枯草菌プラスミドを使った枯草菌遺伝子操作系の開発†

(昭和 57 年度農芸化学奨励賞受賞)

田 中 暉 夫

(三菱化成生命科学研究所)

枯草菌は大腸菌に次いで遺伝学的によく性質の調べられた菌で、グラム陽性菌に属する土壌細菌であり、胞子を形成し、種々の菌体外酵素を出す菌として知られている。この菌に遺伝子操作系を確立することによって枯草菌における遺伝生化学的研究が可能となり、また、非病原性で安全性が高いという面からいって応用微生物的研究が可能となりつつある。大腸菌を使って最初に開発されたこの遺伝子操作技術によって、すでに原核生物や真核生物の遺伝子発現のメカニズムの解明や、ホルモンをはじめとする有用ペプチドの生産に役立っている^(1,2)が、1975年当時安全性の面から問題にされ自主規制を余儀なくされた。われわれはこの時期に大腸菌にとってかわるべき人体に寄生性がなく安全性の高いと考えられる宿主菌として枯草菌を選んで遺伝子操作系を作ることを開始した。枯草菌(*Bacillus subtilis*)を宿主として遺伝子操作を行う利点はすでにいくつかの論文にも記載されているが、いくつかを例示すれば次のようになる。基礎的には、原核生物の分化と考えられるバチルス系に属する菌が有する胞子形成能の解明や、異種の遺伝子の枯草菌内での発現の可否を調べることによって種間の基本的な遺伝子発現の差を研究すること、応用的には大腸菌で問題となるエンドトキシンがないため工業的利用の宿主となるよい候補者である。

われわれがこの研究を始めた当時の 1975 年には、枯草菌のプラスミドは 1 つも知られておらず、まず、プラスミドの検索から開始した。ここではプラスミドベクターの作製と筆者の実験結果を通じて得た宿主の問題点な

どを述べてみたい。

I. プラスミドの単離とベクターの作製

タイプカルチャーから集めた *B. subtilis* に属する菌株 37 株を CsCl-Ethidium bromide 法でプラスミドの存否を調べたところ 14 株にプラスミドの存在を発見し、合計 22 個のプラスミドとなった。これらのプラスミドを分子量および数種類の制限酵素による切断パターンの比較から大きく分けて 7 種類に分類した^(3,4)。これらのプラスミドに関して特徴的なことは、制限酵素の切断パターンに差が認められないプラスミド pLS 11 と pLS 12 が *B. subtilis* 168 のマーカーを形質転換できる DNA を持つ宿主 (pLS 12 の宿主) とできない DNA を持つ宿主 (pLS 11 を持つ宿主) から見出されたことである⁽⁵⁾。形質転換ができるできないは DNA が *B. subtilis* 168 の染色体 DNA と相同性があるか否かにかかわっている。したがってこの事実は pLS 11 と pLS 12 を持つ菌は *B. subtilis* 168 に近縁であるなしを物語っていると思われ、同一と考えられるプラスミド pLS 11 と pLS 12 が両菌株に存在するというはこのプラスミドは宿主特異性の低いことを示唆している。もう一つの特徴は、納豆菌 (枯草菌に属し表 1 で IFO 3009 から IAM 1163 までの 10 株) では大小 1 つずつのプラスミドを持つ菌が多いが (表 1)、大きいほうのプラスミド (pLS 16, 18, 20, 23, 25, 27, 29, 31) は EcoRI で切ったパターンが多数のバンドを与え、そのうちのいくつかのバンドが大きくなったり小さくなったりしている (未発表) が基本的なパターンには変りがない。しかし、小さいほうのプラスミド (pLS 15, 17, 19, 21, 22, 24, 26, 28, 30) は分子量と制限酵素により 2 つに分類でき、その 2 つのグループ同士は、制限酵素のパターン

† Gene Cloning System in *Bacillus subtilis* Using *B. subtilis* Plasmids.
Teruo TANAKA (Mitsubishi-Kasei Institute of Life Sciences, Minamioya, Machida, Tokyo 194)

表 1 枯草菌プラスミド^(3,4)

菌 株	プラスミド	分子量 ^a	コピー数 ^b	No. of cleavage sites		
				EcoRI	BamNI	HindIII
IFO 3022	pLS 11	5.4	7	1	1	5
IFO 3215	pLS 12	5.4	5	1	1	5
IAM 1232	pLS 13	4.9	10	4	0	3
IAM 1261	pLS 14	5.3	7	3	0	4
IFO 3009	pLS 15	3.6	5	1	2	4
	pLS 16	33	0.5	16	5	—
IFO 3013	pLS 17	3.6	6	1	2	4
	pLS 18	33	0.9	15	3	—
IFO 3335	pLS 19	3.6	4	1	2	4
	pLS 20	34	0.4	17	4	—
IFO 3935	pLS 21	3.6	4	1	2	4
IFO 13169	pLS 22	3.6	4	1	2	4
	pLS 23	34	0.7	16	4	—
IAM 1143	pLS 24	3.6	3	1	2	4
	pLS 25	31	0.7	16	4	—
IMA 1207	pLS 26	3.6	4	1	2	4
	pLS 27	33	0.6	16	4	—
IMA 1114	pLS 28	4.0	5	2	1	5
	pLS 29	35	0.6	17	5	—
IAM 1168	pLS 30	4.0	3	2	1	5
	pLS 31	32	0.7	16	4	—
IAM 1163	pLS 32	46	0.9	20	9	—

^a メガダルトン, ^b クロソーム当り.

