



# 好熱性Bacillus属細菌における新規発現ベクターの開発とその利用

池田, 隆幸

---

(Degree)

博士 (農学)

(Date of Degree)

1992-10-02

(Date of Publication)

2009-05-15

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

乙1673

(JaLCD0I)

<https://doi.org/10.11501/3070638>

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D2001673>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



神戸大学博士論文

好熱性Bacillus属細菌における新規発現ベクターの  
開発とその利用

平成4年8月

池田 隆幸

# 目 次

緒 論	1
第1章 好熱性 <u>Bacillus</u> 属細菌由来の薬剤耐性プラスミドの分離と その性質	6
第1節 緒 言	6
第2節 実験材料および方法	7
第3節 結 果	1 2
1、好熱性薬剤耐性菌の分離とプラスミドの検索	1 2
2、 <u>Bacillus subtilis</u> の形質転換	1 2
3、好熱性薬剤耐性菌N1株とT15株の性質	1 3
4、pTHT15の制限酵素切断地図	1 3
5、pTHN1の制限酵素切断地図	1 4
6、pTHT15とpTHN1の必須領域の解析	1 4
7、pTHT15とpTHN1による <u>B. stearothermophilus</u> の形質転換	1 7
第4節 考 察	1 7
第5節 要 約	2 0
第2章 好熱性 <u>Bacillus</u> 属細菌由来の薬剤耐性プラスミドと、 pUB110との遺伝的關係	3 2
第1節 緒 言	3 2
第2節 実験材料および方法	3 3
第3節 結 果	3 6
1、pUB110、pTHT15及びpTHN1のハイブリダイゼーション解析	3 6
2、pTHT15とpTHN1またはpUB110の不和合性	3 7
3、コピー数の推定	3 8
4、カナマイシン不活化酵素のin vitro解析	3 9
第4節 考 察	4 0

第5節 要約	42
第3章 <u>Bacillus subtilis</u> および <u>B. stearothermophilus</u> における プラスミドの複製保持と遺伝子発現の温度依存性	53
第1節 緒言	53
第2節 実験材料および方法	54
第3節 結果	56
1、 <u>B. subtilis</u> におけるプラスミドの遺伝子発現と熱安定性	56
2、プラスミド間のハイブリダイゼーション	57
3、 <u>B. subtilis</u> における組換えプラスミドの作製	59
4、組換えプラスミドの <u>B. subtilis</u> における熱安定性	59
5、 <u>B. stearothermophilus</u> CU21株の形質転換	60
6、 <u>B. stearothermophilus</u> におけるプラスミドの安定性と 薬剤耐性遺伝子の発現	62
7、3剤耐性プラスミドの作製	63
第4節 考察	64
第5節 要約	67
第4章 好熱性 <u>Bacillus</u> 属細菌由来のプラスミドpTHT15のテトラ サイクリン耐性遺伝子の塩基配列	81
第1節 緒言	81
第2節 実験材料および方法	82
第3節 結果	84
1、pTHT15のTc <sup>r</sup> 遺伝子の塩基配列	84
2、S1マッピング	85
3、Tc <sup>r</sup> 遺伝子のmRNAの二次構造予測とTET蛋白質の誘導発現	86
4、 <u>Staphylococcus</u> 由来のTc <sup>r</sup> 蛋白質とTET蛋白質のアミノ酸 配列の比較	87
第4節 考察	88
第5節 要約	90

第5章	$\alpha$ -アミラーゼ遺伝子のクローニングとテトラサイクリン耐性遺伝子の発現制御領域を用いた分泌生産系の構築	97
第1節	緒言	
第2節	実験材料及び方法	97
第3節	結果	
1、	$\alpha$ -アミラーゼ遺伝子のクローニング	100
2、	Tc <sup>r</sup> 遺伝子のプロモーターおよび発現制御領域と $\alpha$ -アミラーゼ遺伝子との連結	101
3、	誘導におけるTc濃度の影響	102
4、	Tcによる $\alpha$ -アミラーゼ遺伝子の誘導発現	103
第4節	考察	104
第5節	要約	106
総括		115
参考文献		119
謝辞		125
本論文に関係のある主な報告		126

## 緒 論

微生物は種々の炭素源や窒素源などから、それぞれの環境に応じて自身の生育に必要な物質を過不足無く合成することができる。微生物のこのような合目的性は、遺伝子の形質発現レベルや細胞内酵素反応レベルにおける精巧な調節反応の結果である。

一方、微生物の工業的利用とは、その調節作用を人為的に改変、制御し、目的物質の生産性向上を図ることである。従来、このような目的のために突然変異処理による遺伝情報の改変が主として行われてきたが、これは一般に1～数塩基対を変化させるに過ぎず、生産性を飛躍的に向上させるにも一定の限度があるのはやむを得ないことであった。これに対し、遺伝子組換え技術が発展した結果、1,000塩基対以上のDNA断片でも操作することが可能となり、遺伝情報を質、量共に飛躍的に変化させることができるようになった。今その技術的發展を歴史的に概観してみると、1960年後半から1970年にかけての薬剤耐性プラスミドの発見<sup>1) 2)</sup>とその大量調製法の確立<sup>3) 4)</sup>や、DNAを特定部位で切断する制限酵素<sup>5) 6)</sup>およびこれを連結するDNAリガーゼの発見<sup>7)</sup>、さらに生細胞へのプラスミドDNAの移入法の確立<sup>8)</sup>によりまず大腸菌で遺伝子操作実験が行われるようになった。また、特定の遺伝子を単離し、これを多コピー型のベクタープラスミドに組み込むことにより遺伝子のコピー数を増加させるいわゆる遺伝子導入量効果や、クローン化した遺伝子の形質発現を人為的に制御することにより生産物の収量を増大させることも基本的に可能となった。現在では、高等動植物遺伝子のクローニングを含め、種々の生理活性蛋白質の構造が解明され、種々の有用物質の工業生産も行われるようになってきた。このような遺伝子操作技術は、

有用なベクターと形質転換法さえ存在すれば、大腸菌以外の如何なる生物でも宿主として利用することが可能であり、これまでに枯草菌<sup>9) 10) 11)</sup>、酵母<sup>12) 13) 14)</sup>、放線菌<sup>15)</sup>を始めとして種々の微生物にも適用されている。また最近では、動物細胞や植物細胞においても宿主・ベクター系が開発され有用物質生産に利用されつつある。

一方、微生物の中には55℃以上の高温環境下で増殖する好熱性細菌が存在する。これらは一般に高い増殖速度を示し、かつその生産する各種酵素は熱や化学的変性剤に対して耐性が強いことから、この好熱性細菌を発酵工業に利用することにより、耐熱性酵素の生産や、培養時における冷却費の軽減等が期待され、その利用価値は高いものと考えられる。さらに、遺伝子操作技術をこのような好熱性細菌に適用することができれば、高い増殖速度と遺伝子投与効果による物質生産能力の飛躍的向上のみならず、好熱菌における各種(中温菌由来、好熱菌由来)遺伝子の形質発現とその遺伝子産物を比較検討することにより、好熱菌における耐熱機構の分子レベルでの解明など、基礎的研究も可能となり、応用的見地からも学術的見地からもその意義は大きいと考えられる。

本研究の目的は、このような性質を持つ好熱性細菌を宿主とした遺伝子操作系の開発を目的として、特にベクターの開発とその利用を行うことにあるが、研究開始に先立ち宿主菌の選択理由について簡単に述べてみたい。

好熱性細菌は、大きく分けて生育温度が75℃以上の高度好熱菌と、55～75℃の中等度好熱菌とに分類される<sup>16)</sup>。高度好熱菌には、グラム陰性桿菌 Thermus thermophilus、Thermus flavus や有孢子桿菌 Bacillus caldolyticus、Bacillus caldotenaxなどがあげられる。これに対して、中等度好熱菌の例としては Bacillus stearothermo-

philusが特に有名である。Thermus属細菌はグラム陰性細菌に特有の3層構造からなる細胞膜を有し、その点からすると大腸菌 (Escherichia coli)と類似性があり、またB. caldolyticus、B. caldotenax、B. stearothermophilusなどの好熱性Bacillus属細菌は内生孢子を形成する点で枯草菌 (Bacillus subtilis)の類縁であると言える。ある特定の遺伝子をクローン化し、これら類縁菌相互にそれぞれ移入し、中温菌と好熱菌の立場から同一遺伝子の特性を解明する上からも進化論的立場からも興味あることである。さらに、Bacillus属細菌は種々の菌体外分泌酵素を生産し<sup>17)</sup>、これらの利用および分泌機構の解析についても意義が高いと考えられたので、本研究では好熱性Bacillus属細菌、中でも研究的背景が比較的整ったB. stearothermophilusを宿主とする有用なベクタープラスミドの構築に力を注いだ。

B. stearothermophilus ATCC12980 (IFO12550)は基準菌株であり<sup>18)</sup>、40~70℃の範囲で生育が可能である<sup>19)</sup>。特に60℃付近で最大の増殖速度を示し、その世代時間が約15分であることが知られている。この菌株は、その役割の同定が行われていないいわゆるクリプティックプラスミドpBS01を保持し、また適当なマーカーを有していなかったが、本研究開始後Imanakaら<sup>20)</sup>によってストレプトマイシン耐性 (Sm<sup>r</sup>)を付与し、プラスミドpBS01を脱落させたB. stearothermophilus CU21株が造成された。また、このB. stearothermophilus CU21株のプラスミドによる形質転換法も同時に開発された。そこで、本研究においても好熱菌宿主についてはB. stearothermophilus CU21株を分譲していただき宿主菌として使用した。本菌株は、各種抗生物質に対する感受性が強く、形質転換によるプラスミドの移入を薬剤耐性マーカーで容易に確認できると考えられたので、本

研究ではこのような薬剤耐性遺伝子を保持するプラスミドを種々の好熱性細菌から検索単離することから実験を開始した。

第1章では、自然界に分布する好熱性 Bacillus 属細菌よりプラスミドDNAの分離を試み、これらのうちプラスミド上に薬剤耐性遺伝子を保持するものを B. subtilis の形質転換実験より選択した。分離した2種の薬剤耐性プラスミド pTHT15 と pTHN1 についてその薬剤耐性遺伝子や、プラスミドの複製に関与する遺伝子部分（複製開始点領域）を決定すると共に、これらのプラスミドの基本的諸性質についても検討を行った。

第2章では、枯草菌ベクター pUB110 と好熱性 Bacillus 属細菌由来の pTHT15 と pTHN1 の遺伝子の相同性について調べた。その結果、pTHT15 と pUB110 は複製開始点領域が、pTHN1 と pUB110 は薬剤耐性遺伝子部分が非常に相同性が高いことが認められた。また、pTHT15、pTHN1、pUB110 の3つのプラスミド間に共通の相同性領域が存在し、細胞膜への結合領域であると考えられた。

第3章では、B. subtilis と B. stearothermophilus におけるプラスミド6種類（pUB110、pTHT15、pTHN1、pTP4、pTP5、pC194）の熱安定性を調べた。その結果、B. subtilis においては pUB110、pTHT15、pTHN1、pC194 はその生育限界温度まで安定に保持され薬剤耐性遺伝子の発現が可能であったが、pTP4 と pTP5 は 45℃ 以上で不安定であった。しかし、pUB110 と組換えプラスミドを作製することで安定化されることが明かとなった。次に、B. stearothermophilus においては、pC194、pUB110、pTHT15、pTHN1 が形質転換可能であったが、pC194 は 55℃ の生育温度においてはほとんど宿主内から脱落した。pTHN1 は 55℃ まで、pUB110、pTHT15 は 60℃ 付近まで安定に保持された。しか

し、pTP4およびpTP5は形質転換能を有していなかった。また、pC194の複製開始点領域を熱安定なpTHT15の複製開始点領域に変換することにより安定化できることが示された。これらの結果をもとに、B. subtilis、B. stearothermophilusの両方で複製発現可能な3つの薬剤に耐性なシャトルベクターを構築した。

第4章では、好熱性Bacillus属細菌由来プラスミドpTHT15のTc<sup>r</sup>遺伝子の全塩基配列を解明し、その構造遺伝子のオープンリーディングフレームと転写開始点を決定した。また、Tc<sup>r</sup>発現がTcによる誘導を受けることから、プロモーター部分における発現制御機構について考察を進め、mRNAによるトランスレーショナルアテニュエーションモデルを提唱した。

第5章では、発現制御を確認し、さらにTc<sup>r</sup>遺伝子の利用を目的として、B. subtilisから $\alpha$ -アミラーゼ遺伝子をクローニングし、得られた $\alpha$ -アミラーゼ遺伝子の構造遺伝子部分をpTHT15のTc<sup>r</sup>遺伝子のプロモーターおよび発現制御領域に連結した。その結果、500 ng/mlのTc添加により15倍もの分泌発現の制御が可能であることを確認した。

なお、最後には本研究の結果を総括し、好熱性細菌と枯草菌における遺伝子操作系への展望を述べた。

## 第1章 好熱性 Bacillus 属細菌由来の薬剤耐性プラスミドの分離とその性質

### 第1節 緒言

大腸菌を始めとするグラム陰性細菌からは、すでに薬剤耐性プラスミドが多数分離され、これらの改良により多くの有用なプラスミドベクターが開発されている。またその中には広い宿主域を示し、種々のグラム陰性細菌において利用可能なベクターも存在している。一方、Bacillus subtilisを中心とするグラム陽性細菌においてもプラスミドベクターによる形質転換法とベクタープラスミドの開発により遺伝子操作系が確立されている。また、B. subtilisのプラスミドベクターとして利用されているプラスミドの中には、pUB110のように形質導入及びプロトプラスト法の形質転換法により他の Bacillus 属細菌、たとえば B. pumilus、B. licheniformis 及び B. megaterium に導入可能な宿主域の比較的広いものもある。しかしながら、本研究で宿主として用いる B. stearothermophilus は、同じ Bacillus 属細菌であってもその生育環境が55℃付近と非常に異なるために、B. subtilis における系がそのまま使えるとは言い難い。

一方、好熱菌由来のプラスミドとしては高度好熱菌 Thermus thermophilus と T. flavas から4種のプラスミドが分離されている。しかし、これらのプラスミドはその性質が不明であり、またグラム陰性細菌由来であることからそのまま利用できることは期待できない。

また、B. stearothermophilus においてはテトラサイクリン耐性

(Tc<sup>r</sup>) プラスミド pAB124<sup>21) 22)</sup>、pTB20<sup>20)</sup>、および Tc<sup>r</sup> カナマイシン耐性プラスミド pTB19<sup>20)</sup>、が分離された報告があるのみであった。そこで、本研究では中等度好熱菌 B. stearothermophilus<sup>20)</sup> において、自己複製可能で適当な選択マーカ―を保持するプラスミドベクターを構築することを目的とし、自然界から新たにこのようなプラスミドを分離することを試みた。その結果、好熱性 Bacillus 属細菌と考えられる菌株より2種類の薬剤耐性プラスミドを得た。本章では、これらの基本的性質の解明と薬剤耐性遺伝子及び複製開始点の位置及び、B. stearothermophilus の形質転換能について調べ、ベクターとしての利用性について考察した。

## 第2節 実験材料及び方法

### 培地組成

分離した好熱性細菌の培養はすべて T Y S 培地<sup>21)</sup> (トリプトン 20g、酵母エキス 10g、NaCl 10g / ℓ (pH 7.3)) で行った。また、固形培地として用いる場合には、これに寒天 (15g/ℓ) を添加した (T Y S 寒天培地)。 B. subtilis RM125株の培養は NY培地 (ニュートリエントブロス 8g、酵母エキス 5g、NaCl 3g、MgSO<sub>4</sub> 0.2g / ℓ (pH7.0)) を、 B. stearothermophilus CU21株の培養は L培地 (トリプトン 10g、酵母エキス 5g、NaCl 5g / ℓ (pH 7.3)) を用いた。

### 使用菌株およびプラスミド

形質転換実験における受容菌として B. subtilis RM125 (arg15 leuA8 hsrM r(-) m(-))<sup>22)</sup> と B. stearothermophilus CU21 (Sm<sup>r</sup>) を用いて行った。またプラスミドとして pUB110 (カナマイシン耐性 (Km<sup>r</sup>)、4.4Kb)<sup>23)</sup>、pC194 (クロラムフェニコール耐性 (Cm<sup>r</sup>)、2.9Kb)<sup>24)</sup>、pTP5 (テトラサイクリン耐性 (Tc<sup>r</sup>)、2.9Kb)<sup>25)</sup> を用いた。

### 好熱性薬剤耐性菌の分離

自然界から採取した土壌試料の約1gを50mlのT Y S培地に加え、55℃で激しく振盪した。その5mlに1μg/ml濃度になるようにアンピシリン (Amp)、クロラムフェニコール (Cm)、エリスロマイシン (Em)、カナマイシン (Km)、ネオマイシン (Nm)、テトラサイクリン (Tc)、又は5μg/mlになるようにストレプトマイシン (Sm) をそれぞれ加え55℃で2時間激しく振盪培養する。この培養液の0.1mlを同じ抗生物質をそれぞれ Amp:25μg/ml、Cm:25μg/ml、Em:25μg/ml、Km:25μg/ml、Nm:25μg/ml、Tc:25μg/ml、Sm:50μg/ml 添加したT Y S寒天培地上に塗布し、55℃で14から18時間保温した。生じた好熱性薬剤耐性菌は単一コロニー分離によって純化した後、それぞれの薬剤を含むT Y S寒天培地上で4℃で保存した。

### プラスミドDNAの分離

好熱性薬剤耐性菌についてのプラスミドDNAの検索はBringhamら<sup>21)</sup>の方法に準じて行った。分離したそれぞれの薬剤を含むT Y S培地(10ml)中で55℃、14から16時間振盪培養した。その培養液10ml

を遠心分離し、得られた菌体を3mlのTES緩衝液(20mM Tris-HCl (pH 7.5), 100mM NaCl, 5mM EDTA)で洗浄した後、0.3mlの25%のショ糖を含むTES緩衝液に懸濁した。5~10mg/ml濃度のリゾチームを含むTES緩衝液を100μl加え、氷上で10分間静置した。50μlの0.25M EDTA溶液を加えさらに37°Cで10分間リゾチーム処理を行った後、50μlの10% SDS溶液と100μlの5M NaCl溶液を添加、充分混合し氷上で30分間静置した。18,000~19,000rpmで30分間遠心分離し、その上清をエッペンドルフチューブに移し、1mlの95%エタノールを加え-20°Cで30分間保った後、15,000rpm、5分間の遠心分離によりDNAを沈澱画分に集め、1mlの95%エタノールで沈澱を洗浄し減圧下で乾燥した。得られたDNAを200μlのTEN緩衝液(20mM Tris-HCl (pH 7.5), 20mM NaCl, 1mM EDTA)に溶解し、RNAase A(シグマ)を50μg/mlになるように加え37°C 20分間保温後、TES緩衝液で飽和したフェノール溶液を等量加え激しく混和し15,000rpmの遠心分離によりDNAを含む水層を回収した。これに3M 酢酸ナトリウム溶液20μlと95%エタノールを600μl加え-70°Cで数分保ち、15,000rpmで5分間の遠心分離を行い、得られたDNA沈澱画分を70%エタノール溶液で洗浄後、TES緩衝液(10mM Tris-HCl (pH 8.0), 1mM EDTA)に溶解した。得られたDNA試料は、アガロースゲル電気泳動による解析およびB. subtilis RM125株の形質転換に用いた。

形質転換して得られたB. subtilis RM125株からのプラスミドの分離は、培養をNY培地で行い、リゾチーム処理を37°Cで30分間行った他は上記の好熱性薬剤耐性菌と同様に行った。

また、形質転換して得られたB. stearothermophilus CU21株からのプラスミドの分離はImanakaら<sup>20)</sup>の方法に従って行った。すなわち、それぞれの薬剤を含むL培地(10ml)で55°C一晩振盪培養した培養液

1μlを、エッペンドルフチューブに移して遠心集菌し、得られた菌体をTES緩衝液で洗浄した後100μlの25mM Tris-HCl(pH 8.0)、10mM EDTA、50mM グルコース、5mg/μlリゾチーム溶液に懸濁した。37℃で30分間リゾチーム処理を行った後、0℃で約5分間保持し、これに0.1N NaOH、1% SDS溶液200μlを加えて混合した。0℃で5分間保った後、これに3M酢酸ナトリウム溶液(pH4.8)を150μl加えて混合し、0℃で1時間静置後、15,000rpm 10分間の遠心分離を行った。遠心分離上清約0.4μlを別のエッペンドルフチューブに移し、TES緩衝液で飽和したフェノール溶液とクロロホルムを1:1で混合した溶液を500μl加え激しく振盪後5000rpm 5分間の遠心分離を行った。上層部分約400μlを別のエッペンドルフチューブに移し、95%エタノール1μlを加えて-20℃で30分間保った後15,000rpm 10分間の遠心によりDNAを沈澱画分に集めた。得られたDNAをTE緩衝液100μlに溶解させた後、1mg/μlのRNase A溶液を1μl加え37℃1時間反応しDNA溶液とした。

プラスミドを大量に閉環状DNAとして調製する際にはTanaka<sup>26)</sup>の方法に従って塩化セシウム-エチジウムブロマイド平衡密度勾配超遠心を行った。得られたプラスミドはTEN緩衝液で飽和したイソアミルアルコールでエチジウムブロマイドを除いた後、TEN緩衝液で透析しプラスミド溶液としてクロロホルム存在下4℃で保存した。

### 形質転換方法

B. subtilis RM125株の形質転換は、ポリエチレングリコール(PEG)6000によるプロトプラスト形質転換法<sup>11)</sup>により行った。また、B. stearothermophilus CU21株の形質転換はImanaka<sup>20)</sup>の方

法に従って行った。

## 酵素

制限酵素は宝酒造(株)、Bethesda Research Laboratories(BRL)およびNew England Biolabsから購入し、切断反応はそれぞれの説明書に従って行った。DNAリガーゼは宝酒造(株)から購入した。突出末端の連結反応はプラスミドDNAを切断後T E S緩衝液に飽和したフェノール溶液で制限酵素を失活、除タンパクし、エタノール沈澱によりプラスミドDNAを回収した。これを66mM Tris-HCl(pH7.6)、6.6mM MgCl<sub>2</sub>、10mM ジチオスレイトール(DTT)、0.1mM ATP溶液に溶解後DNAを混和し、0.1ユニットのT4 DNAリガーゼを加え、22℃1時間反応を行った。

## 電気泳動

スクリーニングした環状DNAは、0.7% (wt/vol) アガロース (Seakem社, LE) を含む水平式スラブゲルを用いて電気泳動を行った。電気泳動用緩衝液としてT B E緩衝液(50mM Tris-ほう酸(pH8.3)、1mM EDTA)を用いた。切断したプラスミドDNAの大きさは、水平式0.7%アガロースゲル電気泳動又は縦型5%ポリアクリルアミドゲル電気泳動を行い、バクテリオファージλ cI 857 Sam7 DNAのHindIII分解物(23.12、9.42、6.56、4.36、2.32、2.03、0.56、0.13Kb)、バクテリオファージφ X 174のHaeIII分解物(1353、1078、872、603、310、281、271、234、194、118、89、3bp)、pBR322(4361bp)、pUB110(4548bp)、pC194(2910bp)を分子量マーカーとして用いた。

### 第 3 節 結 果

#### 1. 好熱性薬剤耐性菌の分離とプラスミドの検索

筑波近郊の土壌及び堆肥から採取した試料より、エリスロマイシン耐性株24株、カナマイシン耐性株11株、ネオマイシン耐性株8株、ストレプトマイシン耐性株45株、クロラムフェニコール耐性株15株、テトラサイクリン耐性株22株を分離した。これらの好熱性薬剤耐性菌についてCreated Lysate法とアガロースゲル電気泳動法によってプラスミドの有無を判定した結果、11株にプラスミドDNAが認められた(表1-1)。これらは、コロニーの形態及び顕微鏡観察によりそれぞれ別個の菌株であると判断された。

#### 2. Bacillus subtilis の形質転換

11株の好熱性薬剤耐性菌から、塩化セシウム-エチジウムプロミド平衡密度勾配超遠心によりプラスミドDNAをそれぞれ調製した。これらのプラスミドの内ベクタープラスミドとしての利用性を考慮し、まず5Kb以下のプラスミドについて薬剤耐性遺伝子の存在を検討するため、各プラスミド1 $\mu$ gをB. subtilis RM125株へ形質転換した。それぞれのプラスミドを有する親株が耐性を示す薬剤の存在下で選択を行ったところ、形質転換株が得られたのはT15株由来のプラスミドによるTc<sup>r</sup>形質転換株、及びN1株よりTc<sup>r</sup>、Km<sup>r</sup>、Tc<sup>r</sup>Km<sup>r</sup>形質転換株であった。これらのB. subtilis形質転換株からプラスミドを調製し、アガロースゲル電気泳動を行ったところTc<sup>r</sup>を示す形質転換株からは、

T15株又はN1株の4.5Kbプラスミドが、Km<sup>r</sup>を示す形質転換株からはN1株の4.8Kbプラスミドが検出された。また、Tc<sup>r</sup>Km<sup>r</sup>の形質転換株からは4.5Kbと4.8Kbの2種類のプラスミドが検出された（図1-1）。そこで、N1株に由来しKm<sup>r</sup>を付与する4.8KbプラスミドをpTHN1と名付けた。次に、T15株とN1株に由来しTc<sup>r</sup>を付与する4.5Kbプラスミドは、後に示す制限酵素EcoRI、HaeIII、HpaII、HhaIによる切断実験で、全く同じ切断パターンを示したことから同じプラスミドであると判断された。そこで、これらのプラスミドをpTHT15と名付けた。以上の結果から、好熱性薬剤耐性株N1株はKm<sup>r</sup>プラスミドpTHN1とTc<sup>r</sup>プラスミドpTHT15を有し、T15株はpTHT15を有していることが明らかとなった。

### 3. 好熱性薬剤耐性菌N1株とT15株の性質

薬剤耐性プラスミドを有していた好熱性細菌N1株とT15株についてそれらの基本的性質を調べた。両菌共に絶対好気性のグラム陽性菌でありカタラーゼ生産性と内生孢子形成能を有することから、いずれも Bacillus属に分類されるものと結論した。

両菌の生育限界温度を調べたところ、N1株が59℃ T15株が65℃であった。両菌についてこれ以上の性質検討は行わなかった。

### 4. pTHT15の制限酵素切断地図

pTHT15を種々の制限酵素で切断し、アガロースゲル電気泳動及びポリアクリルアミドゲル電気泳動を行った。バクテリオファージλ cI 857 Sam7 DNAのHindIII分解物、バクテリオファージφ X 174の

HaeIII 分解物を分子量マーカーとして用いて得られるDNA断片の大きさを測定し、制限酵素切断パターンの解析を行った。供試した制限酵素による切断個数と得られる切断断片の大きさについて表 1 - 3 に示す。その結果、BstE II、EcoR V、Fok I、Hpa II、でそれぞれ 1 カ所、EcoR I、Hae III、Hinc II、Pvu II でそれぞれ 2 カ所ずつ切断されること及び AccI、Bam HI、Bgl II、Hind III、Kpn I、Mlu I、Sal I、Sma I、Xho I では切断されないことが明かとなった。これらの制限酵素による切断部位は、これらの供試した制限酵素を 2 種類同時に切断反応することにより、用いた制限酵素切断箇所の距離が推定できる。そこで、図 1 - 2 に示す制限酵素地図を作製した。

#### 5. pTHN1 の制限酵素地図

pTHN1 を pTHT15 と同様に種々の制限酵素で切断し、切断パターンの解析を行った。供試した制限酵素による切断個数と得られる切断断片の大きさについて表 1 - 4 に示す。その結果、AccI、Bgl II、Bcl I、Pst I、Xba I でそれぞれ 1 カ所、Tha I で 2 カ所、EcoR I で 3 カ所切断されること、及び Bam HI、Cla I、Hpa I、Kpn I、Mlu I、Pvu II、Sal I、Sma I、Xho I では切断されないことが明かとなった。さらに、制限酵素を 2 種類同時に切断反応することによって、図 1 - 3 に示す制限酵素切断地図を作製した。

#### 6. pTHT15 と pTHN1 の必須領域の解析

プラスミド pTHT15 及び pTHN1 の薬剤耐性領域と複製開始点領域を決定することは、これらのプラスミドをクローニングベクターとし

て利用するために必要であると考えられる。そこで、pTHT15およびpTHN1の複製開始点領域と薬剤耐性部位を限定するために、全塩基配列がHorinouchiら<sup>27)</sup>によって明らかとされたpC194を用いて、それぞれの領域のクローニングを行った。

pC194は、その複製開始点領域内に制限酵素HhaIとHpaIIの唯一の切断部位を有し、これらの部位に他の遺伝子を導入することによって複製開始点領域をクローニングすることが可能である。そこで、pC194をHhaI又はHpaIIで切断した後、アルカリホスファターゼによって末端を脱リン酸化し、HhaIで切断したpTHT15またはHpaIIで切断したpTHN1とそれぞれDNAリガーゼを用いて連結した。それぞれの反応液をPEG6000によるプロトプラスト形質転換法で*B. subtilis* RM125株を形質転換した。得られたCm<sup>r</sup>を有する形質転換株からプラスミドDNAを調製し、挿入DNA断片について制限酵素切断とアガロースゲル電気泳動を用いて解析した。その結果、pTHT15のHhaI切断による最も大きなA断片がpC194のHhaI部位に挿入されたpIH3(図1-2、4)、およびpTHN1の制限酵素HpaII切断による1番目のA断片がpC194のHpaII部位に導入されたpIH1を得た(図1-3、4)。これらの結果から、それぞれの制限酵素断片上に複製開始点領域を有することが示された。

次に、薬剤耐性部位を決定するために、制限酵素TaqIで切断したpTHT15およびpTHN1を、それぞれTaqIで部分分解したpC194と連結し、*B. subtilis* RM125株を形質転換した。TaqIによる切断では、表1-3と表1-4からpTHT15が13カ所程度、pTHN1が5カ所程度切断されることが明らかである。まず、Cm<sup>r</sup>Km<sup>r</sup>の形質転換株から、最も小さなプラスミドpIH2を得た。このプラスミドを、アガロースゲル電気泳動によって解析したところ、図1-4に示すようにpC194のTaqIに

