



# HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	Lactobacillus helveticusの分子育種に関する研究
Author(s)	橋場, 炎; Hashiba, Honoo
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(農学)
Dissertation Number	乙第4378号
Issue Date	1993-09-30
DOI	<a href="https://doi.org/10.11501/3074883">https://doi.org/10.11501/3074883</a>
Doc URL	<a href="https://hdl.handle.net/2115/49965">https://hdl.handle.net/2115/49965</a>
Type	doctoral thesis
File Information	000000269622.pdf



*Lactobacillus helveticus*の分子育種に関する研究

橋 場 炎

①

*Lactobacillus helveticus*の分子育種に関する研究

橋場 炎

(雪印乳業株式会社技術研究所 〒350 埼玉県川越市南台1-1-2)

Studies on molecular breeding of *Lactobacillus helveticus*

Honoo Hashiba

Technical Research Institute, Snow Brand Milk Products Co., Ltd.

1-2, Minamidai 1-chome, Kawagoe, Saitama 350, Japan

## 目次

### Abbreviations

第1章	緒言	1
第2章	序論	5
第3章	潜在性プラスミドpLJ1の単離と全塩基配列の決定	
	はじめに	14
	実験材料と実験方法	15
	結果	18
	考察	20
	要約	21
第4章	<i>Lactobacillus helveticus</i> の形質転換法の検討	
	はじめに	28
	実験材料と実験方法	29
	結果	31
	考察	35
	要約	38
第5章	$\beta$ -ガラクトシダーゼ遺伝子の取得および全塩基配列の決定	
	はじめに	49
	実験材料と実験方法	50
	結果	55
	考察	58
	要約	59
第6章	<i>Lactobacillus helveticus</i> の乳糖非資化性変異株の取得	
	はじめに	69
	実験材料と実験方法	70
	結果	72
	考察	77
	要約	79
第7章	食品に利用可能なベクターpBG10の構築	
	はじめに	86
	実験材料と実験方法	87
	結果	89
	考察	94
	要約	97
第8章	総括	110
	Summary	116
	謝辞	125
	参考文献	126

## Abbreviations

bp: Basepair

BPB: Bromophenol blue

BSA: Bovine serum albumine

CFU: Colony forming unit

Da: Dalton

DNA: Deoxyribonucleic acid

EDTA: Ethylenediaminetetraacetic acid, disodium salt

F: Farad

HEPES: *N*-2-Hydroxyethylpiperazine-*N'*-2-ethanesulfonic acid

kb: Kilobasepair

kDA: Kilodalton

LB: Luria-Bertani

MOPS: 3-(*N*-Morpholine)propanesulfonic acid

MRS: Man-Rogosa-Sharpe

NTG: *N*-methyl-*N'*-nitro-*N*-nitrosoguanidine

OD: Optical density

ONPG: *o*-Nitrophenyl- $\beta$ -D-galactopyranoside

ORF: Open reading frame

ori: The region essential for replication of a plasmid

PAGE: Polyacrylamide gel electrophoresis

PCR: Polymerase chain reaction

SA-AP: Streptoavidine-alkalinephosphatase conjugate

SDS: Sodiumlaurylsulfate

SSC: 150 mM NaCl-15 mM Na<sub>3</sub> citrate

STME: 0.5 M Sucrose-10 mM Tris-maleate-10 mM EDTA (pH 6.5)

TBE: 50 mM Tris-borate-10 mM EDTA (pH 8)

TE: 10 mM Tris-HCl-1 mM EDTA (pH 8)

Tris: 2-Amino-2-hydroxymethyl-1,3-propanediol

X-Gal: 5-Bromo-4-chloro-3-indolyl- $\beta$ -D-galactopyranoside

## 第1章 緒言

乳酸菌は、牛乳、食肉、野菜、穀類等からの発酵食品の製造に関わる重要な微生物である。特に発酵乳製品（ヨーグルト、チーズ）の製造に係わる乳酸菌については製品の製造に必要とされる有用な性質を有する菌株を精力的に自然界より単離したり、変異処理等で改良されてきた菌株が使用されてきた。このような古典的手法に加えて、新たな育種として遺伝子工学的手法が、近年、用いられるようになってきた。例えば、乳糖資化性能の安定化（プラスミドが関与）<sup>1,2)</sup>、プロテアーゼ活性の付与または増強（チーズ熟成に関与）<sup>3-5)</sup>、ナイシン等の抗菌物質生産（食品保存に有効）<sup>6-9)</sup>、ファージ耐性<sup>10)</sup>などの改良が遺伝学的に研究されている。これまでに乳酸菌の遺伝学および生理学的知見はかなりされてきており、人間が望むような特別な性質を持つ菌株をつくり出すことが可能となりつつある。

乳酸菌の遺伝子工学的研究は大腸菌や枯草菌に比べてかなり遅れていた（特に乳酸桿菌）。しかし、形質転換法としてエレクトロポレーション法が登場して以来、この数年間において長足の進歩を遂げている。乳酸球菌では宿主-ベクター系の確立から異種遺伝子の発現へ、そして桿菌では宿主-ベクター系の開発がほぼ完成しつつある。そして全体的に食品製造への応用を目的にfood-gradeベクターの開発<sup>6, 11-13)</sup>へと移行しつつある。このfood-gradeの分野では人間のためのみならず家畜の飼料、即ちサイレージの改良等に直接利用可能な菌株を遺伝学的に育種しようとする"feed-grade"ベクターの研究が行われている。例えば、飼料中のキシランに着目し、キシラナーゼを選択マーカーとする宿主-ベクター系の開発<sup>14)</sup>が試みられている。このように、食品に利用可能とする選択マーカー遺伝子の取得や、それを用いた宿主-ベクター系の開発が試みられているが、いずれも検討段階である。実際に $\beta$ -ガラクトシダーゼという安全な選択マーカーを用い、食品に利用可能な宿主-ベクター系を乳酸桿菌で確立しているのは著者らの研究<sup>15)</sup>の他には報告され

ていない。乳酸球菌ではオランダ (NIZO) のグループが $\beta$ -ガラクトシダーゼの調節遺伝子を用いて<sup>12)</sup>, またMcKay のグループがナイシン耐性遺伝子を用いて確立している<sup>11)</sup>。乳酸菌における異種遺伝子の発現については分泌蛋白質である *Bacillus* 属の $\alpha$ -アミラーゼ遺伝子の発現が検討されている<sup>16,17)</sup>。宿主菌として球菌やサイレージ用桿菌が用いられている。目的としては球菌では物質生産系の検討であり, サイレージ用桿菌では本遺伝子の発現により安価な材料を培地に変換し菌の生育をよくするという考え方である。選択マーカーにはfood-gradeではない抗生物質耐性マーカーが利用されている。

著者らは道具としての食品に利用可能な宿主-ベクターを開発したが, 本システムを用いて乳酸菌をどのように改良していくかが今後の課題である。現在行われている研究と考えられる可能性をTable 1-1 に示した。

球菌ではファージ耐性や熟成に関与するプロテアーゼの研究が主流である。また, チーズの製造法に用いられている子牛のキモシン遺伝子や微生物レンネット遺伝子を導入することにより新たな製造法が確立されるかもしれない。

桿菌では代謝経路の活性を高めたりまたは新たに機能を付与することによりテクスチャーやフレーバーの改良, あるいは酸生成能や酸耐性能を改善することが考えられる。また, バクテリオシン関係の遺伝子の導入により食品や人体に悪い影響をあたえる菌を抑制することが可能となる。特に腸内定着性を有し, 人間の健康に関与している乳酸菌においては生理活性物質 (免疫賦活物質, 抗腫瘍性物質等) の生産関連遺伝子を導入し, 腸内で生理活性物質を生産させるという乳酸菌ならではの可能性が挙げられる。

食品加工工業において, 乳酸菌の利用は重要である。消費者の受入れを高めたり, 製造者に対する経済性をもたらすために, また, 最終製品の発酵効率, フレーバー, テクスチャー, 外観, 保存性, 安全性を改善するために利用される。これら

の発酵製品の製造に使用される菌株は望ましい製品や効率的変化と言う点を基本として先ず選択されてきた。現在使用されているカルチャーは確立されたものか又は多くの菌株をテストした後、選択されてきた。最近の食品発酵過程に關与する乳酸菌の改良に対する遺伝子工学の応用は工業的レベルで積極的に受け入れられて来ている。乳酸菌に關する遺伝学的研究は最終的には合目的な菌を供給する事にある。これは、発酵食品の健康と栄養的な重要性の増加に加え、食品工業にエネルギーの保存と儉約をもたらす。更に、食品加工技術は複雑になりつつあるため、使用されているスターターカルチャーに新たなる付加価値を付与することが必要である。もし、適当な遺伝的手法を用いることが可能であるならば、我々は遺伝的に菌株を改良し新たなる付加価値を有する製品を容易に作り出すことができるであろう。そのためにも、我々は発酵食品プロセスに關与する乳酸菌の生理学的、遺伝学的、生化学的特性を知ることは緊急の避けられない課題である。

そこで、ヨーグルトやチーズの製造に用いられてきた*L. helveticus*が有する酸生成能の調整、好ましいフレーバー産生能の付与、チーズ製造上問題とされるプロテアーゼ活性、それに起因する苦味の消去等の諸性質をその製品に合った性質に改良することを目的に遺伝子組換え技術による育種を行なうことにした。その前提となる*L. helveticus*の宿主-ベクター系（最終的には食品に利用可能な系）の開発に着手した。*L. helveticus*よりベクター構築に適当な潜在性プラスミドを単離し、それを土台に抗生物質耐性を選択マーカーとするシャトルベクターの構築を行なった。このベクターを用いて*L. helveticus*の形質転換系の確立を図った。そして、最終的に食品で利用可能な"food grade"ベクターの開発を行ない、外来性遺伝子の発現について検討した。

**Table 1-1. Possibility of molecular breeding of lactic acid bacteria.**

---

**Phage tolerance(restriction)  
Flavor(acetaldehyde, diacetyl)  
Texture(protease, polysaccharide)  
Growth rate(protease, amylase)  
Acid tolerance  
Antitumor substance  
Bacteriocin(nisin, lactacin)  
Afteracidification  
Chymosin or microbial rennet  
Sweetening(thaumatin, miraclin)**

---

## 第2章 序論

発酵食品は多くの食品原材料から製造されており、その歴史は紀元前にさかのぼることができる。そして、その起源は自然界に存在する細菌、カビ、酵母による偶然の所産であった。その中で発酵乳製品は数千年前より食されてきたと考えられている<sup>18)</sup>。その後、発酵により得られた食品は、保存性が優れている上に風味・フレーバー・食感等、原材料本来の特性を向上させることにより人々に受け入れられてきた。世界各地に、関与する微生物、原料乳、温度等の相違により沢山の発酵製品が存在する (Table 2-1)<sup>19)</sup>。乳酸菌はこれらの発酵製品中で重要な役割を担っている。発酵乳製品<sup>20,21)</sup>の他にも、ワイン<sup>22)</sup>、漬物等の発酵食品の製造<sup>23,24)</sup>、味噌や醤油の製造<sup>25)</sup>にも関与しているほか、サイレージの調製<sup>26)</sup>やデキストランの生産、清酒<sup>27)</sup>やウイスキー<sup>28)</sup>等のアルコール飲料の製造、ソーセージのような肉製品の製造<sup>29)</sup>にも関与していることが知られている (Table 2-2)。その中でも、チーズやヨーグルトは最も一般的発酵乳製品として食されてきており、その製造には高い酸生成能と蛋白質分解能を有する乳酸菌が利用されてきた。

1908年、Mechnikoffにより発酵乳の摂取は腸内に乳酸桿菌のフローラをつくりだし、腐敗菌の生育を阻害し、腐敗菌により引き起こされる症状の発生を妨ぐことにより人間の寿命を延ばすのに効果があるという議論がなされた<sup>30)</sup>。しかし、*Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*は腸内では生存していないことが判明した。これはヨーグルト（乳酸菌）を過大評価したものであったが、これによりヨーグルトは一躍脚光をあげ、世界中に広がり、乳酸菌の人間に対する効果が科学的に研究され始める基となった。食品工業において乳酸菌は古くよりヨーグルト等の発酵乳製品の製造に利用されてきた理由は乳酸生成による酸度低下が食品の貯蔵に寄与していることのほか、官能的好ましさによっていた。しかし、現在では *Lactobacillus acidophilus* や *Bifidobacterium* のような腸内定着性乳酸菌が製品

の製造に用いられている。その理由はこれらの乳酸菌が人間の腸内菌叢に関与し、発癌物質の無毒化<sup>31)</sup>、血中コレステロールの上昇を抑制<sup>32,33)</sup>、免疫応答を高める<sup>34,35)</sup>等の人間の健康保持に対し貢献していることが明らかにされつつあるためである。現在ではこの保健効果について膨大な研究<sup>36-38)</sup>がなされており、今後、特定保健食品として発酵乳製品や乳酸菌そのものが非常に期待されている。

Table 2-3 に現在発酵乳製造に主に用いられる乳酸菌を示した。*Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus*, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *Lactobacillus helveticus*などの乳由来の乳酸菌のほかに腸内で有用な働きをする*Lactobacillus acidophilus*や*Bifidobacterium*属の菌株が用いられている。先進国で消費されている発酵乳製品の製造には古くは自然に生ずる発酵により作られていたが、現在ではコントロールされた条件下で製造されている。即ち、純粋培養された微生物のスターターカルチャーを用いて一定品質の製品を作りだしている<sup>39-41)</sup>。

乳酸菌という微生物を考えてみるならば、そのような属は存在しない。糖を発酵しエネルギーを獲得するプロセスで最終生産物として消費された糖に対し50%以上の乳酸を生成する一群のグラム陽性微生物を乳酸菌 (Lactic acid bacteria) と総称している。球菌としては、*Streptococcus*属、*Lactococcus*属、*Pediococcus*属、*Leuconostoc*属、*Enterococcus*属が含まれる。桿菌としては*Lactobacillus*属、*Spololactobacillus*属が含まれ、これに*Bifidobacterium*属 (乳酸生成量は50%以上にはならない) を含めるのが一般的である。グルコースを糖源とした場合最終産物として85%以上が乳酸となるホモ発酵と乳酸、エタノールおよび二酸化炭素が最終産物であるヘテロ発酵の二つの糖代謝経路がある。これに加えて、ペントース代謝経路の有無により更に、偏性ホモ、通性ヘテロ、偏性ヘテロに分けられる。乳酸菌は光学異性体 (D型、L型またはその混合体)

の乳酸を生成する。環境条件が発酵生産物のバランスに影響するが、代謝経路や生産される乳酸の旋光性のタイプは個々の種で異なっており、乳酸桿菌では分類上のキーとなっている。

現在、発酵乳製造に用いられているスターターカルチャーは発酵により作りだされる最終製品の官能的好ましさや製造特性（酸生成速度など）を指標に選択されてきた。自然界からのスクリーニングするという方法はそれなりに成功するけれど、望ましい性質を有する株を得ることは難しい。更に改良された菌株を得るためのスクリーニングに膨大な人と時間が費やされてきた。そこで、変異剤処理や紫外線照射等による変異株の取得が試みられてきた。*Lactobacillus*に対するNTGのような変異剤処理や照射により興味ある結果が報告されている<sup>42-44)</sup>。NTG処理やUVおよび $\gamma$ 線照射によりプロテアーゼのレベルや酸生成能の上昇した*Lactobacillus casei*や*bulgaricus*が単離されている。しかし、この方法においても膨大なスクリーニングを行わなくてはならない。

最近、遺伝子組み換え技術の進歩に伴い、遺伝子組み換え技術を用いた分子育種が大腸菌、酵母をはじめ種々の菌種で行われるようになり、乳酸菌においても遺伝子組み換え技術を応用した分子育種が考えられるようになってきた。酪農乳酸菌においてはMcKayを中心とした乳酸球菌の研究<sup>45)</sup>に端を発し乳酸菌の分子育種が開始され、チーズを大量に生産している欧米で、ファージ耐性賦与を中心に研究<sup>46)</sup>が進められてきた。しかし、乳酸桿菌は球菌に比べてかなり遅れて研究が着手された。桿菌では形質転換にプロトプラストを用いなければならないため、個々の株についてその調製・再生条件を決めなければならないという煩雑さのため研究が進展しなかった。しかし、1987年にChassyとFlikingerがエレクトロポレーションによる*Lactobacillus casei*の形質転換を報告して以来<sup>47)</sup>、形質転換が容易となり、乳酸桿菌に関する研究は急速に進展しはじめた。

乳酸菌の遺伝的研究は1970年代に、糖の輸送機構<sup>48-51)</sup>、解糖系における制御部位の解析(糖代謝の制御)<sup>52)</sup>、遺伝的研究をするための遺伝子導入系の研究のほか、プラスミドの存在とその機能解析等が行われはじめて以来、世界的に多くの研究者が乳酸菌の遺伝子に関する研究に着手し、知識が蓄積し始めた。1980年代に入りプラスミドに関する研究、組換えDNA手法を乳酸菌への応用を可能とさせるエレクトロポレーションを含めた形質転換法の開発、クローニングベクターの開発、遺伝子のクローニングと塩基配列の決定、遺伝子発現シグナル等の特性解析等がなされた。1990年代に入り蓄積した乳酸菌に関する知識を応用する段階に入ってきている。即ち、発酵乳製品のフレーバーや品質の改善を行なうため遺伝子工学的手法により株の改良を実施することや乳酸菌中での種々の遺伝物質の発現を可能とする多くの株を探索する方法の実用化が現実性を帯びてきた。

産業上、発酵乳製品の製造に種々の乳酸菌を使用し、その改良に多くの努力が払われてきている。その中でチーズやヨーグルトの製造に重要な役割を担ってきた*L. helveticus*が着目されてきた。*L. helveticus*は45℃で良く生育し、最高生育温度50~52℃である高温性乳酸桿菌である。糖の代謝型式から偏性ホモ乳酸桿菌に分類されており、乳酸旋光性はDL型である。16S rRNAの塩基配列による系統分類より*Lactobacillus acidophilus*に類縁の菌種<sup>53)</sup>とされており、染色体DNAのホモロジーにおいても*L. acidophilus*に対し13~44%とかなり高い相同性を示している<sup>54)</sup>。1974年に刊行されたBergey's Manual of Determinative Bacteriology<sup>55)</sup>では、これまで発酵乳の製造に用いられてきた高酸型の*Lactobacillus jugurti*と呼ばれてきた菌種は*L. helveticus*のマルトース発酵能を欠く変種(biotype)に分類され、*L. helveticus*に統合された。

ユーゴスラビア地方の発酵乳より単離された103株の乳酸桿菌のうち30%は*Lactobacillus helveticus*(当時は*L. jugurti*と分類されていた)、70%は

*Lactobacillus bulgaricus*と同定されている<sup>56)</sup>。ブルガリア地方の発酵乳より単離された125株の乳酸桿菌においても同様の結果が得られている<sup>57)</sup>。このように古くより発酵乳の製造に係わってきた*L. helveticus*は日本国内においても実際に発酵乳の製造に使用されている。しかし、酸生成能がよいため保存中の酸度上昇が速くプレーンタイプの発酵乳には使用しにくい面がある。また、その爽やかな酸味を利用して甘味剤を添加したスイートタイプの発酵乳にも用いられている。また、*L. helveticus*は蛋白質分解活性が強いことからチーズの製造に用いられてきた。近年、*L. helveticus*の菌体または酵素を利用したチーズの速醸について多くの研究が報告されている。*Penicillium caseicolum*の粗プロテアーゼと*L. helveticus*の組み合わせにより通常3月かかる熟成が僅か20日で熟成したことが報告されている<sup>58)</sup>。また、チェダーチーズやゴータチーズの熟成とフレーバー産生<sup>59,60)</sup>、モザレラチーズの速醸<sup>61)</sup>についても報告されている。しかし、前述したように官能的好ましさや製造適性等全てを満たす株を自然界からスクリーニングすることは困難である。

以上述べたように乳酸菌に期待される分野が拡大されるならば菌株の分子育種が必須となるであろう。しかし、組換え体を食品に利用するには現在のところ問題がある。それは発酵乳製品の製造に用いられる乳酸菌は殺菌されることなく生きてそのまま摂取されるからである。常に安全性が最優先である食品分野ではその組換え体の安全性を充分評価することが必要である。

食品分野での組換え体の使用に関して、厚生省より、酵素、アミノ酸等の菌体を含まない単一物質生産についての運用指針が出され、1992年4月1日より運用されている。菌体そのものを摂取する食品についての製造指針が出されるにはかなり時間を要すると思われるが、組換え植物の利用を含め組換え体そのものを食する食品が認可されていくのは世界的趨勢である。しかし、たとえ安全性が確認されても

一般大衆が受け入れてくれるか (Public acceptance) どうかの問題である。この点に関しては正しい知識を一般大衆に十分に浸透させるための日常の活動が非常に重要であると考えられる。

なお、昔から菌体そのものが発酵食品と一緒に食されてきた乳酸菌は極めて安全性の高い宿主菌として認識されている。平成3年9月に改訂された組換えDNA実験指針においても *L. helveticus* を含めた多くの乳酸菌 (*Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus*, *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*) が安全性の高い宿主菌として記載されている。

**Table 2-1. Yoghurt and yohgurt-like product that have been identified in the Middle East and elsewhere.**

<b>Traditional name</b>	<b>Region</b>
Jugurt/Eyran/Ayran	Turkey
Busa	Turkestan
Kissel Mleka	Balkans
Urgotnic	Balkan Mountains
Leban/Laban	Lebanon, Arab
Zabady	Egypt, Sudan
Mast/Dough	Iran, Afganistan
Roba	Iraq
Dahi/Dadhi/Dahee	India
Mazun/Matzoon/Matsun/Matsoni	Armenia
Katyk	Transcaucasia
Tiaourti	Greece
Cieddu	Italy
Mezzoradu	Sicily
Gioddu	Sardinia
Tarho	Hungary
Fiili	Finland
Filmjolk/Filbunke/Filbunk/Surmerk/ Taettemjolk/Tettemelk	Scandinavia
Iogurte	Brazil, Portugal
Skyr	Iceland
Gruzovian	Yugoslavia
Donskaya/Varenetes/Kurunga/ Ryzhenka/Guslyanka	Russia
Tarag	Mongolia
Shosim/Sho/Thara	Nepal
Yoghurt/Yogurt/Yaort/Yourt/Yaourti/ Yahourth/Yogur/Yaghourt	Rest of the world("Y" is replaced by "J" in some case)

**Table 2-2. Industrial applications of *Lactobacillus* strains.**

<b>Product</b>	<b>Organisms used</b>
<b>Yogurt</b>	<i>Lactobacillus</i> , <i>Lactococcus</i> , <i>Streptococcus</i> , <i>Bifidobacterium</i>
<b>Fermented milks</b>	<i>L. acidophilus</i> , <i>L. casei</i> , <i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i>
<b>Cheeses</b>	<i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> , <i>L. helveticus</i>
<b>Soy sauce</b>	<i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>delbrueckii</i>
<b>Sour bread</b>	<i>L. sanfrancisco</i>
<b>Crackers</b>	<i>L. plantarum</i>
<b>Sauerkraft</b>	<i>L. plantarum</i> , <i>L. brevis</i>
<b>Kefir</b>	<i>L. kefir</i> , <i>L. kefiranofaciens</i> , <i>L. brevis</i>
<b>Sausages, meats</b>	<i>L. plantarum</i> , <i>L. reuterii</i>
<b>Silage</b>	<i>L. plantarum</i>
<b>Lactic acid</b>	<i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>delbrueckii</i>

**Table 2-3. Microorganisms used for fermented milk.**

Genus	species
<i>Lactobacillus</i>	<i>delbrueckii</i> subsp. <i>lactis</i> <i>delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> <i>acidophilus</i> <i>helveticus</i> <i>casei</i>
<i>Lactococcus</i>	<i>lactis</i> subsp. <i>lactis</i> <i>lactis</i> subsp. <i>cremoris</i>
<i>Streptococcus</i>	<i>salivarius</i> subsp. <i>thermophilus</i>
<i>Leuconostoc</i>	<i>mesenteroides</i> subsp. <i>cremoris</i>
<i>Bifidobacterium</i>	<i>longum</i> <i>breve</i> <i>infantis</i> <i>bifidum</i>

### 第3章 潜在性プラスミドpLJ1の単離と全塩基配列の決定

はじめに

*Lactobacillus helveticus*は古くより蛋白質分解活性が高いこと、酸生成能が高いことよりチーズやヨーグルトなどの発酵乳製品の製造に工業的に利用されてきた重要な微生物である。*Lactobacillus* 属にプラスミドが存在はすることは多く報告されている<sup>62-70)</sup>。しかし、その機能に関してはバクテリオシンの生産に関与していること<sup>71)</sup>、乳糖資化性に関与していること<sup>67,68)</sup>等が報告されているのみで、ほとんどのプラスミドは潜在性でありその機能は明らかでない。*L. helveticus*に関してはN-アセチル-D-グルコサミンの代謝と乳酸生成の遅延に関与する遺伝子がプラスミド上にコードされている<sup>65)</sup>という報告のみで、遺伝的情報はほとんどない状況にある。そこで工業的に重要な*L. helveticus*の遺伝子レベルの育種改良(分子育種)を目的として宿主-ベクターの開発に着手した。

ベクターとしては、宿主で複製するために必要な複製領域と形質転換体を選択するために必要な宿主で発現可能な選択マーカーおよび形質転換法が必要である。そこでまず、*L. helveticus*中で複製するために必要なori領域を*L. helveticus*が保有するプラスミドより得ることを目的として*L. helveticus*のプラスミドを検索し、ベクターとして用いるのに適当な潜在性プラスミドpLJ1を単離しその諸性質を検討した。

## 実験材料と実験方法

### 1. 供試菌株と培地及びプラスミド

*Lactobacillus helveticus* SBT2161 (潜在性プラスミド pLJ1 を保有する) は脱脂乳培地 (12% 脱脂乳, 0.5% 酵母エキス, 115°C で20分間滅菌) で37°C, 16時間培養した。これを3回繰り返した後, -20°C で保存した。実験に用いる時には *Lactobacilli* MRS培地 (Difco社製) で培養した。長期間保存する場合には MRS培地で培養後菌体を回収し, 15% glycerol入りMRS培地に懸濁し, -80°C で保存した。形質転換の宿主菌として用いた *Escherichia coli* HB101<sup>69)</sup> およびマキシセル法に用いた *E. coli* CSR603<sup>70)</sup> はLB培地<sup>71)</sup> を用い, 37°C で振盪培養した。*E. coli* の形質転換体の選択はアンピシリン (50  $\mu$ g/ml) を添加したLBプレートで行った。

