

複数酵素系遺伝子増幅による
グルタチオン高生産菌の育種に関する研究

松山 旭

①

複数酵素系遺伝子増幅によるグルタチオン高生産菌の育種に関する研究

Construction of glutathione high-producing strains of Escherichia coli K-12 by simultaneous multiple gene amplification

松山 旭

第1章 結論 1)

- 第1節 グルタチオンについて 2)
- 第2節 ATP再生系とアセテートカイネース 6)
- 第3節 複数酵素系による物質生産におけるスリーパーベクターの利用 11)

第2章 実験材料と方法 17)

- 1) 使用菌株・プラスミドDNA・ファージDNA
- 2) 培地及び培養方法
- 3) プラスミドDNAの抽出と精製
- 4) ファージの精製及びファージDNAの抽出
- 5) in vitro packaging
- 6) 形質転換
- 7) DNA操作
- 8) ハイブリダイゼーション法
- 9) 塩基配列の解析
- 10) 酵素活性の測定
- 11) グルタチオン生産能の測定

第3章 スリーパーベクターによるグルタチオン合成酵素遺伝子群の増幅 43)

- 第1節 はじめに 44)
- 第2節 スリーパーベクターを利用したgshI, gshIIの発現 47)
 - 1) gshIを2コピー組み込んだ組み換え体 slpGSI₂の作製
 - 2) gshIIを1コピー組み込んだ組み換え体slpGSII₁の作製
 - 3) gshIを2コピー、gshIIを1コピー同時に組み込んだ組み換え体 slpGSI₁-GSII₁の作製
 - 4) GSH-I, GSH-IIの酵素活性
- 第3節 外来プロモーターの利用によるgshI, gshIIの発現強化 64)
 - 1) lac-プロモーターより発現可能なgshIを2コピー組み込んだ組み換え体slp_{P_{lac}}GSI₂の作製
 - 2) lac-プロモーターより発現可能なgshIIを1コピー組み込んだ組み換え体 slp_{P_{lac}}GSII₁の作製
 - 3) lac-プロモーターより発現可能なgshIを2コピー及びgshIIを1コピー同時に組み込んだ組み換え体slp_{P_{lac}}GSI₂-P_{lac}GSII₁の作製
 - 4) GSH-I, GSH-IIの酵素活性

第4節	グルタチオン生産能の検定	81)
第5節	考察	85)
第4章	アセテートカイネースとフォスフォトランスアセチレース遺伝子のクローニング	90)
第1節	はじめに	91)
第2節	アセテートカイネースをコードする遺伝子 ackA のクローニング	94)
1)	遺伝子ライブラリーの作製	
2)	purF 遺伝子のクローニング	
3)	ジーンウォーキングによる ackA のクローニング	
4)	AKの発現	
5)	ackA の塩基配列	
第3節	フォスフォトランスアセチレースをコードする遺伝子 pta のクローニング	112)
1)	PTA欠損株の取得	
2)	遺伝子ライブラリーの作製	
3)	pta のクローニング	
4)	PTAの発現	
第4節	ackA - pta の同時発現	123)
第5節	考察	131)
第5章	ATP再生系を増強したグルタチオン高生産菌の育種	135)
第1節	はじめに	136)
第2節	スリーパーベクターによる三種酵素遺伝子 gshI , gshII , ackA の同時発現	139)
1)	ackA 及び lac -プロモーターより発現可能な gshII を1コピーずつ組み込んだ組み換え体 $\text{slp}_{\text{P}_{1, \text{lac}} \text{GII}_1 - \text{AK}_1}$ の作製	
2)	ackA を1コピー、 lac -プロモーターより発現可能な gshI を2コピー及び gshII を1コピー同時に組み込んだ組み換え体 $\text{slp}_{\text{P}_{1, \text{lac}} \text{GSI}_2 - \text{P}_{1, \text{lac}} \text{GSII}_1 - \text{AK}_1}$ の作製	
3)	ackA を1コピー組み込んだ組み換え体 slpAK_1 の作製	
4)	GSII, GSIII, AKの酵素活性	
5)	グルタチオン生産能の検定	
第3節	ATP再生系の強化によるGSH効率的生産の検討	155)
第4節	考察	160)

第6章 総括 166)

第1節 グルタチオンについて 167)

第2節 ATP再生系とアセテートカイネースについて 172)

第3節 複数酵素系による物質生産におけるスリーパーベクターの
利用について 176)

要旨 179)

謝辞 186)

引用文献 188)

第1章 緒論

第1節 グルタチオンについて

グルタチオン(GSH)は、いまから一世紀も前の1888年、Rey-Pailhade⁽¹⁾により、ビール酵母の抽出液から‘イオウを還元してH₂Sを発生させる物質’ (フィロチオンと命名された)として初めて見出され、その後、1921年にHopkins⁽²⁾により、生体酸化還元系に関与している化合物として再発見された物質である。GSHは、 γ -L-グルタミル-L-システイニル-グリシンの構造をもつトリペプチドである。GSHは、動物・植物・カビ・酵母及び細菌など非常に広範囲の生物内に存在し⁽³⁾、しかもかなりの濃度で存在している⁽⁴⁾。

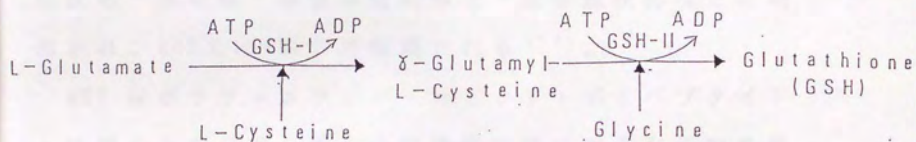
GSHの生理作用には、ある酵素に対する補酵素としての作用(グリオキサラーゼ、ホルムアルデヒド脱水素酵素など)、ラジカルや過酸化物の除去、放射線障害などに対する防御作用、酵素のSH基の保護、生体異物の解毒作用、エイコサン系(ロイコトリエン、プロスタグランジンなど)の生成及び代謝、 γ -グルタミルサイクルによるアミノ酸輸送、L-システインの貯蔵型及び輸送型としての栄養的役割などがある^(3, 5, 6)。医薬品としてのGSH製剤は、解毒剤及び眼科用剤として、各種の中毒・慢性肝臓疾患・抗ガン剤の副作用や放射線療法による障

害の防止、皮膚疾患及び白内障や角膜損傷の治療に使用されている。また、GSHは多くの食品素材中に含まれており⁽⁷⁾、最近は、栄養生理学的視点からもその効用と応用が注目されている。

現在、GSHの工業的製法としては、酵母菌体からの抽出法と有機合成法が採用されている。酵母菌体から抽出する方法は、工程の煩雑さに加え、菌体内含量も低いという欠点があり、その含量を増大させるために種々の検討も行なわれている⁽⁸⁾。一方、有機合成法では、保護基を必要とするので反応工程が長くなるという欠点がある。従って、更に効率良いGSH生産法の開発が望まれ、GSH生成能が比較的高く、GSHの代謝系の研究が進んでいる大腸菌を用いた酵素法でのGSH生産が検討されてきた⁽⁹⁻¹²⁾。

大腸菌において、GSHは、いずれもATPを要求する二種類の酵素、 γ -glutamyl-L-cysteine synthetase(GSH-I)⁽¹³⁾と glutathione synthetase(GSH-II)⁽¹⁴⁾によって生合成されている(図1-1)。まず、GSH-IによりL-グルタミン酸の γ 位のカルボキシル基にシステインのアミノ基が結合し、 γ -グルタミル-L-システイン(γ -GC)が生成する。次に、生成した γ -GCにGSH-IIでグリシンが結合してGSHが生成する。GSH-Iをコードする遺伝子 gshIと GSH-IIをコードする遺伝子 gshIIは、共に京都大

学食糧科学研究所木村研究室においてクローニングされ
(9,10)、塩基配列解析の結果、gshIはTTGに始まる1557
塩基対に518個のアミノ酸よりなるGSH-Iをコードしてお
り⁽¹⁵⁾、gshIIはATGに始まる948塩基対に316個のアミノ
酸よりなるGSH-IIをコードしている⁽¹⁶⁾ことが明らかにな
っている。



GSH-I: γ -Glutamyl-L-cysteine synthetase

GSH-II: Glutathione synthetase

図1-1 大腸菌におけるグルタチオン生成経路

第2節 ATP再生系とアセテートカイネース

1) ATP再生系

ATP は生体内において、エネルギー代謝の中心的役割を果している。生物は、食物の形で、ADP と無機リン酸 (Pi) から ATP を形成することによりエネルギーを獲得し、補捉・貯蔵する。この化学エネルギーは、吸エルゴン合成反応・筋収縮・物質の能動輸送・生合成反応などに利用され、ADP 又は AMP に再転換される⁽¹⁷⁾。

ATP はポリサッカライド・リピッド・ポリペプチド・核酸の合成など、多くの酵素反応系に重要な役割を果している。このような反応において熱力学的に不利な合成は、ATP からの ADP, AMP, Adenosine への分解と共役することによって完遂される。

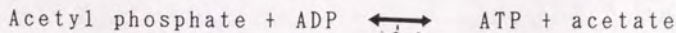
第1節で説明したように、GSH の生合成には ATP が関与する。GSH 生成のように ATP を必要とする酵素反応系を利用した工業的物質生産においては、ATP が非常に高価であるため、コスト面において経済的障害が生じる。しかしながら、高価な ATP を有効に利用することができれば、さらに多くの生体反応を利用した物質生産の広がりが期待されるので、ATP 再生系の構築がこれまで多く試みら

れてきた。GSHにおいても、ATP再生系と共役させることによる生産性の向上が検討されている^(18, 19)。

リン酸基の転移を触媒する酵素は百種類以上単離されている⁽²⁰⁻²²⁾。Langer等は、これらの酵素の中から、酵素の性質、反応性、基質を含めた経済性などを検討することにより、平衡定数が大きくATP側に偏っているアセテートカイネース(AK)が最も利用価値が高いと報告している⁽²³⁾。AKのATP再生系への最初の応用は、gramisidin Sの生産においてなされた⁽²⁴⁾。また、好熱菌 Bacillus stearothermophilus からのAKも精製され⁽²⁵⁾、ATP再生系への応用が検討されている。

2) アセテートカイネース

AK(acetate kinase) (EC 2.7.2.1)は、下記の反応を触媒する酵素である。



AKは、通性・絶対嫌気性細菌に広く存在する酵素であり⁽²⁵⁻²⁹⁾、フォスフォトランスアセチレーズ(PTA)(EC 2.3.1.8)と共に酢酸を重要な代謝中間体であるAcetyl coenzyme Aの形に活性化できる。また、AKは、酢酸の排

出^(30, 31)及び、嫌氣的培養時にカタボリックに形成される大部分のATPの合成⁽³²⁾に関与していると考えられている。加えて、phosphoenolpyruvate:glucose-phosphotransferase systemの蛋白に関与しているという報告もある^(33, 34)。

このようにAKは、ATP再生系としてだけでなく、細胞内代謝においても重要な機能を担っている酵素であると考えられるが、大腸菌由来のAKが高度に精製されたのは1986年の報告⁽³⁵⁾であり、これまでその遺伝子を単離したという報告は如何なる生物由来からも全くなかった。

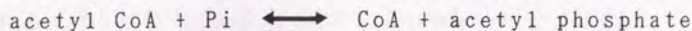
AKをコードする遺伝子ackAを単離することは、AKを物質生産におけるATP再生系として応用するばかりでなく、細胞内代謝におけるAKの役割を研究するためにも意義深いことである。本研究において、このような見地から、大腸菌由来のAKをコードする遺伝子ackAをクローニングし、その発現を検討した。更に、ackAの全塩基配列の解析も行なった。

3) フォスフォトランスアセチレーズ

大腸菌を含むEnterobacteriaceaeにおいてAKは、PTAとリンクして、酢酸からのアセチルCoAの形成及び酢酸の排出に関与している^(30, 35-37)。また、AK-PTA反応

系の過程でつくられるアセチルリン酸が、細胞において、何等かの栄養素の吸収に必要なエネルギー源になっているかもしれないという報告もある⁽³⁸⁻⁴⁰⁾。PTAは、AKと同様に通性・嫌気性細菌に広く存在する^(31, 41-46)。また、真核生物の一種の green algaeである Chlorogonium elongatumからも単離されている⁽⁴⁷⁾。

PTAは下記の反応を触媒する酵素である。



大腸菌のPTAは、Suzuki⁽⁴⁸⁾により精製されているが、その実体に関しては殆どわかっていないのが現状である。大腸菌染色体地図上、PTAをコードする遺伝子 ptaは、49.5分近傍に ackAと近接してマップされており^(49, 50)、Salmonella typhimuriumにおいて ackと ptaはオペロンとして存在すると報告されている⁽⁵¹⁾が、PTAをコードする遺伝子 ptaの単離は、ackAと同様にいかなる生物からも全く報告されていなかった。この様に、AKとPTAは遺伝子レベルで染色体上近接して存在し、酵素レベルにおいても共役しさまざまな生体反応に関与しているという報告が数多くありながら、生体内における発現と機能について、まだまだ不明な点が多く残されている。前項に論じたAKと同様にPTAをコードする遺伝子をクローニン

グすることは、大腸菌の生理・代謝に関する研究の tool として意義があると思われる。

また、CoA thioester は、いろいろの酵素反応の基質として働き、アセチルCoAは、生物学的アセチル化反応において中心的な役割を果す物質である。CoA \longleftrightarrow アセチルCoAサイクリング系を構築することも、効率的物質生産システムの構築に重要な要素となると考えられる。

このような見地から、PTAの細胞内における機能を研究する toolとしてのみならず、CoA \longleftrightarrow アセチルCoAサイクリング系を将来的により有効に利用してゆくために、本研究において、PTAをコードする遺伝子 *pta* をクローニングし、その発現を検討した。更に、*ackA*, *pta* 遺伝子の 大腸菌クロモゾーマルDNA上の正確な位置を決定した。

第3節 複数酵素系による物質生産におけるスリーパーベクターの利用

1) 複数酵素系による物質生産

第1節で説明したGSHは、生体内において、共にATPを要求するGSH-I, GSH-IIの二段階の酵素反応により生合成される。生体における物質生産プロセスは、多くの場合、GSHと同様に複数の生体酵素反応の組合せにより進む。反応プロセスの中には、生体エネルギーであるATPを要求する酵素、補酵素であるCoA, NAD, NADP, FAD等を要求する酵素が含まれることが多い。