よるA,Bの二つの断片と、pTHN1のTaqIによるA断片からなる雑種プラスミドであることが判明した。このことから、プラスミドpTHN1のKm<sup>r</sup>遺伝子はこのTaqI-A断片中に存在することが明かとなった。しかし、pTHT15とpC194のTaqI切断による実験においては、Cm<sup>r</sup>Km<sup>r</sup>の形質転換株は得られなかった。pTHT15は表1-3に示すようにTaqIによって13カ所程度切断され、そのうち6つの切断部位を制限酵素地図(図1-4)に示した。このことから、Tc<sup>r</sup>遺伝子部分は、複数のTaqI切断部位を有することが考えられた。そこで、複製開始点領域のクローニングの際に得られた形質転換株の中からTc<sup>r</sup>Cm<sup>r</sup>の株を探し、有するプラスミドを解析したところ、pIH4(図1-4)が得られた。pIH3を有するB. subtilis RM125株はTc<sup>r</sup>を示さないことから、Tc<sup>r</sup>遺伝子はHhaIによるA,B両断片に渡って存在していると考えられた。このことをさらに確認するために、pTHT15を2カ所で切断することが知られているClaIを用いて切断し、ClaIで消化したpC194と連結し、B. subtilis RM125株を形質転換した。得られたTc<sup>r</sup>Cm<sup>r</sup>形質転換株のプラスミドを調製し、得られたプラスミドを制限酵素による解析を行ったところ、供試した14株すべてのプラスミドに、pTHT15の2つのClaI断片とpC194のCm<sup>r</sup>遺伝子と複製開始点領域の存在するClaIによるA断片が存在していた。いずれの得られたプラスミドもpTHT15の制限酵素地図の4時の位置に存在するClaIサイトにpC194のClaI断片が挿入された構造を有しており、図1-4に示すpIH61又はpC194のClaI断片が逆方向に導入されていたpIH62であった。pTHT15のClaI断片はすべてもとの方向のままであること、11時半の位置にあるClaIサイトにpC194のClaI断片が挿入されたプラスミドがTc<sup>r</sup>Cm<sup>r</sup>形質転換株から得られなかったことから、11時の位置にあるClaIサイトの両側に連続してTc<sup>r</sup>遺伝子が存在していると判断された。

以上の実験結果から、pTHT15とpTHN1のそれぞれの薬剤耐性遺伝子と複製開始点領域の位置を図1-5の様に推定した。

#### 7. pTHT15とpTHN1による B. stearothermophilus の形質転換

pTHT15とpTHN1は枯草菌において、複製しその薬剤耐性を発現可能であった。そこで、これらのプラスミドを B. stearothermophilus へ導入し、B. subtilis とのシャトルベクターとしての利用を検討した。Imanakaらの方法<sup>20)</sup>に従って B. stearothermophilus CU21株をプロトプラストとし、形質転換した。このときpUB110は B. stearothermophilus CU21株で複製できKm<sup>r</sup>も発現できることから、コントロールとして同時に形質転換した。その結果を表1-5に示した。その結果、pTHT15とpTHN1はいずれも B. stearothermophilus CU21株で複製できそれぞれの薬剤耐性遺伝子を発現できることが明かとなった。B. subtilis RM125株から調製したpTHT15の形質転換効率は、他のプラスミドに比べて明らかに低いことが確認され、これは宿主である B. stearothermophilus CU21株に存在する制限系 BstP I<sup>20)</sup> によると考えられた。pTHT15は BstP I の isoschizomerである BstE II により1カ所切断されることが図1-2から明らかである。また、B. stearothermophilus CU21株からpTHT15を調製し、再度 B. stearothermophilus CU21株を形質転換したところ、pTHN1およびpUB110と同等の形質転換効率を示すようになった(表1-5)。

#### 第4節 考 察

Bacillus属細菌におけるプラスミドDNAの検索は1970年半ばより

多くの研究者によって行われ、種々のプラスミドが分離された<sup>28)</sup>  
<sup>28)</sup><sup>29)</sup><sup>30)</sup>。しかし、これらのほとんどは形質転換の際に必要なとされ  
る選択マーカーを持たない潜在性プラスミドであった。一方、Staphylococcus aureus由来の種々の薬剤耐性プラスミドがB. subtilis  
内で安定に維持され、その薬剤耐性遺伝子も形質発現可能であるこ  
とから<sup>31)</sup>、これらがB. subtilisでベクタープラスミドとして利用さ  
れることになった。しかし、これらの薬剤耐性プラスミドを好熱性  
細菌に移入することが可能としても、元来中温菌であるS. aureus由  
来のプラスミドが高温環境下で安定に複製し、かつ薬剤耐性遺伝子  
が十分に形質発現する可能性は少ない。本研究では、好熱性細菌よ  
り2種の薬剤耐性プラスミドpTHT15(4.5Kb, Tc<sup>r</sup>)とpTHN1(4.8Kb, Km<sup>r</sup>)  
を分離し、B. subtilis内で複製及び薬剤耐性遺伝子の形質発現が可  
能であることを確認した。これらのプラスミドを保持していたT15株  
とN1株の増殖最高温度はそれぞれ65℃、59℃であったことから、こ  
れらのプラスミドがB. stearothermophilusに移入可能であれば、S.  
aureus由来の薬剤耐性プラスミドに比べてより利用性の高いベクタ  
ーとなることが期待される。

現在までにBacillus属細菌より分離されたTc<sup>r</sup>のプラスミドとして、  
Bacillus cereusより分離されたpBC16<sup>30)</sup>とB. stearothermophilusか  
ら分離されたpAB124<sup>21)</sup><sup>32)</sup>及びpTB19、pTB20<sup>20)</sup>が知られている。そ  
れらによると、pBC16、pAB124、pTB20の分子量はそれぞれ2.8Md  
(4.5Kb)、2.9Md(4.67Kb)、2.8Md(4.5Kb)であり、我々が分離した  
pTHT15(4.5Kb)と非常に近い値と言える。そこで、制限酵素切断地図  
を比較したところ、pTHT15はpBC16とは全く違うパターンを示してい  
たが、pTB20およびpAB124の制限酵素切断パターン<sup>33)</sup>と比較したと  
ころ、pTHT15のHpa II切断点をはさむ約1Kbの領域が同じパターンを

示すことが明かとなった（図1-6）。図1-6は、pTB20及びpAB124のXbaI切断点を基準として並べ、その下にpTHT15の相同性を示す部分であるHpaII切断点領域付近が一致するように並べた。これらの3つのプラスミド間で制限酵素切断パターンが一致する部分は、pTHT15のTc<sup>r</sup>遺伝子領域として考えられる領域である。しかし、pTB20及びpAB124は、制限酵素EcoRIとHpaIIでそれぞれ3カ所ずつ切断されるのに対し、pTHT15はそれぞれ2カ所と1カ所しか切断されない。以上のことから、3つのTc<sup>r</sup>プラスミドのTc<sup>r</sup>遺伝子がかなり類似していること、pTHT15はpTB20またはpAB125と明らかに違うプラスミドであることが考えられた。このように全く違った自然環境より別個に分離されたプラスミドの薬剤耐性部分が類似しているということは非常に興味深い事実であり、このような薬剤耐性遺伝子は広く自然界に存在していることが示唆された。

次に、枯草菌におけるベクタープラスミドとして現在最も多く用いられているカナマイシン耐性プラスミドとしてpUB110が知られているが、このプラスミドのサイズは4.5Kbであり、我々が分離したTc<sup>r</sup>プラスミドpTHT15と同じ大きさである。しかし、同じKm<sup>r</sup>プラスミドであるpTHN1はやや大きく、4.8Kbであると考えられる。これら2つのKm<sup>r</sup>プラスミドの制限酵素パターンを比較したところ（図1-7）、pUB110のカナマイシン耐性遺伝子をコードしている部分<sup>34)</sup>と考えられる制限酵素BglII付近の制限酵素パターンがpTHN1のそれと一致した。しかし、その領域以外の領域については、全く相同性が認められなかった。これらのことから、我々が分離したKm<sup>r</sup>プラスミドpTHN1は、その耐性遺伝子部分が、pUB110の耐性遺伝子と類似していることが考えられた。pUB110は *Staphylococcus aureus* に由来するプラスミドであり、我々が分離したpTHN1は好熱性の *Bacillus* 属細菌

由来である。この様に、属の違う菌から別個に分離したカナマイシン耐性遺伝子が類似していることは極めて興味深い事実であり、自然界には比較的広く分布し、属を越えて伝達される可能性が示唆された。

pTHT15とpTHN1は、中温菌 B. subtilis と好熱菌 B. stearothermophilus 間の有用なシャトルベクターであることが明かとなった。その理由として、分子量が小さく、伝達性がないこと、コピー数が高いことがあげられる。さらに、制限酵素地図が明らかで、それぞれのプラスミドの必須領域である複製開始点領域と薬剤耐性領域が限定してあること、唯一の制限酵素部位が幾つか存在することがあげられる。

## 第5節 要約

1. 種々の抗生物質に耐性を有する好熱性細菌を125株分離し、内11株がプラスミドDNAを有することを見いだした。これらの内2種類のプラスミド上には薬剤耐性遺伝子がコードされていることを B. subtilis RM125の形質転換株の解析から確認した。

2. pTHT15はTc<sup>r</sup>を示し、その分子量は4.5Kbであった。またpTHN1はKm<sup>r</sup>を示し、その分子量は4.8kbであると考えられた。

3. pC194をクローニングベクターとして用いてpTHT15の薬剤耐性プラスミドとしての必須領域をクローニングした。その結果、複製開始点領域は Hha I による最も大きなA断片上に、Tc<sup>r</sup>遺伝子はこの Hha I - A断片とそのとなり合う Hha I - B断片に渡って存在することが明

かとなった。

4. pTHT15およびpTHN1の両方のプラスミドとも好熱菌 B. stearo-thermophilus CU21株で複製可能で、それぞれの薬剤耐性を発現できることが明かとなった。pTHT15とpTHN1は中温菌と好熱菌の両方で利用可能なシャトルベクターである。

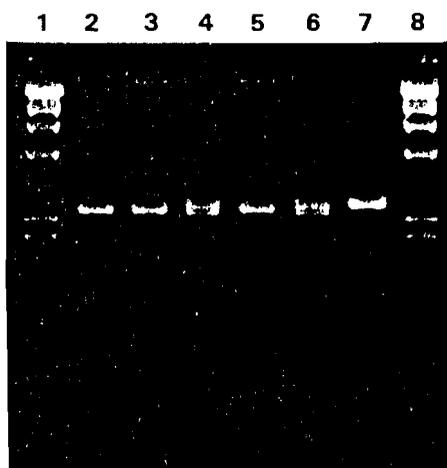
表 1 - 1 好熱性薬剤耐性菌のプラスミドの検索

菌株	耐性を示す薬剤	プラスミドのサイズ (Kb) *	
C6	Cm、Em	2.4	4.5
N1	Amp、Km、Nm、Tc	4.5	4.8
T15	Cm、Em、Tc		4.5
S1	Em、Sm		4.5
S12	Em、Sm		8.1
K1	Km、Nm、Sm、Tc		8.4
T6	Em、Sm		8.4
T7	Em、Km、Nm、Sm、Tc		8.4
T8	Tc		24
T10	Em、Sm、Tc		19
N3	Nm、Sm		32

\* プラスミドのサイズはアガロースゲル電気泳動距離から算出した。

表 1 - 2 プラスミドDNAによる B. subtilis RM125株の形質転換

菌株	プラスミドの分子量 (Kb)	形質転換株の薬剤耐性
C6	2.4 , 4.5	-
N1	4.5 , 4.8	Tc, Km, TcKm
T15	4.5	Tc
S1	4.5	-



- 1&8; lambda-HindIII  
 2; pTHT15 from T15  
 3; pTHT15 from B. subtilis(Tc<sup>r</sup>)  
 4; plasmids from N1 (pTHT15 & pTHN1)  
 5; plasmid from B. subtilis(Tc<sup>r</sup>)  
 6; plasmids from  
     B. subtilis(Tc<sup>r</sup>Km<sup>r</sup>)  
 7; plasmid from B. subtilis (Km<sup>r</sup>)

図 1 - 1 各種形質転換株が保持するプラスミド  
 0.7%アガロースゲル電気泳動による泳動  
 パターン。

表 1 - 3 pTHT15の制限酵素切断による断片

制限酵素	切断数	分子量 (Kb)							合計 (Kb)
<u>Acc</u> I	0								
<u>Bam</u> HI	0								
<u>Bgl</u> II	0								
<u>Bst</u> E II	1	4.5							4.5
<u>Cl</u> aI	2	2.8	1.7						4.5
<u>Eco</u> RI	2	4.0	0.5						4.5
<u>Eco</u> RV	1	4.5							4.5
<u>Fok</u> I	1	4.5							4.5
<u>Hae</u> III	2	4.05	0.5						4.55
<u>Hpa</u> I	1	4.5							4.5
<u>Hpa</u> II	1	4.5							4.5
<u>Hha</u> I	6	1.9	0.95	0.49	0.45	0.45	0.22		4.46
<u>Hinc</u> II	2	3.4	1.0						4.4
<u>Hind</u> III	0								
<u>Hinf</u> I	>6	1.15	0.82	0.73	0.48	0.3	0.25	(*)	3.73
<u>Kpn</u> I	0								
<u>Mlu</u> I	0								
<u>Pst</u> I	0								
<u>Pvu</u> II	2	4.2	0.3						4.5
<u>Sal</u> I	0								
<u>Sma</u> I	0								
<u>Taq</u> I	13	1.35	0.55	0.42	0.40	0.38	0.24	0.20	
		0.18	0.18	0.17	0.16	0.15	0.07		4.45
<u>Xho</u> I	0								

(\*)フラグメントがあると考えられるがアガロースゲル電気泳動においては観察できなかった。

表 1 - 4 pTHN1の制限酵素切断による断片

制限酵素	切断数	分子量 (Kb)						合計 (Kb)
<u>Acc</u> I	1	4.8						4.8
<u>Bam</u> HI	0							
<u>Bgl</u> II	1	4.8						4.8
<u>Bcl</u> I	1	4.8						4.8
<u>Cl</u> aI	0							
<u>Eco</u> RI	3	3.0	1.0	0.7				4.7
<u>Fok</u> I	>5	1.6	1.2	0.61	0.5	0.46	(*)	4.37
<u>Hae</u> III	5	1.96	1.57	0.61	0.34	0.27		4.75
<u>Hpa</u> I	0							
<u>Hpa</u> II	6	2.25	0.72	0.64	0.5	0.26	0.26	4.63
<u>Hha</u> I	3	4.0	0.4	0.37				4.77
<u>Hind</u> III	0							
<u>Kpn</u> I	0							
<u>Mlu</u> I	0							
<u>Pst</u> I	1	4.8						4.8
<u>Pvu</u> II	0							
<u>Sal</u> I	0							
<u>Sma</u> I	0							
<u>Taq</u> I	5	1.8	1.42	0.87	0.48	0.26		4.83
<u>Tha</u> I	2	3.6	1.14					4.74
<u>Xba</u> I	1	4.8						4.8
<u>Xho</u> I	0							

(\*)フラグメントがあると考えられるがアガロースゲル電気泳動においては観察できなかった。



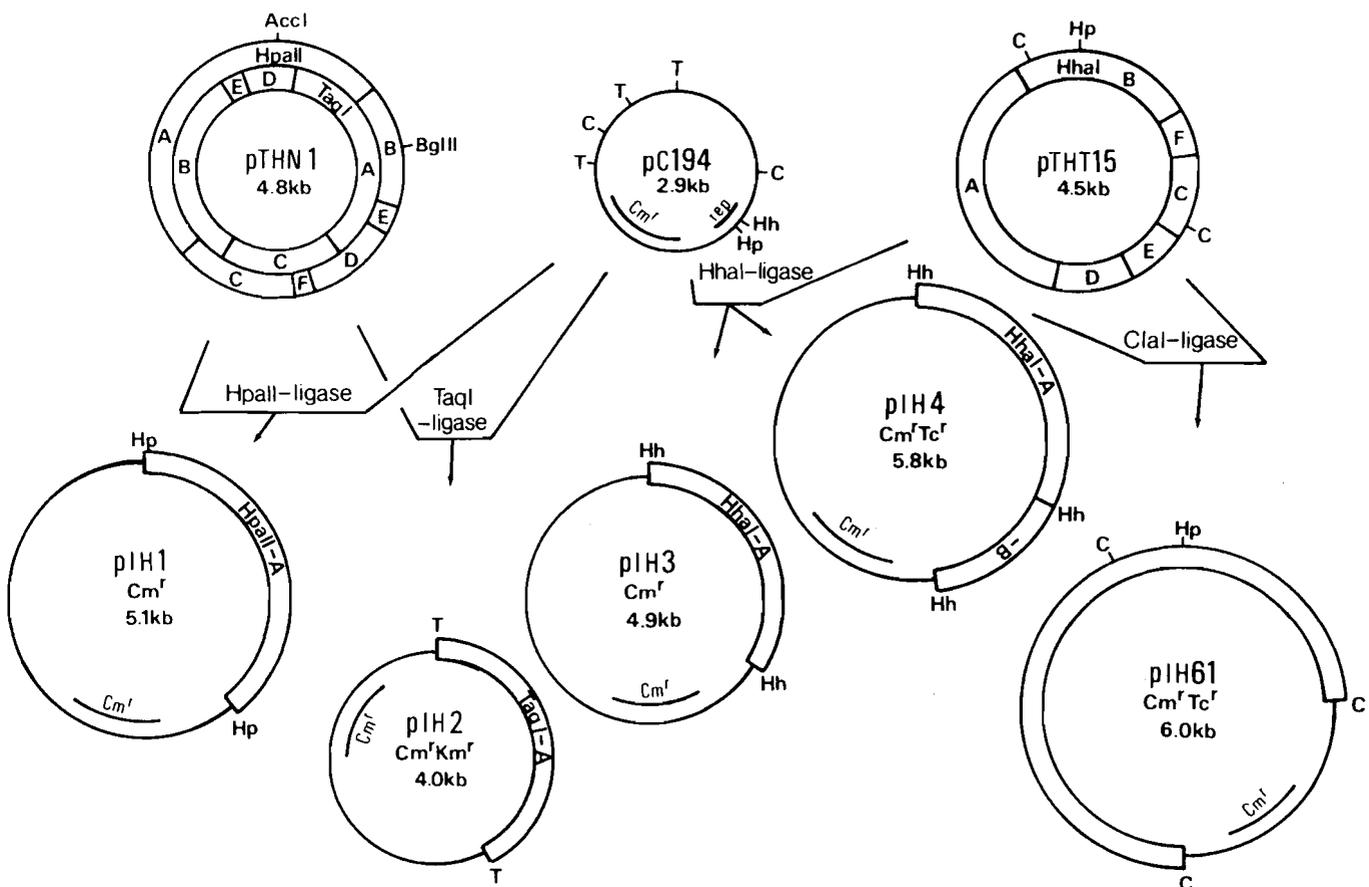


図 1 - 4 薬剤耐性遺伝子および複製開始点領域のクローニングスキーム  
 C, Hh, Hp, Tはそれぞれ *Cla* I、*Hha* I、*Hpa* II、*Taq* I 切断点を示す。

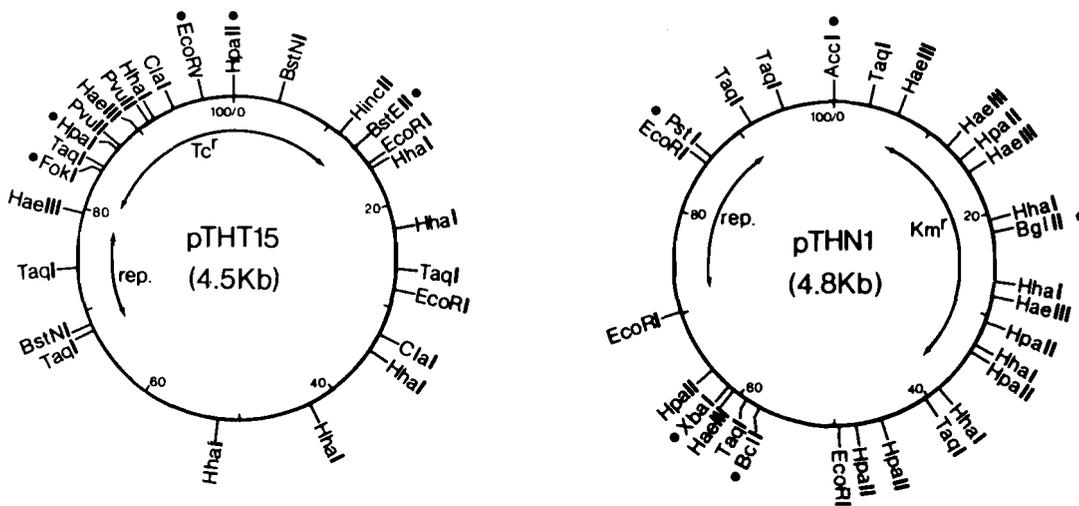


図 1 - 5 p T H T 1 5 と p T H N 1 の薬剤耐性遺伝子および複製開始点領域 ( r e p ) の位置

一カ所切断する制限酵素は●で示した。( r e p . o r i の位置は、第 2 章の結果を同時に表示してある。)

表 1 - 5 p T H T 1 5 および p T H N 1 による B. stearothermophilus プロトプラストの形質転換

Plasmid	Source	Antibiotic ( $\mu\text{g} / \text{ml}$ )	Transformants per reagents
pUB110	<u>B. subtilis</u> RM125	Km(40)	$1.0 \times 10^{-2}$
pTHN1	<u>B. subtilis</u> RM125	Km(40)	$4.3 \times 10^{-2}$
pTHT15	<u>B. subtilis</u> RM125	Tc(5)	$2.5 \times 10^{-4}$
pTHT15	<u>B. stearothermophilus</u> CU21	Tc(5)	$6.1 \times 10^{-2}$

B. stearothermophilus CU21株への形質転換は Imanaka<sup>20)</sup>の方法に従って行った。それぞれのプラスミド約1 $\mu\text{l}$ をプロトプラスト懸濁液 ( $1 \times 10^9 / \text{ml}$ ) 0.5 $\mu\text{l}$ に加え形質転換を行った。この実験でのプロトプラスト再生率は約1%であった。

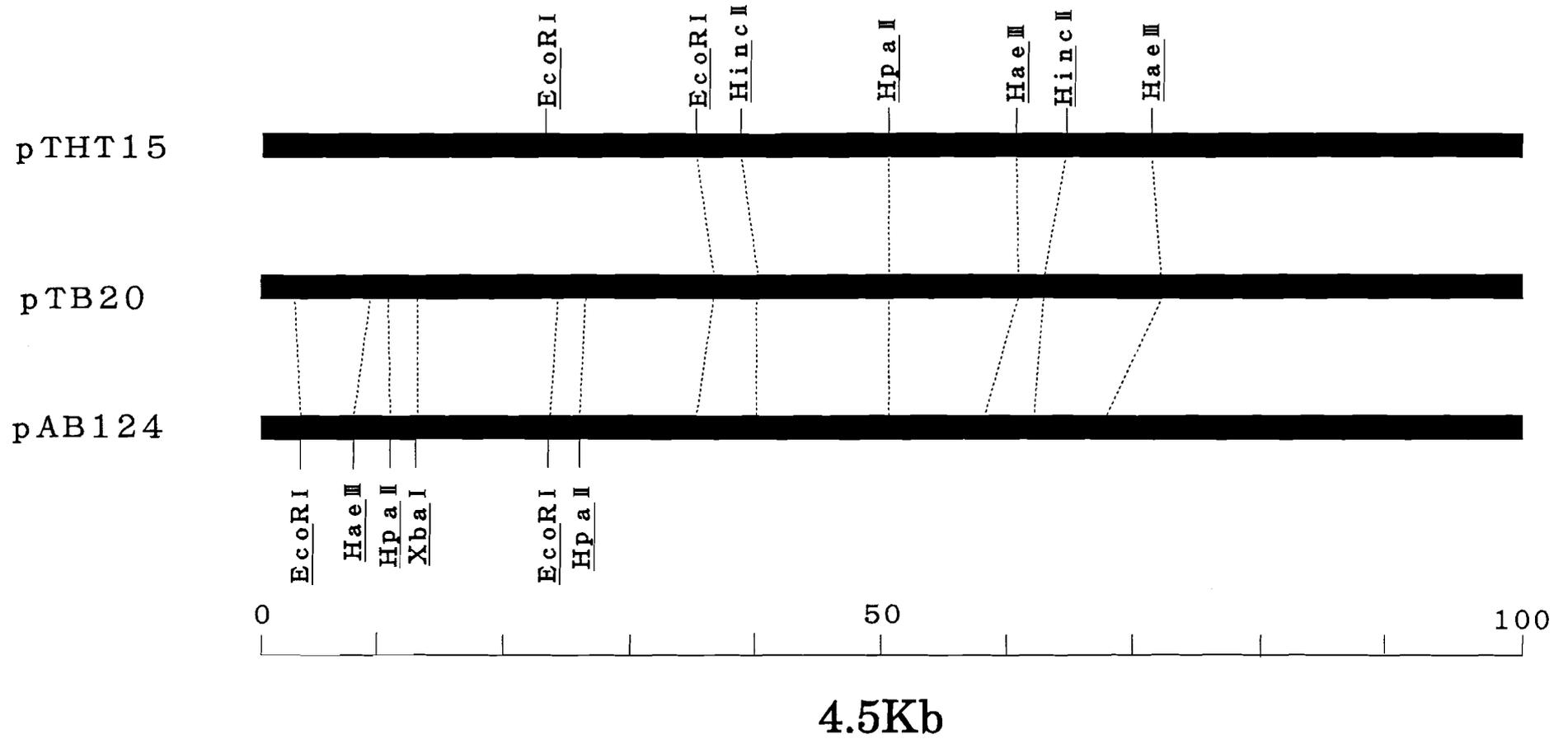


図1-6 pTHT15, pTB20, pAB124との比較  
pTB20, pAB124の比較はImanakaらの報告<sup>33)</sup>を参考にした。pTHT15  
のHpaI切断点を50%の位置として、各切断点の距離を百分率で比較した。

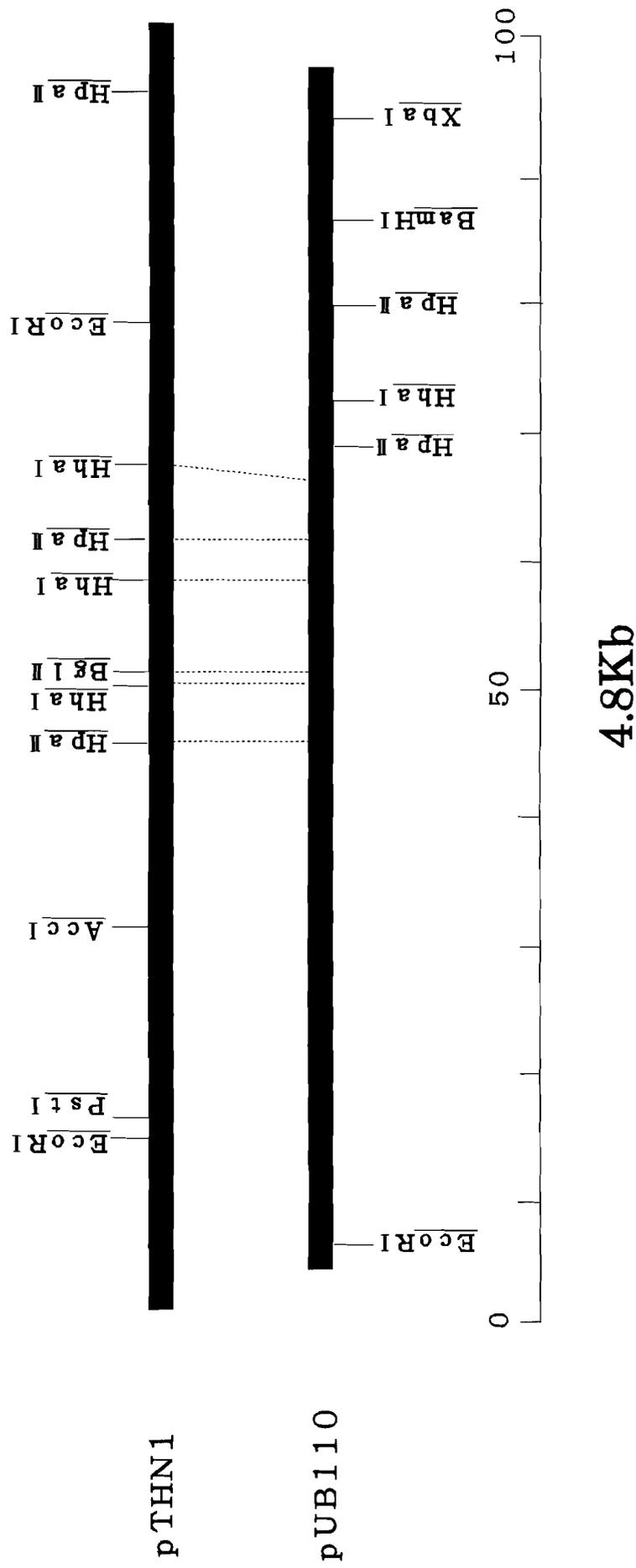


図1-7 pTHN1とpUB110の比較  
 pTHN1とpUB110<sup>42)</sup>のBglII切断点を50%として、各切断点の距離を百分率で比較した。

## 第2章 好熱性 Bacillus 属細菌由来の薬剤耐性プラスミドと、 pUB110との遺伝的關係

### 第1節 緒言

いくつかの薬剤耐性プラスミドが土壌中の Bacillus 属細菌から分離されている<sup>21) 30) 33) 35)</sup>。これらの薬剤耐性プラスミドはそのほとんどがテトラサイクリン耐性 (Tc<sup>r</sup>) 遺伝子を有するプラスミドであり、そのほかの薬剤に対して耐性を有するプラスミドとしては pTB19<sup>20)</sup> と我々が分離した pTHN1 のカナマイシンのみであった。

Polack と Novick<sup>36)</sup> は、土壌中の Bacillus 属細菌由来のテトラサイクリン耐性遺伝子はほとんどが pBC16<sup>30)</sup> と相同性が存在すること、および Staphylococcus aureus 由来の Km<sup>r</sup> プラスミド pUB110<sup>36)</sup> と不和合性を有していることを示した。

また Shishido<sup>37)</sup> らは、Bacillus subtilis 168 株をある条件下におくと Tc<sup>r</sup> プラスミドが染色体 DNA から切り出されてくることを報告し、このプラスミドを pNS1981 と名付けた。さらに、Perkins と Youngman<sup>38)</sup> は Staphylococcus aureus 由来の pAM $\alpha$  1 $\Delta$  1 が pBC16 と制限酵素解析結果から同一であると判断した。これらのプラスミド間の関係は、土壌中の Bacillus 属細菌の進化や起源についての情報を与えてくれると考えられる。

我々は土壌中の好熱性 Bacillus 属細菌から、Tc<sup>r</sup> プラスミド pTHT 15 および Km<sup>r</sup> プラスミド pTHN1 を分離し、その詳細な制限酵素地図を作製した。また、プラスミドとしての必須領域である複製開始点領域と薬剤耐性遺伝子領域の位置を限定した。その結果、pTHN1 の Km<sup>r</sup>

