

研究ノート

クロラムフェニコール耐性遺伝子によるゲノム重複を活用した枯草菌育種法

稲岡 隆史[§], 草房 克江, 本山 志織

独立行政法人 農業・食品産業技術総合研究機構 食品総合研究所

Investigation of *Bacillus subtilis* gene amplification by utilizing chloramphenicol-resistance geneTakashi Inaoka[§], Katsue Kusafusa, Shiori MotoyamaNational Food Research Institute, NARO
2-1-12 Kannondai, Tsukuba, Ibaraki, 305-8642, Japan**Abstract**

Gene amplification, reiteration of a chromosomal DNA segment, spontaneously occurs during replication in all organisms. In this study, we investigated *B. subtilis* gene amplification using a chloramphenicol-resistance gene (*cat*) as a selection marker. When *B. subtilis* strain TI74 carrying a single copy set of *cat* and β -galactosidase gene (*lacZ*) on the genome was plated onto the medium containing chloramphenicol at the higher dosages than its minimum inhibitory concentration, it was found that all high-level resistant strains carried the multi-copy of *cat* gene. Furthermore, the *lacZ*-amplifications were also observed in the *cat*-amplified strains, thereby resulting in the increase in β -galactosidase activity. These results indicate that the *cat*-amplified strains can be selected for increased chloramphenicol resistance efficiently. Thus, *cat* gene is thought to be useful as a selection marker for gene amplification in *B. subtilis*.

緒 言

生物の設計図である遺伝情報は、次の世代へと正確に受け継がれてゆかなければならない。そのため、ゲノムDNA上で突然変異のような遺伝的改変が起こる頻度は極めて低く抑制されている。しかしながら、ゲ

ノムDNAの一部分が重複するゲノム重複現象は複製の過程でしばしば起こることが知られている¹⁻³⁾。このゲノム重複現象は多コピー化した遺伝子の発現量を増大させるだけでなく、重複領域の進化速度を加速することにもなるため、生物進化の原動力にもなっていると考えられている。

ゲノム重複により遺伝子コピー数変動するモデ

[§] 連絡先 (Corresponding author), tina2672@affrc.go.jp

ルを図1に示す。ゲノム重複は、非相同組換えによる2コピー化ステップと相同組換えによる多コピー化ステップの2段階のステップによって進行すると考えられている³⁾。ゲノム重複の最初の2コピー化ステップでは相同配列のような特別な配列は必要なく、RecAも関与しないが、そのメカニズムは不明である。このRecAに依存しない非相同組換え頻度は、RecA依存相同組換え頻度に比べて低いため、最初の2コピー化ステップがゲノム重複の律速段階となっている。しかしながら、リボソームRNA遺伝子のようにゲノム上に多コピー存在する遺伝子や直列反復配列等の相同配列間では、2コピー化ステップがRecA依存相同組換えによって進行するため、ゲノム重複の発生頻度は相対的に高くなる。2コピー化ステップの結果、ゲノム上に同一配列が連続して存在する細胞とその領域を欠失した細胞が誕生するが、環境中の選択圧により生存に適した細胞が選抜されることになる。2コピー化ステップで生じた相同配列間では、RecA依存相同組換えが起こり易くなるため、コピー数の増加が有利な環

境下では、相同組換えを繰り返すことにより多コピー化が促進される。逆に、非選択環境下では、コピー数の低下した細胞が生き残るため、結果的には重複した遺伝子領域のコピー数は低下することになる。このように、ゲノム中の遺伝子コピー数は環境変化に応じて増減するので、ゲノム重複は生物が有する環境適応機構の一つと考えることもできる。

発酵産業を支える有用微生物は幾多の遺伝的改変が加えられ、有用形質の向上、特に有用物質の生産能の向上が図られている。しかしながら、従来法による変異操作では工業レベルの生産株を得るまでに多大な労力と時間を要するため、より効率的な微生物育種法の開発が求められている。この要望に応えるため、筆者らは、ゲノム重複現象を活用することにより、生物の有用機能の発現を増大させる微生物育種法の構築が期待できると考えた。そこで、本研究では、枯草菌を用いてゲノム重複を活用した微生物育種について検討を行なった。

