

### 1S-Dp01 微生物直接固定化の新技術：微生物に非特異的付着性及び凝集性を付与する遺伝子

○堀 克敏<sup>1,2,3</sup>(<sup>1</sup>名工大院・工・物質工,<sup>2</sup>名工大・界面微生物工研,<sup>3</sup> 科技新・さきがけ)

【背景と従来技術】物質生産後に微生物を反応液から分離する方法としては、従来、遠心分離やろ過が主たる手法であった。分離を容易にし、また貴重な微生物細胞を連続的にあるいは反復して利用するために、微生物細胞の固定化や自己凝集が有効であるとされてきた。従来固定化技術として、アルギン酸などのゲルを利用した包括固定法が最も広く使われてきた。しかし、包括固定法には、酸素や基質のゲル内部への輸送が律速になる場合が多いこと、ゲルの機械的強度が弱く攪拌などによって破壊されやすいこと、微生物細胞がゲル内部から漏れてくることなどの欠点があった。凝集については、高分子ポリマーなどの凝集沈殿剤を利用する方法が廃水処理で広く使われているほか、もともと凝集性の微生物をスクリーニングして利用するといった方法がとられているが、非凝集性の微生物細胞、特に細菌を、自発的に凝集させる技術は存在しなかった。

【シーズの概要】病原性細菌が宿主に感染するには、まず細菌細胞が宿主の細胞や組織に接着せねばならない。多くの細菌は細胞表面の接着性ナノファイバーによってこれを達成する。グラム陰性細菌の持つ粘着性ナノファイバーとして報告されているのが、三量体型オートトランスポーターアドヘシン (TAA) である。TAAは、宿主の組織や細胞表面分子、細胞外マトリックスと特異的に相互作用することが知られている。しかし、種々の固体表面に非特異的に接着するという報告はない。

一方、*Acinetobacter* sp. Tol 5株は、様々な固体表面に非特異的な付着性を示す。例えば、培養液をサンプリングするために使用したプラスチック製のピペットチップの内壁は、この細菌細胞で瞬時にコーティングされる。この驚異的な付着性は、Tol 5株の細胞が表面に有する接着性ナノファイバーによるものであることを、発明者らは明らかにしてきた。また、Tol 5株は、固体表面へ直接付着する能力が高だけでなく、強い細胞自己凝集性も有している。これによって、固体表面は、Tol 5株の細胞が多層に密集した凝集体によって覆われる。

そこで、Tol 5から、接着性ナノファイバーの形成と付着性に直接関わる遺伝子を取得した。この遺伝子の塩基配列を決定したところ、TAAファミリーに属する新規の蛋白質 (AtaA) をコードしていることが明らかとなった。*ataA*遺伝子を、固体表面への付着性及び凝集性を有しない他のグラム陰性細菌に導入することにより、付着性及び凝集性を与えることに成功した。

【期待される効果】本技術による微生物の固定化や自己凝集性付与は、伝統的な発酵産業や廃棄物処理にそのまま利用できるだけでなく、バイオマスエネルギーの生産や微生物細胞を用いるホワイトバイオテクノロジーに極めて有効である。特にエネルギーや化学品の生産は低コストが求められており、微生物細胞の固定化および自己凝集技術は、生産プロセスの効率化に直結し、これらの産業の発展の基盤に成り得る。

#### A new technology for direct immobilization of microorganisms: The gene conferring nonspecific adhesiveness and autoagglutination to microorganisms

○Katsutoshi HORI<sup>1,2,3</sup>(<sup>1</sup>Dept. Mat. Sci. Eng., Nagoya Inst. Tech.,<sup>2</sup>Res. Centr. Interfacial Microb., Nagoya Inst. Tech.,<sup>3</sup>PRESTO,JST)

**Key words** adhesion, immobilization, bacterionanofiber, autotransporter adhesion

### 1S-Dp02 大腸菌で構造遺伝子やアンチセンス RNA を過剰発現するための共形質転換可能なベクター群

○中島 信孝<sup>1</sup>, 田村 具博<sup>1,2</sup>(<sup>1</sup>産総研・生物プロセス,<sup>2</sup>北大院・農・応生科)

大腸菌は最も研究が進んでいる微生物で、扱いも容易なことから、様々な有用物質を作る宿主として頻繁に用いられる。大腸菌による物質生産のための遺伝子工学技術には、大きく分けて2種類ある。1つ目は、いわば「遺伝子の足し算」をするもので、環状プラスミド型発現ベクター等に標的の遺伝子を導入して、構造遺伝子を過剰発現させる技術である。2つ目は、「遺伝子の引き算」で、宿主の相同組換え能を利用して標的遺伝子を完全に破壊したり、アンチセンスRNAを用いて遺伝子の発現を抑制したりする技術である。

「遺伝子の足し算」について我々は、IPTG、アラビノース、テトラサイクリン、熱ショック、低温ショックのいずれかで発現誘導可能な発現ベクターを有している。しかも、様々な組み合わせでの多重発現のために、4種類のoriと形質転換マーカーをそれぞれ有しており、4つの発現ベクターまで同時に形質転換が可能である。

一方、「遺伝子の引き算」について、大腸菌では古くから相同組み換えを用いた遺伝子破壊が可能であることが知られている。実際、我々もこの方法を用いて物質生産に有利な株を作成している。しかし、遺伝子破壊法には、増殖に必須な遺伝子を標的とすることが非常に難しいことや、破壊株を作成するのに時間がかかる、といった欠点がある。また、人為的に標的遺伝子が働かないようにする他の手段として、アンチセンスRNAを用いた遺伝子発現抑制方法 (以下、単にアンチセンス法と言う) がある。アンチセンス法では、標的mRNAに相補的な配列を持つアンチセンス核酸を発現ベクターから発現させ、標的mRNAが翻訳されることを妨げる。しかし、大腸菌でのアンチセンス法では、抑制効率が低い場合が多く、効率を上げることが大きな課題となっていた。そこで我々は、大腸菌において抑制効率を上げる研究を行い、「末端対合型アンチセンスRNA」と名付けたアンチセンスRNAを用いると劇的に抑制効率が上がることを見出した。末端対合型アンチセンスRNAとは、アンチセンスRNA配列が38塩基からなる逆向き繰り返し配列に挟まれた形のRNA分子で、これによってRNA鎖の両末端は対合し、RNAが安定化する。IPTG誘導型発現ベクターを用いて、これまでに20以上の遺伝子に対する末端対合型アンチセンスRNAを発現させ、発現抑制したが、すべての場合において予想される通りの表現型が得られている。末端対合型アンチセンスRNA発現ベクターについても、IPTG、アラビノース、テトラサイクリン誘導によるものを有しており、さらに4つまで共形質転換が可能ないようにしてある。

以上のような技術を応用して、大腸菌の代謝経路を様々に改変し、有用物質生産に有利な株を作り出すことにも成功しているため、あわせて報告する。

本研究は、(財) 加藤記念バイオサイエンス研究振興財団、及び新エネルギー・産業技術総合開発機構(NEDO)の支援を受け行われた。

#### Co-transformable vectors for expressing structural genes or antisense RNAs in *Escherichia coli*

○Nobutaka NAKASHIMA<sup>1</sup>, Tomohiro TAMURA<sup>1,2</sup>(<sup>1</sup>Bioproduction Res. Inst., AIST,<sup>2</sup>Div. Appl. Biosci., Grad. Sch. Agric., Hokkaido Univ.)

**Key words** antisense RNA, *Escherichia coli*, expression vector, gene silencing