

# ルーメン細菌における、プラスミド解析をもとにしたホスト・ベクター系の開発と、キシラナーゼ遺伝子の発現に関する研究

中 村 睦

反すう動物は胃を4つ持っており、第一番目の胃はルーメンと呼ばれている。ルーメン中に生息する共生微生物の働きによって、摂取した牧草の細胞壁中の繊維が分解・代謝され、反すう動物はその代謝産物を栄養源として利用することができる。ルーメンの機能を改善するために、ルーメン細菌に遺伝子工学技術を用いて外来遺伝子を導入する試みがおこなわれている。これには、ルーメン細菌の保有するプラスミドを改良して新たにベクターを構築し、ホスト・ベクター系を作製することが必要となる。本研究では、ルーメン細菌の *Selenomonas ruminantium* と *Streptococcus bovis* において、新たにプラスミドを分離・解析してホスト・ベクター系を構築することを試み、作製したホスト・ベクター系を利用して外来遺伝子の導入試験を行った。

*S. ruminantium* S20株が保有するプラスミド pONE429 と pONE430 について、全塩基配列を決定し、解析した。pONE429 (全塩基配列は GenBank に AB003192 で登録) と pONE430 (AB003193) の推定 open reading frame は、そのアミノ酸配列の相同性から複製開始蛋白質 (Rep) をコードしており、両プラスミド共にローリングサークル型の複製をすると推測された。一方、大腸菌と嫌気性菌とのシャトルベクターを構築するために、大腸菌で使用するベクター pACYC184 の複製領域とクロラムフェニコール耐性遺伝子、pUC18 ベクターのマルチクローニングサイトを M13 プライマーセットで増幅した DNA 断片、そして嫌気性菌内で働く選択マーカーとして pAM $\beta$ -1 プラスミドのエリスロマイシン耐性遺伝子を結合し、pECM184 プラスミドを作製した。これに pONE429 と pONE430 の複製領域と思われる部分を挿入してプラスミドベクターを構築し、*S. ruminantium* 全21株にエレクトロポレーションにより導入を試みた。しかし、形質転換体は得られず、*S. ruminantium* ではホスト・ベクター系を構築できなかった。この原因として、*S. ruminantium* のもつ制限・修飾系による外来遺伝子の分解が考えられた。

*S. bovis* JB1株の保有するプラスミド pSBO1 と pSBO2 について、全塩基配列を決定し、解析した (図1)。pSBO1 (AB021464) では、Rep がその遺伝子の上流にある繰り返し配列に結合することをゲルシフトアッセイにより確認した。Rep の相同性から $\theta$ 型の複製をすると推察される。pSBO2 (AB021465) は、pLS1 プラスミドの複製開始領域と相同性の高い領域が確認され、ローリングサークル型の複製をするプラスミドであると

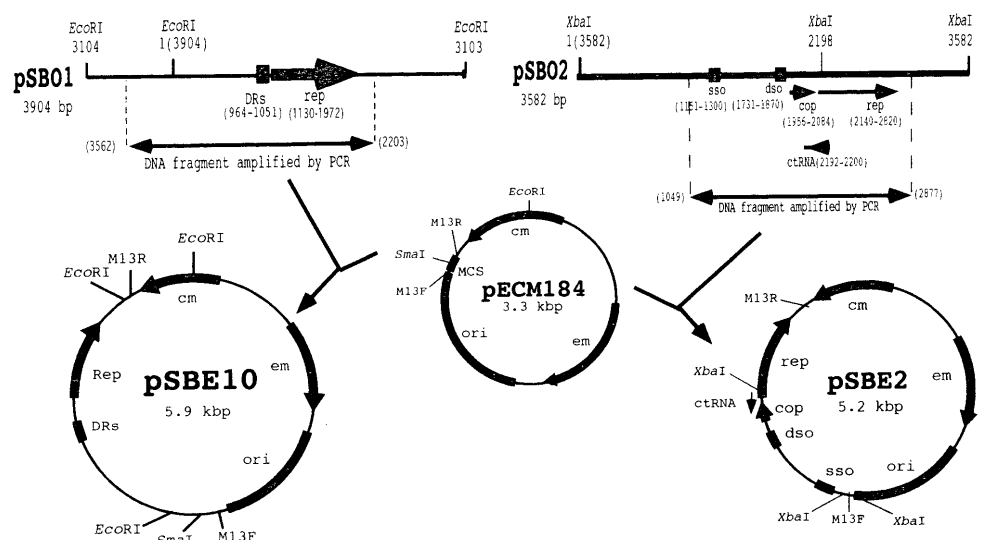


図1. pSBO1 と pSBO2 の地図と、pSBE10 と pSBE2 の構築

pSBO1, pSBO2 から PCR で増幅した DNA 断片を、pECM184 の *Bam*HI, *Hind*III 部位に挿入し、組み換えプラスミド pSBE10, pSBE2 を作製した。rep は複製開始蛋白質遺伝子、DRs は繰り返し配列 (ダイレクトリピート)、cop は抑制蛋白質遺伝子、dso は二本鎖複製起点、sso は一本鎖複製起点、ctRNA は逆向き転写 RNA、ori は pACYC184 プラスミドの複製領域、cm はクロラムフェニコール耐性遺伝子、em はエリスロマイシン耐性遺伝子、MCS はマルチクローニングサイト、M13F は M13 Forward プライマーが、M13R は M13 Reverse プライマーが結合する部位、*Eco*RI, *Bam*HI, *Xba*I, *Hind*III, *Sma*I は制限酵素切断部位。