生体における複数酵素反応系を巧みに利用した物質生産、即ち醸造及び発酵は日本の最も得意とする生産技術である。この生体反応を利用した発酵法においては、基本的には、有機炭素源と窒素源より、様々、かつ複雑な構造を有する物質生産が可能であるが、実際には、細胞の生命活動維持のための生体固有の制御機構により酵素生産が抑制されたり副生成物がつくられたりして、生産プロセスが効率良く進まない場合がある。そして、育種細胞・菌株の不安定性、目的物質により培養条件が異なり、僅かな条件変化により生成量が大きく左右される等の問

題もある。近年、遺伝子組み換え技術の出現により、目的の酵素蛋白質を大量に生産する技術はかなり普及してきたが、複数酵素による物質生産プロセスに応用してゆくには、まだまだ克服すべき課題が多い。

まず、複数酵素系の遺伝子群を安定、かつ高度に発現させるためには、用いるベクターに特別の工夫が必要となろう。

また、細胞内において、代謝産物の量は細胞の恒常性を維持するため、生体制御機構により厳密に調節されていることが多い。従って、特定の複数酵素系による物質生産を安定にしかも効率良く行なうためには、固定化等によってバイオリクターとしての応用が考えられる。このような観点にたった宿主・ベクター系の改良も必要となろう。

2) スリーパーベクター

1973年、ChangとCohen⁽⁶²⁾により、ブドウ状球菌のプラスミドと大腸菌のプラスミドとを試験管内で組換え、組み換え体プラスミドが大腸菌中で保持され、両者の遺伝子が発現することが報告されて以来、今日まで、遺伝子組換え技術は急速に進歩してきた。現在では、大腸菌、酵母、枯草菌などの遺伝学的解析が進んでいる微生

物をはじめ、植物細胞、動物細胞においても宿主・ベクター系が開発され、多くの遺伝子が単離、解析されているのみならず、工業的にも、有用酵素の生産が実用化されている。

これらの有用酵素遺伝子を大腸菌で発現させる場合、数多くのベクターが開発され、利用されている。ファージベクターの開発は、遺伝子組換え技術の幕開けとほぼ同時期に、 λ ファージを中心に開始された⁽⁵³⁻⁵⁵⁾。 λ gt系^(56, 57)、シャロン系⁽⁵⁸⁾、Murrayらによるファージベクター⁽⁵⁹⁾が作製され、種々の目的に応じたファージベクターが開発されてきた。

λ 系のファージベクターは、 λ ファージのもつプラスミドにない特長を利用して、遺伝子産物を大量に、かつ、効率良く生産させることが可能である。 λ ファージのS遺伝子変異株は、溶菌を抑え、細胞内でファージDNAの自己複製を続けることにより500~1,000コピー/細胞にまで達する^(59, 60)。コート蛋白質の合成を抑えることにより、増幅された遺伝子は形質発現の鋳型となり、より効率良い遺伝子の発現が期待できる⁽⁵⁹⁾。また、 λ ファージは、効果的なプロモーター P_L , P_R , P'_R をもっており、このプロモーターを利用することによる遺伝子発現効率の上昇も検討されている^(61, 62)。遺伝子産物を生産する場合、組み込まれた遺伝子の安定性が問題とな

る^(63, 64)。λファージの場合、溶原菌の状態では、クロモゾームDNA中に組み込まれるため、外来遺伝子は安定に保持される。

ファージベクターには、このように利点が多くあるにもかかわらず、プラスミドベクターが多く使われてきたのは、プラスミドベクターのほうが分子量が小さく取扱いが容易であった事もあると思われる。

中野らは、このようなλファージの特色に着目して、安定性にすぐれ、しかも目的とする遺伝子産物の生産能の高い宿主・ベクター系の構築を目指し、溶原化能を保持したベクター（“スリーパー”ベクター⁽⁶⁵⁾）を開発してきた。

スリーパーの由来は、通常は、宿主染色体の中に隠れていて遺伝子産物を作らないことによる。

初期のλ系ベクター⁽⁶³⁻⁵⁵⁾と異なり、スリーパーベクターには、λDNA中央部に存在する宿主染色体への組み込みに必要な遺伝子 $att-int-xis$ が残されている。そのため、外来遺伝子を組み込んだ後に、更に、宿主染色体上に組み込んでしまうことにより、組み換え体DNAのコピー数と発現量を抑えて、安定化できる。目的とする外来遺伝子は、ファージのコート蛋白質構造遺伝子と入れ替える形で組み込めるよう、その部分に、利用可能な制限酵素認識部位が存在する。それにより、組み換え体

の安全性（ファージ粒子ができないため）と生産性（不要な蛋白質を作らないため）が高まるように設計されている。λファージの後期遺伝子の転写を開始する後期プロモーター P'_R (⁶⁶⁻⁶⁸)を外来遺伝子の発現に利用できる。宿主クロモゾーマルDNA上の組み換え体ファージDNAは、ベクター上の cI_{857} 遺伝子 (⁶⁹) にコードされているリプレッサーを培養温度を上げて失活させることにより、クロモゾーマルDNAより切り出されて、自己増殖を開始する。また、 S_7 変異 (⁷⁰)を導入することにより、宿主の溶菌が抑えられ、組み換え体ファージDNAのコピー数は、500~1000/細胞まで高められる。

また、特定の複数酵素系による物質生産を効率良く行なうためには固定化等によるバイオリアクターへの応用が考えられるので、熱誘導後の溶菌を強く抑制できるベクターが望ましい。ファージの感染による大腸菌の溶菌は溶菌遺伝子 (R) 産物により引き起こされる。この溶菌は、Mgの存在により阻害される。しかし、溶菌遺伝子 (Rz) 産物により解除されることにより、通常は、Mgの存在下でも溶菌に至る。従って、Rz遺伝子の欠損により、Mg存在下で溶菌を抑えることができる (⁷¹)。そこで、このような観点から、 S_7 変異を導入したベクターに、更に、Rz欠失変異 (ΔR_z)を加えたベクターを作製している。

このような特長を有するスリーパーベクターは、20数

Kbまでの長い外来遺伝子を組み込み、安定に保持することが可能であるので、複数酵素反応系による物質生産への応用に最適のベクターであると考えられる。

物質生産に関わる複数酵素をコードする遺伝子群を同時に増幅し、安定に発現させ、効率良い物質生産システムを構築することは工業的な面からのみならず、学術的な面からも意義があると考えられる。GSHは、生合成に関与する二種の酵素及びATPを合成する酵素からなる三種類の複数酵素反応系により完結する代謝産物である。生体内においては、短いプロセスではあるが、遺伝子組換え技術によってこの反応系を完全に再構築することは、物質生産技術開発においてモデルケースになると考えられる。また、GSHの工業生産自体においても生産効率の上昇が期待される。

本研究において、このような観点から、GSHの生合成に関与する遺伝子群、gshI, gshIIをスリーパーベクターに組み込むことによりGSH高生産菌の育種を検討し、更にATP再生系としてのAKをクローニングし、三種酵素遺伝子 ackA, gshI, gshIIを同時にスリーパーベクターに組み込むことにより、ATP再生系を含む複数酵素反応システムの再構築と効率良いGSH生産の検討を行なった。

第二章 実験方法と材料

1) 使用菌株・プラスミドDNA・ファージDNA

本研究に使用した大腸菌、プラスミドベクター、ファージベクターは、表2-1にまとめた。

本研究に使用したスリーパーベクターは、図2-1に示す構造からなり、以下に各スリーパーベクターの特徴と作製法を簡単に示す。

表2-1 使用 菌株

strain	Relevant features	Source or reference
1100	<u>thi endA</u>	(72)
LE392	<u>supE44supF58hsdR514galK2gal</u> <u>T22lacY1</u>	(73, 74)
JM101	<u>supE</u> <u>thi</u> Δ (<u>lac-proAB</u>)F' [<u>traD36</u> <u>proAB</u> ⁺ <u>lacI</u> [*] <u>lacZ</u> Δ M15]	(75)
BHB2688	N205 <u>recA</u> [λ <u>imm434cIts</u> <u>b2red3</u> <u>Eam4Sam7/</u> λ]	(76)
BHB2690	N205 <u>recA</u> [λ <u>imm434cIts</u> <u>b2red3</u> <u>Dam15Sam7/</u> λ]	(76)
QD5003	<u>supF</u>	(77)
QD5003(RI)	QD5003/carrying plasmid encoding <u>EcoRI</u>	Nakano
AB2557	<u>purF1</u>	Bachmann
AT703	<u>purF59</u>	Bachmann
NM539	<u>supF</u> <u>hsdR</u> [P2 <u>cox3</u>]	(78)
EMBL4	λ <u>sbhI</u> λ 1 [*] b189<polycloing site <u>int29ninL44trpE</u> poly- cloning site>KH54 <u>chi</u> CsrI λ 4 [*] <u>nin5srI</u> λ 5 [*]	(78)
M13K07	a derivative of M13 carrying mutated version of geneII, a plasmid origin of replication (from p15A)	(79)

表 2-2 使用プラスミド及びファジミド

Plasmid	Relevant features	Reference
pBR322	ColE1 replicon	(80)
pUC18 (pUC19)	ColE1 replicon carrying <u>lacZ</u> with multiple cloning sites	(81)
pUC118 (pUC119)	a derivative of pUC18 (pUC19) containing a 476-bp fragment derived from the intergenic region of M13	(79)

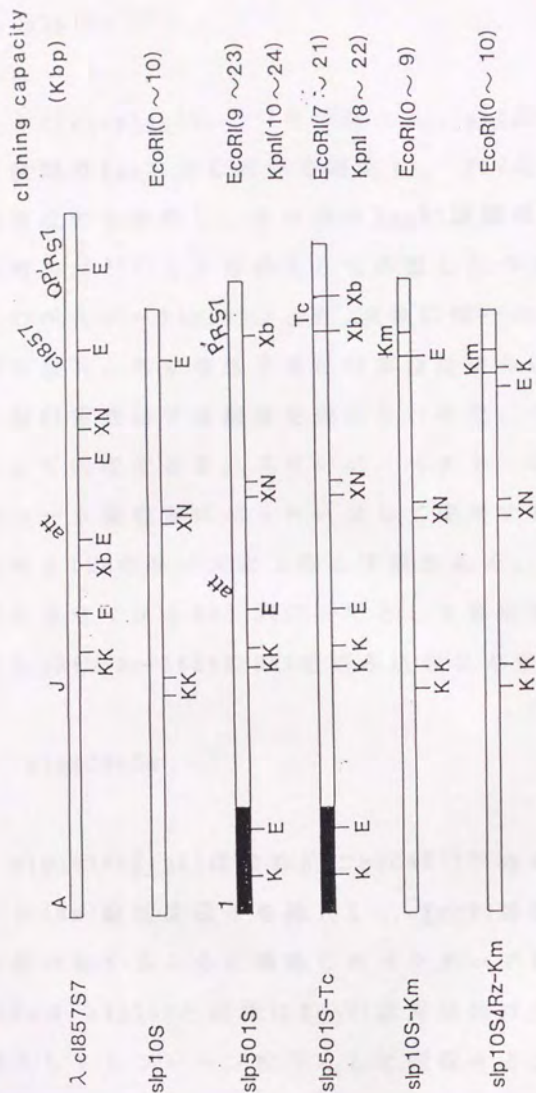


図2-1 スリーパーベクター

■は、 $\phi 80$ 、□は、 λ 由来のDNAを示す。Tcは、Tc耐性遺伝子、Kmは、Km耐性遺伝子を示す。
E: EcoRI, K: KpnI, N: NheI, X: XhoI, Xb: XbaI

a. slp10S⁽⁸³⁾

λ cl₈₅₇plac5S₇⁽⁸⁴⁾を母体とし、att左のEcoRI認識部位間のlacを含む部分を除去し、P'_R直後のEcoRI認識部位のみを残し、その他のEcoRI認識部位をMurrayらの方法⁽⁸⁴⁾により消去して作製したベクターである。このベクターslp10Sは、P'_R直後に唯一のEcoRI認識部位を有し、外来遺伝子をこの部位に組み込んでもコート蛋白質遺伝子は損傷を受けないので、ファージ粒子として回収できる。スリーパーベクターは λ ファージのコート蛋白質にパッケージして使用するので、組み込めるDNAのサイズに上限と下限がある。パッケージできるサイズを38~52Kb⁽⁷⁶⁾として算出するとslp10SはEcoRIで0~10KbのDNAを組み込むことが可能である。

b. slp10S-Km

slp10SのEcoRI認識部位にpUC4K⁽⁸⁵⁾由来のカナマイシン(Km)耐性遺伝子を挿入し、EcoRI認識部位を一箇所だけ有するように構築したベクターである。slp10S-Kmはslp10Sと同様にEcoRI認識部位に外来遺伝子を挿入してもファージ粒子として回収することが可能であり、更にKmを含むプレート上、32℃で生育する株を

選択することにより容易に溶原菌を得ることができる。
EcoRIで0~9Kbの範囲のDNAを組み込める。

c. slp10S△Rz-Km

slp10SのRz遺伝子中に存在する BclI認識部位より Bal31を用いて、Rz構造遺伝子の一部を除去し、Km耐性遺伝子を導入することにより作製したベクターである。このベクターは、他のベクターに比べて、△Rzを導入したことにより溶菌しにくい。slp10S-Kmと同様に EcoRI認識部位に外来遺伝子を挿入してもファージ粒子として回収することが可能であり、Kmを含むプレート上で容易に溶原菌を選択することができる。

EcoRIで0~10Kbの範囲のDNAを組み込める。

b. slp501S-Tc⁽⁸³⁾

slp501Sの XbaI認識部位にpBR322のテトラサイクリン(Tc)耐性遺伝子を導入したものである。slp501Sは slp500Sと slp11Sより、左部分が slp500S、右部分が slp11S由来となるように組み換えて作製したベクターである。slp500Sは、 λ cl_{857S7}を母体とし、Murrayらの方法⁽⁸⁴⁾により λ DNA上の不要な三箇所の EcoRI認識

部位を消去した後に、 ϕ 80ファージとかけ合わせて左端に ϕ 80由来の EcoRI 認識部位を導入して作製したベクターである。slp11Sは、slp10Sの EcoRI 認識部位に合成DNAを挿入して XbaI 認識部位にかえたベクターである。slp501S-Tcは、コート蛋白質遺伝子部分にのみ認識部位を有する EcoRI または KpnI 部位に外来遺伝子を挿入することが可能である。また、Tc耐性遺伝子のプロモーターは P_{trp} に変えてあるので、slp501S-Tcの溶原菌はトリプトファンを含まない培地でのみ、1.5 μ g/ml程度の弱い耐性を示す。従って、トリプトファンを含まず、1.5 μ g/mlのTcを含むプレート上、32°Cで生育する株を選択することにより容易に溶原菌が得られる。slp501S-Tcは、EcoRI で7~21Kb、KpnI で8~22Kbの範囲のDNAを組み込める。