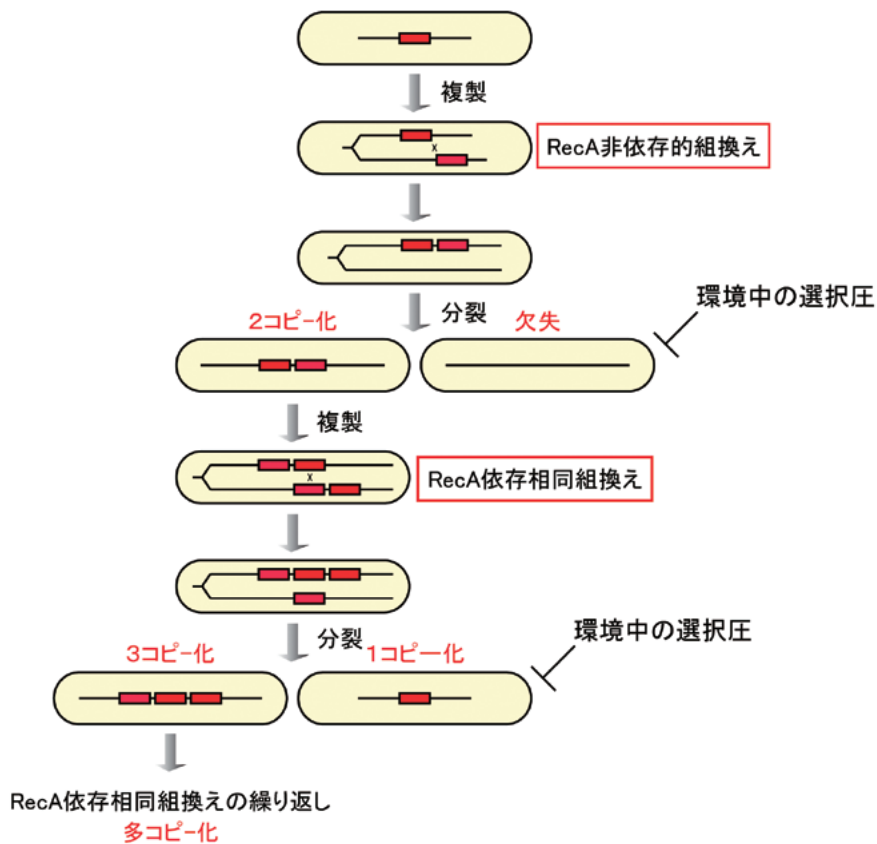


図1. 遺伝子コピー数の変動

実験材料および方法

1. 使用菌株

プラスミド pDL2はクロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ遺伝子 (*cat*) とβ-ガラクトシダーゼ遺伝子 (*lacZ*) を枯草菌ゲノム上の *amyE* 遺伝子上に挿入するプラスミドである⁴⁾。このプラスミドの *lacZ* 遺伝子は転写プロモーターを有していないため、pMutinT3⁵⁾由来の *spac* プロモーター領域を含む *Bgl*III-*Bam*HI断片を *lacZ* 遺伝子直前の *Bam*HIサイトに連結し、pMSL1を構築した。pMSL1プラスミドを制限酵素 *Sca*Iにより直鎖状にした後、*Bacillus subtilis* 168 (*trpC2*) を形質転換し、4 μg/mLのクロラムフェニコール (Cm) を含むLB寒天培地上で選抜した。得られた形質転換体の *cat* 遺伝子コピー数が1コピーであることを定量PCR法にて確認し、TI74株 {*trpC2 amyE:: (Pspac-lacZ, cat)*} とした。

cat 遺伝子重複株は、*B. subtilis* TI74株をLB培地で3-4時間培養後、適当な濃度 (50, 60, 70, 80 μg/mL) のCmを含むLB寒天培地上に適量塗布することによって取得した。