遺伝子領域は、同じKm<sup>r</sup>耐性プラスミド pUB110のKm<sup>r</sup>遺伝子部分と制限酵素地図パターンが一致した。また、pTHT15のTc<sup>r</sup>遺伝子部分は、pAB124とpTB20のTc<sup>r</sup>遺伝子部分制限酵素パターンが一致していた。PolakとNovick<sup>3,5)</sup>はpAB124とpBC16のTc<sup>r</sup>遺伝子部分に相同性があることを報告している。以上のことから、我々はpUB110とpTHT15およびpTHN1間の相同性を明らかにすることを目的として、研究を行った。また、これら3種類のプラスミド間の相同性をサザンハイブリダイゼーション法により解析し、中温菌と好熱菌を宿主とした場合の不和合性について解析した。

## 第2節 実験材料及び方法

### 菌株およびプラスミド

中温菌として Bacillus subtilis RM125株を、好熱菌として B. stearothermophilus CU21を形質転換実験の際の宿主菌として用いた。プラスミドはpUB110、pTHT15、pTHN1の3種類を用いた。pUB110はBethesda Research Laboratories(BRL)から購入し、B. subtilis RM125株へ形質転換後、得られた形質転換株を培養しプラスミドDNAを調製した。また、好熱性 Bacillus属細菌由来の薬剤耐性プラスミドpTHT15とpTHN1は、それぞれを有する B. subtilis RM125株から調製した。

### 制限酵素切断

すべて第1章に示す方法で行った。

## 電気泳動

電気泳動は、アガロース (Srakem LE) 0.8%を含む水平型スラブゲル電気泳動により行った。電気泳動用緩衝液として、TBE緩衝液 (50 mM Tris-borate(pH8.3)、1mM EDTA) を用い、30Vで14時間電気泳動を行った。

## プロットハイブリダイゼーション

アガロースゲル電気泳動を終了した後、アガロースゲルを適当な大きさに切断し、1.5M NaClを含む0.5N NaOH溶液に0.5時間浸すことによりDNAを変性させる。ゲルを1.5M NaClを含む0.5M Tris-HCl (pH7.0)緩衝液に1時間浸して中和する。ニトロセルロースフィルターを密着させ電気プロッティング装置 (和科盛株) を用いて、TEA緩衝液 (40mM Tris-Acetate(pH7.8)、1mM EDTA、20mM 酢酸ナトリウム) で0.2~0.5mA、2~3時間行いアガロースゲル上のDNAをニトロセルロースフィルターにプロッティングした。このニトロセルロースフィルターを2×SSC (1×SSCは0.15M NaCl、0.05M クエン酸ナトリウム) で洗浄し風乾した後、80℃減圧下で1時間ベーキングを行いDNAを固定した。

一方、プローブDNAはAmersham社のニクトランスレーション酵素キットと<sup>32</sup>P-dCTP (Amersham) を用いて、ニクトランスレーション法<sup>30)</sup>によって作製した。

ハイブリダイゼーションはWarnaarとCohen<sup>40)</sup>の方法によって行っ

た。

### 不和合性試験

プラスミドの不和合性試験は基本的にPolakとNovick<sup>35)</sup>の方法に従って行った。宿主菌として B. subtilis RM125株と B. stearothermophilus CU21株を用いて、それぞれにpTHT15をプロトプラスト形質転換法により形質転換した。得られたそれぞれの形質転換株を宿主としてさらに、pUB110又はpTHN1をプロトプラスト形質転換した。得られた B. subtilis RM125株と B. stearothermophilus CU21株の Tc<sup>r</sup> Km<sup>r</sup>形質転換株 (pTHT15とpUB110又はpTHT15とpTHN1を同時に有している) を、それぞれ0.85%のNaCl溶液に懸濁しKm (10 µg/皿)、Tc (10 µg/皿)、又は薬剤を含まないL寒天培地に塗布し37°C 16~18時間培養した。得られたコロニーをレプリカ法によりKm<sup>r</sup>又はTc<sup>r</sup>の有無を調べた。

### プラスミド調製

形質転換株からのプラスミドの調製は、第1章に示したImanaka<sup>20)</sup>の方法に従って行った。

### プラスミドのコピー数の推定

プラスミドを有する菌の溶菌液を、リゾスタフィンの代わりにリゾチーム (5 µg/皿) を用いた他はProjanらの方法<sup>41)</sup>に従って調製した。溶菌液を0.8%アガロースゲル電気泳動を行い、臭化エチジウ

ムで染色し、紫外線照射の下でGerman ACD-18 デンシトメーターを用いて測定した。また、アガロースゲルの写真のネガフィルム（ポラロイドType 665）を、同じデンシトメーターとベックマンDU-8分光光度計を用いて測定した。細胞中のそれぞれのプラスミドのコピー数はProjanらの方法<sup>41)</sup>で計算した。これら3種類のプラスミドはその分子量が非常に近いことから、2種類のプラスミドを有する菌のコピー数の比較は、その溶菌液を制限酵素EcoRIで切断し同様に測定した。

### 酵素活性の測定

pTHN1又はpUB110を有するB. subtilisRM125株を用いて、以下の方法で無細胞抽出液を調製した。まず、対数増殖期後期にまで増殖した菌体を3000×g、5分間で遠心分離し、20mM Tris-HCl(pH 7.3)に懸濁した後4分間の超音波破碎を行った。15000×gで30分間遠心分離し、その上清を無細胞抽出液としてKm不活化酵素の評価に用いた。まず、無細胞抽出液を200μlとり、20mM ATP、2mM カナマイシン硫酸、40mM MgSO<sub>4</sub>、3mM 2-メルカプトエタノールを含む100mMリン酸リン酸緩衝液(pH 7.5)とし37℃で反応を行った。80℃10分間の熱処理により酵素を失活させ、残存するカナマイシン活性をB. subtilis ATCC 6633株を被検菌として用いてペーパーディスク法によって測定した。

## 第3節 結果

### 1. pUB110、pTHT15およびpTHN1のハイブリダイゼーション解析

pUB110、pTHT15、pTHN1をいくつかの制限酵素で切断し、系統的なハイブリダイゼーション実験を行った。図2-1に、ここで用いた制限酵素の切断サイトと得られる断片の大きさを、大きな断片からアルファベット順で示す。pTHT15は第2章の結果を元に、HpaIIサイトを0として、外側からHhaI、HaeIII、EcoRIで切断される断片について示した。同様にpTHN1はAccIの切断サイトを0として、HpaII、HhaI、TaqI、EcoRIで切断される断片について示した。pUB110は、Jalankoら<sup>42)</sup>の制限酵素地図に従って作製した。図2-1のpUB110の切断地図の外側のリングに示した(3)の切断パターンは、BamHI、EcoRI、HpaIIの3つの制限酵素で同時に切断した場合の断片を分子量の大きな断片からアルファベット順で示した。また、その内側のリングに示した(4)の切断パターンは、BamHI、EcoRI、BglII、HaeIIIで切断した断片について示した。これらの制限酵素で切断したそれぞれのプラスミドDNAを0.8%アガロースゲルを用いて電気泳動を行い、泳動終了後アルカリ処理によってDNAを変性しニトロセルロースフィルターへブロットティングした。

ブロットハイブリダイゼーションを行うプローブとして、pUB110、pTHT15、pTHN1、およびpUB110の(3)のD断片、pUB110の(4)のA断片、pTHT15のHhaIによるA断片をそれぞれ<sup>32</sup>PでラベルしたDNAを用いた。

図2-2にpUB110をプローブとして、pTHT15およびpTHN1のドットブロットハイブリダイゼーションの結果を示した。得られたドットブロットハイブリダイゼーションの結果は表2-1にまとめ、それらの相同性を有する部位については、図2-3に図示した。pUB110はpTHT15と複製開始点領域に相同性を有し、pTHN1とはKm耐性遺伝子部分に相同性が認められた。また、これらの三つのプラスミドは共

通の相同領域が存在しており、この領域はpUB110の in vitro における細胞膜への結合領域<sup>43)</sup>の一つと一致していた。

## 2. pTHT15とpTHN1又はpUB110の不和合性

それぞれのプラスミド間の不和合性を調べるために、pUB110とpTHT15又はpTHN1とpTHT15を同時に B. subtilis RM125株と B. stearothermophilus CU21株に形質転換し、得られるTc<sup>r</sup>、Km<sup>r</sup>、Tc<sup>r</sup>Km<sup>r</sup>形質転換株の形質転換頻度を比較した(表2-2, 3)。その結果、いずれの菌においてもpTHT15とpUB110を同時に有する形質転換株の出現頻度は、pTHT15とpTHN1を有する形質転換株の出現頻度に比べ10<sup>2</sup>程度低いことが確認された。

次に、pUB110とpTHT15又はpTHN1とpTHT15を有する B. subtilis RM125形質転換株を3株ずつ、同じプラスミドを有する B. stearothermophilus を2株ずつ用いてプラスミドの不和合性試験を行った。その結果を表2-4に示す。pUB110、pTHT15、pTHN1のいずれもが B. subtilis RM125又は B. stearothermophilus CU21株中に1種類存在するときは、それぞれの生育温度である37℃、55℃の生育条件下においては非選択条件下でも安定に宿主に保持されている(この結果については、第3章にまとめた)。まず、pTHT15とpTHN1は両菌株において和合性を示した。しかし、予想に反しpTHT15とpUB110は B. subtilis RM125株においてわずかに不和合性を示したが、 B. stearothermophilus CU21株においては和合性を示した。pTHT15とpUB110の両方を有する B. subtilis RM125株は、Km存在下および非存在下において10~13%の割合でTc<sup>r</sup>の形質を失うことが確認された。これらのTc<sup>r</sup>を失った株は、pUB110のみを有しpTHT15を欠落していた。

### 3. コピー数の推定

不和合性の実験に用いた2種類のプラスミドの組み合わせから、一見矛盾する結果が得られたので、この理由を明かとするためにコピー数を調べた。それぞれの菌株が保有するプラスミドの薬剤耐性遺伝子に対応する抗生物質を加えて選択圧をかけた状態で培養し、それぞれのプラスミドのコピー数をアガロースゲル電気泳動後にデンストメーターで測定した。その結果を、表2-5に示す。まず、pTHT15のみを有する場合についてみると、B. stearothermophilus CU21株においてはpUB110と極めて高いコピー数を示した。しかし、B. subtilis RM125株においては、約20コピーしか存在しなかった。pUB110もB. stearothermophilus CU21株の方がB. subtilis RM125よりも高いコピー数を示した。しかし、pTHN1はいずれの菌株においても約20コピーと同じコピー数であった。

次に、2種類のプラスミドを同時に有する菌のコピー数を調べた結果に付いて、DNAサンプルを制限酵素EcoRIで切断したパターンを図2-4に示した。pTHT15とpTHN1を同時に有するB. subtilis RM125株（lane 7~9）とpTHT15とpUB110を同時に有するB. stearothermophilus CU21（lane 12 & 13）株は、それぞれのプラスミドを約1:1のコピー数で保持していることが明らかとなった。一方、pTHT15とpUB110を有するB. subtilis RM125株は1:4.2（lane 3~5）で、pTHT15とpTHN1を有するB. stearothermophilus CU21株は5.3:1（lane 15 & 16）のコピー数でそれぞれのプラスミドを保持していることが示された。

#### 4. カナマイシン不活化酵素の *in vitro* 解析

pTHN1とpUB110のKm<sup>r</sup>遺伝子がコードする酵素の種類について調べるために、それぞれのプラスミドを有する *B. subtilis* RM125株を培養し、無細胞抽出液を調製し、Km不活化酵素について調べた。その結果（図2-5）、反応60分後にはKmがほとんど不活化され、ホスファターゼ処理によってもKmの活性が戻らなかった。このことから、pTHN1にコードされているKm不活化酵素はpUB110と同じKmヌクレオチジル転移酵素であると考えられた。また、熱安定性についてそれぞれのプラスミド由来の無細胞抽出液について調べたが、顕著な差は認められなかったことから、ほぼ同じ耐熱性を有していると考えられた。

#### 第4節 考 察

プロットハイブリダイゼーションの結果から、実験に用いたpTHT15、pUB110、pTHN1の3種類のプラスミド間にはそれぞれ相同性が存在することが明らかになった。まず、pUB110とpTHN1のKm<sup>r</sup>部分は相同性が強く、*in vitro*でのカナマイシン不活化酵素のアッセイとDNA塩基配列の解析結果から同じ酵素をコードしていることが判明した。

次に、pTHT15はpUB110とその複製開始点領域付近に広い相同性領域が存在していたが、pTHN1とpUB110にはこの部分に相同性が認められなかった。この結果は、*B. subtilis*を用いた不和合性の実験からも支持された。

PolakとNovick<sup>36)</sup>は、pUB110とpBC16がB. subtilisにおいてお互いに不和合性を示すことを報告している。その中で、pUB110とpBC16の両方のプラスミドを有する菌をテトラサイクリンの非存在下において培養すると、pBC16が80%以上の比率で欠落すると述べている。一方、pTHT15とpUB110を有するB. subtilis RM125株は10%程度しかpTHT15を欠落しないことが我々の研究により明かとなった。また、pTHT15とpUB110はB. stearothermophilus CU21株においては和合性を示すことが確認された。これらの矛盾する結果を調べるために、それぞれのプラスミドのコピー数を測定した。その結果、宿主中に一つのプラスミドのみを存在させた場合、pTHT15はB. subtilis RM125株中においては20コピー程度しか存在しないが、B. stearothermophilus CU21株においては約110のコピー数を有していることが明かとなった。また、pUB110もB. subtilis RM125株中では50コピーであるがB. stearothermophilus CU21株では80コピー存在し、pTHT15、pUB110ともB. stearothermophilus CU21株において高いコピー数を示した。pTHT15とpUB110を同時に有するB. stearothermophilus CU21株においても、それぞれ単独で存在する場合に比べコピー数の低下が認められたものの、60コピーとB. subtilis RM125株に存在する場合に比べて高いコピー数を示した。しかも、そのコピー数は両プラスミドともほぼ同じ値であった。pTHT15とpUB110は、宿主内でコピー数が高く同等のコピー数を示すことから、B. stearothermophilus CU21株においては見かけ上和合性を示すように見える。しかし、B. subtilis RM125及びB. stearothermophilusにおいて、それぞれのプラスミドが単独で存在するよりも2種類同時に有するときの方がコピー数が低下するという事実から、本質的にはpTHT15とpUB110はこれまで明かとなっているpUB110とpBC16と同じように不和合性であると

考えられる。

pTHT15とpUB110のコピー数がB. subtilis RM125よりもB. stearothermophilus CU21の方が高いのに対し、pTHN1のコピー数はいずれの菌においてもほぼ同じ値を示した。また、pTHN1はpTHT15と共存させた場合もほとんどそのコピー数に変化はなく、この二つのプラスミドは和合性を示すことが確認された。このことは、第1章に述べたように、元々これら2つのプラスミドが同じ好熱性のBacillus属細菌中に保持されていた事実からも推察された。

これらの3種類のプラスミドの複製とコピー数が常温菌であるB. subtilis RM125株と好熱菌であるB. stearothermophilus CU21株において、どの様にコントロールされているかについて、今後明らかにし行かなければならないと考えられた。

## 第5節 要約

1. サザンハイブリダイゼーションにより、好熱性Bacillus属より得られた薬剤耐性プラスミドpTHT15及びpTHN1と、S. aureus由来の枯草菌ベクターpUB110の遺伝子の相同性について検討した。その結果、pTHT15とpUB110は複製開始点領域に、pTHN1とpUB110間にはKm<sup>r</sup>遺伝子領域に相同性が認められた。また、これらの3種類のプラスミド間では、膜への結合領域と考えられている部分に相同性が認められた。

2. pTHN1に存在するKm不活化酵素は、pUB110に存在している酵素と同じKmヌクレオチジル転移酵素であることが、in vitroの酵素実験により確認された。

3. pTHT15とpUB110を同時にB. subtilis RM125株に形質転換したところ、二つのプラスミドを同時に有する形質転換株の出現頻度は一つのプラスミドを有する形質転換株に比べて $10^{-2}$ 以上低いことが明かとなった。

4. pTHT15とpUB110を同時に有するB. subtilis RM125株を非選択下で培養したところ、pTHT15が欠落していくことが確認され、pTHT15とpUB110は不和合性であると考えられた。

5. pTHT15とpUB110を同時に有するB. stearothermophilus CU21株におけるコピー数はB. subtilis RM125株における場合よりも高く、不和合性が表れにくいと考えられた。

6. pTHT15とpTHN1は形質転換実験、安定性実験、コピー数の測定結果より和合性であると考えられた。

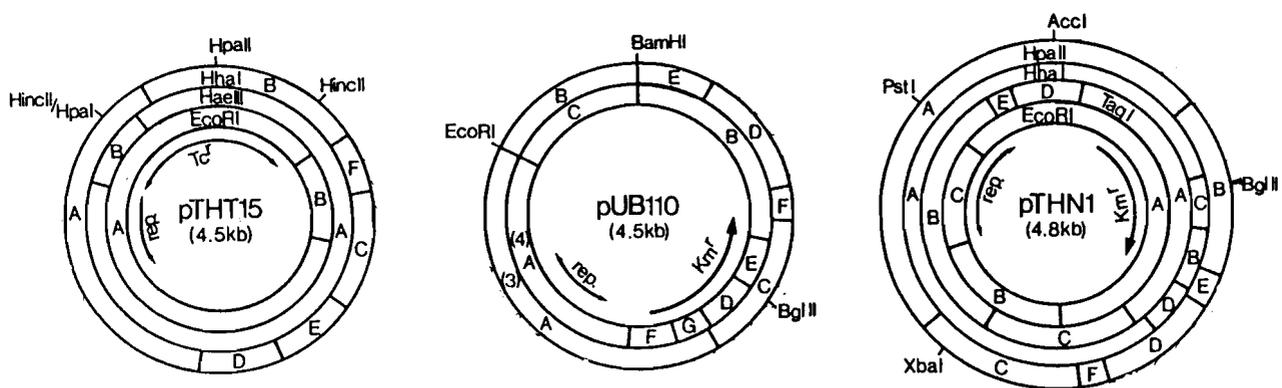


図 2 - 1 pTHT15、pTHN1、pUB110の制限酵素地図

pTHT15とpTHN1は第1章の結果に従い本章で用いた制限酵素と、プラスミドの必須部位について記載した。pUB110の制限酵素地図はJalankoらの制限酵素地図に従い作製した。pUB110の制限酵素地図中の(3)、(4)はそれぞれBamHI+EcoRI+Hpa IIの3つの制限酵素による切断、BamHI+EcoRI+Bgl II+Hae IIIの4つの制限酵素による切断を示した。それぞれのプラスミドの複製開始点領域と薬剤耐性遺伝子領域は地図の内側に示した。

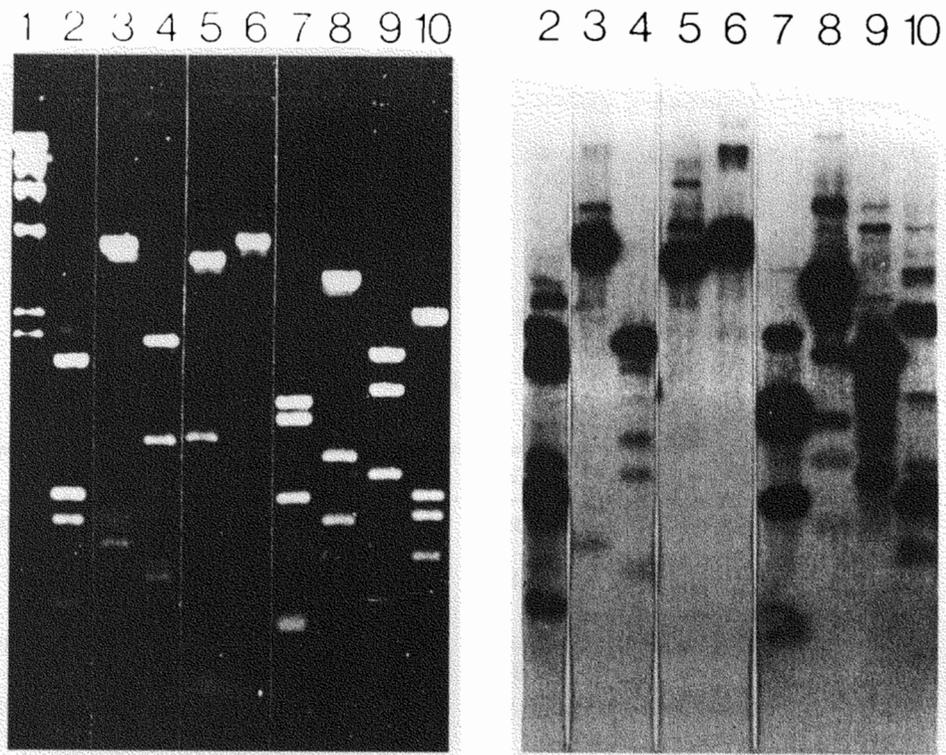


図 2 - 2、 $^{32}\text{P}$ ラベルした pUB110 をプローブとして用いた pTHT15 と pTHN1 のハイブリダイゼーション

pUB110、pTHT15、pTHN1 のそれぞれを制限酵素で切断後、0.8% のアガロースゲル電気泳動を TBE 緩衝液を用いて 30V、15 時間行った。アルカリ変性後、DNA をニトロセルロースへブロットティングした。ハイブリダイゼーションは、ニックトランスレーションによって  $^{32}\text{P}$  ラベル化した pUB110 を用いて Warnaar と Choen の方法に従って行った。終了後、ニトロセルロースフィルターを室温で 70 分間 kodak XAR-5 X 線フィルムに増感紙を用いて感光させた。lane 1:  $\lambda$ -HindIII マーカー、lane 2: pUB110 を BamHI、EcoRI、HpaII 切断、lane 3: pTHT15 - EcoRI、lane 4: pTHT15 - HhaI、lane 5: pTHT15 - HincII、lane 6 pTHT15 - HaeIII、lane 7: pUB110 を BamHI、EcoRI、BglII、HaeIII で切断、lane 8: pTHN1 - EcoRI、lane 9: pTHN1 - TaqI、lane 10 pTHN1 - HpaII。

表 2 - 1 pUB110、pTHN1、pTHT15間のドット  
ハイブリダイゼーションの結果

Probe	pUB110	pTHN1	pTHT15
pUB110 (intact)	(3)-A,B,C,D,E,F (4)-A,B,C,d,e,f,g	<i>EcoRI</i> -A,b,c <i>TaqI</i> -A <i>HpaII</i> -A,B,d	<i>EcoRI</i> -A,b <i>HhaI</i> -A,b,c,f <i>HincII</i> -A <i>HaeIII</i> -A
pTHT15 (intact)	(3)-A,D (4)-A,B	<i>TaqI</i> -A,C <i>HpaII</i> -a,c	<i>EcoRI</i> -A,B
pTHN1 (intact)	(3)-A,C,D (4)-B,D,E,F,G	<i>TaqI</i> -A,B,C,D	<i>HhaI</i> -A,b,c <i>EcoRI</i> -b
pUB110-(4)-A	(4)-A	<i>TaqI</i> -a	<i>HhaI</i> -A
pUB110-(3)-D	(3)-D	<i>TaqI</i> -A,c <i>HpaII</i> -d	<i>EcoRI</i> -B <i>HhaI</i> -c
pTHT15- <i>HhaI</i> -A	(3)-A (4)-A	No homology	<i>HhaI</i> -A
pTHT15- <i>EcoRI</i> -B	(3)-D (4)-B	<i>HpaII</i> -d	<i>EcoRI</i> -B

大文字で表した断片はプローブと強い相同性を、  
小文字で表した断片は弱い相同性を示す。

表 2 - 2 B. subtilis の形質転換

Plasmid	Transformants		
	Tc <sup>r</sup>	Km <sup>r</sup>	Tc <sup>r</sup> Km <sup>r</sup>
pUB110	0	$1.3 \times 10^5$	0
pTHN1	0	$1.0 \times 10^5$	0
pTHT15	$1.2 \times 10^5$	0	0
pUB110	$1.2 \times 10^5$	$1.1 \times 10^5$	$3.8 \times 10^2$
pTHT15	$1.1 \times 10^5$	$1.2 \times 10^5$	$2.8 \times 10^4$

表 2 - 3 B. stearothermophilus の形質転換

Plasmid	Transformants		
	Tc <sup>r</sup>	Km <sup>r</sup>	Tc <sup>r</sup> Km <sup>r</sup>
pUB110	0	$1.6 \times 10^5$	0
pTHN1	0	$3.0 \times 10^5$	0
pTHT15	$2.5 \times 10^5$	0	0
pUB110	$2.1 \times 10^5$	$2.0 \times 10^5$	$8.2 \times 10^2$
pTHT15	$1.5 \times 10^5$	$1.5 \times 10^5$	$3.9 \times 10^4$

表 2 - 4 pTHT15、pTHN1、pUB110間の不和合性

Strain and isolate No.	Grown on:	Km <sup>r</sup> (%)	Tc <sup>r</sup> (%)	Total scored
<i>B. subtilis</i>				
RM125(pTHT15/pUB110)-1	Ns <sup>a</sup>	100	86.8	1101
	Km	100	89.9	926
	Tc	100	100	974
RM125(pTHT15/pUB110)-2	Ns	100	91.0	634
	Km	100	87.8	263
	Tc	100	100	591
RM125(pTHT15/pUB110)-3	Ns	100	82.2	382
	Km	100	83.4	163
	Tc	100	100	218
<i>B. subtilis</i>				
RM125(pTHT15/pTHN1)-1	Ns	100	100	429
	Km	100	100	445
	Tc	100	100	351
RM125(pTHT15/pTHN1)-2	Ns	100	100	867
	Km	100	100	113
	Tc	100	100	492
RM125(pTHT15/pTHN1)-3	Ns	100	100	350
	Km	100	100	578
	Tc	100	100	307
<i>B. stearothermophilus</i>				
CU21(pTHT15/pUB110)-1	Ns	100	100	1072
	Km	100	100	1111
	Tc	100	100	758
CU21(pTHT15/pUB110)-2	Ns	100	100	562
	Km	100	100	281
	Tc	100	100	504
<i>B. stearothermophilus</i>				
CU21(pTHT15/pTHN1)-1	Ns	100	100	303
	Km	100	100	135
	Tc	100	100	334
CU21(pTHT15/pTHN1)-2	Ns	100	100	265
	Km	100	100	142
	Tc	100	100	213

<sup>a</sup>Ns, nonselective.