2) 培地及び培養方法

溶原菌の培養には、表 2-3 の組成からなる TY 培地を用いた。生育は、クレット光電光度計を用いて測定した。

溶原菌の熱誘導培養は通常、次のようにして行なった。TY 培地で 32°C、16 時間の前培養を行なった溶原菌を TY 培地に植え (1/100 seed)、32°C の恒温水槽中で振とうし、クレットユニットが 50~100 に達した時 42°C の恒温水槽に移して 15~20 分間振とうすることにより熱誘導を行なった。その後 32~37°C の恒温水槽に移して、2~4 時間振とう培養を行なうことによりファージ DNA と遺伝子発現の増幅を行なった。

プラスミド DNA による形質転換株の培養は、通常 25 μ g/ml となるようにアンピシリン (Ap) を添加した TY 培地で、37°C の恒温水槽中で振とうすることによって行なった。lac-プロモーター (以後、P_{lac} と略する) からの転写を誘導する場合は、最終濃度が 1 mM となるように Isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside (IPTG) を添加して培養を行なった。野生株の培養は、TY 培地で行なった。

s1p501S-Tc 系の溶原菌の選択は、表 2-4 の組成からなる寒天培地 (A 培地) を用いて行なった。s1p10S-Km

系の溶原菌の選択は、表 2-5 の組成からなる寒天培地 (Km培地) を用いて行なった。ブランクの形成は、表 2-6 の組成からなる Base Agarプレートに指示菌を含む表 2-7 の組成からなる Soft Agarを重層することによって行なった。

pUC 系プラスミドのマルチクローニングサイトに外来遺伝子を導入した 組み換え体 DNAによる形質転換株の選択は、表 2-8 の組成からなる寒天培地 (X-Gal 寒天培地) 上で、白いコロニーを形成する株を単離することによって行なった。

表2-3 TY培地

Tryptone	1 %
Yeast extract	0.5%
NaCl	0.5%

表2-4 A培地

$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	2 g
グルコース	2 g
カザミノ酸	1.5 g
ビタミンB1	15 mg
MgSO_4	1 mM
FeSO_4	0.5mg
テトラサイクリン	150 μ g
リン酸buffer(pH7.0)	20 mM
Agar	15 g
H_2O	1000 ml

表2-5 Km培地

Tryptone	10	g
Yeast extract	5	g
NaCl	5	g
カナマイシン	20	mg
Agar	12	g
<hr/>		
H ₂ O	1000	ml

表2-6 Base Agar

Tryptone	1	%
NaCl	0.25%	
Agar	1.2	%

表2-7 Soft Agar

Tryptone	1	%
NaCl	0.25%	
Agar	0.5	%

表 2-8 X-Gal寒天培地

Tryptone	10 g
Yeast extract	5 g
NaCl	5 g
IPTG	47.6mg
X-Gal*	40 mg
Agar	14 g
<hr/>	
H ₂ O	1000 ml

* X-Gal: 5-bromo-4-chloro-3-indolyl
β-D-galactopyranoside

3) プラスミドDNAの抽出と精製

分析用に少量調製する場合は、アルカリ法⁽⁸⁶⁾または、ポイリング法⁽⁸⁷⁾に従って抽出した。大量にプラスミドDNAを調製する場合は、下記に示すCsCl-エチジウムブロマイド 平衡密度勾配遠心法を用いて行なった。

適当な抗生物質を含む10mlのTY培地(150ml 三角フラスコ)にプラスミドDNAを保持する *E. coli*を植えて、37°Cで16時間培養して前培養液とした。この前培養液10mlを1lのTY培地(5l三角フラスコ)に植えて37°Cで16時間培養を行なった。pBR322系のプラスミドDNAを抽出する場合は、K.U.を70~90に達した時クロラムフェニコール(Cm)を150 μ g/mlとなるように添加して培養を行なった。遠心集菌後、菌体を10mlのST溶液(25%(w/v) sucrose/50mM Tris·HCl(pH8.0))に懸濁したものに2mlの5mg/ml リゾチーム溶液(STに溶解)を加えて氷上に5分放置した。4mlの0.25M EDTA(pH8.0)溶液を加え5分放置した後、1% Brij58/0.4% Na-deoxycholate/62.5mM EDTA/50mM Tris·HCl(pH8.0)からなる溶液16mlを添加し氷上で20分放置した。日立SRP28SA rotorで、25,000rpm, 1時間遠心することにより、cleared lysateを得た。このcleared lysateをフェ

ノール抽出、エタノール沈殿を行ない、得られた沈殿を14mlのTES buffer (20mM Tris·HCl(pH7.5)/10mM NaCl/10mM EDTA)に溶かし、1mlのエチジウムブロマイド溶液(10 mg/ml)を添加後CsCl(塩化セシウム)を加えて、R.I. (Refractive Index)=1.390~1.391に調製した。日立 RPV45T rotorで40,000rpm, 16時間、CsCl-エチジウムブロマイド 平衡密度勾配遠心を行なうことにより、プラスミドDNAを抽出、精製した。

4) ファージの精製及びファージDNAの抽出

ファージ粒子の精製は、Yamamoto等の方法⁽⁸⁸⁾を改変して行なった。溶菌液に、 $1\mu\text{g/ml}$ となるようにDNase Iを添加して、37℃で30分反応した後、11,000 rpmで15分間遠心して上清を分離した。日立 SRP28SA rotorを用いて4℃で、27,000rpm, 90分間遠心することによりファージ粒子を含む沈殿画分を得た。沈殿を0.1mlのSM溶液(0.1M NaCl/1mM MgSO₄/0.01% Gelatin/0.02M Tris·HCl(pH7.5))に溶かし、4℃で16時間以上放置した。ファージ溶液が1.0mlとなるようにSM溶液を加えたのち、CsCl/SM溶液と混合して、 $\rho=1.70$ となるように調製した。日立 RPS55T rotorを用いて25,000 rpm, 23時間遠心した後、ファージ粒子のバンドを抜き

取り、SM溶液で1時間透析することにより精製したファージ粒子を得た。ファージDNAの抽出は、フェノール処理した後TE bufferで透析して行なった。

ファージ粒子を作らないファージDNAの抽出はBlattnerらの方法⁽⁸⁹⁾で行なった。即ち、溶菌液に1/5容量のSDS溶液(0.25M EDTA/2.5% SDS/0.5M Tris (pH9.0))を加え、70℃で30分間加熱した後、更に1/4容量の8M K-Acetate溶液を加え氷上で15分放置した。15,000rpm,30分の遠心後、上清に2倍量のエタノールを加えて、12,000rpmで30分遠心して得られた沈殿をTE bufferに溶解してファージDNAを得た。

5) in vitro packaging

パッケージング・エクストラクトはホーン等の方法^(76,90)に従って、以下の様にして調製した。

E. coli BHB2688 (prehead donor)とBHB2690 (packaging protein donor)をそれぞれTY培地3mlに植え、37℃で16時間培養した。この前培養液1mlを、それぞれ100mlのTY培地(500ml 三角フラスコ)に植えて、K.U.=30まで32℃で培養した。K.U.=30に達した時、42℃、15分間の熱誘導をかけ、その後37℃で3時間培養を続けた。BHB2688とBHB2690の培養液を混合し、

遠心集菌後、20 mlの λ dil buffer (10mM Tris·HCl (pH7.5)/100mM $MgSO_4$)に懸濁し、再び遠心集菌を行なった。この菌体を、 packaging buffer (0.4M Tris·HCl(pH8.0)/ 0.01M $MgSO_4$ / 0.01M Spermidine/ 0.01M Putrescine/ 0.1% β -mercaptoethanol/ 7% DMSO)に懸濁し、遠心後、沈殿画分を 0.5ml の packaging bufferに再懸濁した。この懸濁液を 25μ lずつエッペンドルフチューブに分注して、液体窒素で凍らせて、 $-70^\circ C$ で保存した。このパッケージング・エクストラクトは、 $-70^\circ C$ で数か月保存できる。

in vitro packagingは次の様にして行なった。パッケージング・エクストラクトを氷上で溶かし、50mM ATP 2μ lとパッケージングしたいDNA 1μ gを加えて混合し、 $37^\circ C$ で60分間反応を行なった。この反応液に1 mg/ml のDNase Iを 0.2μ l加えて $37^\circ C$ で15分間反応を続けた。クロロホルム1滴と λ dil buffer 200μ lを加えた後、遠心してファージ液を得た。

6) 形質転換

形質転換はLederberg等の方法⁽⁹¹⁾に従って行なった。

7) DNA操作

制限酵素によるDNAの切断は、Davis等の緩衝液⁽⁹²⁾を用いて、種々の制限酵素で行なった。切断したDNAは、5%のポリアクリルアミド・ゲル電気泳動⁽⁹³⁾或いは、0.7~2.0%アガロース・ゲル電気泳動⁽⁹⁴⁾で分離し、エチジウムブロマイド(0.5 μ g/ml)で染色し、トランスイルミネーター(Ultra-Violet Products, Inc.)上で蛍光によりDNAバンドを検出した。アガロース・ゲルからのDNA断片の回収はDEAE-cellulose membrane (Schleicher and Schuell NA-45)に吸着する方法⁽⁹⁵⁾で行なった。T4DNAリガーゼによるDNA断片の結合、大腸菌DNAポリメラーゼI(Klenowフラグメント)を用いた5'-突出末端の平滑末端への変換、T4DNAポリメラーゼによる3'突出末端の平滑末端への変換、キナーゼによるリンカーの5'末端のリン酸化及びリンカーの連結は、Maniatis等の方法⁽⁹⁶⁾によった。オリゴヌクレオタイドの合成は、DNA合成機(Beckman System 1E Plus)を用いて行なった。

8) ハイブリダイゼーション法

プローブとして用いる DNAの標識はニックトランスレーション法によって行ない、ニックトランスレーションキット (Amersham社製) を用いて DNAを $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]$ dCTPにより標識した。標識されたDNAは、Sephadex G-100のカラムクロマトグラフィー (カラムは $\phi 0.7 \times 20\text{cm}$ のものを使用し、緩衝液は $20\text{mM Tris}\cdot\text{HCl}(\text{pH}8.0)$ / $150\text{mM NaCl}/1\text{mM EDTA}$ を用いた) を用いて未反応のdCTPと分離した。ブランクハイブリダイゼーションは、BentonとDavisの方法⁽⁹⁷⁾に従って行なった。サザンハイブリダイゼーションは、Southernの方法⁽⁹⁸⁾に従って行なった。

DNA断片のアガロースゲルからニトロセルロースフィルターへの移行はCapillary transfer法によって行なった。

9) 塩基配列の解析

ackAの塩基配列の解析は、Sanger Dideoxy-mediated Chain-termination法^(82, 99)により行なった。目的のDNA断片をファジミドpUC118, pUC119にクローニングすることにより一本鎖DNAを調製しテンプレートとした。一本鎖DNAの調製は、M13K07をヘルパーファージとして用いて行なった⁽⁷⁹⁾。プライマーは、最初はベクターとアニールするユニバーサルプライマーを使用し、それ以降は、明らかになった配列に対して相補的なDNA (17-25mer)を合成することにより作製した。反応はE. coli DNA polymerase IのKlenow fragmentを用いて $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{dCTP}$ を取込ませることにより行なった。

10) 酵素活性の測定

粗酵素液の調製は、培養液を遠心分離して菌体を集めた後、生理食塩水に懸濁し超音波破碎処理を行ない、12,000rpmで20分間の遠心分離によりcell debrisを取除くことによって行なった。

γ -glutamylcysteine synthetase (GSH-I)

の活性測定

グルタミン酸とシステインを基質として、GSH-Iにより生成する γ -Glutamylcysteine (γ -GC) の量を Jackson の方法⁽¹⁰⁰⁾で定量することによって行なった。 γ -GCの生成反応は10mM ATP / 15mM グルタミン酸-Na / 15mM システイン / 10mM MgCl₂ / 50mM Tris-Cl (pH7.5) からなる反応液1ml中で、37°C, 30分間行ない、100°Cで2分間煮沸することにより反応を停止した。生成した γ -GCの定量は以下の様にして行なった。反応停止液を8000rpm, 10分間遠心して、その上清0.5mlを4mlのグリオキシル酸混液 (5mM EDTA / 1mg/ml アスコルビン酸 / 3mg/ml グリオキシル酸 / 1M K-Phosphate buffer (pH6.8)) に添加して、65°Cで5分間保持した。25°Cの水槽で冷却した後、DTNB (5,5' Dithiobis-(2-nitrobenzoic acid)) 溶液 (3.8mM DTNB / 1M K-Phosphate buffer (pH6.8)) を0.5ml加え、25°Cで7分間発色反応を行ない、ギルフォード300N型マイクロ分光光度計を用いて412nmで吸光度を測定した。ブランクは生成反応液の組成から ATPとグルタミン酸を除いた条件で反応し測定した。1mg/mlとなるように調製した γ -GC (興人) を用いて検量線を作製し、生成した γ -GCを

定量した。酵素活性は1時間あたりに生成する γ -GCの量 ($\mu\text{mol } \gamma\text{-GC} / \text{mg 蛋白} / \text{hour}$) で表現した。

Glutathione synthetase (GSH-II)の活性測定

γ -GCとグリシンを基質として、GSH-IIにより生成するGlutathione(GSH)をTietzeの方法⁽¹⁰⁾によって定量することによって行なった。

GSHの生成反応は、10mM ATP / 15mM グリシン / 5mM γ -GC / 10mM MgCl_2 / 50mM Tris-Cl(pH7.5) となる反応液1ml中で、37°C, 2時間行ない、100°Cで2分間煮沸することにより反応を停止した。生成したGSHの定量は以下の様に行なった。

反応停止液を8,000rpm, 10分間遠心して、その上清10 μ lを2.65mlの発色液*に加えてギルフォード300N型マイクロ分光光度計を用いて412nmで吸光度の変化($\Delta OD_{412\text{nm}}$)を測定した。ブランクは生成反応液の組成からATPとグリシンを除いた条件で反応し測定した。1mg/mlとなるように調製したGSH(ベーリンガー)を用いて検量線を作製し、生成したGSHを定量した。酵素活性は1時間あたりに生成するGSHの量 ($\mu\text{mol GSH} / \text{mg 蛋白} / \text{hour}$) で表現した。

*: 発色液の調製

0.1mlのDTNB溶液、0.05mlのNADPH溶液、0.4Uのグルタチオンレダクターゼを2.5mlのBufferに加えて調製する。

- ・ DTNB溶液 : 40mg DTNB+15mgNaHCO₃/10ml of 100mM K-Phosphate buffer(pH7.1))
- ・ NADPH溶液 : 12mg/3ml of 0.02N NaOH
- ・ Buffer : 360 μ M EDTA/0.05M K-Phosphate buffer(pH7.1)