2. ゲノムDNA調製

ゲノムDNAの調製には、実験に応じて2通りの調製法を用いた。コロニーから直接ゲノムDNAを調製する場合には、市販のゲノムDNA調製試薬インスタジーン (バイオラッド社) を用いて調製した。培養液からゲノムDNAを調製する場合には、適当な濃度のCmを含むLB培地で一晚培養した培養液を遠心し、上清を除去後、一般的なゲノムDNA調製法であるフェノール/クロロホルム抽出法により調製した。

3. 定量PCRによるコピー数定量

遺伝子コピー数の定量にはアプライド・バイオシステムズ社のリアルタイムPCR装置7300を使用した。PCR反応は、THUNDERBIRD SYBR qPCR Mix (東洋紡) を使用し、20 μL反応液に各プライマーを終濃度300nMになるよう添加して行なった。コントロール遺伝子としてリボソームタンパク質S10をコードする *rpsJ* 遺伝子を用いた。使用したプライマーは表1に示した。

4. β-ガラクトシダーゼ活性測定

適当な濃度のCmを含むLB培地で一晚培養した菌

体液について650 nmにおける吸光度 (A_{650}) を測定した。その培養液0.1 mLを遠心後、上清を除去して、菌体を活性測定まで-30℃で保存した。凍結菌体を0.5 mLのZ緩衝液 {60mM Na_2HPO_4 , 40 mM NaH_2PO_4 , 10 mM KCl, 1 mM $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.35% (v/v) メルカプトエタノール} に懸濁し、30 μLのトルエンを添加して攪拌した。その後、サンプルに0.2 mLのONPG溶液 (4 mg/mL *O*-ニトロフェニル-β-D-ガラクトシドを含むZ緩衝液) を添加して発色が認められるまで28℃で保温した。発色後、0.5 mLの反応停止液 (1M Na_2CO_3) を加えて、反応時間 (t 分) を記録し、420 nmにおける吸光度 (A_{420}) を測定した。β-ガラクトシダーゼ活性 ($\text{U} \cdot \text{A}_{650}^{-1} \cdot \text{mL}^{-1}$) は、 $A_{420} \cdot t^{-1} \cdot A_{650}^{-1} \cdot 0.1^{-1} \cdot 1000$ により算出した。

結果及び考察

ゲノム重複株の選抜において、より厳しい選択条件下ではゲノム重複株の出現頻度は低下する。一方、比較的温和な選択条件では、同時に出現する多数の偽耐性菌や自然突然変異株を効率的に排除し、目的のゲノム重複株を選抜しなければならない。そのため、微生物育種へのゲノム重複の活用にはゲノム重複株を効率的に選抜できる選択マーカー遺伝子が必要不可欠である。ゲノム重複株を選抜する薬剤としては、(1) 自然突然変異等の他の耐性菌が出現し難い薬剤であることに加え、汎用性の面から、(2) 広い抗菌スペクトルを有することが望ましい。また、ゲノム重複株の選択マーカー遺伝子に望まれる特徴として、(1) 耐性遺伝子のコピー数増加に伴って薬剤に対する耐性度も増大すること、及び(2) 耐性遺伝子長が比較的短いこと、等が挙げられる。このような条件において、クロラムフェニコール (Cm) は広い抗菌活性を有しており、自然突然変異耐性菌も出現し難く、選択に用い

表1. 定量PCRで使したプライマー

プライマー	配列 (5' → 3')
rpsJ-F	GTAATCTGGTCCGATTCCG
rpsJ-R	GTGGTGTGGGTTTACAAT
cat-F2	GTGACAAGGGTGATAAACTC
cat-R2	TCAGGTATAGGTGTTTTGGG
lacZ-C F	ACATCAGCCGCTACAGTC
lacZ-C R	CTGGAATTCCGCCGATAC