塩基配列決定にはベクターとして pUC18<sup>72)</sup> を, マキシセル法用として pBR329<sup>73)</sup> を用いた。

### 2. プラスミドの調製

*E. coli* からのプラスミドの単離は Birnboim と Doly の方法<sup>74)</sup> に従って行った。*L. helveticus* からのプラスミドの単離は Birnboim 等の方法を改変し, 以下のように行った。MRS培地 10 ml より菌体を回収し 10 mM トリス-マリエイト緩衝液 (pH 6.5) で1回洗浄した。洗浄菌体を 1 M サッカロースを含む 10 mM トリス-マリエイト緩衝液 (pH 6.5) 100  $\mu$ l に懸濁後, 50  $\mu$ g/ml となるように N-アセチルムラミダーゼ SG (生化学工業社製) を加え 37°C に保持した。30分後, 0.2 N 水酸化ナトリウムに溶解した 1% SDS を 200  $\mu$ l 加え 37°C に保持した。15分後, 3 M 酢酸ナトリウム (pH 4.8) 150  $\mu$ l を加え氷中で1時間保持した。遠心分離 (15,000 rpm, 20分, 4°C) して得られた上清液に 400  $\mu$ l の TE (10 mM トリス塩酸緩衝液, 1 mM EDTA, pH 6.8) 飽和フェノールと 80  $\mu$ l のクロロフォ

ルム/イソアミルアルコール (24:1) を加えフェノール抽出を行った。3回抽出後、1 mlのエタノール (-20°Cに冷却したもの) を加え、-75°Cで10分間冷却遠心分離 (15,000 rpm, 20分, 4°C) した。得られた沈澱物を真空乾燥後30  $\mu$ l のTEに溶解して粗プラスミド溶液とした。大量に調製する場合はこれをスケールアップして行った。得られた粗プラスミドDNA溶液に1.01 倍の cesium chlorideを加え、更に2.5%のethidium bromide溶液 (10 mg/ml) を加えて十分混合後、cesium chloride-ethidium bromide 濃度勾配遠心 (38,000rpm, 15°C, 40時間) により精製した<sup>75)</sup>。

### 3. プラスミドの切断と解析

制限酵素による切断は至適塩濃度の緩衝液を用い、37°Cで1時間行った。電気泳動にはTBE (50 mM トリス-硼酸緩衝液, 10 mM EDTA, pH 8.3) にアガロースを0.7~2%に溶解したものをを用い、TBE中で電気泳動を行なった。電気泳動後、1  $\mu$ g/ml のethidium bromide溶液で染色して切断パターンの解析を行った。

### 4. *E. coli* のコンピテント化と形質転換

Hanahan の方法<sup>76)</sup>を改変して以下のように行った。LB培地で一晚培養した*E. coli* HB101を新しいLB培地に1%接種してOD<sub>660</sub>の比濁定量を行ないクレットメーター (Klett-Summerson Photoelectric Colorimeter) による測定値であるクレット値が20-30になるまで37°Cで振盪培養した。遠心分離して得られた菌体に1/3 容量の冷RF1 (100 mM RbCl, 50 mM MnCl<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O, 30 mM K-acetate, 10 mM CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O, 15% Glycerol, pH 5.8) を加え穏やかに懸濁し、氷中で30分間保持した。遠心分離して得られた菌体に1/12.5容量の冷RF2 (10 mM RbCl, 10 mM MOPS, 75 mM CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O, 15% Glycerol, pH 6.8) を加え穏やかに懸濁し氷中で保持した。15分後マイクロチューブに0.2 ml ずつ分注し、エタノールドライアイス中で瞬間凍結し、使用時まで-80°Cに保存した。-80

℃で保存されていたコンピテントセルを氷中でゆっくり溶解した。完全に溶解後、DNA溶液 (20  $\mu$ l 以内) を加え混合した。30分間氷中で保持後、42℃で90秒加熱した。この菌液を1 mlのLB培地に加え、37℃で1時間振盪培養後、選択用プレートに塗抹 (0.1 ml/プレート) し、37℃で17-20時間静置培養した。

#### 5. シーケンス

塩基配列はSangerらの方法<sup>77)</sup>に従って行った。また、Yanisch-Perronらの方法<sup>71)</sup>による段階欠損法により縮小化したプラスミドを基質として用いた。実際にはKilo-sequence用 Deletion kit (宝酒造社製) を用いて段階欠損したプラスミドを調製した。シーケンスはSequencing Kit (宝酒造社製) と[ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]dCTP を用いて行った。

#### 6. マキシセル法による蛋白質の検出

Sancerらのマキシセル法<sup>78)</sup>を改変して行った。形質転換した*E. coli* CSR603は1% カザミノ酸を含むM9培地で、クレットメーターの測定値 (OD<sub>660</sub>) が45になるまで振盪培養した。この菌体をUVで照射後100  $\mu$ g/mlのサイクロセリン存在下で16時間37℃で振盪した。10 mlの培養液より菌体を回収後、M9 緩衝液で洗浄した。この菌体を硫酸イオンを除いた最小培地5 mlに懸濁し、更に1時間飢餓処理後、最終濃度5 mCi/mlになるようにL-[<sup>35</sup>S]-メチオニンを加え振盪培養した。遠心分離により菌体を回収後、0.2 mlのサンプルバッファー (2% SDS, 5% メルカプトエタノール, 10% glycerol, 0.0005% BPB, 0.0625 M トリス塩酸緩衝液, pH 6.8) に懸濁した。これを100℃で2分間煮沸した。この菌体抽出液5  $\mu$ lをSDS-10% ポリアクリルアミドゲル (SDS-PAGE) にかけた。なお、活性バンドの検出はX線フィルムに感光させて行った。

## 結果

### 1. 制限酵素地図と塩基配列

*L. helveticus* 数十株のプラスミドを検索し, *L. helveticus* SBT2161中にベクター構築に適切な大きさのプラスミドを確認した。本株より潜在性プラスミドpLJ1を調製し, 超遠心法により精製した。精製標品を用い, 各種制限酵素のダブル切断後得られた電気泳動パターンよりサイズマーカーの移動度およびサンプルの移動度を測定し, DNA解析システム (DNASIS) によるコンピューター解析を行ない制限酵素地図を作成した (Fig. 3-1)。pLJ1を1ヶ所切断する制限酵素はAvaII, AccI, EcoRI, HindIII, KpnI, HpaI, PvuIIであった。

*E. coli* 用ベクターであるpUC18のHindIIIまたはEcoRI部位にpLJ1を連結したプラスミドを調製し, これを段階欠損法により縮小して塩基配列決定に用いた。その結果をFig. 3-2に示した。pLJ1は3,292 bpの塩基より成り, そのGC含量は35.3%であり, *L. helveticus* の染色体DNAのGC含量 (37~40%) に比べてやや低かった。また, 約41,155 Daの蛋白質をコードする1,059 bpのオープンリーディングフレーム (ORF) が確認された。このORFに対応するプロモーター領域と考えられる740番目に-35 (TTAAACA) 配列および765番目に-10 (ATTAAT) 配列が確認できた。またORFの開始コドンの7 bp上流にShine-Dalgarno配列 (AGGAG) を確認した。

### 2. ORFがコードする蛋白質の検出

マキシセル法を用いてpLJ1上のORFがコードする蛋白質について検討した。*E. coli* 用ベクターpBR329のHindIII部位にpLJ1を挿入したpLHP100, EcoRI部位にpLJ1を挿入したpLEP100で形質転換した*E. coli* CSR603を紫外線処理した後L-[<sup>35</sup>S]-メチオニンを取り込ませ, 生成された蛋白質をSDS-PAGEにかけ, その泳動パターンを調べた。その結果をFig. 3-3に示した。pLEP100および

pLHP100を保有する*E. coli* CSR603 (lane3, 4) ではテトラサイクリン耐性遺伝子で作られる蛋白質 (35 kDa) より大きい蛋白質のバンドが確認された。一方, *E. coli* CSR603そのもの (lane 1) またはベクターであるpBR329を保有する*E. coli* CSR603 (lane 2) ではそのようなバンドは認められなかった。また, 結果は示していないがORFが存在するpLJ1の*Xba*I-*Hind*III断片をpBR329の*Eco*RV部位に挿入し, マキシセル法による解析を行ったところpLEP100で検出されたバンドと同じ位置にバンドが確認された。従って, この未知蛋白質は1,059 bpのORFの産物であると結論した。

## 考察

*L. helveticus* 数十株のプラスミドを検索し、プラスミドの複製に必要な領域であるoriとして用いるのに適当な大きさである潜在性プラスミドpLJ1 (3,292 bp) を*L. helveticus* SBT2161より得た。本プラスミドは*L. helveticus* SBT2161で非常に安定に保持されている。制限酵素地図を作成し、クローニング部位として使用可能な7個のユニーク切断部位を確認した。そのうちのHindIIIおよびEcoRI部位を用いて*E. coli*用ベクターpBR329にpLJ1を挿入連結して得られたpLEP100とpLHP100は*E. coli*で安定に保持された。

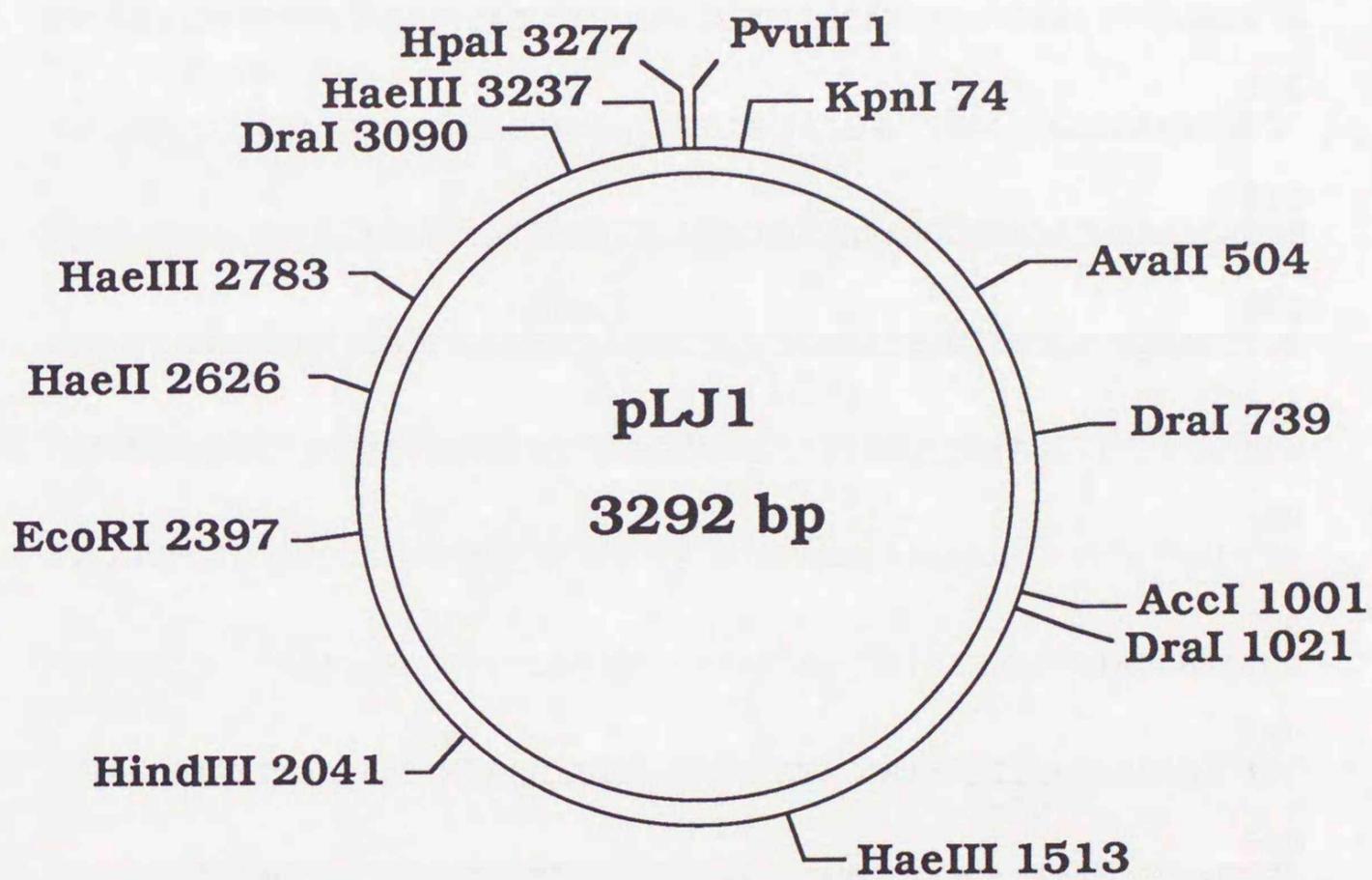
pLJ1の全塩基配列を決定しORFの検索を行い、何らかの遺伝子をコードしている1個のORFを確認した。また、マキシセル法によりpLJ1で確認されたORF (1,059 bp) が未知の蛋白質をコードしていることを確認した。*Lactobacillus* や *Bacillus* のようなグラム陽性菌では複製のイニシエーター蛋白質として約40 kDaの蛋白質が関与しているという多くの報告がある<sup>79-87)</sup>。pLJ1のORFの推定分子量は約41 kDaであることから、この未知蛋白質もイニシエーター蛋白質として機能している可能性が推定される。しかし、このORFのアミノ酸配列をMacMolly Tetraのホモロジー検索システムを用いSwiss Prot蛋白質データベースを対象にコンピューター検索を行なったが乳酸菌由来のプラスミドpLAB1000 (*Lactobacillus hilgardii*)<sup>86)</sup>、pLP1 (*Lactobacillus plantarum*)<sup>87)</sup>、および当社が乳酸球菌用ベクター開発に用いているpST1 (*Streptococcus thermophilus*)<sup>88)</sup>のRep蛋白質には類似性は見いだせなかった。この点については形質転換系を開発しORFの機能を検討することが必要である。また、pLJ1のEcoRIとHindIII部位はORFの外に存在することより本部位を用いて構築したpLHP100およびpLEP100はシャトルベクターとして使用することが可能であると推定される。

## 要約

*L. helveticus* SBT2161 より潜在性プラスミド pLJ1 を単離し，制限酵素地図を作成した。本プラスミドにクローニング部位として使用可能な 7 個のユニーク切断部位 (*Ava*II, *Acc*I, *Eco*RI, *Hind*III, *Kpn*I, *Hpa*I, *Pvu*II) を確認した。そのうちの *Eco*RI と *Hind*III 部位を用いて *E. coli* 用ベクター pBR329 に連結しシャトルプラスミド pLHP100 と pLEP100 を構築した。

Sanger らの方法により pLJ1 の全塩基配列を決定した。pLJ1 は 3,292 bp よりなり，GC 含量は 35.3% であった。また 1,059 bp よりなるオープンリーディングフレーム (ORF) が確認された。更に，この ORF のプロモーター領域 (-35 配列と -10 配列) とリボゾーム結合部位 (SD 配列) を確認した。この ORF のアミノ酸配列のホモロジー検索を Swiss Prot 蛋白質データベースを対象に行なったが類似配列は見いだせなかった。

マキシセル法によりシャトルプラスミド pLHP100 および pLEP100 上の pLJ1 の ORF が未知蛋白質をコードしていることが確認され，この蛋白質が複製に関与していることが推定された。



**Fig. 3-1. Restriction map of *L. helveticus* plasmid pLJ1. The *PvuII* site was arbitrarily chosen as the one reference point, and distances from it are indicated in bp.**

*PvuII* 60  
 CAGCTGTATTATAGCACGAAAAATTTTTAGCAATGTAAAATTCTAAAAATCTAAAAA

*KpnI* 120  
 GACAAATGTCAACGGTACCGGACTGAGCTTGCGAGGGAGGATAAGGAGTTGACATTTTGC

180  
 TGTCAAAACACTTGAAAACCAGGAGAAAGAATTTATTCTTTCTTCCTGCCTAACGGCGAG

240  
 TGATAAAAAATGGGCTATTCTAATAGCCCGTTACCCGTTCAAAAATTGAACCTTCAGTTG

300  
 CAAAAGTAGAAAAATTCGTTCTTTGTGTGAGTATGAAGTTACTCATAGAAAGATGAATAA

360  
 CTGGAGCATTTTTAGAAATGTTACCTATGACTACTTTTGCATGTATTAAATATTGGAATGG

420  
 TATGAATGCTCGATATGCTAGAGGATCATTGTCATTAACGTTTTACAGGAAAAGTATTGC

480  
 TGATAGATATGATACAAATTCACTATTTGGATACGACGAAAAGGTAAAATAAAAAGACAT

*AvaII* 540  
 CTGCTTGAGGATGGGGGCTAGGGGGTCCGACTCACGCAGATGCCTTTTGTTTCTATTTTC

600  
 CGTATCAAAGTTGCTTTTCATCATATTTAGCAAACCTTTATGCTGTAGGATTTTTATATA

660  
 ATTATGTATCTACTTATGGTAATATGTTTTATAGATAAACAAAAAAGCTCGCTTATCAG

720  
 ATTGGACTCCTAACGAACTTTTGATGGTTTTTAACATCTATAAGTATTATAACCAAATCG

*DraI* 780  
 ATTACGATTATCAATAATTTTAAACAGAAATCATTTATACTATAGATTAATAAAAACCTTC

-35 -10  
 840  
 ATTAGTTTGCAGGAGCGAGCTAATGGAGGTATTTTTTATGCGAAGATATAGTGCAACTCA  
 SD MetGluValPhePheMetArgArgTyrSerAlaThrGlu

900  
 GATTAATGCAGAACTTTTCTGGAAGTTTCCAAAATTTTTATCCATTAACAAAAAATATGT  
 nIleAsnAlaGluLeuPheTrpLysPheProLysPheLeuSerIleAsnLysLysTyrVa

960  
 AGGTCTAACCAACGATGATCGCATGGCTTACATGTTAATCAAAGATCGCTATCGATATTC  
 lGlyLeuThrAsnAspAspArgMetAlaTyrMetLeyIleLysAspArgTyrArgTyrSe

*AccI* 1020  
 TTTATCTAACAACTGGATAGATAAAGATAAAAATGTTTACGTCTACTTCACAATTGATGA  
 rLeuSerAsnASnTrpIleAspLysAspLysAsnValTyrValTyrPheThrIleAspAs

*DraI* 1080  
 TTTAAAAGAACTATTACATGTAGGAAAGAATAAAGTTACCAGAATCAAACAACATCTGAT  
 pLeuLysGluLeuLeuHisValGlyLysAsnLysValThrArgIleLysGlnHisLeuIl

**Fig. 3-2. continued**

1140  
 TGATTATGGATTATTGGAAATTGTTAAACAGGGTTTTGATCCTCAAAACAAAAGAATTA  
 eAspTyrGlyLeuLeuGluIleValLysGlnGlyPheAspProGlnAsnLysLysAsnTy

1200  
 TCCCGACCGAATCTATTTACTACAACCAGAATACGATCCAACCGACTTAATTTCACAAAG  
 rProAspArgIleTyrLeuLeuGlnProGluTyrAspProThrAspLeuIleSerGlnSe

1260  
 TTCACATGCTTCAGCCTTAGAGCAGAGCGGAATCCCCAAAATGGGGACTCGATACCAAAA  
 rSerHisAlaSerAlaLeuGluGlnSerGlyIleProLysMetGlyThrArgTyrGlnAs

1320  
 TGAAGGAAATCTTGATAATAAAGGAAAGTCTGATAGTGAAAATTGCAACAAGGACACTTC  
 nGkuGlyAsnLeuAspAsnLysGlyLysSerAspSerGluAsnCysAsnLysAspThrSe

1380  
 AGCCTTAGAGCAGAGCGGAATCCCCAAAATGGGAGCAAATAAAGATAATAATTCCTCAGA  
 rAlaLeuGluGlnSerGlyIleProLysMetGlyAlaAsnLysAspAsnAsnSerSerAs

1440  
 TACTATTAAAGATACTATTAAAGATACTGACCAGTGGAAATTTTTCTACGAATAATTACAC  
 pThrIleLysAspThrIleLysAspThrAspGlnTrpAsnPheSerThrAsnAsnTyrTh

1500  
 CCCAGAACAAGTAACCGCACAGAACCAAGATTTACTTAGTCACTTAGGAGAGACGCTCAC  
 rProGluGlnValThrAlaGlnAsnGlnAspLeuLeuSerHisLeuGlyGluThrLeuTh

*HaeIII* 1560  
 AGGCGATAAGGAGGCCCTATGTTCTAAACAAGATTCTATCAACTTGATTGCTAAATG  
 rGlyAspLysGluAlaProMetPheLeuAsnLysAspSerIleAsnLeuIleAlaLysTr

1620  
 GTTTAGAACACCTGAGGGAGCTTCAGAATGCATCAGTACAATCCTTAACGCTGCTAATGA  
 pPheArgThrProGluGlyAlaSerGluCysIleSerThrIleLeuAsnAlaAlaAsnAs

1680  
 CAGTCGAAATAATGCTGAATCACAAATTGGACACCATGAACTATACTTTGAGGATTACAA  
 pSerArgLysAsnAlaGluSerGlnIleGlyHisHisGluLeuTyrPheGluAspTyrAs

1740  
 TAATGAATTAAGAGAATGATTACTAATCGTTTGAGAAGATACTTTAACAAGATGAGAAC  
 nAsnGluLeuLysArgMetIleThrAsnArgLeuArgArgTyrPheAsnLysMetArgTh

1800  
 TGCTAAAGATGGCAAGATCAAGAATCCTAAGAATTATTTATACGTATCTATGAGAAATAT  
 rAlaLysAspGlyLysIleLysAsnProLysAsnTyrLeuTyrValSerMetArgAsnMe

1860  
 GTTTGATAAATGGCAGAATGATGTTCTAATGGCGGAAAAAGATAAAGCTAACAATAAAGA  
 tPheAspLysTrpGlnAsnAspValLeuMetAlaGluLysAspLysAlaAsnAsnLysAs

1920  
 CTAACGTGATTAACGTTAAAGCAACAGTTAAAAGAGCAGAAAGAGCAATATGAGCAAGTA  
 p

1980  
 GTAGCATCTAAAATGAGACTATATCTTCTTTGCAAAGTCATATGAGGACATGAAGTCT

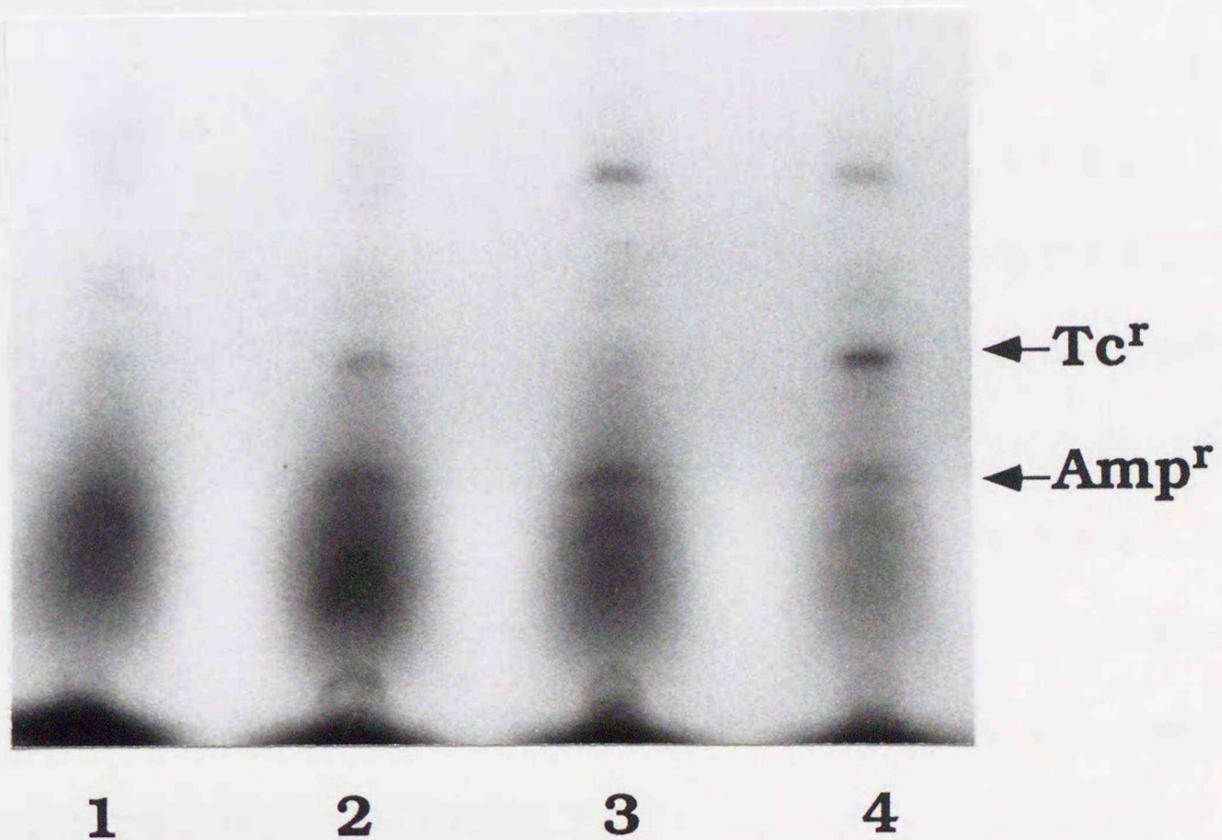
**Fig. 3-2. continued**

CAGTTGAGCGTGAAGGATAATCAAATATCTACCTTAACTCAACTTGCAGACCAGGCGCAG 2040  
*Hind*III 2100  
 AAGCTTAATTTAGTTGATAAAGCACCAAAAAGATTAGAATCTGATATTGAGACGAAGCGT  
 GAGAGTTCAAGTTCATCAGGCTTTGGGTTTGGTTAGTCTGTCAACTCCTTAAAGCCTCCA 2160  
 AGAGGGGGCTAATATCGCCTGTAAGGCTCAATAAGCCCCTCTAAGTCGATTTATCGTTGA 2220  
 CAGACAGCTAAATATATCACTGCTAGCTAAAATTGTTTAGAACGCAAATATGAGCCTTTT 2280  
 AGAGCTATCCAAATAATTGCAACGTTCAAAACAGAAAAAGTTCAGTCGCAAGCTCCTTCG 2340  
 AACTTTTTCTGTTTTGAATGTTTTAACTGACGCAGTCAGTTTCGTTTGAGCAACGCGAAT *Eco*RI  
 TCTGATACAGGTTTTAGCACGAAATACAACCTGATTTATCTTGTGTGTGTAAGTGCGCCC 2460  
 TTACCCAAAACCTTGGGTAACAAACGGCGACTCATTCAACATGACGTGTAAGTGCGCATT 2520  
 TCATGATAATGCGCACTTACACATAGAATTAATTCTATGTCGTGCTCTCTGACAAAAAAT 2580  
 GTCAGAATGCGCATTTACACCCCACTAAAAAAAACATGGGGTTACAGCGCTTAAAATTTT 2640  
 GTATCAGAAGTCGGCTCGCCGACAACAAGAAAAGGTGCTCGATTCGAGCACCTTTTCTTG 2700  
 TTTATATTATTTAATCCTTAGCTACGTTACGCCGGTGAAGTAACAGCTCATTAACAGTCA 2760  
 CATTAATCGGCAATTCTAGTGCGGCCACCCTGGGGGGGTGCAAATGCCACTAAAAGGAAA *Hae*III 2820  
 CCCGGAATAATTAAAAACAGTTTAGAAAAACCCACACGTTTCAATTCGCTTCGTAAAG 2880  
 CCTTGCACCAACAAAATAATTCCGATAATTGCGGAAAGTATCATTACCCAAAAGCCCATC 2940  
 ATTCTCCTTCCTTTAGCATTTTTTTACTCGCTTCGTTCCCTCTTCTCTAATATTTTACC 3000  
 AGTTTCTTTGTTAATCTGTGGCTTACGATTATATCTATGTAAGACACATAATAGAGCTAA 3060  
 AGGTAATCGATGATAAACTTTGTGAAATTTTAAAATATGCAAAAACAAAAGTTTGATT *Dra*I 3120

**Fig. 3-2. continued**

TAATAGGTTTTATCAATTGTGTCAGGCTTGTTTTCACAAAGTGATTTTCTTTGCTCTGTG 3180  
AAGCCTTGCAGCTCTAGCAATTCGTTTAATGGGCATTATGTAAAGTTAAATCAAAGGCC *HaeIII*  
CCTTAGAAATTTCTCTAAGAGGTCTTTTTCTTTCAAGTTAACTGTGTTGA *HpaI* 3292

**Fig. 3-2. Complete nucleotide sequence of pLJ1. The deduced amino acid of the unknown protein corresponding to the 1,059-bp open reading frame is shown. The putative promoter regions are underlined. The Shine-Dalgarno sequence is indicated by SD.**



**Fig. 3-3.** Autoradiogram of L- $[^{35}S]$ methionine-labeled proteins produced in *E. coli* CSR603(lane 1) and *E. coli* CSR603 carrying pBR329(lane 2), pLHP100(lane 3), and pLEP100(lane 4).  $Amp^r$ , ampicillin resistance gene product(28-kilodalton).  $Tc^r$ , tetracycline resistance gene product(35-kilodalton).