Glutamine phosphoribosylpyrophosphate amido-transferaseの活性測定

グルタミン酸デヒドロゲナーゼ法^(102, 103)を若干改変して測定した。

3mM PRPP(phosphoribosylpyrophosphate)/ 13mM グルタミン/ 10mM MgCl₂/ 0.1% BSA/ 50mM Tris-Cl (pH 8.0)からなる反応液2.8mlに粗酵素液0.2mlを加えて、37℃で10分間反応を行なった後、100℃で2分間煮沸することにより反応を停止した。反応停止液を8,000rpmで10分間遠心分離して、その上清100 μ lに1mlの0.25M 塩酸ヒドロキシルアミン、2mlの0.085% β -NAD、及び

0.05%のグルタミン酸デヒドロゲナーゼ50 μ lを加えて37 $^{\circ}$ Cで30分間反応させた後、ギルフォード300N型マイクロ分光光度計を用いて340nmで吸光度を測定した。NADの変化量(ΔOD_{340nm})より定量を行なった。酵素活性は1分間あたりに生成するグルタミン酸の量で表現した。

Acetate kinase(AK)の活性測定

Thomasらの方法⁽¹⁰⁴⁾に従い、ADPとアセチルリン酸から生成するATPをヘキソキナーゼ(HK)とグルコース-6-リン酸デヒドロゲナーゼ(G6P-DH)を經由してNADP⁺還元と共役させることにより測定した。

5mM MgCl₂/10mM glucose/0.5mM NADP/5mM ADP/ 5U of G6P-DH/ 12.5U of HK/ 2mM acetyl phosphate/100mM Tris-Cl(pH8.5)の組成からなる反応液2.4mlに0.1mlの希釈粗酵素液を加えて、25 $^{\circ}$ Cでギルフォード300N型マイクロ分光光度計を用いて340nmの吸光度の変化を測定した。酵素活性は、1分間あたり1 μ molのNADPHを生成する力価を1Uとした。

Phosphotransacetylase (PTA)

の活性測定

Citrate synthaseの測定法⁽¹⁰⁵⁾を改変した方法⁽⁸⁰⁾に従い、アセチルリン酸とCoAから生成するアセチルCoAをmalate dehydrogenase(MDH)とcitrate synthase(CS)を経由して、NADの還元と共役させることにより測定した。

5 μ mol $MgCl_2$ / 0.5 μ mol NAD / 0.5 μ mol CoA / 5 μ mol malate / 12.5 μ g MDH / 25 μ g CS / 10 μ mol acetyl phosphate / 100 μ mol Tris-Cl (pH8.0) の組成からなる反応液0.95mlに0.05mlの希釈粗酵素液を加えて、25℃でギルフォード300N型マイクロ分光光度計を用いて340nmの吸光度の変化を測定した。酵素活性は、1分間当たり1 μ molのNADHを生成する力価を1Uとした。

11. グルタチオン生産能の測定

詳細な方法は、本文中で記載するが、グルタミン酸、システイン、グリシンを基質として生成したグルタチオンをTietzeの方法⁽¹⁰¹⁾によって、定量することによって行なった。

第3章 スリーパーベクターによるグルタチオン 生合成酵素遺伝子群の増幅

第1節 はじめに

GSH は、GSH-I, GSH-II の 2 酵素の逐次反応により生合成されるので、酵素法による効率的生産には両酵素活性の強化が必要である。これまで京都大学木村研究室を中心にして、大腸菌由来の GSH-I, GSH-II 両酵素^(13, 14)の遺伝子 (gshI, gshII) をクローニングし^(9, 10)、プラスミドベクターを利用して大腸菌へ導入することによる GSH 高生産菌の育種が検討されてきた⁽¹¹⁾。

遺伝子組換え技術を利用して酵素活性を強化するためには、細胞内で遺伝子を安定に保持し、細胞当たりの遺伝子のコピー数を増やし、更に転写・翻訳効率を良くする必要がある。また、GSH のような複数酵素系により生合成される物質生産に応用してゆくためには、長い DNA を収容できるベクターを使用する必要がある。

第1章で論じたように、スリーパーベクター^(65, 106)は、20Kb以上の長い外来遺伝子を組込むことが可能であり、しかも、宿主大腸菌染色体 DNA に組込まれることにより安定に保持される。そして、熱誘導のみにより遺伝子を増幅し、菌体内に大量の遺伝子産物を蓄積することが可能である。GSH の様な複数酵素系により生合成される有用物質の高生産システム構築において、酵素群を高

度に発現できるスリーパーベクターのシステムは最適の宿主ベクター系であると思われる。

まず、gshI遺伝子、gshII遺伝子を同時に併せ持つフェージDNAと溶原菌の作製を行ない、グルタチオン生合成遺伝子群の発現を検討した。

大腸菌において、GSH-Iの比活性は、GSH-IIに比べてかなり低く、GSH-Iの活性がGSH生合成の律速段階になっている⁽¹⁰⁷⁾。gshI、gshII両遺伝子を含む雑種プラスミドによる形質転換株においても同様の結果、つまり、GSH-IがGSH生産の律速段階になっている結果が得られている^(12, 108)。GSH-Iの比活性を増強することによりGSH生産能の向上が期待されるので、gshI遺伝子をタンデムに導入することも併せて検討した。

そして、このスリーパーシステムを更に効率良く利用する為には増幅されたDNAの転写効率を高める必要がある。特にgshIの転写・翻訳を高めることによりGSH生産効率の向上が期待される。

従来のプラスミドをもちいた遺伝子発現系において、制御可能且つ強力なプロモーターを利用することにより発現効率を高める改良が数多くなされている。例えば、 P_{lac} の場合は、通常、lacI産物であるリプレッサーの働きにより、転写は抑制されている。IPTGなどの合成基質の添加により抑制が解除され、 P_{lac} からの転写が効率良

く開始される。通常のプラスミドDNAは、その複製が染色体DNAとは独立して行なわれるので、細胞当たりのコピー数を人為的に制御することが難しい。pUCシリーズのようなコピー数の高いプラスミドDNA⁽⁸¹⁾をベクターとして使用する場合、リプレッサーが足りなくなる等の原因から抑制が不十分になり転写が一部行なわれてしまう場合がある。また、工業的に利用する場合、発現の誘導のために添加するIPTGなどの合成基質のコストも問題となろう。

一方、スリーパーベクターを利用したファージDNAは溶原菌中において染色体DNAに組込まれ安定に存在する(1コピー/細胞)。熱誘導のみでファージDNAの複製が開始し、コピー数が急速に増加する(500~1,000コピー/細胞)ことにより遺伝子発現が増幅される。従って制限温度内においては、細胞の制御機構の支配下にあるため、制御可能なプロモーターからの転写は抑制されており、転写誘導基質の添加なしに、熱誘導のみにより制御が解除されて効率良く発現をおこなうことができる。

このような観点から、本研究において、gshI、gshIIの発現効率を上昇させるために、 $P_{1..}$ を利用して、GSH-I、GSH-II両酵素活性の強化を検討した。

第2節 スリーパーベクターを利用した gshI, gshII の 発現

図3-1に示すように、gshIは構造遺伝子内にEcoRI認識部位を有し、gshIIは構造遺伝子内にKpnI認識部位を有している。スリーパーベクターには、第2章に示したようにコート蛋白質をコードする領域にEcoRI或いは、KpnIで外来遺伝子を組込めるslp500タイプのベクターと、後期プロモーター P'_R 直後に唯一のEcoRI或いはXbaI認識部位を有するslp10タイプのベクターがある(図2-1)。そこで、gshIをslp501S-TcのKpnI認識部位に、gshIIをslp10SのEcoRI認識部位に導入し、それらファージDNAをXhoI認識部位で組み換える事により同一ファージDNA上に gshI, gshIIを有する組み換え体ファージDNAの作製を行なった。

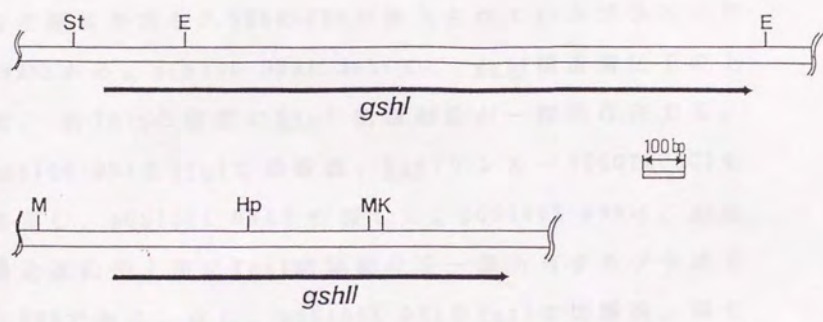


図3-1 gshI, gshIIを含むDNA領域の制限酵素地図

→は、構造遺伝子の存在領域、転写方向を示す。
 E:EcoRI, K:KpnI, Hp:HpaI, M:MluI, St:StuI

1) gshIを2コピー組み込んだ組み換え体slpGS1₂

の作製

gshIを含むプラスミドpGS100 (京都大学木村研究室において作製された)⁽¹⁰⁾より、(図3-2)のスキームに従い、KpnI認識部位の内側にgshIをコピータンデムに保持するpGS300KKを作製した。

pGS100DNAは、pBR322DNAのPstI認識部位にgshI構造遺伝子領域を含む3.5KbのDNAが挿入されているプラスミドDNAである。pGS100 DNAにおいて、gshI構造遺伝子上流、約70bpの位置にStuI認識部位が一箇所存在する。pGS100 DNAをStuIで切断後、KpnIリンカー(GGGTACCC)を挿入し、pGS100K DNAを作製した。pGS100K DNAは、gshI構造遺伝子上流にKpnI認識部位を一箇所有するプラスミドDNAである。次に、pGS100K DNAをPstIで切断後、同じ制限酵素で切断したpUC18 DNAと結合後、X-Gal寒天培地中で白いコロニーを形成し、Tcを含むTY寒天培地中で生育できない株を得た。これら形質転換株よりプラスミドDNAを抽出し、KpnIで切断後アガロース・ゲル電気泳動により1.8KbのDNA断片が検出されるプラスミドDNAを選択することによりpGS100KK DNAを得た。

pGS100KKDNAは、gshIを含む約1.8Kbの領域の両側にKpnI認識部位を有するプラスミドDNAである。次に、gshIを

ニコピータンデムに含むpGS330 DNA (木村研究室において作製された) ⁽¹²⁾ を BglIII で切断後、アガロース・ゲル電気泳動より単離した3.5KbのDNA断片を、同じ制限酵素で切断後BAP (Bacterial Alkaline Phosphatase)処理したpGS100 DNAに挿入することによりpGS300KK DNAを作製した。pGS300KK DNAは、KpnI認識部位の両内側に gshI をニコピータンデムに保持するプラスミドDNAである。

次に、スリーパーベクターslp501S-Tcの KpnI認識部位に gshI を導入した (図3-3)。pGS300KK DNAを KpnI で切断後、アガロース・ゲル電気泳動により gshI を含む4.4KbのDNA断片を単離した。このDNA断片と KpnI で切断したslp501S-TcDNAを結合後、in vitro packaging法によりファージ粒子として、E.coli1100に感染し、Tcを含むA培地上32℃で生育する溶原菌を得た。これら溶原菌をTY培地に植え、熱誘導を含む培養後、クロロホルムを添加して溶菌液を得た。この溶菌液を、base agarプレートの上に、E.coli LE392株をローンとして撒いたsoft agar培地上にスポットして37℃で培養し、ブランク形成の有無を調べた。ブランクを形成しない溶原菌は、コート蛋白質を形成できないファージDNAによる溶原菌である。ファージ粒子を作れない溶原菌の中から、目的の溶原菌を以下の方法で選択した。各株をTY培地3ml中、32℃で培養し、K.U.が約70に達した時、42℃、15分間の

熱誘導を行なった後37°Cで2時間培養を続けた。この培養液を超音波破碎したものを粗酵素液として、GSH-Iの活性を測定した。活性の高かった溶原菌よりファージDNAを調製し、制限酵素地図を作製した結果、slp501S-TcのKpnI認識部位に後期プロモーターP'_Rと順方向にgshIが二コピー組込まれたslpGSI₂* DNAが得られた。同時にgshIを増幅し、熱誘導により発現できる溶原菌E. coli 1100 (slpGSI₂) が得られた。

同様にして、pGS100KK DNAのgshIを含むKpnI切断DNA断片をslp501S-Tcに挿入することにより、後期プロモーターP'_Rと順方向にgshIを一コピー組込んだslpGSI₁* DNA及び溶原菌E. coli 1100 (slpGSI₁)を得た。