が相互に非常に異なっている(表1). これはこれら納豆菌の進化の過程で, 最初に大きいプラスミドが入っている菌に2つのグループに属する小さいプラスミドが入ったものか, またはその逆が過去において起ったものであろう. 大きいプラスミドが多く菌株に存在することは性因子的な役割をしているのかもしれない. IFO 3936には小さいプラスミドしかなく大きいプラスミドの入る前の段階なのかもしれない.

これら枯草菌プラスミドは調べた範囲での薬剤(ストレプトマイシン, テトラサイクリン, アンピシリン, HgCl₂)に対して耐性を示さず, バクテリオシン産生能を持っておらず, したがってベクターと使用するには選択マーカーを付加する必要がある. プラスミドスクリーニングの過程で Lovett 等⁽⁵⁾が2つの枯草菌プラスミドを報告し, その後, 次々と発見されている⁽⁶⁻⁸⁾. すべてのプラスミドは現在のところ機能不明である. 最近納豆菌が分泌する粘質物がプラスミドの支配下にあるという興味ある報告がなされている⁽⁹⁾.

筆者らはクローニングの安全性を考えて, 食用に供されてきた納豆菌由来のプラスミドを選んで, ベクターに

利用することにした. pLS 28 を EcoRI で切断し, ここに長張ら⁽¹⁰⁾がクローンした *B. subtilis* 168 由来のロイシン遺伝子を含む DNA 断片をつなぎ, *B. subtilis* MI 112 arg⁻leu⁻thr⁻r⁻m⁻recE 4 に導入した. この菌株は魚住らによってとられた制限修飾系を欠いた株 *B. subtilis* RM 125⁽¹¹⁾に *recE* 4 を導入した株で, *recE* 4 存在下では供与 DNA が宿主 DNA と相溶性があっても宿主に組み込まれることはない⁽¹²⁾. *B. subtilis* MI 112 に形質転換後2つの Leu⁺ のコロニーを得, その内の1つのコロニーから pLS 102 と pLS 103 を得た⁽²³⁾. pLS 102 は *leu*⁺ を含む EcoRI のフラグメントが同方向に繰り返しているものであり, pLS 103 はその内の1つが失われている. 後に述べるようにこれらのプラスミドは *B. subtilis* 168 株による制限を著しく受ける. 魚住らの制限修飾系を欠いた変異株は大いに役立ったわけである. pLS 102 を持っている菌はロイシンのない培地で生育が早く, また, 分子内で組換えを起こして *leu*⁺ を含んだ EcoRI フラグメントが1つになった pLS 103 を生ずる(図1). Hind III で部分消化して作ったプラスミド pLS 107 は pLS 103 の右側の EcoRI site を失

図1 *leu*⁺ 遺伝子を含むプラスミド⁽²³⁾

プラスミドの周りの数字は各断片の分子量(メガダルトン)を示す。太い線, 細い線はそれぞれベクター部分, *leu*⁺ 部分を含む DNA 部分を示す。Hind III の切断部位は円の内部に示してある。点線より下のプラスミドは *E. coli* の中で作られた。

っている(図1)が, pLS 107 の EcoRI site に pBR 322 を挿入する(pLS 207~pLS 209)とこのプラスミドに乗っている *leu*C と *leu*B の遺伝子(図2)の発現がおさえられ, BamHI site に pBR 322 を挿入する(pLS 202~pLS206)と *leu* B の活性がなくなるが *leu* C は生き残る。これらの事実は遺伝子の読みが A→C→B の順に発現することを示唆しており Zahler ら⁽¹³⁾ の遺伝学的方法の結果を裏づけている。

さて, 表現形質がロイシン合成酵素のみのベクターでは, 宿主として使用する菌が *Leu*⁻ の菌でなくてはならないので, ベクターとして pLS 103 あるいは pLS 107 には限界がある。あくまで枯草菌由来の安全性の高いベクターを作ることを目的としていたので, 形質転換コロニーの検出に強力な手段となる薬剤耐性遺伝子を枯草菌由来で実験室的に作られたトリメトプリム耐性(*Tmp*^R)⁽¹⁴⁾ を選んだ。Tnp は原核細胞のジヒドロ葉酸還元酵素(DHFR)を特異的に阻害する薬剤である。Tnp に耐性の DHFR を生産する株 *B. subtilis* TTK 24⁽¹⁴⁾ の DNA を EcoRI で切断し pBR 322 にまず挿入して *Tmp*^R のプラスミドを得た。一方, pLS 103 を EcoRI* 処理で左側の EcoRI site を除去したプラスミド pLL 10 を作製し, クローンした *Tmp*^R の EcoRI 断片と結合させたプラスミド pTL 10 を得た(図3)⁽²⁴⁾。このあと2つのステップを踏んで PTL 12 を得た。pTL 12 に含まれるロイシンのマーカーを図2に示す。pTL 12 は *Leu*B⁺*Tmp*^R を示すプラスミドであり, XmaI, BamHI, EcoRI および BglII により一カ所で切断される(図3)。Leu⁺ の表現型は BamHI と XmaI site に DNA を挿入すると失われ *Leu*⁻*Tmp*^R となるので DNA が入ったか否か容易に判定することができる。EcoRI と BglII site に DNA が入ったプラスミドは *Tmp* に対する耐