#### 第4章 *Lactobacillus helveticus* の形質転換法の検討

はじめに

酪農乳酸桿菌におけるDNAの伝達については *Enterococcus faecalis* 由来のエリスロマイシン耐性を有する pAM $\beta$ 1<sup>89,90)</sup> が種々の乳酸桿菌属間で接合により伝達されることが報告されている<sup>91)</sup>。また、プロトプラストを用いた形質転換法について検討され、*Lactobacillus reuteri*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei* で形質転換の成功が報告されている<sup>92-94)</sup>。しかし、本法は用いる菌株ごとにプロトプラストの調製条件と、その再生条件を検討しなければならないという煩雑さがあり、一般的方法とはいえない。そこで考えられたのがエレクトロポレーション法である。本法は様々なタイプの真核細胞の形質転換に通常用いられてきた<sup>95-97)</sup>。最近、乳酸菌を含めた様々な原核生物の細胞も本法で形質転換されることが数多く報告されている<sup>47,98-102)</sup>。

そこで、第3章で報告したシャトルプラスミド pLHP100 を土台とした、*L. helveticus* で発現可能な *E. faecalis* 由来の pAM $\beta$ 1 のエリスロマイシン耐性遺伝子を挿入連結した pLHR を構築し、エレクトロポレーションによる *L. helveticus* SBT2161C の形質転換法について検討した。

## 実験材料と実験方法

### 1. 使用菌株とプラスミド

組換えプラスミド構築用の宿主として *E. coli* HB101 [ $F^-$ ,  $Pro^-$ ,  $Gal^-$ ,  $Sm^r$ ,  $Rec^-$ ,  $r_B^-$  (restriction activity loss),  $m_B^-$  (modification activity loss)]<sup>69)</sup> を使用した。また, *Lactobacillus helveticus* SBT2161C (潜在性プラスミド pLJ1 を保有する *L. helveticus* SBT2161 より自然にプラスミドが脱落した誘導体) を形質転換実験の宿主菌として使用した。 *L. helveticus* の培養は MRS 培地を用い, 37°C で行った。形質転換体の選択プレートとして *L. helveticus* に対しては 30  $\mu$ g/ml のエリスロマイシンを含む MRS プレートを使用した。また, *Escherichia coli* に対しては 200  $\mu$ g/ml のエリスロマイシンを含む LB プレートを使用した。

pLHR の構築のために *L. helveticus* SBT2161 由来の pLJ1<sup>103)</sup>, *E. coli* 用ベクター pBR329<sup>72)</sup>, *E. faecalis* 由来の pAM $\beta$ 1 のエリスロマイシン耐性遺伝子を有するプラスミド pVA838<sup>104)</sup> を用いた。

なお, *L. helveticus* SBT2161C の形質転換には, 特に断らない限りは *E. coli* HB101 より調製し, 超遠心法で精製したプラスミド pLHR を用いた。

### 2. 形質転換法

エレクトロポレーション法による *L. helveticus* の形質転換には Gene Pulser (Bio-Rad 社製) を使用した。本装置ではコンデンサーからの放電により作り出されるパルスは指数的減衰波形を描く。時間定数 (time constance,  $\tau$ ) はその系の全抵抗 (R) と電気容量 (C) に依存し  $\tau = RC$  の関係式で示される。そのため,  $\tau$  は減衰波形を描き, 電場の強さ (V/cm) が, 最初の値の  $1/e$  (36.8%) に減少するのに必要とされる時間を意味する。

MRS 培地で一晩培養した *L. helveticus* SBT2161C を新しい MRS 培地 (グリシン添加または無添加) に 5% 接種し, 37°C で培養した。適当な時間培養後, 遠心分

離で菌体を回収し、培養液と等量のエレクトロポレーション用緩衝液（7 mM HEPES, 272 mM サッカロース, 1 mM  $\text{MgCl}_2$ , pH 7.4）で1回洗浄した。この洗浄菌体を培養液の1/10量の氷冷したエレクトロポレーション用緩衝液に懸濁し、10分間氷冷した。電極幅、0.4 cm のエレクトロポレーション用キューベットに菌体懸濁液（ $1-2 \times 10^8$  CFU/ml）を0.8 ml 入れ、更に、プラスミド溶液（ $50 \mu\text{l}$  以下）を加え、よく混合した。これを装置に装着し、1回パルスした菌体を10 ml のMRS培地に加え、エリスロマイシン耐性遺伝子を発現させるために $37^\circ\text{C}$ で2時間静置後、 $30 \mu\text{g/ml}$ のエリスロマイシンを含むMRSプレートに塗抹し、 $37^\circ\text{C}$ で2日間嫌気ジャー（BBL GasPak Anaerobic system）で培養した。

## 結果

### 1. 抗生物質耐性マーカーを有するプラスミドpLHRの構築

*L. helveticus* SBT2161CへのDNAを導入するための方法としてエレクトロポレーション法の可能性を検討するために適当なプラスミドが必要である。そのプラスミドは*L. helveticus* 中で複製され、かつ選択可能な抗生物質耐性が発現することが必要である。しかし、そのような遺伝的マーカーを保有するプラスミドは*L. helveticus* では見出されていない。そこで、pLJ1を土台とした選択マーカーを有するベクターの構築を行った。第3章でのべたpLHP100 (pBR329のHindIII部位に*L. helveticus* SBT2161 由来のpLJ1を挿入連結したもの) をBamHI-AvaI 切断する。また、*L. helveticus* で発現することが知られているエリスロマイシン耐性遺伝子 (*E. faecalis* が保有するpAM $\beta$  1由来)<sup>105)</sup> が存在するBamHI-AvaI 断片をpVA838より切りだした。両者を連結し、*E. coli* を形質転換した。アンピシリンおよびエリスロマイシン選択で得られた形質転換体より得られたプラスミドをpLHRと命名した (Fig. 4-1)。制限酵素切断による解析から本プラスミドは連結部分であるBamHI部位を含む約0.4 kbを欠落していることが判明したが、この欠落はエリスロマイシン耐性遺伝子の発現には影響は与えていなかった。

以後の*L. helveticus* の形質転換実験に本プラスミドを用いた。

### 2. エレクトロポレーション条件の検討

予備実験でグリシンを添加したMRS培地で22時間培養した*L. helveticus* SBT2161Cの菌体を用い、5 kV/cm (セットボルト2 kV) でエレクトロポレーションを行ったところ多くの形質転換体を得た。そこで、エレクトロポレーションによる形質転換に影響を及ぼすと考えられる条件について検討した。

#### 1) 生育培地におけるグリシン濃度

MRS培地に添加するグリシン濃度を变化させて22時間培養して得られた菌体を

用いてエレクトロポレーションによる形質転換効率に対するグリシン濃度の効果を調べた。なお、5 kV/cm (セットボルト2 kV)、電気容量は25 $\mu$ Fで1回パルスを行った。その結果をFig. 4-2に示した。グリシンは過剰に存在すると*L. helveticus* SBT2161Cの生育を阻害する。1.2%添加で生育阻害がかかりはじめ、図には示していないが3%ではほぼ完全に阻害された。しかし、形質転換率は生育阻害がかかりはじめる1.2%グリシン添加で培養した菌体で最高の形質転換効率(350形質転換体/ $\mu$ g DNA)が得られた。なお、pLHR非存在下でエレクトロポレーションを行っても、またはpLHR存在下でエレクトロポレーションを行わずに選択プレートに塗抹してもエリスロマイシン耐性コロニーは得られなかった。本菌はグリシン非存在下では非常に長い菌体が連鎖した状態で生育しているが、グリシンを添加すると連鎖が切れるとともに短桿菌に変化することが認められた。

## 2) 電圧

グリシン存在下で22時間培養した菌体を用い、エレクトロポレーションによる形質転換に対する電圧の影響を調べた。その結果をFig. 4-3に示した。最高の形質転換率は4 kV/cm (セットボルトは1.6 kV)で得られた。なお、検討した電圧の範囲では時間定数(time constant)はほぼ一定(10-15msec)であった。また、電圧4 kV/cmに固定し、25, 3, 1 $\mu$ Fの各電気容量については調べたところ25 $\mu$ F以外では形質転換体は得られなかった。

## 3) 生育期

1.2%グリシンを添加したMRS培地で生育した菌体を用いて、形質転換効率に対する生育期の影響を調べた。培養時間により菌濃度が異なるため菌濃度を一定に調整後、実験に用いた。その結果をFig. 4-4に示した。エレクトロポレーションによる乳酸菌の形質転換に関する報告では全て対数増殖期で高い形質転換効率を得られている。しかし、本菌では培養8-9時間(対数増殖後期)までの菌体では形質転換

体を得ることができなかったが、培養22~23時間（定常期後期）で最高の形質転換効率（500形質転換体/ $\mu$ g DNA）を得た。得られた形質転換体よりプラスミドDNAを抽出し、*Hind*III, *Eco*RI, *Pvu*Iで切断した。同様に*E. coli* HB101より抽出したプラスミドDNAを切断し、両者の制限酵素切断パターンをアガロース電気泳動で比較したところ全く同様の切断パターンが得られた（Fig. 4-5）。

#### 4) エレクトロポレーション時の温度

パルス前後の温度の影響について検討した。パルス前の温度を室温（25℃）と氷中10分間保持、パルス後、室温10分間保持と氷中10分間保持をそれぞれ組み合わせてパルス処理を行った。その結果を結果をTable 4-1に示した。パルス前の冷却は形質転換効率に大きく影響していた。一方、パルス後の温度は形質転換効率にはあまり影響を及ぼしていなかった。

#### 5) エレクトロポレーション用緩衝液のpH

エレクトロポレーション用緩衝液としてHEPES緩衝液を用いているが、この緩衝液のpHについて検討した結果をFig. 4-6に示した。pH 6.5では著しく形質転換効率は低下した。最高の形質転換効率はpH 7.4で得られた。また、結果は示していないが、pH 7.4のトリス-塩酸緩衝液とリン酸緩衝液を用いた場合は形質転換効率は1/10に低下した。

#### 6) DNA量

標準条件下で添加するDNA量の効果について検討した結果をFig. 4-7に示した。5 $\mu$ gまでは添加量に比例して形質転換効体（形質転換効率は300形質転換体/ $\mu$ g DNA）は増加し、それ以上では飽和した。

#### 7) パルス回数

形質転換効率に対するパルス回数の影響を検討した結果をTable 4-2に示した。複数回パルスする時は、1回パルスするごとに氷中で10分間冷却した。1回のパル

スで最高の形質転換効率を得られた。回数が増えるに従って形質転換効率が低下するのはパルスによる菌体損傷が多くなり、生残率が低下するためと推定された。

### 3. 制限・修飾系について

プラスミドDNAの単離源は*L. helveticus* SBT2161Cの形質転換効率に著しく影響を与える。pLHRを保有するSBT2161Cより単離精製したpLHRを用いSBT2161Cを形質転換すると $1.3 \times 10^4$ 形質転換体/ $\mu\text{g}$  DNAの高い形質転換効率を得た。一方、pLHRを保有する*E. coli* HB101より単離精製したpLHRでは $3 \times 10^2$ 形質転換体/ $\mu\text{g}$  DNAの形質転換効率しか得られなかった。また、制限・修飾系欠損株である*E. coli* HB101に対する形質転換効率はSBT2161CおよびHB101より単離精製したpLHRはいずれもほぼ $10^6$ 形質転換体/ $\mu\text{g}$  DNAオーダーの形質転換効率であった (Table 4-3)。

## 考察

これらの結果は*L. helveticus* SBT2161Cの細胞はエレクトロポレーションにより容易に形質転換できることを示している。一般的に、エレクトロポレーションにおいては、使用する電圧条件が形質転換効率に影響する重要なファクターであり、その至適値は対象となる細菌の属や株に依存していることが知られている。SBT2161Cにおいては形質転換効率は電圧4 kV/cmまでは増加するが4.5 kV/cm以上では低下した。これは高い電圧のため細胞膜が致命的損傷を受け再生することができなくなったためと考えられる。

最高の形質転換効率 ( $1.3 \times 10^4$  形質転換体/ $\mu\text{g}$  DNA) は1.2% グリシンを含むMRS培地で37°C, 22時間培養して得られた菌体を用い、電圧4 kV/cm, 電気容量25  $\mu\text{F}$ で得られた。これらがエレクトロポレーションによる*L. helveticus* SBT2161Cの形質転換の至適条件である。pLHRを保有しない*L. helveticus* SBT2161Cは1  $\mu\text{g}/\text{ml}$ のエリスロマイシンを含む培地で生育できないのに対し、pLHRで形質転換したSBT2161Cは1 mg/mlのエリスロマイシンを含んだ培地でも生育可能であった。*L. helveticus* SBT2161C (pLHR) より単離したプラスミドDNAの大きさや制限酵素切断パターンにおいて検出可能な変化は認められないことは形質転換されたプラスミドDNAは欠失や再配列等は受けていないことを示している。SBT2161Cの形質転換効率に対する他の重要な因子はエレクトロポレーションに用いる菌体の生育培地へのグリシンの添加である。生育培地にグリシンを添加すると細胞壁中のL-アラニン残基はグリシンに置換され、その結果、細胞壁の架橋構造がゆるんでくる<sup>106)</sup>。そのため、エレクトロポレーションによりプラスミドDNAが菌体内に導入されやすくなったものと推定される。生育培地にグリシンを添加しないと形質転換体は全く得られない。また、MRS培地に1.5%以上のグリシンを添加するとSBT2161Cの生育阻害が生じ、形質転換効率も低下した。

生育時期もまた形質転換効率に大きく影響している。*L. plantarum*<sup>98)</sup>, *Clostridium perfringen*<sup>99)</sup>, *L. casei*<sup>100)</sup>, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*<sup>101)</sup> など殆どの細菌では対数増殖中期や後期の菌体を用いたエレクトロポレーションで最高の形質転換効率を得られている。しかし、SBT2161Cは対数増殖中期か後期の菌体では殆ど形質転換体は得られない。最高の形質転換効率は定常期後期（22～23時間培養）で得られる。

パルス時の菌液の温度は室温に比較し氷中に保持したものでは形質転換効率は10倍高かった。このことから温度がパルスにより生じた細胞膜の穴の修復に何らかの影響を与えているものと推定される。

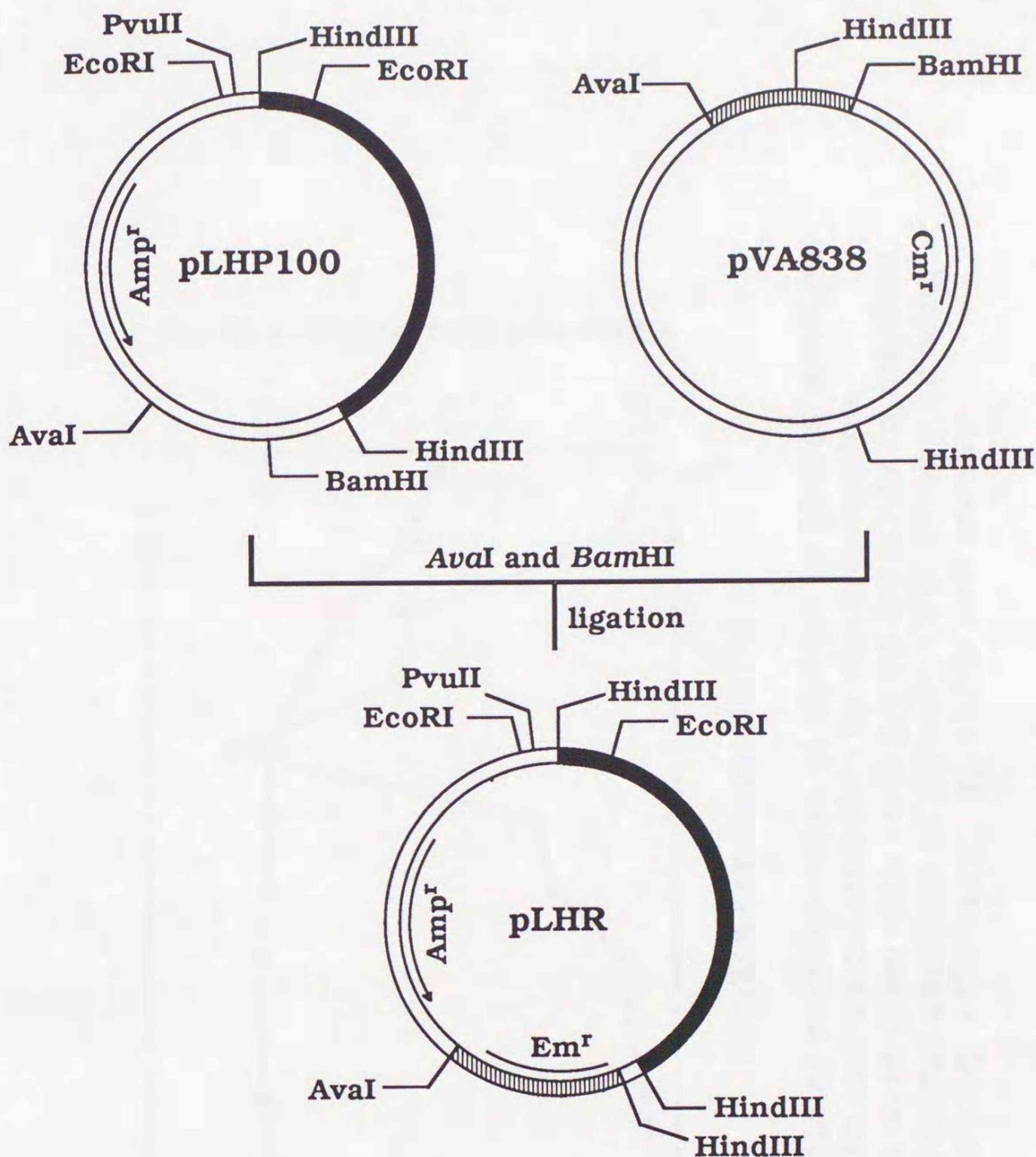
制限・修飾系は外来性DNAを制限酵素で分解することにより菌体内へのDNAの侵入を阻害し、自己のDNAはメチル基で修飾することにより自己の制限酵素による切断を回避する機構である。この系の存在は形質転換効率を著しく低下させることが予測される。LangellaとChopinは*Lactococcus lactis* subsp. *lactis*のエレクトロポレーションによる形質転換の効率は制限・修飾系の存在の有無に係わらず影響されないと報告している<sup>107)</sup>。一方、強い制限・修飾活性を有する*Campylobacter jejuni*ではエレクトロポレーションによる形質転換の効率は著しく低くなると報告されている<sup>102)</sup>。*L. helveticus* SBT2161Cでは*L. helveticus*より単離したプラスミドDNAで形質転換した場合に比べ、*E. coli*より単離したプラスミドDNAによる形質転換効率を2オーダー低下させる程度の制限・修飾活性を有することが示された。*E. coli*より単離したプラスミドDNAを用いた*L. helveticus* SBT2161Cの形質転換効率は $10^2$ オーダーであり、*Clostridium perfringen*<sup>99)</sup>, *L. casei*<sup>100)</sup>, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*<sup>101)</sup>で得られている形質転換効率よりかなり低い。この低い形質転換効率のため、*L. helveticus* SBT2161Cで組換えプラスミドDNAを直接ショットガンクローニングすることはできない。即ち、*E. coli*で組換え操作

し形質転換体より抽出したプラスミドDNAをSBT2161Cに導入しなければならない。そのためには*E. coli* と *L. helveticus* のシャトルベクター系で用いる必要がある。

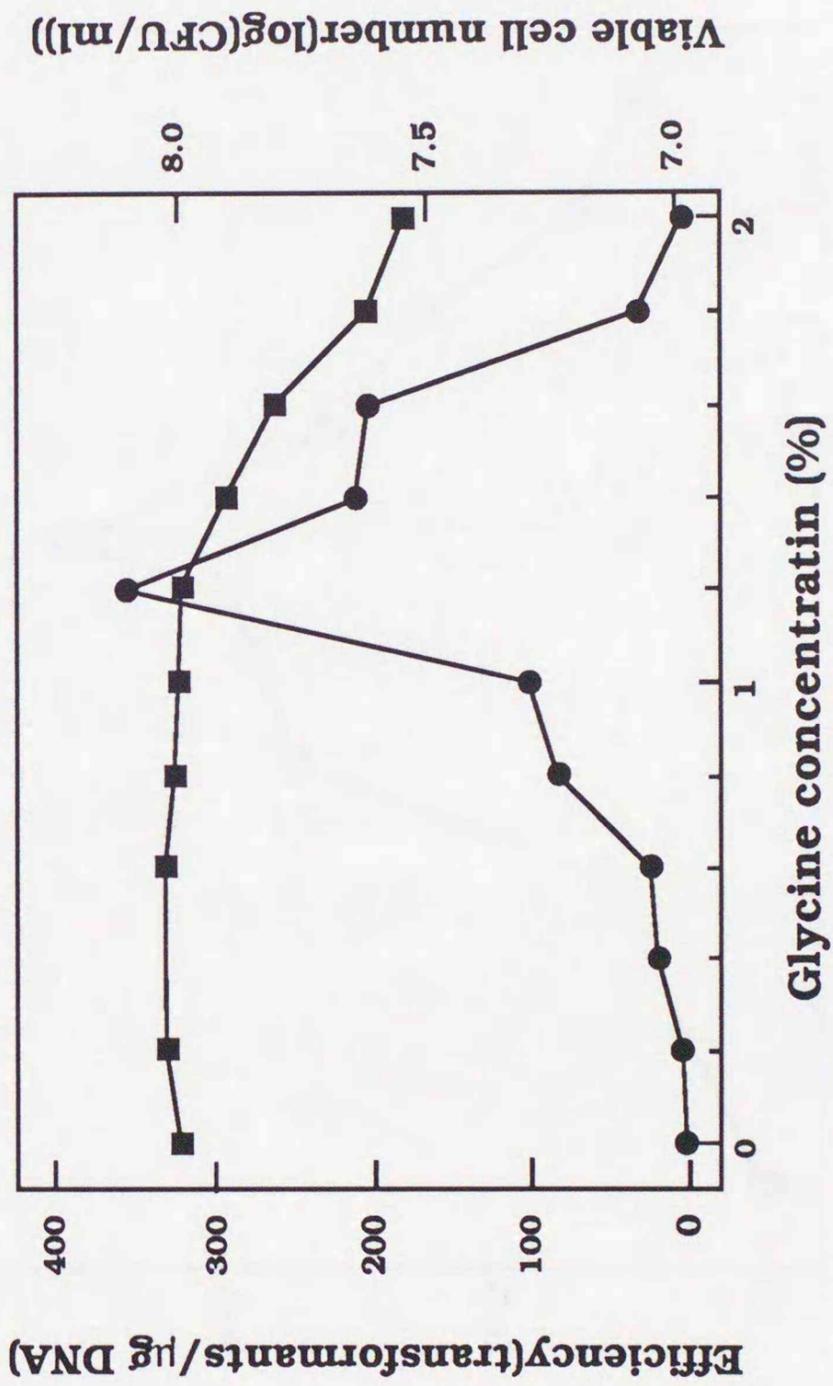
## 要約

エレクトロポレーションによる *L. helveticus* の形質転換条件を検討するために、*L. helveticus* 中で発現することが知られている *E. faecalis* 由来の pAM $\beta$ 1 のエリスロマイシン耐性遺伝子を pLHP100 に挿入連結して pLHR を構築した。本プラスミドを用い、Bio-Rad 社製の Gene Pulser を使用して種々の条件を検討した。形質転換効率に大きく影響するものとしてはエレクトロポレーションに使用する細胞の生育期、生育培地へのグリシンの添加およびパルス時の電圧が挙げられる。生育期は一般には対数増殖期の細胞が用いられるが *L. helveticus* では定常期後期（22～23時間培養）で最も高い形質転換効率がえられ、その際、生育培地への1.2%のグリシン添加が必要であった。また、パルス時の電圧の至適値は4 kV/cmであった。なお、電気容量25 $\mu$ F以外では形質転換体は得られなかった。また、パルス時の菌液の温度は室温に比較し氷中に保持したものでは形質転換効率は10倍高かった。