*: GSIはGSH-I、GSIの後の_{1,2}はファージDNAに組み込まれているgshIのコピー数を表している。

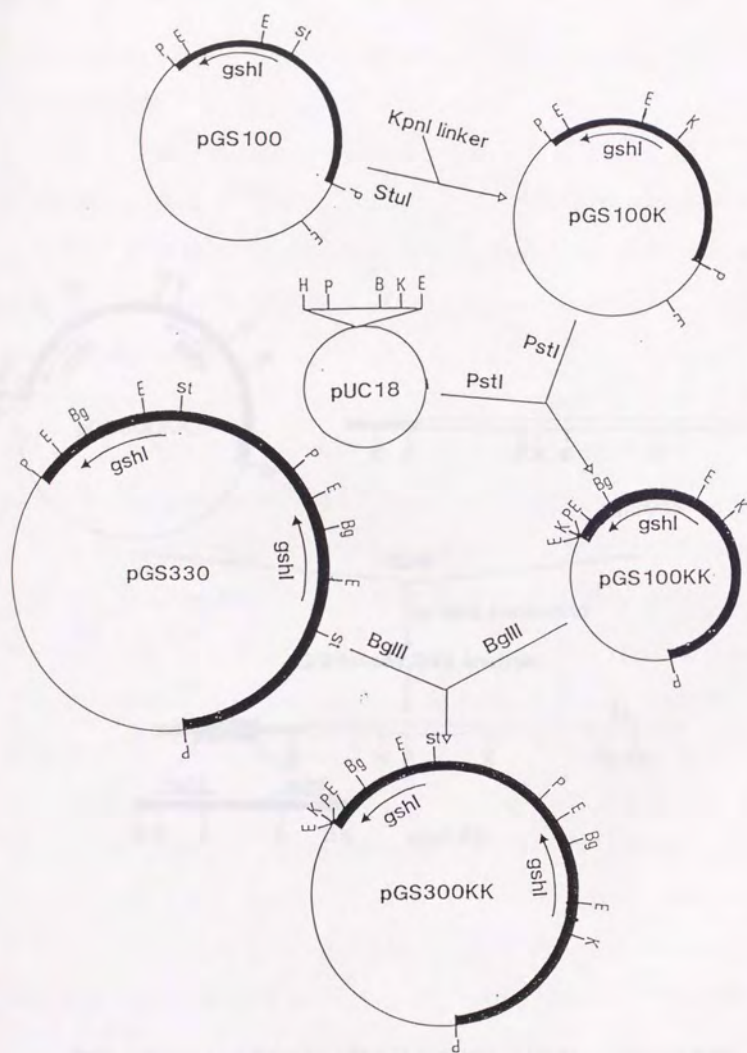


図3-2 *gshI*を2コピー保持するpGS300KKの構築

B: BamHI, Bg: BglII, E: EcoRI, K: KpnI, P: PstI, St: StuI

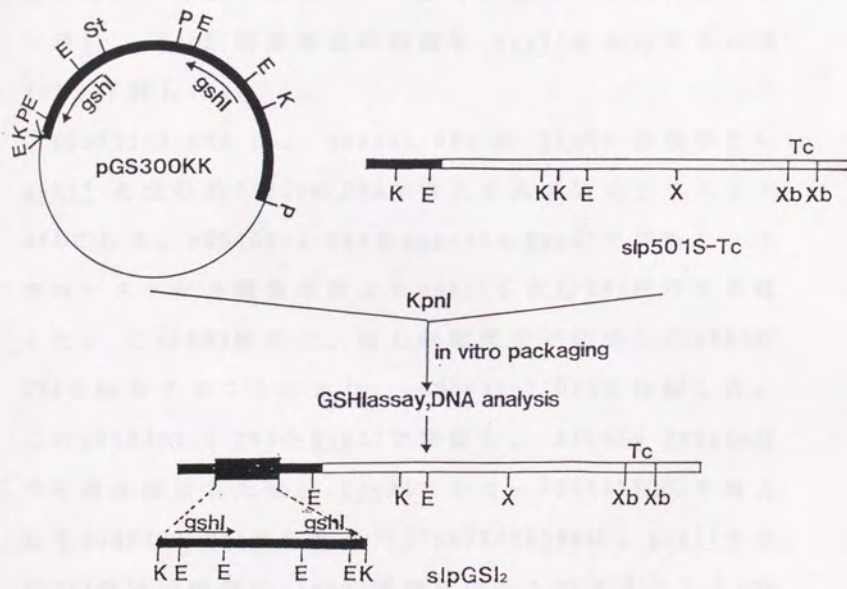


図3-3 gshIを2コピー組み込んだファージDNA sIpGS₁₂の作製

E: EcoRI, K: KpnI, P: PstI, S: StuI, X: XhoI, Xb: XbaI

2) gshIIを1コピー組み込んだ組み換え体slpGSII:
の作製

gshIIを含むプラスミドpGS401-1(京都大学 木村研究室において作製された)⁽¹¹⁾より、図3-4のスキームに従い、EcoRI認識部位の内側に gshIIを保持するpGSB402を作製した。

pGS401-1 DNA は、 pBR325 DNA の BamHI 認識部位に gshII を含む約1.8KbのDNAが挿入されているプラスミドDNAである。pGS401-1 DNAを HinIIIと BamHIで切断し、アガロース・ゲル電気泳動より gshIIを含むDNA断片を単離した。このDNA断片と、同じ制限酵素で切断したpBR322 DNAを結合することにより、pGSB401-1 DNAを作製した。このpGSB401-1 DNAを BamHIで切断し、Klenow fragmentで平滑末端にした後、EcoRIリンカー(GGAATTCC)を挿入してpGSB402 DNAを作製した。pGSB402DNAは、gshIIを含むDNA領域の両側に EcoRI認識部位をもつプラスミドDNAである。

スリーパーベクターslp10Sは、 P'_R プロモーターの直後に EcoRI認識部位を唯一もつベクターである。このベクターに、gshIIを導入した(図3-5)。

pGSB402 DNAを EcoRIで切断し、アガロース・ゲル電気泳動により gshII を含む1.7KbのDNA断片を単離した。こ

のDNA断片と、同じ制限酵素で切断したslp10S DNAを結合して、in vitro packaging後 *E. coli* LE392に感染しブランクを形成させた。得られたブランクより、目的のファージDNAを次の方法により得た。RIプラスミド⁽¹⁰⁹⁾をもっている宿主上でアッセイされるファージのタイターと持っていない宿主上でアッセイされるファージのタイターの比(restriction ratio)は、ファージDNAの EcoRI 認識部位の数によって異なる。即ち、RIプラスミドをもっている *E. coli* K-12 にファージを感染しブランクを形成させると、ファージDNA上の EcoRI 認識部位が増えるにつれタイターが低くなる^(53, 110, 111)。

目的のファージDNAは、EcoRI 認識部位に gshII が挿入されたものであるので EcoRI 認識部位は二箇所以上になる。この方法を応用してタイターの比を比較することにより、外来遺伝子が挿入されたファージを選択した。指示菌として *E. coli* QD5003株と *E. coli* QD5003(RI)株を使用した。*E. coli* LE392株で形成されたブランクよりでファージ溶液を調製し、QD5003株と QD5003(RI)株に感染させ、軟寒天培地上に形成するブランクの数を計測し、QD5003株におけるタイターとQD5003(RI)株におけるタイターの比(QD/QD(RI))が30~200程度のブランクよりファージを抽出した(slp10Sのファージより形成されるブランクはQD/QD(RI)が10以下である)。これらファージ

よりDNAを単離し、その制限酵素地図を作製することにより、gshIIが P'_Rプロモーターと順方向に挿入された s1pGSII₁* DNAが得られた。このファージを E.coli 1100 に感染させて、溶原菌 E.coli 1100(s1pGSII₁)を得た。

*: GSII は GSH-II、GSII の後の ₁ はファージDNAに組み込まれている gshII のコピー数を表す。

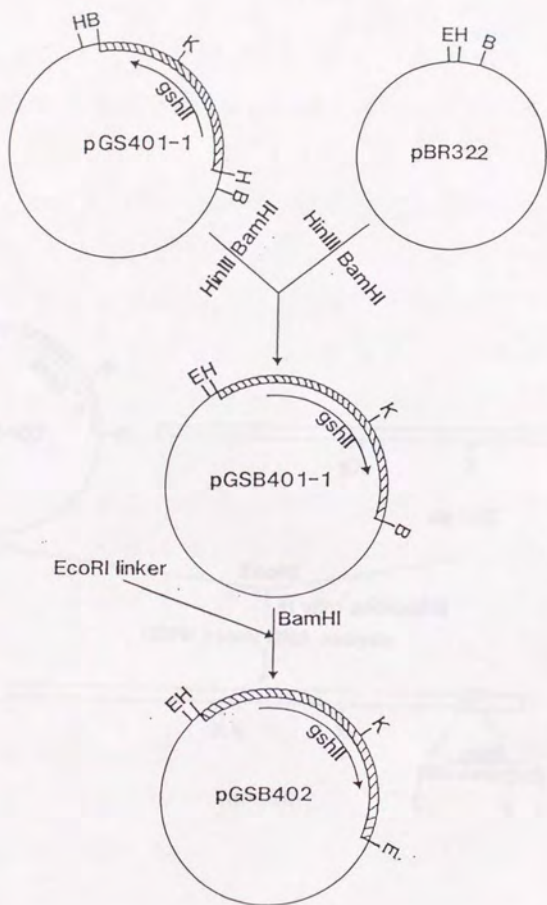


図3-4 gshIIを1コピー保持するpGSB402の構築

B: BamHI, E: EcoRI, H: HinIII, K: KpnI

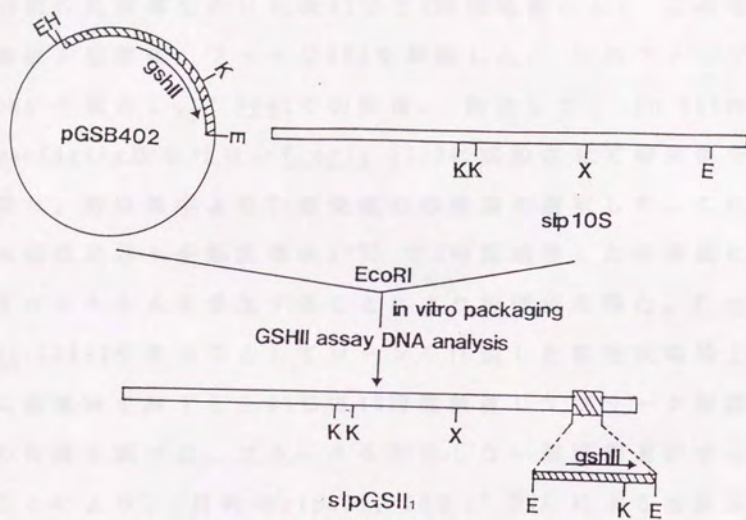


図3-5 *gshII*を1コピー組み込んだファージDNA *slpGSII₁*の作製

E:*EcoRI*, K:*KpnI*, H:*HinIII*, X:*XhoI*

3) gshIを2コピー、gshIIを1コピー同時に組み込んだ組み換え体 $s1pGS1_2-GSII_1$ DNA の作製

溶原菌 E.coli 1100($s1pGS1_2$)と E.coli 1100($s1pGSII_1$)をそれぞれ、TY10mlで32℃で培養し、K.U.=50で42℃、15分間の熱誘導をかけた後37℃で2時間培養した。この培養液を溶菌後、ファージDNAを単離した。このファージDNAを混合し、NheIで切断後、結合して、*in vitro* packaging法を行ない E.coli 1100に感染させて溶原菌を得た。溶原菌中よりTc感受性の溶原菌を選択した。これら溶原菌各々を熱誘導後37℃で2時間培養した培養液にクロロホルムを添加することにより溶菌液を得た。E.coli LE392を指示菌としてローンを作製した軟寒天培地上に溶菌液を滴下し、37℃で16時間放置してプラーク形成の有無を調べた。プラークを形成しない溶原菌選択することにより、目的の $s1pGS1_2-GSII_1$ * DNA による溶原菌 E.coli1100($s1pGS1_2-GSII_1$)を得た (図3-6)。

*: $GS1, GSII$ の後の $2, 1$ は、ファージDNAに組み込まれている gshI, gshII のコピー数を表している。

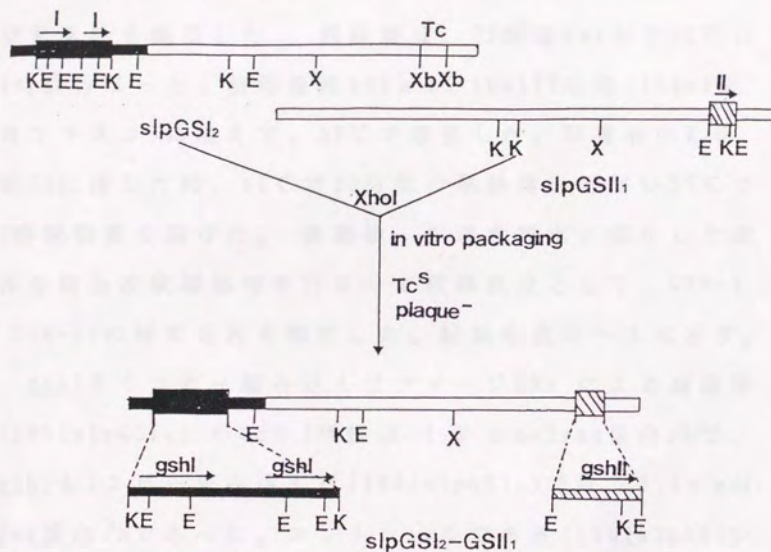


図3-6 *gshI*を2コピー、*gshII*を1コピー同時に組み込んだファージDNA *slpGSII₂-GSII₁*の作製

E: EcoRI, K: KpnI, X: XhoI, Xb: XbaI

4) GSH-I, GSH-IIの酵素活性

得られた溶原菌 *E. coli* 1100(s1pGSI₁), 1100(s1pGSI₂), 1100(s1pGSI₂-GSII₁), 及び コントロールとして 1100(s1p501S-Tc) を培養し、GSH-I と GSH-II の酵素活性を測定した。前培養は、TY 培地 3ml 中で 32°C、16 時間行なった。前培養液 100 μl を 10ml TY 培地 (150ml 三角フラスコ) に植えて、32°C で培養した。培養液の K.U. が 70 に達した時、42°C で 20 分間の熱誘導を行ない 37°C で 3 時間培養を続けた。集菌後、生理食塩水に溶かした菌体を超音波破壊処理を行なって粗酵素液として、GSH-I, GSH-II の酵素活性を測定した。結果を表 3-1 に示す。

gshI を 1 コピー組み込んだファージ DNA による溶原菌 1100(s1pGSI₁) の GSH-I 活性は 1.5 μmol/mg 蛋白/h で、gshI を 2 コピー組み込んだ 1100(s1pGSI₂) では、3.1 μmol/mg 蛋白/h であった。コントロールである 1100(s1p501S-Tc) に比べて、それぞれ 17 倍、34 倍の GSH-I 活性を示した。ファージ DNA 上に組み込まれている gshI 遺伝子のコピー数に応じて、GSH-I 活性が上昇した。gshII を 1 コピー組み込んだ溶原菌 1100(s1pGSII₁) の GSH-II 活性は 28.6 μmol/mg 蛋白/h で、1100(s1p501S-Tc) に比べて 72 倍の高活性を示した。

また、両酵素遺伝子を組み込んだファージ DNA による

溶原菌 1100(slpGSI₂-GSH₁)のGSH-I, GSH-II活性は、熱誘導によりそれぞれ60倍, 90倍に増幅された。GSH-Iの活性は 5.1 μmol/mg蛋白/h, GSH-IIは 36.0 μmol/mg蛋白/hであり、GSH-IはGSH-IIに比べて1/7程度の比活性であった。

表 4-7 溶原菌 1100-GSH-I, IIの増幅活性

菌株	GSH-I	GSH-II
1100(slpGSI ₂ -GSH ₁)	5.1 ± 0.2	36.0 ± 1.5
1100(slpGSI ₂ -GSH ₁) ⁺	306 ± 12	324 ± 18
1100(slpGSI ₂ -GSH ₁) ⁺	306 ± 12	324 ± 18
1100(slpGSI ₂ -GSH ₁) ⁺	306 ± 12	324 ± 18
1100(slpGSI ₂ -GSH ₁) ⁺	306 ± 12	324 ± 18