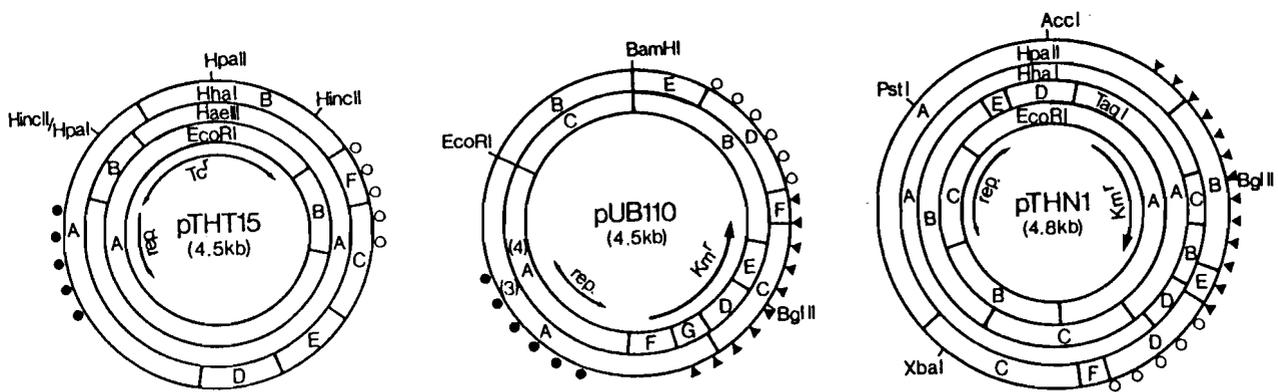


図 2 - 3 pTHT15、pUB110、pTHN1の制限酵素切断地図

●, ○, ▲はそれぞれのプラスミド間の相同性領域を示す。

表 2 - 5 B. subtilis RM125株とB. stearothermophilus CU21株において  
 プラスミドを1種類または2種類保持したときのプラスミドのコピー数

Plasmid	Strain	Copy number			
		Total	pTHT15	pUB110	pTHN1
<b>Monoplasmid-carrying strain</b>					
pUB110	<i>B. subtilis</i> RM125	50±5			
	<i>B. stearothermophilus</i> CU21	80±10			
pTHT15	<i>B. subtilis</i> RM125	20±5			
	<i>B. stearothermophilus</i> CU21	110±10			
pTHN1	<i>B. subtilis</i> RM125	20±5			
	<i>B. stearothermophilus</i> CU21	20±5			
<b>Heteroplasmid-carrying strain</b>					
pTHT15/pUB110	<i>B. subtilis</i> RM125	50±5	10±3	40±5	—
	<i>B. stearothermophilus</i> CU21	125±10	60±5	60±5	—
pTHT15/pTHN1	<i>B. subtilis</i> RM125	50±5	25±5	—	25±5
	<i>B. stearothermophilus</i> CU21	120±20	100±10	—	20±5

コピー数はProjanら<sup>41)</sup>の方法に従って算出した。*B. subtilis* RM125株が保持するpUB110のコピー数は50であり、この値は密度勾配遠心法で算出したコピー数と一致している。

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18



図 2 - 4 2種類のプラスミドを有する菌からプラスミドDNAを調製し、制限酵素 EcoRI で切断したときのアガロースゲル電気泳動パターン

2種類のプラスミドを有する *B. subtilis* RM125 からプラスミドを調製した場合はそのままDNAを制限酵素で切断したが、*B. stearothermophilus* CU21 株から調製した場合は、0.7%アガロースゲル電気泳動を行った後、フリーズスクウィーズ法によってプラスミドDNAを回収し制限酵素切断を行った。その後、0.7%アガロースゲル電気泳動を30V 15時間行った。lane 1 & 18  $\lambda$ -HindIII マーカー、lane 2 & 11 pUB110-EcoRI、lane 6 & 14 pTHT15-EcoRI、lane 10 & 17 pTHN1-EcoRI、以下の2種類のプラスミドを有する *B. subtilis* RM125 又は *B. stearothermophilus* CU21 株はそれぞれ2から3つの菌株を用いてプラスミドを調製し実験を行った。lane 3~5: *B. subtilis* RM125(pTHT15/pUB110)、lane 7~9: *B. subtilis* RM125 (pTHT15/pTHN1)、lane 12 & 13: *B. stearothermophilus* CU21(pTHT15/pUB110)、lane 15 & 16: *B. stearothermophilus* CU21(pTHT15/pTHN1)。

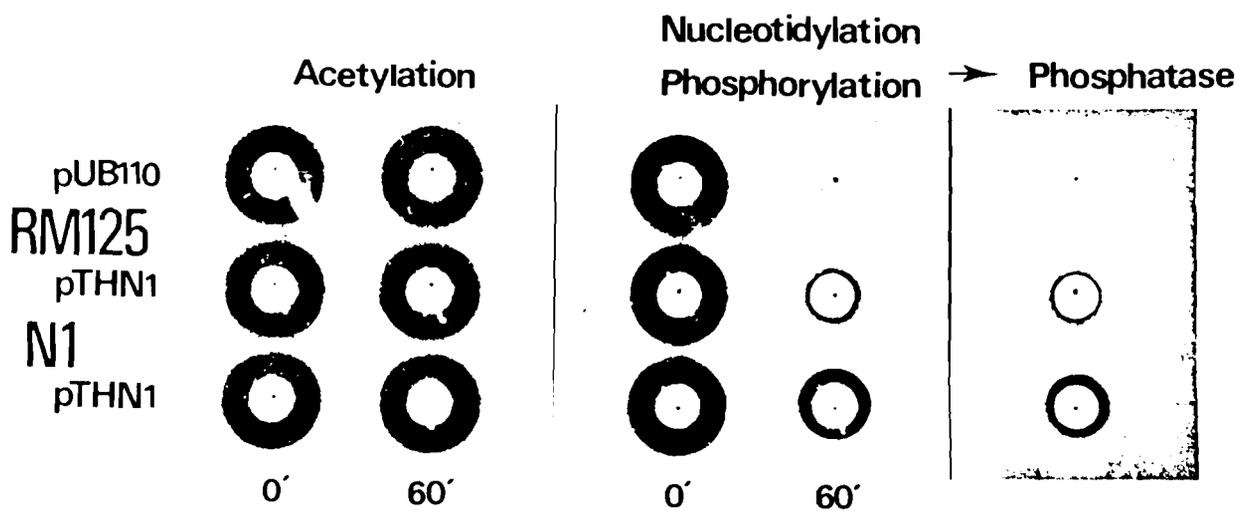


図 2 - 5 pTHT15およびpUB110のカナマイシン不活化酵素のアッセイ

### 第3章、Bacillus subtilisおよびB. stearothermophilusにおける プラスミドの複製保持と遺伝子発現の温度依存性

#### 第1節 緒言

Imanakaらによって好熱性のB. stearothermophilusの宿主ベクター系が構築され、3種類の酵素のクローニングに用いられている<sup>20)</sup>、<sup>44)</sup>、<sup>45)</sup>。この時ベクターとして用いられたプラスミドはpTB90 (Km<sup>r</sup>, Tc<sup>r</sup>)であり、このプラスミドの有用性が確認された。しかし、実際に微生物工業に用いる場合には、さらに多くの機能を有するベクターが必要になるのは大腸菌の例を見ても明かである。

そのような観点から、我々は薬剤耐性プラスミドを自然界からスクリーニングを行い、Tc<sup>r</sup>プラスミドpTHT15とKm<sup>r</sup>プラスミドpTHN1を分離した。これら二つのプラスミドは、B. subtilisとB. stearothermophilusへの形質転換が可能であった。Bringhamら<sup>21)</sup>もTc<sup>r</sup>プラスミドを分離しているが、B. stearothermophilusでの複製と形質発現についての知見はない。

KmとTc以外の抗生物質に耐性を有するプラスミドを好熱性のBacillus属細菌から発見することができなかつたので、これまで知られている枯草菌ベクターのB. stearothermophilusにおける利用を検討した。また、中温菌であるB. subtilisは遺伝学的、生化学的、生物学的な研究が多くなされてきたため、極めて多くのデータが揃っている。このため、B. subtilisとB. stearothermophilusの両方で複製、形質発現可能な多機能シャトルベクターを構築することは、

中温菌と好熱菌の違いを解明する上で非常に有用であると考えられる。中温菌と好熱菌のプラスミドの複製と形質発現の温度感受性を調べ比較することで、タンパク質とDNAの温度安定性についての知見を得ることができる。この章では、基礎的な遺伝学的知見を得るために B. subtilis と B. stearothermophilus 間のシャトルベクターを構築することを目的として、B. subtilis と B. stearothermophilus の両方の菌における薬剤耐性の発現と、複製の温度依存性について調べた。

## 第2節 実験材料および方法

### 培地組成

菌の生育には、L培地（トリプトン 10g、酵母エキス 5g、NaCl 5g / ℓ (pH 7.3)）を用いた。また固形培地として用いる場合には、15%のアガロースを添加した。

### 使用菌株およびプラスミド

これまで同様 B. subtilis RM125株および B. stearothermophilus CU21株を用いた。また、用いたプラスミドは pUB110 (Km<sup>r</sup>、4.5Kb)、pC194 (Cm<sup>r</sup>、2.9Kb)、pTP4 (Cm<sup>r</sup>、4.4Kb)、pTP5 (Tc<sup>r</sup>、4.3Kb)、pTHT15 (Tc<sup>r</sup>、4.5Kb)、pTHN1 (Km<sup>r</sup>、4.8kb) である。

### 使用酵素

プラスミドDNAを切断するための制限酵素は、宝酒造(株)および Bethesda Research Laboratories(BRL)を用いた。また、T4-DNAリガーゼ、アルカリホスファターゼは宝酒造(株)から購入した。これらの酵素反応は、それぞれのカatalogに記載の推薦条件に従って行った。

### 組換えプラスミドの作製

それぞれのプラスミドを適当な緩衝液中で37℃1時間制限酵素切断後、フェノール：クロロホルム溶液で酵素を失活、除タンパクし、エーテルで残留するフェノールを抽出後エタノール沈澱によりDNAを回収した。また、このとき5'リン酸基を除去しておきたいときには、制限酵素処理の後にアルカリホスファターゼを加え、さらに65℃1時間反応を行った。除タンパク後エタノール沈澱によりDNAを回収し、リガーゼ緩衝液に溶解し、リガーゼ反応を1時間行い、アガロースゲル電気泳動により連結を確認した後、エタノール沈澱によりDNAを回収した。これをTE緩衝液に溶解し、B. subtilis RM125株をプロトプラスト形質転換法を用いて形質転換した。得られた、形質転換株から調製したプラスミドDNAを制限酵素で切断後アガロースゲル電気泳動により、目的の組換えプラスミドを選択した。

### 宿主内におけるプラスミドの安定性

プラスミドの安定性は、Imanakaらの方法<sup>20)</sup>を若干変更して行った。すなわち、それぞれのプラスミドを有する菌株を2~3コロニー用意し、それぞれのプラスミドが有する薬剤耐性遺伝子に対応する

抗生物質を添加した (B. subtilis RM125では Cm:10 µg/■、 Tc:10 µg/■、 Km:10 µg/■、 B. stearothermophilus CU21では Cm:5 µg/■、 Tc:5 µg/■、 Km:5 µg/■ の濃度で添加した) L培地で一晚培養した。この前培養菌体溶液を用いて、それぞれ薬剤を含まないL培地に $10^2$ の濃度になるように接種し、温度を変えて約20世代培養を行った。その培養菌体をL寒天平板培地に希釈後塗布し、B. subtilis RM125株は37℃、B. stearothermophilus CU21株は48℃で一晩培養した。得られたコロニーを数百個選び、それぞれの薬剤を有するL寒天平板培地にレプリカし、薬剤耐性の有無を調べた。

### 薬剤耐性遺伝子の発現限界温度

プラスミドの安定性を調べた実験において調製したと同じ方法で前培養菌体を調製し、それぞれの薬剤を含むL培地10■に $10^2$ 濃度になるように接種し、温度を変えて24時間培養した。

## 第3節 結果

### 1. B. subtilisにおけるプラスミドの遺伝子発現と熱安定性

B. subtilisにおけるプラスミドの熱安定性について調べるために、6種類のプラスミドをB. subtilis RM125株にプロトプラスト形質転換法により導入した。同じプラスミドを有するコロニーを2~3株用いて、37℃から52℃までの温度範囲について調べた。52℃はB. subtilis RM125株がL培地中で生育できる限界温度である。結果を

図3-1に示す。供試したプラスミドのうち、pUB110、pTHT15、pTHN1、pC194はB. subtilis RM125株でその生育限界温度の52℃まで安定に保持されることが確認された。一方、pTP5、pTP4は45℃以上で不安定となり、48～49℃付近で宿主からほとんど脱落していることが示された。

次に、プラスミドを有するB. subtilis RM125株をそれぞれの薬剤の存在下で培養して、薬剤耐性遺伝子の発現と宿主の生育限界について調べた。その結果、pUB110、pC194、pTHT15、pTHN1は52℃までその薬剤耐性遺伝子を発現できることが明かとなった。一方、pTP4、pTP5を有するB. subtilis RM125株は51℃までは生育できたが、52℃では生育が認められなかった。

同じプラスミドを用いて、同様な実験をB. subtilis LMAH761222株<sup>24)</sup>を宿主として行ったところ、生育限界温度が49度であった以外はB. subtilis RM125株を用いた時とほとんど同じ結果を得た。

## 2. プラスミド間のハイブリダイゼーション

B. subtilis において、供試した6種類のプラスミドの熱安定性が異なっていたことから、これらのプラスミドの複製領域についてDNAレベルでの相同性を調べた。まず、6種類のプラスミドをそれぞれ制限酵素で切断せずにアガロースゲル電気泳動し、ニトロセルロースメンブレンフィルターにブロッティングした。次に、それぞれのプラスミドをニックトランスレーション法により $\alpha$ -<sup>32</sup>P-dCTPを用いてラベル化し、プロットハイブリダイゼーションを行った。

その結果(図3-2)、pUB110、pTHT15、pTHN1については2章で行った実験の結果通りであった。新しい知見として、pTHT15とpTP5、

及びpTP4とpTP5に相同性が認められた。pTHT15とpTP5の相同性は、pTP5をプローブとすると認められず、pTHT15をプローブとしたときのみ認められることから比較的弱いものと思われた。一方、pTP4とpTP5については、いずれのプラスミドをプローブとしてもハイブリダイズすることから比較的強い相同性を有していると考えられた。

これらの相同性を有する領域を限定するために、さらにこれら3種類のプラスミドを制限酵素切断し、どのフラグメントにハイブリダイズするかを検討した。その結果を図3-3に示す。まず、pTP4をプローブとした場合pTP5のHindIII-A, B、HincII-A、HincII+HpaII-Bフラグメントに強くハイブリダイズした(図3-3、A)。また、pTP5をプローブとした場合、pTP4のAccI-A、HhaI-A、HpaII-Bフラグメントに強くハイブリダイズした(図3-3、B)。これらの結果をまとめると、図3-4に示した部分に相同性あることが明らかとなった。

pTP5のTc<sup>r</sup>遺伝子部分と、複製開始点領域はNoguchiら<sup>46)</sup>によって決定されており、図3-4の円の内側部分に示した。また、pTP4のCm<sup>r</sup>遺伝子と複製開始点領域はまだ正確に決定されていない。ただし、Konoらは<sup>47)</sup>pTP4のプラスミドとしての必須領域はXbaIによる切断(2カ所切断される)の大きな方のフラグメントに存在することを報告している。また、pTP4とpC221<sup>20)</sup>はほとんど同じプラスミドであることも同時に報告した。ここで示した実験結果も、図3-4に示した部分にpTP4のCm<sup>r</sup>遺伝子部分と、複製開始点領域が存在していることを示唆している。ハイブリダイゼーションの結果から、pTP4とpTP5の相同性領域はそれぞれの複製開始点領域であると考えられる。また、図3-4にはpTP5とpTHT15の相同性領域についても示した。pTHT15はpTP5のHindIII-AフラグメントとHpaII-Bフラグメントにハイ

ブリダイズした。この部分はpTP5のTc<sup>r</sup>遺伝子をコードしている部分であるとされている。しかし、逆にpTP5をプローブとして用いた場合にはpTHT15とハイブリダイズする事実は得られなかった。

### 3. B. subtilisにおける組換えプラスミドの作製

pTP4とpTP5の複製開始点領域における広範な相同性と、温度感受性を確かめるためにpUB110とpTP4、pUB110とpTP5間の組換えプラスミドを作製した。まず、pUB110とpTP4の組換えプラスミドの作製は、両プラスミドを一カ所ずつ切断するEcoRIで切断し、連結したプラスミドpIH114 (Km<sup>r</sup>Cm<sup>r</sup>、8.9Kb) を作製した。pUB110とpTP5の組換えプラスミドは、それぞれ一カ所ずつ切断するXbaIで切断、連結したpIH1150 (Km<sup>r</sup>Tc<sup>r</sup>、8.8Kb)、および切断末端をT4DNAポリメラーゼにより平滑末端化したpTP5のHindIII-AフラグメントをpUB110のPvuIIサイトに挿入したpIH1151 (Km<sup>r</sup>Tc<sup>r</sup>、6.8Kb) を作製した。

また、B. subtilis内での安定なプラスミド同士の組換えプラスミドとして、pUB110とpC194の組換えプラスミドを、それぞれを一カ所切断するPvuIIで切断し、連結したプラスミドpIH111を作製した(図3-5)。

これらのプラスミドはすべてB. subtilis RM125株へのプロトプラスト形質転換により作製した。

### 4. 組換えプラスミドのB. subtilisにおける熱安定性

結果を図3-6、A、B、Cに示す。まず、それぞれ安定なプラスミド同士の組換えプラスミドであるpIH111は、B. subtilis RM125

株の生育限界温度である52℃まで安定に保持されることが確認された(図3-6、C)。pUB110とpTP5のTc<sup>r</sup>遺伝子部分で構築したpIH1151は、B. subtilis RM125株中で52℃までかなり安定に保持されていることが明かとなった。しかし、pUB110とpTP5の両方の複製開始点領域を含むpIH1150は依然温度に対して不安定であり、宿主内から脱落していくことが示された。

一方、pUB110とpTP4の組換えプラスミドpIH114は、pUB110とpTP4の複製開始点領域を含むにも関わらず、かなり熱安定であった。このpIH114とpIH1150についてはさらに詳しい解析行う必要があると考えられるが、この熱安定性の違いはpTP4とpTP5の複製開始点領域が全く同じではないことを示していると推察された。

pIH1151とpIH1150が熱安定となったことから、pTP4とpTP5がB. subtilis RM125株において高温下で不安定になるのは、主にその複製開始点領域が熱に対し不安定となるためであることが考えられた。

##### 5. B. stearothermophilus CU21株の形質転換

まず、pUB110、pTHN1、pTHT15、pC194、pTP4、pTP5の6種類のプラスミドについてB. stearothermophilus CU21株へ形質転換を試みた。その結果(表3-1)、供試したプラスミドのうちpUB110、pTHT15、pTHN1については第1章で示した通り、形質転換可能であることが再確認された。この実験では、さらにpC194がB. stearothermophilus CU21株をCm<sup>r</sup>へ形質転換できることが新たな知見として得られた。

一方、pTP4とpTP5を用いた実験では、B. stearothermophilus CU21株を形質転換できなかった。このことは、B. subtilis RM125株において示された複製領域の熱不安定性によると考えられた。

B. stearothermophilus CU21株は市販の制限酵素 BstE II の isoschizomerである BstPI<sup>20</sup> を有していることが知られている。供試した6種類のプラスミドについて制限酵素 BstE II での切断実験を行ったところ、pTHT15とpTP4がそれぞれ一カ所切断されることが明らかとなった。そのアガロースゲル電気泳動の結果を図3-7に示す。このため、B. subtilis RM125株から調製したpTHT15は一度形質転換したB. stearothermophilus CU21株から調製したpTHT15に比べてB. stearothermophilus CU21株への形質転換効率が $10^2$ 程度低下することが示された。しかし、B. stearothermophilus CU21株から調製したpTHT15は、制限酵素 BstE II で切断されないpUB110、pTHT15、pC194と同じ形質転換効率 ( $1\sim 8\times 10^6$  個/ $\mu$ g DNA) を示した。

次に、枯草菌中では安定となった組換えプラスミド pIH114、pIH1151及びpIH3について形質転換を行った。pIH3は第1章で構築した組換えプラスミドで、図4-8に示すようにpC194の複製開始点領域中にある Hha I 部位にpTHT15の複製開始点領域を導入し、複製部分を入れ換えたプラスミドである。

その結果(表3-1)、pIH114、pIH1151ではB. stearothermophilus CU21株をKm<sup>r</sup>とする形質転換株を得ることができたが、それぞれpTP4、pTP5由来のCm<sup>r</sup>、Tc<sup>r</sup>で選択したところ形質転換株は得られなかった。pIH114は BstE II で切断されるpTP4部分を有するため、pTHT15と同様に B. subtilis RM125株から調製したプラスミドDNAはB. stearothermophilus CU21株から調製したDNAに比べて形質転換効率が $10^2$ 程度低下することが認められた。得られたKm<sup>r</sup>の形質転換株の薬剤耐性を、pIH114についてはCm<sup>r</sup>、pIH1151についてはTc<sup>r</sup>について調べたところ、いずれにおいても感受性を示したことから、pTP4由来のCm<sup>r</sup>遺伝子とpTP5由来のTc耐性遺伝子はB. stearothermophilus

CU21株で形質発現ができないことが明かとなった。

pIH3は予想通り B. stearothermophilus CU21株をCm<sup>r</sup>に形質転換できた。またこのときの形質転換効率は、他の組換えプラスミドとほぼ同等であった。

## 6. B. stearothermophilusにおけるプラスミドの安定性と薬剤耐性遺伝子の発現

まず、B. stearothermophilus CU21株を形質転換可能であった pUB110、pTHN1、pTHT15、pC194を有する株について調べた。われわれが行った実験によると、B. stearothermophilus CU21株の生育限界温度は66℃であり、67℃では生育できなかった。そこで、66℃までの宿主内におけるプラスミドの安定性について検討を行った。その結果、図3-9に示すようにプラスミドによってかなり違う安定性を示した。まず、pTHT15は供試したプラスミドの中でもっとも安定に宿主に保持され、60℃まで100%安定であることが明かとなった。pUB110も60℃において約85%のプラスミド保持率を示した。これらの結果は、第2章において示したpTHT15とpUB110の複製開始点領域の相同性のデータと一致する。pTHN1はpTHT15とpUB110に比べてわずかに不安定であった。しかし、pC194はB. stearothermophilus CU21株の形質転換が可能であるにも関わらず不安定であり、48℃で約40%が、55℃の培養ではほとんどの株がプラスミドを脱落していた。

培養温度が上がるにつれてpC194が不安定化する事が明かとなったが、その原因が複製開始点領域の熱不安定性によるのであれば、その部分を安定な他のプラスミドの複製領域と代えることにより安定化されると考えられる。そこで、pTHT15とpC194の組換えプラスミド

である pH3 の B. stearothermophilus CU21 株での熱安定性について調べてみた。その結果、図 3 - 9 に示すように 60℃ 以上まで安定に保持されることが示された。

それぞれのプラスミドを有する B. stearothermophilus CU21 株を用いて、薬剤存在下での生育限界温度を調べることによって、薬剤耐性遺伝子の発現限界温度を検討した。その結果（図 3 - 9）、L 培地において、pUB110、pTHN1、pC194、pIH4 をそれぞれ有する B. stearothermophilus CU21 株の薬剤存在下における生育限界温度は 59℃ であった。一方、pTHT15 を有する B. stearothermophilus CU21 株は Tc 存在下で 64℃ まで生育可能であることがわかった。

#### 7. 三つの薬剤に耐性を有する複合プラスミドの作製

B. stearothermophilus において pH3 は極めて安定に高温まで保持されることが確認された。そこで、この pH3 を元に B. stearothermophilus と B. subtilis で安定に保持され、形質発現可能な三つの薬剤に耐性なシャトルベクターを作製した。pIH3 に pTHT15 の Tc<sup>r</sup> を付与した二つの薬剤に耐性なプラスミド（Cm<sup>r</sup>Tc<sup>r</sup>）pIH4 はすでに第 1 章で作製してある。そこで、pIH4 の Hpa II サイトに Km<sup>r</sup> 遺伝子を有する Taq I 断片を導入した pH41 と、pIH4 の EcoR I サイトに pTHN1 の Km<sup>r</sup> 遺伝子を有する EcoR I 断片を導入した pH42 を枯草菌において作製した（図 3 - 10）。これら二つの組換えプラスミドは B. subtilis RM125 株においてその生育限界温度である 52℃ まで安定に形質を発現できることが確認された。そこで、これらの三つの薬剤に耐性なプラスミドを B. stearothermophilus CU21 株へ形質転換した。形質転換効率は表 3 - 2 に示したように、いずれの薬剤耐性を選択マーカー

に用いても親プラスミドと同等の、再生株あたり2~10%の高い値を示している。また、これらのプラスミドの B. stearothermophilus CU21株における熱安定性も pTHT15 とほぼ同等のパターンを示した。

#### 第4節、考察

Bacillus 属細菌において熱安定性の高いプラスミドベクターを複製することは、工業的な観点からも極めて興味ある問題である。そこでこの章においては、中温菌として B. subtilis RM125株、好熱菌として B. stearothermophilus CU21株を用いて温度によるプラスミド保持の安定性と遺伝子発現について検討した。

供試した6種類のプラスミドのうち、pUB110、pTHN1、pTHT15、pC194は B. subtilis RM125株においてその生育限界温度52℃まで安定に宿主内に保持され、それぞれの薬剤耐性遺伝子を発現できることが明かとなった。これらの4種類のプラスミドは B. stearothermophilus CU21株をも形質転換可能であった。一方、相同性を有する複製領域を持つプラスミド pTP4と pTP5は B. subtilis RM125株においても高温下で不安定となり、45℃においても宿主内からのプラスミドの脱落が観察された。さらに、B. stearothermophilus CU21株を Cm<sup>r</sup> または Tc<sup>r</sup> に形質転換する事ができなかった。これらのプラスミドの複製機能が、温度感受性であったためか、または B. stearothermophilus の複製機能に不適合であったために複製できないことが考えられた。もう一つの可能性として、pTP4と pTP5は B. stearothermophilus CU21株内で複製可能であるが、それぞれのマーカーである Cm<sup>r</sup>、Tc<sup>r</sup> 遺伝子が発現できないために形質転換できなかったと考えられた。pUB110と pTP4、pTP5の組換えプラスミドは B. stearother-

mophilus CU21株に導入することは可能であったが、pUB110由来のKm<sup>r</sup>は発現できるのに対し、pTP4由来のCm<sup>r</sup>とpTP5由来のTc<sup>r</sup>遺伝子はその形質を発現できなかつた。以上の結果から、pTP4のCm<sup>r</sup>遺伝子とpTP5のTc<sup>r</sup>遺伝子は温度感受性であるか、B. stearothermophilus CU21株で、転写もしくは翻訳が不可能であると考えられた。

B. subtilis RM125株中におけるpTP4とpTP5の複製の熱不安定性は、pUB110との組換えプラスミドを作製することにより克服できた。pUB110の複製領域およびKm<sup>r</sup>遺伝子部分とpTP5のTc<sup>r</sup>遺伝子部分を有するpIH1151はB. subtilis RM125株において高い熱安定性を示すようになった。pTP4とpUB110の二つの複製領域を有するpIH114も同じように熱安定性の上昇が認められた。しかし、pTP5とpUB110の二つの複製領域を有するpIH1150は、pTP4とpTP5の複製領域に相同性が認められるにも関わらず、依然不安定のみであった。現在の知見だけでは、pIH1150とpIH114の複製の違いを考察するのは困難であるが、pIH1150はその二つの複製機能が宿主細胞中で混乱し、その結果として熱に対する安定性を失っていると推察された。

B. stearothermophilus CU21株におけるプラスミドの安定性の温度依存性を調べたところ、pTHN1は55℃まで、pTHT15とpUB110は60℃まで安定に宿主細胞に保持されていることが確認された。しかし、pC194は宿主内で不安定であり、非選択条件下において48℃で40%、50℃で80%、55℃で100%が宿主細胞から脱落していくことが示された。B. subtilis RM125株においてはpC194は52℃まで安定に宿主に維持されていた。このことから、pC194のB. stearothermophilusでの不安定性は温度による不安定化のみではなく、好熱菌宿主細胞中の何らかの因子によるものであると考えられた。

Imanakaら<sup>20)</sup>は、B. subtilisとB. stearothermophilusにおいて、

いくつかのプラスミドの挙動の違いを報告している。すなわち、pTB19から数種の小型プラスミドを作製し、B. subtilisとB. stearothermophilusの両方で形質発現可能なプラスミド、B. subtilisのみで形質発現可能なプラスミド及びB. stearothermophilusのみで形質発現可能なプラスミドの3種類が得られると述べている。さらに、pC194とpT127の組換えプラスミドpHV11とpC194とpBR322の組換えプラスミドpHV22を作製したが、いずれのプラスミドもB. stearothermophilus CU21株を形質転換できなかつたと報告している。

この章において、pC194がB. stearothermophilus CU21株を形質転換できるが不安定であること、及び複製領域をpTHT15の複製領域に変換することにより複製機能が熱安定性になることを示した。このpTHT15とpC194の組換えプラスミドpIH3は、極めて安定にB. stearothermophilus CU21株内に保持され、 $Cm^r$ も59°Cまで発現可能である。pTHT15の複製領域と新しく好熱菌で発現が確認された $Cm^r$ を用いて、Bacillus属細菌における熱安定性の高いベクタープラスミドを構築できることが示された。これらの知見から、B. subtilisとB. stearothermophilus間の熱安定なシャトルベクターはもっとも熱安定性の高いpTHT15の複製領域とpTHT15の $Tc^r$ 遺伝子、pTHN1の $Km^r$ 遺伝子、pC194の $Cm^r$ 遺伝子から構築できると考えられた

そこで、作製した三つの薬剤に耐性なプラスミドpIH41とpIH42はB. subtilisとB. stearothermophilusの両方で複製発現可能なシャトルベクターである。これらのプラスミドは制限酵素EcoR I、Bgl II、Hind III、Hpa I（以上pIH41）、Acc I、Pst I、Bgl II、Hind III、Hpa I（以上pIH42）による唯一の切断点をクローニング部位として利用できる。また、これらのうちBgl II、Hpa I切断部位はそれぞれ $Km^r$ 遺伝子、 $Tc^r$ 遺伝子に対する挿入不活部位としてクローンの検出

に利用できる。さらに、Cm<sup>r</sup>遺伝子を含むpC194に由来する部分はずで塩基配列が明かとなっていたほか、Km<sup>r</sup>遺伝子および複製開始点領域についても塩基配列が明らかである。次章で明かとするpTHT15のTc<sup>r</sup>遺伝子部分の塩基配列を合わせると、これら2種類の三つの薬剤に耐性なプラスミドの塩基配列はほとんど確認されている。

## 第5節 要約

1. pUB110、pC194、pTHT15、pTHN1はB. subtilis RM125株において非選択圧下52℃まで安定に保持され、それぞれの薬剤耐性遺伝子は52℃まで発現した。

2. 一方、pTP4、pTP5は高温で容易にB. subtilis RM125株から脱落した。またそれぞれのプラスミドを有するB. subtilis RM125株の生育限界温度は、薬剤存在下で51℃であった。pTP4とpTP5の複製領域は高い相同性が認められた。

3. pUB110とpTP4及びpUB110とpTP5の組換えプラスミドは高温下でも安定となり、B. subtilis RM125株において52℃まで保持された。

4. 6種類のプラスミドの形質転換能を好熱性細菌、B. stearothermophilus CU21株において検討した。その結果、pUB110、pC194、pTHT15、pTHN1はB. stearothermophilus CU21株の形質転換能を有していたがpTP4とpTP5は形質転換能を有していなかった。

5. pUB110とpC194及びpTHN1はB. stearothermophilus CU21株にお

いて耐性遺伝子を59℃まで発現し、pTHT15のTc<sup>r</sup>は64℃まで発現した。

6. pC194は非選択圧下で不安定で、55℃でほとんど宿主菌から脱落した。pTHN1は55℃まで、pUB110とpTHT15は60℃まで宿主菌内に安定に複製保持された。pC194の高温条件下での熱不安定性は、その複製機能の熱感受性によることが明かとなった。すなわち、pC194の複製領域をpTHT15のそれと置き換えると、その組換えプラスミドpIH3は安定となりB. stearothermophilus CU21株において60℃で複製保持されるようになった。

7. pTP4とpTP5の薬剤耐性遺伝子は、pUB110との組換えプラスミドを作製し安定な複製機能を付与しても、B. stearothermophilus CU21株で発現できなかった。

8. 最も熱安定なpTHT15の複製開始点領域を元に、Tc<sup>r</sup>、Cm<sup>r</sup>、Km<sup>r</sup>の三つの薬剤に耐性なプラスミドpIH41およびpIH42を構築した。これらのB. subtilisとB. stearothermophilus間シャトルベクターは両宿主内で、pTHT15と同等の安定性を示した。

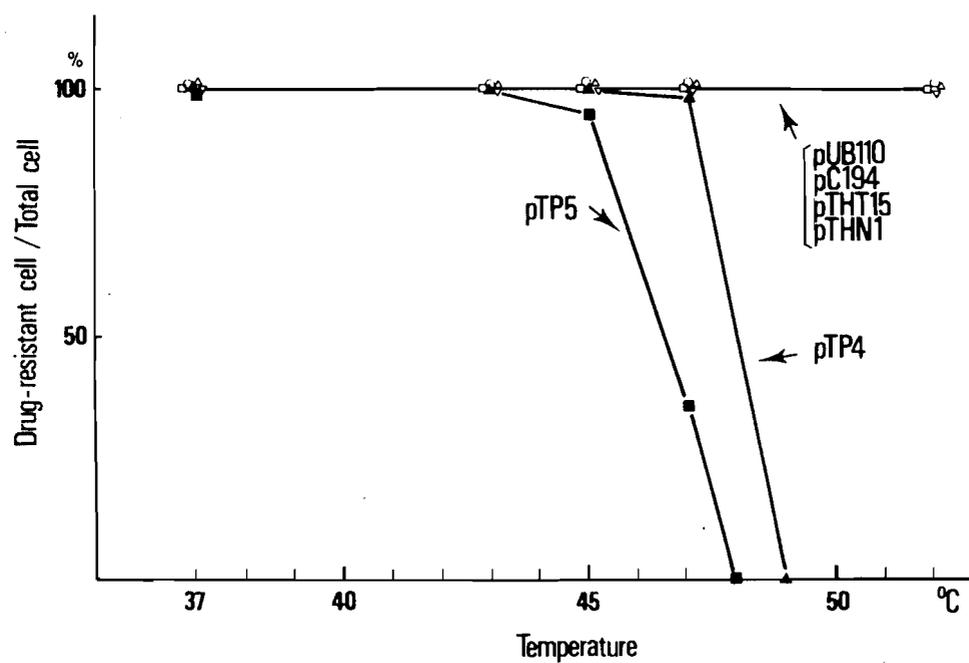


図 3 - 1 B. subtilis RM125株におけるプラスミドの安定性

Lプロス培地で24時間培養し、その培養液を希釈後、平板寒天上に塗布した。得られたコロニーを、それぞれの薬剤を含む平板寒天に塗布し、その生育からプラスミドの脱落比率を算出した。

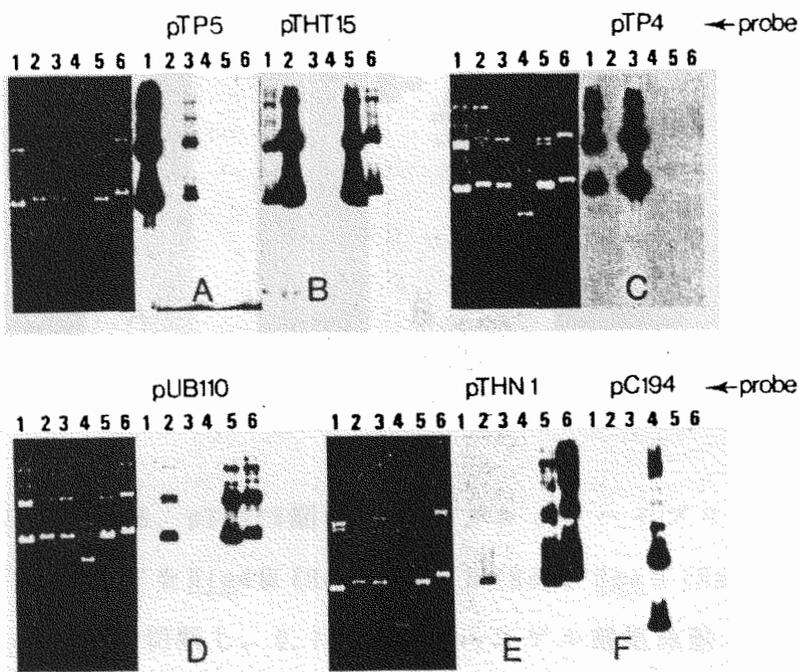


図3-2 pTP4、pTP5、pUB110、pTHT15間の遺伝的相同性

40V、15時間で0.7%アガロースゲル電気泳動を行い、ドットプロットハイブリダイゼーションを行った。A、B、C、D、EはそれぞれpTP5、pTHT15、pTP4、pUB110、pTHN1、pC194をそれぞれプローブとして用いたオートラジオグラフの結果である。lane 1, pTP5; lane 2, pTHT15; lane 3, pTP5; lane 4, pC194; lane 5, pUB110; lane 6, pTHN1.

