

(様式第9 別紙2：公開版)

養成技術者の研究・研修成果等

1. 養成技術者氏名： 岡井 直子
2. 養成カリキュラム名： コリネ型細菌の遺伝子機能解析に関する研究
3. 養成カリキュラムの達成状況

コリネ型細菌は各種アミノ酸、核酸の工業生産に用いられてきた有用細菌である。生物機能を活用した基盤技術開発・宿主細胞の創製と応用「コリネ型細菌宿主細胞創製技術の開発とその応用」プロジェクトにおいて、同研究室はコリネ型細菌の物質生産に必須・不要遺伝子の判別を行うとともに、染色体上の多数遺伝子操作を行うことにより生産に適した安定な汎用宿主の開発を行っている。個々の遺伝子の機能を明らかにするために、遺伝子破壊株構築による機能解析が必須である。

今年度は本カリキュラムにおいてコリネ型細菌の高効率遺伝子破壊技術について開発を行い、人工トランスポゾンを用いたランダム遺伝子破壊方法を設定するとともに同方法を用いたランダム遺伝子破壊株ライブラリーの構築を実施した。コリネ型細菌の遺伝子破壊方法は従来、複数回の遺伝子組み換え操作が必要であり長時間を要していたが、ランダム遺伝子破壊方法の設定により省力化・高効率化を達成することができた。

次に未知遺伝子/必須遺伝子の解析を実施した。同ライブラリーの破壊株による網羅的遺伝子機能解析の結果により *C. glutamicum* R 株において富栄養条件における生育に非必須と考えられる約 700 の遺伝子を同定することができた。コリネ型細菌における広範囲な遺伝子破壊株ライブラリー構築は以前に例はなく、有用物質生産菌である本菌の代謝解析、産業上の利用の基盤となるものである。

現在はコリネ型細菌の物質高生産株の構築に関して基礎となる研究を行っている。各種物質生産に際して糖(単位重量)当たりの収率を最大限に引き出すことは重要な目標であり、そのため外界からの糖輸送経路については詳しい知見が必要である。ここで糖輸送系酵素の遺伝子破壊株について機能解析を行ったところ、一部の株について興味深い表現型が観察され、現在は増殖速度および糖消費速度等の詳しい解析を行っている。

これらの遺伝子破壊株構築・生理機能解析で得られたデータはミニマムゲノム宿主創製に必須な遺伝子機能解析の情報として貴重であり、サブテーマとして平行して進行中の大規模ゲノム削除株構築の結果と統合することで、ミニマムゲノム宿主創製のためのコリネ型細菌ゲノム上における新たな削除可能な領域の情報とすることができる。

4. 成果

コリネ型細菌の遺伝子機能解析技術の開発

(1) コリネ型細菌の遺伝子破壊株ライブラリーの構築

コリネ型細菌は数十年にわたり各種アミノ酸、核酸等の工業生産に用いられてきた有用細菌である。工業的に利用されている株の多くはランダム変異により構築され、物質高生産株の育種を目指して現在まで数々の変異が重ねられてきた。全ゲノム配列が明らかである現在、標的を明らかとした変異株構築とプロテオーム解析・トランスクリプトーム解析を含めた変異株の機能解析が可能である。*C. glutamicum* の単一遺伝子破壊株について生理機能、代謝能、発現制御等を詳細に解析することにより、目的物質生産に関する必要遺伝子群とミニマムゲノム宿主創製のために削除し得る不要遺伝子群の双方を明らかとすることを目的とし、前年度に継続して *C. glutamicum* R 株の遺伝子破壊株ライブラリーの構築を実施した。全遺伝子を標的とした遺伝子破壊株ライブラリー構築に際し、本年度はミニトランスポゾンを用いた高効率遺伝子破壊法を開発を行った。

