒矢印、U1A*-RNA 由来と考えられるバンド (U1A*S-RNA) を白矢印で示す。n.d. はバンドとして検出されず定量出来なかったことを意味する。細胞を構成する代表的な内在性 RNA として、23S, 16S rRNAs、5S rRNA と tRNAs のバンドの位置も記す。

3.7 生産 RNA の構造解析

U1A*-RNA とその副生物と考えられる U1A*S-RNA を、5'- & 3'-RACE 法に基づき、5'末端および 3'末端の構造解析を実施した。5'-RACE 解析の結果、U1A*-RNA の 5'末端は転写開始点と推定される G であった (図 4-18A) 。3'-RACE 解析の結果、U1A*-RNA の 3'末端ではターミネーター配列のステムループ構造形成後の UU で終結 (図 4-18B) しており ρ 因子非依存的終結が起こっている。したがって、U1A*-RNA は設計通りに転写開始から転写終結が起こっていることが示された。U1A*S-RNA の 5'末端は U1A*-RNA と同様に転写開始点は G である一方、3'末端は U1A*-RNA と異なりターミネーター配列の前であることが明らかになった。つまり、U1A*S-RNA は U1A*-RNA の 3'側の 50、60 塩基程度が欠如した RNA であり、U1A*-RNA の鎖長は 158~160 塩基であるのに対して、U1A*S-RNA は 99~107 塩基であることが示された。U1A*S-RNA の転写終結位置近傍に、ターミネーター配列以外に転写終結をもたらす配列は見当たらないため、U1A*-RNA が生成された後、内在性エンド型 RNase により分解を受け U1A*S-RNA が生成されていると考えられる。



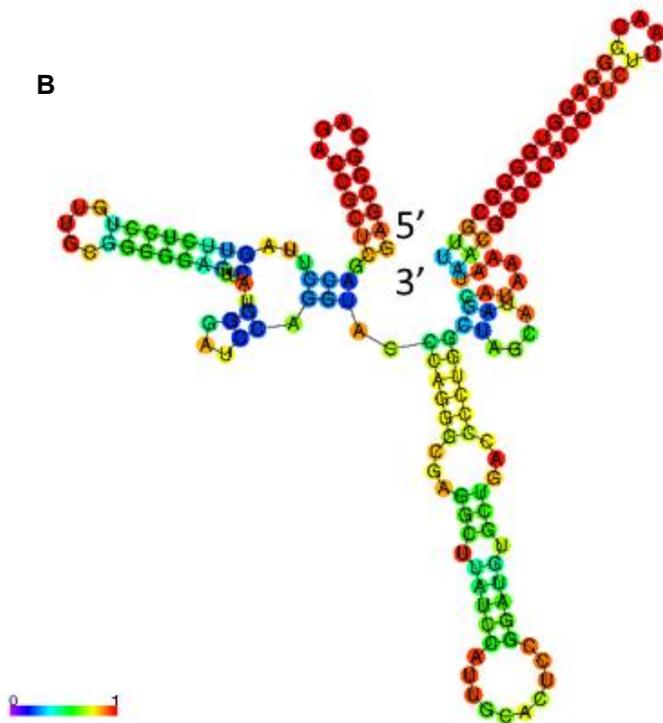


図 4-18 コリネ型細菌により生産された U1A*-RNA 構造解析

(A) RACE 法により決定された U1A*-RNA および U1A*S-RNA の 5'末端と 3'末端の位置の説明図。U1A*-RNA の末端位置を赤字、U1A*S-RNA の末端位置を青字で記し、例えば 4/5 は、調べた転写産物 5 個の内、4 つがそこに位置することを意味する。Pfl 配列の-10 領域および-35 領域を下線で、ターミネーター配列は点下線で示し、転写開始点は+1 で表記した。(B) CentroidFold により予測される U1A*-RNA 二次構造。塩基の色付けは、結合の強弱 (青色は結合が弱く、赤色は結合が強い) を示す。

3.8 U1A*-RNA と U1A 結合タンパク質との結合活性評価

コリネ型細菌により生産した組換え U1A*-RNA が特異的タンパク質結合能を有するか確認するため、ゲルシフトアッセイ法によって U1A*-RNA と U1A 結合タンパク質 (U1A-RBD) の結合活性を評価した。まず、コリネ型細菌タンパク質分泌系 (Tat 系) を用いて、プロ体グルタミナーゼ (pro-PG) と U1A-RBD との融合型 U1A-RBD タンパク質を調製した。pro-PG は TorA シグナルペプチドを介した Tat 輸送系によって分泌発現可能であり⁸⁴、その分泌過程でシグナル配列部分が切除され、活性型 PG が形成される。発現プラスミド pPK6-tU1A-RBD で形質転換した *C. glutamicum* YPS010 株の培養上清画分を SDS-PAGE 分析した結果、融合型 U1A-RBD タンパク質の推定分子量 49.1 の位置にバンドが確認された (図 4-19A)。また、His-tag 精製サンプルを使用し、N 末端アミノ酸解析を実施したところ、pro-PG タンパク質の最初の 5 残基 Asp-Ser-Asn-Gly-Asn が同定された。以上のことから、分泌過程で TorA シグナル配列が正しく切断された設計通りの融合型 U1A-RBD タンパク質が得られた。

精製後の融合型 U1A-RBD タンパク質を用いて、ゲルシフトアッセイ法によって *C. glutamicum* で生産した組換え U1A*-RNA の結合活性を評価した。試験管反応系で生産した U1A*-RNA に対して、融合型 U1A-RBD タンパク質を添加することで、その複合体と思われるバンドが検出されることから、U1A*-RNA は U1A-RBD タンパク質と結合することが分かった (図 4-19B)。また、競合阻害用 RNA として SL-II の化学合成 RNA を過剰量添加したところ、その組換え U1A*-RNA と U1A-RBD タンパク質との結合が抑制されることから、その結合は特異的であることが示された。本研究において、*C. glutamicum* で生産した組換え RNA が、期待通り RNA 結合タンパク質との特異的結合能を有することを初めて実証した。このことから、*C. glutamicum* を宿主とした RNA 生産系において、望みの機能性を有する組換え RNA を生成出来ることが明らかとなった。

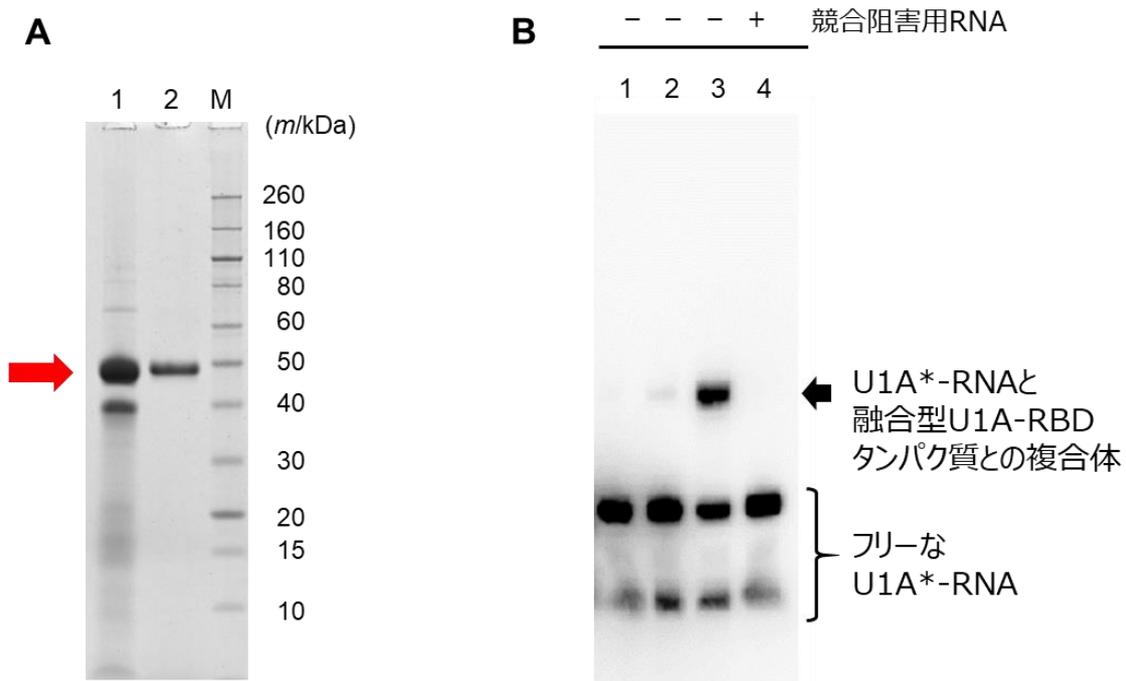


図 4-19 U1A*-RNA と U1A-RBD との特異的相互作用検出

(A) コリネ型細菌による融合型 U1A*-RBD タンパク質分泌サンプルの SDS-PAGE 分析。YPS010/pPK6-tU1A-RBD 株の培養上清サンプル (lane 1) および培養上清を His-tag 精製したサンプル (lane 2) を泳動した。赤矢印は融合型 U1A-RBD タンパク質バンドを示す。(B) EMSA 法による U1A*-RNA と U1A-RBD タンパク質との結合解析。U1A*-RNA の EMSA 分析として、His-tag 精製後の融合型 U1A-RBD タンパク質を 110 pM (lane 1) 、1.1 nM (lane 2) 、11 nM (lane 3) 、11 nM および U1A*-RNA の 200 倍量相当の競合阻害用 SL-II RNA (lane 4) を使用した。U1A*-RNA はビオチンでラベル化してあり、ビオチンラベル化 RNA を化学発光検出した。

3.9 ジャーファーマンター培養による U1A*-RNA 過剰生産

試験管培養系で U1A*-RNA 生産菌の培養評価を行い、2256L $\Delta rnc/pVC7H2-U1A^*-1$ 株では目的とする U1A*-RNA は培養液あたり 100 mg/L を超える高い生産性を示した。一般的に、試験管培養系では通気量や pH を制御することが出来ず、培養後半の培地中では溶存酸素は枯渇している。細胞内の RNA 合成では、グルコースの好氣的代謝で生産される ATP を消費することから、溶存酸素濃度を維持した培養が適すと考えられる。ジャーファーマンターを使用した培養では、温度、通気量、攪拌速度、pH といった培養条件を制御することができる。U1A*-RNA の更なる生産性向上を目指し、ジャーファーマンターを用いた U1A*-RNA 生産菌の培養評価を行った。試験管培養系において、U1A*-RNA 生産量が一番多かった pVC7H2-U1A*-1 を選んだ。コントロールとしては 2256L $\Delta rnc/pVC7H2$ 株を選択した。ジャーファーマンター培養の結果から、コントロール株と U1A*-RNA 生産株 2256L $\Delta rnc/pVC7H2-U1A^*-1$ は同じ生育曲線を示したことから、U1A*-RNA 蓄積は菌の生育に影響を与えないことが分かった (図 4-20A)。U1A*-RNA 生産量は対数増殖期後半まで増加し、培養 24 時間後には培養液あたり 308 ± 4 mg/L に達することが分かった (図 4-20B、表 4-6)。培養 24 時間以降は U1A*-RNA 蓄積量は増加せずに、培養 42 時間には U1A*-RNA を含めた total RNA が減少しており RNase III 以外の RNase による分解の影響を受けていることが考えられた。

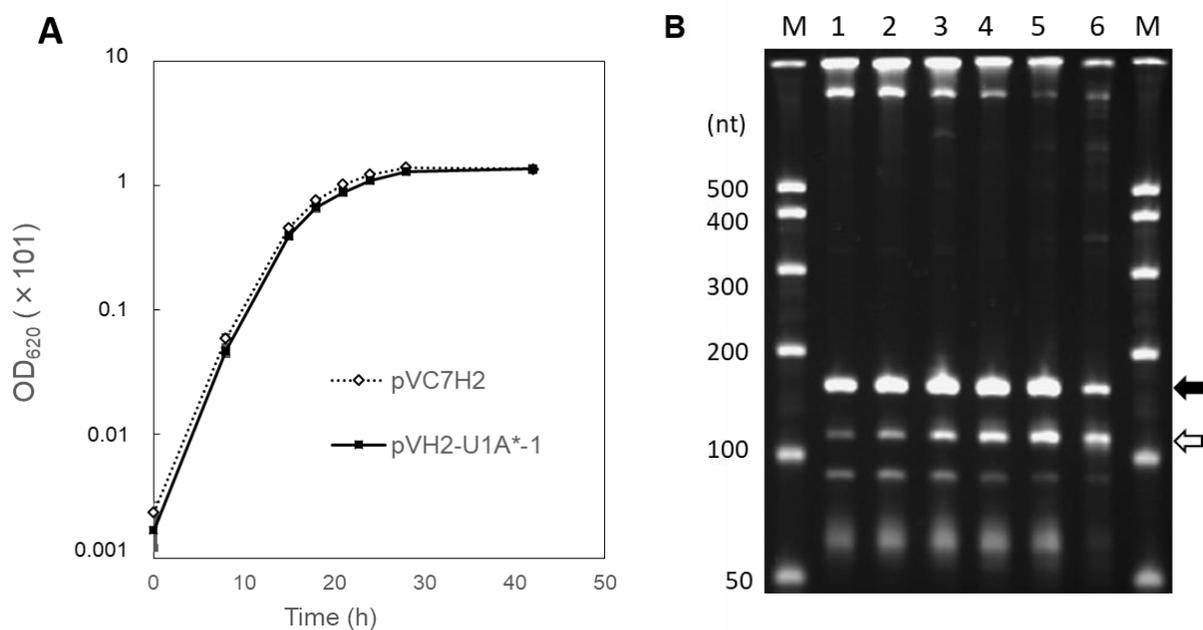


図 4-20 U1A*-RNA 生産菌のジャーフェンター培養評価

(A) 2256L Δ rnc/pVC7H2 株および 2256L Δ rnc/pVC7H2 -U1A*-1 株の生育曲線。平均値と標準偏差は 3 回の実験値から算出した。エラーバーは小さく図示出来なかった。(B) 各培養時間での 2256L Δ rnc/pVC7H2 -U1A*-1 株培養サンプルから抽出した total RNA の PAGE 分析。lane 1 は培養 15 時間、lane 2 は培養 18 時間、lane 3 は培養 21 時間、lane 4 は培養 24 時間、lane 5 は培養 28 時間、lane 6 は培養 42 時間のサンプルである。U1A*-RNA に相当するバンドを黒矢印、U1A*S-RNA を白矢印で示す。

表 4-6 2256L Δ rnc/pVC7H2 -U1A*-1 株のジャーフェンター培養時の total U1A*-RNA 量と total RNA 量

培養時間 (h)	total U1A*-RNA 量 (mg/L) ^a	total RNA 量 (mg/L) ^a
15	183 ± 9	608 ± 9
18	220 ± 4	784 ± 14
21	258 ± 13	771 ± 25
24	308 ± 4	673 ± 10
28	308 ± 8	548 ± 2
42	111 ± 7	275 ± 13

^a 平均値と標準偏差は 3 回の実験値から算出。

第4節 結言

本研究で確立した *C. glutamicum* を宿主とした RNA 生産技術では、強力なプロモーターとして コリネ型細菌ファージ由来 Pfl を使用することにより、T7 RNA ポリメラーゼといった外来のポリメラーゼを使用することなく、目的とする U1A*-RNA の生産量を非変性 PAGE で検出可能なレベルまで増強することが出来た。本生産系では、コリネ型細菌の内在性 RNA ポリメラーゼを使用するため、IPTG 等の誘導剤の使用は必要なく、菌体増殖と連動した目的 RNA 生産が可能である。

