

学 位 論 文 題 名

Lactobacillus helveticus の分子育種に関する研究

学位論文内容の要旨

微生物は有史以前より人間が摂取する食品の製造や加工に関与してきた。その結果、現在においては発酵食品や発酵飲料は食品加工工業においてかなりの部分を占めるに至っている。乳酸菌は牛乳、肉、野菜を原料とする様々な発酵食品や飼料の菌叢の重要な構成菌であり、その役割は利用可能な糖源を素早く乳酸に転換し、pHを低下させることにある。工業的規模での発酵製品の製造では、性質のよく解かったスターターカルチャーを添加することにより常に一定品質、かつ高品質を保持してきた。スターターとして用いられる乳酸菌は酸生成能、フレーバー生成能、食感の様な望ましい性質を指標として自然界よりスクリーニングしたり、変異処理を行ない、選択するという方法が用いられて来た。

遺伝子組換え法は微生物を育種改良をするための有用な方法である。しかし、乳酸桿菌の分野ではベクター開発や遺伝子導入法に関する研究は他の微生物に比べて遅れていたが1987年にChassyらがエレクトロポレーションにより*Lactobacillus casei* の形質転換に成功して以後、急激に進展しはじめてきた。

乳酸桿菌としては多くの菌種が知られており、目的とする菌種の育種改良にはその菌種にあったベクターと形質転換法の開発が必要である。そこで、チーズやヨーグルト製造に用いられている*L. helveticus* の分子育種を最終目的として宿主ベクター系の開発研究を行なった。

1. *L. helveticus* SBT2161 より潜在性プラスミドpLJ1を単離し、制限酵素地図を作成した。また、Sangerらの方法によりpLJ1の全塩基配列を決定した。塩基数は3,292 bpで、アミノ酸353個、分子量41 kDaのタンパク質をコードしている 1,059 bpよりなるオープンリーディングフレーム(ORF)を確認した。マキシセル法により、この ORFにコードされている未知タンパク質が生産されていることを確認した。また、pLHR中のpLJ1由来のORF中のAccIを平滑末端化することにより複製能が消失することより、この未知タンパク質がpLJ1の複製に関与していることが強く示唆された。しかし、この未知タンパク質のアミノ酸配列とプラスミド中で複製に関与することが知られている他の乳酸菌のプラスミド上にコードされているRepタンパク質のアミノ酸配列を比較したが、類似性は認められなかった。

2. *L. helveticus* 中で発現することが知られているEnterococcus faecalis 由来のpAM β 1のエリスロマイシン耐性遺伝子とpLJ1および大腸菌用ベクターpBR329よりなるpLHRを構築した。本プラスミドを用いてエレクトロポレーションによる *L. helveticus* の形質転換条件を検討した。電圧の最適値は菌種や菌株により異なり、*L. helveticus* では4 kV/cmで最高の形質転換効率が得られた。また、定常期後期（22～23時間培養）の細胞で最も高い形質転換効率が得られた。更に、他の因子としてエレクトロポレーションに用いられる菌体の培養時におけるグリシンの添加が

挙げられる。1.2%のグリシンを添加したMRS培地で生育した菌体で高い形質転換効率を得られた。至適条件である1.2%のグリシンを含むMRSで22時間培養した菌体を用い、電圧4 kV/cmで 1.3×10^4 形質転換体/mlの効率を得られた。宿主株である*L. helveticus* SBT2161Cは1 μ g/mlのエリスロマイシンで生育を阻害されるのに対し、pLHRを保有するSBT2161C株は1 mg/mlのエリスロマイシン存在下でも生育可能であった。制限・修飾系は異種のDNAを修飾したり分解したりすることにより細菌の形質転換を著しく阻害することが知られており、SBT2161Cにも弱い制限・修飾系が存在することが示唆された。

3. 乳糖はミルクに存在する唯一の糖源であるため、発酵乳の製造に使用される*L. helveticus* においては、乳糖資化能は食品に利用可能な効果的選択マーカーとなる。そこで、*L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* より β -ガラクトシダーゼ遺伝子を取得し、その塩基配列を決定した。 β -ガラクトシダーゼ遺伝子をコードするORFの塩基数は3,024 bpで、アミノ酸1,008個（分子量114,154 Da）よりなっていた。