コリネ型細菌では、環状 DNA に比して直鎖状 DNA による形質転換効率が著しく低く、また、大腸菌によりメチル化された DNA が強く制限される。このため本研究グループでは、電気パルス法とパラメータの最適化によりコリネ型細菌高効率遺伝子導入法を確立するとともに、*dami dcm* の大腸菌株より調製したプラスミド DNA の使用が形質転換の高効率化に非常に有効であることを報告してきた。*C. glutamicum* R 株について相同組み換えによる遺伝子置換で 2.4×10^2 cfu / μ g DNA の形質転換効率を有する方法を確立している。これらの技術を基に、前年度はハイスループット遺伝子破壊用・発現用新規ベクターを構築するとともに解糖系・TCA サイクル・アミノ酸代謝系を含む中央代謝系について単一遺伝子破壊株のライブラリーを構築した。ここで、各遺伝子を標的とした破壊方法においては多数の組み換えを同時に進行するのであるが、〔 標的遺伝子のクローニング 標的遺伝子中央への薬剤耐性カセットの挿入 遺伝子破壊プラスミドの大腸菌による非メチル化 〕と、遺伝子破壊に到るまでに 3 回の形質転換を経ることが必要である。

そこで本年度はコリネ型細菌の全遺伝子対応型破壊株作製のための更なる効率化を図り、新たに *C. glutamicum* 由来のミニトランスポゾンを用いたランダム遺伝子破壊法を開発して広範囲なライブラリーを構築した。

当研究室ではコリネ型細菌の染色体操作技術開発において高効率かつランダムな転移能を持つトランスポゾンを用いて以前に複数単離し報告している。中でも、挿入因子 IS31831 はコリネ型細菌のゲノム上にランダムに高効率で転移する優れた能力を有する。この IS31831 を改変したミニトランスポゾンベクター pMV23 を用いて、*C. glutamicum* R のランダム遺伝子破壊株ライブラリーを作製した。図 1 に示す pMV23 は IS31831 の 2 つの逆位繰り返し配列 (Inverted Repeat:IR) の間にカナマイシン耐性遺伝子を挿入して人工トランスポゾン miniTn31831 とし、一方トランスポザゼ遺伝子 (*tnpA*) を同じベクター上で IR に挟まれた転移領域より外側へ配置することにより再転位能を欠失したものである。pMV23 は大腸菌由来の複製起点を有しコリネ型細菌では複製不能であるため、コリネ型細菌に導入後はトランスポザゼが保存されず、従ってゲノムに転移領域が挿入された後に再転移することは無い (図 1)。

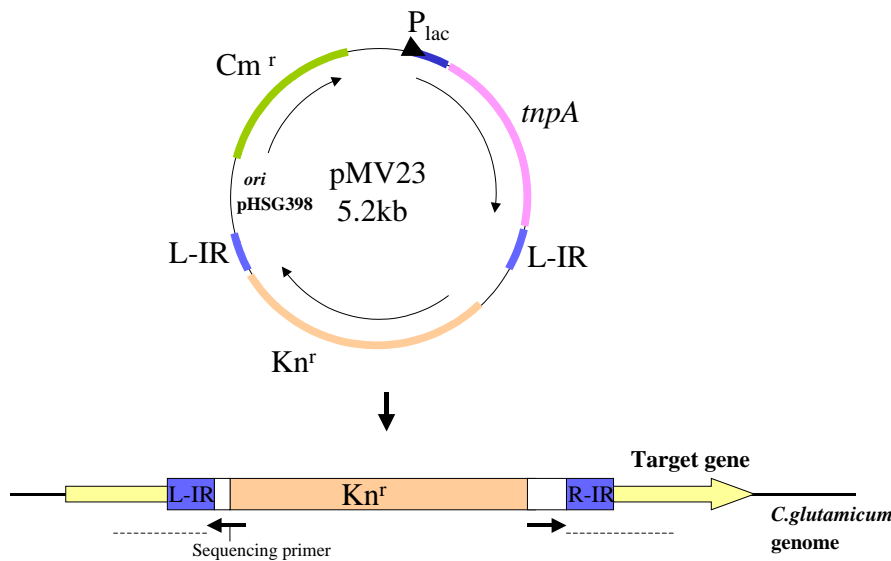


図1 ミニトランスポゾンベクターpMV23 を用いた *C. glutamicum* R 株の遺伝子破壊方法

(a) ミニトランスポゾンベクターpMV23 の遺伝子地図

pMV23 の転移領域は一对の IR および Km 耐性カセット遺伝子より成る 1837bp の領域であり、この転移領域外の *lac* プロモーター下にトランスポザース遺伝子 *tnpA* を有する。矢印は各遺伝子の転写の方向を示す。pMV23 は大腸菌の複製起点を有しコリネ型細菌では複製不能である。