図2 pLS 103 および pTL 12 に含まれる *leu* 遺伝子領域⁽²⁹⁾
カッコ内の数字は分子量(メガダルトン)を示す。

図3 *leu*⁺ プラスミド (pLL 10) および *leu*⁺*tmp*⁺ プラスミド (pTL シリーズ) の作製⁽²⁴⁾

カッコ内は分子量(メガダルトン)。pLL 10 の斜線部分は pLS 103 由来の EcoRI* 断片が pLS 103 の右側の EcoRI site に入り込んだことを示す。

性は失われないが、DNA が BglII に入ったときには Tmp への耐性の程度が影響を受ける。最近 Myoda により pTL 12 には *thyB*⁺ が乗っていることが示された⁽¹⁵⁾。pTL 12 を使ってプロトプラストによる形質転換法⁽¹⁶⁾を利用できる。

現在では枯草菌由来のプラスミド以外にも *B. cereus*⁽¹⁷⁾ や *Staphylococcus aureus*⁽¹⁸⁾ 由来のプラスミドがベクターとして使用されている。

II. 宿主による制限修飾

クローニングに用いる菌は安全性、宿主による制限、

欠失を生ずる組換えなど組換え DNA 実験に不都合な問題が解決されねばならない。われわれの用いている菌は先に述べた制限修飾系を欠いた *B. subtilis* MI 112 であるが、この菌株がプラスミドによる形質転換に対して有利か否かを検討した。*S. aureus* あるいは *B. cereus* 由来の薬剤耐性因子を使用した実験では、これらのプラスミドをもとの宿主からとり *B. subtilis* 168 に形質転換した場合の形質転換の頻度は、いったん *B. subtilis* 168 に形質転換して導入したプラスミドを使った場合に比べて 1~1/50 に下がることが観察され^(7,19,20)、これは *B. subtilis* 168 による制限であろうと考えられた。しかし、Canosi ら⁽²¹⁾は形質転換はプラスミドが monomer では形質転換活性はなく、multimeric form のみが活性を持つと報告した。それゆえ、上に述べた形質転換効率の低下は、各宿主からプラスミドを単離したときのプラスミド DNA の形を反映しているのか、それとも宿主によるプラスミド形質転換に対する制限なのかははっきりしなかった。したがって形質転換効率の差が制限の問題なのか否かはプラスミドの構造が無視しうる条件でなされねばならない。

筆者は *leu*⁺ のプラスミド pLS 102 あるいは pLS 103 を制限に関して野性株と制限修飾系を欠いた株からそれぞれ単離し、これを使って再び野性株と変異株に形質転換してその形質転換の頻度を比べてみた⁽²²⁾。表 2 に示すように制限修飾系を欠いた株 (*r_M⁻m_M⁻*) からとられたプラスミドを用いて形質転換した場合、野性株への形質転換効率は約 1/1000 に低下することが見出されたが、野性株からとられたプラスミドを用いて同様の実験を行うとこのような現象は見られない。すなわちプラスミドを用いた *B. subtilis* 168 の形質転換に、制限修飾系が影響を及ぼすことが明らかとなった。種々のファージを用いた実験によると *B. subtilis* 168 による制限修飾はあまり強くない^(11,25)。また先に述べた *S. aureus* や *B. cereus* のプラスミドによる形質転換効率が 1/50 に低下する現象が制限によるものとしてみても強い制限ではない。Canosi ら⁽²⁵⁾は DNA が *B. subtilis* で制限を受けるには 1 つの DNA 分子の中に restriction site が 1 つではほとんど制限を受けず、いくつか存在して初めて強く制限を受けると報告している。pLS 103 や pLS 102 には restriction site がいくつかあってこのように強く制限を受けるのかもしれない。いずれにしても pLS 102 や pLS 103 のように強く制限を受けるプラスミドもあ

表 2 制限・修飾系を持つ菌と持たない菌から調製されプラスミドによる形質転換頻度⁽²²⁾

Recipient	Leu ⁺ 形質転換コロニーの数			
	pLS 102 & pLS 103		pLS 102 & pLS 103-MT 128	
	Large colonies	Small colonies	Large colonies	Small colonies
MT 120 (<i>r_M⁻m_M⁻, recE4</i>)	41,500(1)	166,000(1)	9,300(1)	36,000(1)
MT 128 (<i>r_M⁺m_M⁺, recE4</i>)	25(6×10^{-4})	220(1.3×10^{-3})	8,800(9.5×10^{-1})	36,000(1)

pLS 102 & pLS 103-X は pLS 102 および pLS 103 を X 株から得たプラスミドである。pLS 102 は大きいコロニーを pLS 103 は小さいコロニーをそれぞれ与える。カッコ内は相対的な形質転換効率である。