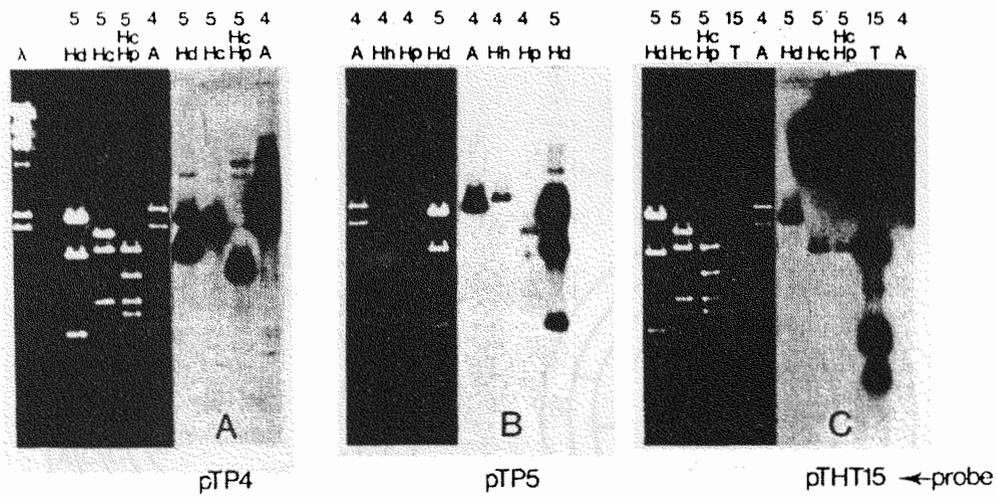


図 3 - 3 pTP4、pTP5、pTHT15間のドットプロットハイブリダイゼーション  
 それぞれのプラスミドを Hind III (Hd)、Hinc II (Hc)、Hpa II (Hp)、Acc I (A)、  
Hha I (H)、Taq I (T)で切断し、0.7%アガロースゲル電気泳動(40V 15時間)、  
 pTP4 (A)、pTP5 (B)、pTHT15 (C)をプローブとして使ってハイブリダイ  
 ゼーションした。それぞれのlaneの上に用いたpTP4、pTP5、pTHT15をそれぞれ  
 4、5、15と示した。

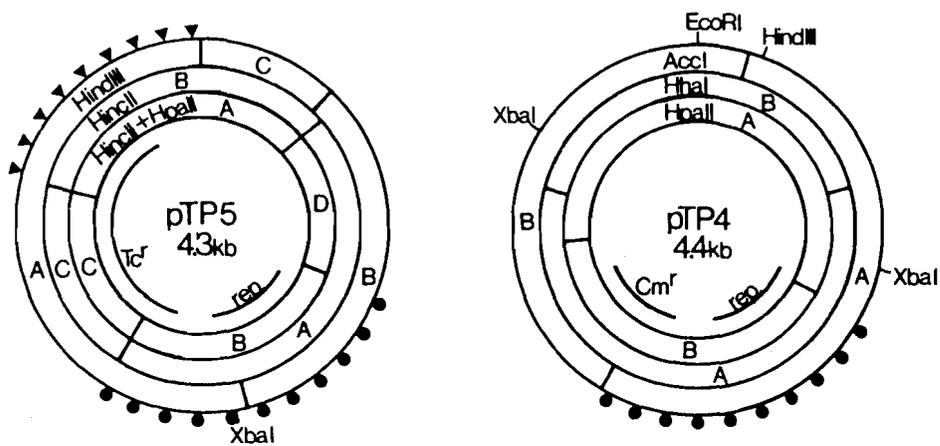


図 3 - 4 pTP4とpTP5の制限酵素切断地図

この地図は、KonoらとNoguchiらの報告に基づいて作製した。(●)はpTP4とpTP5の相同性領域を示した。(▲)は、pTP5とpTHT15の相同性領域を示した。

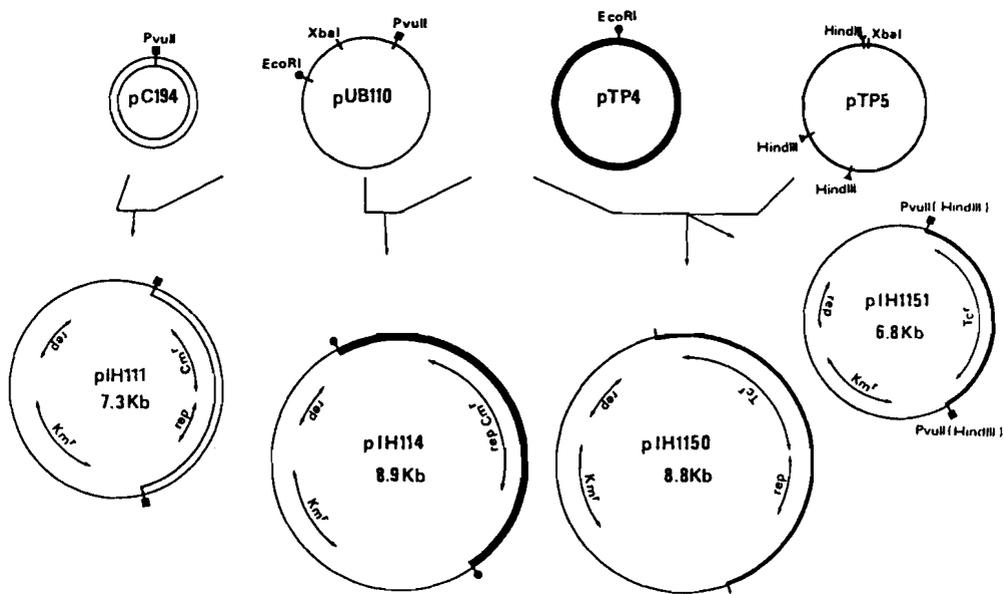


図 3 - 5 組換えプラスミドの作製

pIH111はpC194-Pvu II と pUB110-Pvu II、 pIH114はpUB110-Eco R I と pTP4-Eco R I、 pIH1150はpUB110-Xba I と pTP5-Xba I、 pIH1151はpUB110-Pvu II と pTP5-Hind III -A断片（平滑末端処理）でそれぞれ構築した。

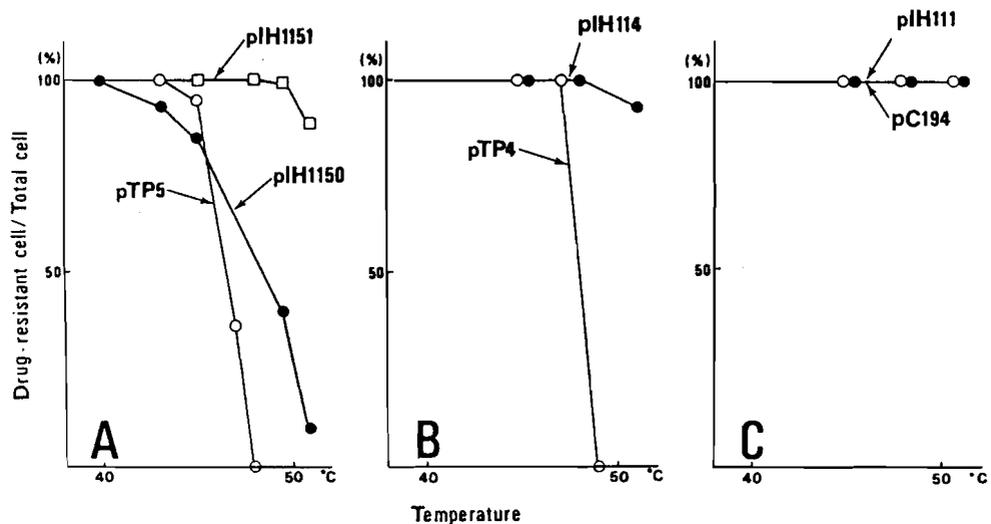


図 3 - 6 *B. subtilis* RM125株におけるプラスミドの安定性  
 それぞれのプラスミドを有する*B. subtilis* RM125株をL培地でそれぞれの温度で24時間培養し、その培養液を平板寒天上に塗布した。得られたコロニーを、それぞれの薬剤を含む平板寒天上に移し、生育したコロニー数からプラスミドの安定性を算出した。

\* 1 2 3 4 5 6 7 8 \*

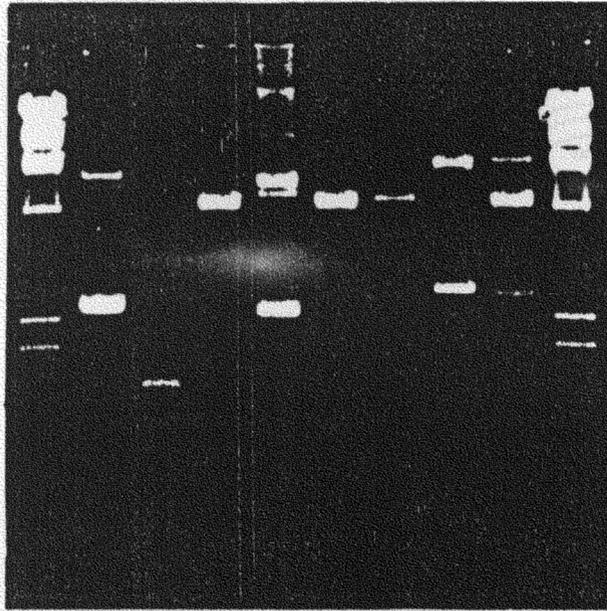


図3-7 制限酵素BstE IIによる切断パターン

それぞれのプラスミドをBstE IIで切断後、0.7%アガロースゲル電気泳動(40V 15時間)を行った。: lane 1, pUB110; lane 2, pC194; lane 3, pTP4; lane 4, pTP5; lane 5, pTHT15(B. subtilis); lane 6, pTHT15(Thermophile T15); lane 7, pTHN1(B. subtilis); lane 8, pTHN1+pTHT15(Thermophile N1)。レーンの両端にはマーカーとしてλ-Hind IIIマーカーを流した。

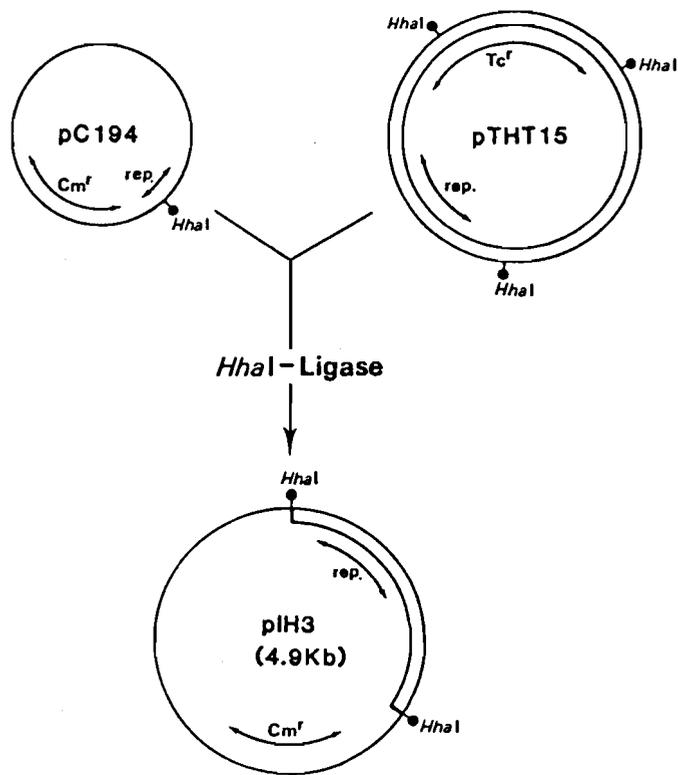


図 3 - 8 pIH3の構築

pC194のHha I 切断部位に、pTHT15の複製開始点領域を含むHha I -B断片を挿入した。

表 3 - 1 B. stearothermophilus CU21株へのプラスミドの形質転換効率

Plasmid	Source <sup>a</sup>	Antibiotic ( $\mu\text{g/ml}$ )	Transformation efficiency	
			A. per regenerants	B. per $\mu\text{g}$ DNA
pUB110	RM125	Km (40)	$1.0 \times 10^{-2}$	$1.3 \times 10^5$
pTHN1	RM125	Km (40)	$4.3 \times 10^{-2}$	$5.4 \times 10^5$
pTHT15	RM125	Tc (5)	$2.5 \times 10^{-4}$	$3.1 \times 10^5$
pTHT15	CU21	Tc (5)	$6.1 \times 10^{-2}$	$7.6 \times 10^5$
pC194	RM125	Cm (7)	$4.2 \times 10^{-2}$	$5.3 \times 10^{10^5}$
pTP4	LMAH761222	Cm (7)	$< 5 \times 10^{-7}$	Nd <sup>b</sup>
pTP5	LMAH761222	Tc (5)	$< 5 \times 10^{-7}$	Nd
pIH114	RM125	Km (40)	$8.6 \times 10^{-5}$	$1.1 \times 10^5$
		Cm (7)	$< 5 \times 10^{-7}$	Nd
pIH114	CU21	Km (40)	$2.1 \times 10^{-2}$	$2.6 \times 10^5$
		Cm (7)	$< 5 \times 10^{-7}$	Nd
pIH1151	RM125	Km (40)	$1.1 \times 10^{-2}$	$1.4 \times 10^5$
		Tc (5)	$< 5 \times 10^{-7}$	Nd
pIH3	RM125	Cm (7)	$2.4 \times 10^{-2}$	$3.0 \times 10^5$

B. stearothermophilus CU21株のプロトプラスト形質転換はImanakaら<sup>20)</sup>の方法に従って行った。プロトプラストの再生効率は約1%であった。 a: それぞれのプラスミドはB. subtilis RM125株、B. subtilis LMAH 761222株、B. stearothermophilus CU21株から調製した。 b:測定不能 = 形質転換株が全く得られなかった。

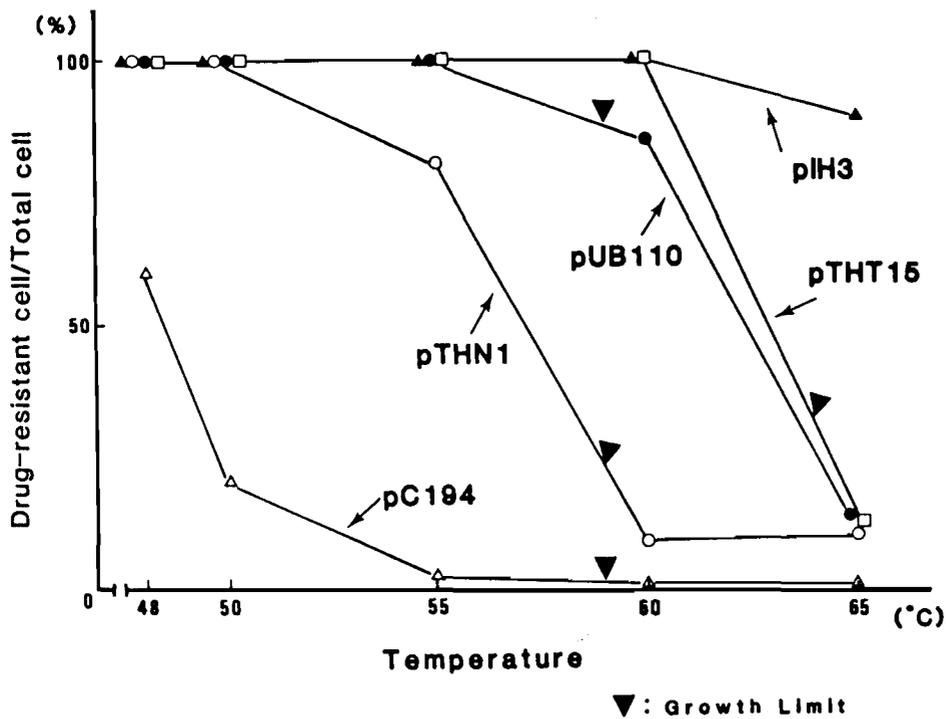


図 3 - 9 B. stearothermophilus CU21株におけるプラスミド機能の熱安定性

薬剤存在下でのB. stearothermophilus CU21株での生育限界温度は▲のシンボルで示した。pIH3のCm存在下での生育限界温度は59°Cであった。

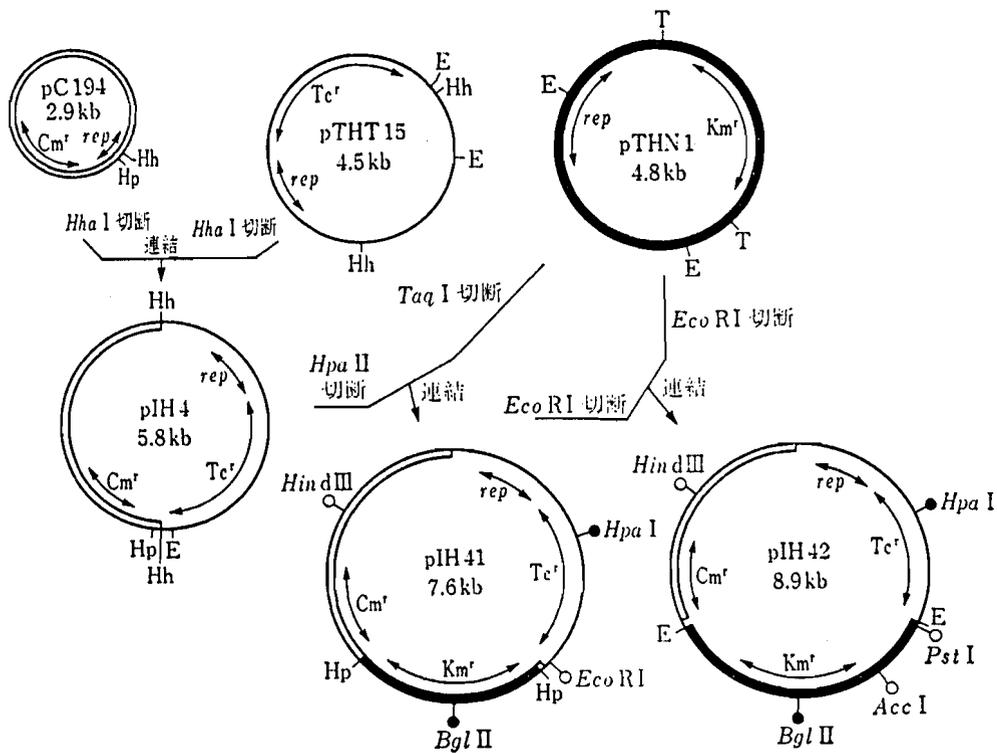


図 3 - 1 0 pIH41、pIH42の作製スキーム

略号で示されている制限酵素切断部位は以下の通りである。

E:EcoRI、Hh:HhaI、Hp:HpaII、T:TaqI また repは複製開

始点領域を示している。

表 3 - 2 各プラスミドの B. stearothermophilus CU21株への形質転換株

プラスミド	抗生物質 (濃度: $\mu\text{g}/\text{ml}$ )	形質転換効率*
pTHT15	Tc (5)	$2.5 \times 10^{-2}$
pTHN1	Km (40)	$4.3 \times 10^{-2}$
pC194	Cm (7)	$4.2 \times 10^{-2}$
pIH4	Tc (5)	$2.4 \times 10^{-2}$
	Cm (7)	$2.4 \times 10^{-2}$
pIH41	Tc (5)	$2.5 \times 10^{-1}$
	Cm (7)	$1.1 \times 10^{-1}$
	Km (40)	$3.0 \times 10^{-2}$
pIH42	Tc (5)	$2.6 \times 10^{-1}$
	Cm (7)	$1.1 \times 10^{-1}$
	Km (40)	$3.1 \times 10^{-2}$

約 $1\mu\text{g}$ のプラスミドDNAを $0.5\text{ml}$ プロトプラスト懸濁液 ( $1 \times 10^9/\text{ml}$ )に加えた。再生率は約1%であった。

\* 再生株あたりの形質転換株の割合。 $\mu\text{g}$ DNAあたりに換算すると $10^5 \sim 10^6$ 形質転換株/ $\mu\text{g}$ となる。

#### 第4章 好熱性 Bacillus 属細菌由来のプラスミド pTHT15 のテトラサイクリン耐性遺伝子の塩基配列

##### 第1節 緒言

グラム陽性細菌由来の薬剤耐性プラスミドの中には、多くのテトラサイクリン耐性 ( $Tc^r$ ) が見つかっている。すなわち、Staphylococcus aureus からは pTP5、pT181、pT127、pT169、Bacillus cereus からは pBC16、好熱性 Bacillus 属細菌からは pAB124、pTB90、pTB19 が見つかっており、これらの内のいくつかは pBC16 とかなり似ていると報告されている。われわれもまた、好熱性細菌から新しい  $Tc^r$  プラスミド pTHT15 を分離し、解析を行ってきた。その  $Tc^r$  遺伝子部分の制限酵素地図のパターンは pBC16、pAB124 および pTB90 と非常に似ていることは第1章で示した。これらのことから、Bacillus 属細菌が有するプラスミドから得られる  $Tc^r$  遺伝子は非常に相同性が高いと考えられた。また、Shishido らは B. subtilis 168 から特殊な条件によって切り出された  $Tc^r$  プラスミド pNS1981 が、pBC16 と制限酵素切断パターンが同一であることを報告している<sup>37)</sup>。また、Perkins と Youngman は<sup>38)</sup> Staphylococcus 由来のプラスミド pAM $\alpha$ 1 $\Delta$ 1 が pBC16 と同一の制限酵素パターンを有すると報告した。

Khan と Novick<sup>48)</sup> は Staphylococcus 由来の pT181 の全塩基配列を報告し、その中で  $Tc^r$  遺伝子部分が二つのポリペプチドをコードする部分に分かれていると述べている。彼らはまた、pT181 の  $Tc^r$  遺伝子は pE194 の macrolide lincosamide-streptogramin B 耐性遺伝子 (ermC) で報告<sup>49) 50) 51)</sup> のあったトランスレショナルアテニューエ

ーション機構により発現をコントロールされていると考察した。

Staphylococcus由来のTc<sup>r</sup>プラスミドと、pTHT15を含む好熱性 Bacillus属由来のTc<sup>r</sup>プラスミドはいずれも B. subtilisで複製し、Tc<sup>r</sup>を発現可能である。それ故、好熱性 Bacillus属由来のTc<sup>r</sup>遺伝子の構造を解析し、Staphylococcus由来のTc<sup>r</sup>遺伝子と比較することは非常に興味深い。そこで、この章では好熱性 Bacillus属細菌由来のpTHT15を用いて、そのTc<sup>r</sup>遺伝子部分の塩基配列を決定し、制御機構の解明と Staphylococcus由来のTc<sup>r</sup>遺伝子との比較を行った。

## 第2節 実験材料及び方法

### 培地組成

大腸菌の培養はすべてLB培地（トリプトン 10g, 酵母エキス 5g, NaCl 5g, Glucose 1g/ℓ (pH7.3)) で、枯草菌の培養はすべてNY培地（ニュートリエントブロス 8g, 酵母エキス5g, NaCl 3g, MgCl<sub>2</sub> 0.2g/ℓ (pH7.0)) で行った。また固形培地として用いる場合には、これに寒天15g/ℓを添加した。

### 使用菌株及びプラスミド

プラスミドの調製には B. subtilis RM125株を用いた。また、組換えプラスミド作製のための大腸菌宿主として Escherichia coli HB101株 (F<sup>-</sup> hsdS20(r<sub>B</sub><sup>-</sup>, m<sub>B</sub><sup>-</sup>) recA13 ara-14 proA2 lacY1 galK2 rpsL20(Sm<sup>r</sup>) xyl-5 mtl-1 supE44 λ<sup>-</sup>)を用いた。また、使用したプラ

スミドは、pTHT15 (Tc<sup>r</sup>, 4.5Kb) である。

### 塩基配列の決定方法

塩基配列の決定は、MaxamとGilbert<sup>52)</sup>の方法によって行った。またさらに塩基配列を確認するために、M13mp10<sup>53)</sup>、M13mp18、M13mp19<sup>54)</sup>を用いてジデオキシヌクレオチド塩基配列決定法(サンガー法)<sup>55)</sup>により塩基配列を調べた。決定されたDNAはソフトウェア開発(株)の塩基配列プログラムGenetyx IIIによって行った。

### RNAの調製方法

pTHT15を有する B. subtilis RM125株と有しない株からそれぞれ全RNAをGageとGeiduchekの方法<sup>56)</sup>によって調製した。

### S1マッピング

約1 $\mu$ gのRNAと5'末端をラベルしたssDNAを40 $\mu$ lのハイブリダイゼーション緩衝液(20 mM Tris-HCl(pH 8.0)、1M NaCl、2mM EDTA)に溶解し、90°C 5分間熱処理した後、51°Cで26時間ハイブリダイゼーションを行った。これに20ユニットのS1ヌクレアーゼ(BRL)を含む160 $\mu$ lのS1緩衝液(38mM 酢酸ナトリウム(pH 4.6)、63mM NaCl、1.3 mM ZnSO<sub>4</sub>)を加え、37°Cで30分間静置した。反応終了後、8%のシーケンス用ポリアクリルアミドゲル電気泳動により解析した。この時、DNAマーカーとして同じ5'末端をラベルしたssDNAをMaxamとGilbertの方法で切断したシーケンス用サンプルを同時に電気泳動した。

## 酵素反応

制限酵素、リガーゼ、DNAポリメラーゼ、アルカリホスファターゼ、キナーゼの反応は宝酒造（株）、東洋紡績（株）のカタログおよび成書<sup>57)</sup>に従って行った。

## 電気泳動

アガロースゲル電気泳動は0.7% Agarose, 40mM Tris-Acetate (pH8.0) 2mMEDTAの条件でMupid-2（アドバンス（株））を用いたサブマリン法で行った。ポリアクリルアミドゲル電気泳動は5%-30:1 アクリルアミド:ビスアクリルアミド, 89mM Tris-Borate (pH8.3) 0.2mM EDTAの条件でスラブゲル電気泳動装置を用いて行った。

## 第3節 結果

### 1. pTHT15のTc<sup>r</sup>遺伝子の塩基配列

図4-1に示すストラテジーに従って、pTHT15のTc<sup>r</sup>遺伝子部分を含む1628bpを決定した。決定した塩基配列を図4-2に示した。PC-9801によるDNA塩基配列の解析プログラムにより、これらの決定した塩基配列を解析した結果、186番目のGTGから1565番目のTAAがTc<sup>r</sup>遺伝子をコードしうる唯一のオープンリーディングフレーム（ORF）であ

った。またそのGTG開始コドンの3bp上流にリボソーム結合領域であるSD配列（図4-2 RBS-2）が存在した。

これらの結果は、このORFがTc<sup>r</sup>遺伝子（TET）をコードしていることを示唆するものである。またTETのコーディングフレームから上流について調べると、リーダーペプチドをコードすると考えられる小さなORFが存在した。このORFは、93番目のATGから155番目のTAAまでの30アミノ酸をコードしており、その上流にはもう一つのSD配列（図4-2 RBS-1）が存在した。さらに、その30アミノ酸をコードするORFの中にはRBS-2を含む3組のインバーテッドリピート構造が存在した。

また、ORFがコードすると考えられるアミノ酸配列を塩基配列の下に記載した。そのTET蛋白質は458アミノ酸から構成され、ハイドロパシープロット<sup>58)</sup>の結果（図4-3）、非常に疎水性の高いことが明かとなった。この事実は、膜への結合酵素であると考えられるTET蛋白質の条件と一致する。

## 2. S1マッピング

転写開始点をS1マッピングを用いて解析した。まず、pTHT15を有する *B. subtilis* RM125株から全RNAを調製した。次に、pTHT15から制限酵素 FokI（186）-HaeIII（3）の断片を調製し、5'末端をラベル化後ssDNAとし、RNAとハイブリダイズした。その後、S1ヌクレアーゼによる切断を行い、DNAシーケンス用8%ポリアクリルアミド-尿素ゲル電気泳動を行い、S1ヌクレアーゼにより切断を受けなかった断片について解析した。同時に、同じssDNAをMaxamとGilbertの方法で調製したシーケンスサンプルを泳動した。その結果（図4-4）、