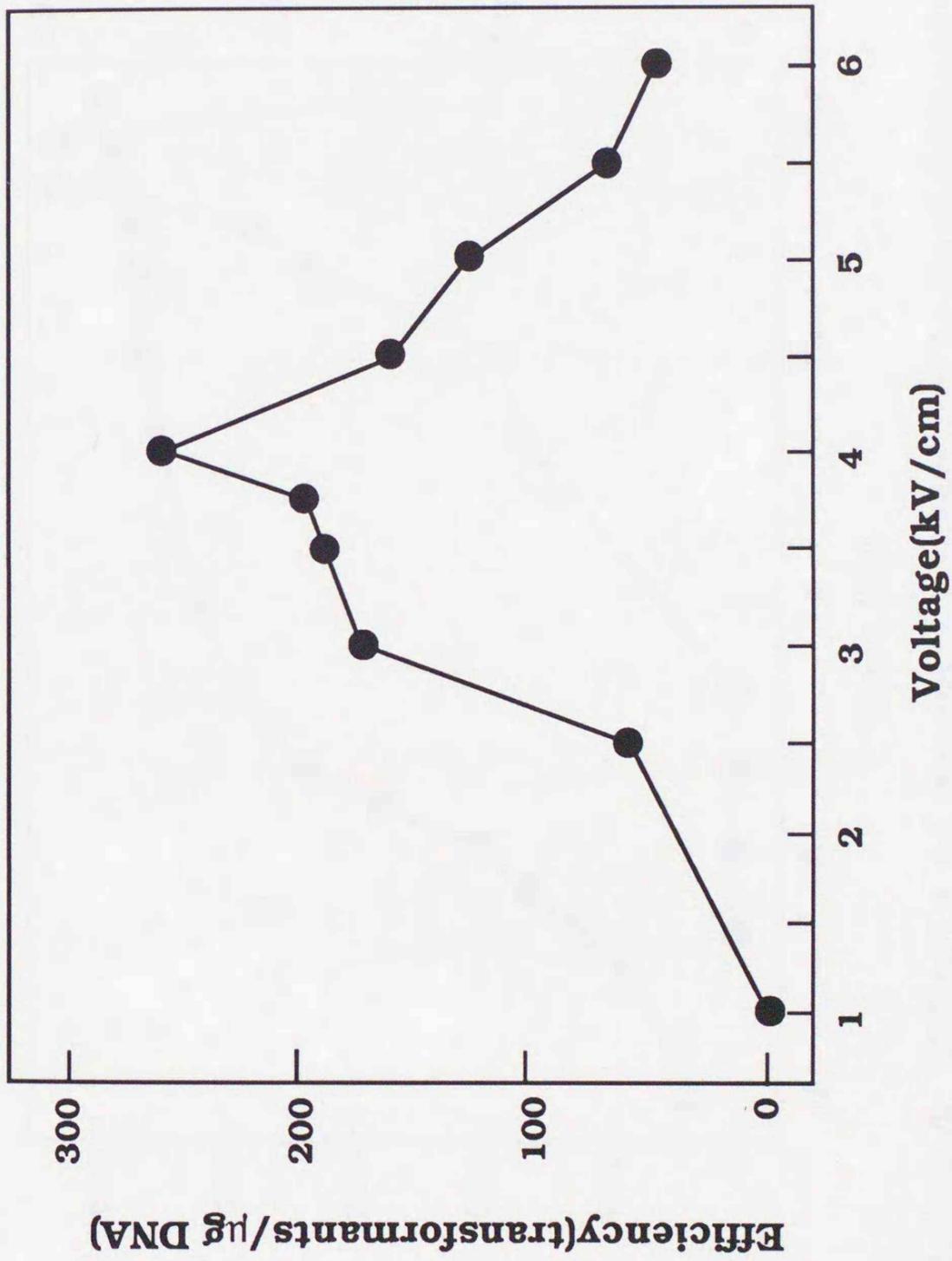
エレクトロポレーションによる形質転換では制限・修飾系の影響を受けないとい報告があるが、*L. helveticus* では *L. helveticus* より単離精製したプラスミドでは *E. coli* より単離精製したものより100倍形質転換効率は高く、*L. helveticus* SBT2161Cには弱い制限・修飾系が存在することが示唆された。



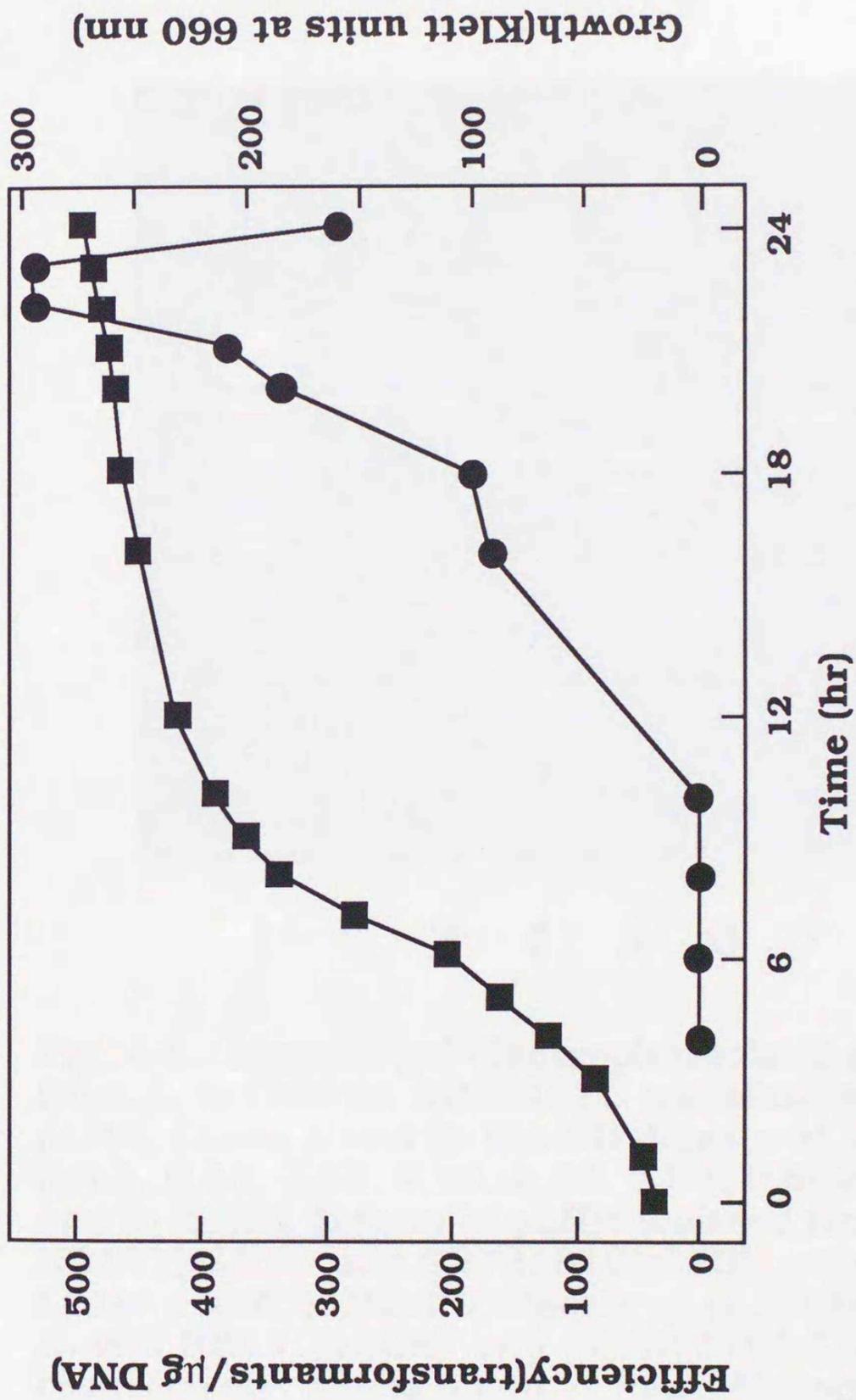
**Fig. 4-1. Construction of shuttle vector pLHR.** Plasmid pLHP100 and pVA838 were cleaved with the restriction enzyme *Bam*HI and *Ava*I and ligated together. The ligated DNA was used to transform *E. coli* HB101 to ampicillin resistance. The resulting plasmid, pLHR, underwent deletion of about a 0.4 kb DNA fragment in which a *Bam*HI-cutting site was located. The approximate size of pLHR is 8.5 kb. Symbols in pLHR: , pBR329-derived part containing the ampicillin and chloramphenicol resistance gene, and origin of replication; , pLJ1-derived part containing the origin of replication; , pAM $\beta$ 1-derived part containing the erythromycin resistance gene.



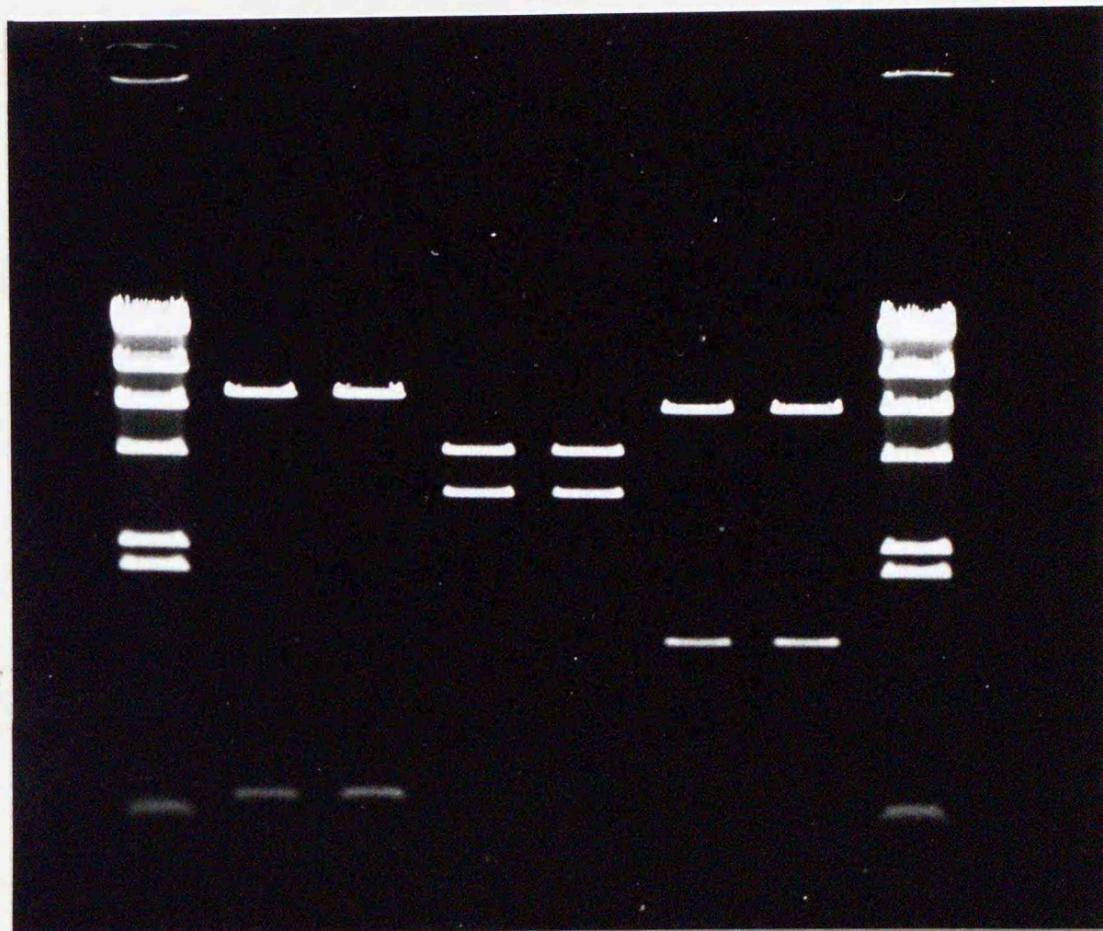
**Fig. 4-2. Effect of concentration of glycine in growth medium on cell growth and transformation by electroporation. Experiments were done with cells grown for 22 hr in medium containing various amounts of glycine. CFU, colony forming units. Symbols: ●, efficiency; ■, viable cell number.**



**Fig. 4-3. Effects of electric field strength on transformation by electroporation. Experiments were done with cells grown in medium containing 1.2% glycine for 22 hr.**

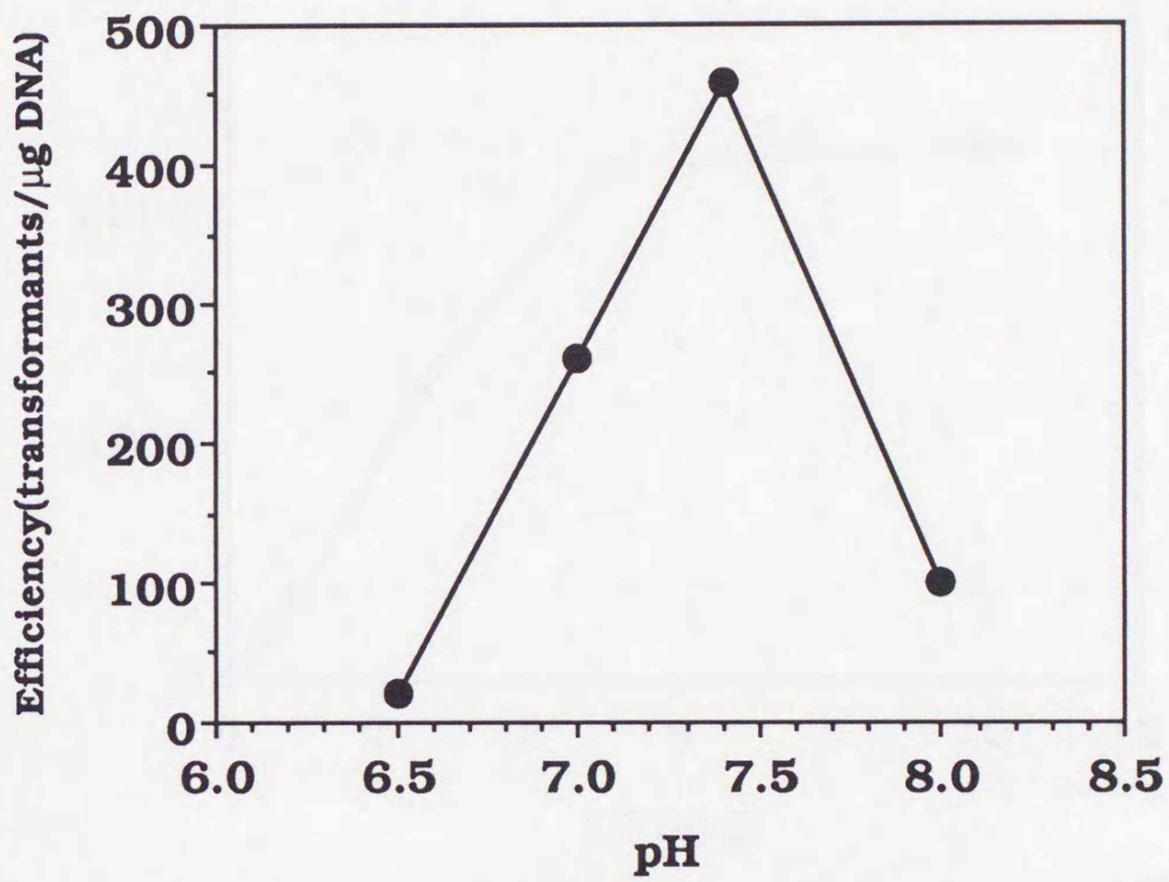


**Fig. 4-4. Effects of growth phase on transformation by electroporation. Experiments were done with cells grown in medium containing 1.2% glycine for various periods. Symbol: ■, growth; ●, efficiency.**

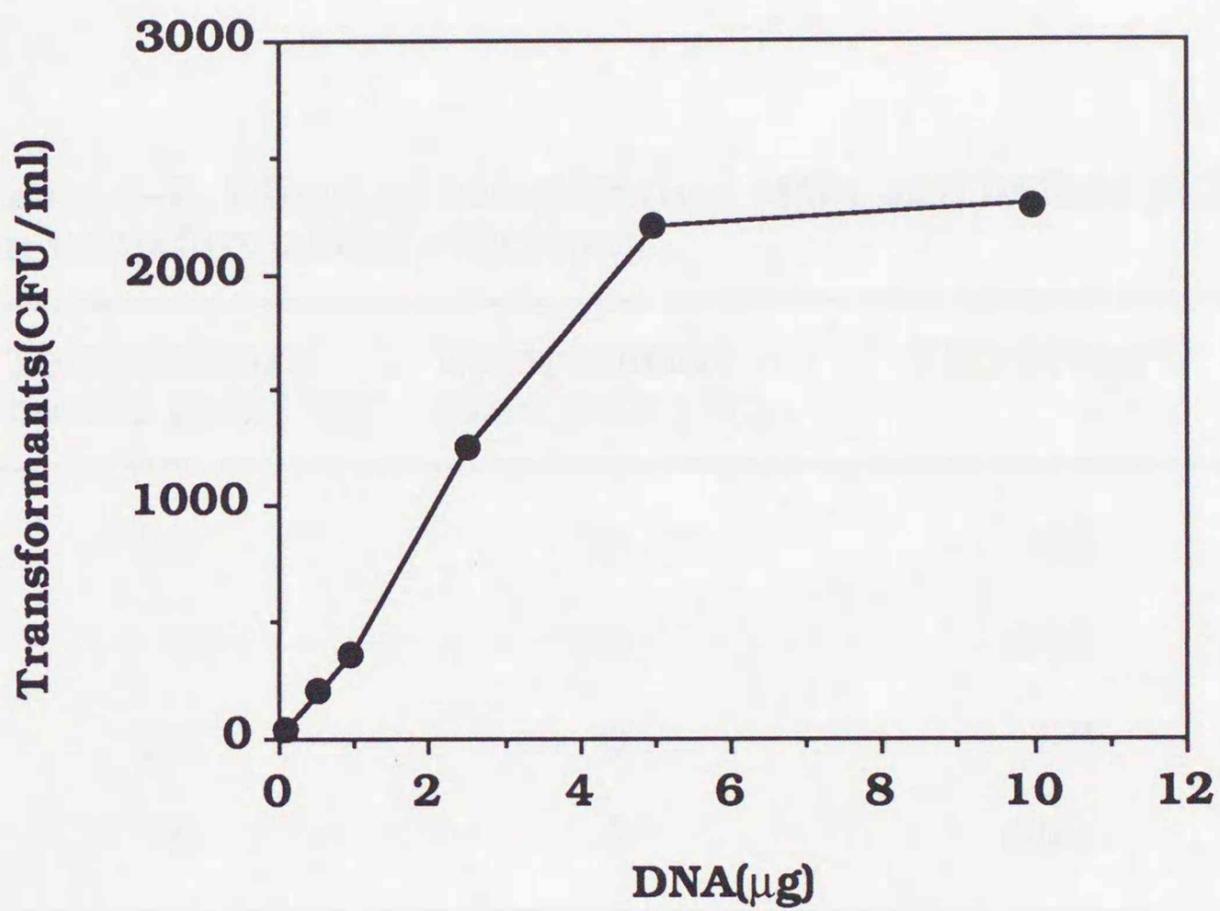


1 2 3 4 5 6 7 8

**Fig. 4-5. Agarose gel electrophoresis of pLHR isolated from *L. helveticus* SBT2161C transformed with pLHR. Lanes 1 and 8: *Hind*III digests of lambda DNA (23.1, 9.43, 6.56, 4.36, 2.32, 2.02, 0.56kb). Lanes 2 and 3: *Eco*RI digests of pLHR isolated from *E. coli* HB101(pLHR) and SBT2161C(pLHR), respectively. Lanes 4 and 5: *Hind*III digests of pLHR isolated from *E. coli* HB101(pLHR) and SBT2161C(pLHR), respectively. Lanes 6 and 7: *Pvu*II digests of pLHR isolated from *E. coli* HB101(pLHR) and SBT2161C(pLHR), respectively.**



**Fig. 4-6. Effect of pH on transformation efficiency. 7mM HEPES buffer was used.**



**Fig. 4-7. Dependency of transformation efficiency on DNA concentration. Transformants were selected on MRS plate containing 30  $\mu\text{g}/\text{ml}$  of erythromycin. CFU, colony forming unit.**

**Table 4-1. Effect of temperature after and before pulsing on transformation efficiency.**

<b>Temperature before puls ( °C)</b>	<b>Temperature after puls ( °C)</b>	<b>Efficiency*</b>
30	30	62
0	30	682
30	0	66
0	0	804

**\* Efficiency was expressed as transformants/ $\mu$ g DNA.**

**Table 4-2. Effect of pulsing time on transformation efficiency.**

<b>Puls time</b>	<b>Survival ratio(%)</b>	<b>Efficiency*</b>
<b>1</b>	<b>25.6</b>	<b>820</b>
<b>2</b>	<b>10.2</b>	<b>500</b>
<b>3</b>	<b>7.3</b>	<b>360</b>

\* Efficiency was expressed as transformants/ $\mu\text{g}$  DNA.

**Table 4-3. Restriction and modification of plasmid DNA in *L. helveticus* SBT2161C.**

pLHR-harboring strain as donor DNA source	Efficiency <sup>a</sup>	
	Recipient strain	
	SBT2161C	HB101
SBT2161C	$1.3 \times 10^4$	$5.3 \times 10^6$
HB101 <sup>b</sup>	$3.0 \times 10^2$	$7.8 \times 10^6$

<sup>a</sup> Efficiency was expressed as transformants/ $\mu$ g DNA.

<sup>b</sup> *E. coli* HB101( $r^-$  and  $m^-$ ).

## 第5章 $\beta$ -ガラクトシダーゼ遺伝子の取得および全塩基配列の決定

はじめに

第4章で報告したpLHRは*L. helveticus*で発現するエリスロマイシン耐性遺伝子と*E. coli*で発現するアンピシリン耐性遺伝子を有している。本プラスミドを宿主菌中で安定に保持させるためには常に抗生物質による選択圧をかけることが望ましい。しかし、食品中に抗生物質を添加することは許可されてはいない。また、抗生物質耐性をマーカーとするプラスミドを用いた組換え体を含む食品を摂取した場合、抗生物質耐性遺伝子が人腸内で他の菌に伝達される可能性が考えられる。このことは病気治療の際、抗生物質が効かなくなることを意味する。従って、抗生物質耐性マーカーを有するプラスミドは食品に使用することはできないことになる。そこで、抗生物質耐性マーカーに替わるマーカーを検討することが食品に応用するためには必要である。

*L. helveticus*は乳を原材料として工業的発酵乳製品の製造に用いられている。乳糖はこの乳中に存在する唯一の糖源である。この唯一の糖源である乳糖利用に重要な役割を果たしている $\beta$ -ガラクトシダーゼ遺伝子を食品に利用可能な選択マーカーとして用いるならば乳中に宿主菌が存在するかぎりには常に選択圧下に置かれることになり、プラスミドは安定に保持されると考えられる。この考え方に基づき*Streptococcus thermophilus*からの $\beta$ -ガラクトシダーゼ遺伝子のクローニングがMcKayらにより報告されている<sup>108)</sup>。そこで、乳酸桿菌のなかでも $\beta$ -ガラクトシダーゼ活性が高い*Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*からの $\beta$ -ガラクトシダーゼ遺伝子のクローニングを行い、全塩基配列を決定した。

## 実験材料と実験方法

### 1. 供試菌株と培地及びプラスミド

$\beta$ -ガラクトシダーゼ遺伝子のショットガンクローニング用宿主として、 $\beta$ -ガラクトシダーゼ欠損株である *E. coli* JM105<sup>72)</sup> 株を用いた。 $\beta$ -ガラクトシダーゼ遺伝子は *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* SBT0034株の染色体DNAよりクローニングした。*L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* は脱脂乳培地で37°C、16時間培養後、-20°Cで保存した。実験に用いる時には *Lactobacilli* MRS培地 (Difco社製) を用いて培養した。

ショットガンクローニング用ベクターとして pBR329<sup>73)</sup> を、シーケンス用ベクターとして pUC18<sup>72)</sup> を用いた。

### 2. 染色体DNAの調製

MRS培地で13時間培養して得られた菌体をSTME (0.5 M サッカロース, 10 mM トリス-マリエイト緩衝液, 10 mM EDTA, pH6.5) で2回洗浄後, 1/50容量のSTMEに懸濁した。懸濁液に50  $\mu$ g/mlとなるようにN-アセチルムラミダーゼSGを加え37°Cに保持した。30分後エタノールドライアイス中で急速凍結した試料に1.5倍量のトリス-SDS (0.1 M トリス-塩酸緩衝液, 0.1 M 塩化ナトリウム, 1% SDS, pH 9) を加え65°Cで15分間保持した。これに等量のTE飽和フェノールと1/10のクロロフォルム-イソアミルアルコール (24:1) を加え室温で5分間静かに振盪後, 遠心分離により上清を得た。フェノール処理を2回行って得られた上清液に予め-20°Cで冷却したエタノールを2倍量加え, 沈殿する染色体DNAをガラス棒に巻き取った。得られたDNAを適当量のTEに溶解し, リボヌクレアーゼA処理 (20  $\mu$ g/ml, 30分間, 37°C) 後, 再度, エタノール沈殿, イソプロパノール沈殿を行なった。得られた沈殿を真空乾燥後適当量のTE溶解して, 染色体DNA試料とした。