図 4 *leu*⁺ の一部 (2.6 メガダルトン) が同方向に繰り返しているプラスミド pLS 104⁽²⁶⁾

矢印は繰返し部分を示している。内円は Hind III の切断部位、ΔB、ΔC は HindIII B および C の一部であることを示す。

るので、制限活性を欠いた RM 125 株のような株を用いたほうがクローニングには有用であろう。

III. *recE4* 変異株内における DNA 相同部分間の組換え

組換え DNA 実験において、細胞内プラスミドに宿主染色体と相同部分があってプラスミドが組み込まれてしまったりあるいは、プラスミド上で欠失が起きて DNA の一部が除かれてしまうのは好ましくない。これを防ぐには組換え能欠損株が必須である。

枯草菌において当初組換え能欠損変異株として *recE4* 株が有望と思われた。なぜなら *recE4* 以外の組換え能変異株では、外から加えた DNA が形質転換によって宿主クロモソームに効率は野性株に比べて低いけれども組み込まれてしまうのに対して、*recE4* 変異株では外から加えた DNA に相同部分があっても宿主クロモソームに組み込まれず形質転換が検出されないからである⁽¹²⁾。pTL 12 は宿主と相同の DNA 領域を持っているが、宿主がこの *recE4* を持っている MI 112 株のクロモソームには組み込まれない、すなわち *recE4* 株では2つのレプリコン間での組換えは無視しうる。しかしながら筆

図 5 *B. subtilis recE4* 株内で生ずる *leu*⁺ プラスミドの組換え⁽²⁶⁾

leu⁺ 領域を含む 2.6 メガダルトンの繰返し DNA 部位を弧で示す。矢印は組換えの方向を示す。

者らの得た pLS 102 は高頻度で *recE4* 株中で組換えを起して pLS 103 になってしまう (図 1)。pLS 103 を調製している過程で、pLS 103 の内 *leu*⁺ 遺伝子の一部 (2.6 メガダルトン) が同方向に繰り返した DNA 領域を持つ pLS 104 を、偶然見出した (図 4) が、これも *recE4* 変異株中で高頻度に pLS 103 を生ずる。pLS 104 から *leu*⁺ を含む 2.6 Md DNA 領域が、3つも4つも繰り返したプラスミドが生ずることも観察した (図 5)。これは一部の薬剤耐性因子が、薬剤の濃度に応じて耐性部分の遺伝子数を増幅させ薬剤に打ち勝つ現象⁽²⁷⁾に類

似しているが、この現象は増幅される DNA 部分の両側に特殊な DNA の配列の存在が必要である。調べた限りでは pLS 104 の場合、繰り返している 2.6 Md の両端にはこのような特殊な配列の存在は認められなかった⁽²⁶⁾。したがって、*recE4* 株のなかでも同一分子内に繰り返しの配列がある場合には、組換えを起こし、欠失を起こしたプラスミドが生ずると考えられる。

さらに *recE4* 株では 2 つのレプリコン間の組み換えは無視しうると記したが、分子間の組換えもごくまれに起ると思われる。pLS 103 を持つ *leu⁻recE4* 細胞は、通常ロイシンの入っていない培地では生育が遅く、小さいコロニーを作るが、まれに生育の速い大きなコロニーを作る細胞が出現する(未発表)。この細胞はプラスミドを持っていないが、*recE4* 株の特徴であるマイトマイシン C の感受性が失われていないので、野性株にもどったのではない。したがって *recE4* 中でも pLS 103 が、あるいは一部が宿主クロモソームに組み込まれて *Leu⁺* となり生育が早くなったものと思われる。pLS 102 を持つコロニーをロイシンの入っていないプレートにストリークすると、pLS 102 を持つコロニーと pLS 103 を持つコロニーが約 1:5 の割合で生じてくる⁽²³⁾ので、分子内で起る組換え頻度は非常に高いと考えられる。Keggins ら⁽²⁸⁾は *recE4* cell 内に相同部分を持つ 2 つのプラスミドを導入し 460 個のコロニーを調べた限り、このプラスミド間では組換えが起きないと報告している。これは調べたコロニーの数が少なすぎて組換えを観察できなかったものと思われる。いずれにせよ分子内に相同部分があると DNA の一部が失われるので新たに組換え能変異株を探す必要がある。

IV. 宿主 DNA 変異のプラスミド上への転位

rec⁺ 菌では同一細胞内に存在する 2 つの不和合性のないプラスミドに相同部分がある場合相同部分間に組換えを起こしたプラスミドが出現する⁽²⁸⁾。宿主クロモソームと相同部分を持つプラスミドを形質転換して導入した