(b) *C. glutamicum* R 株ゲノム上に転移した領域は一对の IR と Km 耐性遺伝子である。矢印はダイレクトシーケンスの方向を示す。

大腸菌 JM110 株より調製し非メチル化した pMV23 で *C. glutamicum* R を形質転換し、栄養豊富な培地で生育する薬剤耐性遺伝子を含む IS 挿入株を選択したところ、ミニトランスポゾンの転移は 2×10^5 cfu/ μ gDNA と高効率であった。

薬剤耐性遺伝子を含む転移領域の特定、ゲノム上の破壊遺伝子の検出は各破壊株ゲノムの薬剤耐性遺伝子周辺の配列決定によって行った。ここで従来のゲノムダイレクトシーケンス法は解読領域が短く、鋳型となるゲノム DNA は高純度のものが必要であるという欠点がある。実験条件を検討した結果、コリネ型細菌で精製ゲノム 2 μ g を用いて 500bp までダイレクトにゲノム配列を解読することが可能となった。次に多数の遺伝子破壊株サンプルについては時間を要するゲノム抽出の方法について改良を行った。ファージ由来の Phi29 DNA polymerase を利用したゲノム増幅方法が近年報告されている。これはランダムプライマーを利用し、微量のゲノム DNA を定温で指数関数的に増幅させる方法である。この Phi29 DNA polymerase を用い、遺伝子破壊株コロニーからゲノム DNA を増幅させ、直接塩基配列決定することとした。

各破壊株コロニーを微量採取し熱変性させ鋳型とし、GenomiPhi DNA Amplification Kit (Amersham Biosciences) を用いて 30 で 20 時間の Phi29 DNA polymerase 反応を行った。条件の最適化により、48 サンプル以上を単位として容易かつ高効率でゲノム増幅 DNA が得られるようになった。この DNA 増幅産物(約 500ng)を鋳型とし、サイクルシーケンス反応条件を検討することで、多数サンプルを用いた場合でもほぼ確実に増幅ゲノムよりダイレクトに塩基配列を決定することが可能となった。シーケンス用のプライマーにはミニトランスポゾン転移領域内 IR の内側の配列(28mer)を用いた。各破壊株ゲノムの配列解析により定めた破壊部位はさらに、該当遺伝子の上・下流のプライマー対を用いた cell ダイレクト PCR により各遺伝子について転移領域 1.8kbp の挿入を確認した。上記の方法により、96 サンプル単位での破壊株構築および連続す

る破壊遺伝子配列決定がコリネ型細菌で可能となった。

各破壊株の遺伝子配列解析結果より定めた、ミニトランスポゾン由来転移領域の挿入位置を *C. glutamicum* R 株の染色体地図に示した (図 2)。ここで図 2- に示したミニトランスポゾンの転移位置は染色体上でランダムであった。本研究グループのゲノム解析結果では、*C. glutamicum* R 株ゲノムには 2990 の遺伝子が存在する。*C. glutamicum* R 株と *C. glutamicum* ATCC13032 株の間の全配列の相同性比較による分類では、両者に保存される遺伝子は全遺伝子数の 85% であり (図 2-)、*C. glutamicum* R 株に特有な遺伝子はそれとは異なる 15% である (2-) ことが解析されている。本年度得られた、同ライブラリーの破壊された遺伝子に関してはその 50.4% が全遺伝子相同性検索において COG に分類されない機能未知群 (hypothetical protein) の遺伝子であり、機能の予測された遺伝子は 49.6% であった。このことから同ライブラリーは現時点においても生理機能解析を行う上で均等の取れた有用な遺伝子破壊株群である。