1100(slpGSI₂-GSH₁)⁺は、1100(slpGSI₂-GSH₁)に比べて、GSH-I, GSH-IIの活性がそれぞれ60倍, 90倍に増幅された。GSH-I, GSH-IIの活性は、それぞれ5.1 μmol/mg蛋白/h, 36.0 μmol/mg蛋白/hであった。

表 3-1. GSH-I, GSH-II の酵素活性

菌株	GSH-I*	GSH-II*
1100(s1p501S-Tc)	0.09 (1)	0.4 (1)
1100(s1pGSI ₁ **)	1.5 (17)	0.4 (1)
1100(s1pGSI ₂)	3.1 (34)	0.4 (1)
1100(s1pGS II ₁)	0.09 (1)	28.6 (72)
1100(s1pGSI ₂ -GS II ₁)	5.1 (57)	36.0 (90)

* : $\mu\text{mol/mg 蛋白/時間}$

** : GSI, GS II はそれぞれGSH-I, GSH-II酵素遺伝子を組み込んでいることを表し、₁或いは₂は、組み込まれている遺伝子のコピー数を示す。

第3節 外来プロモーターの利用による gshI, gshII の 発現強化

これまで、gshI, gshII の発現は、それぞれの遺伝子の
上流に存在する本来のプロモーター領域、或いは、ファ
ージの後期プロモーター P_R を利用して行なってきた。
強力なプロモーターを使用することにより gshI, gshII の
転写効率の上昇が期待されるので、本節において、gshI,
gshII を P_L の支配下に置くことにより、GSH-I, GSH-II
の高発現を検討した。基本的には、第2節と同様に、
gshI を組込んだファージ DNA と gshII を組込んだファージ
DNA を組換えることにより gshI, gshII を同時に併せもつ
ファージ DNA を作製した。第2節で使用したスリーパー
ベクター s1p10S は、溶原菌を選択するのに薬剤などの選
択マーカールを持っていないので、溶原菌を選択するのに
煩雑な手法を要する。そこで、カナマイシン (Km) 耐性
遺伝子を組み込んだ s1p10S-Km を使用することとした。
gshI は、Tc 耐性で選択することができる s1p501S-Tc に、
gshII は、Km 耐性で選択できる s1p10S-Km に導入すること
とした。また、Km 耐性遺伝子中には XhoI 認識部位が存
在するので、ファージ DNA 中に唯一存在する NheI 認識部
位で組み換えることとした。

1) lac-プロモーターより発現可能な gshI を2コピー組み込んだ組み換え体 $\text{slp}_{\text{P}_{\text{lac}}}\text{GS1}_2$ の作製

gshI の塩基配列解析の結果⁽¹⁵⁾、gshI の上流には2組のプロモーター構造が存在することが報告されている。StuI 認識部位は上流側にあるプロモーターの中央部を分断する位置に存在する。pGS100 DNAを StuI で切断した後、PstI リンカーを挿入して、pGS100Ps DNAを作製した。pGS100Ps DNAを PstI で切断後、gshI を含む1.8KbのDNA断片を単離し、同じ制限酵素で切断したpUC19に挿入し、 P_{lac} に対し gshI が順方向に向いているpGS100(lacP)を作製した(図3-7)。pGS100(lacP)は、 P_{lac} より gshI の転写を開始することが可能であり、gshI の3'末端より下流に KpnI 認識部位を一箇所保持するプラスミドDNAである。

pBR322 DNAを AatII と BamHI で切断し、5'-CGGTACCACTA GTAGGCCTGAGCTCG-3' と 5'-GATCCGAGCTCAGGCCTACTAGTGGTACCGACGT-3' の配列よりなる合成オリゴヌクレオタイズを挿入することにより pNK322LDNAを作製した(図3-7)。pNK322L DNAは、pBR322 DNAの AatII-BamHI DNA断片(約450bp)のかわりに、AatII-KpnI-SpeI-StuI-SacI-BamHI 認識部位をもつDNAが挿入されたDNAである。

次に、pGS100(lacP) DNAを PvuII と SacI で切断し、ア

ガロス・ゲル電気泳動より単離した $P_{1..}$ 及び gshI を含む DNA 断片を、StuI, SacI で切断した pNK322L DNA に挿入することにより pGS1101 DNA を作製した。pGS1101 DNA は、 $P_{1..}$ の支配下で gshI の発現を誘導でき、さらに、 $P_{1..}$ の上流に SpeI 認識部位、gshI の 3'-末端より下流に XbaI 認識部位を有するプラスミド DNA である。また、このプラスミド DNA は SpeI の上流及び XbaI の下流に KpnI 認識部位を有するので、KpnI で切断することにより $P_{1..}$ より発現可能な gshI を含む DNA 断片を単離することができる。

SpeI は A ↓ CTAG T , XbaI は T ↓ CTAG A を認識する
 T GATC ↑ A A GATC ↑ T

制限酵素であるので、切り口の配列は同じである。従って、XbaI と SpeI で切断後単離した DNA 断片を XbaI 或いは SpeI で切断した同じプラスミド DNA に挿入することにより、遺伝子を効率良くタンデム化することができる。このようなシステムは、BamHI と BglII, NheI と XbaI, NheI と SpeI の組み合わせでも可能である。この方法を用いて、pGS1101 DNA を XbaI と SpeI で切断して得た DNA 断片 ($P_{1..}$ より発現可能な gshI 領域を含む) を、XbaI で切断後アルカリフォスファターゼ処理した pGS1101 DNA に挿入することにより pGS1102 DNA を得た (図 3-7)。pGS1102 は、KpnI 認識部位の内側に $P_{1..}$ より発現可能な gshI を 2 コピータンデムに有するプラスミド DNA である。

第2節と同様にして、スリーパーベクターslp501S-TcのKpnI部位に、gshIを含むDNA領域を導入した（図3-8）。

pGS1102 DNAをKpnIで切断後、 P_{lac} より転写を開始できるgshIを2コピータンデムに含む約4.4 KbのDNA断片をアガロース・ゲル電気泳動により単離した。このDNA断片とKpnIで切断したslp501S-Tcを混合し、結合後、in vitro packaging 法によりファージ粒子とした。このファージ粒子をE.coli 1100に感染して、A寒天培地上に撒き32°Cでコロニーを形成させ、Tc耐性株を得た。コロニー中より温度感受性株を選択して溶原菌を得た。得られた溶原菌をTY培地に植え、熱誘導を含む培養を行ないGSH-Iの酵素活性を測定することにより、GSH-I活性が高い溶原菌を選択した。これら溶原菌よりファージDNAを単離して制限酵素地図を作製し、その構造を検討した結果、 P_{lac} より発現可能なgshI2コピーが P'_{R} プロモーターと順方向に挿入されたファージDNA slp P_{lac} GSI $_2^*$ が得られた。

*: P_{lac} はlac-プロモーター、GSIはGSH-I、GSIの後の2は P_{lac} -gshI2コピーをファージDNAに組み込んでいることを表している。

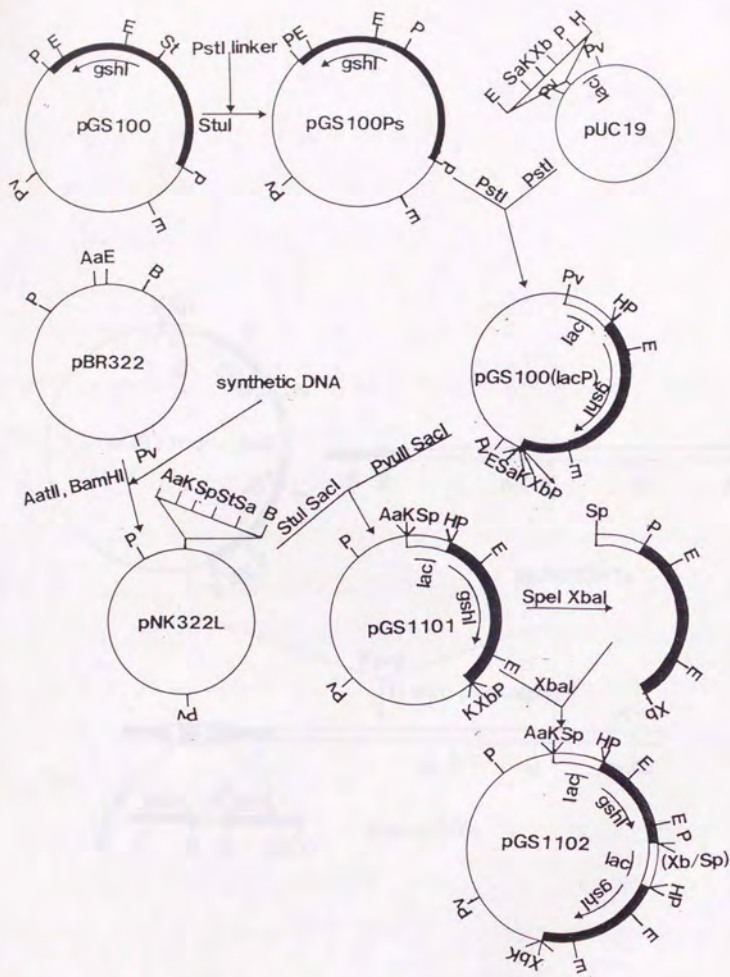


図3-7 P_{lac} より発現可能なgshIを2コピー保持するpGS1102の構築

syntheticDNAは、 CCGTACCACTAGTAGGCCTGAGCTCG

TGCAGCCATGGTGATCATCCGGACTCGAGCCTAG

よりなる配列を有する。 lac は、 P_{lac} を示す。

Aa:AatII, B:BamHI, E:EcoRI, K:KpnI, H:HinIII, P:PstI, Pv:PvuII,

Sa:SacI, Sp:SpeI, St:StuI, Xb:XbaI

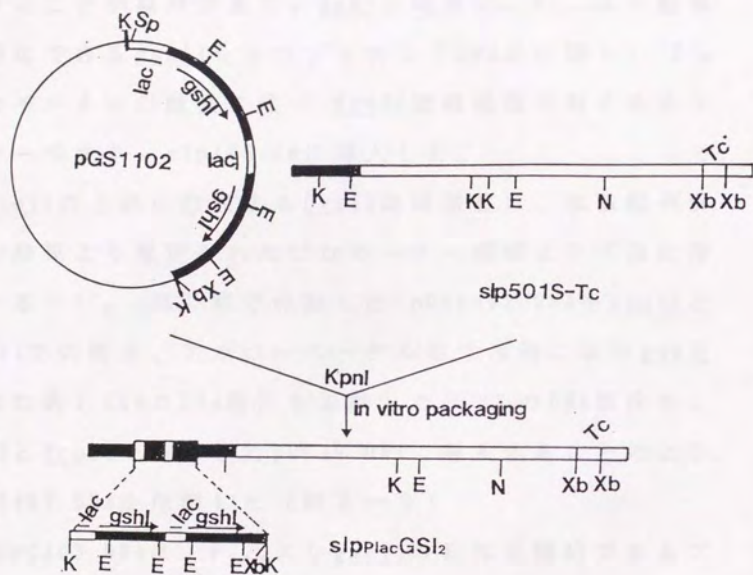


図3-8 P_{lac} より発現可能な $gshI$ を2コピー組み込んだファージDNA $sIp_{PlacGSI_2}$ の作製

E:EcoRI, K:KpnI, N:NheI, Sp:SpeI, Xb:XbaI

2) lac-プロモーターより発現可能な gshII を1コピー組み込んだ組み換え体 $slp_{P_{lac}}GSII$; DNAの作製

gshII の発現も、強力なプロモーターの使用により増強することが期待できる。gshI と同様に、 P_{lac} より転写を開始できる gshII をもつプラスミドDNAを作製し、 P'_{R} プロモーターの直後に唯一 EcoRI 認識部位を有するスリパーベクター $slp10S-Km$ に導入した。

gshII の上流に存在する DraII 認識部位は、塩基配列解析の結果より推定されたプロモーター領域より下流に存在する⁽¹⁶⁾。第2節で作製した $pGSB402$ DNAを DraII と EcoRI で切断後、アガロース・ゲル電気泳動により gshII を含む約1.2KbのDNA断片を単離した。このDNA断片を、SmaI と EcoRI で切断した $pUC19$ DNAに挿入することにより、 $pGSB403$ DNAを作製した(図3-9)。

$pGSB403$ DNAは、 P_{lac} より gshII の転写を開始できるプラスミドDNAである。 $pGSB403$ DNAを PvuII で切断後、アガロース・ゲル電気泳動より単離した約1.7KbのDNA断片(P_{lac} より発現可能な gshII を含む)を SmaI で切断した $pUC18$ DNAに挿入することにより $pGSB420$ DNAを作製した(図3-9)。 $pGSB420$ DNAは、 P_{lac} より転写を開始できる gshII を含む1.4KbのDNA領域の両側に EcoRI 認識部位を有するプラスミドDNAである。

pGSB420 DNAをEcoRIで切断後、アガロース・ゲル電気泳動を行ないgshIIを含む1.4KbのDNA断片を単離した。このDNA断片と、同じ制限酵素で切断したslp10S-Km DNAを結合後、in vitro packaging法によりファージ粒子とした。このファージ粒子をE.coli 1100に感染後、Km寒天培地上、32℃でコロニーを形成させた。これらKm耐性株の中から温度感受性株を選択して溶原菌を得た（得られたKm耐性株はすべて温度感受性株であった）。これら溶原菌各々をTY培地3ml中、32℃で培養し、K.U.が50～70の時42℃、15分間の熱誘導をかけた後37℃で2時間培養を続けた。培養液を超音波破碎処理したものを粗酵素液として、GSH-II酵素活性を測定した。酵素活性の高かった溶原菌よりファージDNAを抽出して制限酵素地図を作製した結果、P_Rプロモーターと順方向にgshIIが1コピー挿入されたslp_{P_{lac}}GSII₁* DNAが得られた（図3-10）。