場合、プラスミドが宿主クロモソームに組み込まれていない状態の菌を選択できる条件を用いればプラスミドと宿主クロモソーム上のマーカーが乗り移ったプラスミドを持つ菌がとれるはずである。pTL 12 を *rec⁺* 株に形質転換し、ロイシンを添加せず Tmp を高濃度に入れたプレートにまくと、Tmp^R の部分が宿主クロモソームに組み込まれた形質転換株と、pTL 12 が宿主クロモソームに組み込まれない形質転換株が出現する。前者では Tmp^R が宿主に組み込まれているためコピー数が低く、Tmp に対する抵抗性は低いが、後者はコピー数が多いので耐性が強く、コロニーの大きさでこれら 2 つの形質転換株を容易に区別できる。宿主に *B. subtilis leuB8 rec⁺* を用いたところ、大きいコロニー(pTL 12 がクロモソームに組み込まれていない)に濃いコロニーと薄いコロニーの 2 種類が現れた。濃いコロニーはすべて *Leu⁺* Tmp^R ですべて pTL 12 そのものを持っていると思われる。薄いコロニーは 20 個の内 2 個が *Leu⁻* Tmp^R であった。*Leu⁻* Tmp^R からとったプラスミド pTL 12-1 は pTL 12 と同じサイズで制限酵素のパターンに両者変りなく、また、予想どおり *leuB8 rec⁺* 株を *Leu⁺* にする活性を持っていなかったが、他のロイシンのマーカーを形質転換する能力は持っていた(表 3)⁽²⁹⁾。これはクロモソーム上のマーカーが 1 回の形質転換でプラスミド上の相同部分に移ったことを示している。この理由を次のように考えている。プラスミドによる形質転換は、分子がモノマーであると形質転換活性がないがプラスミドの DNA 上に宿主と相同の部分が存在する場合はプラスミドがモノマーであっても形質転換できることが観察された⁽²⁵⁾。その理由として、モノマープラスミド DNA はまず細胞表層で二重鎖切断を受けてその後種々の長さの一本鎖となって細胞内に入っていくが、この一本鎖 DNA は宿主クロモソームの相同部分とペアリングしそれを鋳型として欠失部分が修復される⁽²⁵⁾。このときもし一本鎖 DNA 上の相同部分が *leuB8* 部位を欠失していれば、修復されたとき宿主の *leuB8* がプラスミド上にコピーされる

表 3 pTL 12 および pTL 12-1 による形質転換能力⁽²⁹⁾

	<i>rec⁺</i>					<i>recE4</i>	
	<i>leuC113</i>	<i>leuB8</i>	<i>leuB6</i>	<i>leuB111</i>	<i>leuB132</i>	<i>leuB6</i>	Tmp
pTL 12-1	+	-	+	+	+	-	R
pTL 12	+	+	+	+	+	+	R

+- は *leu* 変異株を *Leu⁺* にする能力があるなしをそれぞれ意味する。R は Tmp^R を示す。

ことになる。

この方法を用いることによって、*B. subtilis* のある遺伝子ののったプラスミドと、その遺伝子に変異を起こした部分がのったプラスミドができることになる。これら2つのプラスミドを別々にミセルに導入し、放射性アミノ酸でラベルすれば、ラベルされたタンパク質をゲルで分析することにより遺伝子産物の同定が可能であろう。とくに遺伝子産物に酵素活性の見出せないたとえば DNA 合成に関与するタンパク質などの場合、このような方法で遺伝子産物の同定あるいは精製が可能と思われる。

さらに、同じオペロンに属するいくつかの変異を一つずつプラスミド上にのせ、このプラスミドを *recE4* の入った変異株に導入して、表現型が野生株になるか否かを complementation させ、変異が同じシストロンに属するか否かを研究できると思われる。

V. 異種 DNA の枯草菌における発現

大腸菌のプラスミドにグラム陽性菌である *S. aureus* の薬剤耐性因子や枯草菌の遺伝子をつないで大腸菌に導入した場合その遺伝子は発現する。グラム陽性菌である *S. aureus*⁽¹⁹⁾, *B. licheniformis*⁽⁵³⁾, *B. pumilus*⁽⁵³⁾ の遺伝子は枯草菌中で発現する。しかし、大腸菌の薬剤耐性遺伝子は枯草菌の中では発現されないことが 1978 年ごろ認められた^(23,30)。グラム陰性菌遺伝子のグラム陽性菌における発現は Shöttel らにより、大腸菌の薬剤耐性が *Streptomyces* により発現されたのが最初である⁽³¹⁾。発現される例が積みかさなることによって、種々の遺伝生化学的解析が可能な枯草菌を用いてグラム陽性菌と陰性菌の基本的な違いを分子レベルで解明することが可能であろう。*in vitro* の実験では、グラム陽性菌のメッセンジャー RNA (mRNA) をグラム陰性菌のタンパク合成系は読むことができるが、その逆は不可能であった⁽³²⁾。Rabinowitz らはこの大腸菌と枯草菌における遺伝子発現の差を mRNA 合成およびタンパク合成のレベルで説明している。すなわち、大腸菌のプロモーターからの mRNA 合成を枯草菌の RNA ポリメラーゼは *in vivo* における塩濃度では開始できず⁽³⁴⁾、また、タンパク合成の差異は大腸菌 mRNA と枯草菌リソソームが安定な複合体を作れないからであるとしている⁽³³⁾。

タンパク合成が開始するにはまず 30S リソソームサブユニット中にある、16S RNA の 3' 末端の配列が

mRNA の Shine-Dalgarno(SD) 配列と相互作用してリソソームの結合位置が決まり、開始コドンである AUG からタンパク合成が開始する。枯草菌ではこの相互作用が起るためには長い SD 配列を要求し、大腸菌 mRNA ではこの配列が通常短いため枯草リソソームと安定な複合体ができないためと説明している⁽³³⁾。