推測された。両プラスミドの複製領域と思われる部分を pECM184 プラスミドに挿入してプラスミドベクター pSBE10 と pSBE2 を構築し (図 1), *S. bovis* 全 21 株に導入を試みた。その結果, pSBE10 と pSBE2 は, ホスト菌 *S. bovis* 12-U-1 株と no8 株に導入することができた。pSBE10 の挿入領域をさらに断片化して調べた結果, 繰り返し配列と Rep 遺伝子をもつ pSBE11 が導入可能であり, この繰り返し配列と Rep 遺伝子の領域が複製領域であることが判明した。pSBE2 は, 導入された後では 160 bp を欠失している pSBE2A プラスミドになっていた。この pSBE2A に遺伝子を組み込んで *S. bovis* に導入すると, 形質転換体中のプラスミドの大きさにバリエーションが生じた。これはプラスミドの複製様式によるものかもしれない。したがって, pSBE10 と pSBE11 の方が安定したベクターであり, さらに pSBE11 の方が小さいために使用し易いベクターとなる。このように, *S. bovis* 菌株における新しい宿主・ベクター系の作製に成功した。

ルーメン細菌の中で主要な繊維分解菌である *Ruminococcus albus* では, キシラナーゼの遺伝子解析がなかったため, *R. albus* 7 株よりキシラナーゼ遺伝子 (*xynA*) を分離して解析した (U43089)。そしてこの遺伝子を, 作製した宿主・ベクター系を使用して, *S. bovis* 内で発現させる試みをおこなった。*S. bovis* JB1 株のリケナーゼ遺伝子 (Z92911) が保持する, 菌体外へ蛋白質を放出するためのシグナルペプチドとそのプロモーター領域を, *xynA* に結合させてベクター pSBE11 に挿入し, pXA プラスミドを作製した (図 2)。これを *S. bovis* 12U-1 株に導入したところ, 得られた形質転換体 *S. bovis* 12UXA 株はキシラナーゼ活性を獲得していた。そして酵素の約 70% が菌体外に放出されていると考えられた。また, *S. bovis* 12UXA 株は, オートスペルトキシランとバーチウッドキシランを分解することができた (図 3)。

以上の結果から, *S. bovis* に, *R. albus* の *xynA* を導入して発現させ, 新しい能力を付加することに成功した。これは, ルーメン細菌を遺伝子工学技術を用いて改良し, 反すう動物の生産能力を高めるための第一歩である。

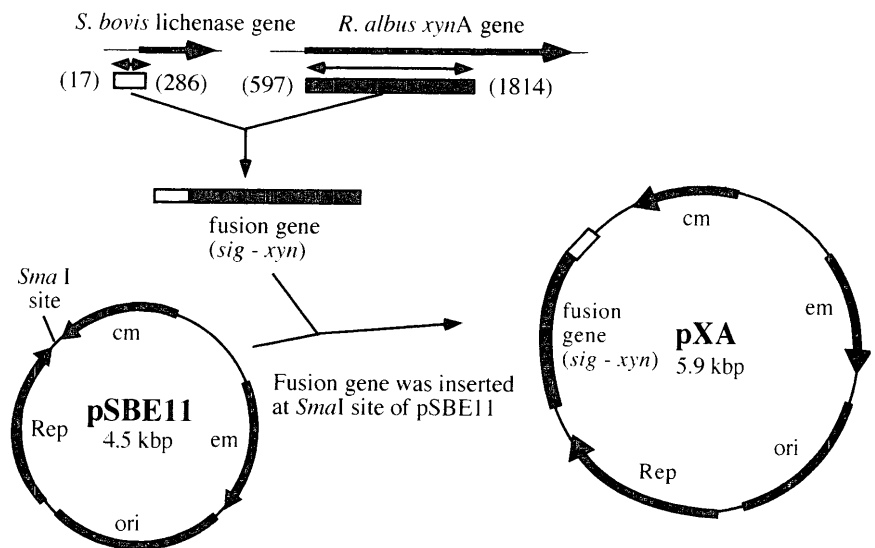


図 2. pXA プラスミドの構築

( ) 内の数字は塩基番号, Rep は *S. bovis* の複製開始蛋白質, ori は大腸菌の複製領域, cm はコロラムフェニコール耐性遺伝子, em はエリスロマイシン耐性遺伝子を示す。

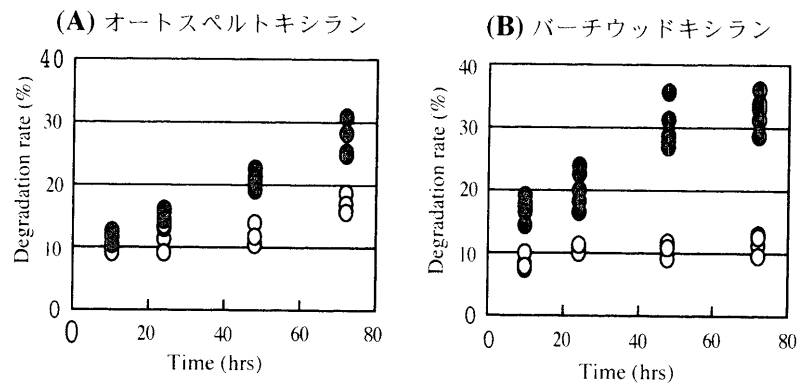


図 3. キシラン分解率

(A) はオートスペルトキシラン, (B) はバーチウッドキシランを基質として用いたときの分解率。 *S. bovis* 12-U-1 は○, 12UXA は●で示す。