さらに、高コピー数化プラスミドを利用することにより、RNA 転写ユニット数を増加し、目的 U1A*-RNA の生産性を向上することができた。構造解析の結果からは、U1A*-RNA は設計通りに転写開始と終結が起きた一方、副生物として U1A*S-RNA も生じており、3'側のターミネーター配列の欠損により短縮化していることが分かった。ターミネーター配列直前で切断が起こっていることから、RNase III 以外の RNase がその分解に関与している可能性が考えられる。したがって、RNase の活性を低下させる、または遺伝子欠損するという育種戦略が目的 RNA 生産量のさらなる向上に寄与すると考えられる。生産した組換え U1A*-RNA は、U1A-RBD タンパク質との特異的結合能を有しており、期待通りの機能を有することが示された。*C. glutamicum* による組換え RNA 生産において、機能性を有した RNA 分子を合成できることが分かった。

ジャーファーメンターを用いて RNA 生産菌の培養を評価したところ、試験管培養系と比較し U1A*-RNA 生産量は 2 倍程度に向上し、培養 24 時間で培養液あたり約 300 mg/L に達した。RNA の蓄積量は、その目的 RNA の塩基配列に依存するが、この成績は既知の組換え RNA 生産成績である数十 mg/L と比較し、大幅に向上している。興味深いことに、約 300 mg/L 程度の U1A*-RNA 蓄積自体は菌の生育には影響を与えなかったことから、さらなる目的 RNA 高発現化に向けて、育種や培養条件の面で改良が可能であるといえる。

第 5 章

組換え二本鎖 RNA 生産菌の構築ならびに
その摂食による標的害虫の生育抑制効果

第1節 緒言

農作物栽培のため、多くの化学農薬が使用されている一方で、益虫や土壌細菌叢への影響や殺虫剤耐性を持った害虫の出現など、様々な生態系への悪影響が出ている⁹³。したがって、従来の化学農薬に代わる環境に低負荷な害虫駆除方法の開発が望まれており、RNAは害虫防除の候補として注目されている。標的害虫の生育に必須な遺伝子に対する二本鎖RNA (dsRNA) が細胞内に取り込まれることでRNA干渉 (RNAi) を誘導し、その遺伝子の発現が抑制されると、害虫の成長は阻害される。このような機能を持つRNA分子は、RNA殺虫剤またはRNA農業資材と名付けられている^{31, 94}。これまでにRNA農業資材のモデル害虫としてニジュウヤホシテントウ *Henosepilachna vigintioctopunctata* が選択され、この害虫に対するRNAiのdsRNAの影響が研究されてきた³⁴。アポトーシス阻害タンパク質をコードする *diap1* 遺伝子を標的としたdsRNAを酵素法で合成し、ニジュウヤホシテントウ幼虫に投与すると効果的な生育阻害効果を得られることが報告されている。*diap1* 遺伝子は、プログラム細胞死 (PCD) を誘導するカスパーゼと相互作用しPCDプロセスの重要な機能を果たすため、DIAP1機能の抑制は細胞死を誘導する。

dsRNA生産法は、酵素法または *E. coli* を宿主とした微生物による製造法が主流であるが、これらは、製造コストが高いという点で農業での実用化における課題をかかえていた。酵素法は、大量合成に不向きであり、酵素や反応基質が高価であり、*E. coli* を宿主とした微生物による製造法では、dsRNAの生産性が低いためその製造コストも高くなっていた。第4章では、コリネ型細菌を宿主とした組換えRNA製造法を新しく構築し、1本鎖RNAの大量生産系の確立について述べた。本章では、農業資材として実用化が期待されるdsRNAについても高効率な転写系を構築した。

微生物で生産したdsRNAを製剤化し害虫投与するためには、dsRNAの構造安定性とdsRNAを抽出する際のコストが課題と考えられる。抽出工程を省略しdsRNA生産菌を菌体ごと利用することが出来ればコスト削減につながる一方で、dsRNA生産菌を生菌のまま利用することは遺伝子組換え体の環境漏洩として生態系への悪影響が懸念される。そこで、本研究ではdsRNA発現菌

体をアルコール処理（特にエタノール処理）によって殺菌すると同時に菌体内に dsRNA を安定に保持させる手法を考案し、その手法によって調製した dsRNA 生産菌の死菌体を害虫に投与することの有効性を実証することにした。

第2節 方法

2.1 使用菌株、プラスミド、プライマー

2.1.1 菌株

本章で使用した菌株およびプラスミドは表 5-1 に示す通りである。

表 5-1 菌株とプラスミド

菌株とプラスミド	説明	薬剤耐性	引用・入手先
Strains			
<i>C. glutamicum</i> 2256L	2256株からpAM330を脱落させた株	—	第2章
<i>C. glutamicum</i> 2256LΔ <i>rnc</i>	2256L株の <i>rnc</i> 遺伝子欠損株	—	第4章
<i>E. coli</i> JM109	<i>endA1</i> , <i>recA1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>thi-1</i> , <i>hsdR17</i> (<i>rk-</i> , <i>mk+</i>), <i>relA1</i> , <i>supE44</i> , λ - Δ (<i>lac-proAB</i>), F' [<i>traD36</i> , <i>proAB+</i> , <i>lacI^q</i> , <i>lacZ</i> ΔM15]	—	タカラバイオ
Plasmids			
pVC7N	pHSG399(タカラバイオ)とpAM330を結合し構築した <i>E. coli</i> - コリネ型細菌シャトルベクターで、正確な配列情報に更新したpVC7系プラスミド。GenBank Acc. No.: LC425431。	Cm	第2章
pVC7H2	pVC7の1塩基置換(C1172G)変異体で、コリネ型細菌内での高コピー数化する形質を獲得したプラスミド	Cm	第2章
pVC7-Pf1rev	pVC7N上にCm耐性遺伝子に対向する位置にF1プロモーターを配置したプラスミド	Cm	本研究
pVC7-KpnI-XhoI-Pf1rev	pVC7-Pf1rev上のF1プロモーター転写開始点直下に制限酵素KpnI認識配列および制限酵素XhoI認識配列を挿入したプラスミド	Cm	本研究
pVC7-Pf1-Hviap	pVC7N上にF1プロモーター(Pf1)と <i>Hv-diap1</i> 遺伝子由来配列を配置したプラスミド	Cm	本研究
pVC7-Hviap	pVC7Nにおいて対合するF1プロモーター間に <i>Hv-diap1</i> 遺伝子由来配列を配置したプラスミド	Cm	本研究
pVC7H1-Hviap	pVC7-Hviapを鋳型とした部位特異的変異導入により1塩基置換(C1172A)した高コピー数化プラスミド	Cm	本研究
pVC7H2-Hviap	pVC7-Hviapを鋳型とした部位特異的変異導入により1塩基置換(C1172G)した高コピー数化プラスミド	Cm	本研究

2.1.2 プライマー

本章では表 5-2 に記載の DNA プライマーと DNA 配列を使用した。

表 5-2 使用プライマーと DNA 配列

プライマー名または配列名	用途	塩基配列 (5'-3')	配列番号
[pVC7-Hviapプラスミド構築]			
Pfl	F1プロモーター配列	GATCTACTCGTTACTCAAGGCAAGCTCGAGCGGGACGGTCGAAC CAGCTTCAAGCGACCCGGATGAGTATGTTACAGTAGATAGCGAGC GGGAGACCGCTCGACCTTAGTTCTCCTGTTGCGGGGGAGTTCAT GGGATCC	1
Pfl_-XhoI site	F1プロモーター配列から制限酵素XhoI認識配列を除いた配列	GATCTACTCGTTACTCAAGGCAAGCTCGAGCGGGACGGTCGAAC CAGCTTCAAGCGACCCGGATGAGTATGTTACAGTAGATAGCGAGC GGGAGACCGCTCGACCTTAGTTCTCCTGTTGCGGGGGAGTTCAT GGGATCC	2
Pflrev_IF-F	F1プロモーター増幅用	ACGGTTCCTGGCCTTGATCTACTCGTTACTCAAGGC	3
Pflrev_IF-R	F1プロモーター増幅用	TAGGCACCCAGGCTTCGCTATCTACTGTAACATACTC	4
pVC7_F	pVC7プラスミド増幅用	AAGGCCAGGAACCGTAAAAAG	5
pVC7_R	pVC7プラスミド増幅用	AGCCTGGGGTGCCTAATGAG	6
pVC7-Pflrev_KpnI-XhoI-F	KpnI, XhoIの認識配列挿入用	GGTACCGGATCCCTCGAGTCGCTATCTACTGTAACATACTC	7
Hv-diap	<i>H. vigintioctopunctata</i> 由来 <i>diap</i> 遺伝子の部分配列	CCTCGGAATCGGCGACCAGACGTTGTGCTTCTACTGCGGCGGCG GTCTGAAAGATTGGGTGCAAGAAGACGATCCGTGGGAACAGCAC GCGCTTTGGTTCCCCAGTGAATTATCTATTATTGAAGAAAAC ACCCGCTTTCGTCAAAGACGTCCAAGAAAAACATAAAGGCGATT TGTCTCATCCAAGCAAAACGAGACCGAAGTGGTAGCAAGTAGT AGCAGTAGTCACAACCTCAAAGAATCTCCAAGTGGGTGGTAGA AGAGCGAGAAAAGAAAACAACGAGAGGAAAGCTCGACATTATGCA AAATATGTTATAAAAATGAATTGGCTGTTGTATTTCTA	8
Pfl_IF-F	F1プロモーター増幅用	TAGGCACCCAGGCTGATCTACTCGTTACTCAAGGC	9
Pfl_R	F1プロモーター増幅用	TCGCTATCTACTGTAACATACTC	10
Hviap_IF-F	Hv-diap配列増幅用	TACAGTAGATAGCGACCTCGGAATCGGCGACCAG	11
Hviap_R	Hv-diap配列増幅用	TAGAAATACAACAGCCAATTC	12
pVC7(Pfl-Hviap)_F	pVC7-Pfl-Hviap構築用	GCTGTTGTATTTCTAAAGGCCAGGAACCGTAAAAAG	13
Pfl-Hviap_KpnI-F	KpnI認識配列挿入用	CCAGGTACCGATCTACTCGTTACTCAAGGC	14
Pfl-Hviap_XhoI-F	XhoI認識配列挿入用	CGAACTCGAGTAGAAATACAACAGCCAATTC	15
[pVC7H1-Hviap、pVC7H2-Hviapプラスミド構築]			
pVC7(C1172A)_F	pVC7-Hviapプラスミドの1塩基置換(C1172A)用	AAACTCATATGCACGGGGGCCACATAAC	16
pVC7(C1172G)_F	pVC7-Hviapプラスミドの1塩基置換(C1172G)用	GAACTCATATGCACGGGGGCCACATAAC	17
pVC7(C1172)_R	pVC7-Hviapプラスミドの1塩基置換用	GTAGCTCGCACGGGGGTTTGTCTTG	18
[RT-PCR用プライマー]			
RT-PCR_F	Hv-diap部分配列増幅用	CGCTTTGGTTCCCCAGTG	19
RT-PCR_R	Hv-diap部分配列増幅用	TAGAAATACAACAGCCAATTC	20
[qPCR用プライマー]			
rp49 qPCR_F	<i>rp49</i> 遺伝子断片増幅用	ATAGGGTTAGAAGACGTTTCAAGGG	21
rp49 qPCR_R	<i>rp49</i> 遺伝子断片増幅用	CTTCCAATTCTCTGACATTATGCAC	22
diap qPCR_F	<i>diap</i> 遺伝子断片増幅用	ATTGAATTTGGCAAGCATGAGGACA	23
diap qPCR_R	<i>diap</i> 遺伝子断片増幅用	CAGTAGTACGTCGAAGTGTCTAGTGA	24

2.2 培養条件

プラスミド構築のために用いた *E. coli* JM109 株の形質転換株の培養は、LB 培地を用いた。必要に応じて寒天 15 g/L、抗生物質としてクロラムフェニコール (Cm) を 25 µg/mL の終濃度となるよう添加した。培養は 37°C で実施し、液体培養の場合 120 rpm で 12 時間振とうを行った。*C. glutamicum* の試験管培養は、CM-Dex 培地を使用した。必要に応じて寒天 20 g/L、抗生物質として Cm を 5 µg/mL の終濃度となるよう添加した。培養は 30°C で実施した。*C. glutamicum* の形質転換はエレクトロポレーション法にて実施した。菌株培養評価は試験管培養系で行い、必要な抗生物質を含む CM-Dex 培地 2 mL に対し、プレートに生えてきた菌体を白エーゼ (ループ容積 1 µL) 摺り切り 1 かき分を植菌して 30°C、120 rpm で 18 時間振とう培養を行った。

ジャーファーメンター培養は、CM-Dex 培地プレートに生えてきた菌体を青エーゼ (Nunc、ループ容積 10 µL) 摺り切り 5 かき分をメイン培地 5 mL に懸濁した。その懸濁液 5 mL をメイン培地 300 mL に接種し、1 L 容量培養装置にて培養を実施した。培養温度 30°C、培養 pH 7、培養開始時は攪拌速度 650 rpm でその後は溶存酸素濃度を 5%以上に保つよう攪拌速度を制御し、培養 pH 7.0 になるようにアンモニアガスで制御し、培養液量あたりの通気量 (vvm) として 1/2 vvm に制御して培養を行った。

2.3 プラスミドの構築

2.3.1 pVC7-Hviap の構築

F1 プロモーター配列 1 の内部の XhoI 制限酵素サイトを除去した F1 プロモーター配列 (—XhoI サイト) 2 は人工遺伝子合成品としてユーロフィンより購入した。F1 プロモーター配列の増幅断片は、その人工遺伝子合成品 2 を鋳型とし、プライマー 3 と 4 を使用して PrimeSTAR HS を用いた PCR により取得した (図 5-1)。pVC7N ベクター断片は、pVC7N を鋳型とし、プライマー 5 と 6 を使用して KOD FX NEO を用いた PCR により取得した。このようにして得た両 DNA 断片を混合し、In-Fusion HD Cloning Kit により連結した。その反応溶液を用いて、*E. coli* JM109 株コンピテントセルを形質転換し、Cm を終濃度 25 µg/mL で含む LB 寒天培地上に塗布して 37°C で一晩培養した。その後、LB 寒天培地上に出現したコロニーを選抜し、Cm を終濃度 25 µg/mL で含む LB 液体培地に植菌し振とう培養を実施した。こうして得られた形質転換株の培養菌体から QIAprep Spin Miniprep Kit によりプラスミド抽出し、シーケンス解析により DNA 配列を確認し、これを pVC7-Pflrev と命名した。

pVC7-Pflrev の F1 プロモーターの下流に制限酵素 KpnI 認識部位および XhoI 認識部位を導入した pVC7-KpnI-XhoI-Pflrev プラスミドは、KOD -Plus- Mutagenesis Kit を用いて次のように作製した。pVC7N プラスミドを鋳型に、プライマー 6 と 7 を用いて PCR を行った。PCR 産物にキット付属の制限酵素 DpnI を加えて鋳型プラスミドの消化反応を行った後、その直鎖状プラスミドを含む反応液を用いてキット付属の T4 Polynucleotide Kinase および Ligation high によるセルフライゲーション反応を実施した。その反応液で *E. coli* JM109 株コンピテントセルを形質転換し、Cm を終濃度 25 µg/mL で含む LB 寒天培地上に塗布して 37°C で一晩培養した。その後、LB 寒天培地上に出現したコロニーを選抜し、Cm を終濃度 25 µg/mL で含む LB 液体培地に植菌し振とう培養を実施した。こうして得られた形質転換株の培養菌体から QIAprep Spin Miniprep Kit を用いてプラスミド DNA を抽出し、DNA 配列の解析により目的とするプラスミドを確認した。

