

2Fa03 ピフィズス菌における温度感受性プラスミドの作製と効率的な遺伝子破壊への利用

坂口 広大¹, ○鈴木 徹¹, 谷 早織²
 (岐阜大院・連農・生資科, ²岐阜大院・応生)
 suzuki@gifu-u.ac.jp

(目的) ピフィズス菌が有する諸性質、機能、生命現象などを解明するためには、効率的な形質転換法や遺伝子破壊法などの逆遺伝学的アプローチが必要である。しかしながら、ピフィズス菌において、効率的な遺伝子破壊法は未だ報告されていない。本研究では、ピフィズス菌における温度感受性(Ts)プラスミドの作製を行い、これを用いた効率的な遺伝子破壊法の構築を試みた。

(方法・結果) Error-prone PCR法を用いてピフィズス菌-大腸菌シャトルベクターpKKT427に変異を導入し、Tsプラスミドの作製を行った。Tsプラスミドは *Bifidobacterium longum* 105-A, *B. longum* NCC2705 および *B. adolescentis* ATCC15703において温度感受性を示すことがわかった。このTsプラスミドを利用して目的遺伝子の遺伝子破壊を試みた。高温培養およびレプリカ法を用いて遺伝子破壊株のスクリーニングを行った。得られた遺伝子破壊候補株をPCR法によって分析した結果、目的遺伝子の破壊を確認することができた。本プラスミドを用いることで簡便かつ比較的高い効率で相同組換えによる遺伝子破壊株を取得することができた。現在、遺伝子破壊系の条件等の検討を行い、多重遺伝子破壊株の作製を試みている。

Construction of temperature sensitive plasmid of *bifidobacterium* and its application for the efficient gene knockout

Kouta Sakaguchi¹, ○Tohru Suzuki¹, Saori Tani²
 (Sci. Biol. Res., United Grad. Sch. Agric. Sci., Gifu Univ., ²Grad. Sch. Appl. Biol. Sci., Gifu Univ.)

Key words temperature sensitive, homologous recombination, *bifidobacterium*, gene knockout

2Fa05 PHBH 高生産菌株育種に向けた新規宿主-ベクター系の開発

○佐藤 俊輔, 藤木 哲也, 松本 圭司
 (カネカ・G P 事業開発プロジェクト)
 Keiji_matsumoto@kn.kaneka.co.jp

微生物生産ポリエステルであるPHBHの高生産株育種のためには、優れた宿主-ベクター系が必要である。そこで、PHB高生産菌株 *C.necator* H16株を用いて、新規宿主の開発を進めた。

また、非選択条件下において安定に保持される新規ベクターの開発を目指した。

【方法】

・部位特異的の相同組み換え技術により *phbC1*をノックアウト（活性中心の破壊、部分/完全欠失、終止コドンの導入など）することで種々のPHB非生産株を作製した。

・*C.necator* H16株のPHB合成系は *phaCAB*オペロン (*phaC1, phaA, phaB1*) を形成しているが、上記PHB非生産株の *phaA*、及び *phaB1*の転写活性への影響を評価した。

・*C.metallicidurans* CH34株のメガプラスミド由来のプラスミド安定化因子(par)をpUC系ベクターに組み込んだ新規ベクターを作製した。

・PHB非生産株に新規ベクターにて PHBH合成酵素 (*phaC_{AC}*) を導入することにより種々のPHBH生産菌株を作製した。

【結果】

・*phbC1*の破壊方法によって *phaCAB*オペロンを形成する下流2遺伝子 (*phaA*、及び *phaB1*)の発現量が影響を受け、それぞれの遺伝子の発現量の高い株ほど高いPHBH生産性を示した。

・新規に開発したベクターは非選択培養条件下にて高い保持率を示した。

Development of new Host-Vector System for Molecular Breeding of PHBH Producing *Cupriavidus necator* H16

○Shunsuke Sato, Tetsuya Fujiki, Keiji Matsumoto
 (GP Business Development Project, KANEKA)

