

## [成果情報名] ゲノム重複による遺伝子の多コピー化を利用した微生物育種法

**[要 約]** ゲノム重複はゲノム DNA が部分的に多コピー化する現象であり、薬剤耐性遺伝子等の適当な選択マーカー遺伝子の利用によりゲノム重複株が選抜できる。これを活用して微生物の有用遺伝子の発現を増大させる微生物育種が可能となる。

**[キーワード]** ゲノム重複、多コピー化、微生物育種、遺伝子発現、選択マーカー

**[担 当]** 加工流通プロセス・食品生物機能利用

**[代表連絡先]** 電話 029-838-7991

**[研 究 所]** 食品総合研究所・食品バイオテクノロジー研究領域

**[分 類]** 研究成果情報

---

### [背景・ねらい]

発酵細菌等の有用機能をより効率的に向上させる微生物育種法の開発が望まれている。ゲノム重複は複製の過程でゲノム DNA が部分的に多コピー化される現象である。ゲノム重複が起こる頻度は低いですが、コピー数の増加が有利な環境下では多コピー化が促進されることになるため、適当な選択マーカーを利用することによりゲノム重複の微生物育種への活用が期待できる(図1)。そこで、クロラムフェニコール耐性遺伝子(*cat*)を選択マーカーとして導入した枯草菌(*B. subtilis*)を用いて、ゲノム重複を介した微生物育種法の効果を検証した。

### [成果の内容・特徴]

1. *B. subtilis* TI74 株は、*B. subtilis* 168 株ゲノム上の *amyE* 遺伝子領域に *cat* 遺伝子及び  $\beta$ -ガラクトシダーゼ遺伝子(*lacZ*)を含む約 5.3kb の外来 DNA を挿入して作製した(図2)。
2. *cat* 遺伝子を1コピー有する TI74 株はクロラムフェニコール(Cm) 5  $\mu$ g/mL に耐性であるが、高濃度(50 - 80  $\mu$ g/mL)の Cm を含む寒天培地に適量の菌体をプレーティングすることにより高耐性株を取得できる。試験した全ての高耐性株において *cat* 遺伝子のコピー数が増加しており、*cat* 遺伝子による選抜は極めて有効である(表1)。
3. 選抜した全ての株において、*lacZ* 遺伝子のコピー数は *cat* 遺伝子のコピー数と一致しており(表には示さず)、 $\beta$ -ガラクトシダーゼ活性も増大する(表1)。

### [成果の活用面・留意点]

1. Cm 60  $\mu$ g/mL 以上で選抜した場合、平均コピー数が一定になることから、Cm 耐性能が最大になっていると考えられる(表1)。
2. Cm 60  $\mu$ g/mL では、*lacZ* 遺伝子のコピー数が増加しているにも拘らず  $\beta$ -ガラクトシダーゼ活性が増大しないことから、添加している高濃度の Cm がタンパク質合成に影響している可能性が考えられる(表1)。
3. *cat* 遺伝子プロモーターを低発現プロモーターに置換することにより、さらにコピー数を増加させることも可能である。
4. 他の薬剤耐性遺伝子やアミノ酸合成の遺伝子等でも利用可能であるが、ゲノム重複株の出現頻度は使用する薬剤や濃度によって異なるため、予め検討する必要がある。
5. 目的微生物が元来有する薬剤耐性遺伝子を重複させたい目的領域にセルフクローニングして利用することも可能である。
6. 数百 kb の領域が重複することもあるが、重複領域の長さとの出現頻度は逆相関関係にある。
7. コピー数を一定に保つためには、常に選択薬剤を添加するか、高耐性株の取得後に RecA のような組換え関連タンパク質を欠損させる必要がある。
8. 微生物だけでなく、作物育種等にも活用できる可能性がある。
9. ゲノム重複を抑制することにより細菌の薬剤耐性菌の出現を抑制できる可能性がある。

[具体的データ]

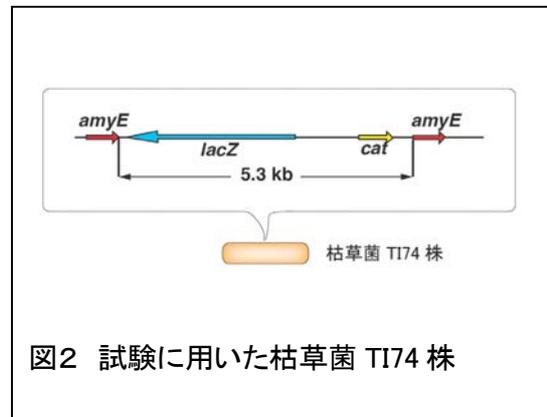
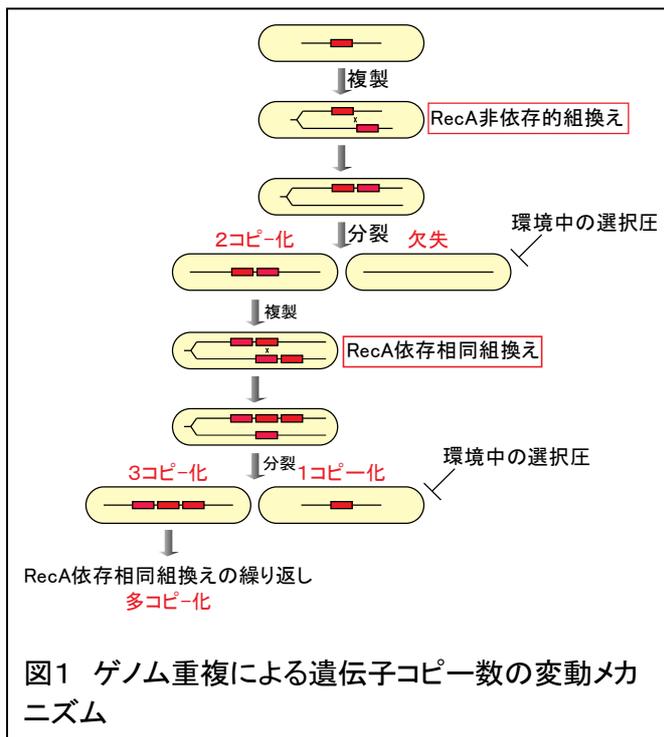


表1 Cm 耐性遺伝子を利用したゲノム重複による枯草菌育種

	選択に用いた Cm 濃度 (μg/mL)				
	5	50	60	70	80
cat 重複株数/試験株数	0/9	17/17	10/10	10/10	10/10
cat コピー数 (平均)	0.94±0.045	5.0±0.96	12±3.0	12±1.7	11±1.3
cat コピー数 (最低-最高)	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(平均、U/ml)	110±22	270±90	310±58	240±46	250±53
β-ガラクトシダーゼ活性(最低-最高)	64-140	170-530	250-450	180-330	190-360

cat 重複株は *rpsJ* 遺伝子コピー数に対する *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。

(稲岡隆史)

[その他]

中 課題名 : 新需要創出のための生物機能の解明とその利用技術の開発

中課題番号 : 330d0

予算区分 : 交付金

研究期間 : 2011-2015

研究担当者 : 稲岡隆史

発表論文等 : 稲岡隆史ら (2014) 食研報、78:印刷中