次に、 β -ガラクトシダーゼ活性を選択マーカーとするベクター用の宿主として β -ガラクトシダーゼ欠損株の取得を行った。*L. helveticus* SBT2161Cを300mg/mlのニトロソグアニジンで30分間37℃で処理した。 β -ガラクトシダーゼ欠損変異株は 2.4×10^2 の頻度で得られ、そのなかで変異を安定に保持している一株をSBT2195と命名した。このSBT2195株の形質転換効率は親株のわずか1/20であった。この低い形質転換効率のためエレクトロポレーション法では遺伝子操作したプラスミドDNAを直接 *L. helveticus* にクローニングすることはできない。しかし、*E. coli* と *L. helveticus* 間のシャトルベクターの形で用いるならば低い形質転換効率であるエレクトロポレーション法でも十分である。

4. β -ガラクトシダーゼ活性を選択マーカーとするベクターの構築を行った。pLJ1の複製に関与する領域を含む断片、pBR329のori断片、*L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* の β -ガラクトシダーゼ遺伝子およびpAM β 1のエリスロマイシン耐性遺伝子を連結することによりプラスミド pBG8Em1と pBG8Em2を構築した。pBG8Em1とpBG8Em2はエリスロマイシン耐性遺伝子と β -ガラクトシダーゼ遺伝子が同一方向と反対方向にそれぞれ挿入されている。両者とも β -ガラクトシダーゼ遺伝子は発現しているが、pBG8Em2を保有している*L. helveticus* SBT2195は乳糖を唯一の糖源とする培地では生育できなかった。この結果は、*L. helveticus* SBT2195が乳糖を唯一の糖源とする培地で生育するにはエリスロマイシン耐性遺伝子のプロモーターからのリードスルーが必須であることを示している。

次に、pLJ1の複製に関与する領域を含む断片、pBR329のori断片、*L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* の β -ガラクトシダーゼ遺伝子および pAM β 1のエリスロマイシン耐性遺伝子のプロモーター断片よりなる食品に応用するには不適当な薬剤耐性遺伝子を全く含まないプラスミドpBG10を構築した。SBT2195(pBG10)の β -ガラクトシダーゼ活性は親株の10倍であった。このことはpBG10のエリスロマイシン耐性遺伝子のプロモーターは強く、外来性遺伝子発現に利用できることを示唆している。

本ベクターのエリスロマイシン耐性遺伝子のプロモーターの下流に発現ベクターとしても使用できるように外来性遺伝子のクローニング部位としてのSacI部位を配した。SacI部位の3'-末端をKlenow断片で除くことにより外来性遺伝子は翻訳開始コドンATGの下流に挿入可能とる。pBG10では、このSacI部位に加えてBamHI、SalI、PstI部位が一般的クローニング部位として利用可能である。

5. ATG以降から停止コドンまでをPCRで増幅し、pBG10のエリスロマイシン耐性遺伝子のプロモーターの下流のSacI部位に挿入した*Bacillus licheniformis*の α -アミラーゼ遺伝子の構造遺伝子(1,536 bp)は*L. helveticus*で発現し、その形質転換体は乳糖を唯一の糖源とする培地で生育可能であった。これらの結果は α -アミラーゼ遺伝子断片(1,536 bp)の大きさまでの外来性遺伝子は β -ガラクトシダーゼ遺伝子の発現には影響しないことを示している。

β -ガラクトシダーゼ欠損株である*L. helveticus* SBT2195株と β -ガラクトシダーゼ活性を唯一の選択マーカーとするpBG10との組み合わせは食品に利用可能な宿主ベクターシステムであり、フレーバーの生産、酸耐性の付与、酸生成能に関与する外来性遺伝子をクローニングし発現させるために役立つものと考ええる。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 富 田 房 男

副 査 教 授 本 間 守

副 査 教 授 匂 坂 勝之助

学 位 論 文 題 名

Lactobacillus helveticus の分子育種に関する研究

本論文は、緒論と序論が2章、実験の部が5章、和文総括と英文総括が1章、計8章より構成されている。和文70頁、図32、表6、引用文献120からなり、ほかに参考論文11編が付されている。乳酸菌は乳、肉、野菜を原料とする様々な発酵食品や飼料の菌叢の重要な構成菌であり、その役割は利用可能な糖源を素早く乳酸に転換し、pHを低下させることにある。工業的規模での発酵製品の製造では、性質のよく解かったスターターカルチャーを添加することにより常に一定品質かつ高品質を保持してきた。スターターとして用いられる乳酸菌は酸生成能、フレーバー生成能、食感の様な望ましい性質を指標として自然界よりスクリーニングしたり、変異処理を行ない、選択するという方法が用いられて来た。しかし、それには膨大なスクリーニングを必要とした。遺伝子組換え法は微生物を育種改良をするための有用な方法である。しかし、乳酸桿菌の分野ではベクター開発や遺伝子導入法に関する研究は他の微生物に比べかなり遅れていたが、1987年にChassyらがエレクトロポレーションにより*Lactobacillus casei* の形質転換に成功して以後、急激に進展しはじめてきた。乳酸桿菌として多くの菌種が知られており、目的とする菌種の育種改良にはその菌種にあったベクターと形質転換法の開発が必要である。

