乳酸菌における遺伝子ターゲティングの利用†

佐々木 隆, 佐々木 泰子

(明治乳業株式会社中央研究所)

Key words : gene targeting ; applications ;

lactic acid bacteria ;

Lactococcus ; *Lactobacillus*

1. 乳酸菌の遺伝子ターゲティング

乳酸菌は、古くから多くの発酵食品製造などに用いられ、また一部はヒトの腸内常在菌として健康維持に重要な役割を果たしている。これら乳酸菌の遺伝子操作技術はここ十年程の間に進展し⁽¹⁾、産業上有用な乳酸菌の育種は実現可能な課題になりつつある。そして、欧州などを中心にチーズやサイレージ製造用乳酸菌の育種をはじめ各種の応用を目指す研究が精力的に行われている⁽²⁾。

遺伝子操作によって乳酸菌を育種する場合に、何よりも大切なことは言うまでもなく「安全性」である。乳酸菌の応用では、育種株（遺伝子組換え体）そのものが食品などの最終製品に含まれる場合が多いと考えられる。したがって、「食品レベルの安全性」、即ち、食べて何ら問題がないという厳しいレベルの安全性が必要で、育種株が危険な要素を全く持たないことが大前提となる。

産業的応用を目指す乳酸菌の育種にとって、遺伝子ターゲティングはまさにその方法を提供する画期的な技術である。何故なら、目的とする遺伝子を二重交叉によって乳酸菌染色体へ組込み、選択マーカー遺伝子を始めベクターなど不要な塩基配列を除去することができ、育種株の安全性確保に適するからである⁽³⁾。また、プラスミドで複製する場合に比べると、目的の遺伝子が染色体に組込まれているために脱落せず、導入した有用形質の安定化も実現できる。

2. 乳酸菌での遺伝子ターゲティングの研究例

最近では、応用を目指した乳酸菌の育種を、遺伝子ターゲティングによって達成しようとする試みが多くなってきたが、そのいくつかの例を示す。

(1) プロテアーゼ活性の安定化

Lactococcus lactis では、チーズ生産に重要な役割を果たすプロテアーゼの遺伝子がプラスミドにコードされていることが多く、その脱落によってチーズ生産が停止する事がある。1991年 Leenhouts らは⁽⁴⁾、染色体への組込みによってプロテアーゼ遺伝子を安定化し、且つ、増幅する試みを行った。pBR322 とプロテアーゼ遺伝子、及び染色体相同領域から成るプラスミドを構築し、染色体組込み株を得た。組込み株の中でプラスミドが2及び8コピー増幅した株では、プラスミドの場合と比較して、各々1.5, 11倍のプロテアーゼ活性が認められた。これらの株では、非選択条件下で100世代培養してもプロテアーゼ活性は安定に保持された。

(2) ファージ耐性遺伝子の安定化

ファージ感染によってチーズ製造が停滞することがあり、経済的に重大な問題として古くから研究されてきた。1994年 Dinsmore と Klaenhammer は⁽⁵⁾ 安定なファージ耐性株を育種する基礎研究として、abortive infection (感染不全) 遺伝子 (*abiA*) と IS (insertion sequence) を有する組込みプラスミド pTRK 75 (図1) を構築した。pTRK 75 は IS の機能によって染色体のランダムな部位へ組込まれたが、*abiA* を1コピー持つほとんどの組込み株ではファージ耐性は認められなかった。強力なプロモーターの下流に組込まれ、わずかに感染防御能を示す株も得られたが、プラスミドで多コピー存在する場合に比べると耐性は極めて弱かった。今後の実用化に向けては、多コピー遺伝子の組込みや発現量の増大等、多くの検討が必要であろう。

(3) サイレージ乳酸菌へのアミラーゼ遺伝子の導入
Fitzsimons 等は効率良いサイレージ (家畜用貯蔵飼

† Recent Studies on Gene Targeting in Lactic Acid Bacteria

Takashi SASAKI and Yasuko SASAKI (Central Research Institute, MEIJI MILK PRODUCTS Co., Ltd.)