2つの主なバンドが検出された。S1マッピングにより得られるフラグメントよりも、シーケンス反応によって得られるバンドの方が1.5bp速く泳動される<sup>59)</sup>ことから、転写開始点は68と69番目の塩基部分であると考えられた。また、RosenbergとCourt<sup>60)</sup>は、原核生物のmRNAの開始は、プリン塩基で始まることが多いと結論している。以上のことから、TET遺伝子のmRNA開始は69番目のAの位置であると考えられた。

その上流には35～40番目にTTTAAAが、58～63番目にTAAAATが存在しており、これらが転写のためのプロモーターのコンセンサス配列の-35と-10領域に相当する部位と考えられた。この-35と-10領域の間は17bpとB. subtilisにおける一般的な間隔<sup>61)</sup>と一致した。しかし、-35と-10領域は知られているコンセンサス配列TTGACA(-35), TATAAT(-10)とは若干異なり、-35領域で2塩基、-10領域で1塩基のズレが認められた。

### 3. Tc<sup>r</sup>遺伝子のmRNAの二次構造予測とTET蛋白質の誘導発現

S1マッピングの結果から、Tc<sup>r</sup>遺伝子のmRNAは69番目から開始されることが確認された。そのmRNAの5'領域には、図4-2に示す(1)、(2)、(3)、(4)、(5)の三組のインバーティッドリピート構造を有していた。図4-5に、RBS-1からTETタンパク質の翻訳開始点までの部分において、Tc<sup>r</sup>mRNAの予想される二次構造にを示した。それぞれのステムとループ構造の自由エネルギーをTinoco<sup>62)</sup>らの報告に従って算出し図4-5に示した。図4-5の(A)の構造をとったときのmRNAの自由エネルギーは-20kcal/molであり、(B)構造の-15.8kcal/molよりも安定である。これらの二つの二次構造は

HorinouchiとWeisblumによって明らかにされたエリスロマイシン耐性遺伝子 ermC の mRNA 構造と非常に似ている。ermC 遺伝子で提唱されたトランスレーショナルアテニュエーション機構<sup>49) 50) 51)</sup>を有する構造と似ていることから、TET蛋白質も同様の機構で誘導発現を受けているものと考えられた。

#### 4. Staphylococcus 由来の Tc<sup>r</sup> 蛋白質と TET 蛋白質のアミノ酸配列の比較

Staphylococcus 由来の Tc<sup>r</sup> プラスミド pT181<sup>48)</sup> は B. subtilis で複製、形質発現可能であり、その Tc<sup>r</sup> 遺伝子はグラム陽性菌由来の Tc<sup>r</sup> 遺伝子の中で唯一塩基配列が決定されている。そこで、pTHT15 と pT181 の Tc<sup>r</sup> 蛋白質アミノ酸配列の比較を行った。pT181 の Tc<sup>r</sup> は一つの mRNA から二つの翻訳開始点により B、D 二つの蛋白質が翻訳される。Tc<sup>r</sup> 発現のためには、両方の蛋白質を同時に必要とされている。D 蛋白質は、B 蛋白質とは違ったフレームで、B 蛋白質をまだコードしている部分にある ATG 開始コドンから始まる。

TET と B 蛋白質を並べてそのアミノ酸配列を比較してみると (図 4-6)、相同性はかなり高いことが明かとなった。同様に TET と D 蛋白質を比較しても相同性が高いことが示された。D 蛋白質の ATG 開始コドンと対応する位置を TET 蛋白質について調べると、ATG コドンとして Met をコードしており TET 蛋白質においてはフレーム内にある。これらの二つの Tc<sup>r</sup> 遺伝子は共通の祖先から進化したと考えられた。

#### 第 4 節 考 察

好熱性 Bacillus 属由来薬剤耐性プラスミド pTHT15 の Tc<sup>r</sup> 遺伝子の DNA 塩基配列を決定した。その結果、Tc<sup>r</sup> 構造遺伝子は GTG を開始コドンとする 1374bp の ORF からなり、その TET 蛋白質は 458 残基からなる非常に疎水性の高い蛋白質であることが明かとなった。細菌における Tc<sup>r</sup> の獲得は、Tc<sup>r</sup> 遺伝子産物である TET 蛋白質が細胞の膜へ結合し Tc の細胞内への進入を防ぐことにより行われる。pTHT15 の TET 蛋白質も、非常に疎水性の高い蛋白質であることから、膜タンパクとしての特徴を有している。その遺伝子の下流には  $\rho$  因子に関与せず転写終結を行うと考えられるターミネーター構造が認められた。

構造遺伝子上流部分には、リボソームとの結合領域 (RBS) が存在し、その上流部分には 20 アミノ酸をコードする小さな ORF とその RBS が存在した。その上流にプロモーターと考えられるコンセンサス配列 TTTAAA (-35 領域)、TAAAAT (-10 領域) が存在したこと、および S1 マッピングの結果から -10 領域の TAAAAT から 6 塩基下流の A から mRNA の転写が行われていることが示されたことから、この位置がプロモーター領域であることが確認された。また、これらの mRNA 転写開始点から TET 構造遺伝子開始コドンまでには 5 つのインバーテッドリピート構造が存在し、この部分が Tc<sup>r</sup> 遺伝子の発現を制御している部分であることが示唆された。この mRNA 部分の二次構造を推定したところ、活性型と不活性型の二つのコンホメーションをとり得ることが明かとなり、いわゆるトランスレーショナルアテニュエーションの機構により制御を受けると考察された。

低濃度の Tc が細胞内に入ってきたときになぜ熱力学的に安定な不活性型が壊れて活性型になるかを以下のように推論した。誘導の無い状態では、大半のリボソームはリーダーペプチドの部分で通常の

スピードで通過し続け、(B)の構造をとる機会を与えない。しかし、微量のTcが存在するときにはTcを結合したリボソームはリーダーペプチドに対するSD配列から翻訳を開始してだんだんとスピードをゆるめ、ついにはリーダーペプチドを合成する途中で停止する。その結果、ステム1から3を引き離し、自由になった2はステム4とペアを作れる状態となり、TET蛋白質のSD配列を解放しTET蛋白質の合成が開始されると推察された。

pTHT15のTET蛋白質は同じ制限酵素切断パターンを有するpAB124で明らかにされた<sup>63)</sup>ように、細胞膜に結合することによってTcの細胞内への進入を抑制していると考えられる。このような誘導発現によってTET蛋白質の合成が増大し、やがて細胞中からTcが無くなるとリーダーペプチド上に停止するリボソームは無くなることから、再びこの系は熱力学的に安定な状態すなわちSD配列をループ内にトラップする構造(A)に戻り、それ以上無駄なTET蛋白質の生産は停止すると考えられた。

また、Staphylococcus由来のTc<sup>r</sup>プラスミドのpT181のTc<sup>r</sup>蛋白質と非常に相同性が高いことが示された。しかし、pT181のTc<sup>r</sup>遺伝子が二つの重なりあうORFからなり、耐性発現にはその両方の遺伝子産物が必要であると考察している。今後は、これら両方のTc<sup>r</sup>蛋白質の遺伝子産物を取得することにより、その機構が解明されるものと期待する。PerkinsとYoungmann<sup>64)</sup>は、Streptococcus由来のTc<sup>r</sup>プラスミドpAM $\alpha$ 1 $\Delta$ 1は制限酵素による切断地図からpBC16と全く同一であるとしている。Bacillus由来の多くのTc<sup>r</sup>プラスミドが、pBC16に似た遺伝子配列をしていることが明かとなっている。そのためグラム陽性菌に存在しているTc<sup>r</sup>遺伝子は共通の祖先から進化したと考えられる。しかし、グラム陰性菌のTc<sup>r</sup>遺伝子は、グラム陽性菌のTc<sup>r</sup>明

らかに違っているように考えられた<sup>65)66)</sup>。

## 第5節 要約

1. 好熱性 Bacillus 属由来 Tc<sup>r</sup> プラスミド pTHT15 の Tc<sup>r</sup> 遺伝子部分の塩基配列 1628bp を決定し、そのアミノ酸配列を推定した。その結果、TET 蛋白質をコードする ORF は 1374bp からなり、予想される TET 蛋白質は疎水性に富む 456 アミノ酸から構成されることが明かとなった。
2. 構造遺伝子上流には 20 アミノ酸のリーダーペプチドをコードできる小さな ORF が存在し、それぞれに RBS を有していた。また、S1 マッピングの結果から、mRNA の転写開始点およびプロモーターの位置を決定した。mRNA の転写開始点と TET 蛋白質の翻訳開始点との間の mRNA の二次構造を検討したところ、5 つのインバーテッドリピート構造がステム & リピート構造を取ることで、活性型と不活性型の二種類の構造を取り得ることが判明した。これらの知見から、Tc の発現制御機構はいわゆるトランスレーショナルアテニュエーションである可能性が示唆された。
3. 同じグラム陽性細菌 Staphylococcus 由来の Tc<sup>r</sup> プラスミド pT181 の Tc<sup>r</sup> 遺伝子との比較から、予想されるアミノ酸配列に相同性があることが明かとなった。

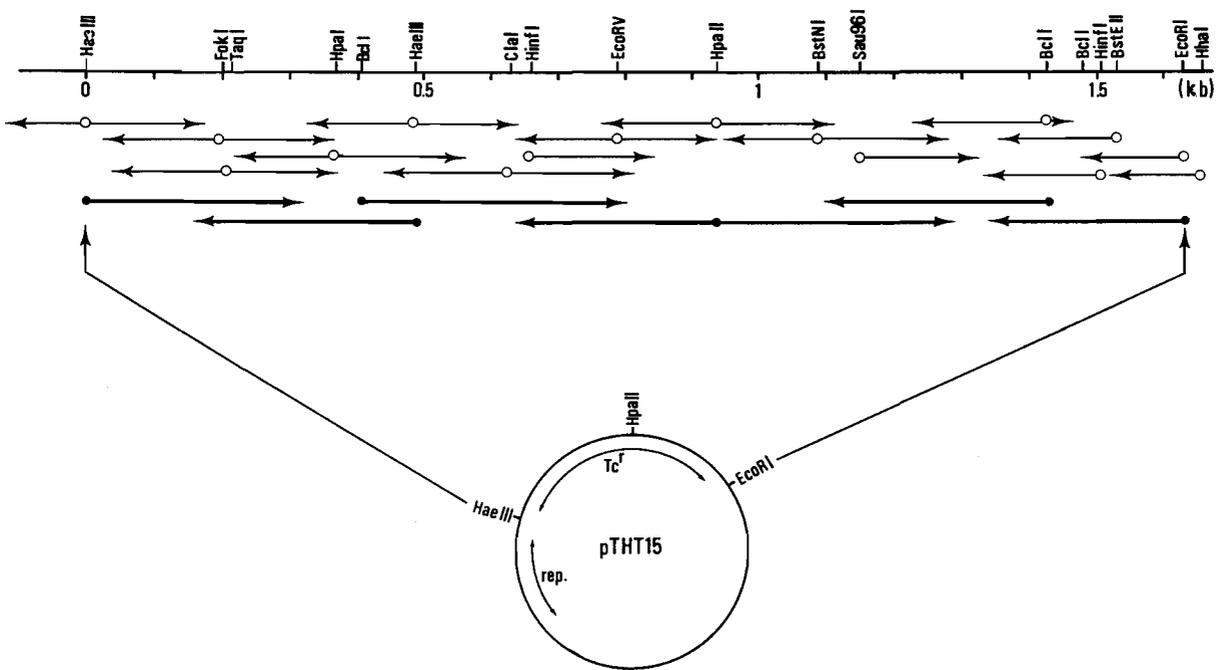


図 4 - 1 pTHT15の $Tc^r$ 遺伝子部分のシーケンスストラテジー  
塩基配列決定時に用いた制限酵素サイトのみ示した。

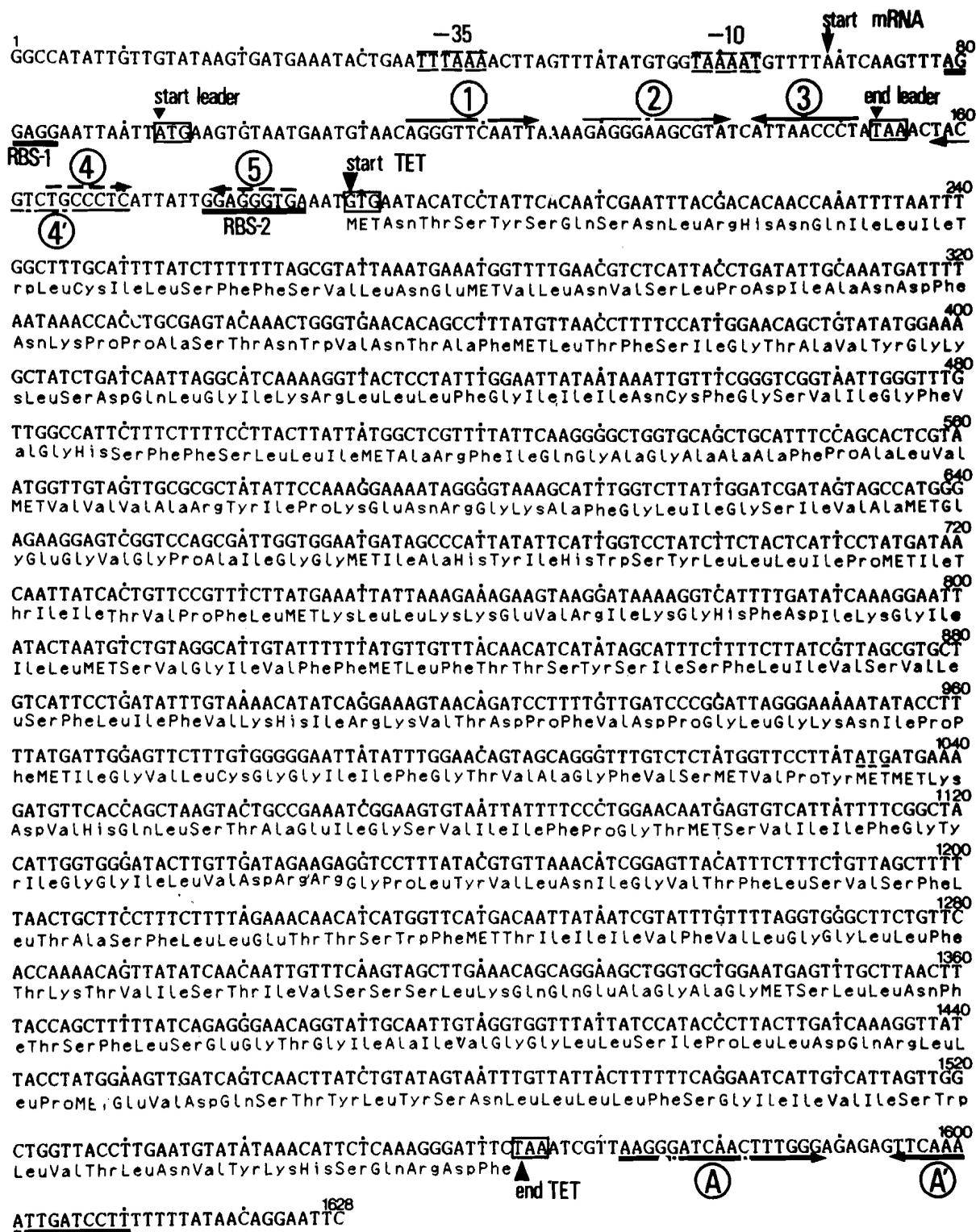


図 4-2 pTHT15のTc<sup>r</sup>遺伝子部分の塩基配列

HacIII認識サイトGGCCの最初のGを1として番号をつけた。予想されるプロモーター、リボソーム結合部位(RBS)、インバーテッドリピート構造部分にアンダーラインを記した。AとA'のアンダーライン部分は、 $\rho$ 因子に依存しない転写のターミネーターであると考えられる。二つのORFにおける翻訳の開始コドンと終始コドンはボックスで示した。TET蛋白質をコードしていると考えられるアミノ酸配列は、塩基配列の下に記述した。塩基配列の上のドットは10bp毎に記した。

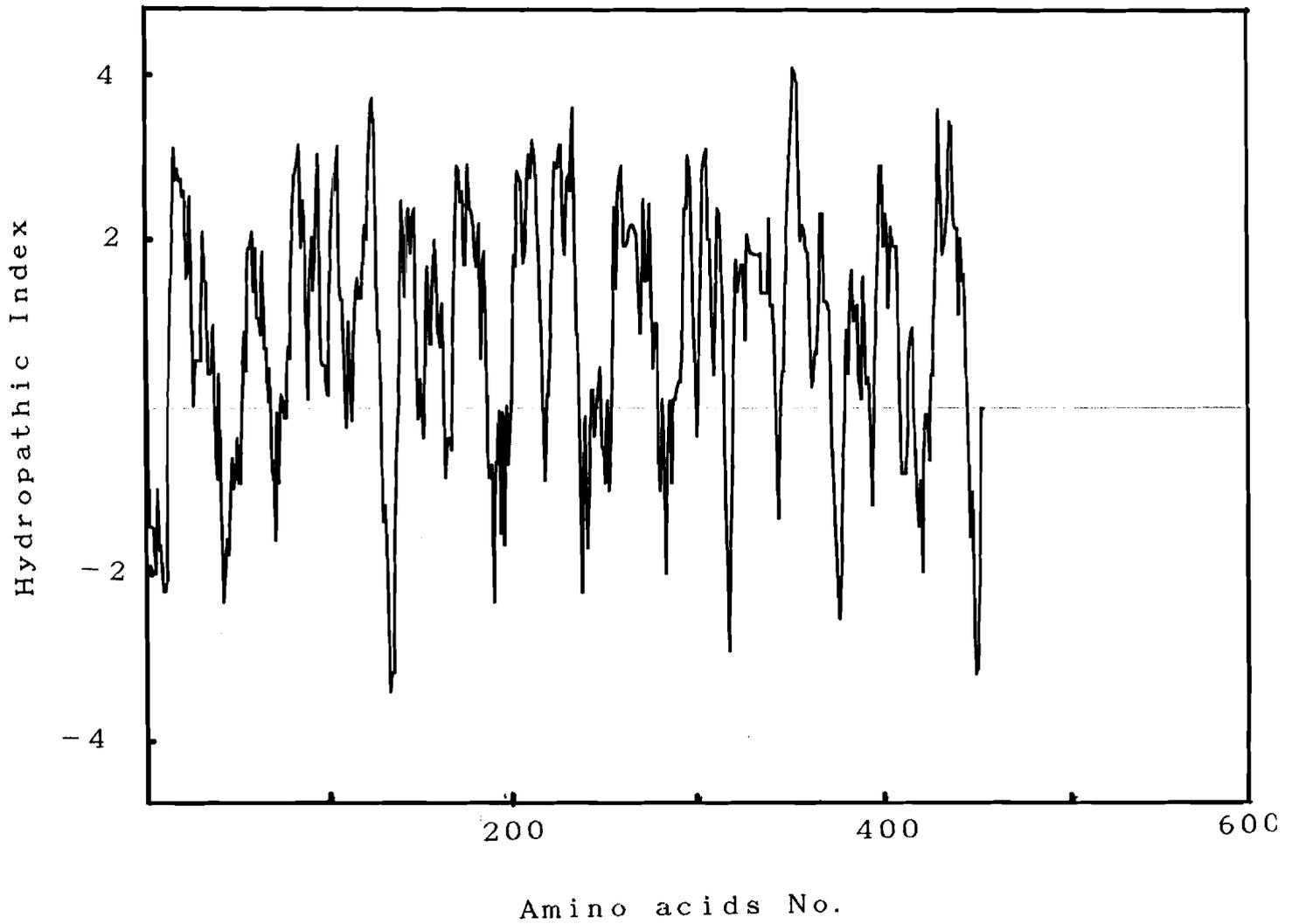


図4-3 TET蛋白質のハイドロパシー

Doolitの文献に従い、前後5残基ずつのアミノ酸残基の値を平均した値をプロットした。

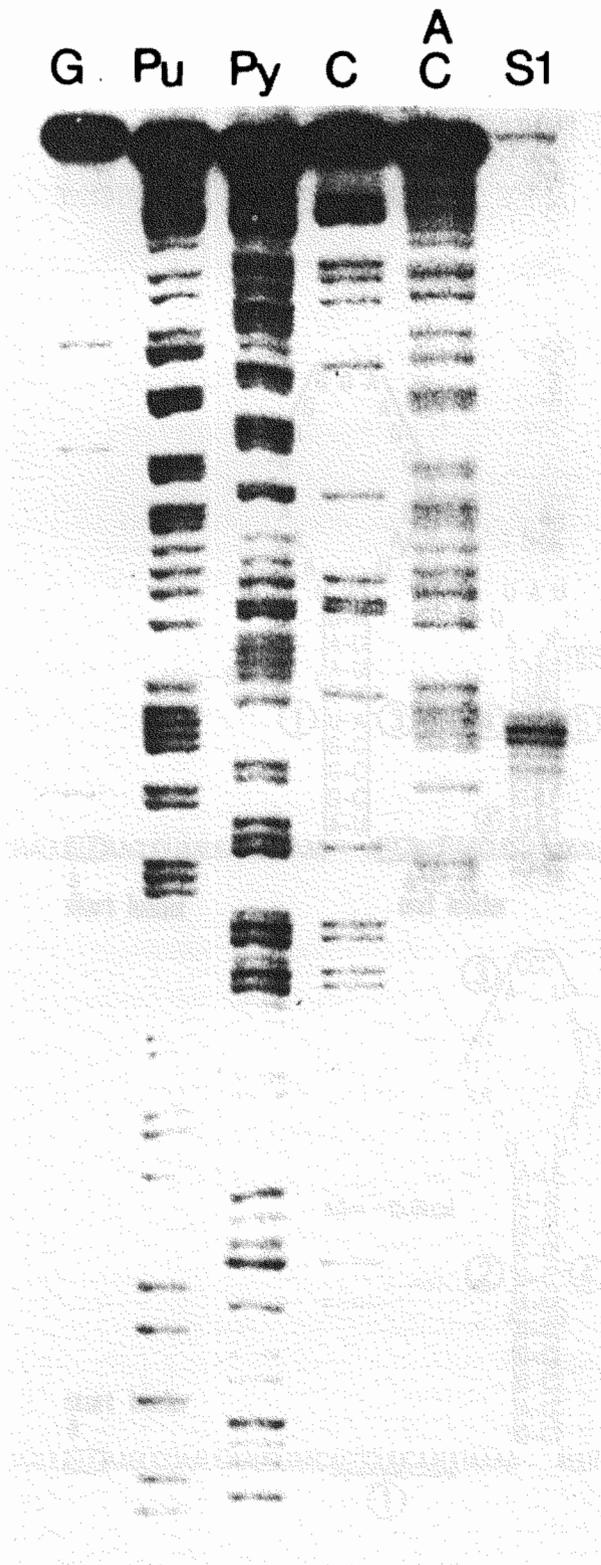


図4-4 S1マッピングによるTc<sup>r</sup>遺伝子のmRNAの5'末端部分の解析

pTHT15を有する*B. subtilis* RM125株から調製したRNAを約1 $\mu$ gと5'末端をラベルしたpTHT15のFokI-HaeIII間の一本鎖DNAをハイブリダイズし、S1ヌクレアーゼで消化後、シーケンスマーカーと同時に8%ポリアクリルアミド-Ureaゲル電気泳動を用いて解析した。

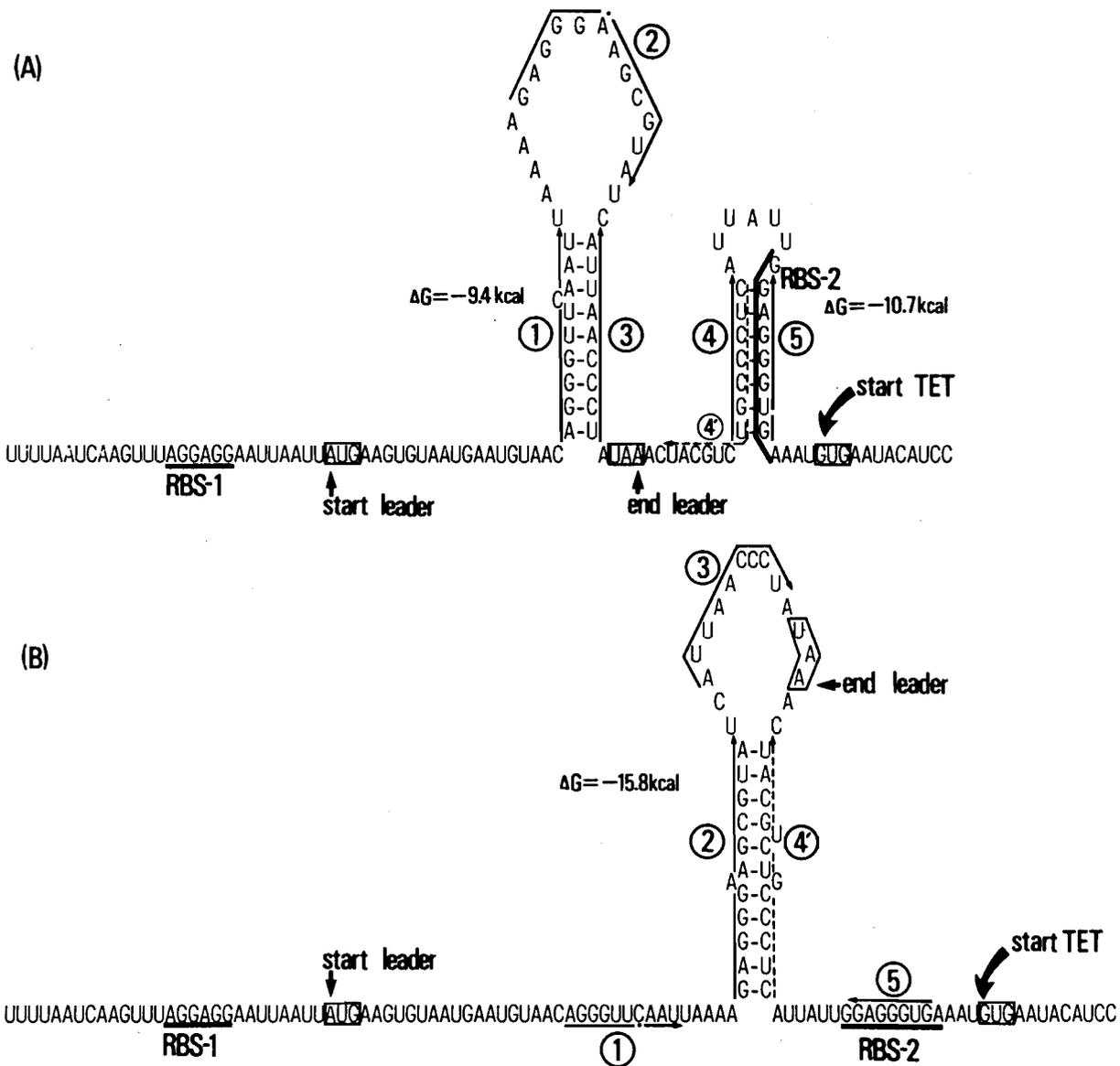


図 4 - 5 TET遺伝子の mRNA の制御遺伝子部分の二次構造予測

①、②、③、④、④'、⑤で示したインバーテッドリピート構造は図 4 - 2 に従った。それぞれのループの自由エネルギーはTinocoらの文献に従って算出した。  
 (A) 構造は不活性型で、TET蛋白質のRBS-2がステムの中にある。(B) は活性型で、RBS-2とリボソームが結合可能となる。

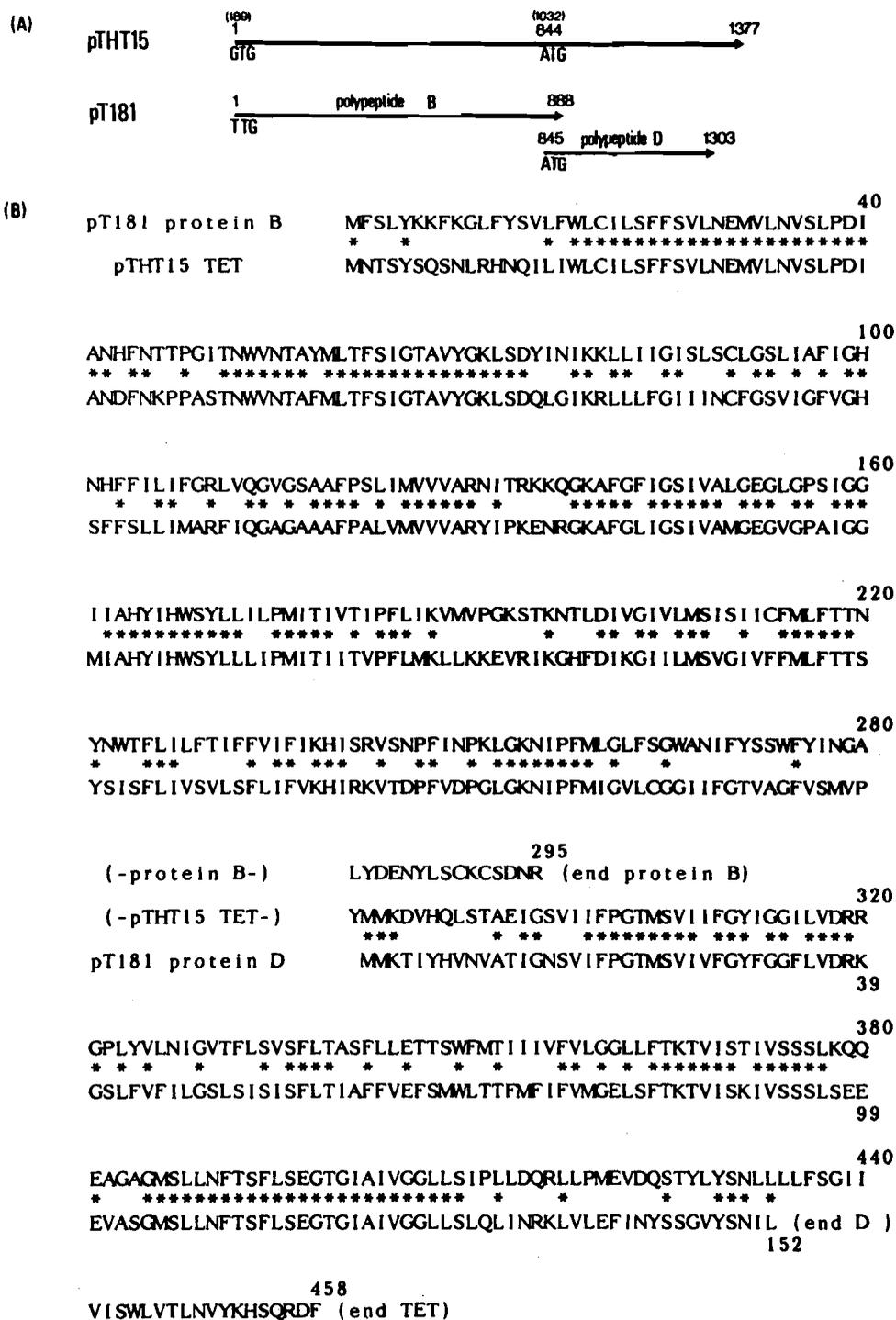


図 4-6 *Staphylococcus aureus* 由来の Tc<sup>r</sup> プラスミド pT181 との比較

(A) : コーディング部分全体の比較 (B) : pT181 の TET 蛋白質の B および C 蛋白質とのアミノ酸比較。

## 第5章 $\alpha$ -アミラーゼ遺伝子のクローニングとテトラサイクリン耐性遺伝子の発現制御領域を用いた分泌生産系の構築

### 第1節 緒言

第4章で解析したpTHT15由来のTc<sup>r</sup>遺伝子の発現制御領域を用いることにより、枯草菌における発現の制御が可能であると考えられる。これまで、薬剤耐性遺伝子を用いた枯草菌による発現制御の試みの例として、pE194のエリスロマイシン耐性遺伝子のプロモーターによる肝癌ウイルスのコア抗原の生産<sup>67)</sup>とクロラムフェニコール耐性遺伝子cat-86のプロモーターによるヒドロキシ葉酸脱水素酵素(DHFR)の生産<sup>68)</sup>が知られている。しかし、これらの遺伝子のいずれもが薬剤耐性遺伝子の構造遺伝子部分を含む融合蛋白質遺伝子となり、プロモーター及び発現制御領域のみで十分な発現制御が可能であるかは不明である。また、これらはいずれも菌体内酵素であり、枯草菌の発酵工業における最も有用な性質である分泌生産系におけるコントロールシステムはまだ確立されていない。そこで、pTHT15のテトラサイクリン耐性遺伝子のプロモーター及び発現制御領域を $\alpha$ -アミラーゼの構造遺伝子へ連結し、枯草菌の工業的利用の上で最も有用であると考えられる分泌系への応用を試みた。