本研究では、古くよりチーズやヨーグルト製造上重要である乳酸桿菌*Lactobacillus helveticus* の分子育種を最終目的として食品に利用可能な発現ベクターの構築を行うとともに、宿主菌の形質転換条件を明らかにしたものである。

第1章では本研究のねらいと意義について述べている。

第2章の序論では乳酸菌と人類の関わりと遺伝学的研究の歴史および組換え微生物使用の現状を述べている。

第3章では*L. helveticus* の潜在性プラスミドについて述べられ、下記の内容が含まれている。

L. helveticus SBT2161より潜在性プラスミドpLJ1を単離し、制限酵素地図を作成し、その塩基配列を決定した。複製に必要なori領域と推定されるオープンリーディングフレーム(ORF)を確認した。マキシセル法によりORFにコードされている未知タンパク質が生産されていることが示された。

第4章では*L. helveticus* の形質転換法について述べられ、下記の内容が含まれている。

L. helveticus 中で発現することが知られている *Enterococcus faecalis* 由来の *pAM β 1* のエリスロマイシン耐性遺伝子を選択マーカーとする大腸菌とのシャトルベクター *pLHR* を構築した。本プラスミドを用いてエレクトロポレーションによる *L. helveticus* の形質転換条件を決定した。また、*SBT2161C* に弱い制限・修飾系が存在することが示唆された。

第5章では *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* の β -ガラクトシダーゼのクローニングと塩基配列について述べられ、下記の内容が含まれている。

食品に利用可能な効果的選択マーカーである β -ガラクトシダーゼ遺伝子を *L. delbrueckii subsp. bulgaricus* より取得し、その塩基配列より必要最小領域を決定した。

第6章では β -ガラクトシダーゼ活性欠損株の取得について述べられ、下記の内容が含まれている。

L. helveticus SBT2161C ニトロソグアニジンで処理し、そのなかで変異を安定に保持している一株を *SBT2195* と命名した。この *SBT2195* 株の形質転換効率は親株のわずか $1/20$ であった。

第7章では食品に利用可能なベクターの構築と外来性遺伝子の発現について述べられ、下記の内容が含まれている。

pLJ1 の複製に関与する領域を含む断片、*pBR329* の *ori* 断片、*L. delbrueckii subsp. bulgaricus* の β -ガラクトシダーゼ遺伝子および *pAM β 1* のエリスロマイシン耐性遺伝子を連結したプラスミドを構築した。*SBT2195* が乳糖を唯一の糖源とする培地で生育するにはエリスロマイシン耐性遺伝子のプロモーターからのリードスルーによる β -ガラクトシダーゼ遺伝子の発現が必須であることが示された。

エリスロマイシン耐性遺伝子のプロモーター領域の下流に発現ベクターとしてのクローニング部位 *SacI* を介して β -ガラクトシダーゼ遺伝子を連結し、すべての薬剤耐性遺伝子領域を除去した food-grade 発現ベクター *pBG10* を構築した。ATG 以降から停止コドンまでを PCR で増幅し、*pBG10* の *SacI* 部位に挿入した *Bacillus licheniformis* の α -アミラーゼ遺伝子は *L. helveticus* で発現した。このことから、 α -アミラーゼ遺伝子断片 (1,536 bp) の大きさまでの外来性遺伝子は β -ガラクトシダーゼ遺伝子の発現には影響しないことが示唆された。

以上の様に、*L. delbrueckii subsp. bulgaricus* の β -ガラクトシダーゼ活性を選択マーカーとする食品に利用可能な *L. helveticus* の発現ベクターを構築するとともに形質転換法を決定し、乳酸桿菌における遺伝子育種に関して基礎的な貢献を果たした。

よって、審査員一同は、別に行った学力確認試験の結果と併せて、本論文の提出者 橋 場 炎 は博士（農学）の学位を受けるのに十分な資格があるものと認定した。