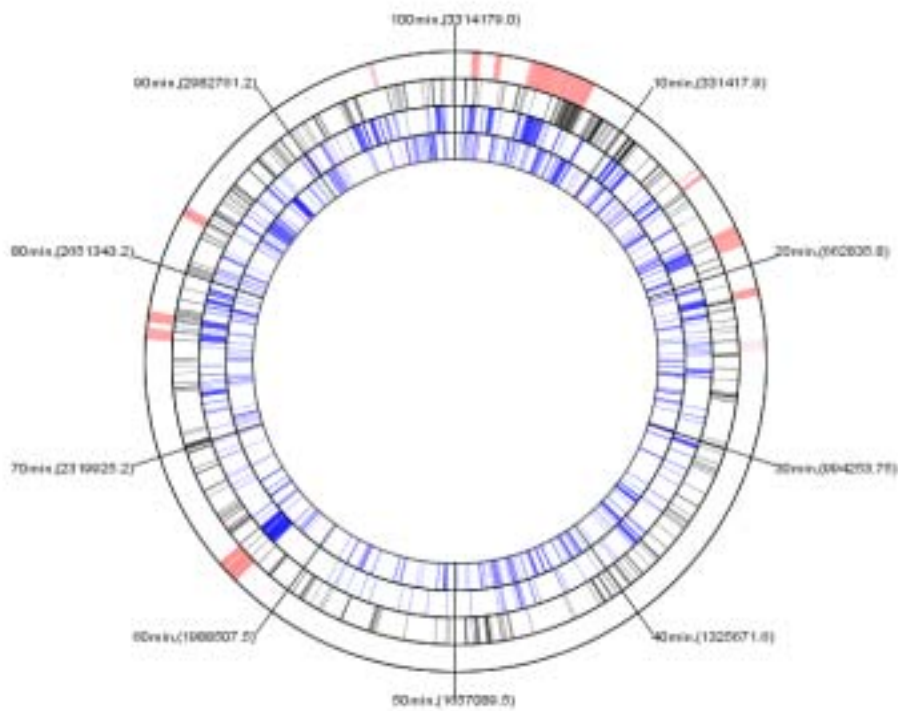


図 2 *C. glutamicum* R 株の染色体地図における遺伝子破壊領域

C. glutamicum R 株の染色体には 2990 の遺伝子が存在する。円の内側から、
C. glutamicum R 株と *C. glutamicum* ATCC13032 株の間で保存され、*C. efficiens*
には保存されていない遺伝子 *C. glutamicum* R 株に特有である遺伝子
C. glutamicum R 株において構築した遺伝子破壊株 *C. glutamicum* R 株にお
ける多数遺伝子削除領域 を示した。

(2) コリネ型細菌の遺伝子破壊株の機能解析

本年度、ミニトランスポゾン挿入により得られた遺伝子破壊株群は取得時に栄養豊富な培地を使用し選抜した。このため、破壊遺伝子と栄養要求性との関係を見るために、破壊株 200 株について最少培地を用い、33 24 時間の生育試験を行ったところ、5 株について生育に異常が認められた。一方他の遺伝子破壊株は生育に顕著な差は見られなかった。

コリネ型細菌の二株間でも保存されない本菌に特有な機能未知遺伝子についてみると、それらの破壊株のほとんどは、栄養豊富な固形培地で生育するとともに最少培地でも生育した。これらの情報はミニマムゲノム宿主創製に必須な遺伝子機能解析のデータとして貴重であり、サブテーマとして平行して進行中の大規模ゲノム削除株構築の結果と統合することで、ミニマムゲノム宿主創製のためのコリネ型細菌ゲノム上における新たな削除可能な領域の情報とすることができる。また、一部の遺伝子破壊株については興味深い表現型が観察され、現在、糖消費速度等の詳細な解析を行っている。

このような破壊株作製による網羅的遺伝子機能解析等の結果により本年度、*C. glutamicum* R 株において栄養豊富な培地上での生育に非必須と考えられる約 700 の遺伝子を同定することができた。コリネ型細菌におけるこのような広範囲な遺伝子破壊株ライブラリー構築は以前には例はなく、有用物質生産菌である本菌の代謝解析、産業上の利用に大きく寄与できるであろう。

5. 成果の対外的発表等

(1) 論文発表 (論文掲載済、または査読済を対象。)

なし

(2) 口頭発表 (発表済を対象。)

- ・ コリネ型細菌の糖輸送系 (PTS) 遺伝子破壊株の構築と解析
岡井直子、野中寛、池田洋子、和田真利子、鈴木伸昭、乾将行、湯川英明 (RITE)
日本農芸化学会 2004 年度大会 2004 年 3 月 29 日
- ・ Physiological effects of GAPDH disruption in *Corynebacterium glutamicum*
Crispinus Omumasaba, Naoko Okai, Mariko Wada, Masayuki Inui,
Hideaki Yukawa (RITE)
日本農芸化学会 2004 年度大会 2004 年 3 月 29 日

(3) 特許等 (出願番号を記載)

なし