

Streptomyces 属放線菌用誘導高発現ベクターのシャトル化

橋本 義輝・松本 雅子・小林 達彦*

Streptomyces 属放線菌の有用性

Streptomyces 属放線菌は、ストレプトマイシンをはじめ、さまざまな抗生物質を二次代謝産物として生産する。既存の抗生物質の2/3は本属放線菌が生産するといわれている。また、生産した二次代謝産物は、動物用の抗生物質である抗寄生虫薬・農薬・免疫抑制剤などとしても広く使用されている。2015年にノーベル生理学・医学賞を受賞された大村智 北里大学特別栄誉教授らの発見で大きな注目を集めたエバメクチンは土壌から採取された Streptomyces avermitilis が生産し、その化学誘導体がイベルメクチンである。また、キシラナーゼ、トランスグルタミナーゼなどの酵素が Streptomyces 属放線菌から発見され、その中には工業的に利用され、我々の豊かな日常生活に大きく貢献している有用酵素もある。これらの理由から、Streptomyces 属放線菌は今日の応用微生物学上きわめて重要な菌群として有名である。

Streptomyces 属用誘導型発現ベクター pSH19

Streptomyces 属放線菌による有用物質生産の重要性を考慮すると、本属のさらなる高機能化を目指す微生物育種工学の観点から本属放線菌で利用可能な大量発現系の開発が望まれていた。これまでに、誘導剤を添加せずに発現可能な構成型プロモーターや、誘導剤の添加で発現をコントロールできる誘導型プロモーターの利用例は存在していた。しかし、基礎研究レベルにおいてもその発現は微弱で、二次代謝産物生産に悪影響を及ぼす可能性のある化合物を誘導剤として使用するなど、これらの発現系の有用性はきわめて限定的なものであった。

そこで、筆者らは Streptomyces 属とは異なるが、同じ放線菌に属する Rhodococcus 属微生物のニトリル代謝酵素の著量誘導発現に着目した。アクリルアミドやニコチンアミドの工業生産のバイオ触媒として活躍している Rhodococcus rhodochrous J1 株は¹⁾、培地にイソバレロニトリルあるいはε-カプロラクタムを誘導物質として添加すると、ニトリラーゼを選択的かつ、無細胞抽出液の35%以上を占めるほど大量に生産する²⁾。この遺伝子誘導発現調節機構を解析し、ニトリラーゼ遺伝子プロモーター (PnitA)・転写調節タンパク質 (NitR)・誘導

剤という、きわめてシンプルな構成要素のみで機能することを発見した³⁾。この異常なほどの誘導型発現系が Streptomyces 属でも機能することを明らかにし、PnitA-NitR システムと命名したタンパク質発現系を搭載する新規誘導型高発現ベクター pSH19 を開発した⁴⁾。pSH19 を用いると、グラム陽性細菌由来の酵素のみならず、グラム陰性細菌や真核生物由来⁵⁾の酵素・タンパク質の誘導的な大量発現が可能となり、酵素によっては全可溶性タンパク質の40%に及ぶ、きわめて著量の誘導生成が認められた。さらに、Streptomyces griseus や S. avermitilis などの工業生産利用株を含め、幅広い Streptomyces 属宿主で機能することを確認した⁴⁾。これらの特徴から Streptomyces 属放線菌の育種改良・物質生産用の基盤技術として、基礎研究分野のみならず応用研究分野で高い注目を浴びている。