### 3. $\beta$ -ガラクトシダーゼ遺伝子のクローニング

*Sa*II で切断したpBR329はアルカリフォスファターゼ処理により脱リン酸して用いた。染色体DNAは *Sa*II 切断後、0.7%アガロース電気泳動を行ない4-10 kb以上の断片をゲルより回収精製して用いた。両者を連結して得られたプラスミドを用いて *E. coli* JM105 を形質転換した。形質転換体は50  $\mu$ g/mlのアンピシリンと40  $\mu$ g/mlのX-Galを含むLBプレートで選択した。 $\beta$ -ガラクトシダーゼ活性は青色コロニーの出現により検出した。

### 4. Southern hybridization

BluGene Nonradioactive nucleic acid detection system (Bethesda Research Laboratories) を用いて以下のように行なった。

#### 1) ビオチン標識DNAプローブの調製

pBG1を *Sa*II-*Pst*IIで切断後0.7%アガロース電気泳動を行ない $\beta$ -ガラクトシダーゼをコードしている *Sa*II断片を切り出しフェノール抽出により精製した。この断片を標識反応液に加えニックトランスレーション法により標識した。

[標識反応溶液]	dATP, dCTP, dGTP 混合液	5 $\mu$ l
	サンプルDNA	20 $\mu$ l
	Biotin-11-dUTP	2.5 $\mu$ l
	蒸留水	17.5 $\mu$ l
		45 $\mu$ l

15°Cで2時間反応後、反応停止液(300 mM EDTA, pH 8.0)を5  $\mu$ l, 5% SDSを1.25  $\mu$ l, 1/10容量の3 M 酢酸ナトリウムを加えた後、エタノール沈殿によりビオチン標識DNAを回収した。

#### 2) Blotting

染色体DNAを *Sa*IIで切断後、0.7%アガロースを用いた電気泳動で分離した。

電気泳動終了後、0.2 M NaOH-0.6 M NaCl溶液にゲルを漬け、室温で20分間アルカリ変性した。これを2回繰り返した後、蒸留水で5分間洗浄した。次に0.2 M トリス塩酸緩衝液 (pH7.5)-0.6 M 塩化ナトリウム溶液で20分間中和した。これを2回行なった後、6×SSC (1×SSC:150 mM 塩化ナトリウム, 15 mMクエン酸ナトリウム) 溶液を用いてナイロンメンブランフィルターにトランスファーした。軽くすすいだ後、80℃で1時間ベーキングすることによりDNAを固定した。

### 3) Prehybridization

ベーキングしたフィルターを2×SSCに浸漬後、ビニール袋に入れ10 mlのプレハイブリダイゼーション溶液を加え密封後、42℃で4時間保持した。

[プレハイブリダイゼーション溶液]

5×SSC

25 mM リン酸ナトリウム (pH 6.5)

5×Denhardt's溶液\*

0.5 mg/ml 変性ニシン精子DNA\*\*

\* 50×: 1% フィコール, 1% ポリビニルピロリドン, 1%

牛血清アルブミン (BSA)

\*\*使用直前に100℃で10分間加熱後、氷水で急冷したもの

### 4) Hybridization

プレハイブリダイゼーション溶液を捨てハイブリダイゼーション溶液を10 ml 加え密封後、42℃で一晩保持した。

[ハイブリダイゼーション溶液]

45% ホルムアミド

5×SSC

20 mM リン酸ナトリウム (pH 6.5)

1×Denhardt's 溶液

0.2mg/ml 変性ニシン精子DNA\*

0.1~0.5mg/ml 変性プローブDNA\*

\*使用直前に100°Cで10分間加熱後、氷水で急冷したもの

#### 5) フィルターの洗浄

ハイブリダイゼーション終了後、2×SSC-0.1% SDS溶液で3分間洗浄した(室温で2回反復)。0.2×SSC-0.1% SDS溶液で3分間洗浄した(室温で2回反復)。次に、0.16×SSC-0.1% SDS溶液で15分間洗浄した(50°Cで2回反復)。さらに、2×SSCで3分間室温で洗浄した。

#### 6) フィルターのブロッキング

緩衝液I (0.1% トリス塩酸緩衝液, 0.15 M 塩化ナトリウム, pH 7.5) に1分間浸漬後フィルターをビニール袋に入れ、緩衝液II (緩衝液IにBSAを3%に溶解したもの) を8 ml加え密封して65°Cで1時間保持後、袋より取り出し緩衝液IIに10分間室温で浸漬した。

#### 7) 発色

フィルターをビニール袋に入れ、SA-AP溶液 (ストレプトアビジン-アルカリフォスファターゼ・コンジュゲイト7  $\mu$ lを7 mlの緩衝液Iに加えたもの) を7 ml加え密封し室温で10分間保持後、200 mlの緩衝液Iで15分間室温で洗浄した。

これを2回行なう。次に、緩衝液III (0.1 M トリス塩酸緩衝液, 0.1 M 塩化ナトリウム, 50 mM 塩化マグネシウム, pH 9.5) で10分間洗浄する。洗浄したフィルターをビニール袋に入れ色素溶液 (7.5 mlの緩衝液IIIに33  $\mu$ lのニトロブルーテトラゾリウムと25  $\mu$ lの5-ブロモ-4-クロロ-3-インドリールフォスフェートを加えたもの) を7.5 ml/100-cm<sup>2</sup> filterで添加し密封後、室温暗所に0.5~

3時間放置し発色させた。20 mM トリス塩酸緩衝液 (pH 7.5)-0.5 mM EDTA 溶液を添加して反応を停止後、80°Cで2分間乾燥する。

#### 5. $\beta$ -ガラクトシダー活性の検出

PAGEは1.5 mm 厚の6%ポリアクリルアミドゲルを用い、Laemmliの方法<sup>109)</sup>に従って行った。また、 $\beta$ -ガラクトシダーゼ活性を有するバンドの検出は10 mM トリス塩酸緩衝液 (pH 7.0) に40  $\mu$ g/mlになるようにX-Galを溶解した溶液に37°Cで1時間ゲルを浸漬し青色に染色することにより行った。

#### 6. シーケンス

Kilo-sequence 用 Deletion kit (宝酒造社製) を用いて段階欠損したプラスミドを調製した。シーケンスはSequencing Kit (宝酒造社製) と[ $\alpha$ -<sup>32</sup>P] dCTPを用いて行った。

## 結果

### 1. $\beta$ -ガラクトシダーゼ遺伝子のクローニング

*Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* SBT0034より調製したDNAおよび*E. coli*用ベクターpBR329を制限酵素 *Sa*II で切断し、両者を連結した。これを用いて*E. coli* JM105 ( $\text{Lac}^-$ ) を形質転換した。 $\beta$ -ガラクトシダーゼ遺伝子を有する形質転換体はX-Gal ( $20\mu\text{g/ml}$ ) とアンピシリン ( $50\mu\text{g/ml}$ ) を含むLBプレート上で青色コロニーの形成により選択した。青色コロニーより得られたプラスミドをpBG1と命名し、その制限酵素切断部位の検討を行った。得られた結果をFig. 5-1に示した。挿入断片の大きさは約4.1 kbであった。pBG1に挿入された*Sa*II断片が*L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* SBT0034由来であることを確認するため、この挿入断片をプローブとしてサザンハイブリダイゼーションを行った。その結果がFig. 5-2である。*L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* SBT0034の染色体DNAを*Sa*IIで完全切断したもの (lane 3)、pBG1を*Sa*IIで切断したもの (lane 4) およびpGB1を*Sa*IIと*Pst*Iで切断したもの (lane 6) で同一位置に相補性を示すバンドが確認された。また、*E. coli* JM105 (乳糖非資化性) とHB101 (乳糖資化性) の染色体DNAを*Sa*IIで切断したもの (lane 1, 2) には相補性を示すバンドは確認されなかった。このことより、pBG1に挿入された4.1 kb *Sa*II断片は*L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* SBT0034由来であることが確認された。また、pBG1を保有する*E. coli* JM105が生産する $\beta$ -ガラクトシダーゼが*L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* SBT0034由来であることを確認するためPAGEにかけ活性染色を行った結果がFig. 5-3である。*L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* SBT0034の粗抽出液 (lane 1) とpBG1を保有する*E. coli* JM105の粗抽出液 (lane 3) で同一位置に活性バンドが確認された。*E. coli* HB101の粗抽出液 (lane 4) にも活性バンドは確認されるが移動度はかなり異なっていた。また、

*E. coli* JM105 の粗抽出液 (lane 2) には活性バンドは認められなかった。よって、pBG1を保有する*E. coli* JM105 は*L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* SBT0034由来の $\beta$ -ガラクトシダーゼを生産していることが確認された。以上の結果よりpBG1に挿入された*Sa*II断片上に $\beta$ -ガラクトシダーゼ遺伝子がコードされていると結論した。pBR329の挿入部位である*Sa*II部位の上流にテトラサイクリン耐性遺伝子のプロモーターが存在するため、このプロモーターで $\beta$ -ガラクトシダーゼ遺伝子が発現している可能性が考えられる。そこで、挿入断片を逆方向に連結したpBG2を構築した。本プラスミドを保有する*E. coli* JM105は青色コロニーを形成したことから挿入断片は $\beta$ -ガラクトシダーゼ遺伝子の本来のプロモーター領域を有していると考えられた。

## 2. $\beta$ -ガラクトシダーゼ遺伝子領域の決定

pBG1の挿入断片上の $\beta$ -ガラクトシダーゼ遺伝子の領域を特定するため、サブクローニングにより縮小化をおこなった。得られたクローンの青色コロニーの形成能より $\beta$ -ガラクトシダーゼ遺伝子の発現を判定した。その結果をFig. 5-4に示した。*Sa*II-*Kpn*I (0.82 kb)断片を除去したNo. 1株、*Sa*II-*Hind*III (1.3 kb)断片を除去したNo. 2株および*Sa*II-*Hind*III (0.94 kb)断片を除去したNo. 5株では $\beta$ -ガラクトシダーゼ遺伝子は発現していなかった。一方、*Sa*II-*Sma*I (0.43 kb)断片を除去したNo. 3株と*Pvu*I (0.23 kb)断片を除去したNo. 4株では $\beta$ -ガラクトシダーゼ遺伝子は発現したことから $\beta$ -ガラクトシダーゼ遺伝子は*Sma*I-*Pvu*I (3.2 kb)断片上に存在することが推定された。そこで、 $\beta$ -ガラクトシダーゼ遺伝子発現に必須な最小断片をえるため、まず、pBG1の*Kpn*I部位の反時計方向に存在する*Sma*Iに*Bam*HIリンカーを連結し、*Sma*I部位を*Bam*HI部位に置換後、*Bam*HIで切断し再連結して*Sa*II-*Sma*I断片を除去したpBG3を構築した (Fig. 5-1)。

### 3. 塩基配列の決定

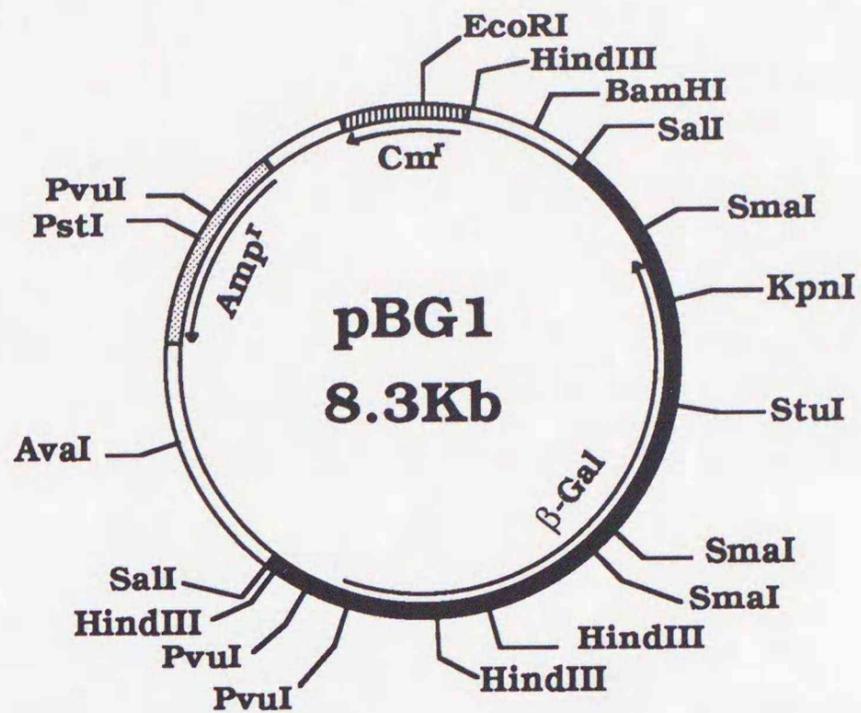
pBG3のSalI-BamHI断片をSalIとBamHI切断したpUC18に連結し挿入断片の全塩基配列を決定した。*L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* SBT0034の $\beta$ -ガラクトシダーゼ遺伝子は3,024 bpの塩基、アミノ酸にして1,008個(114,154 Da)よりなっていた。その結果とSchmidtらが報告している*Lactobacillus bulgaricus* B131の $\beta$ -ガラクトシダーゼ遺伝子の塩基配列<sup>110)</sup>を比較した結果をFig. 5-5に示した。 $\beta$ -ガラクトシダーゼ遺伝子のプロモーター領域の上流に5か所塩基置換または挿入が認められた。また、Schmidtが-10領域と推定している領域に1か所、-35領域とリボゾーム結合部位の間に1か所塩基置換が認められた。 $\beta$ -ガラクトシダーゼの構造遺伝子領域では、3か所(2,362, 2,515, 3,181番目)の塩基置換が認められた。さらに、3,182-3,184番目に3個(CTG)の塩基挿入が認められた。これ以外は完全に一致しており、ターミネーターと推定される2回転対称部位(dyad symmetry region)も認められた。

## 考察

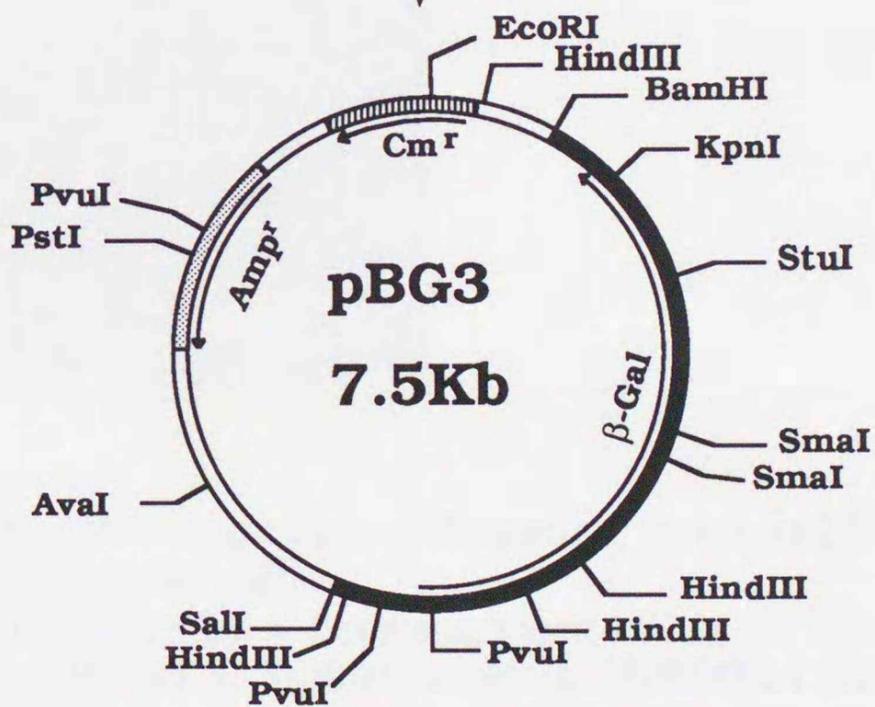
*L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* SBT0034 の染色体DNAよりショットガン法により $\beta$ -ガラクトシダーゼ遺伝子が大腸菌にクローニングした。X-Galで選択したクローンより $\beta$ -ガラクトシダーゼ遺伝子が挿入されていると考えられるプラスミドpBG1を得た。サザンハイブリダイゼーションの結果とPAGEを用いた活性染色の結果からpBG1に挿入されている4.1 kb断片上には*L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* SBT0034由来の $\beta$ -ガラクトシダーゼ遺伝子が存在することが明らかとなった。結果は示していないが*L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* の $\beta$ -ガラクトシダーゼ遺伝子は*L. helveticus* の染色体DNAとは全く相補性を示していないことからプラスミドのマーカースとして用いた場合、宿主菌の*L. helveticus* のDNAと組換わることなく保持されることが考えられる。pBG1に挿入された断片中の $\beta$ -ガラクトシダーゼ遺伝子がコードされている領域の塩基配列を決定し、既に報告されている*L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* B131の $\beta$ -ガラクトシダーゼ遺伝子の塩基配列と比較した。プロモーター領域の-35領域に1個の塩基置換が認められた。また、構造遺伝子中に3か所の塩基置換が認められたが、この置換はトリプレットコドンの第3番目の文字にあたるためアミノ酸としては置換されたことにはならない。また、完全にアミノ酸1個分の3個(CTG)の塩基挿入が認められた。これは*L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* B131の $\beta$ -ガラクトシダーゼのアミノ酸配列の905番目にLeuが挿入されたことになる。-35領域の1個の塩基置換が $\beta$ -ガラクトシダーゼ遺伝子の転写にどのような影響をおよぼしているか興味がかかる。また、Leuの挿入が*L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* の $\beta$ -ガラクトシダーゼの立体構造にどのような影響を与え、その結果、活性や安定性等にどのように影響するか蛋白質工学的に興味がかかる。

## 要約

*L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* SBT0034 の染色体DNAを用いてショットガンクローニングを行い,  $\text{Lac}^-$  の *E. coli* JM105 に  $\beta$ -ガラクトシダーゼ遺伝子をクローン化した。クローンから得られたプラスミドをpBG1と命名した。このpBG1には約4.1 kbの断片が挿入されていた。4.1 kbの挿入断片をプローブとして *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* SBT0034の染色体DNAとサザンハイブリダイゼーションを行いこの挿入断片が *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* SBT0034由来であることを確認した。また, pBG1を保有する *E. coli* JM105 の粗抽出液を用いてPAGEを行い, X-Galによる活性染色を行った。検出された活性バンドは *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* SBT0034 の  $\beta$ -ガラクトシダーゼと同じ位置に検出され, *L. helveticus* SBT2161Cや *E. coli* の  $\beta$ -ガラクトシダーゼとは明らかに移動度は異なった。この結果とサザンハイブリダイゼーションの結果からpBG1に挿入された4.1 kbの断片上に *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* SBT0034由来の  $\beta$ -ガラクトシダーゼ遺伝子が存在することが確認された。pBG1に挿入された  $\beta$ -ガラクトシダーゼ遺伝子の塩基配列を決定し, Schmidtが報告している *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* B131の  $\beta$ -ガラクトシダーゼ遺伝子の塩基配列を比較検討した。プロモーター領域の-35領域に1個の塩基置換, 構造遺伝子中にアミノ酸置換をとみなわない塩基置換が3個認められた。更に, アミノ酸1個の挿入にあたる3個の塩基の挿入が認められた。

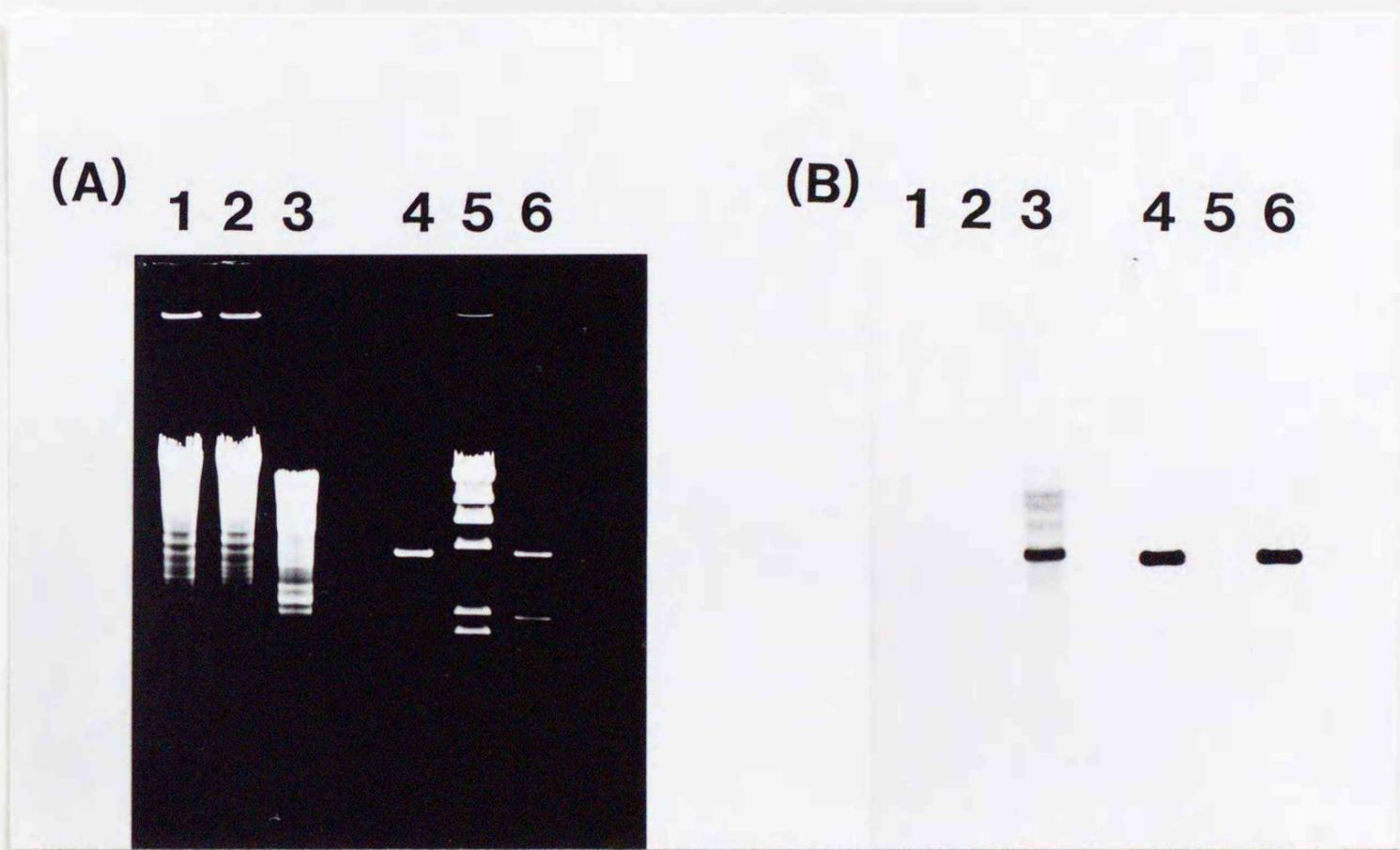


*SmaI* site replace *BamHI* site  
*BamHI* cut and religation



**Fig. 5-1. Restriction map of pBG1 and pBG3.**

**Amp<sup>r</sup>, Cm<sup>r</sup>, and β-Gal with arrows indicate the positions and the direction of transcription of ampicillin resistance gene, the chloramphenicol resistance gene, and the β-galactosidase gene, respectively. Symbols: , ampicillin resistance gene; , chloramphenicol resistance gene; , β-galactosidase gene.**



**Fig. 5-2. Restriction enzyme cleavage pattern(A) and southern hybridization pattern(B).  
 Lanes 1, *E coli* HB101 Chromosomal DNA; 2, *Ecoli* JM105 chromosomal DNA; 3, *L. bulgaricus* SBT0034 Chromosomal DNA; 4, *Sall*-digested pBG1;5, *Hind*III digests of  $\lambda$  DNA; 6,*Sall*/*Pst*I double-digested pBG1.**



**Fig. 5-3. Location of  $\beta$ -galactosidase activity after electrophoresis of cell extracts in SDS-polyacrylamide gel(6%). After electrophoresis, the gel was incubated in 5-bromo-4-indolyl- $\beta$ -D-galactopyranoside solution for activity staining. Lanes; 1, *L. bulgaricus* SBT0034; 2, *E. coli* JM105(Lac<sup>-</sup>); 3, *E. coli* JM105 (pBG1); 4, *E. coli* HB101(Lac<sup>+</sup>).**

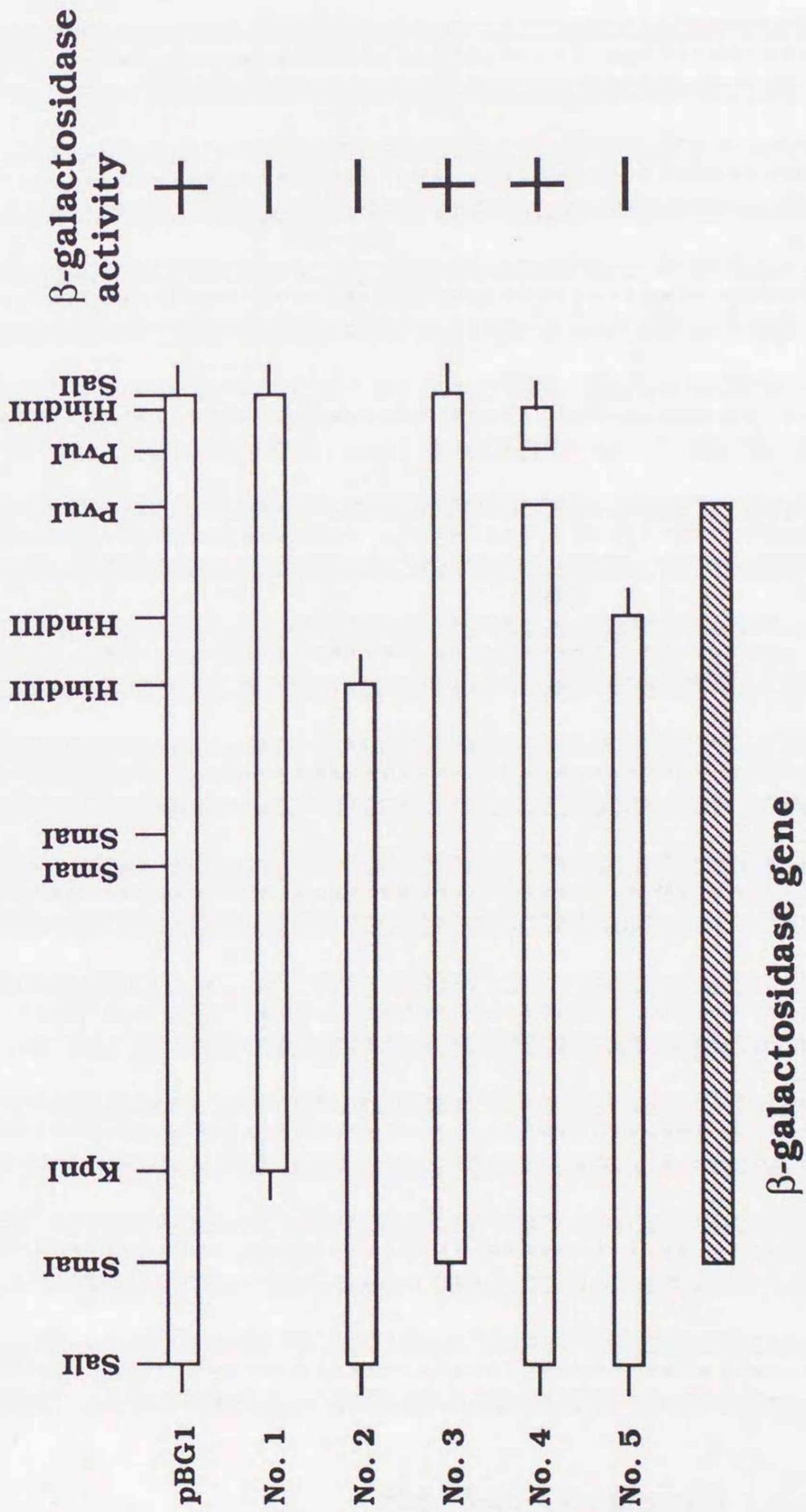


Fig. 5-4. Subcloning of pBG1 and β-galactosidase activity of each clone.