F1 プロモーターの直後に *H. vigintioctopunctata* 由来 *diap1* 遺伝子の部分配列 (Hv-diap) を連結した DNA 配列を含むプラスミド pVC7-Pf1-Hviap の構築を次のように実施した。F1 プロモーターの DNA 断片は、F1 プロモーター (-XhoI サイト) 2 を鋳型とし、プライマー9と10を使用して PrimeSTAR HS を用いた PCR により取得した。Hv-diap 配列の DNA 断片は、人工遺伝子合成品としてユーロフィンより購入した Hv-diap 配列 8 を鋳型として、プライマー11と12を使用し、PrimeSTAR HS を用いた PCR により取得した。pVC7 ベクター断片は、pVC7 を鋳型としてプライマー6と13を使用し、KOD FX NEO を用いた PCR により取得した。これら3種の断片を混合し、In-Fusion HD Cloning Kit により連結し、目的とするプラスミドを確認した。

pVC7-Pf1-Hviap を鋳型として、プライマー14と15を使用し、PrimeSTAR HS を用いた PCR により、「F1 プロモーター-Hv-diap 配列」の5'側に KpnI 認識部位を、3'側に XhoI 認識部位を付加した DNA 断片を取得した。そして、本 DNA 断片と、pVC7-KpnI-XhoI-Pf1rev の各々に対し、制限酵素 KpnI 及び XhoI による切断を行った後、MinElute PCR Purification Kit で精製を行い、両精製産物を混合し、Ligation high Ver.2 (東洋紡) を用いてライゲーション反応を行い、両 DNA 断片を連結した。その反応液で *E. coli* JM109 株コンピテントセルを形質転換し、Cm を終濃度 25 µg/mL で含む LB 寒天培地上に塗布して 37°C で一晩培養した。その後、LB 寒天培地上に出現したコロニーを選抜し、Cm を終濃度 25 µg/mL で含む LB 液体培地に植菌し振とう培養を実施した。こうして得られた形質転換株の培養菌体から QIAprep Spin Miniprep Kit を用いてプラスミド DNA を抽出し、シーケンス解析により DNA 配列を確認し、これを pVC7-Hviap と命名した。

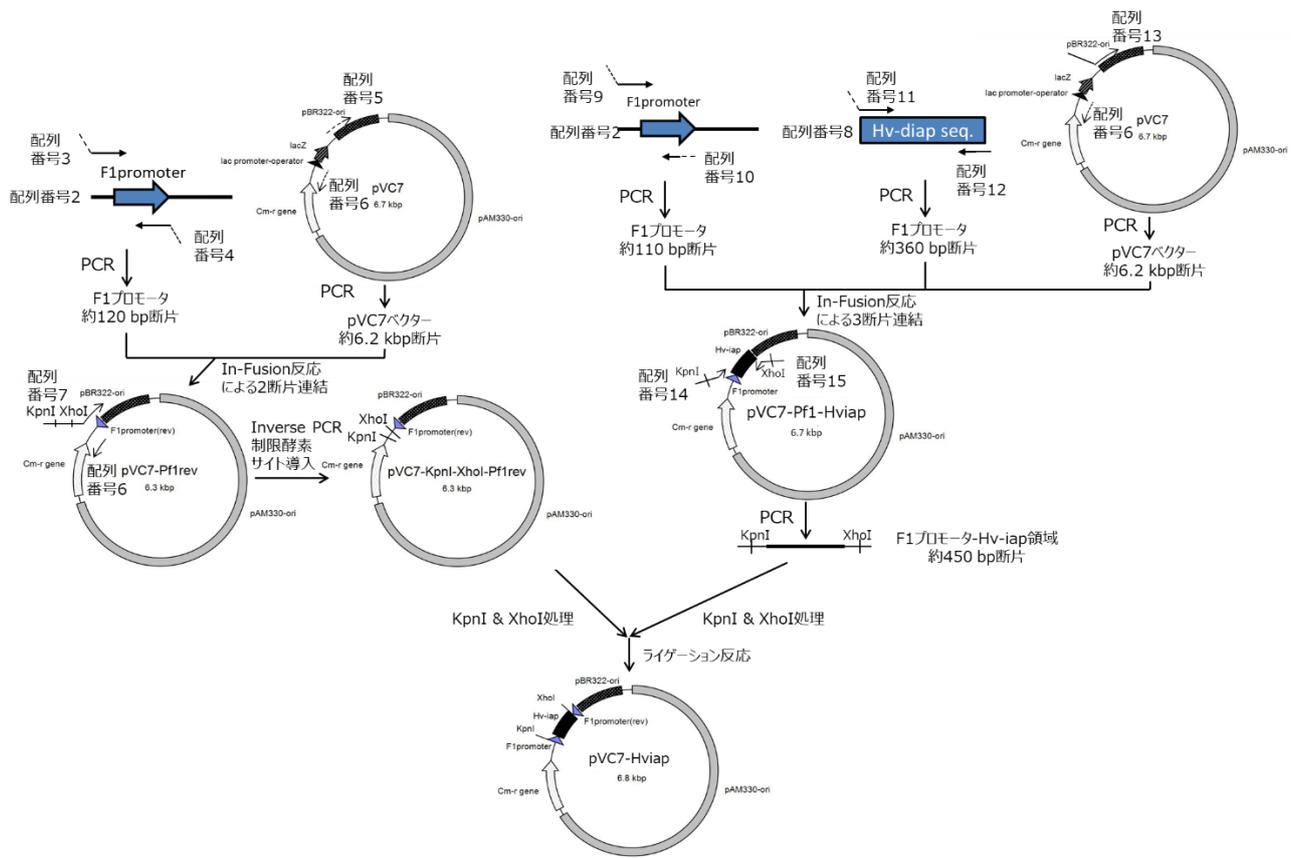


図 5-1 pVC7-Hviap プラスミド構築の流れ

2.3.2 pVC7H1-Hviap および pVC7H2-Hviap の構築

pVC7-Hviap の高コピー数化変異体である pVC7H1-Hviap、pVC7H2-Hviap pVC7-Hviap は KOD -Plus- Mutagenesis Kit を用いて次のように作製した。pVC7-Hviap を鋳型として、プライマー16と18またはプライマー17と18を用いてPCRを行い、1塩基置換したDNA断片溶液を取得した。その反応溶液にキット付属の制限酵素 DpnI を加えて鋳型プラスミドの消化反応を行った後、その直鎖状プラスミドを含む反応液を用いてキット付属の T4 Polynucleotide Kinase および Ligation high によるセルフライゲーション反応を実施した。その反応液で *E. coli* JM109 株コンピテントセルを形質転換し、Cm を終濃度 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ で含む LB 寒天培地上に塗布して 37°C で一晚培養した。その後、LB 寒天培地上に出現したコロニーを選抜し、Cm を終濃度 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ で含む

LB 液体培地に植菌し振とう培養を実施した。こうして得られた形質転換株の培養菌体から QIAprep Spin Miniprep Kit を用いてプラスミド DNA を抽出し、DNA 配列の解析により目的とするプラスミドを確認した。

2.4 RNA 評価のための試験管培養と RNA 抽出法

Cm を終濃度 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ で含む CM-Dex 培地 2 mL に白エーゼ 1 かき分を植菌し、レシプロ培養装置 ML-1216-TN を用い、培養温度 30°C、振盪速度 120 rpm で 18 時間培養後の培養液 200 μL を回収した。培養液 200 μL に対して、RNAprotect Bacteria Reagent 400 μL を添加し処理した後、上清を除去し菌体画分を回収した。次に、菌体画分に 15 mg-Lysozyme/mL-TE 緩衝液 225 μL を添加し室温で 30 分間反応させ、更に 20 mg/mL Proteinase K を 25 μL 添加して室温で 30 分間反応した。TRIzol LS を用いて RNA 抽出を行った後、RNase-free 水 50 μL で溶解し、total RNA 溶液を調製した。total RNA の濃度は NanoDrop を使用して OD₂₆₀ の値から算出した。total RNA 溶液は、Novex TBE Gels (6%) を用いて PAGE 分析を行った。各 total RNA 溶液 1 μL 、Novex Hi-Density TBE Sample Buffer (5X) 2 μL 、1M NaCl 1 μL 、RNase-free 水 6 μL と混合し、ゲルのレーンヘアプライし、非変性条件下、1×TBE を泳動緩衝液として用い、200V、28 分の条件で泳動を行った。PAGE に用いる dsRNA 用マーカーとして DynaMarker dsRNA (バイオダイナミクス研究所) を使用した。泳動後のポリアクリルアミドゲルは、SYBR Green II (タカラバイオ) で染色した後、ゲル撮影装置 ChemiDoc XRS (バイオラッド) で画像取得し、解析ソフト Quantity One (バイオラッド) で定量を行った。

2.5 各種 RNase 処理による dsRNA 生成確認

RNase 処理は、RNase A (プロメガ) または *E. coli* 由来 RNase III (Ambion) を用いて実施した。RNase A 処理では、total RNA 1.6 μg に対して RNase A を 10 ng、NaCl を終濃度 125 mM になるよう添加し、RNase-free 水を加えて反応体積 16 μL で 25°C で 30 分間反応した。RNase III 処理では、total RNA 1.6 μg に対して RNase III を 6 units 添加した上で、NaCl 200 mM、Tris (pH 7.9) 12.5 mM、MgCl₂ 12.5 mM、DTT 1.25 mM となるよう調製し、反応体積 16 μL で 37°C で 1 時間反応した。1 unit は 37°C で 1 時間反応時に、500 bp dsRNA を 1 μg 分解する酵素量である。反応後、各反応溶液に対して、Hi-density TBE sample buffer (サーモフィッシャーサイエンティフィック) 4 μL を添加し、Novex TBE Gels (6%) を用いて、非変性 PAGE を行った。

2.6 RT-PCR による目的 *diap1**-dsRNA 生成確認

One-step RT-PCR を行うために、高度好熱菌 *Thermus thermophilus* HB8 由来の逆転写活性を有する耐熱性ポリメラーゼを用いた RT-PCR Quick Master Mix (東洋紡) を使用した。*C. glutamicum* 2256L Δ *rnc*/pVC7H2-Hviap 株の試験管培養後の菌体サンプルから TRIzol LS を使用して RNA 抽出操作を行い、total RNA 溶液を調製した。total RNA 溶液の非変性 PAGE を行い、核酸染色試薬 SYBR Green II で染色した。トランスイルミネーターCyanoView を使用し、染色ゲルから *diap1**-dsRNA 由来バンドを切り出し、メスで細かく切り刻んだ後に、TBE 緩衝液 (100 mM Tris, 90 mM boric acid, 1 mM EDTA) に浸し 37°C で 3 時間静置した。その上清を回収し、イソプロパノール沈殿を行い、*diap1**-dsRNA 溶液を得た。

RT-PCR 反応に使用する鋳型 RNA としては、ゲル切り出し精製産物 2 μg を RNase-Free DNase I (キアゲン) で処理した後、TRIzol LS 試薬で精製した dsRNA を用いた。0.001 ng から 10 ng まで 10 倍ずつ希釈系列を用いて増幅の検討を行った。プライマー 19 と 20 を使用した PCR に

より調製した反応産物を 2%アガロースゲル電気泳動で分析し、サイズマーカーとして 1 Kb Plus DNA ladder (サーモフィッシャーサイエンティフィック) を使用した。

```
5'-GGTAAATGTCATGGTTATGCAAGGAAGTAACCATCCCGTGTATGTTTATATTACTAGTTCGTTTCAATTACTCTAAAAATTTGTA
GTGGATATAATCAAGATAATTGTTCTGGCTTTACGATTTCTGCAACTCATAAGTTTTAAACCTCGCATTTCGAAAATGGTTCCACCA
GTAGAAGTATTGTCTTATCCAAGCTCGACTAGGAAGTTTGGTAACGGACTTGATTTGAAGAATATGCCCGCAGCAGTAAGTGTGAA
GAGAAATATAAATCATACCATAGGAAAAGACACTGGCGATAATGGTTGTTCCCTTTTTGAATCTAACTCCACCCGCAAATTTATTGG
CTACGATCGAGGGACGCCTGAAGACGTACAAAAATTGGCCCAACAAGAATATAGATCCCCAGAAGTTAGCGGCCGCCGGCTTTTTTC
TATTTCTGGAAAACCTGACATCGTTCGAGTGTTCAGTGCAGTATCAAGGGACACAACCTGGTTGTTGAACGACGATCCAATGGAAGA
TCACAAAAAATGGAATAGGAATTGTTCTTTTGTAAGAGAAAACGCACCCGAAGAAAATAACGTCCCAAACTGGCACCCGGTAGTG
ATTATGTGGCAATTTAGACGTGTAACCTCACAATATACAGTCAGCGAAGAACCTGGAGATTATATCGTAACTTGGGTGTGGAC
ATCTCTCCGTTCTTGCAAACCTGGCGCTAAAACGAATCAGTCCGAGGGTCATAACCTGGAGGGGTTGTTACTAAGAACGAGGAAGGG
CCCAAGTCACCCAGATCAGATCATTACGAGCGTAGAGTGGCGACATTCGCGAATTGGCCCAAGTCCTTGAACAGAAAACCCACGG
ACTTGGCGGCCGAGGCTTTACTACCTCGGAATCGGCGACCAGACGTTGTGCTTTTACTGCGGCCGGCTGAAAAGATTGGGTC
GAAGAAGACGATCCGTGGGAACAGCACGCGCTTTGGTTCCCCAGTGTAAATTATCTATTATTGAAGAAAACACCCGCTTTCGTCAA
AGACGTCCAAGAAAACATAAAGGCGATTTGTCTCATCCAAGCAAACGAGACCGAAGTGGTAGCAAGTAGTAGCAGTAGTCACA
ACTCAAAGAATCTCCAAGTGCGGTGGTAGAAGAGCGAGAAAACAACGCAGAGGAAAGCTCGACATTATGCAAAATATGTTAT
AAAAATGAATTGGCTGTTGATTTCTACCTTGCGGTCATATGGTAGCTTGTGTAGATTGTGCATCAGGATTAAGAATGTGCTAT
TTGCCGTAAAGAGATCCAAGCGAATGTTCGAGCCTTTTGTGCATAGTTTCGGAACAGTTAACAGTAACAGTTACTGCTTGACCACA
CTCATTTCAAAGAAGTATGGTCGAATTATGTCCTCAGCTCAAATCACCACCAACAGTGACACGTTGTGGATGCATTTGTGTTT
CGACAATTACAGGTGGGTTCTCAGAACCCTAAAAGTGGCAGTTTGGCGATTACAAACCCATCTAGGTGAAAATGTGCTGCGTGC
CTCACGAAGATTTTGTGCAAAATACAGCATTCCCTTTTGTGCGGATGTTGCAAACTTTCTTCACTGTGCATGGGCAAAAAGGCTT
CAGTTGTTGTGGTTATTGAATTTGGCAAGCATGAGGACACAGATCTTACTGATTATACGCTGTAGAGAGCTTCTTGAAATTTGAA
ATTCTTGTCCACGACGTCGAATTGAGATTCTCTGGATTGTCACTGACACTTCGACGTACTACTGTGATTTTGACATTTGGACGACCA
TTGTATATGACGTATACAACGGATCCTGTCTCCCTGAATTCCTCATCTCTTACAGTTGACGAAGTTAAAACACTATTCCGACAAC
ATTTCGAATGAAATTTTAGAACTGCTCGCAAGCTTTTATATTTTTGAAATATTGTTCAATAATGAAGTAACGTTGTTCTATCG
TGTAATGTTCCATTTTAATAACCTTAACTGTC -3'
```