pSH19のシャトル化と安定性

pSH19 は Streptomyces 属で機能する複製領域しかもたないため、宿主は Streptomyces 属放線菌に限定される。筆者らは pSH19 構築時から本ベクターのシャトル化を試みていたものの、大腸菌のプラスミド複製領域を導入すると大腸菌内で複製後にプラスミド領域の一部が欠失するなどシャトルベクターの不安定性から実験を一時中断していた。誘導型高発現ベクター pSH19 は希望者には分与を行い、多くの研究者に広く使用されているが、大腸菌を宿主として利用可能な本ベクターのシャトル化の希望が多く寄せられた。特に、扱っていた酵素・タンパク質がたまたま Streptomyces 属放線菌由来で、大腸菌を宿主とするそれらの大量発現を断念し、Streptomyces 属放線菌での大量発現系の構築を試みようとする研究者にとっては、Streptomyces 属放線菌の形質転換などはハードルが高く、せめて発現プラスミドの構築くらいは大腸菌を宿主として行えないかとの要望も多かった。そこで、筆者らは pSH19 のシャトル化を再開した。Streptomyces 属放線菌由来 pIJ101 のプラスミド複製領域と大腸菌の ColE1 型プラスミド複製領域の両方をもつ Escherichia coli-Streptomyces シャトルベクターが存在するため、pIJ101 のプラスミド複製領域をもつ pSH19 に ColE1 型プラスミド複製領域を導入することにした。

*著者紹介 筑波大学大学院 生命環境科学研究科 (教授)

pSH19のシャトル化に際し、以下に示すいくつかの改良を行った。これまでpSH19のシャトル化を試みるにあたり、大腸菌でのプラスミド保持のためにアンピシリン耐性遺伝子を使用していたが、アンピシリン耐性遺伝子の他にクロラムフェニコール耐性遺伝子、カナマイシン耐性遺伝子も試すことにした。制限酵素処理したpSH19のDNA断片と、ColE1型プラスミド複製領域と大腸菌用抗生物質耐性遺伝子をもつDNA断片はこれまでligation法で連結していたが(ColE1プラスミド複製領域と大腸菌用抗生物質耐性遺伝子をもつDNA断片自身のself-ligationがきわめて起こりにくい)、Gibson assembly法を用いることにした。制限酵素処理したpSH19のDNA断片に対して、ColE1型プラスミド複製領域と大腸菌用抗生物質耐性遺伝子をもつDNA断片を導入する方向は2通り考えられるが、Gibson assembly法ではプライマーの設計で導入方向をコントロールできるため両方試すことにした。さらに、シャトルベクター構築時の宿主には一般的な大腸菌株であるJM109を利用していたが、DH10B, TOP10に加え、大腸菌内で不安定な遺伝子のクローニングに適したStbl2, Stbl3およびStbl4を利用することとした。制限酵素処理したpSH19のDNA断片に対して、抗生物質耐性遺伝子3種、導入方向2通りで連結反応を行い、その6通りの反応溶液(すなわち、pESH19aF, pESH19aR, pESH19cF, pESH19cR, pESH19kF, pESH19kRの6種のシャトルベクター)を用いて5種の大腸菌をそれぞれ形質転換した。合計30通りの組合せの形質転換体を、抗生物質を含む液体培地で培養し、その培養液を新たな抗生物質を含む液体培地に1%植菌し培養を行った。この操作を2回繰り返し、最終的に3回継代培養を行った培養液から菌体を集菌し、プラスミドを抽出した。その後、制限酵素処理しアガロースゲル電気泳動によりDNAサイズを確認することで大腸菌内でのプラスミド安定性を評価し