図 1 組込みプラスミド pTRK 75

グラム陽性菌での複製のための origin を欠いており、IS 946 の機能によって乳酸菌 (*Lactococcus lactis*) 染色体へ組込まれ、ファージ耐性遺伝子 *abiA* が導入される。Em と Cm は各々、エリスロマイシン及びクロラムフェニコール耐性遺伝子を示す。

(許可を得て文献(5)より転載)

料) 生産を目指して、サイレージ用乳酸菌にデンプン分解能を賦与した⁽⁶⁾。即ち *Lactobacillus plantarum* 染色体上の特定の遺伝子に *L. amylovorus* 由来の α -amylase 遺伝子を組込んだ (図 2)。サイレージの原料は単糖及び少糖に乏しいため乳酸が充分生成されずサイレージ製造が失敗することがあるが、得られた組込み株はアミラーゼを分泌し、通常は利用できないデンプンも炭素源として用いることができるようになった。しかも、二重交叉によって作成されたためアミラーゼ遺伝子以外の余分な遺伝子が残存していない。従って、組込み株は安全であり、効率良く乳酸生成を行って安定したサイレージ製造を可能にすると思われる。今後、実用化へ向けての本格的な研究が期待される。

(4) 乳酸脱水素酵素 (LDH) 遺伝子の交換

ヨーグルト製造に用いられる、いわゆるブルガリア菌 (*Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*) は遺伝子操作が極めて困難な乳酸菌である。しかし筆者らは、広宿主域で接合伝達性の pAM β 1 が本菌で複製できず、選択条件下では低頻度ながら染色体へ組込まれることを発見し⁽⁷⁾、本プラスミドをベクターとして用い、接合伝達によって遺伝子を組込む方法を確認した。

図 2 α -amylase 遺伝子のターゲッティング

サイレージ用乳酸菌 (*Lactobacillus plantarum*) 染色体へのアミラーゼ遺伝子のターゲッティング。(A) 組込みプラスミド pGAF 002 は Lp 80 株染色体の conjugated bile acid hydrolase 遺伝子 (*cbh*) 部位に相同組換えで組込まれ、エリスロマイシン耐性でアミラーゼ遺伝子を有する組込み株 LPGAf 株が得られた。(尚、*cbh* は生育には必須でないため、この遺伝子が組込み部位として用いられた。)(B) LPGAf 株を抗生物質無添加培地で継代すると、2 回目の相同組換えを起こして、ベクター部分が除去されアミラーゼ遺伝子のみが組込まれた LPGAf Δ 5 株が取得された。

(許可を得て文献(6)より転載)

この方法を用い二重交叉によって、本菌が元来有するD-型のLDH遺伝子を、他のヨーグルト乳酸菌由来のL-型の遺伝子と交換した。その結果、D-型の代わりにL-型のLDHが作られ、生成された乳酸はD-型ではなくL-型になった⁽⁸⁾。元の株(宿主)の遺伝子構成と違うのは交換したLDH遺伝子だけなので、作成された育種株は安全だと思われる。

(5) ブルガリア菌用の「汎用的遺伝子組込み法」

更に筆者らは、本菌染色体に各種遺伝子を導入する方法としてチミジン合成酵素遺伝子 *thyA* を組込みの標的部位とする方法を開発した^(9,10)。導入したい遺伝子を *thyA* 遺伝子を含むDNA断片中に挿入し、二重交叉で染色体へ組込むと、外来遺伝子は染色体の *thyA* 部位に組込まれた(図3)。目的の「遺伝子組込み体」であるかどうかはチミジン要求性で容易に判別できた。しかも、前例のように接合伝達法を用いれば「制限」バリアの影響を受けないため、形質転換頻度の低い「ブルガリア菌の産業株」にも適用できる。即ち、汎用性があり産業的応用性の高い遺伝子ターゲティング法であると考えている。

(6) その他の例

遺伝子ターゲティングを利用して、乳糖代謝に関連する *lac* オペロン中の *lacG* 遺伝子⁽¹¹⁾ や *lacZ* 遺伝子⁽¹²⁾ を不活化して各遺伝子の働きが調べられ、*lacS*、