図 5-2 *Henosepolachna vigintioctopunctata* 由来 *diap1*-cDNA 配列情報

diap1 遺伝子の CDS は下線で、*diap1**-dsRNA 転写に使用した配列は水色のハイライトで、RT-PCR で増幅する領域は赤色文字で、定量リアルタイム PCR で増幅する領域は黄色のハイライトで示した。

2.7 dsRNA 生産菌の殺菌処理

培養した dsRNA 生産株菌体は、下記のエタノール処理、メタノール処理、熱処理手法により殺菌処理を行った。

2.7.1 dsRNA 生産菌のエタノール・メタノール処理

培養液 200 μ L を 21,600 \times g、2 分間室温で遠心分離し、菌体を回収した後、任意の濃度のエタノール 1 mL (10~90% エタノール / 10mM リン酸バッファー pH 6.8) と混合した。室温で 10 分間静置した後、21,600 \times g、2 分間室温で遠心分離し、殺菌処理済み菌体を得た。調製量が多い場合は、培養液 1.5 mL を 15 mL 容量のファルコンチューブに入れ 2,400 \times g、5 分間室温で遠心分離し、得られたペレットに 1125 μ L の滅菌 miliQ 水と 375 μ L の 200 mM リン酸バッファー pH 6.8 を添加し、よく懸濁した。その後、100% エタノール 6 mL を添加して混合し、室温で 10 分間静置した。その混合液を 2,400 \times g、5 分間室温で遠心分離し、菌体を回収した。メタノール処理の場合は、エタノールをメタノールに代えて同様に処理した。

2.7.2 dsRNA 生産菌の熱処理

培養液 200 μ L を 21,600 \times g、2 分間室温で遠心分離し、菌体を回収した後、1 mL の 10 mM リン酸バッファー pH 6.8 でよく懸濁した。21,600 \times g、2 分間の遠心分離後により菌体を回収し、菌体ペレットをヒートブロックで 30 分間インキュベートすることで加熱処理をした。加熱温度は特に記載のない限り 100°C で行った。調製量が多い場合は、培養液 1.5 mL を 15 mL 容量のファルコンチューブに入れ 2,400 \times g、5 分間室温で遠心分離した。得られたペレットを 7.5 mL の 10 mM リン酸バッファー pH 6.8 を添加しよく懸濁し、2 mL のエッペンドルフチューブに 1.5 mL ずつ分注した。21,600 \times g、2 分間の遠心分離により菌体を回収し、上記と同様に加熱処理を行った。

2.8 生菌数の評価

2.8.1 殺菌処理前のコリネ型細菌の生菌数確認

dsRNA 生産菌の培養液を CM-dex 培地で 10^7 倍希釈し、希釈液を CM-dex 寒天培地に播種した。30°C で 48 時間培養したのち、出現するコロニーの数をカウントした。

2.8.2 殺菌処理後のコリネ型細菌の生菌数確認

培養液 200 μ L 分の殺菌処理菌体を 200 μ L の CM-dex 培地に懸濁し、そのうち 100 μ L を CM-dex 寒天培地に播種した。30°C で 48 時間培養したのち、出現するコロニーの数をカウントした。

2.9 ニジュウヤホシテントウへの dsRNA 投与試験

基礎生物学研究所の新美教授にニジュウヤホシテントウへの投与試験を依頼した。調製した菌体（コリネ菌は培養液 1.5 mL 相当の量。乾燥菌体重量約 3 mg）は冷蔵状態で送付した。受領当日に 50 μ L の蒸留水を加え懸濁し、作成した菌液のうち 0.5 μ L をシリコナイズしたスライドグラス上にスポットし、予め 16 時間絶食しておいた 3 齢幼虫に摂食させた。菌液摂食後、イモ葉上に幼虫を移し、24 時間後に更に新しいイモ葉に移すことで摂食量を観察した（図 5-3）。一つの実験区に対し 4~5 匹で試験を行い、対象区には蒸留水を使用した。*diap1**-dsRNA 投与効果の評価には、イモ葉に移してから 24 時間、48 時間後のイモ葉の摂食量と、48 時間後の幼虫の体重を測定した。イモ場の摂食量についてはデジタルマイクロスコープ VHX-5000 (キーエンス) を使用し摂食面積を測定し、幼虫の体重については精密分析天秤 AUW120D (島津) を使用し測定した。

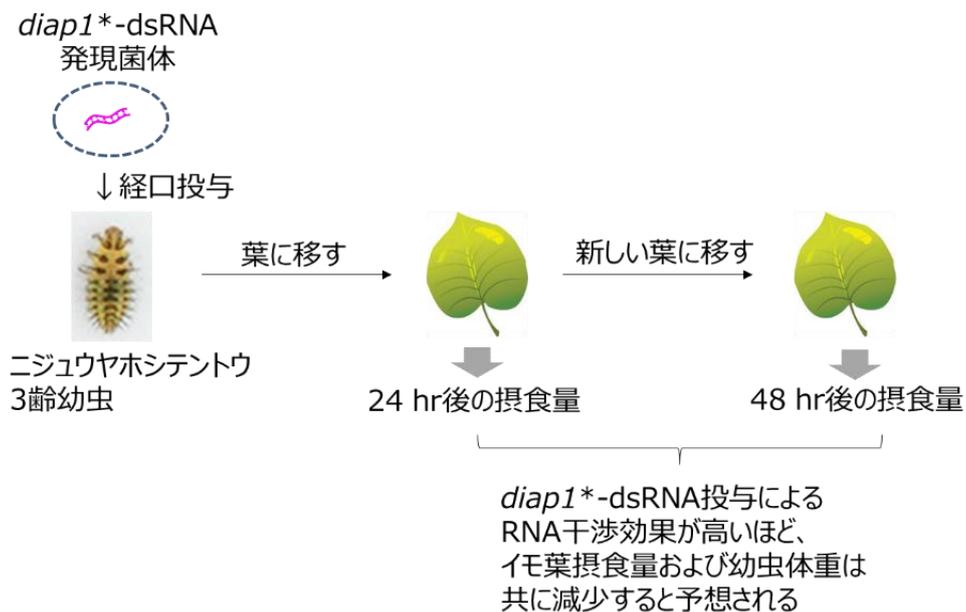


図 5-3 ニジュウヤホシテントウへの *diap1**-dsRNA 生産菌摂食試験概要

2.10 *H. vigintioctopunctata* 発現遺伝子の定量リアルタイム PCR

ニジュウヤホシテントウ全身から、TRI Reagent (モレキュラーリサーチセンター) を使用し total RNA 抽出を行った。total RNA 1 μ g を鋳型として SuperScript III Reverse Transcriptase (サーモフィッシャーサイエンティフィック) を使用して、1st strand cDNA を合成した。定量リアルタイム PCR は THUNDERBIRD SYBR qPCR Mix (東洋紡) を使用し、LightCycler 96 (ロシュ) にて実施した。*iap* 遺伝子の発現量比較として、ribosomal protein 49 遺伝子 (*rp49*) (GenBank Acc. No. AB480201) をコントロールとし、プライマー21 と 22 で *rp49* 遺伝子を、プライマー23 と 24 で *iap* 遺伝子を増幅 (図 5-2 参照) し、 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法⁹⁵に基づき比較定量を実施した。

第3節 結果と考察

3.1 *diap1**-dsRNA 生産菌の構築

モデル害虫 *H. vigintioctopunctata* の *diap1* 遺伝子部分配列に対応する *diap1**-dsRNA は、*H. vigintioctopunctata* が摂食することで RNA 干渉により *diap1* 遺伝子をノックダウンすることが出来る³⁴。*diap1* 遺伝子はアポトーシス阻害タンパクをコードしており、RNA 干渉によりその存在量が減少することでアポトーシス阻害機能が働かずに生育阻害が生じる。

既往の研究として、dsRNA 転写ベクターの設計としては、対向する T7 プロモーターの間に目的配列を配置することで、目的とする dsRNA を生産する例が知られている⁷⁵。そこで、対合する F1 プロモーター間に *Hv-diap1* 遺伝子の部分配列を配置したプラスミドを作製した (図 5-4)。

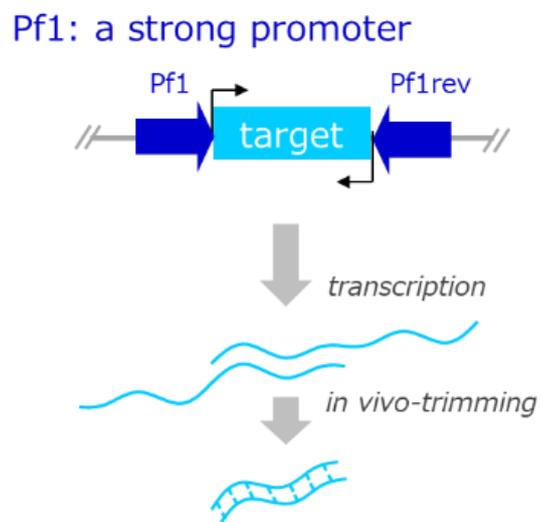


図 5-4 dsRNA 転写系の説明図

*diap1**-dsRNA 転写プラスミドとしては、pVC7N プラスミドを宿主とした pVC7-Hviap を構築した。pVC7 のコピー数は染色体あたり約 11 コピーであるのに対して、pVC7H1 は 110 コピー、pVC7H2 は 320 コピーである。高コピー数プラスミドに dsRNA 転写系を導入することにより目的 dsRNA 転写量の増加が見込まれる。pVC7-Hviap を鋳型として、1 塩基置換による高コピー数化変異導入を行うことで、pVC7H1-Hviap および pVC7H2-Hviap を取得した。2256L Δ *rnc* 株を pVC7-Hviap、pVC7H1-Hviap、pVC7H2-Hviap で形質転換して、目的とする *diap1**-dsRNA の生産を評価した。試験管培養後の菌体から抽出した total RNA を非変性 PAGE により分析したところ、空ベクター-pVC7 の形質転換株と比較し、*diap1**-dsRNA 転写プラスミド形質転換株では目的とする *Hv-diap1* 遺伝子部分配列長である約 360 塩基長の位置に RNA バンドが確認出来た (図 5-5) 。pVC7-Hviap では、薄いバンドが検出されるのに対し、pVC7H1-Hviap および pVC7H2-Hviap では明瞭なバンドが確認され、そのバンド強度もコピー数に比例し、pVC7H1-Hviap よりも pVC7H2-Hviap の方が高いことが分かった。

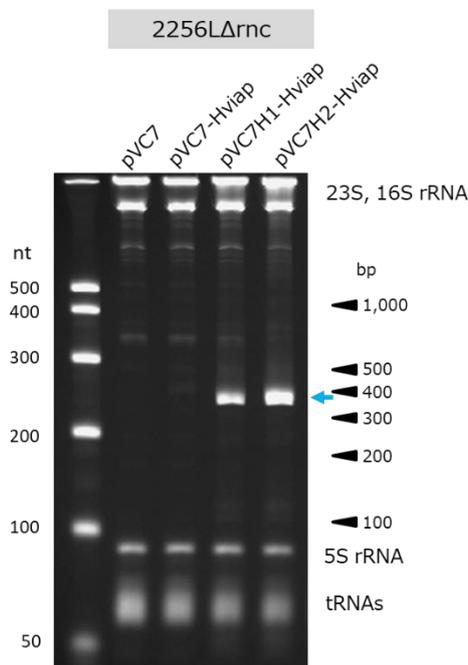


図 5-5 各種 *diap1**-dsRNA 生産菌株の培養評価

水色矢印は、*diap1**-dsRNA のバンド位置を示す。

3.2 *diap1**-dsRNA の生成確認

3.2.1 *rnc* 遺伝子欠損による dsRNA 蓄積への影響評価

rnc 遺伝子の非欠損株においては、菌体内の二本鎖 RNA 分解活性が高く保持されているため、目的の dsRNA の蓄積は起こらないと推定できた。実際、2256L 株および 2256L Δrnc 株の pVC7H2-Hviap 形質転換体を取得し、培養評価を実施した。pVC7H2-Hviap で形質転換した 2256L Δrnc 株では、360 塩基長のバンドが確認できたものの、2256L 株では確認出来なかった (図 5-6)。2256L 株では 10-30 塩基長程度の位置にスミアなバンドが検出され、合成された dsRNA の分解産物であると考えられる。このことは、2256L Δrnc 株で観察された RNA バンドは、二本鎖構造をとった RNA であることを示唆している。

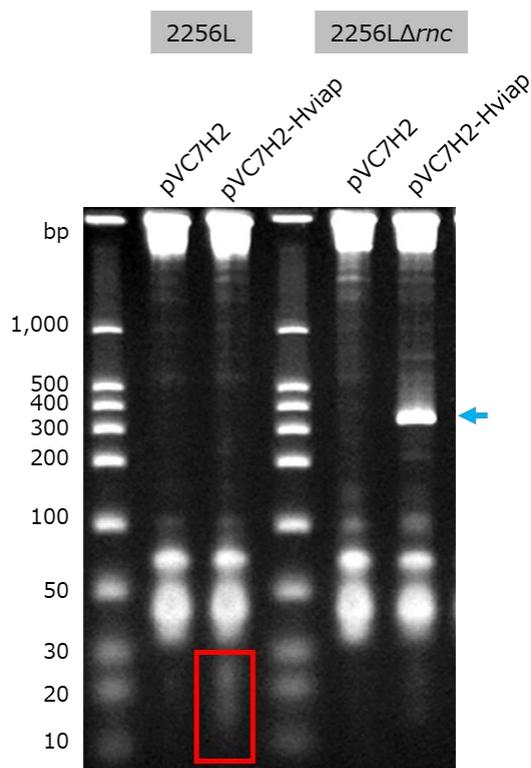


図 5-6 *rnc* 遺伝子欠損による dsRNA 蓄積効果の確認

水色矢印は、*diap1**-dsRNA と想定されるバンド位置を示す。赤枠は、RNase III によって分解された *diap1**-dsRNA 由来 RNA 断片であると考えられる。

3.2.2 RNase 処理による生成 RNA の構造解析

2256L Δ *rnc*/pVC7H2-Hviap 株の培養サンプルから抽出した total RNA 内に目的とするサイズの *diapI**-dsRNA 断片が検出されたことから、RNase 処理によってその DNA 断片の構造解析を行った。RNase A は ssRNA をピリミジン残基特異的に分解するエンド型リボヌクレアーゼであり、dsRNA よりも ssRNA に対する分解活性が高い。また、RNase III は dsRNA 特異的に分解するエンド型リボヌクレアーゼであり、ssRNA よりも dsRNA に対する分解活性が高い。空ベクター pVC7H2 の形質転換株では、RNase A 処理によって、一部の rRNA を除く大部分の total RNA が分解される一方で、dsRNA 転写ユニットを搭載した pVC7H2-Hviap 形質転換株では RNase A 処理によって、約 360 塩基対長と思われる二本鎖 RNA バンドはある程度保持されていることが示された (図 5-7A)。RNase III 処理では、total RNA のうち、rRNA や tRNA でもやや分解が起きるものの、目的の RNA バンドは消失することから、その RNA バンドは dsRNA 構造を有していることが示唆された (図 5-7B)。