*: P_{lac}はlac-プロモーター、GSIIの後の₁はP_{lac}-gshII 1コピーをファージDNAに組み込んでいることを表している。

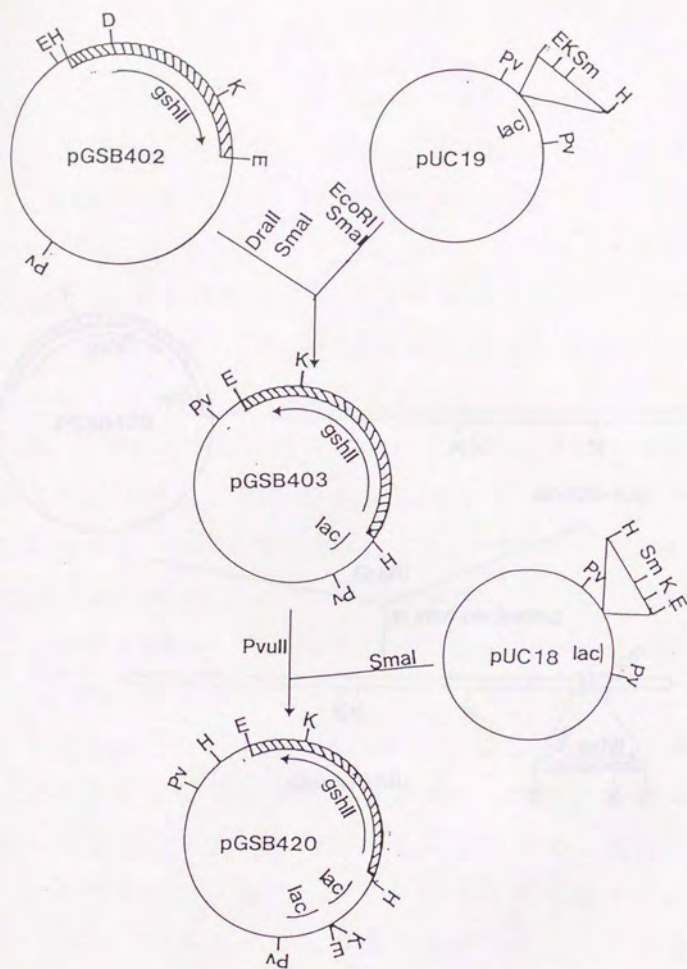


図3-9 P_{lac}より発現可能なgshIIを1コピー保持するpGSB420の構築

D: DraI, E: EcoRI, H: HinIII, K: KpnI, Pv: PvuII, Sm: SmaI

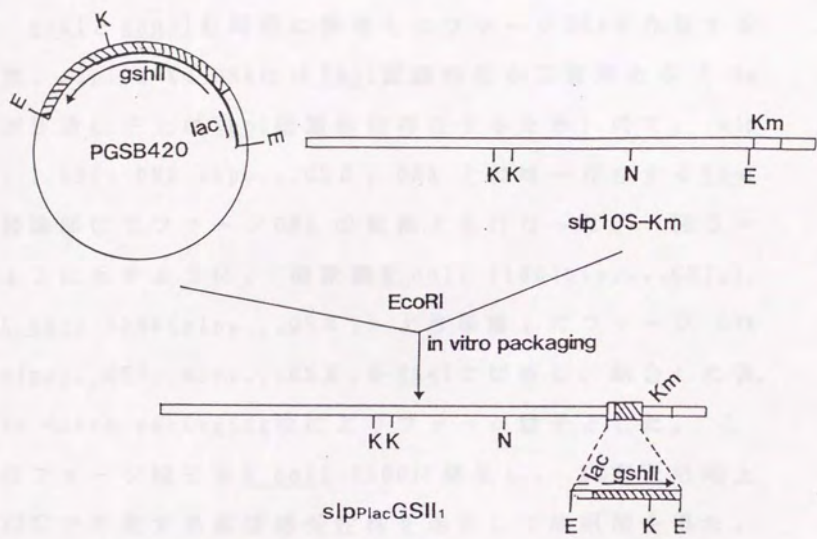


図3-10 $P_{1..}$ より発現可能な $gshII$ を1コピー組み込んだファージDNA $slp_{P_{1..}GSII_1}$ の作製

E: *EcoRI*, K: *KpnI*, N: *NheI*

3) lac-プロモーターより発現可能な gshI を2コピー及び gshII を1コピー同時に組み込んだ組み換え体 $slp_{P_{1.a.c}GSI_2-P_{1.a.c}GSII_1}$ の作製

gshI と gshII を同時に併せもつファージDNAを作製する際、 slp_{10S-Km} DNAには XhoI 認識部位が二箇所ある (Km 耐性遺伝子上に XhoI 認識部位存在するため) ので、 $slp_{P_{1.a.c}GSI_2}$ DNA, $slp_{P_{1.a.c}GSII_1}$ DNA 上に唯一存在する NheI 認識部位でファージDNAの組換えを行なった。図3-11に示すように、溶原菌 E. coli 1100 ($slp_{P_{1.a.c}GSI_2}$), E. coli 1100 ($slp_{P_{1.a.c}GSII_1}$) より単離したファージDNA $slp_{P_{1.a.c}GSI_2}$, $slp_{P_{1.a.c}GSII_1}$ を NheI で切断し、結合した後、*in vitro* packaging法によりファージ粒子とした。このファージ粒子を E. coli 1100に感染し、Km寒天培地上32°Cで生育する温度感受性株を選択して溶原菌を得た。これら溶原菌より E. coli LE392株を指示菌とした時プラークをつくらない、即ちファージ粒子を作る能力を欠失したファージDNAによる溶原菌を選択することにより目的の溶原菌 E. coli 1100 ($slp_{P_{1.a.c}GSI_2-P_{1.a.c}GSII_1}$ *) を得た。

*: $P_{1.a.c}$ は lac-プロモーター、GSI, GSII の後の $2, 1$ はそれぞれ2コピーの $P_{1.a.c}$ -gshI, 1コピーの $P_{1.a.c}$ -gshII をファージDNAに組み込んでいることを表す。

また、溶原菌 E. coli 1100 ($slp_{P_{1..c}GSI_2}$)と E. coli 1100 (slp_{GSI_1})よりファージDNAを抽出した。これらファージDNA $slp_{P_{1..c}GSI_2}$ と slp_{GSI_1} を XhoIで組換えることにより $slp_{P_{1..c}GSI_2-GSI_1}$ DNA及び溶原菌 E. coli 1100 ($slp_{P_{1..c}GSI_2GSI_1}$)を作製した (図3-12)。



図3-12. $slp_{P_{1..c}GSI_2}$ と slp_{GSI_1} の組換えによる $slp_{P_{1..c}GSI_2-GSI_1}$ DNAの作成

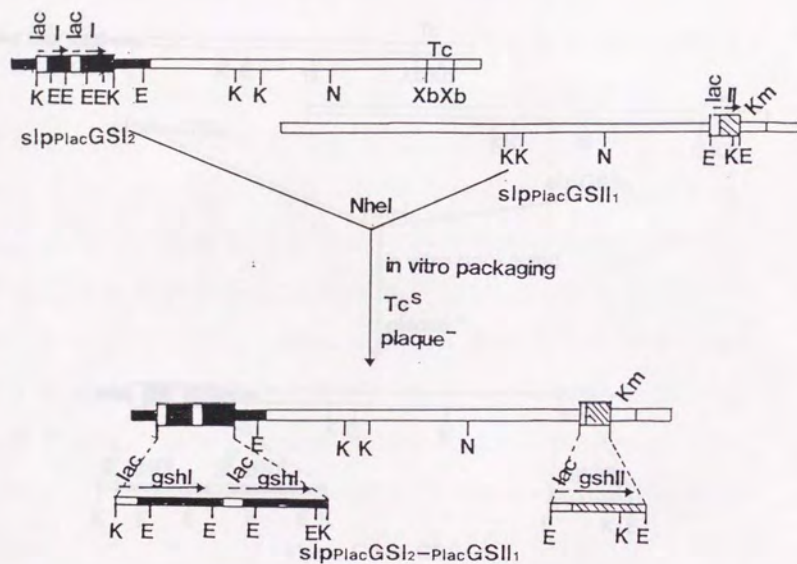


図3-11 P_{lac} より発現可能な $gshI$ を2コピー及び P_{lac} より発現可能な $gshII$ を1コピー同時に組み込んだファージDNA $slp_{P_{lac}GSII_2-P_{lac}GSII_1}$ の作製

E:EcoRI, K:KpnI, N:NheI, Xb:XbaI

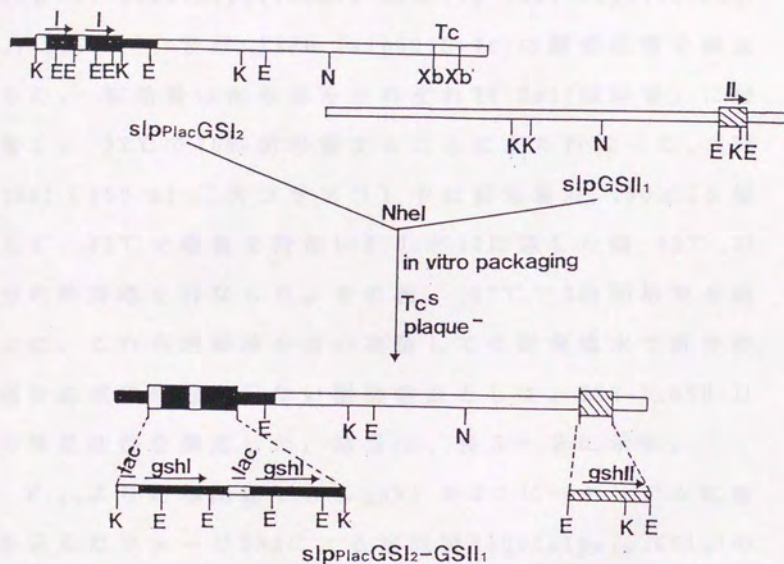


図3-12 $P_{1...}$ より発現可能な $gshI$ を1コピー、及び $gshII$ を1コピー組み込んだファージDNA $slp_{P_{1...}GSI_2-GSII_1}$ の作製

E: EcoRI, K: Kpnl, N: NheI, Xb: XbaI

4) GSH-I, GSH-II の酵素活性

溶原菌 E.coli 1100(s1pGSI₂), 1100(s1p_{P₁} GSI₂), 1100(s1p_{P₁} GSII₁), 1100(s1pGSII₁), 1100(s1pGSI₂-GSII₁), 1100(s1p_{P₁} GSI₂-GSII₁), 1100(s1p_{P₁} GSI₂-_{P₁} GSII₁), 及び 1100 (s1p501S-Tc)の酵素活性を測定した。前培養は溶原菌をそれぞれTY 3ml(試験管)に植菌し、32°Cで16時間培養することにより行なった。TY 10ml (150 ml 三角フラスコ)中に前培養液 100 μlを植えて、32°Cで培養を行ないK.U.が70に達した時 42°C, 20分の熱誘導を行なった。その後、37°Cで3時間培養を続けた。これら培養液を遠心集菌して生理食塩水で洗浄後、超音波破碎処理を行ない粗酵素液として、GSH-I, GSH-IIの酵素活性を測定した。結果は、表3-2に示す。

P₁より転写開始できる gshI を2コピータンデムに組み込んだファージDNAによる溶原菌1100(s1p_{P₁} GSI₂)のGSH-I活性は、13.0 μmol/mg蛋白/hであった。コントロール菌 1100(s1p501S-Tc)に比べて140倍、第2節で作製した1100(s1pGSI₂)に比べて約4倍の高活性を示した。一方、P₁より転写を開始できる gshIIを組み込んだ1100(s1p_{P₁} GSII₁)のGSH-II活性は、33.5 μmol/mg蛋白/hで、コントロール菌 1100(s1p501S-Tc)に比べて80倍以上の高活性を示した。第2節で作製した1100(s1p

GSH₁)に比べて、約1.2倍の活性を示した。

P_{1,2}より転写を開始できる gshI, gshIIを同時に発現できるように組み込んだ ファージDNAによる溶原菌1100 (slpP_{1,2}GSH₂-P_{1,2}GSH₁)のGSH-I, GSH-IIの酵素活性は、それぞれ、19.6, 45.1 μmol/mg蛋白/hであった。両遺伝子の上流に存在する本来のプロモーター領域及びファージ後期プロモーターP'_Rより発現可能なようにgshI, gshIIを同時に組み込んだ溶原菌1100 (slpGSH₂-GSH₁) に比べて、GSH-I, GSH-II活性は、それぞれ約4倍, 1.2倍に増幅され、コントロール菌1100 (slp501S-Tc)に比べてそれぞれ220倍, 110倍に増幅された。また、本溶原菌におけるGSH-IとGSH-IIの活性比は1 : 2.3であった。

gshI, gshII両遺伝子をP_{1,2}より転写開始できるように構築し、同一ファージDNAに導入した組み換え体DNAとそれによる溶原菌 を作製することによりGSH-I, GSH-II酵素活性が熱誘導のみにより、両遺伝子を増幅していない株に比べて、それぞれ、220倍、110倍と顕著に増大した菌株が得られた。

表 3-2 GSH-I, GSH-IIの酵素活性

菌株	酵 素 活 性	
	GSH-I*	GSH-II*
1100(slp501S-Tc)	0.09 (1)**	0.4 (1)
1100(slpGSI ₂ ****)	3.1 (34)	0.4 (1)
1100(slp _{P_{1,2}} cGSI ₂)	13.0 (144)	N.D.***
1100(slpGSII ₁)	0.09 (1)	28.6 (72)
1100(slp _{P_{1,2}} cGSII ₁)	N.D.	33.5 (84)
1100(slpGSI ₂ -GSII ₁)	5.1 (57)	36.0 (90)
1100(slp _{P_{1,2}} cGSI ₂ -GSII ₁)	18.7 (208)	36.5 (91)
1100(slp _{P_{1,2}} cGSI ₂ - _{P_{1,2}} cGSII ₁)	19.6 (218)	45.1 (113)

*: $\mu\text{mol/mg}$ 蛋白/時間

** : 1100(slp501S-Tc)の酵素活性を1とした時の相対活性

*** : N.D.; Not Determined

**** : _{P_{1,2}}cはlac-プロモーター、GSI, GSIIはそれぞれGSH-I, GSH-II酵素遺伝子を組み込んでいることを表し、₁或いは₂は、組み込まれている遺伝子のコピー数を示す。

第4節 グルタチオン生産能

表3-2に示したように、溶原菌 1100($s1p_{P1.a.c}GS12-P1.a.c.GSII_1$)を熱誘導を含む培養をすることによりGSH-I、GSH-IIの活性は、それぞれ220倍、110倍に上昇した。そこで、*gshI*、*gshII*を組み込んだファージDNAによる溶原菌の熱誘導を含む培養菌体を酵素源として、3つのアミノ酸からのグルタチオン生産能について検討を行なった。

溶原菌 1100($s1p_{P1.a.c}GS12-P1.a.c.GSII_1$)、1100($s1p_{GS12-GSII_1}$)、及びコントロール菌として *E. coli* 1100のGSH生産能を検討した。溶原菌からの酵素液は第3節4)で培養した菌体を生理食塩水で洗浄後、培養液と等量の5mM Tris·HCl(pH7.0) bufferに懸濁して超音波破碎処理を行なうことによって調製した粗酵素液を利用した。