最近、大腸菌のクロラムフェニコール耐性⁽³⁵⁾ (Cm^R)、テトラサイクリン耐性⁽³⁶⁾、トリプトファン D⁽³⁷⁻³⁹⁾ および C^{37-39} 遺伝子が枯草菌内で発現されたと報告された。 Cm^R の発現は *B. subtilis* プロモーターを使用して RNA 合成が起っており、できたタンパク質は *B. subtilis* のタンパク質と Cm アセチルトランスフェラーゼが結合したタンパク (fused protein) であった。トリプトファン D の場合も fused protein らしい。テトラサイクリン耐性の発現はよく検討されていない。*trpC* の場合は intact なタンパクができていくという⁽³⁹⁾。筆者の観察した大腸菌 *trpC* の枯草菌内での発現は次のごとくである。pET 3 (図 6) は *E. coli* プラスミド RSF 1010-*trpΔ*3⁽⁴⁰⁾ と pTL 12 との複合体であるが *E. coli* から単離したとき pTL 12 の *leu*⁺ 部分が欠失したものである。pET 3 は *E. coli* では $\text{Tmp}^R\text{TrpC}^+\text{Sm}^R$ を示すが、*B. subtilis* では $\text{Tmp}^R\text{Trp}^-\text{Sm}^S$ である。pET 3 を *B. subtilis* *trpC* に形質転換して $\text{Tmp}^S\text{Trp}^+\text{Sm}^S$ なるコロニーを 1 つ得た。この形質転換株からとれたプラスミド pET 2 は pET 3 の Tmp^R 部位から *trpC*⁺ の辺まで欠失しており、*trpC*⁺ 遺伝子は直接 pTL 12 部分に結合していた (図 6)。pET 2 は *E. coli* 内では $\text{Tmp}^S\text{TrpC}^+\text{Sm}^R$ を示す。pET 3 は *B. subtilis* *trpE*~A のどれも形質

図 6 *E. coli* プラスミドと *B. subtilis* プラスミドの組換え体。

弧の部分が *B. subtilis* のプラスミド。太線部分は *E. coli* プラスミド RSF 1010 部分。P_R, P_L: ラムダファージプロモーター; *trp*: *E. coli* *trpC* と *trpE*, *trpB* の一部; Sm^r: ストレプトマイシン耐性。破線は HindIII の切断部位、pET 3 中の矢印は欠失部分を示す。

転換できなかったが pET 2 は *trpC* と *trpF* を形質転換した。 *E. coli trpC* の遺伝子産物は2つの酵素活性を持ち、この2つの酵素は *B. subtilis* では *trpC* と *trpF* によって別々に作られる。したがって *E. coli* の *trpC* のほとんどが pET 2 に入っていると思われる。制限酵素による解析から pET 2 には *E. coli trpC* の 78 番目の塩基から最後まで存在することがわかったが *trpC* の開始コドン付近は今のところ不明である。したがって、intact な *E. coli* の *trpC* 遺伝子産物ができているのか、枯草菌のタンパクと結合しているのか明らかでない。Williams らの観察した *E. coli trpC* の *B. subtilis* での発現⁽³⁹⁾はリボソームが *trpD* の翻訳が終って脱落し、*E. coli trpC* の SD 配列を認識して再び *B. subtilis* のリボソームが結合し *trpC* 遺伝子を読み始めるのであろうか、あるいは *trpD* を読み終えたリボソームがそのまま滑って、隣の *trpC* 遺伝子に入っていくのであろうか。 *E. coli trpC* の SD 配列⁽⁴¹⁾は *B. subtilis* の 16S rRNA の 3' 末端と塩基対を作って相互作用するには塩基対の数が少なすぎるように思われる。むしろ、

という配列の間を滑っていくように思われる。

さて *E. coli trpC* は *B. subtilis* 内で読まれるようなので今度は *trpB* はどうであろうか。上に述べた *trpD-trpC* 間のスペーサーが6塩基とすれば *trpC-trpB* 間には14塩基対もある。前者のリボソームの滑りで行くなれば後者もそれで行けるであろうか。また、もしリボソームが所詮読めないのならば読めるように変異させた場合、菌の側にあるいはプラスミドのほうにどのような変化が起るであろうか。このような研究を通じて、遺伝子発現のメカニズムや *E. coli* と *B. subtilis* の遺伝子発現の差を解明したいと考えている。

原核生物の遺伝子は真核生物と違っていくつかの遺伝子がつらなってポリシストロンを形成している⁽⁴²⁾。異種の DNA を入れた場合、最初の遺伝子が発現されれば下流にある遺伝子が発現されるか否かを調べることは重要な問題であろう。

おわりに

現在では、枯草菌のベクターには大きく分けて *S. aureus*⁽¹⁸⁾, *B. cereus*⁽¹⁷⁾ 由来の薬剤耐性因子、ファージ ρ 11⁽⁴³⁾, ϕ 105^(44,46) ϕ I⁽⁴⁵⁾ そして *B. subtilis* のプ