Key words *Cupriavidus necator* H16, PHBH

2Fa04 温度感受性プラスミドを用いたピフィズス菌の部位特異的相同組換えに関する研究

○谷 早織¹, 鈴木 徹², 坂口 広大²
 (岐阜大院・応生, ²岐阜大院・連農)
 suzuki@gifu-u.ac.jp

(目的)ヒトの健康維持において重要な働きをしている腸内細菌であるピフィズス菌が有する様々な機能、性質、生命現象などは未解明な部分が多い。これらを解明する為には効率的な形質転換方法や遺伝子破壊法などの逆遺伝学的アプローチが必要である。また、ピフィズス菌において効率的な遺伝子破壊法もこれまで報告されていない。ピフィズス菌における効率の良い相同組換えを用いた遺伝子破壊法を構築する為に、当研究室では複製における温度感受性プラスミドpKO403を取得し、組換え実験に応用してきた。本研究はpKO403を用いて *B. longum* 105-A株に導入したDNA断片の相同領域の長さと部位特異的相同組換えの効率の関係について検証した。

【方法・結果】 *B. longum* 105-A株のゲノム上 *pyrE*遺伝子上流部の約0.5～3.0 kbpの長さのゲノムにおけるムDNA断片をPCRで増幅し、得られたDNA断片を In-Fusion cloning法を用いてそれぞれpKO403に導入した。この作製した部位特異的プラスミドを用いて *B. longum* 105-A株を形質転換し、得られたコロニーを30℃でスペクチノマイシンを含むMRS(以下MRS+Sp)液体培地で増殖させ、段階希釈してMRS+Sp寒天培地に塗布し、30℃と42℃で培養した。その結果42℃で培養した寒天培地において相同組換えによる耐性コロニーが確認された。導入したDNA断片の長さと相同組換えの頻度は正の相関があることが分かった。また1.0 kbにおいて1つの細胞あたりの組換え頻度が 5.9×10^{-3} であったことより、1.0 kb程度あれば比較的高い頻度で組換え体が得られることが分かった。

Homologous recombination in *Bifidobacterium* using temperature-sensitive plasmid.

○Saori Tani¹, Tohru Suzuki², Kouta Sakaguchi²
 (Grad. Sch. Appl. Biol. Sci., Gifu Univ., ²United Grad. Sch. Agric. Sci., Gifu Univ.)

Key words *bifidobacterium*, genome engineering, homologous recombination, temperature sensitive

2Fa06 *Brevibacillus choshinensis*を宿主とした、制限酵素やリガーゼ処理を必要としない簡単な発現プラスミドの構築法

○水上 誠, 花方 寛, 宮内 明
 (ヒゲタ醤油・研究開発部)
 a-miyauchi@higeta.co.jp

Brevibacillus 属に属するグラム陽性菌の一種である *B. choshinensis* は極めて高い蛋白質生産能力を持ち、特に異種蛋白質の高効率分泌生産において多くの実績を積み重ねてきた。

異種蛋白質を生産するためには、まず目的蛋白質の遺伝子を発現ベクターに組み込んだ発現プラスミドを構築しなければならない。従来、プラスミド構築に当たっては制限酵素処理やゲルからの目的DNA断片の切り出し、切り出したDNAをベクターにつなぐためのライゲーション処理などの時間と手間のかかる工程を必要とし、また遺伝子の中にその認識配列を持つ制限酵素は使えないなどの不便さを伴っていた。

今回、我々は従来のエレクトロポレーションに代わる *B. choshinensis* 新規形質転換法を用いることにより、ベクターDNAと遺伝子配列を含む挿入DNAを一切酵素処理することなく結合させ、発現プラスミドが構築可能なことを見出した。すなわち、それぞれの末端に相同配列を含むようにベクターと目的蛋白質遺伝子をPCRによって増幅した後、未精製のまま混合し、形質転換を行うと両DNAはその相同領域間で組換え反応を起すことにより菌体内で発現プラスミドが形成されることが分かった。

この方法を用いることにより従来法に較べて遙かに迅速、簡便、かつ経済的に発現プラスミドの構築が可能となった。特に、制限酵素を使う必要がないので、例えは多くの制限酵素認識配列を含むような遺伝子のクローニングには非常に有効であると考えられる。

Simple and easy plasmid construction method without restriction enzyme treatment or ligation using *Brevibacillus choshinensis* as a host

○Makoto Mizukami, Hiroshi Hanagata, Akira Miyauchi
 (R & D Dept., Higeta Shoyu)

Key words *Brevibacillus choshinensis*, gram positive, plasmid, recombinant protein production