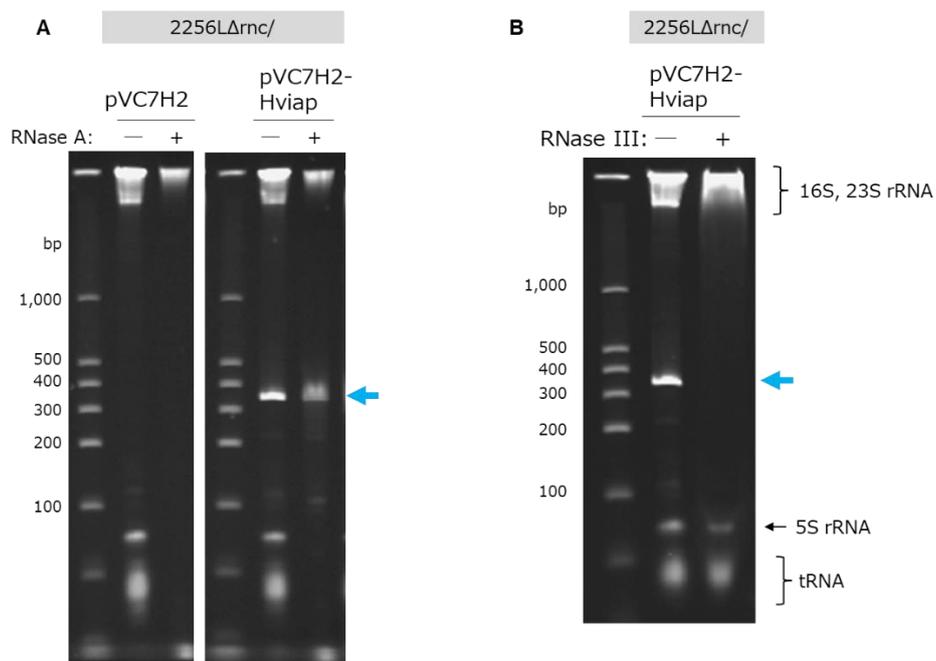


図 5-7 RNase A 処理または RNase III 処理による生成 RNA の構造解析

(A) RNase A 処理前後での total RNA 分析 (B) RNase III 処理前後での total RNA 分析
水色矢印は、*diapI**-dsRNA のバンド位置を示す。

3.2.3 RT-PCR による目的 dsRNA 生成確認

*diap1**-dsRNA と考えられるバンドが、*diap1* 遺伝子の部分配列由来であるかどうかを評価するため、RT-PCR を実施した。2256L Δrnc /pVC7H2-Hviap 株から抽出した total RNA を非変性 PAGE により分離した後、その目的の RNA バンドのみを切り出し精製した。再度非変性 PAGE を行ったところ、目的の dsRNA が精製出来たことが分かった (図 5-8A)。図 5-8B に示すプライマー設計で、逆転写活性を有する耐熱性ポリメラーゼを用いた RT-PCR を行ったところ、鋳型 RNA 量 0.001 ng において、予想されるサイズ 260 塩基長の位置に DNA バンドが検出された。したがって、本 dsRNA は予想通り *diap1* 遺伝子の塩基配列を有していると考えられる (図 5-8C)。

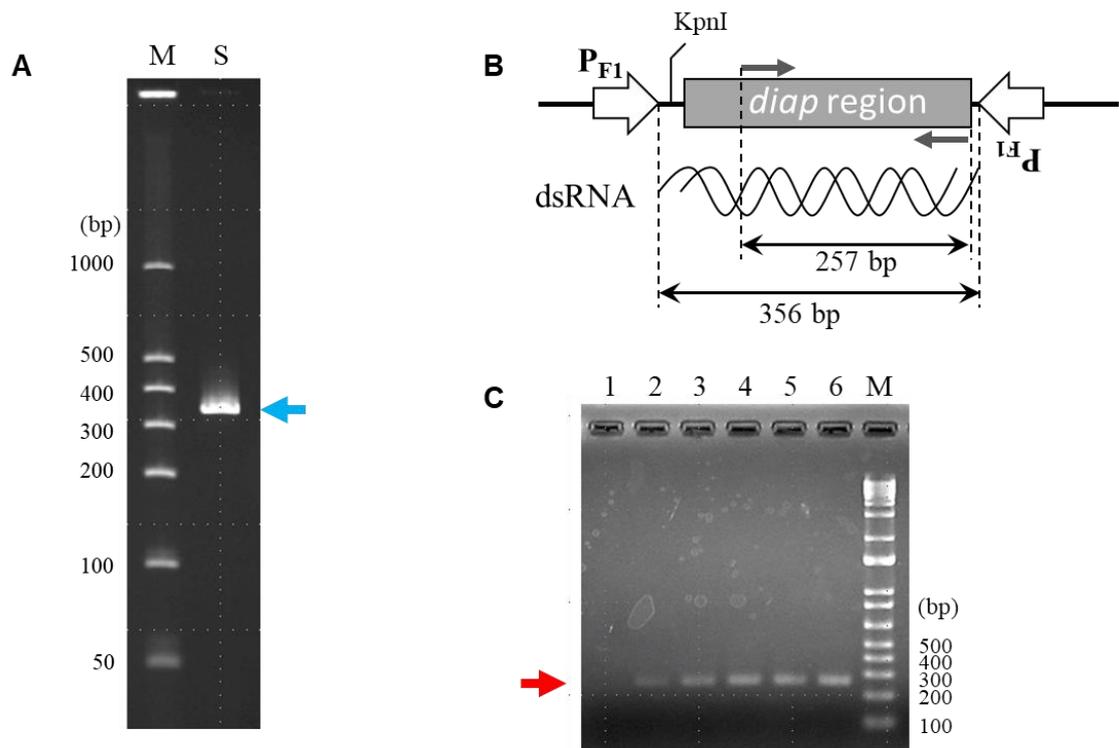


図 5-8 RT-PCR による *diap1**-dsRNA 生成確認

(A) ゲル切り出し後に精製した約 360 塩基対長の dsRNA バンドの非変性 PAGE。水色矢印は、*diap1**-dsRNA のバンドに相当する位置を示す。(B) RT-PCR による増幅 DNA 領域の説明図。*diap1**-cDNA の内部配列で RT-PCR 用プライマー設計を行い、増幅長は 257 bp になる。(C) RT-PCR 後のアガロースゲル電気泳動結果。2% アガロースゲルを使用した。0 ng (lane 1)、0.001 ng (lane 2)、0.01 ng (lane 3)、0.1 ng (lane 4)、1 ng (lane 5)、10 ng (lane 6) と、RT-PCR 反応に供する鋳型 RNA 量をふって実施した。赤色矢印は、RT-PCR による増幅が予想されるバンドの位置を示す。

3.3 ジャーファーマンター培養による目的 dsRNA の生産評価

コントロール株 *C. glutamicum* 2256L $\Delta rnc/pVC7H2$ および *diap1**-dsRNA 生産株 2256L $\Delta rnc/pVC7H2$ -Hviap のジャーファーマンター回分培養を実施した。培養後半では、見かけ上、コントロール株よりも *diap1**-dsRNA 生産株の方が菌体量は上回っていた (図 5-9A)。コントロール株とモデル RNA 生産株である pVC7H2-U1A*-1 保持株のジャーファーマンター回分培養を実施した際には、モデル RNA 生産株の方で生育遅延が確認されていた (第 4 章)。今回、F1 プロモーター対向による dsRNA 転写系は、その逆向き反復配列を有しているためプラスミドの構造的な不安定を引き起こすことが考えられる。実際に培養終盤でのプラスミド保持率を評価したところ、コントロール株はプラスミド保持率が 100%であった一方で、pVC7H2-Hviap 保持株のプラスミド保持率はばらつき 30%-70%程度と低下していた。したがって、今回観察された培養の後半での *diap1**-dsRNA 生産株の菌体濃度上昇は、RNA 生産プラスミドの脱落が起こることで、プラスミド保持に関わる生育負荷が軽減されることが原因と考えられる。pVC7H2 プラスミドは Cm 耐性遺伝子を導入しており、通常 Cm 存在下ではプラスミドは保持されるが、培養後半では大部分の Cm が消費されていると考えられるため、プラスミド脱落株の出現頻度は高まると予想される。

dsRNA の蓄積度合いをみると、生育と連動し *diap1**-dsRNA 蓄積量は増加していき培養 21 時間でほぼ極大に達していることを確認した (図 5-9B)。PAGE 結果からおおよその dsRNA 量を算出するため、dsRNA サイズマーカー 300 bp バンドを 25 ng として定量を行ったところ、培養液あたり約 75 mg/L の *diap1**-dsRNA が蓄積した (図 5-9C)。また、360 bp 長の *diap1**-dsRNA バンド以外にも、複数のバンドが検出されており、それらは *diap1* 遺伝子由来 RNA の副生物であると推測された。

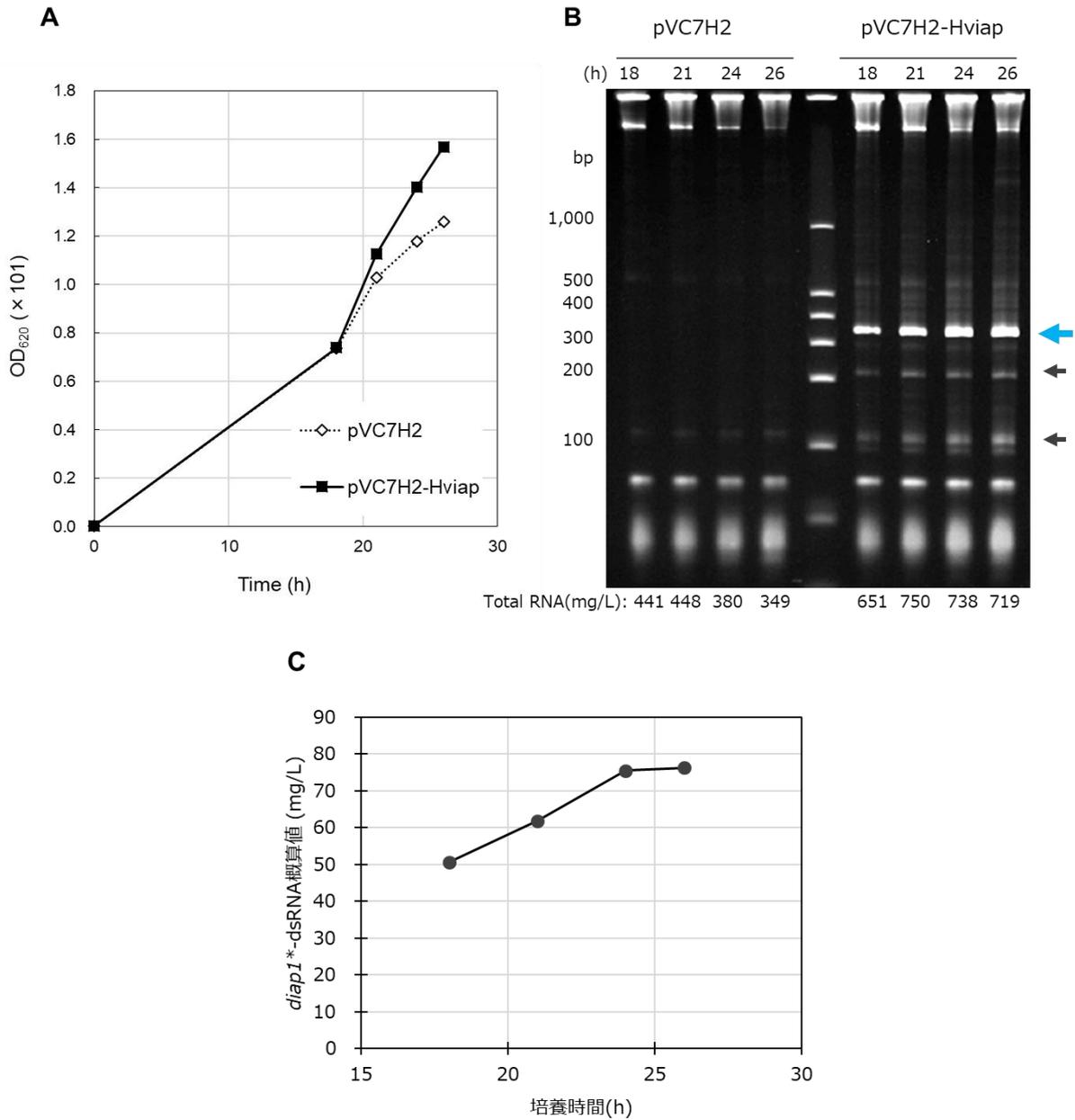


図 5-9 *diap1**-dsRNA 生産菌のジャーフェンターでの培養

(A) 生育曲線 (B) 各培養時間での抽出 total RNA の非変性 PAGE 結果 (C) 2256LΔ *mcl/pVC7H2-Hviap* 株の *diap1**-dsRNA 生産量概算値。画像解析から算出した。水色矢印は *diap1**-dsRNA のバンドを、灰色矢印は *diap1* 遺伝子由来と考えられる RNA バンドを示す。

3.4 *diap1**-dsRNA 生産菌の殺菌処理方法検討

コリネ型細菌を宿主とした *diap1**-dsRNA 生産菌を殺菌処理した後に、死菌体ごとニジュウヤホシテントウに摂食させ、その dsRNA によるニジュウヤホシテントウの生存活性に及ぼす効果を検証した。

まず、殺菌処理に有効なアルコール処理濃度を確認するため、10%から 90%濃度 (v/v) のエタノール溶液またはメタノール溶液で処理をし、その殺菌効率を評価した。アルコール処理前では 6.0×10^8 CFU であった菌体サンプルを、アルコール処理後に寒天培地上で培養したところ、30%以上の濃度のエタノール溶液で処理したサンプル、または 50%以上の濃度のメタノール溶液で処理したサンプルでは、寒天培地上には一つもコロニーは形成しなかった (表 5-3)。すなわち、30%以上の濃度のエタノール処理または 50%以上の濃度のメタノール処理により、生菌率としては 10^{-8} 以下となり、コリネ菌体は死滅していることが判明した。

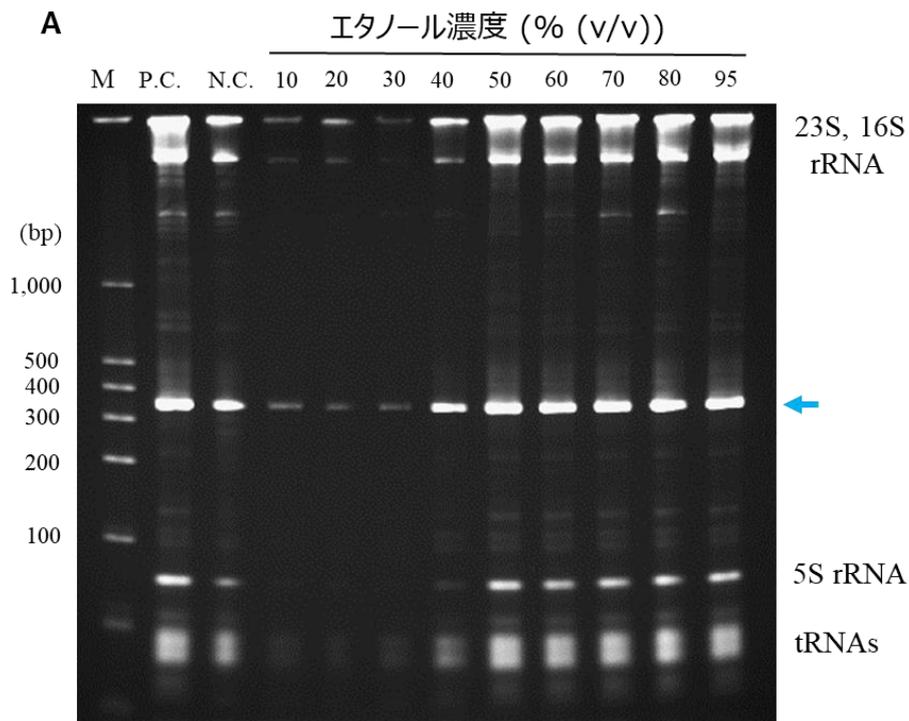
表 5-3 各種アルコール処理後の *diap1**-dsRNA 生産菌の生存率