AAGCTTCACTTTGGCCAGCCCAGTCTCCGGACAATTAATGAACCTGGACATGGTTGACGA 60  
\*\*\*\*\*  
AAGCTTCACTTTGGC AGCC AGTCTCCGGGCAATTAATGAACTTGGACATGGTTGACGA  
  
CCCGGTCTTTGCCGACAAAAAGTTAGGCGACGGCTTTGCCCTGGTGCCAGCAGACGGTAA 120  
\*\*\*\*\*  
CCCGGTCTTTGCCGATAAAAAAGTTAGGCGACGGCTTTGCCCTGGTGCCAGCAGACGGTAA  
  
GGTCTACGCGCCATTTGCCGGTACTGTCCGCCAGCTGGCCAAGACCCGGCACTCGATCGT 180  
\*\*\*\*\*  
GGTCTACGCGCCATTTGCCGGTACTGTCCGCCAGCTGGCCAAGACCCGGCACTCGATCGT  
-35  
CCTGGAAAATGAACATGGGGTCTTGGTCTTGATTACCTTGGCCTGGGCACGGTCAAATT 240  
\*\*\*\*\*  
CCTGGAAAATGAACATGGGGTCTTGGTCTTGATTACCTTGGCCTGGGCACGGTCAAATT  
-10  
AAACGGGACTGGCTTTGTCAGCTACGTTGAAGAGGGCAGCCAGGTAGAAGCCGGCCAGCA 300  
\*\*\*\*\*  
AAACGGGACTGGCTTTGTCAGCTATGTTGAAGAGGGCAGCCAGGTAGAAGCCGGCCAGCA  
  
GATCCTGGAATTCTGGGACCCGGCGATCAAGCAGGCCAAGCTGGACGACACGGTAATCGT 360  
\*\*\*\*\*  
GATCCTGGAATTCTGGGACCCGGCGATCAAGCAGGCCAAGCTGGACGACACGGTAATCGT  
  
GACCGTCATCAACAGCGAAACTTTTGCAAATAGCCAGATGCTCTTGCCGATCGGCCACAG 420  
\*\*\*\*\*  
GACCGTCATCAACAGCGAAACTTTCACAAATAGCCAGATGCTCTTGCCGATCGGCCACAG  
RBS Start  
CGTCCAAGCCCTGGATGATGTATTCAAGTTAGAAGGGAAGAATTAGAAAATGAGCAATAA 480  
\*\*\*\*\*  
CGTCCAAGCCCTGGATGATGTATTCAAGTTAGAAGGGAAGAATTAGAAAATGAGCAATAA  
  
GTTAGTAAAAGAAAAAAGAGTTGACCAGGCAGACCTGGCCTGGCTGACTGACCCGGAAGT 540  
\*\*\*\*\*  
GTTAGTAAAAGAAAAAAGAGTTGACCAGGCAGACCTGGCCTGGCTGACTGACCCGGAAGT  
  
TTACGAAGTCAATACAATTCCCCGCACTCCGACCATGAGTCCTTCCAAAGCCAGGAAGA 600  
\*\*\*\*\*  
TTACGAAGTCAATACAATTCCCCGCACTCCGACCATGAGTCCTTCCAAAGCCAGGAAGA  
  
ACTGGAGGAGGGCAAGTCCAGTTTAGTGCAGTCCCTGGACGGGGACTGGCTGATTGACTA 660  
\*\*\*\*\*  
ACTGGAGGAGGGCAAGTCCAGTTTAGTGCAGTCCCTGGACGGGGACTGGCTGATTGACTA  
  
CGCTGAAAACGGCCAGGGACCAGTCAACTTCTATGCAGAAGACTTTGACGATAGCAATTT 720  
\*\*\*\*\*  
CGCTGAAAACGGCCAGGGACCAGTCAACTTCTATGCAGAAGACTTTGACGATAGCAATTT  
  
TAAGTCAGTCAAAGTACCCGGCAACCTGGAAGTCAAGGCTTTGGCCAGCCCCAGTATGT 780  
\*\*\*\*\*  
TAAGTCAGTCAAAGTACCCGGCAACCTGGAAGTCAAGGCTTTGGCCAGCCCCAGTATGT  
  
CAACGTCCAATATCCATGGGACGGCAGTGAGGAGATTTTCCCGCCCCAAATTCCAAGCAA 840  
\*\*\*\*\*  
CAACGTCCAATATCCATGGGACGGCAGTGAGGAGATTTTCCCGCCCCAAATTCCAAGCAA

**Fig. 5-5. Continued**

AAATCCGCTCGCTTCTTATGTCAGATACTTTGACCTGGATGAAGCTTTCTGGGACAAGGA 900  
\*\*\*\*\*  
AAATCCGCTCGCTTCTTATGTCAGATACTTTGACCTGGATGAAGCTTTCTGGGACAAGGA  
AGTCAGCTTGAAGTTTGACGGGGCGGCAACAGCCATCTATGTCTGGCTGAACGGCCACTT 960  
\*\*\*\*\*  
AGTCAGCTTGAAGTTTGACGGGGCGGCAACAGCCATCTATGTCTGGCTGAACGGCCACTT  
CGTCGGCTACGGGGAAGACTCCTTTACCCCAAGTGAGTTTATGGTTACCAAGTTCCTCAA 1020  
\*\*\*\*\*  
CGTCGGCTACGGGGAAGACTCCTTTACCCCAAGTGAGTTTATGGTTACCAAGTTCCTCAA  
GAAAGAAAATAACCGCCTGGCAGTGGCTCTCTACAAGTATTCTTCCGCCTCCTGGCTGGA 1080  
\*\*\*\*\*  
GAAAGAAAATAACCGCCTGGCAGTGGCTCTCTACAAGTATTCTTCCGCCTCCTGGCTGGA  
AGACCAGGACTTCTGGCGCATGTCTGGTTTGTTCAGATCAGTACTCTTCAGGCCAAGCC 1140  
\*\*\*\*\*  
AGACCAGGACTTCTGGCGCATGTCTGGTTTGTTCAGATCAGTACTCTTCAGGCCAAGCC  
GCGTCTGCACTTGGAGGACCTTAAGCTTACGGCCAGCTTGACCGATAACTACCAAAAAGG 1200  
\*\*\*\*\*  
GCGTCTGCACTTGGAGGACCTTAAGCTTACGGCCAGCTTGACCGATAACTACCAAAAAGG  
AAAGCTGGAAGTCGAAGCCAATATTGCCTACCGCTTGCCAAATGCCAGCTTTAAGCTGGA 1260  
\*\*\*\*\*  
AAAGCTGGAAGTCGAAGCCAATATTGCCTACCGCTTGCCAAATGCCAGCTTTAAGCTGGA  
AGTGCGGGATAGTGAAGGTGACTTGGTTGCTGAAAAGCTGGGCCCAATCAGAAGCGAGCA 1320  
\*\*\*\*\*  
AGTGCGGGATAGTGAAGGTGACTTGGTTGCTGAAAAGCTGGGCCCAATCAGAAGCGAGCA  
GCTGGAATTCACCTCTGGCTGATTTGCCAGTAGCTGCCTGGAGCGCGGAAAAGCCTAACCT 1380  
\*\*\*\*\*  
GCTGGAATTCACCTCTGGCTGATTTGCCAGTAGCTGCCTGGAGCGCGGAAAAGCCTAACCT  
TTACCAGGTCCGCCTGTATTTATAACCAGGCAGGCAGCCTCTTAGAGGTTAGCCGGCAGGA 1440  
\*\*\*\*\*  
TTACCAGGTCCGCCTGTATTTATAACCAGGCAGGCAGCCTCTTAGAGGTTAGCCGGCAGGA  
AGTGGGTTTCCGCAACTTTGAACTAAAAGACGGGATTATGTACCTTAACGGCCAGCGGAT 1500  
\*\*\*\*\*  
AGTGGGTTTCCGCAACTTTGAACTAAAAGACGGGATTATGTACCTTAACGGCCAGCGGAT  
CGTCTTCAAGGGGGCCAACCGGCACGAATTTGACAGTAAGTTGGGTTCGGGCTATCACGGA 1560  
\*\*\*\*\*  
CGTCTTCAAGGGGGCCAACCGGCACGAATTTGACAGTAAGTTGGGTTCGGGCTATCACGGA  
AGAGGATATGATCTGGGACATCAAGACCATGAAGCGAAGCAACATCAATGCTGTCCGCTG 1620  
\*\*\*\*\*  
AGAGGATATGATCTGGGACATCAAGACCATGAAGCGAAGCAACATCAATGCTGTCCGCTG  
CTCTCACTACCCGAACCAGTCCCTCTTTTACCGGCTCTGTGACAAGTACGGCCTTTACGT 1680  
\*\*\*\*\*  
CTCTCACTACCCGAACCAGTCCCTCTTTTACCGGCTCTGTGACAAGTACGGCCTTTACGT

**Fig. 5-5. Continued**

CATTGATGAAGCTAACCTGGAAAGCCACGGCACCTGGGAAAAAGTGGGGGGGCACGAAGA 1740  
 \*\*\*\*\*  
 CATTGATGAAGCTAACCTGGAAAGCCACGGCACCTGGGAAAAAGTGGGGGGGCACGAAGA  
  
 TCCTAGCTTCAATGTTCCAGGCGATGACCAGCATTGGCTGGGAGCCAGCTTATCCCAGGT 1800  
 \*\*\*\*\*  
 TCCTAGCTTCAATGTTCCAGGCGATGACCAGCATTGGCTGGGAGCCAGCTTATCCCAGGT  
  
 GAAGAACATGATGGCTCGGGACAAGAACCATGCTTCAATCCTAATCTGGTCTTTAGGCAA 1860  
 \*\*\*\*\*  
 GAAGAACATGATGGCTCGGGACAAGAACCATGCTTCAATCCTAATCTGGTCTTTAGGCAA  
  
 TGAGTCTTACGCCGGCACTGTCTTTGCCCAAATGGCTGATTACGTCCGGAAGGCTGATCC 1920  
 \*\*\*\*\*  
 TGAGTCTTACGCCGGCACTGTCTTTGCCCAAATGGCTGATTACGTCCGGAAGGCTGATCC  
  
 GACCCGGGTTTCAGCACTATGAAGGGGTGACCCACAACCGGAAGTTTGACGACGCCACCCA 1980  
 \*\*\*\*\*  
 GACCCGGGTTTCAGCACTATGAAGGGGTGACCCACAACCGGAAGTTTGACGACGCCACCCA  
  
 GATTGAAAGCCGGATGTATGCTCCGGCCAAGGTAATTGAAGAATACTTGACCAATAAACC 2040  
 \*\*\*\*\*  
 GATTGAAAGCCGGATGTATGCTCCGGCCAAGGTAATTGAAGAATACTTGACCAATAAACC  
  
 AGCCAAGCCATTTATCTCAGTTGAATACGCTCACGCCATGGGCAACTCCGTCGGTGACCT 2100  
 \*\*\*\*\*  
 AGCCAAGCCATTTATCTCAGTTGAATACGCTCACGCCATGGGCAACTCCGTCGGTGACCT  
  
 GGCCGCCTACACGGCCCTGGAAAAATACCCCACTACCAGGGCGGCTTCATCTGGGACTG 2160  
 \*\*\*\*\*  
 GGCCGCCTACACGGCCCTGGAAAAATACCCCACTACCAGGGCGGCTTCATCTGGGACTG  
  
 GATTGACCAAGGACTGGAAAAAGACGGGCACCTGCTTTATGGGGGCGACTTCGATGACCG 2220  
 \*\*\*\*\*  
 GATTGACCAAGGACTGGAAAAAGACGGGCACCTGCTTTATGGGGGCGACTTCGATGACCG  
  
 GCCAACCGACTATGAATTCTGCGGGAACGGCCTGGTCTTTGCTGACCGGACTGAATCGCC 2280  
 \*\*\*\*\*  
 GCCAACCGACTATGAATTCTGCGGGAACGGCCTGGTCTTTGCTGACCGGACTGAATCGCC  
  
 GAAACTGGCTAATGTCAAGGCCCTTTACGCCAACCTTAAGTTAGAAGTAAAAGATGGGCA 2340  
 \*\*\*\*\*  
 GAAACTGGCTAATGTCAAGGCCCTTTACGCCAACCTTAAGTTAGAAGTAAAAGATGGGCA  
  
 GCTCTTCCTCAAAAACGACAATTTATTTACCAACAGCTCATCTTACTACTTCTTGACTAG 2400  
 \*\*\*\*\*  
 GCTCTTCCTCAAAAACGACAATTTATTTACCAACAGCTCATCTTACTACTTCTTGACTAG  
  
 TCTTTTGGTCGATGGCAAGTTGACCTACCAGAGCCGGCCTCTGACCTTTGGCCTGGAGCC 2460  
 \*\*\*\*\*  
 TCTTTTGGTCGATGGCAAGTTGACCTACCAGAGCCGGCCTCTGACCTTTGGCCTGGAGCC  
  
 TGCGAATCCGGGACCTTTGCCCTGCCTTGGCCGGAAGTCGCTGATGAAAAAGGAGAGGT 2520  
 \*\*\*\*\*  
 TGCGAATCCGGGACCTTTGCCCTGCCTTGGCCGGAAGTCGCTGATGAAAAAGGGGAGGT

**Fig. 5-5. Continued**

CGTCTACCGGGTAACGGCCCACTTAAAAGAAGACTTGCCTTGGGCGGATGAGGGCTTCAC 2580  
\*\*\*\*\*  
CGTCTACCGGGTAACGGCCCACTTAAAAGAAGACTTGCCTTGGGCGGATGAGGGCTTCAC  
TGTGGCTGAAGCAGAAGAAGTAGCTCAAAGCTGCCGGAATTTAAGCCGGAAGGGCGGCC 2640  
\*\*\*\*\*  
TGTGGCTGAAGCAGAAGAAGTAGCTCAAAGCTGCCGGAATTTAAGCCGGAAGGGCGGCC  
AGATTTAGTTGATTCCGACTACAACCTAGGCCTGAAAGGAAATAACTTCCAAATTCTCTT 2700  
\*\*\*\*\*  
AGATTTAGTTGATTCCGACTACAACCTAGGCCTGAAAGGAAATAACTTCCAAATTCTCTT  
CTCCAAGGTCAAGGGCTGGCCGGTTTCCCTCAAGTATGCCGGTAGGGAATACTTGAAGCG 2760  
\*\*\*\*\*  
CTCCAAGGTCAAGGGCTGGCCGGTTTCCCTCAAGTATGCCGGTAGGGAATACTTGAAGCG  
GCTGCCGGAATTTACCTTCTGGCGGGCCCTGACGGACAACGACCGGGGAGCTGGTTACGG 2820  
\*\*\*\*\*  
GCTGCCGGAATTTACCTTCTGGCGGGCCCTGACGGACAACGACCGGGGAGCTGGTTACGG  
CTATGATCTGGCCCGGTGGGAAAATGCCGGCAAGTATGCCCGCTTGAAAGACATCAGCTG 2880  
\*\*\*\*\*  
CTATGATCTGGCCCGGTGGGAAAATGCCGGCAAGTATGCCCGCTTGAAAGACATCAGCTG  
CGAGGTCAAGGAAGACTCCGTTTTGGTCAAGACTGCCTTTACGTTGCCTGTCGCCTTAAA 2940  
\*\*\*\*\*  
CGAGGTCAAGGAAGACTCCGTTTTGGTCAAGACTGCCTTTACGTTGCCTGTCGCCTTAAA  
GGGTGATTTAACCGTGACCTATGAAGTCGATGGACGGGGCAAGATTGCTGTAACAGCTGA 3000  
\*\*\*\*\*  
GGGTGATTTAACCGTGACCTATGAAGTCGATGGACGGGGCAAGATTGCTGTAACAGCTGA  
CTTCCCAGGCGCGGAAGAAGCCGGTCTCTTGCCAGCCTTTGGCTTGAACCTGGCCCTGCC 3060  
\*\*\*\*\*  
CTTCCCAGGCGCGGAAGAAGCTGGTCTCTTGCCAGCCTTTGGCTTGAACCTGGCCCTGCC  
AAAAGAACTGACCGATTACCGCTACTATGGTCTGGGACCTAATGAGAGCTACCCAGACCG 3120  
\*\*\*\*\*  
AAAAGAACTGACCGATTACCGCTACTATGGTCTGGGACCTAATGAGAGCTACCCAGACCG  
CTTGAAGGTAATTACCTGGGCATCTACCAGGGAGCGGTAAAAAAGAACTTTAGCCCAGA 3180  
\*\*\*\*\*  
CTTGAAGGTAATTACCTGGGCATCTACCAGGGAGCGGTAAAAAAGAACTTTAGCCCAGA  
CCTGCGTCCGCAGGAAACGGGCAACCGGAGCAAGGTTGCTGGTACCAGCTCTTTGATGA 3240  
\*\*\*\*\*  
T CGTCCGCAGGAAACGGGCAACCGGAGCAAGGTTGCTGGTACCAGCTCTTTGATGA  
AAAGGGCGGCTTGAATTTACGGCCAATGGGGCAGACTTGAACCTGTCTGCTTTGCCATA 3300  
\*\*\*\*\*  
AAAGGGCGGCTTGAATTTACGGCCAATGGGGCAGACTTGAACCTGTCTGCTTTGCCATA  
TTCTGCCGCCAAATTGAAGCAGCGGACCACGCTTTTGAACCTGACTAACAATTACACTTG 3360  
\*\*\*\*\*  
TTCTGCCGCCAAATTGAAGCAGCGGACCACGCTTTTGAACCTGACTAACAATTACACTTG

**Fig. 5-5. Continued**

```

GGTTAGAGCCTTAAGCGCCCAGATGGGGGTCGGCGGGGATGACTCCTGGGGGCAGAAGGT 3420
*****
GGTTAGAGCCTTAAGCGCCCAGATGGGGGTCGGCGGGGATGACTCCTGGGGGCAGAAGGT

CCACCCGGAATTCTGCCTGGATGCTCAAAAAGCCCGCCAGCTCCGCCTGGTGATTCAGCC 3480
*****
CCACCCGGAATTCTGCCTGGATGCTCAAAAAGCCCGCCAGCTTCGCCTGGTGATTCAGCC
      Stop
CCTTTTACTAAAATAAATGCTACAATTGACTTAACAGGATGAAATTTTAGTAAAAGCAA 3540
*****
CCTTTTACTAAAATAAATGCTACAATTGACTTAACAGGATGAAATTTTAGTAAAAGCAA

GCGAGTGAGGAAGATGGCAACGATCAGAGAAGTGCCAAGGCAGCCGGCGTGTGCTAGCG 3600
*****
GCGAGTGAGGAAGATGGCAACGATCAGAGAAGTGCCAAGGCAGCCGGCGTGTGCTAGCG

ACGGTTTCCCGGG 3613
*****
ACGGTTTCCCGGG

```

**Fig. 5-5. DNA sequence of  $\beta$ -galactosidase gene and flanking regions of *L. bulgaricus* SBT0034 and B131. The start and stop codons are underlined along with a putative *E. coli* transcriptional promoter(-10 and -35 regions) and a possible ribosomal binding site(RBS). A region of dyad symmetry near the stop codon is indicated by arrows. Identical in both sequence is indicated by \*.**

## 第6章 *Lactobacillus helveticus* の乳糖非資化性変異株の取得

はじめに

乳酸菌は古来から発酵食品に用いられてきた安全で有用な微生物である。近年はその保健効果に関して関心が高まっていることから、遺伝子導入技術を含む育種法に関する精力的な研究が進められている。著者らは第4章で述べたように抗生物質耐性を選択マーカーとする *Lactobacillus helveticus* 宿主ベクターシステムを開発<sup>11)</sup>した。しかしながらこれまでに開発された乳酸菌用ベクターは、いずれも抗生物質耐性遺伝子を形質転換体選択用のマーカーとしており、食品用途への応用は困難なものである。

第5章で述べた *Lactobacillus bulgaricus* の  $\beta$ -ガラクトシダーゼ遺伝子をマーカー遺伝子としてベクターDNAに組み込んだプラスミドを使用するためには乳糖非資化性の *L. helveticus* が必要となる。そこで、変異剤処理により *L. helveticus* から  $\beta$ -ガラクトシダーゼ活性を欠失した変異株を取得し、その安定性と形質転換条件を検討した。

## 実験材料と実験方法

### 1. 供試菌株と使用プラスミド

変異取得実験の親株として *Lactobacillus helveticus* SBT2161C を使用した。また、形質転換効率の測定には pLHR<sup>11)</sup> を用いた。親株は Lactobacilli MRS 培地 (Difco 社製) または エーリッカー培地 (Difco 社製) で培養した。乳糖非資化性変異株は 1% のグルコースを添加した脱脂乳培地または MRS 培地で培養した。乳糖非資化性変異株の選択には乳糖-MRS 培地 (MRS 培地のグルコースを乳糖に置き換えたもの) または乳糖-エーリッカー培地 (エーリッカー培地の乳糖のみを糖源としたもの) を用いた。

### 2. 生育曲線の作成

クレットメーター用の試験管中で静置培養を行なった。一定時間ごとにクレットメーター (Klett-Summerson Photoelectric Colorimeter) で OD<sub>660</sub> の比濁定量を行ない (クレット値), 生育曲線を作成した。また, 生菌数の測定は以下のように行なった。測定するサンプル 1 ml を生理食塩水 9 ml に加えて混合し 10 倍希釈液を調製した。同様に希釈を繰り返して適当な希釈率とした後, その 0.1 ml を MRS プレートまたはエーリッカープレートに塗抹した。37°C で 2 日間の嫌気培養を行ってプレートあたり 30-300 のコロニーが出現したプレートのコロニー数を計数してサンプル中の生菌数を算出した。

### 3. 抗生物質濃度勾配平板法<sup>112)</sup> による抗生物質の最低生育阻止濃度の判定

被験用の抗生物質を, 使用する最高濃度で添加した寒天培地 10 ml でプレートに斜面寒天培地を形成した。その上に抗生物質を含まない同寒天培地 10 ml を加え平らに固化させた。抗生物質の拡散を待って同プレート上に指示菌の菌液 0.1 ml を塗抹して培養し, コロニーの生育状態からおおよその最低生育阻止濃度を判定した。

#### 4. 菌体の変異剤処理<sup>113)</sup>

50 mlのMRS培地に*L. helveticus*の種菌を2%接種し、16時間の培養を行った。集菌後、50 mlの1/15 M 燐酸緩衝液 (pH 7.0) で3回洗浄し、5 mlの同緩衝液に懸濁した。その500 $\mu$ lを1.5 ml容量のマикроチューブに分注し、500 $\mu$ lのNTG溶液を0-1,200 $\mu$ g/ml添加して混合後、37 $^{\circ}$ Cに0~60分間静置した。集菌後、1 mlの1/15 M 燐酸緩衝液 (pH 7.0) で3回洗浄して10 mlのMRS培地に懸濁し、37 $^{\circ}$ Cで3時間の培養を行った。培養終了後、集菌して1 mlのMRS培地に懸濁した。菌体を長期保存する場合は、15%のglycerolを含むMRS培地に懸濁して-80 $^{\circ}$ Cで保存した。

#### 5. 乳糖資化能欠損株の選択法

変異処理した菌体を希釈後MRSプレートに塗沫して嫌気培養し、出現したコロニーから釣菌してエーリッカープレートと乳糖-エーリッカープレートに植菌した。嫌気培養後、エーリッカープレートに生育し、乳糖-エーリッカープレートに生育しない株を乳糖資化能欠損株として選択した。

#### 6. 乳糖資化能欠損株の形質転換条件の検討

第5章に示した方法<sup>111)</sup>に従って行った。

## 結果

### 1. *L. helveticus* の変異指標の選定

*L. helveticus* の変異操作の条件検討を行うためには、変異した場合に確認しやすい指標となる形質を選定する必要がある。

MRS培地とエーリッカー培地でそれぞれ抗生物質濃度勾配平板法により抗生物質の最低生育阻止濃度を決定した。テトラサイクリン、ストレプトマイシン、アンピシリン、クロラムフェニコール、リファンピシン、エリスロマイシンを添加したMRS培地で調製した濃度勾配平板プレートではコロニー形成は認められなかった。また、カナマイシン、フシジン酸、サイクロセリンを添加したプレートでは、平板全体に菌が薄くマット状に生育し、最低生育阻止濃度を決定することができなかった。一方、ストレプトマイシン、カナマイシン、フシジン酸、サイクロセリン、リファンピシンを含むエーリッカー培地で調製した濃度勾配平板培地では抗生物質濃度勾配に従った生育阻害が観察され、およその最低生育阻止濃度を決定することができた。そこで、ストレプトマイシンとリファンピシンの2抗生物質について添加濃度の異なるエーリッカープレートを調製して自然突然変異による耐性株の出現頻度を求めた。その結果をTable 6-1に示した。いずれも約 $10^{-6}$ の頻度で出現していた。この頻度は大腸菌の1遺伝子座で起こる自然突然変異の頻度<sup>113)</sup>と一致している。したがってリファンピシン耐性株またはストレプトマイシン耐性株の出現頻度を指標として変異率の変化を確認できるものと判断した。

