

2016年度 個人特別研究費 研究成果報告書

所属・職・氏名：理工学部・教授・藤原伸介

研究課題：酢酸菌を宿主とする物質生産系の構築

研究期間：2016年4月1日～2017年3月31日

研究成果概要 (2,000字程度)

現在、組換え体(組換えタンパク質)の生産には、大腸菌を宿主にする実験系が用いられている。大腸菌はもともと腸内細菌であり、特異的選択に抗生物質が用いられているなど、安全な環境低負荷実験系とは言い難い。細胞の超音波破砕で生じるエアロゾルは、従事者を感染の危険にさらすだけでなく、大腸菌表層タンパク質やリポ多糖(LPS)が、妊婦の流産を促す。流早産のモデル動物が、大腸菌LPSや外膜タンパク質による腹腔内、あるいは子宮内投与により、構築されたのもこのような背景からである。組換え実験が一般化した現在、大腸菌実験系の危険性に対する意識は薄い。また、大腸菌の最終菌体収量は *Corynebacterium* 属細菌など、高密度培養が可能な微生物種には、遠く及ばない。高生産用宿主としての視点からも大腸菌は、優れた微生物ではない。本研究では、大腸菌に変わる安全で、培養制御が容易な選択系の宿主ベクター系の開発を目指した。酢酸菌は、アルコールが含まれる酸性環境(低pH)で、活発に増殖する。酢酸菌発酵液は食酢として使われるほか、飛翔昆虫の誘引剤としても機能する。酢酸菌の繁殖する培地には雑菌は繁殖しない。酢酸菌を宿主とし、内在性プラスミドを用い、遺伝子の高発現機構を導入することで発現ベクター系の構築を目指した。また増殖に伴う細胞内のpH変化をモニターし、外来遺伝子の発現に適したpHを維持するかを精査した。

酢酸菌 *Komagataeibacter europaeus* は震盪培養で従属栄養的に増殖し、3種類の内在性プラスミド(cryptic plasmid)を有する。一般的に改変プラスミドは宿主に大きな代謝負荷を与えるため、宿主細胞より容易に脱離しうる。染色体DNAよりウラシル合成遺伝子 *pyrE* を欠失させた株、及び潜在性プラスミド pGE3 に *pyrE* 遺伝子を連結した改変プラスミドを用いて、ウラシル要求性を指標とした相補系を構築した。一方で、他の潜在性プラスミド pGE2 は、自身が宿主細胞集団内で安定的に維持されるための機構である Toxin - antitoxin (TA) システムを有する事が示唆された。これらの知見を踏まえ、pGE2 由来改変プラスミドを用い、*K. europaeus* におけるより安定な宿主ベクター系が可能かを検証した。TAシステムでは、RNA分解酵素(トキシン)と、それを不活化する結合タンパク質(アンチトキシン)が重要な役割を果たす。*pyrE* 遺伝子を大腸菌及び酢酸菌中で複製可能なシャトルベクター pBE2 (pGE2 由来、 β -ラクタマーゼ遺伝子を含む)に連結した(pBE2-*pyrE*)。これを、pGE3 非保持かつ *pyrE* 遺伝子翻訳領域を欠失させた 3CDE (pGE3 cured, $\Delta pyrE$) 株 ($\Delta pyrE$, pGE3) に、エレクトロポレーション法により導入し、ウラシル原栄養性細胞を集積し、最少寒天培地に塗布した。得られた候補株細胞内の pBE2-*pyrE* の存在を、pBE2-*pyrE* 特異領域を標的としたPCR、及び増幅産物のシーケンス解析により確認した。TAシステムを有する pBE2-*pyrE* は細胞集団内で安定的に維持されると期待されたが、継代培養或いは富栄養条件下で培養するとプラスミドが脱落し、ウラシル原栄養性及びアンピシリン耐性を示した。この事から、導入プラスミドは相同領域(*pyrE* プロモーター領域)を介した相同組換えにより、3CDE株染色体上に組み込まれたと考えられる。プラスミド上の相同配列は

分子の安定維持には好ましくない。現在、組換えを起こすと考えられた領域を除いた宿主の構築を試みている。

酢酸菌は酢酸生産に伴う細胞外 pH の低下により、細胞内の pH 低下をも招くと考えられる。酢酸菌の増殖に依存した細胞内 pH 変化を知ることは、有用物質生産系を構築する上で非常に重要である。そこで酢酸菌 *K. europaeus* の細胞内において pH 感受性蛍光タンパク質 GFP を発現させ、そのスペクトルから pH 変化を調べた。まず部位特異的変異導入法を用いて pH 感受性 GFP (pHluorin2) を作成した。大腸菌で pHluorin2 を組換えタンパク質として生産させ、精製した。各 pH (4, 5, 6, 7, 8, 9) における 2 点の励起波長 (400 nm 及び 480 nm) に対する pHluorin2 の蛍光強度の比を算出し、pH 感受性スペクトルを確認した。*K. europaeus* に pHluorin2 発現用プラスミド pBE1-Pbla-pHluorin2 を導入し、pHluorin2 の蛍光を観察した。対数期の細胞では、蛍光スペクトル解析から、対数増殖期の細胞では pH5 程度を維持し、定常期に入るとしばらくすると pH4 以下となると推定された。このことから本菌は定常期の初期までは物質生産用宿主として機能しうると考えられる。

今後、発現用のプラスミドベクターの選択系として抗生物質耐性を指標とする予定である。本菌はアンピシリン、テトラサイクリン、ストレプトマイシンに対し感受性を示しており、これら抗生物質耐性遺伝子をプラスミドに導入し、選択系とする。また高発現に適したプロモーターのスクリーニングを行う。

本報告書は、データで gakunai@kwansei.ac.jp まで提出してください。