### 第2節 実験材料及び方法

#### 菌株

$\alpha$ -アミラーゼのクローニングには B. subtilis 1A412株 (amyEm<sup>+</sup>  
amyR2 purB6 metB5; Bacillus Genetic Stock Center, Ohio State  
University; Original code :NA64)をDNA供与体として用いた。また、  
クローニング宿主として B. subtilis 207-25株 (m168 herM recE4  
amyE07 aro1906 leuA8 lys21)を用いた。

### 染色体DNAの調製方法

B. subtilis 1A412株からの染色体DNAの調製は、SaitoとMiura<sup>69)</sup>  
の方法に従って行った。

### DNA断片の回収

DNA断片の回収は、第4章の実験方法と同様に電気泳動した  
あとで目的のバンドを剃刀の刃で切取り、電気泳動緩衝液0.25mlを  
入れた透析チューブに入れて更に電気泳動を行い、トランスイルミ  
ネーターでゲルからDNAが出たことを確認した後、緩衝液を回収  
した。それを15,000rpm 4°C 5分間の遠心分離を行いその上清につい  
てフェノール処理2回、エーテル処理3回行った後、エタノール沈  
澱を行いDNA断片を回収した。

### DNAの化学合成

DNAの合成はすべてアプライドバイオシステム社のDNA合成  
装置381Aを用いて行った。

## 塩基配列の決定方法

塩基配列の決定は以下のように行った。DNA断片をpUC118及びpUC119に両方向に連結し、ヘルパーファージM13K07を用いて一本鎖DNAを調製した。Sangerらによるダイデオキシターミネーション法<sup>65)</sup>によって塩基配列を決定した。

## $\alpha$ -アミラーゼの検出

得られた形質転換株について $\alpha$ -アミラーゼ生産の生産性を調べるために以下の実験を行った。形質転換株を1%可溶性デンプンを含むNY寒天平板培地に移植し37°Cで一夜培養した。生育したコロニーについて、10mM  $I_2$ -18mM KI溶液を平板培地に噴霧しコロニーの周りのクリアゾーンにより判断した。

また、培養上清中の $\alpha$ -アミラーゼ活性は不破の方法<sup>70)</sup>を用いて測定した。0.1mgの可溶性デンプンを加水分解する酵素活性を1ユニットとした。

## SDS-PAGE (sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis)による $\alpha$ -アミラーゼの検出

B. subtilisの培養上清を12%SDS-PAGE<sup>71)</sup>後、ゲル中の $\alpha$ -アミラーゼをLacksとSpringtonの方法<sup>72)</sup>によって活性化した。つぎに、1%の可溶性デンプン溶液(pH6.2)で37°C 4時間振盪し、その後で0.01 M-K/I<sub>2</sub>で処理した。

### 第 3 節 結 果

#### 1. アミラーゼ遺伝子のクローニング

Tc<sup>r</sup> 遺伝子の発現制御領域が明かとなったので、これを用いて  $\alpha$ -アミラーゼの誘導分泌発現の検討を行った。 $\alpha$ -アミラーゼ遺伝子は、B. subtilis 1A412株の  $\alpha$ -アミラーゼ遺伝子をクローニングし用いた。すなわち、B. subtilis 1A412株の染色体DNAを Saitoと Miuraの方法<sup>5,6)</sup>で調製後、制限酵素 Sau3A I で部分消化し、pUB110の BamH I サイトに連結し、プロトプラスト形質転換法を用いて枯草菌 B. subtilis 207-25株を形質転換し、可溶性デンプン1%と5,000 ng/皿の Kmを含む枯草菌再生培地 DM3に塗布した。37°C二日間培養し、得られた再生用寒天培地に直接 I<sub>2</sub>-KI溶液を噴霧し、ヨードデンプン反応によりそれぞれのコロニーの  $\alpha$ -アミラーゼ生産について調べた。約5,000株について調べたところ、内一株が  $\alpha$ -アミラーゼを多量に産生することが認められた。そこで、この高  $\alpha$ -アミラーゼ産生株を培養し、保持しているプラスミドを調製後各種制限酵素により解析した。その結果、得られた組換えプラスミドは pUB110の BamH I 部位に3.1Kbの断片が挿入された構造を有しており、このプラスミドを pDCA100と名付けた (図5-1)。さらに、挿入遺伝子部分を制限酵素で解析したところ、図5-1に示すように Km耐性遺伝子とは逆方向に  $\alpha$ -アミラーゼ遺伝子がクローニングされており、その5'領域はすべて含まれていることが明かとなった。しかし、3'領域について同じタイプの  $\alpha$ -アミラーゼ遺伝子である Yamazakiらがクローニングした pTUB4<sup>7,8)</sup>の  $\alpha$ -アミラーゼ遺伝子との比較より、 $\alpha$ -アミラーゼ遺伝子の全長ではなく、開始コドンから1583塩基目

の Sau3AI サイトでベクター DNA と連結されていると判断された。

そこで次に、構造遺伝子部分について塩基配列を決定し、pTUB4 にクローニングされた  $\alpha$ -アミラーゼ遺伝子との比較を行った。その結果（図 5-2）、1539 番目と 1542 番目の塩基に欠失が認められたものの、他の塩基は全て一致した。しかし、この塩基配列の欠失により、アミノ酸配列のフレームシフトが起こり、欠失位置以降のアミノ酸配列は、全く違う配列となり、最初のストップコドンが現れるのは、pUB110 の BamHI サイトの 103 から 105 下流にある TAA であった。このため、pDCA100 を有する B. subtilis 207-25 株が分泌生産する  $\alpha$ -アミラーゼは 520 アミノ酸（分子量 57,650）であると計算された。

## 2. $Tc^r$ 遺伝子のプロモーター及び発現制御領域と $\alpha$ -アミラーゼ遺伝子との連結

pIH4 に存在する  $Tc^r$  遺伝子のプロモーターおよび発現制御領域とターミネーターとの間に  $\alpha$ -アミラーゼ遺伝子を挿入し、 $\alpha$ -アミラーゼ遺伝子の  $Tc$  による発現の制御を検討した。

pTHT15 の  $Tc^r$  遺伝子の構造遺伝子を制限酵素 FokI と BstEII で切断することにより、1341 塩基対の断片として除去した。この時、BstEII サイトは T4-DNA ポリメラーゼにより平滑末端にした。

一方、枯草菌の  $\alpha$ -アミラーゼ構造遺伝子は HinfI - HinfI (253bp)、HinfI - EcoRI (270bp)、EcoRI - SphI (1291bp) の 3 つの DNA 断片によって、5' 側の 14bp を除いて再構築できる。そこで、pDCA100 を上記の制限酵素で切断した後、ポリアクリルアミドゲル電気泳動で目的の 253bp, 270bp, 1291bp 断片を単離精製した。

また、 $Tc^r$  遺伝子のプロモーターと発現制御領域と  $\alpha$ -アミラーゼ

構造遺伝子を連結するための合成DNAリンカーとして

5'-TGAAATATGTTTGCAAAACG-3'と5'-AATCGTTTTGCAAACATAT-3'を合成した。この合成DNAをT4-DNAキナーゼを用いて5'末端にリン酸基を付与した後、両DNAを加熱処理後アニーリングしDNAリンカーとした。

以上のDNA断片を混合し、T4 DNAリガーゼを用いて連結し

B. subtilis 207-25株を形質転換した。クロラムフェニコール耐性を示す形質転換株のプラスミドを調製しアガロースゲル電気泳動により解析した。その結果、目的通りTc<sup>r</sup>耐性遺伝子のプロモーター及び発現制御領域と $\alpha$ -アミラーゼの構造遺伝子部分が連結されたプラスミドpMD391を得た(図5-3)。この時の、Tc<sup>r</sup>遺伝子のプロモーターと $\alpha$ -アミラーゼ構造遺伝子の連結部分の塩基配列は図5-4に示した。連結部分には、余分な塩基配列は含まず $\alpha$ -アミラーゼ遺伝子の開始コドンの直前までTc<sup>r</sup>遺伝子の塩基配列を有している。このpMD391を有するB. subtilis 207-25株は500ng/mlのTcにより $\alpha$ -アミラーゼの生産量が増大することが、2%の可溶性デンプンを含む寒天平板培地上で確認された(図5-5)。

### 3. 誘導におけるTc濃度の影響

添加するTcの濃度を変えて $\alpha$ -アミラーゼ遺伝子誘導への影響を検討した。Tcを5 $\mu$ g/ml含むNY培地に5, 10, 50, 100, 500, 1,000 ng/mlの濃度になるようにそれぞれ添加し、pMD3041を有するB. subtilis 207-25株を、前培養を行った菌体を接種し、37°Cで24時間培養した。培養終了後の培養上清中の $\alpha$ -アミラーゼ活性を測定したところ(表5-1)、Tcの濃度が100ng/ml以下では $\alpha$ -アミラーゼ活性がそれ以上の添加濃度の場合と比べて低く、誘導が充分に行

われていないと判断された。また、Tcの濃度が1,000ng/mlでは菌の生育がそれ以下のTc添加濃度の時と比べ半分に低下していた。以上の結果から、遺伝子の発現には500ng/ml程度のTcが最適であると考えられた。

#### 4、Tcによる $\alpha$ -アミラーゼ遺伝子の誘導発現

Tcによる $\alpha$ -アミラーゼ遺伝子の誘導発現について、培養の初期からTcを添加した場合と、定常期初期でTcを添加した場合について検討した。まず、37℃16時間前培養したpMD391を有するB. subtilis 207-25株を500ng/mlのTcと5,000ng/mlのCmを添加したNY培地に植菌後37℃で振盪培養し、培養約2時間毎に菌の生育と $\alpha$ -アミラーゼ活性を測定した。その結果(図5-6)、Tcの添加条件下では、菌の生育と共に $\alpha$ -アミラーゼを分泌生産し、その生産量はTc無添加に比べて約15倍に達した。また、菌の対数増殖期に比べるとそのスピードは低下しているものの、定常期においても $\alpha$ -アミラーゼを分泌生産が進行することが確認された。

次に、定常期初期における誘導発現にを検討するために、約OD<sub>600</sub>=1.3の時Tcを500ng/mlの濃度になるように添加し、37℃で更に振盪培養した。一定時間毎に培養上清をサンプリングし $\alpha$ -アミラーゼ活性とOD<sub>600</sub>値を測定した。その結果は図5-6に示した。

最初のサンプリングはTc添加後1時間目に行ったが、すでにTc無添加に比べ約2倍の $\alpha$ -アミラーゼを分泌生産しており、極めて速やかに誘導発現が起こることが示された。また菌の増殖が停止した後も $\alpha$ -アミラーゼを分泌生産し続けていることが確認された。この事実は、十分に菌体が生育した後に目的の遺伝子の発現を開始で

きることを示しており、このTcによる発現制御系が実用化レベルで利用可能であることが強く示唆された。

次に、これらの培養上清のSDS-PAGEによる解析を行ったところ、確かに $\alpha$ -アミラーゼ活性を有する分子量48,000のバンドが確認された(図5-7)。

#### 第4節 考 察

第4章において解明したpTHT15の薬剤耐性遺伝子のプロモーターおよび発現制御領域を用いて、枯草菌における分泌蛋白質遺伝子の発現制御系を構築した。まず、分泌蛋白質として枯草菌の $\alpha$ -アミラーゼを選びその遺伝子をB. subtilis 1A412株よりクローニングした。クローニングした遺伝子は、Yamazakiら<sup>66)</sup>がクローニングした $\alpha$ -アミラーゼ遺伝子に比べ3'側のSau3A Iサイトが一つ短い遺伝子であると考えられた。そこで、塩基配列を決定し比較したところ、2塩基対の欠失を除いて塩基配列は一致した。この欠失により我々がクローニングした $\alpha$ -アミラーゼはフレームシフトを起こしていると考えられた。推定されたアミノ酸配列から分子量57,650の $\alpha$ -アミラーゼを分泌生産すると考えられたが、実際にSDS-PAGEを行った結果からは分子量48,000であると示された。このことは、生産される $\alpha$ -アミラーゼがpUB110ヘリドスルーで読まれている部分の余分なアミノ酸配列をC末端部分に持つため、結果としてC末端部分の立体構造が不安定となり、自身のプロテアーゼによるアタックを受け易くしているものと考えられた<sup>74)</sup>。

次に、 $\alpha$ -アミラーゼ構造遺伝子部分をpIH4のTc耐性遺伝子のプロモーターおよび発現制御領域とターミネーターの間に挿入し、B.

subtilis 207-25株に導入した。そこ結果、予想通りTcによって $\alpha$ -アミラーゼ遺伝子の発現をコントロールできることが明かとなった。その発現のコントロールは培養の初期だけではなく安定期の初期においても可能なことから、菌体濃度が十分得られてから発現を開始できる。このことから、本発現制御系は菌にとって発現が有害である蛋白質を発現する場合にも極めて有用であると考えられる。ところで、薬剤による発現の制御が非常に高価であると一般に言われているが、発現の開始に必要なTcの濃度は500ng/μlと低濃度であり、しかもTcは最も安価な抗生物質の一つであることから、安価に発現を誘導できることが確認された。また、抗生物質を誘導物質として用いることから、使用する培地を制限しないことがもう一つの利点としてあげられる。すなわち、本発現制御系を用いることで、生産に適した培地条件下で発現のコントロールが可能となる。

枯草菌においても発現制御系は幾つか開発され、そのうち薬剤耐性遺伝子の発現制御部位を用いた系も構築されている。しかし、本章で行ったような枯草菌の分泌系で発現制御系を構築したのは著者が始めてである。また、Bacillus属細菌の発酵工業における役割はその高い分泌生産能にあり、この分泌生産能をいかに利用するかが遺伝子組換え技術によるBacillus属細菌の宿主・ベクター系に課せられた使命であると考えられる。このことから、枯草菌の分泌系で利用できる発現制御系構築は、今後のBacillus属細菌の遺伝子組換え利用において極めて有用であると考えられる。本章で構築したTcによる発現の制御が可能な分泌ベクターpMD391を利用し、 $\alpha$ -アミラーゼのシグナル配列遺伝子の下流に有用な蛋白質または生理活性ペプチドの遺伝子を連結することにより、これらの分泌生産が可能になると考えられる。今後は、B. stearothermophilusで以上の有

用性を確認し、利用できる系を広げていくと共に有用蛋白質などの生産に利用することが必要であると考えられる。また、実用レベルでの利用性を高めるために、プロモーターを強化し、高い生産レベルを達成することも必要になってくると思われる。

## 第5節 要約

1. B. subtilis 1A412株の $\alpha$ -アミラーゼ遺伝子をクローニングし、その塩基配列を決定した。その結果、これまで知られている $\alpha$ -アミラーゼ遺伝子の構造遺伝子と比較したところ、2塩基対の欠失を除いて一致した。
2. Tc<sup>r</sup>遺伝子のプロモーターおよび発現制御領域と $\alpha$ -アミラーゼ遺伝子の構造遺伝子部分を連結し、枯草菌を形質転換した。 $\alpha$ -アミラーゼ産生をTc添加により解析したところ、Tcを500ng/μl添加することにより $\alpha$ -アミラーゼ生産量が無添加の約15倍となることが確認され、 $\alpha$ -アミラーゼの発現がTcの添加によりコントロールできることが明かとなった。
3. Tcの誘導は、枯草菌の培養の初期後期を問わず行うことができることが明かとなり、この発現制御系が幅広い応用範囲を持つことが示唆された。

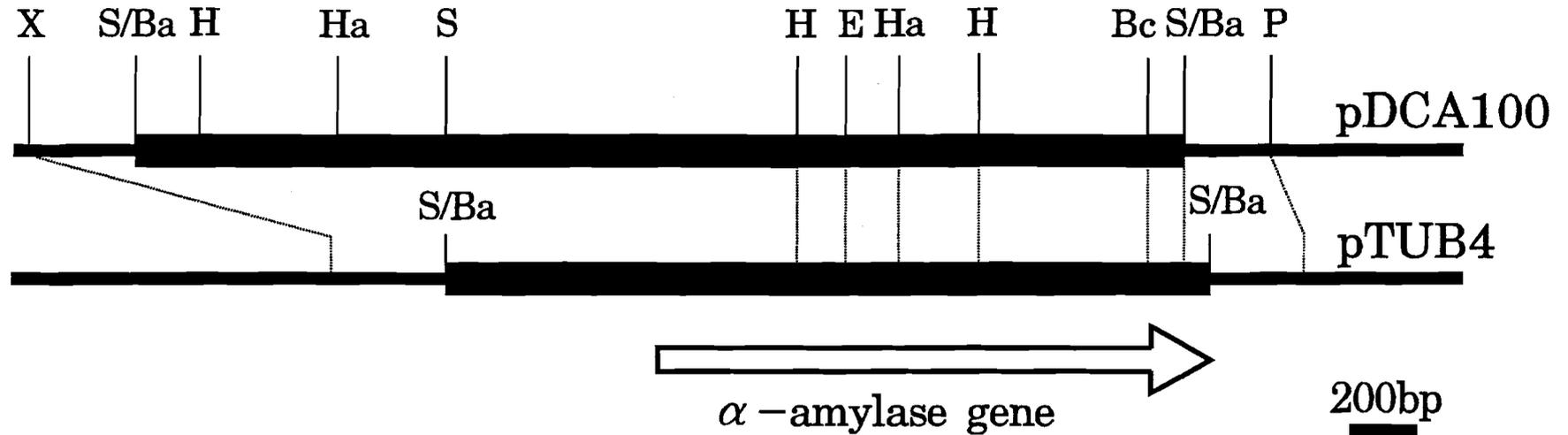


図5-1 pDCA100の制限酵素地図とpTUB4の $\alpha$ -アミラーゼとの比較

太線は挿入DNA、細線はpUB110部分を示す。Ba, BamHI; B, BclI; E, EcoRI; Ha, HaeIII; Hi, HincII; P, PvuII; Sau3AI。Sau3AI以外の制限酵素サイトは全て記載した。

1440  
 GCTGTGCTTTATCCTGATGATATTGCAAAGCGCCTCATGTTTTCCCTTGAGAATTACAAA  
 AlaValLeuTyrProAspAspIleAlaLysAlaProHisValPheLeuGluAsnTyrLys

1500  
 ACAGGTGTAACACATTCTTTCAATGATCAACTGACGATTACCTTGCGTGCAGATGCGAAT  
 ThrGlyValThrHisSerPheAsnAspGlnLeuThrIleThrLeuArgAlaAspAlaAsn

1560  
 ACAACAAAAGCCGTTTATCAATCAATAATGGACCAGAGACGGCGTTTAAGGATGGAGAT  
 ThrThrLysAlaValTyrGlnIleAsnAsnGlyProGluThrAlaPheLysAspGlyAsp

*Sau3AI/Bam*HI → pUB110 1620  
 CAATTCACAATCGGAAAAGGAGATCCAGTTGCTCAAAAAAATCTCGGTCAGATGTTACTA  
 GlnPheThrIleGlyLysGlyAspProValAlaGlnLysAsnLeuGlyGlnMetLeuLeu

1680  
 GCAACTCATTTACAAGAACAGCATCTTTCCTCGTTTTTCTTGTACCTGTTTTTTGTGATT  
 AlaThrHisLeuGlnGluGlnHisLeuSerSerPhePheLeuTyrLeuPhePheValIle

CAATAA  
 Gln\*\*\*

図5-2 *B. subtilis* 1A412株由来  $\alpha$ -アミラーゼ遺伝子の3'-部分の塩基配列とアミノ酸配列

塩基配列の番号は開始コドンATGから始まっている。pUB110のアミノ酸配列は、小文字で示した。2塩基の欠失部分は、▼で示し、pTUB4の塩基配列を記した。

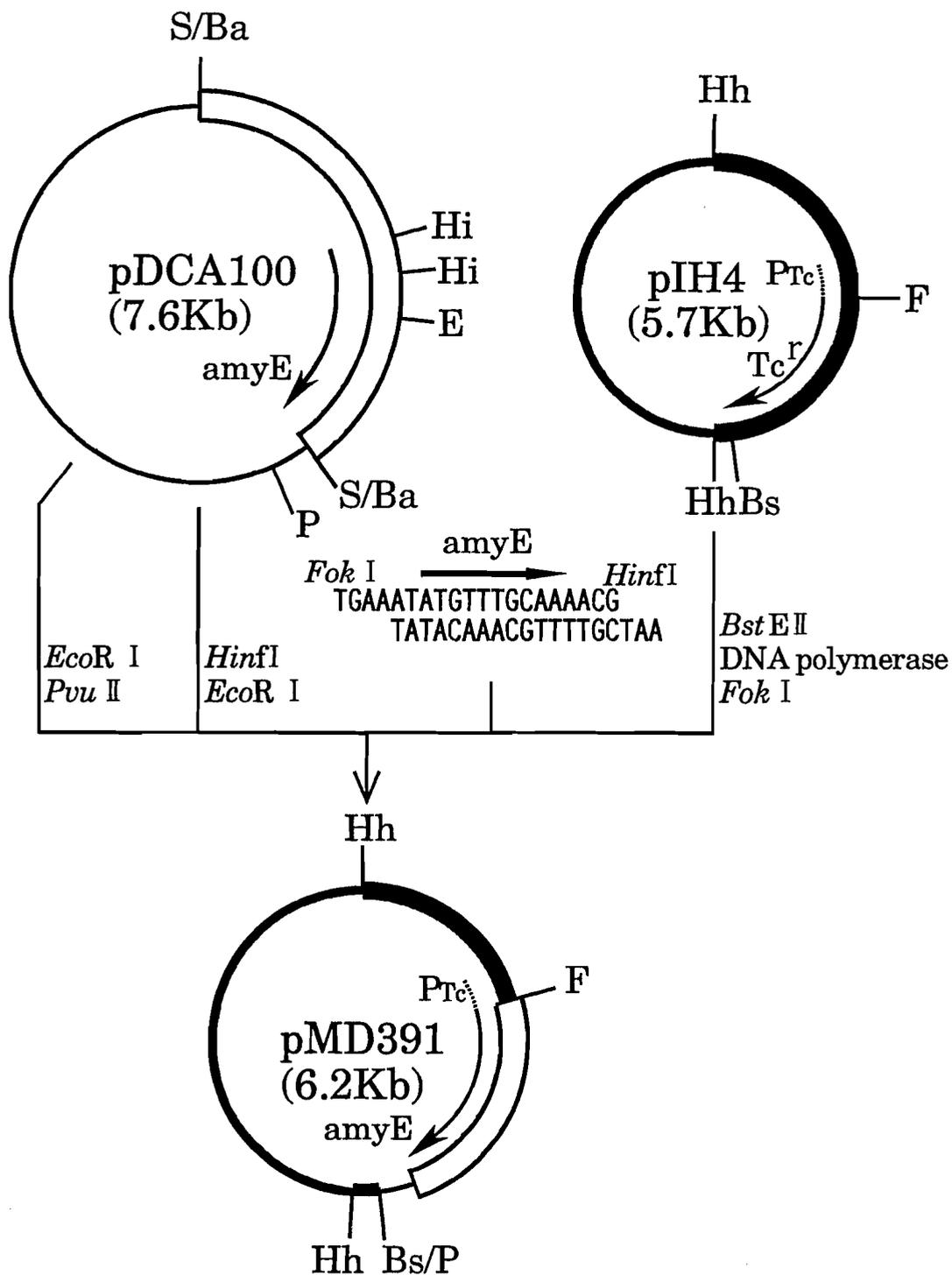


図 5 - 3  $\alpha$ -アミラーゼの発現制御可能な分泌ベクターの構築

□は pDCA100 の  $\alpha$ -アミラーゼ 遺伝子の挿入遺伝子部分を示す。■は、pTHT15 に由来する Tc<sup>r</sup> 遺伝子と複製開始点領域を示す。P<sub>Tc</sub> は、Tc<sup>r</sup> のプロモーター及びオペレーター遺伝子部分である。

Bs, BstE II ; E, EcoR I ; F, Fok I ; Hh, Hha I ; Hi, Hinf I ;

P, Pvu II ; S, Sau3A I

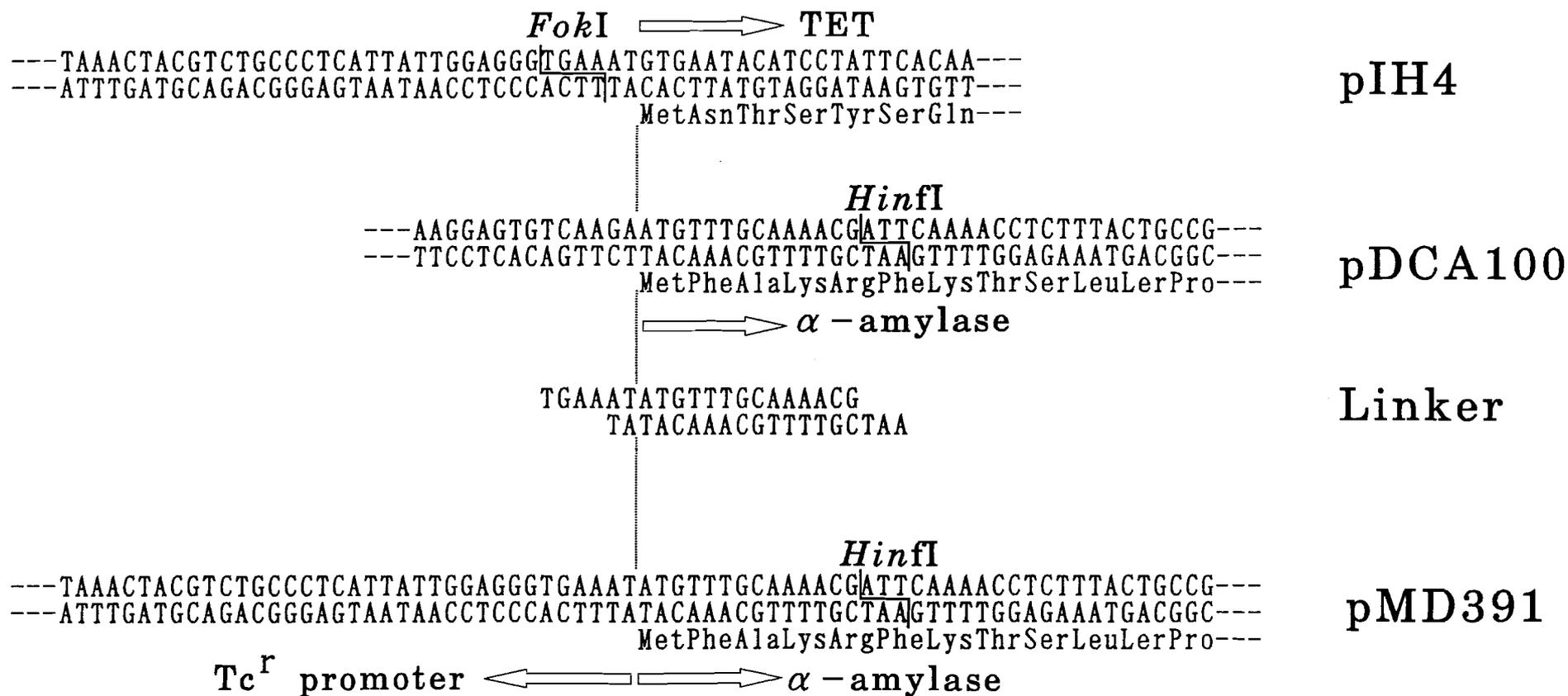


図5-4 pMD391の連結部分の塩基配列

LinkerをはさんでTc<sup>r</sup> promoterとα-amylase構造遺伝子を挿入配列無しに連結した。

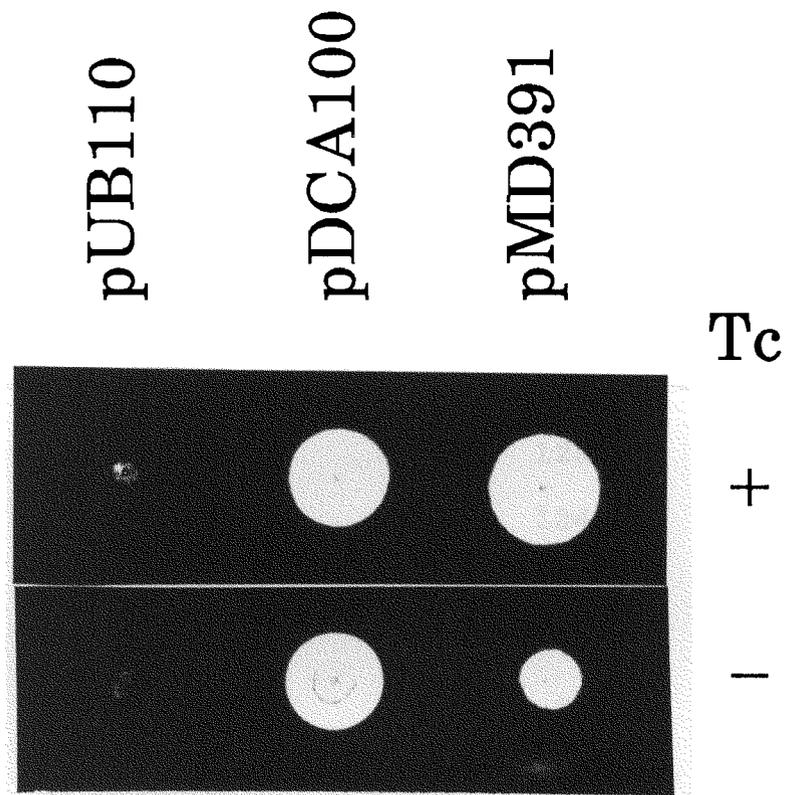


図 5 - 5 可溶性デンプンを含む寒天平板培地での  
 $\alpha$ -アミラーゼ生産の検出

pMD391、pDCA100、pUB110を有する *B. subtilis* 207-25株のコロニーを2%の可溶性デンプンを含むNY寒天平板培地にそれぞれ塗布した。誘導に用いたTcの濃度は500ng/μlである。