### 2. *L. helveticus* の生育曲線の作成

遺伝子の変異はDNAの合成あるいは修復のミスにより生じるため、菌体を変異処理するには増殖の盛んな対数増殖期に行うのが一般的である。そこで、*L. helveticus*の生育曲線を作成し、培養時間を決定した。MRS培地で一晚培養した種菌をMRS培地に2%接種し、クレット値と生菌数の変化を測定した。その結果を

Fig. 6-1に示した。培養10時間以下では生菌数是对数的な増加を示しているが菌数が少ないため、クレット値は増加していない。12-18時間で生菌数、クレット値とも対数増殖を示し、以後増殖速度が緩やかになっている (Fig. 6-1)。この結果から培養時間は、15-16時間に設定した。

### 3. 変異処理時のNTG濃度の検討

菌体の変異処理に適当なNTG濃度を決定するために種々のNTG濃度で菌体を処理した場合の生残率と変異率を調べた。変異率は、 $20\mu\text{g/ml}$ のリファンピシンを含むエーリッカードプレートに生育したリファンピシン耐性株の出現頻度から算出した。また、NTG処理時間は30分間とした。その結果をFig. 6-2 に示した。NTG濃度の増加にともなって生残率是对数的に低下した。一方、変異率は $300\mu\text{g/ml}$ までNTG濃度の増加に伴って増加を示したが、 $600\mu\text{g/ml}$ ではやや減少した。 $300\mu\text{g/ml}$ 以上の濃度ではあまり変異率の増加が著しくないにもかかわらず、生残率は直線的に減少し続けることから $300\mu\text{g/ml}$ 程度の濃度による処理が適当であると判断した。なお、NTG処理後の変異の固定のために、エーリッカードプレートを用いた場合には培養による菌数の低下が認められた。これはMRS培地で増殖した種菌がエーリッカード培地に適応して増殖するためには時間が必要であるためと考えられる。従って、変異の固定のための培養にはMRS培地を用いることとした。

### 4. NTGによる変異処理時間の検討

NTGによる変異処理時間を決定するために異なる処理時間での*L. helveticus* SBT2161Cの変異率と生残率を調べた。変異率は $20\mu\text{g/ml}$ のリファンピシンを含むエーリッカードプレートに生育したリファンピシン耐性株の出現頻度から算出した。また、NTG処理は $300\mu\text{g/ml}$ 及び $450\mu\text{g/ml}$ で行った。その結果をFig. 6-3に示した。NTG処理時間に反比例して生残率は低下した。NTG濃度が $450\mu\text{g/ml}$ の場合は $300\mu\text{g/ml}$ に比較して生残率の低下が速く、NTG処理時間45分間以上では

10<sup>2</sup> CFU/ml 以下となり生菌数の測定限界以下であった。一方、変異率に関しては NTG濃度が300 μg/mlの場合は処理時間60分間まで時間に伴う変異率の上昇が認められたが、NTG濃度が450 μg/mlの場合は処理時間15分間で最高値を示した後低下し、処理時間45分間以上では測定限界以下であった。変異率の最高値はNTG濃度が450 μg/ml、処理時間15分間で得られた。しかし、NTG濃度が450 μg/mlの場合は300 μg/mlの場合に比較して生残率の低下が速く、変異率の変動も大きいことから、菌体の培養状態等の変動により常に安定した変異率を得られるとは限らないと判断した。NTG濃度が300 μg/mlの場合は30分間以上の処理時間で安定した変異率が得られたことから、変異処理条件はNTG濃度が300 μg/ml、処理時間30分間とした。

#### 5. 乳糖資化能欠損株の選択

変異処理を行った菌液から乳糖資化能欠損株を選択する最も確実な方法として乳糖以外の糖を含まない乳糖-エーリッカープレートでの生育の有無により判定する方法を用いた。ペニシリンスクリーニング法<sup>115)</sup>や培地へのONPGの添加により野性株を淘汰し乳糖資化能欠損株を濃縮する方法も試みたが、試験した範囲では効果的な選択はできなかった。また、培地中にX-Galを添加して乳糖資化能を有する株を発色させる方法も試験したが、嫌気培養のため明瞭な発色が認められなかった。しかし、空気中に数時間放置することにより発色することから一次スクリーニングに利用した。グルコースを糖源とする培地で生育した株のうち、乳糖を糖源とする培地での生育が認められない株が約1.3%、ほとんど生育が認められない株が1.1%であった。得られた132株の乳糖資化能欠損株を純化の後に保存した。

## 6. 乳糖資化能欠損株の安定性試験

乳糖資化能欠損株のうちpLHRによる形質転換効率が比較的高かった No. 14 株, No. 66 株, No. 74 株, No. 83 株について乳糖非資化性の安定性試験を行った。10 mlのMRS培地で培養した菌液を遠心分離により集菌し生理食塩水で洗浄後, 0.3 ml の生理食塩水に懸濁した。乳糖-エーリッカープレートに塗沫して嫌気培養し, コロニーの出現状況により復帰変異株の出現頻度を調べた。その結果, No. 74株は復帰変異株の出現頻度が高く, No. 14 株でも復帰変異株の出現が認められた。No. 66 株, No. 83 株の2株については, 全くコロニーの出現は認められなかった。

No. 66 株, No. 83 株の2株については脱脂乳培地についても復帰変異株の出現の有無を確認した。その結果, No. 83 株は脱脂乳プレートにおいて低頻度ながら復帰変異株のコロニー形成が認められ, 脱脂乳培地においても3-5日間の培養で培地の凝固が認められた。No. 66 株については, 復帰変異株の出現は全く認められなかった。また継代培養を30 回行っても復帰変異株の出現は認められなかった。そこで本株をSBT2195 と命名し, 以後の実験に供した。

## 7. SBT2195 株の形質転換条件の検討

宿主-ベクター系を用いて遺伝子のクローニングを行う場合には, プラスミドを効率よく導入するために形質転換効率が高いことが必要である。しかし, SBT2195株は, 親株である*L. helveticus* SBT2161 株と比較して形質転換効率が低く, 将来, 遺伝子クローニングの宿主として用いる際に問題となるものと考えられた。そこで, SBT2195 株の形質転換条件の検討を行い, 形質転換効率の向上をはかった。菌体を培養する時に添加するグリシンの濃度, 電圧, 菌体の培養時間について検討した。形質転換効率に大きく影響したのは菌体の培養時間であった。その結果をFig. 6-4に示した。SBT2195 株では28-30時間付近で形質転換の効率が

最大となった。この実験ではSBT2195 株の形質転換効率は約20形質転換体/ $\mu\text{g}$  DNAとかなり低い形質転換効率であった。以上の結果からSBT2195 株では培養を28時間の菌体を形質転換に用いることにした。

## 考察

*L. helveticus* SBT2161CのNTG処理による突然変異の誘発条件を検討するため、NTG処理によるリファンピシンとストレプトマイシン耐性株の出現頻度を調べた。リファンピシン耐性株の出現頻度は $10^{-4}$  -  $10^{-3}$ であり自然突然変異出現率の100-1,000倍であった。一方、乳糖資化性能欠損株に関しては、NTG処理で乳糖-エーリッカープレートに全く生育できない株、またはほとんど生育できない株が $2.4 \times 10^{-2}$ の頻度で出現した。これはリファンピシン耐性変異株の出現頻度に較べてかなり高い値である。この原因として乳糖資化性に係わる遺伝子座がリファンピシン耐性に係わる遺伝子座に比較して大きい、乳糖資化性に係わる遺伝子座が複数ある、乳糖資化性に係わる遺伝子座にホットスポットのような不安定な部分がある等が考えられる。しかし、得られた乳糖資化性能欠損株はすべて $\beta$ -ガラクトシダーゼ活性の低下した株であった。このことは $\beta$ -ガラクトシダーゼ遺伝子に変異が生じている可能性が高いことを示唆している。

変異株の安定性に関しては、得られた乳糖資化性能欠損株のほとんどに復帰変異が認められることからワンポイント変異がほとんどであると推定される。また、同じ株でも継代培養する培地により復帰変異率がことなる。No. 83株は乳糖-エーリッカー培地で継代培養しても復帰変異は認められないが、脱脂乳培地では復帰変異が認められた。これは乳糖-エーリッカー培地では生育できないが、脱脂乳培地では生育可能な復帰変異が生じたためと考えられる。一方、No. 66株(SBT2195)は脱脂乳培地で継代培養しても復帰変異は全く認められないことから $\beta$ -ガラクトシダーゼ活性を選択マーカーとするベクターの宿主菌として用いることができるものと判断した。

SBT2195の最高形質転換効率は20形質転換体/ $\mu$ g DNAであった。これは親株であるSBT2161Cの形質転換効率の1/20であり、かなり低い効率であった。この

ことは形質転換に影響を与えるなんらかの遺伝子が変化した可能性を示唆するものであるが*L. helveticus*で直接DNA組換えを行うことを想定していないため問題とはならないと判断する。

## 要約

*L. helveticus* SBT2161CのNTG処理による突然変異の誘発条件を検討した。まず濃度勾配平板プレートで最低生育阻止濃度の決定を行い $20\mu\text{g/ml}$ のリファンピシンを含む培地で変異率の測定を行うこととした。また、生育曲線より対数増殖期にあたる培養15-16時間の菌体を用いて変異処理を行った。

NTG処理によるリファンピシン耐性株の出現頻度は $10^{-4}$ - $10^{-3}$ であり自然突然変異出現率の100-1,000倍であった。このことはリファンピシン耐性変異の出現率を指標として変異処理条件を検討することができることを示している。そこで、処理条件の検討を行い、NTG濃度 $300\mu\text{g/ml}$ 、処理時間30分で行うことにした。本条件でNTG処理を行いエーリッカープレートで生育し、乳糖-エーリッカープレート(乳糖を唯一の糖源としたもの)で生育できないコロニーを乳糖資化性能欠損株として取得した。乳糖-エーリッカープレートに全く生育できない株、またはほとんど生育できない株が $2.4\times 10^{-2}$ の頻度で出現した。これはリファンピシン耐性変異株の出現頻度に較べてかなり高い値である。得られた乳糖資化性能欠損株はすべて $\beta$ -ガラクトシダーゼ活性の低下した株であった。このことは $\beta$ -ガラクトシダーゼ遺伝子に変異が生じている可能性が高いことを示唆している。

得られた乳糖資化性能欠損株のほとんどに復帰変異が認められることからワンポイント変異がほとんどであると推定した。また、同じ株でも継代培養する培地により復帰変異率がことなる。No. 83株は乳糖-エーリッカー培地で継代培養しても復帰変異は認められないが、脱脂乳培地では復帰変異が認められた。これは乳糖-エーリッカー培地では生育できないが、脱脂乳培地では生育可能な復帰変異が生じたためと考えられる。一方、No. 66株は脱脂乳培地で30回継代培養しても復帰変異は全く認められないことから $\beta$ -ガラクトシダーゼ活性を選択マーカーとするベクターの宿主菌として用いることができるものと判断し、*L. helveticus*

SBT2195 と命名し、以後の実験に用いた。

SBT2195 の最高の形質転換効率は親株である SBT2161C の形質転換効率の 1/20 とかなり低く、しかも、至適培養時間は 28 時間であった。このことは形質転換に影響を与えるなんらかの遺伝子が変化した可能性を示唆している。しかし、*L. helveticus* で直接 DNA 組換えを行うことを想定していないため問題とはならないと判断した。

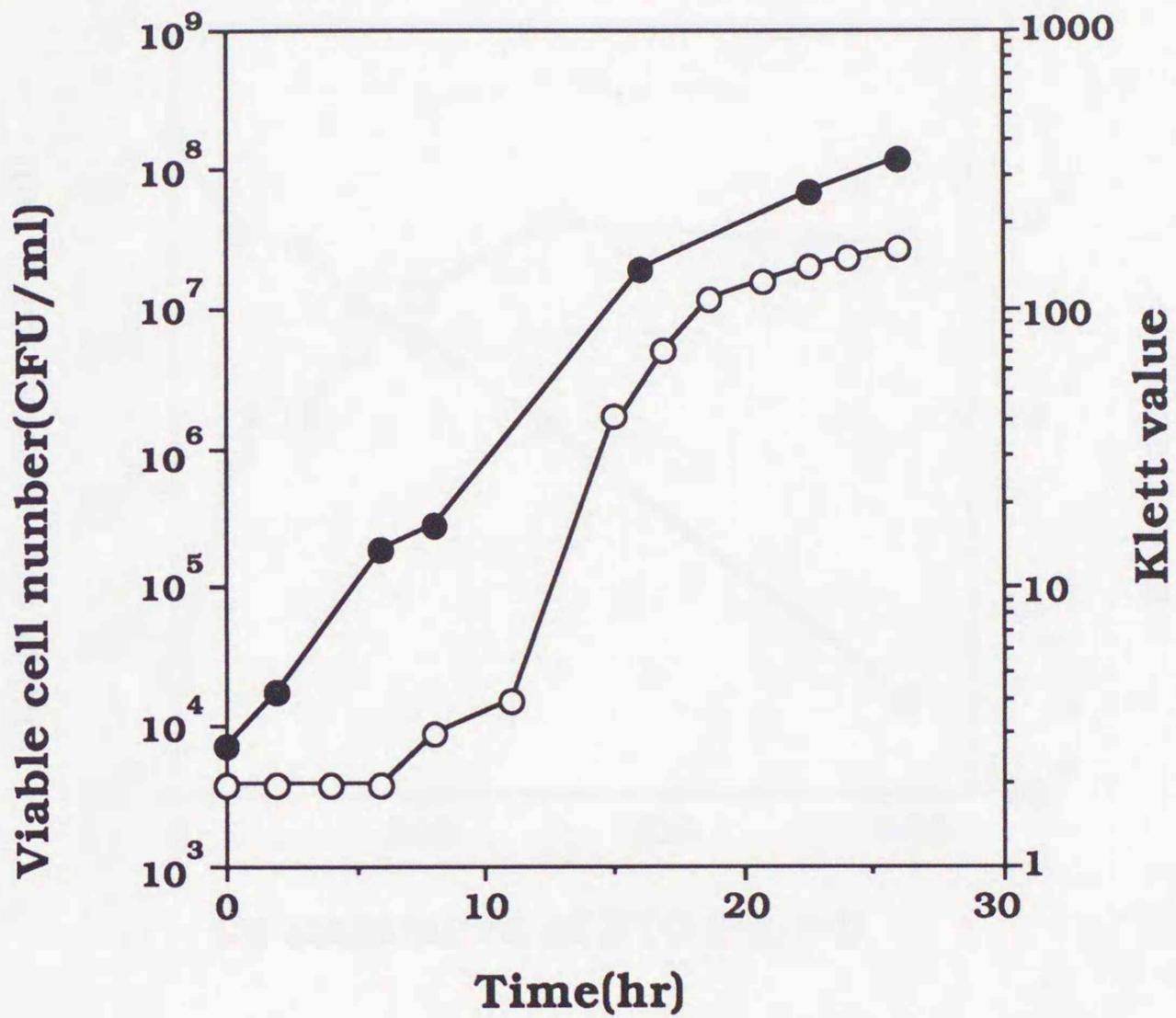
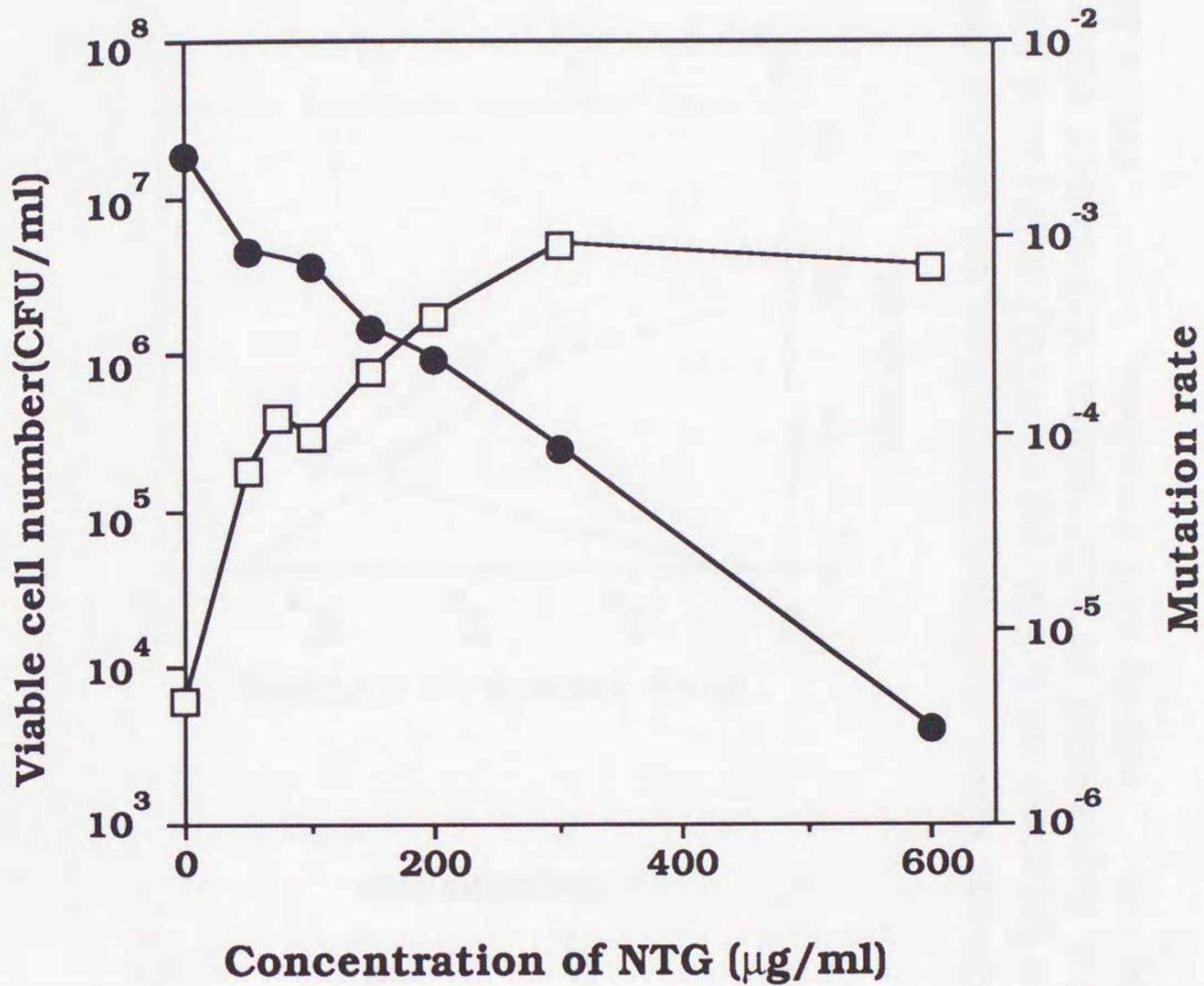


Fig. 6-1. Growth curve of *Lactobacillus helveticus* SBT2161C. Symbols: —●—, Viable cell number; —○—, klett value. CFU, colony forming unit.



**Fig. 6-2. Effects of NTG concentration on viable cell number and mutation rate. Symbols: —●— , viable cell number; —□— , mutation rate. Mutation rate was expressed as rifampicin resistance cell number/viable cell number. CFU, colony forming unit.**

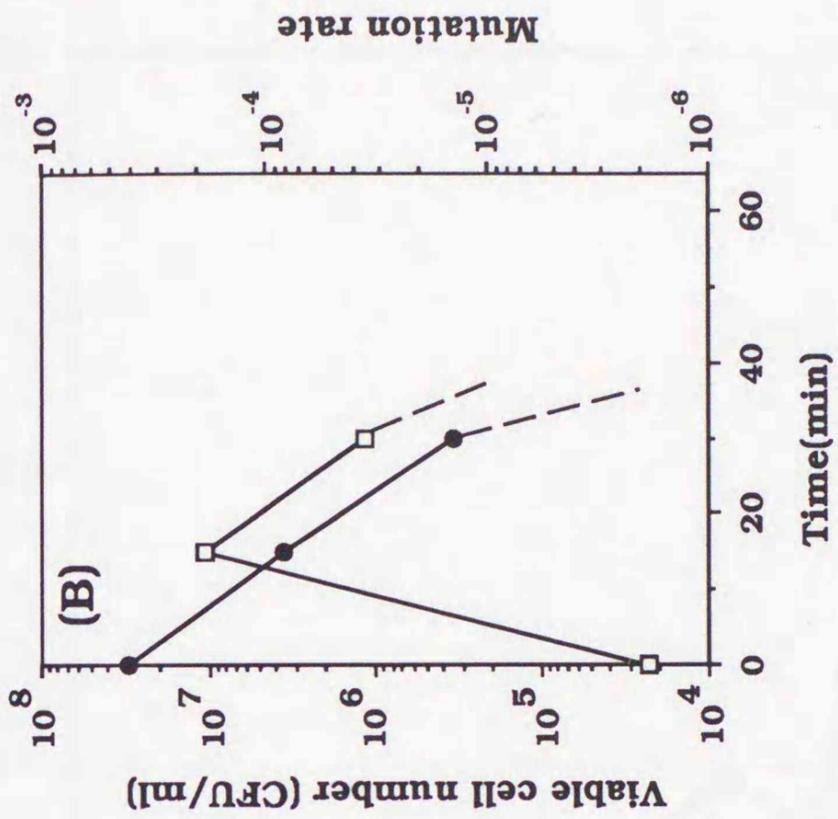
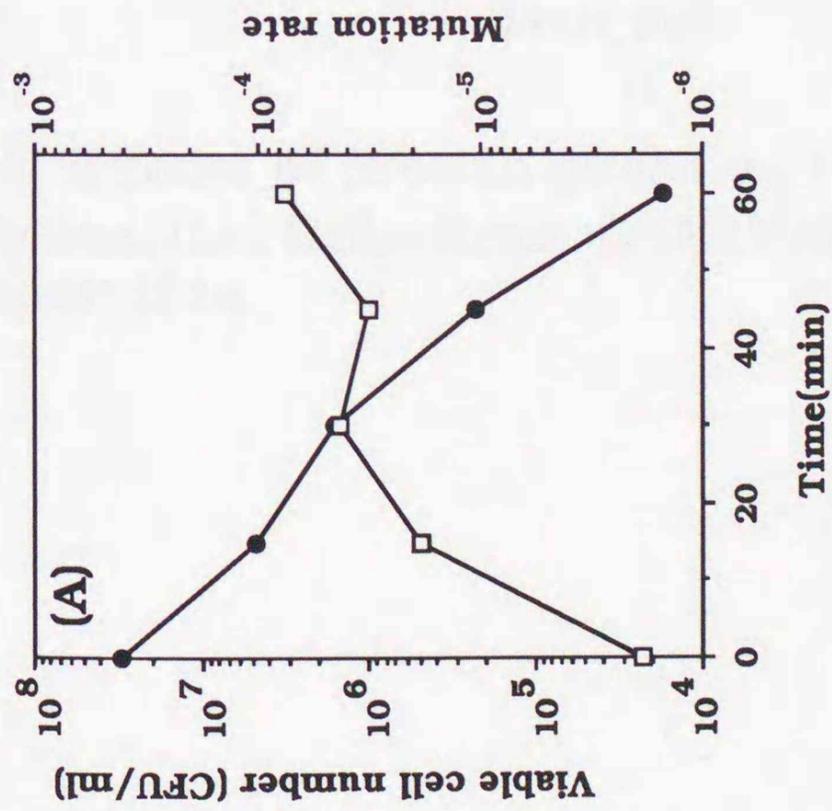
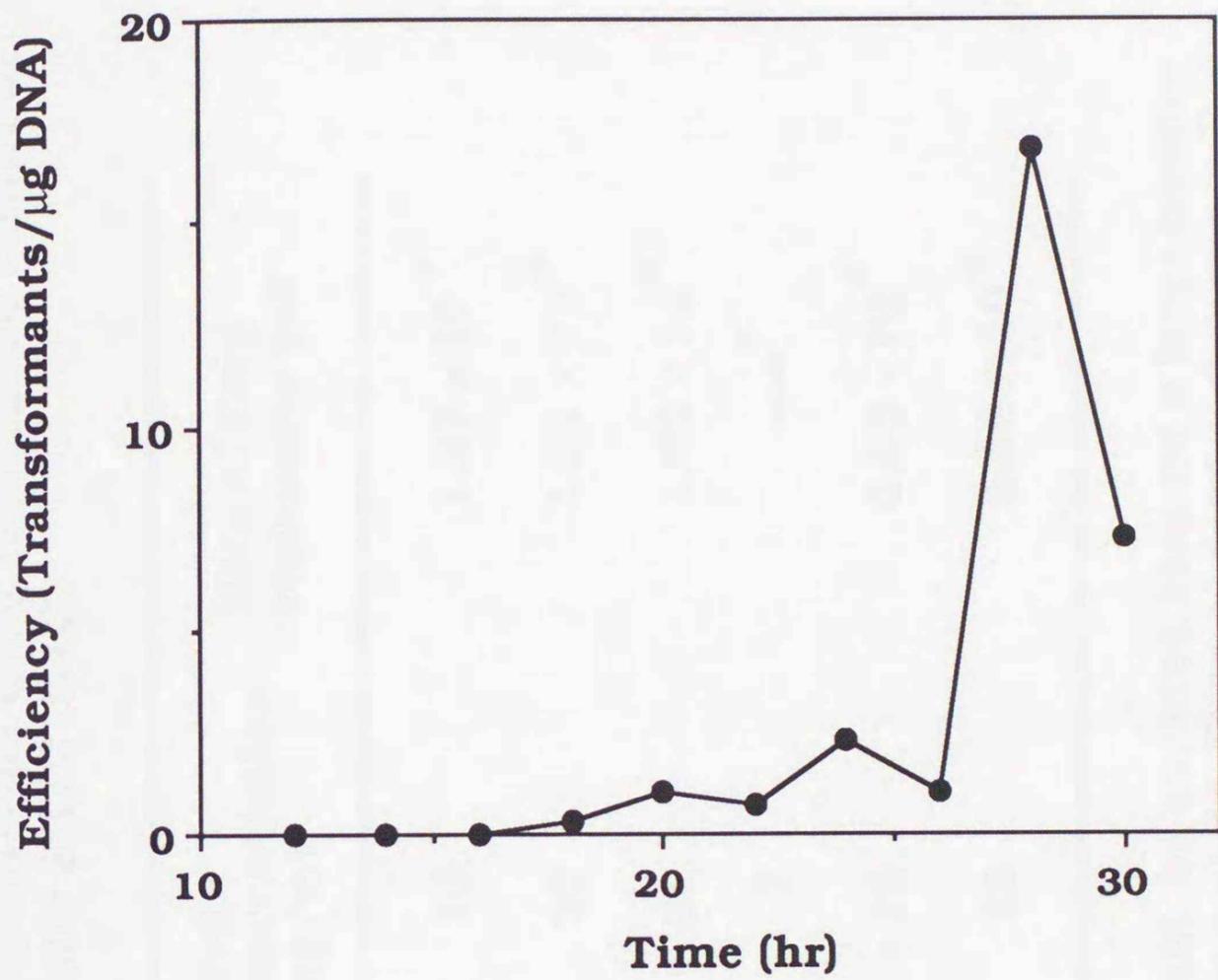


Fig. 6-3. Effects of NTG treatment time and concentration on viable cell number and mutation rate. Cells were treated with 300  $\mu\text{g}$  of NTG/ml(A) and 450  $\mu\text{g}$  of NTG/ml (B). Mutation rate was expressed as rifampicin resistance cell number /viable cell number. Symbols:  $\bullet$ —, viable cell number;  $\square$ —, mutation rate. CFU, colony forming unit.