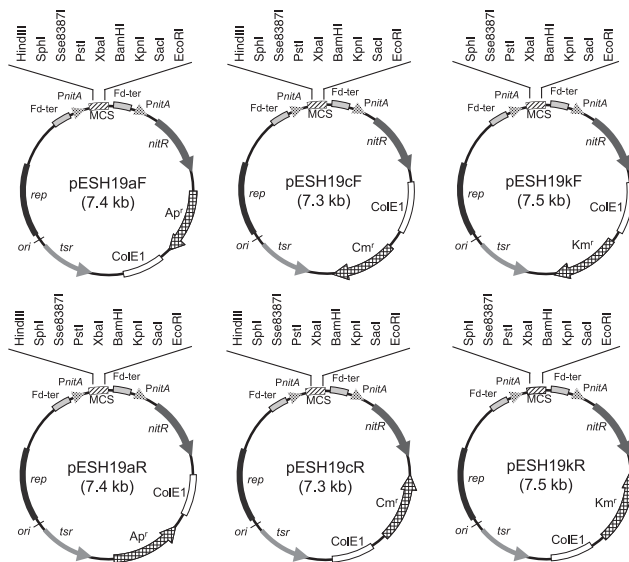


図1. *Streptomyces* 属用誘導高発現シャトルベクター

た。その結果を表1に示す。シャトルベクターと大腸菌宿主の組合せによっては、安定に保持されないプラスミドがいくつかあった。特に、大腸菌で不安定なダイレクトリピートを含む断片のクローニングに適しているとされているStbl4ではシャトルベクターの安定性は低かったが、Stbl2ではすべてのシャトルベクターが安定に保持された。今回、30通りの条件を網羅的に試すことで、6種のシャトルベクターの構築に成功した(図1)⁶⁾。

しかし、この30条件でのシャトルベクターの安定性は60%であり、シャトルベクターの安定性は大腸菌宿主に深く関係することが示唆された。宿主に用いた5種の大腸菌の遺伝子型を比較したが、シャトルベクターの安定性に与える影響は見いだせず、理由は不明のままである。

構築した6種のシャトルベクターを用いて、*Streptomyces lividans* TK24株を形質転換し、同様の方法でプラスミド安定性を評価したが、いずれのシャトルベクターも *Streptomyces* 属内では安定に保持された。

pSH19 シャトルベクターの特徴

構築した6種のシャトルベクターのいずれもColE1型プラスミドの複製領域をもち、大腸菌内では1細胞あたり500-700コピーであるため、プラスミドの大量調製が容易である。また、いずれのシャトルベクターも *Streptomyces* 属放線菌が宿主の場合にはチオストレプトンで選択可能で、pIJ101由来のプラスミド複製領域をもつため、*Streptomyces* 属放線菌内では1細胞あたり300コピーの高コピー型発現ベクターとして機能する。シャト

表1. pSH19 シャトルベクターの大腸菌内での安定性

(h)	TOP10	DH10B	Stbl2	Stbl3	Stbl4
pESH19aF	○	○	○	○	×
pESH19aR	○	○	○	×	○
pESH19cF	○	○	○	○	×
pESH19cR	○	○	○	×	×
pESH19kF	○	×	○	×	×
pESH19kR	×	×	○	×	×

○: 安定, ×: 不安定

ルベクターの内, pESH19aF, pESH19aR, pESH19cF, pESH19cRはpSH19と同様, マルチクローニングサイト内のHindIII, SphI, Sse8387I, PstI, XbaI, BamHI, KpnI, SacIおよびEcoRIがユニークサイトとして利用できる. pESH19kF, pESH19kRではカナマイシン耐性遺伝子内にHindIIIサイトがあるためユニークではなくなるが, それ以外の7種がユニークサイトとして利用可能である⁶⁾. また, 今回使用したカナマイシン耐性遺伝子は*Streptomyces*属放線菌内でも機能するため, pESH19kF, pESH19kRは*Streptomyces*属放線菌が宿主の場合, チオストレプトンのみならずカナマイシンも選択マーカーとして利用可能である.