ラスミド(本総説および文献(17)),がある。一般に、薬剤耐性因子の場合はコピー数が多く、ファージの場合は宿主に組み込まれているときは、染色体当たり1コピーであり、*B. subtilis* 由来のプラスミド(pTL 12)は染色体当たり約5コピーである。遺伝子産物を多量にとるときは当然コピー数が多いほうが良いが、それが宿主に対して害を及ぼすような場合はコピー数が少ないほうが有利である。これらのベクターを用いて枯草菌の宿主ベクター系の今後の問題点をひろい出してみる。

B. subtilis を宿主としたとき、しばしば組換え体 DNA が不安定であり、宿主から失われる場合(seg-regational instability)と、組換え体の一部が欠失を起す場合(structural instability)がある。前者の例として *S. aureus* 由来の pC 194 の HindIII site に DNA を挿入した場合この組換え体 DNA は高頻度に失われるという報告がある⁽¹⁸⁾。また後者の場合もいくつかの例が報告されている(文献 18 参照)が特殊な配列の関与(translocatable element)が原因と考えられる場合⁽⁴⁷⁾と、そうでない場合⁽⁴⁸⁾がある。また欠失が生ずる場合、*B. subtilis* を形質転換するとき起るとされる報告⁽⁴⁸⁾と、組換え DNA が細胞内に入ってから起るとされる報告⁽⁴⁹⁾がある。いずれにしてもわずかな分子内に存在する相同部分を利用して組換えを起し欠失が生ずると考えられ、*E. coli* における *recA* タイプの変異株を分離する必要がある。本総説に述べた *leu*⁺, Tmp^R および *E. coli trpC*⁺ を含む DNA 断片は *B. subtilis* 内で安定であり、不安定性にベクターが関与しているか否か検討を要する。

枯草菌の特長の一つとして菌体外酵素があり、このシグナルペプチドの下流に必要な遺伝子をつなげて、遺伝子産物を培地中に放出させることが初期のころから期待され、実際 α-アミラーゼや β-ラクタマーゼ遺伝子の下流にそれぞれ *E. coli* β-ラクタマーゼ⁽⁵⁰⁾ およびヒトインターフェロン⁽⁵¹⁾をつないで分泌させる試みがなされ培養液中に放出されることが示された。枯草菌は菌外プロテアーゼを出す、これが分泌されてきたタンパク質を分解する可能性の問題と、たとえタンパク質がシグナルペプチドに結合されても分泌されにくい構造も考えうる。これらの問題を克服する変異株を期待したい。

枯草菌で開発されるべきベクターは強いプロモーターを持つ、発現効率の高いものであろう。Williams らの pPL 608 はその1つの例である⁽³⁹⁾。さらに、これに加

えて必要なときに誘発して求めるタンパク質が誘導されるようにすれば宿主にとって不都合なタンパク質を生育のある時期に、また、菌体内で不安定なタンパク質も代謝の不活発になった非増殖期に誘発をかけてタンパク質を取り出せる可能性がある。エリスロマイシンやクロラムフェニコールで誘発のかかるプラスミドを利用してB型肝炎ウイルス抗原⁽⁵²⁾やマウスジヒドロ葉酸還元酵素⁽⁵³⁾がそれぞれ誘導合成されている。

今ではウシ口蹄ウイルス抗原⁽⁵²⁾、ヒトインターフェロン⁽⁵¹⁾のクローニングなど、大腸菌で行われてきたことが枯草菌で可能となった。これら2つの系は、エンドトキシンの問題、発現の効率、菌体外への分泌の可否、大量培養、安全度などの因子を考慮しつつ、それぞれの系の長を生かしてしばらくは併用されるものと思われる。

おわりに、ご指導賜りました三菱化成生命科学研究 所坂口健二氏、この研究においてご協力をいただきました黒田もと子氏、越川孝子氏、河野直子氏に深謝いたします。またこの研究の発展に御援助いただきました三菱化成生命科学研究 所大島泰郎氏、終始励ましをいただいた東京大学大岳望教授に心からお礼申し上げます。