Alcohol	各アルコール濃度 (% (v/v)) 処理後の生存活性									
	0	10	20	30	40	50	60	70	80	90
Ethanol	+++	+++	+++	$<10^{-8}$	$<10^{-8}$	$<10^{-8}$	$<10^{-8}$	$<10^{-8}$	$<10^{-8}$	$<10^{-8}$
Methanol	+++	+++	+++	+++	+	$<10^{-8}$	$<10^{-8}$	$<10^{-8}$	$<10^{-8}$	$<10^{-8}$

+++はプレート全体に隙間なく菌が生えている状態、+はプレート全体にコロニーが生えている状態、 $<10^{-8}$ はプレート上にコロニーが1個も生えていない状態

次に、エタノール処理後において目的とする dsRNA を保持しているかを確認するため、エタノール処理菌体を室温で 24 時間静置した後に total RNA を抽出し、非変性 PAGE で評価した (図 5-10A)。その結果、360 bp 付近の *diap1**-dsRNA 由来バンドが 10%から 40%の濃度のエタノール処理サンプルでは薄くなっているのに対して、50%以上の濃度のエタノール処理サンプルでは

殺菌未処理サンプルと比較して濃く、菌体内 RNA 安定化剤である RNAprotect Bacteria Reagent で処理サンプルとほぼ同様に保持されていることが分かった。低濃度のエタノール処理では、RNase 分解酵素の失活効果が低いことと共に、低濃度エタノールに対するストレス応答によって total RNA 分解が起こるものと推測された。このことから、菌体内 dsRNA の安定性の観点から 50%から 95%の濃度のエタノール殺菌処理を行うことが望ましいことが示された。同様に、メタノール処理後の菌体内 RNA の安定性評価を行ったところ、目的とする dsRNA はメタノール濃度 70%から 95%の試験区で良好に保持されることが分かった (図 5-10B)。以上の結果から、両アルコールでの処理濃度は、80%と設定することにした。



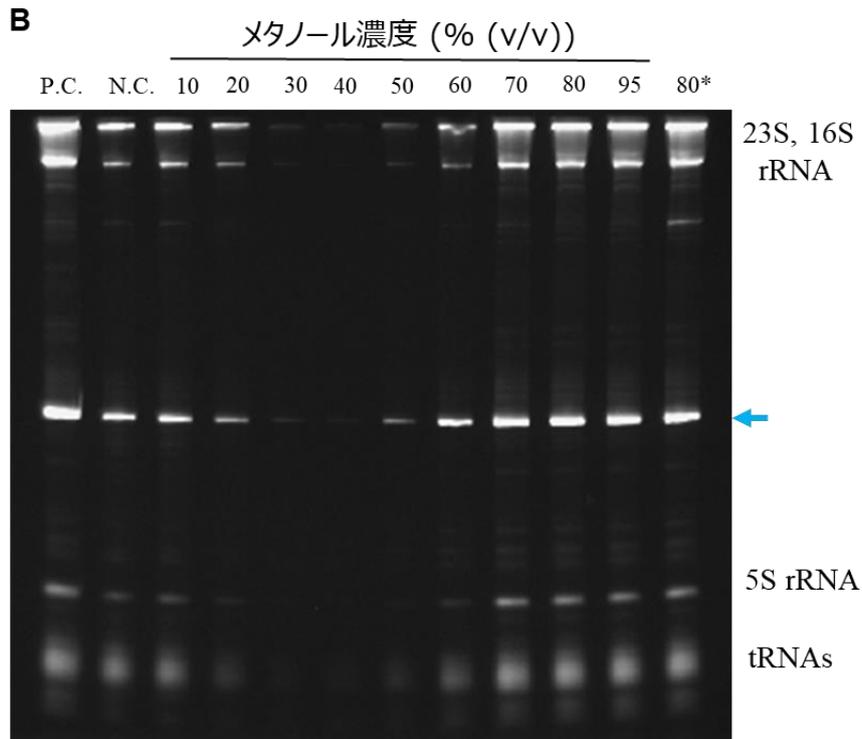


図 5-10 アルコール処理による菌体中の *diapl1-dsRNA 安定性評価**

(A) エタノール処理菌体から抽出した total RNA 分析 (B) メタノール処理菌体から抽出した total RNA 分析。矢印は、*diapl1**-dsRNA のバンド位置を示す。P.C.: ポジティブコントロール (菌体内 RNA 安定化剤である RNA Protect Bacteria Reagent を使用し菌体内 RNA を安定保持したサンプル)、N.C.: ネガティブコントロール (菌体を 10 mM リン酸バッファー (pH 6.8) 溶液で洗浄したのみの未殺菌サンプル)。*はコントロールとして用いたエタノール処理濃度 (% (v/v))。

アルコール処理以外の滅菌方法として、加熱による方法も検討した。菌体を入れた微小チューブを、ヒートブロックに設置して滅菌処理を行ったが、生存率 $<10^{-8}$ となるには、温度を 100°C に設定して 10 分間の処理が必要であった。加熱処理菌体から抽出した total RNA を非変性 PAGE によって分析した結果、目的とする *diapl1**-dsRNA を含めた全ての RNA が分解されており、低分子側に分解産物が確認された (図 5-11)。

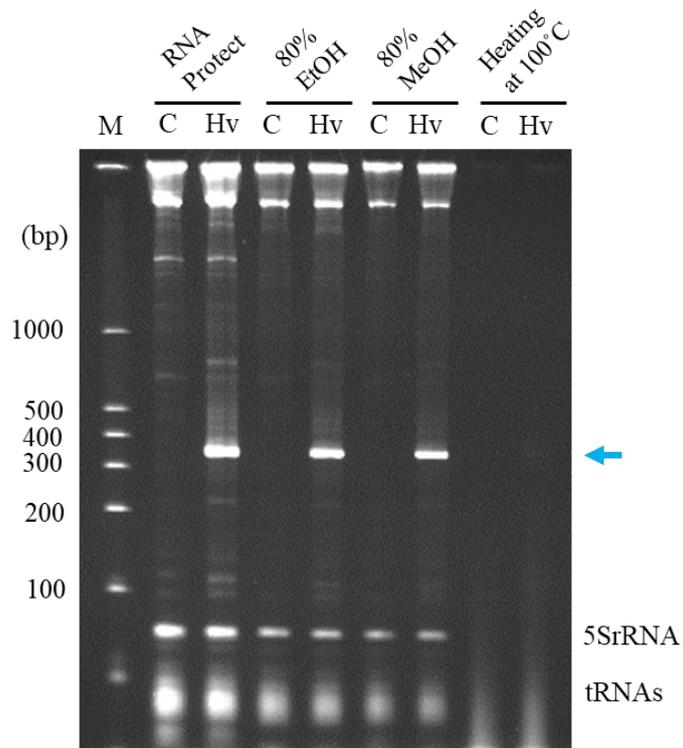


図 5-11 摂食試験用の各種処理菌体から抽出した total RNA 分析

C: 2256L Δrnc /pVC7H2 株、Hv: 2256L Δrnc /pVC7H2-Hviap 株。矢印は、目的の *diap1**-dsRNA のバンド位置を示す。

3.5 *diap1**-dsRNA 生産菌の害虫摂食試験

dsRNA 生産株菌体にエタノール処理を行うことによって、殺菌効果と共に目的 dsRNA 保持出来ることが分かったため、そのエタノール処理後の菌体をニジュウヤホシテントウに摂食させることで生育阻害効果が発揮されるかを確認した。コントロールとしては 2256L Δrnc /pVC7H2 株を使用した。*diap1**-dsRNA 生産菌である 2256L Δrnc /pVC7H2-Hviap 株を試験管培養し、3 mL 分の培養液を使用して、エタノール殺菌処理菌体を調製した。エタノール処理を行った菌体については、ニジュウヤホシテントウへの摂食時の残存エタノールの直接的な影響を避けるために 10 mM リン酸バッファー (pH 6.8) を用いて洗浄を行ったサンプルを使用した。

コントロール株ならびに *diap1**-dsRNA 生産株のエタノール処理菌体を、ニジュウヤホシテントウの幼虫へ摂食させてから 24 時間後に、全身から total RNA を抽出し、qPCR によって幼虫の *diap1* 遺伝子発現量を評価した。*diap1**-dsRNA 生産株菌体を摂取させた場合は、コントロール株菌体を摂取させた場合と比べて、*diap1* 遺伝子の発現量は有意に低下していて、エタノール殺菌 *diap1**-dsRNA 生産株菌体を摂取することで、さらに、*diap1* 遺伝子発現量の大幅な低下が確認された (図 5-12)。*diap1**-dsRNA 摂取による *diap1* 発現量の大幅な低減効果が示された。また、殺菌コントロール株菌体を摂取すること自体で何らかの生理的変化を誘導することが示唆された。このことは、腸管表面細胞のターンオーバーは早く、菌のような異物に対して生体防御反応が生じることでアポトーシスが誘導されたため、腸管表面細胞の一部においてコントロール菌摂取における *diap1* 遺伝子の発現低下が生じた可能性が考えられる。一方、*diap1**-dsRNA 生産株菌体では、すべての腸管細胞で *diap1* 遺伝子の発現低下が生じアポトーシスが誘導されると考えられる。

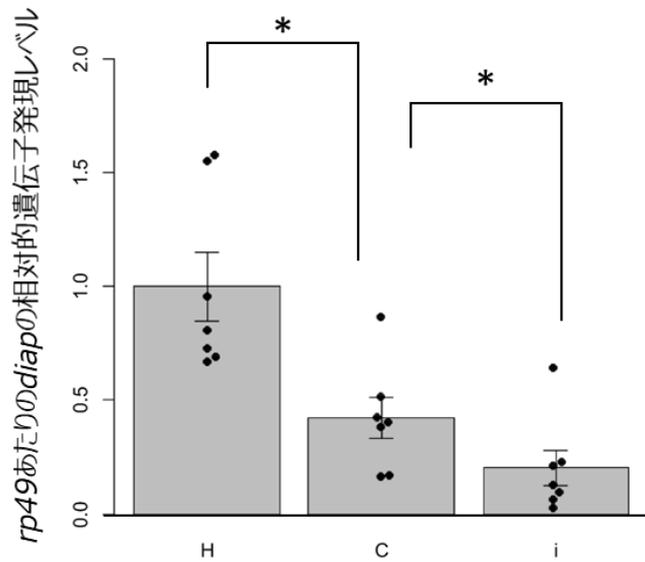


図 5-12 qPCR による *diap1* 遺伝子発現量評価

diap1 遺伝子の発現を、*rp49* 遺伝子のものを対照にして、調べた結果を示す。各サンプルは、水のみ (H)、エタノール処理した pVC7H2 保持菌体 (C)、エタノール処理した pVC7H2-Hviap を保持菌体 (i) を与えた幼虫の全身から調製し、各実験区は 7 匹の幼虫を使用した。統計解析での有意性は、Student *t*-テストを用い、データは、平均値±標準偏差値 (n=7) で示されている。
* $P < 0.05$ を示す。

エタノール処理した *diap1**-dsRNA 生産株菌体を摂食させた各幼虫で、RNA 干渉の効果が発揮されるならば、イモ葉摂食量の減少や幼虫体重の減少が観察されることが考えられる。殺菌体を摂食させた各幼虫をイモ葉に移して 24 時間後、そして、その後に新しいイモ葉に移しての更に 24 時間後に幼虫およびイモ葉を回収した。各葉の摂食面積を算出したものを図 5-13 に、その葉の写真を図 5-14、葉に移して 48 時間後の幼虫の体重を図 5-15 に示す。水のみ与えた試験区と比較し、*diap1**-dsRNA 生産株菌体を与えた試験区において、イモ葉摂食量が減少していることから、*diap1**-dsRNA 生産株菌体がニジュウヤホシテントウ幼虫に対する摂食障害を引き起こし、生育阻害の効果が発揮されていると考えられる (図 5-13、図 5-14) 。そして、*diap1**-dsRNA 発現コリネ菌体を摂食した幼虫の体重は、水のみ試験区やコントロール株の試験区と比べて約 4 分の 1 となったことから、生育阻害効果が確認された (図 5-15) 。また、空ベクター pVC7H2 を導入したコリネ菌を摂食させた試験区では、水のみ与えた試験区と同等の結果となり、菌体の摂食による生育阻害の影響は認められなかった。このことは、コントロール株を摂食させただけで *diap1* 遺伝子の発現量は低下したが、実際にはアポトーシスを誘導するほどの Diap1 タンパク質発現量の低下が起きていないことを示唆している (図 5-12) 。

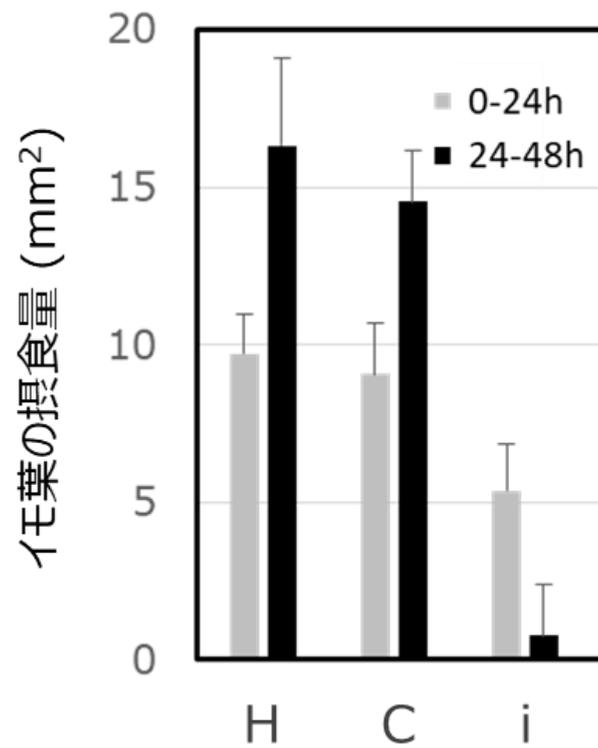


図 5-13 各種処理 *diap1**-dsRNA 生産菌摂取後のイモ葉摂食量

水のみ (H) 、空ベクター-pVC7H2 を保持する 2256L Δrnc /pVC7H2 株のエタノール処理菌体 (C) 、2256L Δrnc /pVC7H2-pVC7H2-Hviap 株のエタノール処理菌体 (i) を使用した。各々のデータは平均値 \pm 標準偏差として表示し、各実験区は 4 または 5 匹の幼虫を使用した。



図 5-14 *diap1**-dsRNA 生産菌摂取後のニジュウヤホシテントウに摂食させたイモ葉
 (A) 80%エタノール処理後の 2256L Δ *rnc*/pVC7H2 菌体摂取試験区 (B) 80%エタノール処理後の 2256L Δ *rnc*/pVC7H2-Hviap 菌体摂取試験区。菌体摂取後 24-48 時間の間に食べたイモ葉の様子の代表的なものを示す。

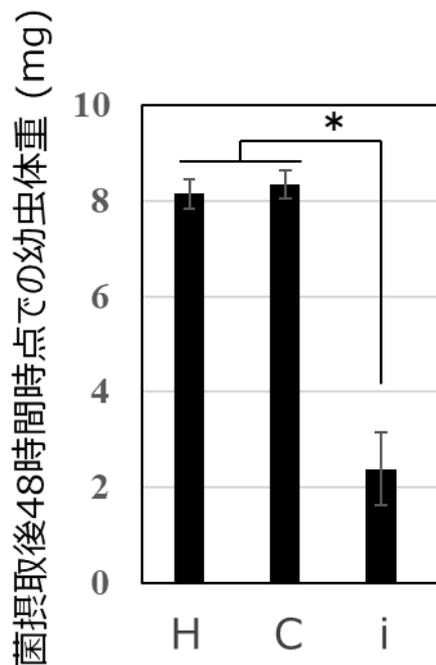


図 5-15 各種処理 *diap1**-dsRNA 生産菌摂取後の幼虫体重
 水のみ (H) 、空ベクター-pVC7H2 を保持する 2256L Δ *rnc*/pVC7H2 株のエタノール処理菌体 (C) 、2256L Δ *rnc*/pVC7H2-pVC7H2-Hviap 株のエタノール処理菌体 (i) を使用した。各々のデータは平均値 \pm 標準偏差として表示し、各実験区は 4 または 5 匹の幼虫を使用した。 $*P < 0.05$ を示す。