表 5 - 1 添加するTcの濃度による $\alpha$ -アミラーゼの誘導発現

Plasmid	Tc concn.(ng/ml)	$\alpha$ -Amylase activity(units/OD <sub>600</sub> ) <sup>a</sup>
pMD391	1000	123.1
	500	134.6
	100	68.1
	50	42.2
	10	22.2
	5	14.6
	0	8.0
	pDCA100	0

<sup>a</sup>菌体は表で示した濃度のTcを添加したNY培地で37°C12時間培養した。

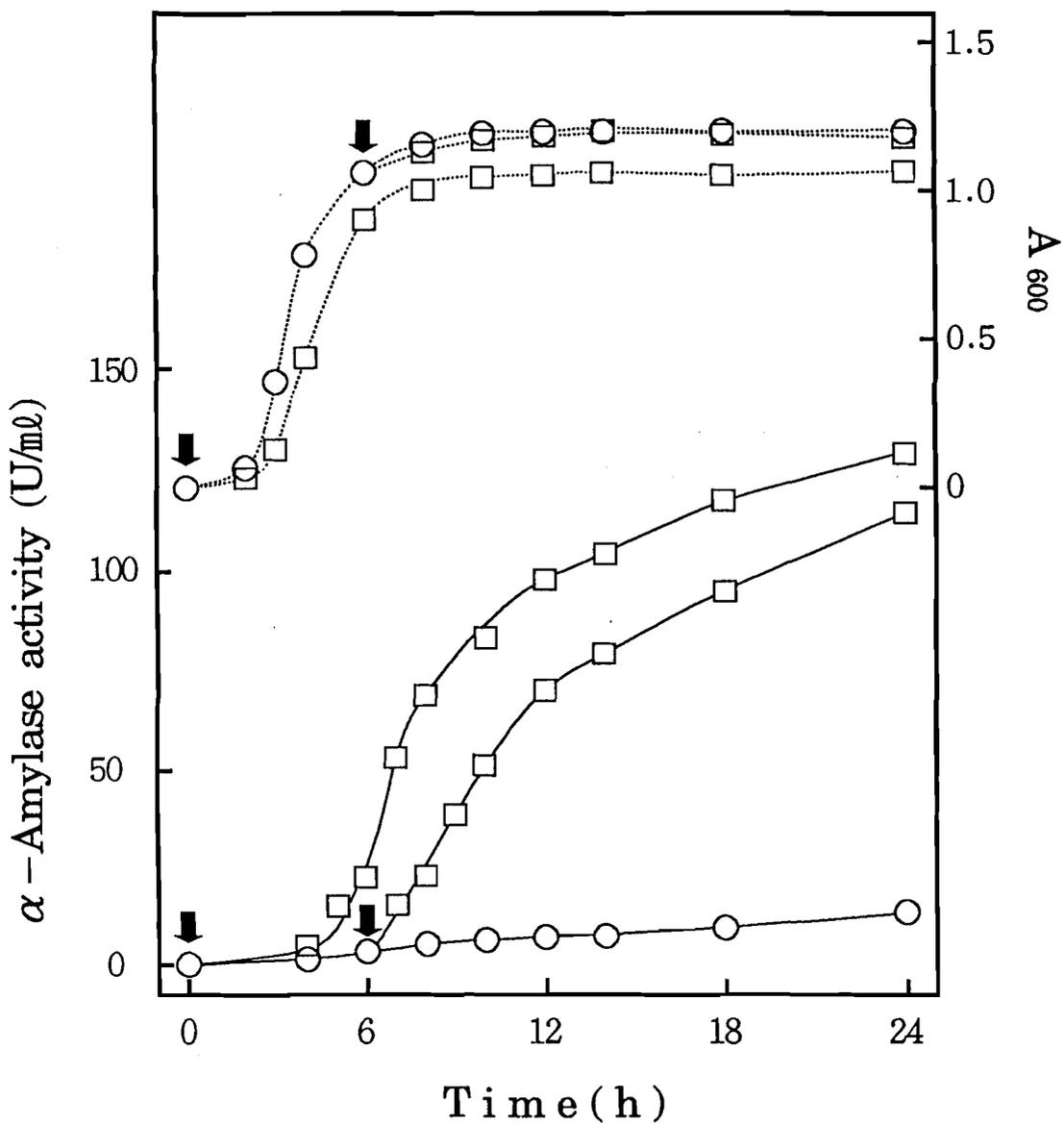


図5-6 pMD391を有する *B. subtilis* 207-25株の生育（点線）と $\alpha$ -アミラーゼの誘導生産（実線）

本菌はNY培地で培養し、その培養液を1/100希釈で500ng/mlのTcを添加または無添加のNY培地に植菌した。また、植菌後6時間後にTcを添加した（添加時期については矢印で示した）。□, Tc添加; ○, Tc無添加。培養上清を $\alpha$ -アミラーゼアッセイに用いた。菌体の生育は600nmでの吸光度を測定した。

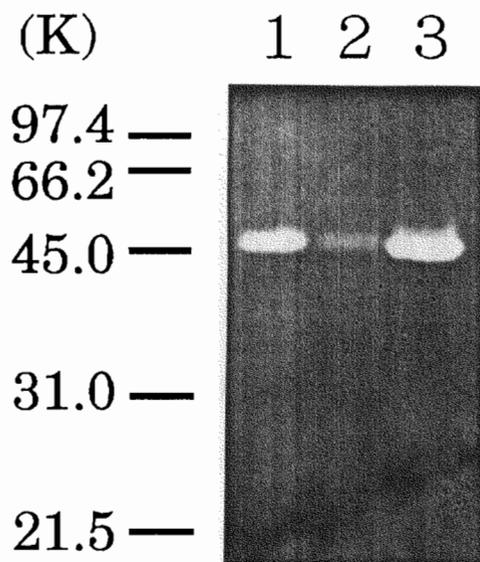


図5-7 pMD391またはpDCA100を有する *B. subtilis* の培養上清の SDS-PAGE  
 菌体を 500ng/μl の Tc の添加または無添加培地で 37℃ 14 時間培養した。12% の SDS-PAGE 後、活性染色した。レーン 1, Tc 添加培地で pDCA100 を有する *B. subtilis* 207-25 株を培養した培養上清。  
 ;レーン 2, 3, pMD391 を有する *B. subtilis* 207-25 株を 500ng/μl の Tc をそれぞれ無添加、添加培地で培養したときの培養上清。 矢印は、 $\alpha$ -アミラーゼの位置を示す。

## 総括

好熱性細菌は通常の生物が生育できない高温環境下（55℃以上）で生育し、かつ一般に高い増殖速度を示すことから、これに遺伝子操作技術を適用することができれば好熱性細菌はより利用性の高い宿主となる可能性がある。本論文は、このような観点から好熱性細菌 B. stearothermophilus で安定に保持され、マーカーである薬剤耐性遺伝子が発現可能なベクタープラスミドの開発を行い、全塩基配列が明かとなっている枯草菌とのシャトルベクターを構築した。さらに、枯草菌において Tc による分泌酵素の誘導発現を論じたものであり、ここで得られた結果は次のように総括することができる。

第1章では、種々の好熱性細菌についてプラスミドの検索を行い、B. subtilis の形質転換により薬剤耐性を担う2種のプラスミド pTHT15 及び pTHN1 を分離した。これらについて、基本的な性質検討を行い、詳細な制限酵素地図の作製と、それぞれの薬剤耐性遺伝子や複製開始点領域の位置を決定した。さらに、pTHT15 及び pTHN1 は共に B. stearothermophilus CU21 株での複製及び形質発現が可能であった。

第2章では、pTHT15、pTHN1、pUB110 間の遺伝子レベルでの相同性を調べ、pTHN1 と pUB110 の Km<sup>r</sup> 遺伝子部分、pTHT15 と pUB110 の複製開始点領域、及び3つのプラスミド間では細胞膜への結合領域と考えられる部分にそれぞれ高い相同性が認められた。また、pTHN1 の Km<sup>r</sup> 酵素が pUB110 のそれと同じ Km ヌクレオチジル転移酵素であることを明かとした。さらに、pUB110 と pTHT15 の B. subtilis 及び B. stearothermophilus でのコピー数を調べ、不和合性であることを確認した。

第3章では、B. subtilisとB. stearothermophilusでのプラスミド6種類の熱安定性と、形質発現の限界温度について調べた。B. subtilisにおいては、pUB110、pTHT15、pTHN1、pC194がその生育限界温度まで安定に保持され薬剤耐性遺伝子の発現が可能であったが、pTP4とpTP5は45℃以上で不安定であった。しかし、これらの不安定なプラスミドもpUB110と組換えプラスミドを作製し、pUB110の複製領域を用いることで安定化されることを明らかにした。次に、B. stearothermophilusにおいては、pC194、pUB110、pTHT15、pTHN1が形質転換可能であった。宿主内における安定性を検討したところ、pC194は55℃でほとんど宿主内から脱落したが、pTHN1は55℃まで、pUB110、pTHT15は60℃付近まで安定に保持された。しかし、pTP4およびpTP5は形質転換能を有しておらず、その薬剤耐性も発現できないことを明らかにした。また、pC194の複製開始点領域を熱安定なpTHT15の複製開始点領域に変換することで、安定化できることを示した。これらの結果を基に、B. subtilis、B. stearothermophilusの両方で複製発現可能で三つの薬剤に耐性なシャトルベクターpIH41およびpIH42を構築した。

第4章では、好熱菌由来プラスミドpTHT15のTc<sup>r</sup>遺伝子の全塩基配列を解明し、その構造遺伝子のオープンリーディングフレームと転写開始点を決定した。また、Tc<sup>r</sup>発現がTcによる誘導を受けることから、プロモーター部分における発現制御機構について考察を進め、mRNAによるトランスレショナリアテニュエーションモデルを提唱した。

第5章では、これらの発現制御を確かめ利用することを目的として、B. subtilisから $\alpha$ -アミラーゼ遺伝子をクローニングし、得られた $\alpha$ -アミラーゼ遺伝子の構造遺伝子部分をpTHT15のTc<sup>r</sup>遺伝子のプロモーターおよび発現制御領域に連結した。その結果、0.5 $\mu$ g/■のTc添加により培養の初期及び定常期の初期のいずれにおいても約15倍の分泌発現の制御が可能であることを確認した。

以上の諸結果から、本研究で構築したB. subtilisとB. stearo-thermophilus間の安定なシャトルベクターを利用することにより、好熱菌を宿主とする遺伝子操作が簡単に行うことが可能となった。また、枯草菌における分泌発現系での発現制御系を構築できたことは、遺伝子組換えした枯草菌の発酵生産への利用性を飛躍的に高めたと言える。

一般に、プラスミドをベクターとして利用する場合の理想的な条件として、1) 宿主内で自立的に複製する、2) 外来DNAの挿入可能な制限酵素切断点を複数個保持する、3) 選択マーカーを保持する、4) 分離調製が容易である、5) 分子量が小さい、6) 宿主域が広い、7) コピー数の外部因子による調節ができるなど<sup>75)</sup>があげられるが、本研究で発見、構築したプラスミドベクターはこれらの諸条件をほとんど満足していると言える。

ある種の遺伝子をクローン化した場合、遺伝子操作の工業的利用においてはその組換えプラスミドの安定性がきわめて重要である。また、プラスミドの不安定性の要因としてプラスミドDNAの脱落とプラスミドの部分的欠失が考えられる。前者の場合には、ベクタープ

ラスミドのマーカ-を利用して抗生物質などの薬剂存在下で培養することができればプラスミド脱落株の増殖を阻止し得るが、プラスミドの部分的欠失の場合には、安定なプラスミドをベクターとして用いる以外方法はない。B. subtilis 及び B. stearothermophilus で最も安定な pTHT15 の複製領域と薬剂耐性遺伝子を有する pTHT15、pIH4、pIH41、pIH42 を用いることで、両菌における安定なクローニングと発酵生産が可能となる。また、Tc<sup>r</sup> 遺伝子の発現制御部位は、 $\alpha$ -アミラーゼ等の分泌蛋白質遺伝子の発現をコントロールできることから、pIH4、pIH41、pIH42 を用いることにより蛋白質の分泌発現を制御することが可能である。

さらに、pMD391 の  $\alpha$ -アミラーゼのシグナル配列遺伝子の下流に他の有用蛋白質または生理活性ペプチド遺伝子を連結することにより、これらの有用物質の分泌生産を可能にし、それらの社会への供給が一段と進むものと期待する。

## 参 考 文 献

- 1) **Watanabe, T.** 1963. Infective heredity of multiple drug resistance in bacteria. *Bacterol. Rev.* **27**: 87-115.
- 2) **Lacey, R.W.** 1975. Antibiotic resistance plasmids of *Staphylococcus aureus* and their clinical importance. *Bacteriol. Rev.* **39**: 1-32.
- 3) **Radloff, R., W. Bauer, and J. Vinograd.** 1967. A dye-buoyant-density method for the detection and isolation of closed circular duplex DNA: the closed circular DNA in HeLa cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **57**: 1514-1521.
- 4) **Clewell, D.B.** 1972. Nature of ColE1 plasmid replication in *Escherichia coli* in the presence of chloramphenicol. *J. Bacterol.* **110**: 667-676.
- 5) **Morrow, J.F., and P. Berg.** 1972. Cleavage of Simian Virus 40 DNA at a unique site by a bacterial restriction enzyme. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **69**: 3365-4469.
- 6) **Smith, H.O., and K.W. Wilcox.** 1970. A restriction enzyme from *Haemophilus influenzae*. I. purification and general properties. *J. Mol. Biol.* **51**: 379-391.
- 7) **Weiss, B., A. Jacquemin-Sblon, T.R. Live, G.C. Fareed, and C.C. Richardson.** 1968. Enzymatic breakage and joining of deoxyribonucleic acid. VI. further purification and properties of polynucleotide ligase from *Escherichia coli* infected with bacteriophage T4. *J. Biol. Chem.* **243**: 4543-4555.
- 8) **Mandel, M., and A. Higa.** 1970. Calcium-dependent bacteriophage DNA infection. *J. Mol. Biol.* **53**: 159-162.
- 9) **Ehrlich, S.D.** 1977. Replication and expression of plasmids from *Staphylococcus aureus* in *Bacillus subtilis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **74**: 1670.
- 10) **Gryczan, T.J. and D. Dubnau.** 1978. Construction and properties of chimeric plasmids in *Bacillus subtilis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **75**: 1428-1432.
- 11) **Chang, S., and S.N. Cohen.** 1979. High frequency transformation of *Bacillus subtilis* protoplasts by plasmid DNA. *Mol. Gen. Genet.* **168**: 111-115.
- 12) **Hinnen, A., J.B. Hicks, and G.R. Frink.** 1978. Transformation of Yeast. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **75**: 1929-1933.
- 13) **Beggs, J.S.** 1978. Transformation of yeast by a replicating hybrid plasmid. *Nature (London)* **275**: 104-109.

- 14) **Struhl, K., S.T. Stinchcomb, S. Scherer, and R.W. Davis.** 1979. High-frequency transformation of yeast: autonomous replication of hybrid DNA molecules. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **76**: 1035-1039.
- 15) **Chater, K.F., S.A. Hopwood, T. Koeser, and C.J. Thompson.** 1982. Gene cloning in Streptomyces. *Curr. To. Microbiol. Immunol.* **96**: 69-95.
- 16) 大島 泰郎. 1978. 好熱性細菌. 東京大学出版会.
- 17) **Priest, f.G.** 1977. Extracellular enzymes synthesys in the genus Bacillus. *Bacteriol. Rev.* **41**: 711-753.
- 18) **Gibson, T., and R.E. Gordon.** 1974. Genus Bacillus , Chon 1972, 174, p.529-550. in R.E. Buchanan and N.E. Gibbons (ed.), *Bergey's manual of determinatibe bacteriology* , 8th ed. The Williams & Wilkins Co., Baltimore.
- 19) **Gordon, R.E., W.C. Haynes, and C.H.-N. Pang.** 1973. The genus Bacillus . In *Agriculture Handbook no.427*, US Department of Agriculture, Washington D.C..
- 20) **Imanaka, T., M. Fujii, I. Aramori, and S. Aiba.** 1982. Transformation of Bacillus stearothermophilus with plasmid DNA and characterization of shuttle vector plasmid between Bacillus stearothermophilus and Bacillus subtilis. *J. Bacteriol.* **149**: 824-830.
- 21) **Bringham, H.A., C.J. Bruton, and T. Atkinson.** 1979. Isolation and partial characterization of four plasmids antibiotic resistant thermophilc bacilli. *J. Gen. Microbiol.* **114**: 401-408.
- 22) **Uozumi, T., T. Hoshino, K. Miwa, S. Horinouchi, T. Beppu, and K. Arima.** 1977. Restriction and modification of bacteria with DNA from differnt species. Part I. *Molec. Gen. Genet.* **152**: 65-69.
- 23) **Gryczan, T.J, S. Contente, and D. Dubnau.** 1978. Characterization of Staphylococcus aureus plasmids introduced by transformation into Bacillus subtilis. *J. Bacteriol.* **134**: 318-329.
- 24) **Iordanescu, S.** 1975. Recombinant plasmid obtained from two different, compatible staphyrococcal plasmids. *J. Bacteriol.* **124**: 597-601.
- 25) **Kono, M., M. Sasatsu, and H. Hamashima.** 1978. Transformation of Bacillus subtilis with staphylococcal plasmid DNA. *Microbios Lett.* **5**: 55-59.
- 26) **Tanaka, T., and T. Koshikawa.** 1977. Isolation and characterization of four types of plasmids from Bacillus subtilis (natto). *J. Bacteriol.* **131**: 699-701.
- 27) **Horinouchi, S., and B. Weisblum.** 1982. Nucleotide sequence and

- function map of pC194, a plasmid that specifies inducible chloramphenicol resistance. *J. Bacteriol.* **150**: 815-825.
- 28) **Tanaka, T., M. Kuroda, and K. Sakaguchi.** 1977. Isolation and characterization of four plasmids from Bacillus subtilis. *J. Bacteriol.* **129**: 1487-1494.
- 29) **Lovett, P.S., and M.G. Bramucci.** 1975. Plasmid deoxyribonucleic acid in Bacillus subtilis and Bacillus pumilus. *J. Bacteriol.* **124**, 484-490.
- 30) **Burnhard, K., H. Schrempf, and W. Goebel.** 1978. Bacteriocin and antibiotic resistance plasmids in Bacillus cereus and Bacillus subtilis. *J. Bacteriol.* **133**: 897-903.
- 31) **Ehrlich, S.D.** 1977. Replication and expression of plasmids from Staphylococcus aureus in Bacillus subtilis. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* **74**: 1680-1682.
- 32) **Bringham, A.H.A., C.J. Bruton, and T. Atkinson.** 1980. Characterization of Bacillus stearothermophilus plasmid pAB124 and construction of deletion variants. *J. Gen. Microbiol.* **119**: 109-115.
- 33) **Imanaka, T., M. Fujii, and S. Aiba.** 1981. Isolation and characterization of antibiotic resistance plasmids from thermophilic bacilli and construction of deletion plasmids. *J. Bacteriol.* **146**: 1091-1097.
- 34) **Jalanko, A., I. Palva, and H. Soderlund.** 1981. Restriction maps of plasmids pUB110 and pBD9. *Gene.* **14**: 325-328.
- 35) **Polak, J., and R.P. Novick.** 1982. Closely related plasmids from Staphylococcus aureus and soil Bacilli. *Plasmid.* **7**: 152-162.
- 36) **Gryczan, T., S. Contente, and D. Dubnau.** 1978. Characterization of Staphylococcus aureus plasmids introduced by transformation into Bacillus subtilis. *J. Bacteriol.* **134**: 318-329.
- 37) **Shishido, K., N. Noguchi, C. Kim, and T. Ando.** 1983. Isolation of a tetracycline-resistance plasmid excised from a chromosomal DNA sequence in Bacillus subtilis. *Plasmid.* **10**: 224-234.
- 38) **Perkins, J.B., and P. Youngman.** 1983. Streptococcus plasmid pAM  $\alpha$  1  $\Delta$  1 is a composite of two separable replicons, one of which is closely related to Bacillus plasmid pUB110. *J. Bacteriol.* **155**: 607-615.
- 39) **Rigby, P.W., M. Dieckmann, C. Rodes, and P. Berg.** 1977. Labeling deoxyribonucleic acid to high specific activity in vitro by nick translation with DNA polymerase I. *J. Mol. Biol.* **98**: 503-517.
- 40) **Warnaar, S.O., and J.A. Cohen.** 1966. A quantitative assay for

- DNA-DNA hybrids using membrane filters. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **24**: 554-559.
- 41) **Projan, S.J., S. Carleton, and R.P. Novich.** 1983. Determination of plasmid copy number by fluorescence densitometry. *Plasmid.* **9**: 182-190.
- 42) **Jalanko, A., I. Palva, and H. Soderlund.** 1981. Restriction maps of plasmids pUB110 and pBD9. *Gene*, **14**: 325-328.
- 43) **Tanaka, T., and N. Sueoka.** 1983. Site-specific in vitro binding of plasmid pUB110 to Bacillus subtilis membrane fraction. *J. Bacteriol.* **154**: 1184-1194.
- 44) **Fujii, M., M. Takagi, T. Imanaka, and S. Aiba.** 1982. Molecular cloning of a thermostable neutral protease gene from Bacillus stearothermophilus in a vector plasmid and its expression in Bacillus stearothermophilus and Bacillus subtilis. *J. Bacteriol.* **154**: 831.
- 45) **Aiba, S., K. Kitai, and T. Imanaka.** 1983. *Appl. Env. Microbiol.*, **46**: 1059.
- 46) **Noguchi, N., K. Shishido, T. Ando, and M. Kono.** 1983, *Gene* **21**:105.
- 47) **Kono, M., N. Noguchi, and M. Sasatsu.** 1971. *Agric. Biol. Chem.*, **182**: 279.
- 48) **Khan, S.A., and R.P. Novick.** 1983. Complete nucleotide sequence of pT181, a tetracycline-resistance plasmid from Staphylococcus aureus. *Plasmid* **10**:251-259.
- 49) **Horinouch, S., and B. Weisblum.** 1980. Posttranscriptional modification of mRNA conformation: mechanism that regulates erythromycin-induced resistance. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **77**: 7079-7083.
- 50) **Gryczan, T.J., G. Grandi, J. Hahn, R. Grandi, and D. Dubnau.** 1980. Conformational alternation of mRNA structure and the posttranscriptional regulation of erythromycin-induced drug resistance. *Nucl. Acids Res.* **8**: 6081-6097.
- 51) **Shivakumar, A.G., J. Hahn, G. Grandi, Y. Kozov, and D. Dubnau.** 1980. Posttranscriptional regulation of an erythromycin resistance protein specified by plasmid pE194. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **77**: 3903-3907.
- 52) **Maxam, A.M., and W. Gilbert.** 1980. Sequencing end-labeling DNA with base-specific chemical cleavage. *Methods in Enzymology.* **65**: 499-560.
- 53) **Messing, J., R. Crea, and P.H. Seeberg.** 1981. A system for shotgun DNA sequencing. *Nucl. Acids Res.* **9**: 309-321.

- 54) **Norrande, J., T. Kempe, and J. Messing.** 1983. Construction of improved M13 vectors using oligodeoxynucleotide-directed mutagenesis. *Gene*. **26**: 101-106.
- 55) **Sanger, F., S. Nicklen, and A. R. Coulson.** 1977. DNA Sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **74**: 5463-5467.
- 56) **Gage, L. P., and E. P. Geiduschek.** 1971. RNA synthesis during bacteriophage SP01 development: six classes of SP01 RNA. *J. Mol. Biol.* **57**: 279-300.
- 57) **Maniatis, T., E. F. Fritsch, and J. Sambrook.** 1982. *Molecular Cloning a laboratory manual.* Cold Spring Harbor Laboratory.
- 58) **Kite, J., and R. F. Doolittle.** 1982. *J. Mol. Biol.* **157**: 105-132.
- 59) **Sornar-Webb, B., and R. H. Reeder.** 1979. The nucleotide sequence of the initiation and termination sites for ribosomal RNA transcription in *X. laevis*. *Cell* **18**: 485-499.
- 60) **Rosenberg, M., and S. Court.** 1979. Regulatory sequences involved in the promotion and termination of RNA transcription. *Annu. Rev. Genet.* **13**: 319-353.
- 61) **Moran Jr, C. P., N. Lang, S. F. J. LeGrice, G. Lee, M. Stephens, A. L. Sonenshein, J. Pero and R. Losick.** 1982. Nucleotide sequences that signal the initiation of transcription and translation in *Bacillus subtilis*. *Mol. Gen. Genet.* **186**: 339-346.
- 62) **Tinoco, jun I., P. N. Borer, B. Dengler, and M. D. Levine.** 1973. Improved estimation of secondary structure in ribonucleic acids. *Nature (London)* **246**: 40-41.
- 63) **Eccles, S. J., and I. Chopra.** 1984. Biochemical and genetic characterization of the *tet* determinant of *Bacillus* plasmid pAB124. *J. Bacteriol.* **158**: 134-140.
- 64) **Perkins, J. B. and P. Youngman.** 1983. *Streptococcus* plasmid pAMa1 is a composite of two separable replicons, one of which is closely related to *Bacillus* plasmid pBC16. *J. Bacteriol.* **155**: 607-615.
- 65) **Peden, K. W. C.** 1983. Revised sequence of the tetracycline-resistance gene of pBR322. *Gene* **22**: 101-106.
- 66) **Nguyen, T. T., K. Postle and K. P. Bertrand.** 1983. Sequence homology between the tetracycline-resistance determinants of Tn10 and pBR322. *Gene* **25**: 83-92.
- 67) **Hardy, K., S. Stahl, and H. Kupper.** 1981. Production in *B. subtilis* of hepatitis B core antigen and major antigen of foot and mouth disease virus. *Nature* **293**: 481-483.

- 68) Duvall, E.J., D.M. Williams, P.S. Lovett, N. Vasantha, and M. Guyer. Chloramphenicol-inducible gene expression in Bacillus subtilis. Gene **24**: 171-177.
- 69) Saito, H., and K. Miura. 1963. Biochem. Biophys. Acta. **72**: 619.
- 70) H. Fuwa. 1954. A new method for microdetermination of amylase activity by the use of amylose as the substrate. J. Biochem. **41**: 583-603.
- 71) Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature **227**: 680-685.
- 72) Lacks, S.A. and S.S. Springhorn. 1980. Renaturation of enzymes after polyacrylamide gel electrophoresis on the presence of sodium dodecyl sulfate. J. Biol. Chem. **255**: 7467-7473.
- 73) Yamazaki, H., K. Ohmura, A. Nakayama, T. Iwachi, K. Otozai, M. Yamasaki, G. Tamura, and K. Yamane. 1983.  $\alpha$ -Amylase genes (amyR2 and amyE<sup>+</sup>) from an  $\alpha$ -amylase hyperproducing Bacillus subtilis strain: Molecular Cloning and Nucleotide Sequences. J. Bacteriol. **156**: 327-337.
- 74) 今中忠行、他. 公開特許公報 平 2-222678.
- 75) 高木康敬. (編). 1980. 遺伝子操作実験法. 講談社.

## 謝 辞

本研究を行うに際し、終始懇切なる御指導と御鞭撻を賜りました神戸大学農学部・新家龍教授ならびに筑波大学応用生物化学系・星野貴行助教授に深甚なる感謝の意を表します。また、本研究を推進する過程において適切なる御助言を持って御指導いただきました通産省工技院微生物工業技術研究所機能開発部・富塚登部長、九州大学農学部・古川謙介助教授に深謝いたします。

本論文を作製する際に、有益なる御助言、御教示を賜りました神戸大学教養部・湯木昭八郎教授ならびに農学部・大川秀郎教授に感謝の意を表します。

本研究の過程において、菌株の分譲と御助言を賜りました筑波大学生物科学系・山根國男教授、大阪大学工学部・今中忠行教授に感謝いたします。さらに、様々な研究の便宜を図っていただきましたダイセル化学工業(株)総合研究所アクア研究所・森永豪所長ならびに筑波研究所・河田直紀博士、木村仁博士をはじめとする方々、本研究に御協力下さいました、成島裕之氏、相馬明氏、山崎久人氏、山下邦彦氏に感謝の意を表します。

## 本論文に関係のある主な報告

1. Isolation and characterization of antibiotic-resistance plasmids in thermophilic bacilli.  
Can. J. Microbiol., Vol. 31. No. 4 , 1985年4月
2. Genetic relationship between pUB110 and antibiotic-resistant plasmids obtained from thermophilic bacilli.  
Can. J. Microbiol., Vol. 31, No. 7, 1985年7月
3. Temperature dependency of plasmid maintenance and gene expression in Bacillus subtilis and Bacillus stearothermophilus.  
Report of the Fermentation Research Institute, Japan,  
No. 64, 1985年9月
4. Nucleotide sequence of the tetracycline resistance gene of pTHT15, a thermophilic Bacillus plasmids: comparison with staphylococcal Tc<sup>R</sup> controls.  
Gene, Vol. 37, 1985年7月
5. The tetracycline inducible expression of  $\alpha$ -amylase in Bacillus subtilis.  
J. Ferment. Bioeng., Vol. 74, No. 1, 1992年7月