E. coli 1100からの酵素液はTY培地 10ml (150ml三角フラスコ) 中、37°Cで16時間培養した菌体を生理食塩水で洗浄した後0.5mlのTris·HCl(pH7.0)bufferに懸濁し超音波破碎処理を行なうことによって調製した。反応組成は、表3-3に示す。GSHの酵素合成では2段階の酵素反応にいずれもATPが必要である。従って、1分子のGSHの生成に2分子のATPが消費される。生成するADPによるGSH生成反応の阻害を少しでも避けるために、アセチルリン酸

を加えて大腸菌自体のAKによるATP再生系と共役させた。反応は、37°Cで30分間緩やかに浸とうしながら行なった。生成したGSHの量はTietzeの方法により測定した。結果は、表3-4に示す通りである。

熱誘導を含む培養を行なった溶原菌体を酵素源としてGSH生産能を測定した結果、E. coli本来のDNA領域のみを有する gshI, gshII を組み込んでいる 1100(slpGSI₂-GSII₁) においては、5.7 μmol/mg蛋白/hであったのに対して、lac-プロモーターより発現可能な gshI, gshII を組み込んでいる 1100(slp_{P_{lac}}.GSI₂-P_{lac}.GSII₁) においては、22.4 μmol/mg蛋白/hのGSH生産能がみられた。一方、1100(slpGSI₂-GSII₁), 1100(slp_{P_{lac}}.GS₂-P_{lac}.GSII₁) の熱誘導後の培養菌体におけるGSH-I活性は、それぞれ、5.1, 19.6 μmol/mg蛋白/hであったことから、GSH生産能の向上は、GSH生成反応の律速段階になっている比活性の低いGSH-I酵素活性をスリーパーベクターの利用とP_{lac}の使用により、強化することに伴いなされたことになる。

E. coli 1100におけるGSH生産能は0.07 μmol/mg蛋白/hであったので、スリーパーベクターを利用して両酵素活性を強化した 1100(slpGSI₂-GSII₁) では、80倍、更に加えてP_{lac}からの両酵素遺伝子の発現を誘導した 1100(slp_{P_{lac}}.GSI₂-P_{lac}.GSII₁) では、320倍ものGSH高生産能を示したことになる。

表 3-3 GSH生産能測定用反応液組成

L-Glutamate	80mM
L-Cysteine	20mM
Glycine	20mM
MgCl ₂	25mM
Acetyl-P	20mM
ATP	20mM
K-Phosphate buffer(pH7.0)	50mM
粗酵素液(sonicated)	100 μ l

1.0ml, 37°C

表3-4 グルタチオン生産能

菌株	酵素 活性*		GSH生産能*
	GSH-I	GSH-II	
1100(s1p _{P_{1,ac}} GSI ₂ -P _{1,ac} GSII ₁ **)	19.6	45.1	22.4
1100(s1pGSI ₂ -GSII ₁)	5.1	36.0	5.7
1100	0.09	4.0	0.07

*: $\mu\text{mol}/\text{mg}$ 蛋白/時間

**:
P_{1,ac}はlac-プロモーター、GSI,GSIIはそれぞれGSH-I,
GSH-II酵素遺伝子を組み込んでいることを表し、₁或いは
₂は、組み込まれている遺伝子のコピー数を示す。

第5節 考察

E. coli B株由来のGSH-IとGSH-II精製酵素の比活性はそれぞれ216, 650 $\mu\text{mol}/\text{mg}$ 蛋白/hと報告されている^(13, 14)。GSH-Iの比活性はGSH-IIの比活性に比べると1/3程度である。E. coli1100におけるGSH-I, GSH-II活性はそれぞれ0.09, 0.4 $\mu\text{mol}/\text{mg}$ 蛋白/hであり(表3-4)、GSH-Iの比活性はGSH-IIの約1/4であった。

この比活性の低いGSH-I酵素活性を強化するために、第2節において、GSH-Iをコードする遺伝子 gshI を2コピータンデムにスリーパーベクターに導入し、更に、 gshII を1コピー組み込んだファージDNAと組換えることにより、ファージDNA上に同時に二酵素遺伝子を併せもつ溶原菌($\text{s1pGSI}_2\text{-GSHII}_1$)を作製した。熱誘導を含む培養により遺伝子発現を増幅した結果、GSH-I, GSH-IIの活性はそれぞれ、5.1, 36.0 $\mu\text{mol}/\text{mg}$ 蛋白/h、コントロール菌に比べ、60倍、90倍に上昇した。このファージDNA $\text{s1pGSI}_2\text{-GSHII}_1$ では、2コピー組み込んだ gshI のうち上流に存在する gshI のプロモーター領域は、不完全な状態として組み込まれている。また、 gshI を1コピー組み込んだ溶原菌1100(s1pGSI_1)の熱誘導後のGSH-I活性が1.5 $\mu\text{mol}/\text{mg}$ 蛋白/hであり、2コピー組み込んだ溶原菌

1100(slpGSI₂)では、 $3.1 \mu\text{mol/mg蛋白/h}$ であった。gshIのみを組み込んだ溶原菌では、gshIの発現は本来のプロモーターまたはファージの後期プロモーターP'_Rより行なわれ、gshI,gshIIを共に組み込んだ溶原菌では、GSH-Iの活性がgshIのみを組み込んでいる時に比べて上昇していることから、gshIIのプロモーターからもgshIの発現が行なわれている可能性がある。

しかしながら、この時、GSH-Iの比活性は、GSH-IIの1/7であった。両酵素遺伝子は同一ファージDNA上に導入しているため、熱誘導によりファージDNAの自己増殖後も細胞当たりの両遺伝子のコピー数の比は、一定(gshI:gshII=2:1)である。gshIのコピー数は、gshIIの2倍になったのにもかかわらず、熱誘導後の両酵素の比活性の差が親株に比べて大きくなったのは、どのプロモーターから発現が開始しているにせよgshIの転写・翻訳効率がgshIIに比べて低いということが考えられる。

第3節では、gshI, gshIIの転写効率を上昇させるために、P_{1.0}より転写を開始できるgshI,gshIIを導入した溶原菌 1100(slpP_{1.0}.GSI₂-P_{1.0}.GSII₁)を作製した。熱誘導後のGSH-I,GSH-II活性はそれぞれ、 $19.6, 45.1 \mu\text{mol/mg蛋白/h}$ であり、コントロールに比べてそれぞれ、220倍、110倍に上昇した(表3-2)。この菌においては、GSH-Iの比活性は、GSH-IIの4/9であった。更

に P_{lac} を利用した場合、本来のプロモーターによる発現に比べて、GSH-IIの活性上昇が20%程度であったのに対し、GSH-Iにおいては約4倍に上昇した(表3-2)。

この結果は、 P_{lac} を利用することにより gshI の転写効率が大きく上昇したことを意味する。更に、大腸菌より精製したGSH-IとGSH-IIの活性比が1:3であることと、gshI のコピー数は gshII の2倍であることを考え合わせると、gshI と gshII は同じ効率で発現していると推測することができる。一方、プラスミドベクターにより両酵素遺伝子の発現を本来のプロモーターを利用して増幅させた場合、両遺伝子が同じ効率で発現することが報告されている⁽¹⁰⁸⁾。ファージDNAを利用した場合、本来のプロモーター(或いは P'_{R} かもしれない)よりの発現効率に差がでたことと併せて考えると、ファージDNAのような長い線状DNA(ファージ粒子ができないため細胞内では熱誘導後コンカテマーの形で存在する)と、プラスミドDNAのような環状DNAでは、細胞内におけるDNA立体構造が異なるため、プロモーターの機能に変化が起きるのかもしれない。今後細胞内におけるDNAの構造と遺伝子発現の相関性を研究することによって、興味深い知見が得られるのではなからうか。

gshI、gshII 遺伝子を同時に併せもつ溶原菌のGSH-I、GSH-II活性は、両酵素共それぞれの遺伝子を単独に組み

込んだ溶原菌より高い活性を示した（表3-2）。要因の一つとしては、それぞれのプロモーターとファージのもつP₁プロモーターの相乗効果が考えられる。また、細胞当たりのP₁の数が増えることによってレプレッサーの影響が減ることによるP₁からの効率良い発現が行なわれていることも考えられる。また、gshIIに関しては、gshIとともに組み込まれることによりファージのコート蛋白質が作られなくなるので、酵素の生産性が上昇したことも考えられる。この転写・翻訳効率の違いを明確にするために、mRNAを単離するなどして、転写開始点を決定することは今後の課題であろう。

P₁からの発現の誘導は42℃、15～20分間の熱誘導のみにより行ない、GSH-I、GSH-II酵素活性は誘導後急激に上昇し、コントロールに比べてそれぞれ、220倍、110倍にまで高まった。この様に、IPTGなどの誘導基質を添加せずにプロモーターからの転写を誘導できるシステムは、工業生産において経済的にメリットがあろう。また、本研究において作製した溶原菌はスラントにうえて、室温で1年以上放置しておいても溶原性は全く失われず、更に酵素生産性も同レベルに保持された。

第4節に示したように、GSH生産能もGSH-I酵素活性の強化に伴い上昇し、溶原菌1100(s1p_{P₁}GSII₂-P₁GSII₁)では、親株の320倍もの高生産能が得られた。この生

産能は、これまでプラスミドを用いて作製した GSH高生産菌よりはるかに高い生産能である。

GSH生産能を検定する時、大腸菌本来の有するアセテートカイネースをATP再生系として利用し、酵素反応の結果生成されるADPによる障害を軽減するために反応液中にアセチルリン酸を添加した。遺伝子組換え技術を用いて強化したATP要求酵素を物質生産に利用する場合、ATP再生系酵素活性も同様に強化することにより、より効率的な物質生産システムの構築が期待される。このような見地から、次章以降において、ATP再生系の強化を検討した。

本研究において、スリーパーベクターを利用し、更に強力なプロモーターである P_{lac} を利用することにより *gshI*, *gshII* 遺伝子を同時に組み込んだ溶原菌、即ち、両酵素遺伝子を安定に保持しながら熱誘導のみにより両酵素活性を強化できる GSH高生産菌の育種を行なった。この複数酵素系遺伝子群を同時に増幅するシステムは、他の物質生産にも全く同様の手法で応用できるので、今後、工業的物質生産システムのみならず、大腸菌代謝制御機構などの研究にも応用できるであろう。

第4章 アセチルトカイネース遺伝子とフォスフォ トランスアセチレーズ遺伝子のクローニング

本稿は、アセチルトカイネース遺伝子とフォスフォトランスアセチレーズ遺伝子のクローニングについて報告している。この2つの遺伝子は、2つの異なるアセチルトカイネース遺伝子とフォスフォトランスアセチレーズ遺伝子から構成されている。アセチルトカイネース遺伝子は、アセチルトカイネース合成酵素として機能する。フォスフォトランスアセチレーズ遺伝子は、アセチルトカイネースのリン酸化を触媒する。この2つの遺伝子は、アセチルトカイネース合成とリン酸化の調節に重要な役割を果たしている。この研究は、アセチルトカイネース合成とリン酸化の調節機構を明らかにする上で重要な貢献をしている。この研究は、アセチルトカイネース合成とリン酸化の調節機構を明らかにする上で重要な貢献をしている。

本研究は、アセチルトカイネース合成とリン酸化の調節機構を明らかにするために、アセチルトカイネース合成酵素とリン酸化酵素のクローニングを行った。この研究は、アセチルトカイネース合成とリン酸化の調節機構を明らかにする上で重要な貢献をしている。この研究は、アセチルトカイネース合成とリン酸化の調節機構を明らかにする上で重要な貢献をしている。

アセチルトカイネース合成酵素のクローニングは、アセチルトカイネース合成酵素のcDNAをライブラリからスクリーニングすることによって行われた。この研究は、アセチルトカイネース合成とリン酸化の調節機構を明らかにする上で重要な貢献をしている。この研究は、アセチルトカイネース合成とリン酸化の調節機構を明らかにする上で重要な貢献をしている。

第1節 はじめに

物質生産に生体内酵素反応系を利用する場合、その反応系にATPを要求する酵素が含まれる場合がある。本研究において検討しているGSH生産系は、共にATPを要求する二種酵素から生成される系である。このような反応系を物質生産に応用するためには、効率的なATP再生系の構築が必要となろう。アセテートカイネース(AK)は、第1節に論じたようにATP再生系酵素として有効であると考えられているが、遺伝子の単離は如何なる細胞種からも全く報告されていなかった。これまで、ATP再生系としてのAKは、精製酵素又は、菌体本来が有している酵素として利用されてきた。

本研究において、ATP再生系をより効率的に利用し物質生産システムへ応用するために、大腸菌由来のAKをコードする遺伝子のクローニングと発現を検討した。同時に、塩基配列の決定を行なった。

アセテートカイネースをコードする遺伝子 ackA は、大腸菌染色体地図上 49.5 分近傍にマップされている⁽⁴⁹⁾ (図4-1)。 5-phosphoribosylamime:glutamine pyrophosphate phosphoribosyltransferase をコードする purF と ackA は、約5%の頻度で cotransduce する⁽³⁰⁾。

50)。また、purFの塩基配列は、既に決定されている(112)。このような点から、ackAをクローニングするためにpurFを出発点として、gene walking法(113)を採用した。

図4-1において、ackAに近接して、マップされているptaはフォスホトランスアセチレース(PTA)をコードする遺伝子である(49, 50)。PTAは、細胞内においてAKとリンクして酢酸の排出、アセチルCoAの形成などの代謝機構に関与(30, 37)していると考えられている。

酵素反応系の中にはCoAを要求するものもあり、アセチルCoAは生体内におけるアセチル化反応において中心的な役割を果たしている物質である。アセチルCoA \longleftrightarrow CoA 転換反応を効率的に行なう系を構築することにより、工業的物質生産の新たな展開が期待される。AKと同様にPTAをコードする遺伝子の単離も、これまで全く報告されていなかった。

本研究において、大腸菌由来のPTAをコードする遺伝子ptaのクローニングと発現を検討した。ptaのクローニングは、PTA欠損株において、PTA活性を相補するクローンをショットガン法により検索することにより行なった。

また、ackAとptaの大腸菌染色体上における正確な位置を決定し、両遺伝子のプラスミド上での同時発現についてもあわせて検討した。

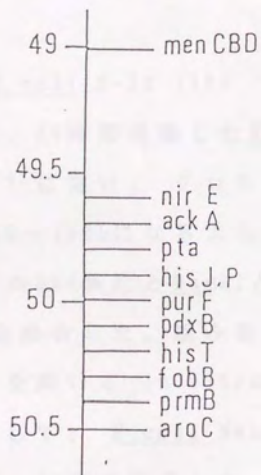


図4-1 E.coli K-12クロモゾーマルDNA49.5分近傍の遺伝子地図

Bachman; Microbial Reviews 47:180~230 (1983) による