第4節 結言

環境低負荷でかつ対象害虫に特異的な生育阻害効果をもつ新規農業資材としての dsRNA に注目し、4章で開発した *C. glutamicum* を宿主とした RNA 生産技術を用いて dsRNA 生産系を構築した。強力な転写活性を有する F1 プロモーターを対向に並べることで、モデル害虫ニジュウヤホシテントウ *H. vigintioctopunctata* のアポトーシス阻害因子の *diap1* 遺伝子を対象とする *diap1**-dsRNA を生産した。本系を用いたジャーファーメンター培養での *diap1**-dsRNA 生産量（培養液あたり約 75 mg/L）は、T7 RNA ポリメラーゼを用いた *E. coli* を宿主とした発現系⁷⁵を利用した dsRNA 生産量（培養液あたり数 mg/L）と比較して極めて高い。今後、改良を加えることで更なる dsRNA 高生産系を構築できると考えられる。

RNA 生産菌から RNA を抽出することなく害虫に投与するために、dsRNA の機能性を安定保持したまま殺菌する処理法についても検討した。エタノールで 30%から 95%の、メタノールでは 50%から 95%の濃度で処理したサンプルにおいて高い殺菌効果が確認された。菌体内の目的 RNA 量については、適切な濃度でのエタノール処理（50%から 95%）もしくはメタノール処理（70%から 95%）では目的 RNA を安定に保持できることが明らかになった。本手法による殺菌工程を用いることで、RNA 抽出工程は不要となることで、さらに dsRNA 生産におけるコスト低減が期待できる。

第 6 章

総括

RNA 生産系構築のための要素技術としてプラスミドの高コピー数化に取り組んだ。従来使用してきたプラスミド pVC7N は約 10 コピー、pPK4 は約 50 コピーであったのに対して、pVC7H2 では約 300 コピー、pPK4H1 では約 800 コピーと、大幅にコピー数が向上した。また、本研究で取得した高コピー数プラスミドの RNA 生産以外の用途として、目的タンパク質の高生産にも有効であることが示され、今後の *C. glutamicum* を宿主とした物質生産系の有用な分子生物学的ツールとしての使用が期待できる。

コリネ型細菌由来クリプティックプラスミド pBL1 ファミリーに分類される pAM330 系プラスミドにおいて、pCG1 ファミリープラスミドと同様に、*repA*-mRNA の上流から逆向きに転写が開始される sRNA1 がコピー数制御に関与することが見出した。sRNA1 が *repA*-mRNA の RBS 領域に結合することでリボソームの結合を阻害し、翻訳抑制が起こり複製開始タンパク質 RepA の発現が抑制されコピー数が抑制されるといった制御モデルを提案した。実際、sRNA1 内の SL-II 領域に変異導入することで、そのほとんどがコピー数の増加につながっていることから、sRNA1 の中でも SL-II はコピー数制御に重要なドメインであることを明らかにした。また、pCG1 ファミリーに分類される pHM1519 系プラスミドにおいて、コピー数増加を引き起こす高コピー数化変異点を見出した。その変異位置は *repA*-ORF 内部に位置し、RepA の C 末端領域で 1 アミノ酸置換を引き起こしていることを明らかにした。その 1 アミノ酸置換は、HTH-motif のループ領域に位置しアミノ酸残基置換を引き起こし、RepA の DNA への結合親和性に影響を与えていることが予想された。高コピー数変異体の解析を通して推定されたコピー数制御機構は、類似のプラスミド複製機構を有する別プラスミドへの応用展開が期待される。コピー数制御機構に基づきコピー数を厳密に調整する技術は、今後の合成生物学的視点での合理的設計に適用可能であり、遺伝子解析研究から物質生産まで幅広い分野に対する貢献につながることが期待される。

本研究では、*C. glutamicum* を宿主として、組換え RNA 生産系を構築した。微生物による組換え RNA 製造法のほとんどでは *E. coli* を宿主として利用しており、*C. glutamicum* を宿主とした RNA 生産例は本研究が初めてである。まずは、U1A タンパク質と特異的に結合する機能性

RNA として、約 160 塩基長の UIA*-RNA 生産を行い、実際にその UIA*-RNA が目的配列を有し、UIA タンパク質と特異的相互作用する機能性も有することを明らかにした。このことは、コリネ型細菌を宿主とした組換え RNA 製造において、機能を有した RNA を合成できることを示している。UIA*-RNA 生産株のジャーファーマンター培養を行うことで、UIA*-RNA 生産量は培養液あたり 300 mg/L に達した。この値は、既報の微生物による RNA 生産系の収量を超えるものであり、本系は RNA 大量生産系として有望な基盤技術であると考えられる。

本研究で用いた RNA 生産菌宿主は、野生株から RNA 分解酵素である *rnc* 遺伝子を欠損した株を使用している。*C. glutamicum* で既にアノテーション付けされている RNA 分解酵素は 14 種あり、*rnc* 遺伝子以外のそれら RNA 分解酵素の欠損を行うことでより RNA 分解を抑制することが可能であり、目的 RNA 生産の蓄積量向上が期待される。また、微生物による発酵生産の育種戦略に習い、核酸生合成経路の強化や RNA 生産に適した代謝改変を行うと共に、培養温度や培地組成など培養プロセスを最適化することによって、RNA 工業生産菌としてさらなる生産性向上が見込まれる。

RNA 製造法の応用例として、害虫生育抑制効果を持つとされる dsRNA 生産系を構築した。実際に、害虫ニジュウヤホシテントウを対象とした dsRNA 生産菌の死菌体を害虫に投与することで、葉摂食量の低下や体重増加量の抑制といった生育抑制効果が実証された。アルコール殺菌処理工程を用いることによって、菌体内で安定的に dsRNA を保持させることが可能であり、菌体から RNA 抽出工程を省略できることはプロセス面での簡略化およびコスト低減につながると期待される。

コリネ型細菌を宿主とした組換え RNA 分子製造技術は、社会的課題を解決すると共に潜在的ニーズを引き出すと考えられる。dsRNA 摂取による害虫駆除では、dsRNA の配列を変えることで特定の害虫のみに効果を発揮することが可能である。ニジュウヤホシテントウ以外にもコロラドハムシといった重要害虫、ダニ・ゴキブリ・コクゾウムシといった衛生害虫、ヒアリといった特定外来生物に対しても効果が期待でき、通常の化学物質では対応出来ないような種類の害虫に対して

防除策となり得る。また、殺虫剤としてではなく RNA 農業資材として農作物の高品質化も期待できる。また、我々の研究グループでは、RNA 投与により、ウイルス感染ニンニクからウイルスを効率的に除去出来ることを見出しており⁹⁶、植物感染ウイルスに対する新規防除法としての利用も期待できる。このことは、化学農薬として未開発の植物ウイルス防除剤として有用であることに加えて、ウイルス防除剤を使用したウイルスフリー体を作製することで、ウイルス感染ストレス回避により農作物の品質向上や収量増加が見込める。核酸医薬用途 pre-miRNA や mRNA、ゲノム編集用途 sgRNA といった多様な組換え RNA 分子種の生産が可能であり、核酸医薬原薬となる RNA 種の製造が可能となり医薬分野への貢献が期待される。

謝辞

本研究を遂行し博士論文をまとめるにあたり、多くのご支援とご指導を賜りました指導教員である本学大学院 生命環境科学研究科 生物機能科学専攻 平川秀彦先生に深く御礼申し上げます。また、副指導教員である本学大学院 生命環境科学研究科 生物機能科学専攻 市川創作先生、本学大学院 生命環境科学研究科 生物機能科学専攻 青柳秀紀先生、本学大学院 生命環境科学研究科 持続環境学専攻 宮前友策先生に深く御礼申し上げます。

社会人博士課程の就学にあたってご指導賜りました、本学大学院 生命環境科学研究科 生物機能科学専攻長である田中俊之先生をはじめ、専攻委員の本学大学院 生命環境科学研究科 生物機能科学専攻 高谷直樹先生に深く御礼申し上げます。

博士課程への進学および研究全般にわたる多大なご支援とご指導を賜りました味の素株式会社 安枝寿氏、臼田佳弘氏、菊池慶実氏、三橋麻由氏に御礼申し上げます。

本研究の共同研究において、多大なご支援を頂きました基礎生物学研究所 進化発生研究部門 新美輝幸先生、川口はるか氏、千頭康彦氏に御礼申し上げます。

付録

培地組成

Luria-Bertani (LB) 培地 (Difco)

Tryptone	10 g/L
Yeast Extract	5 g/L
Sodium Chloride	10 g/L

KOHでpH 7.0に調整した後

オートクレーブ滅菌 (121°C、20 min)

MM-Glc培地

Glucose	10 g/L
(NH ₄) ₂ SO ₄	2.5 g/L
KH ₂ PO ₄	0.5 g/L
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.25 g/L
Urea	2 g/L
FeSO ₄ ·7H ₂ O	10 mg/L
MnSO ₄ ·4H ₂ O	10 mg/L
Biotin	50 µg/L
VB ₁ HC I	100 µg/L
プロトカテク酸	15 mg/L
CuSO ₄	0.02 mg/L
CaCl ₂	10 mg/L
MOPS	40 g/L

KOHでpH 7.0に調整した後

オートクレーブ滅菌 (115°C、10 min)

RNA-seq解析のためのジャーファーメンター培養用シード培地

Glucose	5 g/L
Polypeptone	10 g/L
Yeast Extract (Difco)	10 g/L
NaCl	5 g/L
DL-Methionine	0.2 g/L

KOHでpH 7.2に調整した後

オートクレーブ滅菌 (121°C、20 min)

RNA-seq解析のためのジャーファーメンター培養用メイン培地

[A区]

Glucose	120 g/L
MgSO ₄ ·7H ₂ O	3 g/L
FeSO ₄ ·7H ₂ O	30 mg/L
MnSO ₄ ·5H ₂ O	30 mg/L

[B区]

(NH ₄) ₂ SO ₄	3 g/L
KH ₂ PO ₄	1.5 g/L
豆濃 (味の素(株)自製品)	0.8 g/L (窒素量として)
DL-Methionine	0.15 g/L
Thiamine HCl	0.45 mg/L
Biotin	0.45 mg/L
Disfoam GD-113K	0.1 mL/L

[C区]

CaCl ₂	2 g/L
-------------------	-------

各区をオートクレーブ滅菌 (121°C、20 min) した後、

A区、B区、C区の3つを混合し調製

CM-Dex培地

Glucose	5 g/L
Polypeptone	10 g/L
Yeast Extract (Difco)	10 g/L
KH ₂ PO ₄	1 g/L
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.4 g/L
FeSO ₄ ·7H ₂ O	0.01 g/L
MnSO ₄ ·5H ₂ O	0.01 g/L
Urea	3 g/L
豆濃 (味の素(株)自製品)	1.2 g/L (窒素量として)
Biotin	10 µg/L

KOHでpH 7.5に調整した後

オートクレーブ滅菌 (121°C、20 min)

S10培地プレート

Sucrose	100 g/L
Hipolypeptone	10 g/L
Yeast Extract	10 g/L
KH ₂ PO ₄	1 g/L
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.4 g/L
FeSO ₄ ·7H ₂ O	0.01 g/L
MnSO ₄ ·5H ₂ O	0.01 g/L
Urea	3 g/L
豆濃 (味の素(株)自製品)	1.2 g/L (窒素量として)
Biotin	10 µg/L
Agar	15 g/L

KOHでpH 7.5に調整した後

オートクレーブ滅菌 (121°C、20 min)

U1A*-RNA生産、diap1*-dsRNA生産のためのジャーファーメンター培養用メイン培地

[A区]

Glucose	120 g/L
MgSO ₄ ·7H ₂ O	3 g/L
FeSO ₄ ·7H ₂ O	30 mg/L
MnSO ₄ ·5H ₂ O	30 mg/L

[B区]

(NH ₄) ₂ SO ₄	3 g/L
KH ₂ PO ₄	3.5 g/L
豆濃 (味の素(株)自製品)	0.8 g/L (窒素量として)
DL-Methionine	0.15 g/L
Thiamine HCl	0.45 mg/L
Biotin	0.45 mg/L
Disfoam GD-113K	0.1 mL/L

各区をオートクレーブ滅菌 (121°C、20 min) した後、

A区とB区を混合し調製

引用文献

1. Fire, A. *et al.* Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* **391**, 806–811 (1998).
2. Matsukura, S. *et al.* Establishment of conditional vectors for hairpin siRNA knockdowns. *Nucleic Acids Res.* **31**, e77 (2003).
3. Timmons, L. *et al.* Ingestion of bacterially expressed dsRNAs can produce specific and potent genetic interference in *Caenorhabditis elegans*. *Gene* **263**, 103–112 (2001).
4. Robinson, K. E. *et al.* Double stranded RNA expression and its topical application for non-transgenic resistance to plant viruses. *J. Plant Biochem. Biotechnol.* **23**, 231–237 (2014).
5. Cagliari, D. *et al.* Management of pest insects and plant diseases by non-transformative RNAi. *Front. Plant Sci.* **10**, 1–18 (2019).
6. Sioud, M. Therapeutic siRNAs. *Trends Pharmacol. Sci.* **25**, 22–28 (2004).
7. Shalem, O. *et al.* High-throughput functional genomics using CRISPR–Cas9. *Nat. Rev. Genet.* **16**, 299–311 (2015).
8. Yin, H. *et al.* CRISPR–Cas: a tool for cancer research and therapeutics. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* **16**, 281–295 (2019).
9. Hochmann, S. *et al.* Evaluation of modified Interferon alpha mRNA constructs for the treatment of non-melanoma skin cancer. *Sci. Rep.* **8**, 1–10 (2018).
10. DeFrancesco, L. The ‘anti-hype’ vaccine. *Nat. Biotechnol.* **35**, 193–197 (2017).
11. Dolgin, E. Business: The billion-dollar biotech. *Nat. News* **522**, 26–28 (2015).
12. Beaucage, S. L. *et al.* Deoxynucleoside phosphoramidites—A new class of key intermediates for deoxypolynucleotide synthesis. *Tetrahedron Lett.* **22**, 1859–1862 (1981).
13. Milligan, J. F. *et al.* Oligoribonucleotide synthesis using T7 RNA polymerase and synthetic DNA templates. *Nucleic Acids Res.* **15**, 8783–8798 (1987).