- (1) 「遺伝子工学 10 年の軌跡」, サイエンティスト社, 1980.
- (2) 蛋白質 核酸 酵素, **26**, 4号, 共立出版, (1981).
- (3) T. Tanaka, M. Kuroda and K. Sakaguchi : *J. Bacteriol.*, **129**, 1487 (1977).
- (4) T. Tanaka and T. Koshikawa : *J. Bacteriol.*, **131**, 699 (1977).
- (5) P. S. Lovett and M. G. Bramucci : *J. Bacteriol.*, **124**, 484 (1975).
- (6) J. C. Le Hegarat and C. Anagnostopoulos : *Mol. Gen. Genet.*, **157**, 167 (1977).
- (7) K. H. Bernhard, H. Schrempf and W. Goebel : *J. Bacteriol.*, **133**, 897 (1978).
- (8) T. Uozumi, A. Ozaki, T. Beppu and K. Arima : *J. Bacteriol.*, **142**, 315 (1980).
- (9) T. Hara, A. Aumayr and S. Ueda : 4th International symposium on Genetics of Industrial Microorganisms, 1982.
- (10) K. Nagahari and K. Sakaguchi : *Mol. Gen. Genet.*, **158**, 263 (1978).
- (11) T. Uozumi, T. Hoshino, K. Miwa, S. Hori-nouchi, T. Beppu and K. Arima : *Mol. Gen. Genet.*, **152**, 65 (1977).
- (12) D. Dubnau, R. Davidoff-Abelson, B. Scher and C. Cirigliano : *J. Bacteriol.*, **114**, 273 (1973).
- (13) J. B. Ward and S. A. Zahler : *J. Bacteriol.*, **116**, 719 (1973).
- (14) V. J. Wainwright and J. F. Kane : *Microbiology*-1976, 208.
- (15) T. T. Myoda : 4th International Symposium on Genetics of Industrial Microbiology, 1982.
- (16) S. Chang and S. N. Cohen : *Mol. Gen. Genet.*, **168**, 111 (1979).
- (17) J. Kreft, K. Bernhard and W. Goebel : *Mol. Gen. Genet.*, **162**, 59 (1978).
- (18) S. D. Ehrlich, B. Niaudet and B. Michel : *Curr. Topics Microbiol. Immunol.*, **96**, 19 (1982).
- (19) S. D. Ehrlich : *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **74**, 1680 (1977).
- (20) T. J. Gryczan, S. Contente and D. Dubnau : *J. Bacteriol.*, **134**, 318 (1978).
- (21) U. Canosi, G. Morelli and T. Trautner : *Mol. Gen. Genet.*, **166**, 259 (1978).
- (22) T. Tanaka : *Mol. Gen. Genet.*, **175**, 235 (1979).
- (23) T. Tanaka and K. Sakaguchi : *Mol. Gen. Genet.*, **165**, 269 (1978).
- (24) T. Tanaka and N. Kawano : *Gene*, **10**, 131 (1980).
- (25) U. Canosi, A. Iglesias and T. Trautner : *Mol. Gen. Genet.*, **181**, 434 (1981).
- (26) T. Tanaka : *J. Bacteriol.*, **139**, 775 (1979).
- (27) Y. Yagi and D. Clewell : *J. Mol. Biol.*, **102**, 583 (1976).
- (28) K. M. Keggin, E. J. Duvall and P. S. Lovett : *J. Bacteriol.*, **134**, 514 (1978).
- (29) T. Tanaka : *Agric. Biol. Chem.*, **46**, 1101 (1982).
- (30) S. D. Ehrlich : *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **75**, 1433 (1978).
- (31) J. L. Schöttel, M. J. Ribb and S. N. Cohen : *J. Bacteriol.*, **146**, 360 (1981).
- (32) M. R. Stallcup, W. J. Sharrock and J. C. Rabinowitz : *J. Biol. Chem.*, **251**, 2499 (1976).
- (33) J. R. McLaughlin, C. L. Murray and J. C. Rabinowitz : *J. Biol. Chem.*, **256**, 11283 (1981).
- (34) J. R. McLaughlin, C. L. Murray and J. C. Rabinowitz : *J. Biol. Chem.*, **256**, 11273 (1981).
- (35) R. Doi, D. S. Goldfarb and R. L. Rodriguez : Conference on Genetics at Stanford, Molecular cloning and gene regulation in Bacilli, Stanford (California), June, 1981.
- (36) W. Goebel : *ibid.*
- (37) D. Williams : *ibid.*
- (38) T. Tanaka : *ibid.*
- (39) D. M. Williams, R. G. Schoner, E. J. Duvall, L. H. Pries and P. S. Lovett : *Gene*, **16**, 199

- (1981).
- (40) K. Nagahari : *J. Bacteriol.*, **136**, 312(1978).
- (41) C. E. Christie and T. Platt : *J. Mol. Biol.*, **142**, 519 (1980).
- (42) K. H. Nierhaus : *Curr. Topics Microbiol. Immunol.*, **97**, 81 (1982).
- (43) F. Kawamura, H. Saito and Y. Ikeda : *Gene*, **5**, 87 (1979).
- (44) T. Iijima, F. Kawamura, H. Saito and Y. Ikeda : *Gene*, **9**, 115 (1980).
- (45) F. Kawamura, H. Saito and Y. Ikeda : *Mol. Gen. Genet.*, **180**, 259 (1980).
- (46) Y. Yoneda, G. Scott and F. E. Young : *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **91**, 1556 (1979).
- (47) G. Grandi, M. Mottes and V. Sgaramella : *Plasmid*, **6**, 99 (1981).
- (48) M. Uhlen, J. I. Flock and L. Philpson : *Plasmid*, **5**, 161 (1981).
- (49) T. J. Gryczan and D. Dubnau : *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **75**, 1328 (1978).
- (50) I. Palva, P. Lehtovaara, M. Salvas, K. Takkinen, N. Kalkkinen and L. Kääriäinen : 4th International Symposium on Genetics of Industrial Microbiology, 1982.
- (51) S. Chang : *ibid.*
- (52) K. Hardy, S. Stahl and H. Küpper : *Nature*, **293**, 481 (1981).
- (53) K. M. Keggins, P. S. Lovett and E. J. Duvall : *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **75**, 1423 (1978).
-