図3 *thyA* 遺伝子を組込みの標的部位とする遺伝子導入
導入しようとする遺伝子を染色体の *thyA* 遺伝子の中に入れ、組込みベクターに挿入する。このプラスミドを宿主に導入し、二重交叉によってできた「育種株」は、染色体の *thyA* 遺伝子の中に目的の遺伝子が挿入されているため、チミジン要求性を示す。

lacZ 遺伝子間に *cat* 遺伝子を挿入して⁽¹²⁾ 転写への影響が検討された。また、tripeptidase 遺伝子を *in vitro* で欠失させて遺伝子置換⁽¹³⁾、X-prolyl dipeptidyl aminopeptidase 遺伝子を不活化して⁽¹⁴⁾、乳蛋白質の分解への関与が調べられた。さらにISを利用した組込みで染色体のランダムな部位に制限酵素のサイトを導入し、染色体解析を行った例もある⁽¹⁵⁾。最近では、形質転換効率の低い産業株への組込みやランダムな変異体を得るために、乳酸菌の *repA* を欠損したベクターと温度感受性ベクターを組合わせた系⁽¹⁶⁾や、ISの機能を利用した温度感受性ベクター⁽¹⁷⁾も開発されている。

3. 今後の展望

ここ数年盛んに報告されるようになった乳酸菌での遺伝子ターゲティングは、乳酸菌染色体や各種遺伝子を解明するとともに、産業上有用な乳酸菌を安全に育種する方法としても注目され、貴重な成果が出始めている。遺伝子ターゲティングは、今後も乳酸菌育種の根幹技術の一つとして重要である事は疑いないが、将来、育種株を食品などへ応用する可能性を考えると、さらなる検討が必要であろう。例えば、終始一貫して薬剤耐性マーカーを用いずに「安全なベクター」のみを用いる方法の確立、染色体に1ないし少数コピー組込んだ場合でも十分な発現量が得られる強いプロモーター等の検討、さらに、遺伝子が乳酸菌染色体に組込まれるメカニズムの解明、などが挙げられる。

欧米等では、乳酸菌の遺伝学的研究が特にこの10年程前から極めて活発に行われてきている。従って、応用のために必要な諸技術が次々と開発され、またガイドライン等の整備も行われ、近い将来には遺伝子ターゲティングを用いた乳酸菌の育種株が、産業的に広く利用される事が充分期待できる。

- (1) M. J. Gasson : *FEMS Microbiol. Rev.*, **12**, 3-20 (1993).
- (2) 佐々木隆 : バイオサイエンスとインダストリー, **53**, 950-955 (1995).
- (3) 佐々木泰子 : バイオサイエンスとインダストリー, **52**, 106-108 (1994).
- (4) K. J. Leenhouts, J. Kok and G. Venema : *Appl. Environ. Microbiol.*, **57**, 2568-2575 (1991).
- (5) P. K. Dinsmore and T. R. Klaenhammer : *Appl. Environ. Microbiol.*, **60**, 1129-1136 (1994).
- (6) A. Fitzsimons, P. Hols, J. Jore, R. J. Leer, M. O'Connell, and J. Delcour : *Appl. Environ. Microbiol.*, **60**, 3529-3535 (1994).
- (7) Y. Sasaki, Y. Ito and T. Sasaki : *FEMS Micro-*

- biol. Rev.*, **87**, p17 (1990).
- (8) 佐々木隆, 佐々木泰子, 伊藤喜之: 日本醸造協会誌, **89**, 613-619 (1994).
- (9) 佐々木泰子, 佐々木 隆: 1995 年度日本農芸化学会大会講演要旨集, 1995, p.276.
- (10) 佐々木 隆, 佐々木泰子: 1995 年度日本農芸化学会大会講演要旨集, 1995, p.276.
- (11) G. Simons, M. Nijhuis, and W. M. De Vos: *J. Bacteriol.*, **175**, 5168-5175 (1993).
- (12) B. Mollet, J. Knol, B. Poolman, O. Marciset, and M. Delley: *J. Bacteriol.*, **175**, 4315-4324 (1993).
- (13) I. Mierau, A. J. Haandrikman, O. Velterop, P. S. T. Tan, K. L. Leenhouts, W. N. Konings, G. Venema, and J. Kok: *J. Bacteriol.*, **176**, 2854-2861 (1994).
- (14) K. J. Leenhouts, J. Kok and G. Venema: *J. Bacteriol.*, **173**, 4794-4798 (1991).
- (15) P. Le Bourgeois, M. Lautier, M. Mata and P. Ritzenthaler: *J. Bacteriol.*, **174**, 6752-6762 (1992).
- (16) J. Law, G. Buist, A. Haandrikman, J. Kok, G. Venema, and K. Leenhouts: *J. Bacteriol.*, **177**, 7011-7018 (1995).
- (17) E. Maguin, H. Prevost, S. D. Ehrich, and A. Gruss: *J. Bacteriol.*, **178**, 931-935 (1996).
-