14. Nelissen, F. H. T. *et al.* Fast production of homogeneous recombinant RNA—towards large-scale production of RNA. *Nucleic Acids Res.* **40**, e102 (2012).
15. Green, M. R. *et al.* How to Win the Battle with RNase. *Cold Spring Harb. Protoc.* **2019**, 95-98 (2019).
16. Cech, T. R. *et al.* *In vitro* splicing of the ribosomal RNA precursor of *Tetrahymena*: involvement of a guanosine nucleotide in the excision of the intervening sequence. *Cell* **27**, 487–496 (1981).
17. Ohuchi, M. *et al.* The flexizyme system: a highly flexible tRNA aminoacylation tool for the translation apparatus. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **11**, 537–542 (2007).
18. Bunka, D. H. *et al.* Development of aptamer therapeutics. *Curr. Opin. Pharmacol.* **10**, 557–562 (2010).
19. Ng, E. W. M. *et al.* Pegaptanib, a targeted anti-VEGF aptamer for ocular vascular disease. *Nat. Rev. Drug Discov.* **5**, 123–132 (2006).
20. Geary, C. *et al.* A single-stranded architecture for cotranscriptional folding of RNA nanostructures. *Science* **345**, 799–804 (2014).
21. Bechhofer, D. H. *Bacillus subtilis* mRNA decay: new parts in the toolkit. *WIREs RNA* **2**, 387–394 (2011).
22. Lasa, I. *et al.* An effort to make sense of antisense transcription in bacteria. *RNA Biol.* **9**, 1039–1044 (2012).
23. Wade, J. T. *et al.* Pervasive transcription: illuminating the dark matter of bacterial transcriptomes. *Nat. Rev. Microbiol.* **12**, 647–653 (2014).
24. Yukawa, H. *et al.* Comparative analysis of the *Corynebacterium glutamicum* group and complete genome sequence of strain R. *Microbiology* **153**, 1042–1058 (2007).

25. Maeda, T. *et al.* RNase III mediated cleavage of the coding region of *mraZ* mRNA is required for efficient cell division in *Corynebacterium glutamicum*. *Mol. Microbiol.* **99**, 1149–1166 (2016).
26. Khvorova, A. *et al.* The chemical evolution of oligonucleotide therapies of clinical utility. *Nat. Biotechnol.* **35**, 238–248 (2017).
27. Woodcock, B. A. *et al.* Country-specific effects of neonicotinoid pesticides on honey bees and wild bees. *Science* **356**, 1393–1395 (2017).
28. Ivashuta, S. *et al.* Environmental RNAi in herbivorous insects. *RNA* **21**, 840–850 (2015).
29. Zhang, J. *et al.* Full crop protection from an insect pest by expression of long double-stranded RNAs in plastids. *Science* **347**, 991–994 (2015).
30. Miguel, K. S. *et al.* The next generation of insecticides: dsRNA is stable as a foliar-applied insecticide. *Pest Manag. Sci.* **72**, 801–809 (2016).
31. Palli, S. R. RNA interference in Colorado potato beetle: steps toward development of dsRNA as a commercial insecticide. *Curr. Opin. Insect Sci.* **6**, 1–8 (2014).
32. Baum, J. A. *et al.* Control of coleopteran insect pests through RNA interference. *Nat. Biotechnol.* **25**, 1322–1326 (2007).
33. Zhu, F. *et al.* Ingested RNA interference for managing the populations of the Colorado potato beetle, *Leptinotarsa decemlineata*. *Pest Manag. Sci.* **67**, 175–182 (2011).
34. Chikami, Y. *et al.* Oral RNAi of *diapl* in a pest results in rapid reduction of crop damage. *bioRxiv* 737643 (2019) doi:10.1101/737643.
35. Takahashi, D. *et al.* AJIPHASE®: A highly efficient synthetic method for one-pot peptide elongation in the solution phase by an Fmoc strategy. *Angew. Chem.* **129**, 7911–7915 (2017).
36. Ponchon, L. *et al.* A generic protocol for the expression and purification of recombinant RNA in *Escherichia coli* using a tRNA scaffold. *Nat. Protoc.* **4**, 947–959 (2009).

37. Becker, J. *et al.* Bio-based production of chemicals, materials and fuels – *Corynebacterium glutamicum* as versatile cell factory. *Curr. Opin. Biotechnol.* **23**, 631–640 (2012).
38. Li, Z. *et al.* Analyzing the decay of stable RNAs in *E. coli*. *Meth. Enzymol.* **447**, 31–45 (2008).
39. Timmons, L. *et al.* Specific interference by ingested dsRNA. *Nature* **395**, 854–854 (1998).
40. Aalto, A. P. *et al.* Large-scale production of dsRNA and siRNA pools for RNA interference utilizing bacteriophage ϕ 6 RNA-dependent RNA polymerase. *RNA* **13**, 422–429 (2007).
41. Suzuki, H. *et al.* Extracellular production of an RNA aptamer by ribonuclease-free marine bacteria harboring engineered plasmids: a proposal for industrial RNA drug production. *Appl. Environ. Microbiol.* **76**, 786–793 (2010).
42. Suzuki, H. *et al.* Artificial RNA aptamer production by the marine bacterium *Rhodovulum sulfidophilum*: improvement of the aptamer yield using a mutated transcriptional promoter. *J. Biosci. Bioeng.* **112**, 458–461 (2011).
43. Yasueda, H. Overproduction of L-glutamate in *Corynebacterium glutamicum*. Anazawa, H., Shimizu S. (eds.) *Microb. Prod.* 165–176 (Springer, 2014).
44. Kitade, Y. *et al.* Production of 4-hydroxybenzoic acid by an aerobic growth-arrested bioprocess using metabolically engineered *Corynebacterium glutamicum*. *Appl. Environ. Microbiol.* **84**, e02587-17 (2018).
45. Date, M. *et al.* Secretion of human epidermal growth factor by *Corynebacterium glutamicum*. *Lett. Appl. Microbiol.* **42**, 66–70 (2006).
46. Nakamura, J. *et al.* Mutations of the *Corynebacterium glutamicum* NCg11221 gene, encoding a mechanosensitive channel homolog, induce L-glutamic acid production. *Appl. Environ. Microbiol.* **73**, 4491–4498 (2007).
47. Becker, J. *et al.* From zero to hero—Design-based systems metabolic engineering of *Corynebacterium glutamicum* for L-lysine production. *Metab. Eng.* **13**, 159–168 (2011).

48. Carpousis, A. J. The RNA degradosome of *Escherichia coli*: an mRNA-degrading machine assembled on RNase E. *Annu. Rev. Microbiol.* **61**, 71–87 (2007).
49. Nishio, Y. *et al.* Analysis of strain-specific genes in glutamic acid-producing *Corynebacterium glutamicum* ssp. *lactofermentum* AJ 1511. *J. Gen. Appl. Microbiol.* **63**, 157–164 (2017).
50. Miwa, K. *et al.* Cryptic plasmids in glutamic acid-producing bacteria. *Agric. Biol. Chem.* **48**, 2901–2903 (1984).
51. Santamaría, R. *et al.* Characterization of an endogenous plasmid and development of cloning vectors and a transformation system in *Brevibacterium lactofermentum*. *Microbiology* **130**, 2237–2246 (1984).
52. Yoshihama, M. *et al.* Cloning vector system for *Corynebacterium glutamicum*. *J. Bacteriol.* **162**, 591–597 (1985).
53. Smith, M. D. *et al.* Protoplast transformation in coryneform bacteria and introduction of an alpha-amylase gene from *Bacillus amyloliquefaciens* into *Brevibacterium lactofermentum*. *Appl. Environ. Microbiol.* **51**, 634–639 (1986).
54. Deb, J. K. *et al.* Plasmids of corynebacteria. *FEMS Microbiol. Lett.* **175**, 11–20 (1999).
55. Eggeling, L. *et al.* *Handbook of Corynebacterium glutamicum*. (CRC Press, 2005).
56. Tsuchida, Y. *et al.* Characterization of a new 2.4-kb plasmid of *Corynebacterium casei* and development of stable corynebacterial cloning vector. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **81**, 1107–1115 (2009).
57. Yamaguchi, R. *et al.* Determination of the complete nucleotide sequence of *Brevibacterium lactofermentum* plasmid pAM330 and analysis of its genetic information. *Agric. Biol. Chem.* **50**, 2771–2778 (1986).

58. Okibe, N. *et al.* Antisense-RNA-mediated plasmid copy number control in pCG1-family plasmids, pCGR2 and pCG1, in *Corynebacterium glutamicum*. *Microbiology* **156**, 3609–3623 (2010).
59. Franch, T. *et al.* Antisense RNA regulation in prokaryotes: rapid RNA/RNA interaction facilitated by a general U-turn loop structure. *J. Mol. Biol.* **294**, 1115–1125 (1999).
60. Nešvera, J. *et al.* Tools for genetic manipulations in *Corynebacterium glutamicum* and their applications. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **90**, 1641 (2011).
61. Kikuchi, Y. *et al.* Secretion of active-form *Streptovercillium mobaraense* transglutaminase by *Corynebacterium glutamicum*: processing of the pro-transglutaminase by a cosecreted subtilisin-like protease from *Streptomyces albogriseolus*. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**, 358–366 (2003).
62. Jäger, W. *et al.* Expression of the *Bacillus subtilis sacB* gene leads to sucrose sensitivity in the gram-positive bacterium *Corynebacterium glutamicum* but not in *Streptomyces lividans*. *J. Bacteriol.* **174**, 5462–5465 (1992).
63. Venkova-Canova, T. *et al.* Control of rep gene expression in plasmid pGA1 from *Corynebacterium glutamicum*. *J. Bacteriol.* **185**, 2402–2409 (2003).
64. Zuker, M. Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction. *Nucleic Acids Res.* **31**, 3406–3415 (2003).
65. Rodrigo, G. *et al.* RiboMaker: computational design of conformation-based riboregulation. *Bioinformatics* **30**, 2508–2510 (2014).
66. Venkova-Canova, T. *et al.* Characterization of the cryptic plasmid pCC1 from *Corynebacterium callunae* and its use for vector construction. *Plasmid* **51**, 54–60 (2004).
67. Ozaki, A. *et al.* Functional expression of the genes of *Escherichia coli* in gram-positive *Corynebacterium glutamicum*. *Mol. Gen. Genet.* **196**, 175–178 (1984).

68. Trautwetter, A. *et al.* Structural organization of the *Corynebacterium glutamicum* plasmid pCG100. *Microbiology* **137**, 2093–2101 (1991).
69. Tauch, A. *et al.* Plasmids in *Corynebacterium glutamicum* and their molecular classification by comparative genomics. *J. Biotechnol.* **104**, 27–40 (2003).
70. Ilyina, T. V. *et al.* Conserved sequence motifs in the initiator proteins for rolling circle DNA replication encoded by diverse replicons from eubacteria, eucaryotes and archaeobacteria. *Nucleic Acids Res.* **20**, 3279–3285 (1992).
71. McGuffin, L. J. *et al.* The PSIPRED protein structure prediction server. *Bioinformatics* **16**, 404–405 (2000).
72. Narasimhan, G. *et al.* Mining protein sequences for motifs. *J. Comput. Biol.* **9**, 707–720 (2002).
73. Brennan, R. G. *et al.* The helix-turn-helix DNA binding motif. *J. Biol. Chem.* **264**, 1903–1906 (1989).
74. Zotti, M. *et al.* RNA interference technology in crop protection against arthropod pests, pathogens and nematodes. *Pest Manag. Sci.* **74**, 1239–1250 (2018).
75. Tenllado, F. *et al.* Crude extracts of bacterially expressed dsRNA can be used to protect plants against virus infections. *BMC Biotechnol.* **3**, 3 (2003).
76. Ikeda, M. *et al.* Amino acid production by *Corynebacterium glutamicum*. Yukawa, H., Inui, M. (eds.) *Corynebacterium glutamicum* 107–147 (Springer, 2013).
77. Bukovska, G. *et al.* Complete nucleotide sequence and genome analysis of bacteriophage BFK20 — A lytic phage of the industrial producer *Brevibacterium flavum*. *Virology* **348**, 57–71 (2006).
78. Koptides, M. *et al.* Characterization of bacteriophage BFK20 from *Brevibacterium flavum*. *Microbiology* **138**, 1387–1391 (1992).

79. Hall, K. B. *et al.* Interaction of N-terminal domain of U1A protein with an RNA stem/loop. *Nucleic Acids Res.* **20**, 4283–4290 (1992).
80. Endoh, T. *et al.* Cellular siRNA delivery mediated by a cell-permeant RNA-binding protein and photoinduced RNA interference. *Bioconjug. Chem.* **19**, 1017–1024 (2008).
81. Hansmeier, N. *et al.* The surface (S)-layer gene *cspB* of *Corynebacterium glutamicum* is transcriptionally activated by a LuxR-type regulator and located on a 6 kb genomic island absent from the type strain ATCC 13032. *Microbiology* **152**, 923–935 (2006).
82. Toyoda, K. *et al.* The *ldhA* gene, encoding fermentative L-lactate dehydrogenase of *Corynebacterium glutamicum*, is under the control of positive feedback regulation mediated by LldR. *J. Bacteriol.* **191**, 4251–4258 (2009).
83. Yamaguchi, S. *et al.* Protein-glutaminase from *Chryseobacterium proteolyticum*, an enzyme that deamidates glutaminy residues in proteins. *Eur. J. Biochem.* **268**, 1410–1421 (2001).
84. Kikuchi, Y. *et al.* TatABC overexpression improves *Corynebacterium glutamicum* Tat-dependent protein secretion. *Appl. Environ. Microbiol.* **75**, 603–607 (2009).
85. Matsuda, Y. *et al.* Method for secretory production of protein. U.S. Patent No. 10,538,798. (2020).
86. Sato, K. *et al.* CentroidFold: a web server for RNA secondary structure prediction. *Nucleic Acids Res.* **37**, W277–W280 (2009).
87. Pátek, M. *et al.* Promoters and plasmid vectors of *Corynebacterium glutamicum*. Yukawa, H., Inui, M. (eds.) *Corynebacterium glutamicum* 51–88 (Springer, 2013).
88. Wei, H. *et al.* Identification and application of a novel strong constitutive promoter in *Corynebacterium glutamicum*. *Ann. Microbiol.* **68**, 375–382 (2018).
89. Kay, R. *et al.* Duplication of CaMV 35S promoter sequences creates a strong enhancer for plant genes. *Science* **236**, 1299–1302 (1987).

90. Khan, K. H. Gene expression in mammalian cells and its applications. *Adv. Pharm. Bull.* **3**, 257–263 (2013).
91. Barák, I. *et al.* Construction of a promoter-probe shuttle vector for *Escherichia coli* and *brevibacteria*. *Gene* **95**, 133–135 (1990).
92. Koptides, M. *et al.* Characterization and sequence analysis of the F2 promoter from coryneophage BFK20. *Acta Virol.* **38**, 223–228 (1994).
93. Gilliom, R. J. Pesticides in U.S. streams and groundwater. *Environ. Sci. Technol.* **41**, 3408–3414 (2007).
94. Gu, L. *et al.* Recent advances in RNA interference research in insects: Implications for future insect pest management strategies. *Crop Prot.* **45**, 36–40 (2013).
95. Livak, K. J. *et al.* Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. *Methods* **25**, 402–408 (2001).
96. 増田税ら. ウイルスフリー植物体の製造方法. WO2107131079A1 (2017).

発表論文

Hashiro, S., Yasueda, H. Plasmid copy number mutation in *repA* gene encoding RepA replication initiator of cryptic plasmid pHM1519 in *Corynebacterium glutamicum*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **82**, 2212-2224 (2018).

上記論文は、第 2 章に対応

Hashiro, S., Mitsuhashi, M., Yasueda, H. High copy number mutants derived from *Corynebacterium glutamicum* cryptic plasmid pAM330 and copy number control. *J. Biosci. Bioeng.* **127**, 529-538 (2019).

上記論文は、第 3 章に対応

Hashiro, S., Mitsuhashi, M., Yasueda, H. Overexpression system for recombinant RNA in *Corynebacterium glutamicum* using a strong promoter derived from corynephage BFK20. *J. Biosci. Bioeng.* **128**, 255-263 (2019).

上記論文は、第 4 章に対応

Hashiro, S., Mitsuhashi, M., Chikami, Y., Kawaguchi, H., Niimi, T., Yasueda, H. Construction of *Corynebacterium glutamicum* cells as containers encapsulating dsRNA overexpressed for agricultural pest control. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **103**, 8485-8496 (2019).

上記論文は、第 5 章に対応