る薬剤としては優れた薬剤であると言える。また、その耐性遺伝子である *Streptococcus pneumoniae* 由来のクロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ遺伝子 (*cat*) は約800bpと小さく、微生物分野では遺伝子破壊用のマーカー遺伝子として広く利用されており、選択マーカー遺伝子としての活用が期待できる。そこで、本研究では、選択に用いる薬剤としてCmを、選択マーカー遺伝子として*cat*遺伝子を利用し、ゲノム重複を活用した枯草菌育種について検討を行なった。

B. subtilis TI74株はゲノムの *amyE* 遺伝子領域に *cat* 遺伝子及びβ-ガラクトシダーゼ遺伝子 (*lacZ*) を含むDNA (約5.3 kb) が挿入されており、5 μg/mLのCm耐性を有している。そこで、*B. subtilis* TI74株を様々な濃度 (10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80 μg/mL) のCmを含むLB寒天培地上に塗布した結果、50 μg/mL以上の濃度では高度耐性菌を取得することが可能であったが、40 μg/mL以下の濃度では選抜が困難であった。Cm耐性菌の出現頻度は、Cm 50 μg/mLでは約 10^{-5} であり、60 μg/mL以上の濃度では約 10^{-6} – 10^{-7} であった。そこで各選択濃度で選抜したコロニーの*cat*遺伝子のコピー数を定量した (表2)。コントロールとして、5 μg/mLのCmを含むLB寒天培地上で生育させた*B. subtilis* TI74株コロニーについても同様の実験を行なった。その結果、定量したCm高度耐性菌 (50, 60, 70, 80 μg/mL耐性) の全てにおいて*cat*遺伝子のコピー数が増加していた (表2)。これはCmに対する自然突然変異株が出現し難いという特徴によるものと考えられ、*cat*遺伝子が非常に優れた選択マーカーであることを示すものである。実際、筆者らが試験したいいくつかの他の薬剤耐性遺伝子マーカーではゲノム重複株の出現頻度は最高でも30%程度であり、ゲノ

ム重複株が取得できないものもあった (未発表データ)。

Cm濃度が50 μg/mLの条件で選抜されたコロニー17株について、*cat*遺伝子のコピー数平均は 5.0 ± 0.96 であり、60 μg/mLの濃度で選抜されたコロニー10株ではコピー数平均は 12 ± 3.0 であった。しかしながら、70および80 μg/mLで選抜されたコロニーにおける*cat*遺伝子のコピー数の平均は60 μg/mLの濃度で選抜されたものと同様であったことから、本条件での*cat*遺伝子のコピー数は12コピー程度が上限であると思われた。今後、*cat*遺伝子をゲノム重複株の選抜に利用するためには、*cat*遺伝子のコピー数を更に増加させる必要がある。そのためには、*cat*遺伝子産物であるクロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ活性を低下させるような変異を導入するか、より弱い転写プロモーターから発現させることにより可能であると考えられる。なぜなら、クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ活性が低下した細胞では、十分なCm抵抗性を獲得するために*cat*遺伝子のコピー数をより増加させなければならないためである。

一方、*lacZ*遺伝子についても同様にコピー数の定量実験を行なったが、コピー数は*cat*遺伝子と同程度であり、*cat*遺伝子の重複に伴って*lacZ*遺伝子も重複したことが示された (データは示さず)。これらゲノム重複株におけるβ-ガラクトシダーゼ活性は、Cm 50 μg/mLで選抜されたコロニーにおいて平均約2–3倍、最大で約5倍増加することが確認された (表2)。しかしながら、Cm 50 μg/mLで選抜されたコロニーと60 μg/mLで選抜されたコロニーでは平均コピー数が2倍以上増加しているにも拘らず、β-ガラクトシ