pSH19シャトルベクターの機能解析

構築したpSH19シャトルベクターの機能解析を行うために, pESH19cF, pESH19kF, pESH19aFについて, 一般的に利用されている大腸菌TOP10を宿主に用いて各種発現プラスミドを構築した. レポーター遺伝子としては, グラム陰性菌である*Pseudomonas putida*由来カテコール2,3-ジオキシゲナーゼ遺伝子 (*xylE*), グラム陽性菌である*R. rhodochrous* J1由来ニトリラーゼ遺伝子 (*nitA*)⁷⁾および*Arthrobacter pascens* F164由来*N*-置換ホルムアミドデホルミラーゼ遺伝子 (*nfdA*)⁸⁾を使用した. 構築した各種発現プラスミドで形質転換した*S. lividans* TK24株を培養し, 無細胞抽出液を調製後, 各レポータータンパク質の酵素活性を測定した. その結果, 誘導条件で培養した場合は, 各pSH19シャトルベクターはpSH19とほぼ同等のタンパク質発現能力を示した. pESH19cFまたはpESH19kFを使用した時のカテコール2,3-ジオキシゲナーゼ, pESH19kFまたはpESH19aFを使用した時の*N*-置換ホルムアミドデホルミラーゼの発現量はpSH19の場合よりも多かった. 一方, 形質転換体を非誘導条件で培養した場合には, いずれの発現プラスミドでも当該レポータータンパク質の発現は認められず, 発現のオン・オフが厳密に制御できた. pSH19シャトルベクターの機能解析については, pSH19での発現量と比較するために, pSH19の機能解析時に使用したレポーター遺伝子のみしか解析を行っていない. しかし, pSH19シャトルベクターは, pSH19にColE1型プラスミド複製領域と大腸菌用抗生物質耐性遺伝子を導入しただけで, *Streptomyces*属放線菌内で機能するpIJ101由来のプラスミド複製領域, チオストレプトン耐性遺伝子, PnitA-NitRシステムには手を加えていない. そのため,

pSH19で確認した特徴はそのまま*Streptomyces*属内で保持されることは容易に想像できる. すなわち, PnitA-NitRシステムは誘導発現に際し*trans*に働く他の染色体由来因子を必要としないため, すべての*Streptomyces*属放線菌内でイソバレロニトリルあるいは毒性が低く安価なε-カプロラクタムの添加により誘導発現が期待される.

おわりに

*Streptomyces*属放線菌用誘導型高発現ベクターpSH19のシャトル化に成功したことで, 大腸菌を宿主として発現プラスミドの構築を行えるなど迅速な研究が可能となるが, これ以外にもいくつか利点がある. 前述したように, pESH19kF, pESH19kRは*Streptomyces*属宿主がチオストレプトン耐性であっても, カナマイシン感受性であれば, カナマイシンを選択マーカーとして形質転換体を取得できる. また, *Streptomyces*属放線菌は制限修飾系が強いため形質転換頻度が極端に悪いことが多い. そのような場合でも, 制限修飾系を破壊した大腸菌株を宿主として調製したプラスミドで形質転換を行えば, 形質転換頻度を上げることができる. 制限修飾系を破壊した大腸菌株でのシャトルベクターの安定性は不明だが, pSH19シャトルベクターは6種あるのいずれかのシャトルベクターは安定であろう. pSH19のみならずpSH19シャトルベクターが多く*Streptomyces*属放線菌の育種改良・物質生産に広く利用されれば幸いである.

謝 辞

本研究の一部は, 文部科学省科研費および内閣府最先端・次世代研究開発支援プログラムにより実施したものであり, ここに厚くお礼申し上げます.

文 献

- 1) Kobayashi, M. and Shimizu, S.: *Nat. Biotechnol.*, **16**, 733 (1998).
- 2) Nagasawa, T. *et al.*: *Arch. Microbiol.*, **150**, 89 (1988).
- 3) Komeda, H. *et al.*: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **93**, 10527 (1996).
- 4) Herai, S. *et al.*: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **101**, 14031 (2004).
- 5) Matsumoto, M. *et al.*: *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **80**, 1230 (2016).
- 6) Tsuji, Y. *et al.*: *Plant Cell Physiol.*, **53**, 1043 (2012).
- 7) Kobayashi, M. *et al.*: *J. Biol. Chem.*, **267**, 20746 (1992).
- 8) Fukatsu, H. *et al.*: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **101**, 13726 (2004).