表2. Cm耐性を指標としたゲノム重複による枯草菌育種

	Cm耐性 (μg/mL)				
	5	50	60	70	80
<i>cat</i> 重複株の割合 (<i>cat</i> 重複株数/試験株数)	0/9	17/17	10/10	10/10	10/10
<i>cat</i> コピー数 (平均)	0.94 ± 0.045	5.0 ± 0.96	12 ± 3.0	12 ± 1.7	11 ± 1.3
<i>cat</i> コピー数 (最少-最大)	0.84 - 0.98	2.7 - 6.8	8.2 - 15	8.1 - 14	9.1 - 14
β-ガラクトシダーゼ活性	110 ± 22	270 ± 90	310 ± 58	240 ± 46	250 ± 53
β-ガラクトシダーゼ活性 (最少-最大)	64 - 139	166 - 532	252 - 447	180 - 329	186 - 359

*cat*重複株は*rpsJ*コピー数に対する*cat*コピー数の比が2以上のものとした。分母はコピー数の定量を行なった菌株数を示す。これら試験した全ての株について、β-ガラクトシダーゼ活性を測定した。

ダーゼ活性では有為な差は観察できなかつた(表2)。重複した遺伝子は非選択環境下ではコピー数が低下するため、本実験ではスクリーニング時の高濃度Cmを添加した培地で増殖させた菌体のβ-ガラクトシダーゼ活性を測定している。そのため、この高濃度のCmがタンパク質合成を阻害している可能性も否定できない。もしβ-ガラクトシダーゼ活性が増加しない原因が高濃度のCm添加によるものであるならば、RecAを破壊する等、RecA依存相同組換えを生じさせない変異⁶⁾を導入し、Cm無添加の条件で培養することによって回避できる可能性がある。

このように、*cat*遺伝子はゲノム重複株の選抜マーカーとして非常に有望であるが、コピー数の更なる増加と重複遺伝子の安定化が必要である等、実用化のためには更なる改良が必要であり、今後検討してゆく予定である。

要 約

ゲノム重複を活用した微生物育種法の開発を目指し、その効果を枯草菌で検証した。Cm耐性遺伝子(*cat*)をゲノム重複株の選抜用マーカーとして用いたところ、単離した全ての株でゲノム重複が生じており、*cat*遺伝子がゲノム重複株の選抜に極めて有効であることが示された。また、*cat*遺伝子と共に重複させたβ-ガラクトシダーゼ遺伝子においても、酵素活性を約5倍まで増加させることができた。

参考文献

- 1) Hastings, P. J., Bull, H. J., Klump, J. R., and Rosenberg, S. M., Adaptive amplification: an inducible chromosomal instability mechanism, *Cell*, **103** (5), 723-731 (2000)
- 2) Hastings, P. J., Adaptive amplification, *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.*, **42** (4), 271-283 (2007)
- 3) Sandegren, L., and Andersson, D. I., Bacterial gene amplification: implications for the evolution of antibiotic resistance, *Nat. Rev. Microbiol.* **7** (8), 578-588 (2009)
- 4) Fukuchi, K., Kasahara, Y., Asai, K., Kobayashi, K., Moriya, S., and Ogasawara, N., The essential two-component regulatory system encoded by *yycF* and *yycG* modulates expression of the *ftsAZ* operon in *Bacillus subtilis*. *Microbiology*, **146**, 1573-1583 (2000)
- 5) Moriya, S., Tsujikawa, E., Hassan, A. K. M., Asai, K., Kodama, T., and Ogasawara, N., A *Bacillus subtilis* gene-encoding protein homologous to eukaryotic SMC motor protein is necessary for chromosome partition. *Mol. Microbiol.*, **29** (1), 179-187 (1998)
- 6) Tyo, K. E. J., Ajikumar, P. K., and Stephanopoulos, G., Stabilized gene duplication enables long-term selection-free heterologous pathway expression. *Nat. Biotechnol.*, **27** (8), 760-765 (2009)