**Fig. 6-4. Effects of growth phase on transformation of *Lactobacillus helveticus* SBT2195(Lac<sup>-</sup>) by electroporation.**

**Table 6-1. Rate of spontaneous drug resistance strain of *Lactobacillus helveticus* SBT2161C.**

<b>Drug</b>	<b>Drug concentration (mg/ml)</b>	<b>Rate of drug resistance cell</b>
<b>Rifampicin</b>	10	$1.27 \times 10^{-6}$
	20	$1.31 \times 10^{-6}$
	30	$1.33 \times 10^{-6}$
<b>Streptomycin</b>	7	*
	10	$6.95 \times 10^{-6}$
	12	$5.56 \times 10^{-6}$

\* Colony number could not be counted because a large number of colonies appeared on a plate. Rate of drug resistance cell was expressed as viable cell number/drug resistance cell number.

## 第7章 食品に利用可能なベクターpBG10の構築

はじめに

抗生物質を用いない食品に利用可能なベクター (food-grade vector) について McKayらは*Lactococcus lactis* subsp. *lactis*のナイシン耐性遺伝子を用いて構築したことを報告している<sup>6,11)</sup>。欧米ではナイシンは食品添加物として認可されているが日本では認可されていないため本システムは国内では使用できない。また, de Vosらは*L. lactis* subsp. *lactis*由来の $\beta$ -ガラクトシダーゼの調節遺伝子であるLacFを用いた*L. lactis* subsp. *lactis*用ベクターについて報告している<sup>12)</sup>。しかし, いずれも乳酸球菌に関するもので, 桿菌についてはfood-grade vectorの報告はない。

そこで,  $\beta$ -ガラクトシダーゼ活性欠損株である*L. helveticus* SBT2195を宿主とし, 抗生物質耐性遺伝子を全て除去し, *Lactobacillus delbruechii* subsp. *bulgaricus*由来の $\beta$ -ガラクトシダーゼを唯一の選択マーカーとする食品に利用可能なベクターであるpBG10を構築し, 外来性遺伝子の発現について検討した。

## 実験材料と実験方法

### 1. 供試菌株と培地及びプラスミド

*Lactobacillus helveticus* SBT2161C (潜在性プラスミドpLJ1を保有する*L. helveticus* SBT2161より自然にプラスミドが脱落した誘導体) と*Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* SBT0034 ( $\beta$ -ガラクトシダーゼ遺伝子を単離した元株) は脱脂乳培地 (12% 脱脂乳, 0.5% 酵母エキス, 115°Cで20分間滅菌) で37°C, 16時間培養後, -20°Cで保存した。*L. helveticus* SBT2161CをNTG処理して得られた乳糖非資化性変異株*Lactobacillus helveticus* SBT2195は1% グルコースを添加した脱脂乳培地で培養後-20°Cで保存した。実験に用いる時は*Lactobacilli* MRS培地 (Difco社製) で培養した。形質転換の宿主菌として用いた*Escherichia coli* JM105<sup>72)</sup> ( $\Delta lac-pro$ ) はLB培地<sup>71)</sup>を用い, 37°Cで培養した。抗生物質を用いる場合には, *E. coli* に対してはアンピシリン (50  $\mu\text{g/ml}$ ), エリスロマイシン (150  $\mu\text{g/ml}$ ) を用いた。また, *L. helveticus* にはエリスロマイシン (30  $\mu\text{g/ml}$ ) を用いた。 $\beta$ -ガラクトシダーゼ活性を有する形質転換体の選択では, *L. helveticus* に対しては乳糖-MRSプレート (MRS培地のグルコースを乳糖に置き換えたもの) または脱脂乳プレートを用い, *E. coli* に対しては乳糖-M9<sup>116)</sup> 最小培地 (グルコースを乳糖に置換し, チアミンを添加) を用いた。

プラスミドとしてはpBR329<sup>73)</sup>, pUC18<sup>72)</sup>, pLJ1<sup>103)</sup>, pLHR<sup>111)</sup> および pAM  $\beta$  1<sup>89,90)</sup> を実験に用いた。

### 2. 形質転換法

*L. helveticus* はエレクトロポレーション法<sup>103)</sup> により形質転換した。また, *E. coli* はHanahan らの方法<sup>76)</sup> により形質転換した。

### 3. プラスミドDNAの単離

*L. helveticus*からのプラスミド単離は前述の方法<sup>103)</sup> に従った。また, *E. coli*

からのプラスミドの単離はBirnboimとDolyの方法<sup>74)</sup>に従った。プラスミドDNAは cesium chloride-ethidium bromide 濃度勾配遠心により精製した<sup>75)</sup>。

#### 4. $\beta$ -ガラクトシダーゼ活性の測定<sup>117)</sup>と活性染色

一晚培養した菌体を回収し、0.1 M 燐酸緩衝液 (pH 7) で洗浄後、同緩衝液に懸濁し、超音波処理を行った。遠心分離 (15,000rpm, 4°C, 10分) により菌体破砕物を除去し、得られた上清液を粗酵素抽出液とした。 $\beta$ -ガラクトシダーゼ活性測定の基質としてONPGを用いた。2 mlの5 mM ONPG (pH 7の0.1 M 燐酸緩衝液に溶解したもの) に0.5 mlの粗酵素抽出液を加え、37°Cで10分間反応後 2.5 mlの0.5 M炭酸ナトリウムを加えて反応を停止した。生成された $o$ -ニトロフェノールを420nmの吸光度より測定し、1分間当たり1  $\mu$ mol の $o$ -ニトロフェノールを生成する酵素量を1単位とした。BSAを標準としBio-Rad protein assay を用い、595nmの吸光度より蛋白量を測定した。

1.5-mm厚の6%ポリアクリルアミドゲルを用いLaemmliの方法<sup>109)</sup>に従ってPAGEを行った。 $\beta$ -ガラクトシダーゼ活性を有するバンドを検出するため、ゲルを40  $\mu$ g/mlのX-Gal溶液 (pH 7の10 mMトリス塩酸緩衝液に溶解したもの) に37°Cで1時間浸漬し、青色に染色されるバンドを $\beta$ -ガラクトシダーゼと判定した。

#### 5. $\alpha$ -アミラーゼ活性の検出

0.2%の可溶性スターチを含むMRSプレートに菌を塗抹し37°Cで2日間嫌気培養後、0.2%ヨウ素を含む2%ヨウ化カリウム溶液を噴霧し菌の周囲に形成されるハローにより $\alpha$ -アミラーゼ活性を検出した。

#### 6. Polymerase chain reaction (PCR)<sup>118,119)</sup>

PCRはGeneAmp DNA Amplification Reagent Kit (Perkin Elmer Cetus, Norwalk, Conn., U.S.A.) を用い、Zymoreactor (アトー社製) で行った。PCR用プライマーはCyclone plus DNA synthesizer (MilliGen/Biosearch, Burlington, Mass., U.S.A.) を用いて合成した。

## 結果

### 1. pLJ1の複製必須領域の決定

第1章でpLJ1上のORFが複製に関与している可能性が示唆された。そこで、pLJ1を適当な制限酵素で切断し、ori検索用ベクターとしてエリスロマイシン耐性遺伝子を組み込んだ*E. coli*用ベクターに連結した。得られたプラスミドを*L. helveticus* SBT2161Cに形質転換しエリスロマイシン耐性コロニーの出現により挿入断片が複製に必須な領域を含むか否かを判定した結果をFig. 7-1に示した。ORFのN末端領域を含むHaeIII断片(1.57 kb)を連結したプラスミドを保有するNo. 1株、ORFのC末端領域を含むAccI-HindIII断片(1.04 kb)を連結したプラスミドを保有するNo. 2株ではエリスロマイシン耐性コロニーは得られなかった。一方、未知の蛋白質をコードするORFを含むAvaII-HindIII断片(1.54 kb)を連結したプラスミドを保有するNo. 3株のプラスミドのみがエリスロマイシン耐性コロニーを出現させた。また、本断片上に存在するORF中のAccI部位をKlenow断片で平滑末端化したプラスミドを保有するNo. 4株ではエリスロマイシン耐性コロニーは得られなかった。このことは、このORFがコードしている未知蛋白質が複製に関与していることを示唆する。そこで、このAvaII-HindIII断片(1.54 kb)をori断片として用いるためにpUC18にクローニングした。即ち、AvaII-HindIII断片のAvaIIをKlenow断片により平滑末端化した断片を切り出し、PstI部位を同様に平滑末端化後HindIIIで切断したpUC18に連結してpUC-LJ1構築した。次に、本プラスミドのHindIII部位をPstI部位に変換したpUC-LJ2を構築した(Fig. 7-2)。

### 2. pAM $\beta$ 1からのエリスロマイシン耐性遺伝子のクローニング

*L. helveticus*中で発現することが知られているpAM $\beta$ 1上のエリスロマイシン耐性遺伝子をコードするDdeI-AccI断片(950 bp)を切り出しKlenow断片で両

末端を平滑末端化した。一方、pUC18もXbaIで切断後、同様に平滑末端化して、両者を連結したプラスミドを構築した。カセットとして使用することを考慮し、このプラスミドのSmaI部位にSalIリンカーを連結することによりSmaI部位をSalI部位に変換したプラスミドをpUCEm3と命名した (Fig. 7-3)。

### 3. pBG8, pBG8Em1およびpBG8Em2の構築

*E. coli* 用ベクターpBR329のAvaI部位をSalI部位に変換したものよりori領域とアンピシリン耐性遺伝子の一部を含むPstI-SalI断片 (1.09 kb) を切り出す。pBG3よりβ-ガラクトシダーゼ遺伝子を含むSalI-BamHI断片 (3.2 kb) を切り出した。また、pUC-LJ2よりpLJ1のoriを含むBamHI-PstI断片 (1.54 kb) を切り出した。この3者を連結後、*E. coli* JM105を形質転換し、乳糖-M9培地 (糖源を乳糖にしたもの) で選択した。形質転換体より得られたプラスミドをpBG8と命名した (Fig. 7-4)。本ベクターのSalI部位に、pUCEm3より切り出したエリスロマイシン耐性遺伝子を含むSalI断片を挿入連結し、エリスロマイシン耐性で形質転換体を選択した。エリスロマイシン耐性遺伝子のプロモーターがβ-ガラクトシダーゼ遺伝子のプロモーターと同一方向に連結されたものをpBG8Em1、反対方向に連結されたものをpBG8Em2と命名した (Fig. 7-4)。

### 4. pBG8Em1およびpBG8Em2を保有する*L. helveticus* SBT2195の生育能

pBG8Em1およびpBG8Em2をβ-ガラクトシダーゼ欠損株である*L. helveticus* SBT2195に形質転換し、得られた形質転換体の各種培地での生育能を調べた。その結果をTable 7-1に示した。親株である*L. helveticus* SBT2161Cは乳糖を唯一の糖源とする乳糖選択培地 (乳糖-MRS培地および8%脱脂乳培地) で生育可能であった。一方、β-ガラクトシダーゼを欠損しているSBT2195は乳糖選択培地では生育できないが、pBG8Em1で形質転換すると乳糖選択培地でも生育可能であった。しかし、pBG8Em2はβ-ガラクトシダーゼが連結されているにも

係わらずSBT2195を形質転換しても乳糖を唯一の糖源とする培地では生育できなかった。このことは $\beta$ -ガラクトシダーゼ遺伝子そのもののプロモーターのみでは乳糖選択培地で生育するために十分な $\beta$ -ガラクトシダーゼを生産することができない。すなわち、SBT2195が乳糖選択培地で生育するためにはエリスロマイシン耐性遺伝子のプロモーターのリードスルーにより $\beta$ -ガラクトシダーゼが生産されることが必要であることを意味する。

#### 5. $\beta$ -ガラクトシダーゼの活性染色

*L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* SBT0034, *L. helveticus* SBT2195 (pBG8Em1), 親株のSBT2161Cおよび菌体抽出液を用いてPAGEを行い、それぞれの生産する $\beta$ -ガラクトシダーゼを検出するためゲルをX-Gal溶液に浸漬して活性染色を行った結果をFig. 7-5に示した。pBG8Em1を有するSBT2195 (lane 3) および*L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* SBT0034 (lane 1) は同じ位置に活性バンドが検出された。一方親株のSBT2161C (lane 2) および*E. coli* (lane 4) では移動度の少ない位置に活性バンドが検出され、明らかにSBT0034の $\beta$ -ガラクトシダーゼとは異なることが確認された。また、データは示していないが、乳糖選択培地では生育できないSBT2195 (pBG8Em2) においてもSBT2195 (pBG8Em1) と同じ位置に活性バンドが検出された。

#### 6. pBG9およびpBG10の構築

食品に利用するためには抗生物質耐性遺伝子は除去することが必要である。そこで、pBG8に含まれるアンピシリン耐性遺伝子の一部を除くため、pBR329をPstI部位で切断し、ヌクレアーゼBal31で消化後、PstIリンカーを付加して再連結した。形質転換体のプラスミドを解析した結果、アンピシリン耐性遺伝子のORFの停止コドン (TAA) の下流115 bpまで消化されていることが判明した。本プラスミドのAvaI部位をSalI部位に置換後*E. coli*用ori領域を含むPstI-SalI断片 (700

bp) を切り出し, pBG8の *E. coli* 用oriを含む *Pst*I-*Sa*II 断片 (約1.1 kb) と置換してpBG9を構築した (Fig. 7-6)。

前述したように *L. helveticus* SBT2195 が乳糖選択培地で生育するためにはエリスロマイシン耐性遺伝子プロモーターのリードスルーによる  $\beta$ -ガラクトシダーゼの発現が必須であると考えられる。従って, 食品に利用するためにはエリスロマイシン耐性遺伝子の構造遺伝子領域を除去しなければならない。そこで, PCRを用いてエリスロマイシン耐性遺伝子プロモーター領域の合成を行った。プロモーター領域の5'-末端側のプライマーとしてpUCEm3の *Sa*II 部位 (GTCGAC) を含む20塩基 (5'-GTCGACTCTAGTTAGAAGCA-3') を, また, 3'-末端のプライマーとして, *Sac*I 部位 (GAGCTC) と停止コドン (TAA) を付加した27塩基 (5'-TTAAGAGCTCAT GTAATCACTCCTTCT-3') を合成した。なお, 本プライマーの *Sac*I 部位の最初のGが開始コドンATGのGに当たるようにデザインした。また, 停止コドン (TAA) はエリスロマイシン耐性遺伝子プロモーターによる異種蛋白質の合成を止めるために読み枠が合うように付加した。pUCEm3を鋳型とし, 上記2種のプライマーを用いてPCRを行い, *Sa*II 部位から停止コドンまでのプロモーター断片 (134 bp) を合成し, *Sa*II 切断後Klenow断片処理を行ったpBG9に挿入連結した。これを用いて *E. coli* JM105 を形質転換し乳糖-M9最小培地で選択した。得られた形質転換体のプラスミドを解析し,  $\beta$ -ガラクトシダーゼ遺伝子プロモーターと同じ方向にエリスロマイシン耐性遺伝子プロモーターが連結されたものをpBG10と命名した (Fig. 7-7)。

#### 7. $\beta$ -ガラクトシダーゼ活性の測定

Table 7-1 で示した形質転換体およびpBG10を保有する形質転換体より粗抽出液を調製し, 生産する  $\beta$ -ガラクトシダーゼ活性を測定した。その結果をTable 7-2 に示した。親株である *L. helveticus* SBT2161Cに対する相対活性と比

活性を示した。 $\beta$ -ガラクトシダーゼ欠損株である*L. helveticus* SBT2195からは活性は検出されなかった。 $\beta$ -ガラクトシダーゼ遺伝子プロモーターとエリスロマイシン耐性遺伝子プロモーターが同一方向に連結されているpBG10およびpBG8Em1を保有するSBT2195は親株であるSBT2161Cの10倍の $\beta$ -ガラクトシダーゼを生産していた。一方、逆方向にエリスロマイシン耐性遺伝子プロモーターが連結されているpBG8Em2を保有するSBT2195は親株のわずか0.4倍の活性しか認められなかった。この結果は*L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* SBT0034由来の $\beta$ -ガラクトシダーゼのプロモーター単独ではSBT2195は乳糖を唯一の糖源とする培地では生育できないというTable 7-1の結果を支持する。

#### 8. *Bacillus licheniformis* 由来の $\alpha$ -アミラーゼ遺伝子の発現

pBG10に挿入するための外来性遺伝子として*Bacillus licheniformis* 由来の $\alpha$ -アミラーゼ遺伝子<sup>120)</sup>を用いた。 $\alpha$ -アミラーゼ遺伝子の開始コドンATGの次の塩基から20塩基 (5'-AAACAACAAAAACGGCTTTA-3')と停止コドンTAGからの20塩基 (5'-CATTCTTTGAACATAAATTG-3')の2本のプライマーを合成し、 $\alpha$ -アミラーゼ遺伝子を鋳型としてPCRを行った。得られた断片 (1,536 bp) を *SacI* で切断しKlenow断片処理したpBG10に連結し、エリスロマイシンプロモーターと同一方向に挿入されたプラスミドをpBG10Amyと命名した。pBG10Amyで*L. helveticus* SBT2195を形質転換し、脱脂乳プレートと乳糖-MRSプレートで選択した。得られたクローンを0.2%の可溶性スターチを含む乳糖-MRSプレートに画線した。十分生育した時点でヨード液を噴霧し、菌体の周辺に形成されるハローを調べた。その結果をFig. 7-8に示した。pBG10Amyを保有するSBT2195の周囲のみ明確なハローが認められた。

## 考察

*L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* SBT0034と *L. helveticus* SBT2195 (pGB8Em1) および SBT2195 (pGB8Em2) の  $\beta$ -ガラクトシダーゼはPAGEでは同じ移動度を有し、かつ、*L. helveticus* SBT2161Cや *E. coli* の  $\beta$ -ガラクトシダーゼよりかなり高い移動度を有している。このことは SBT0034 の  $\beta$ -ガラクトシダーゼ遺伝子は SBT2195 で発現し、親株の SBT2161C の  $\beta$ -ガラクトシダーゼとは異なることを示している。pBG8Em2では pLJ1 の ori 領域のプロモーターやエリスロマイシン耐性遺伝子プロモーターとは逆方向に  $\beta$ -ガラクトシダーゼ遺伝子プロモーターが連結されているため SBT2195 (pBG8Em2) では  $\beta$ -ガラクトシダーゼは自己のプロモーターのみで発現していると考えられる。しかし、pBG8や pBG8Em2 で形質転換した SBT2195 は乳糖選択培地 (乳糖-MRS培地, 脱脂乳培地) ではコロニーを形成することができない。一方、エリスロマイシン耐性遺伝子プロモーターと  $\beta$ -ガラクトシダーゼ遺伝子プロモーターが同一方向に連結されている pBG8Em1 を保有する SBT2195 は乳糖選択培地でも生育可能である。また、pBG8Em1 および pBG8Em2 を保有する SBT2195 の  $\beta$ -ガラクトシダーゼ活性は親株である SBT2161C の活性のそれぞれ 10 倍と 0.4 倍であった。このことは乳糖選択培地で SBT2195 が生育するためには SBT0034 由来の  $\beta$ -ガラクトシダーゼのプロモーターのみでは宿主の生育に必要な  $\beta$ -ガラクトシダーゼを生産することはできない。即ち、エリスロマイシン耐性遺伝子プロモーターのリードスルーによる  $\beta$ -ガラクトシダーゼの生産が必須であることを意味する。

pBG8Em1 を保有する *L. helveticus* SBT2195 は乳糖選択培地でも十分生育することができる。しかし、pBG8Em1 はエリスロマイシン耐性遺伝子とアンピシリン耐性遺伝子の一部を有している。そこで、食品に利用するには不適當なこれらの遺伝子を除去した。また、乳糖選択培地で生育するためにはエリスロマイシン耐性

遺伝子プロモーターのリードスルーによる $\beta$ -ガラクトシダーゼ遺伝子の発現が必須であることより、エリスロマイシン耐性遺伝子のプロモーター領域のみをPCRで合成し、それをpBG9の $\beta$ -ガラクトシダーゼ遺伝子上流に挿入しpBG10を構築した。本プラスミドで形質転換したSBT2195はpBG8Em1で形質転換したSBT2195と同等の $\beta$ -ガラクトシダーゼを生産しており、乳糖選択培地で生育可能であった。

宿主である*L. helveticus* SBT2195は $\beta$ -ガラクトシダーゼ欠損株であるため乳糖選択培地で生育するためにはpBG10が必須であることから脱脂乳培地で継代培養する限りはプラスミドは安定に保持される。

pBG10を保有すSBT2195の $\beta$ -ガラクトシダーゼ活性は親株であるSBT2161Cの約10倍である。即ち、エリスロマイシンプロモーター活性が非常に強いことを示している。このことは外来性遺伝子の発現プロモーターとして本プロモーターが使用できる可能性を示唆する。この考え方を示したのがFig. 7-9である。エリスロマイシンプロモーター（SD配列も具備している）の下流に存在するSacIで切断し、Klenow断片処理をすることによりATG-3'が平滑末端として出現する。ここに開始コドンATGを除いた構造遺伝子を挿入するならばエリスロマイシンプロモーターにより挿入遺伝子は発現可能となる。ただし、ターミネーターが存在すると後続のマーカースとしての $\beta$ -ガラクトシダーゼが発現しなくなるため、ターミネーターは除くことが必要である。この考え方に基づき*B. licheniformis*の遺伝子を合成し、SacI部位に挿入した。得られたプラスミドpBG10Amyを有するSBT2195は乳糖選択培地で生育可能であり、 $\alpha$ -アミラーゼ活性も検出された。このことは挿入した $\alpha$ -アミラーゼ遺伝子断片（1,536 bp）の大きさまでは乳糖選択培地で宿主菌が生育できるレベルでエリスロマイシンプロモーターのリードスルーによりマーカースである $\beta$ -ガラクトシダーゼが発現していることを意味する。

*SacI* 部位のほかに通常のクローニング部位として *PstI*, *BamHI* および *SaII* をも使用することができる。

酪農乳酸菌は古来より人類に食されてきたことから宿主としては極めて安全性は高いといえる。抗生物質耐性遺伝子を全く含まず、 $\beta$ -ガラクトシダーゼ遺伝子を唯一のマーカールとし、発現ベクターとしての機能も合わせ持ちしかも全塩基配列が明らかである pBG10 と乳糖非資化性株 *L. helveticus* SBT2195 の組み合わせにより極めて安全性の高い宿主-ベクターが完成したといえる。今後、発酵乳に望まれる諸性質に関連する遺伝子を本ベクターに挿入することにより製品の改良につながる分子育種が可能である。

## 要約

pLJ1の複製に関与する領域を含む断片，大腸菌のori断片および*L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* の $\beta$ -ガラクトシダーゼ遺伝子を連結したプラスミドpBG8を構築したが，本プラスミドを保有する*L. helveticus* SBT2195（乳糖非資化性株）は乳糖を唯一の糖源とする乳糖選択培地では $\beta$ -ガラクトシダーゼ遺伝子は発現しているにもかかわらず生育できなかった。このpBG8の $\beta$ -ガラクトシダーゼ遺伝子上流にpAM $\beta$ 1のエリスロマイシン耐性遺伝子を正逆両方向に挿入した。得られたプラスミドでSBT2195を形質転換したところエリスロマイシン耐性遺伝子と $\beta$ -ガラクトシダーゼ遺伝子のプロモーターの方向が同一のpBG8Em1を保有する形質転換体のみが乳糖選択培地で生育可能であった。そこで本形質転換体の $\beta$ -ガラクトシダーゼ活性を測定した。得られた活性値は親株である*L. helveticus* SBT2161Cの10倍であった。このことより $\beta$ -ガラクトシダーゼ活性を選択マーカーとするにはエリスロマイシンのプロモーターのリードスルーが必須であると結論された。

食品に応用可能なベクターを構築するためにpBG8の改造を行った。まず，大腸菌用ベクターpBR329のori領域のみを含むpBG9を構築した。このプラスミドに，エリスロマイシン耐性遺伝子のプロモーター領域のみをPCRで合成し挿入して，完全に抗生物質耐性遺伝子を除去した $\beta$ -ガラクトシダーゼのみを選択マーカーとするpBG10を構築した。本ベクターのエリスロマイシン耐性遺伝子のプロモーターは非常に強いことから本プロモーターの下流に発現ベクターとしても使用できるように外来性遺伝子のクローニング部位としてのSacI部位を配した。この部位にPCRで合成した*B. licheniformis*の $\alpha$ -アミラーゼ遺伝子の構造遺伝子（開始コドンは含まない）断片（約1.6 kb）を挿入したところ乳糖選択培地で生育可能であり，かつ，可溶性スターチを含む培地で $\alpha$ -アミラーゼ活性が認められた。このことは，1.6

kb 程度の大きさの外来性遺伝子を  $\beta$ -ガラクトシダーゼ遺伝子上流に挿入しても、乳糖選択培地で生育できるだけの  $\beta$ -ガラクトシダーゼは生産されていることを示している。

**Table 7-1. Colony forming ability of *L. helveticus* SBT2161C, SBT2195 and its transformants on various agar media.**

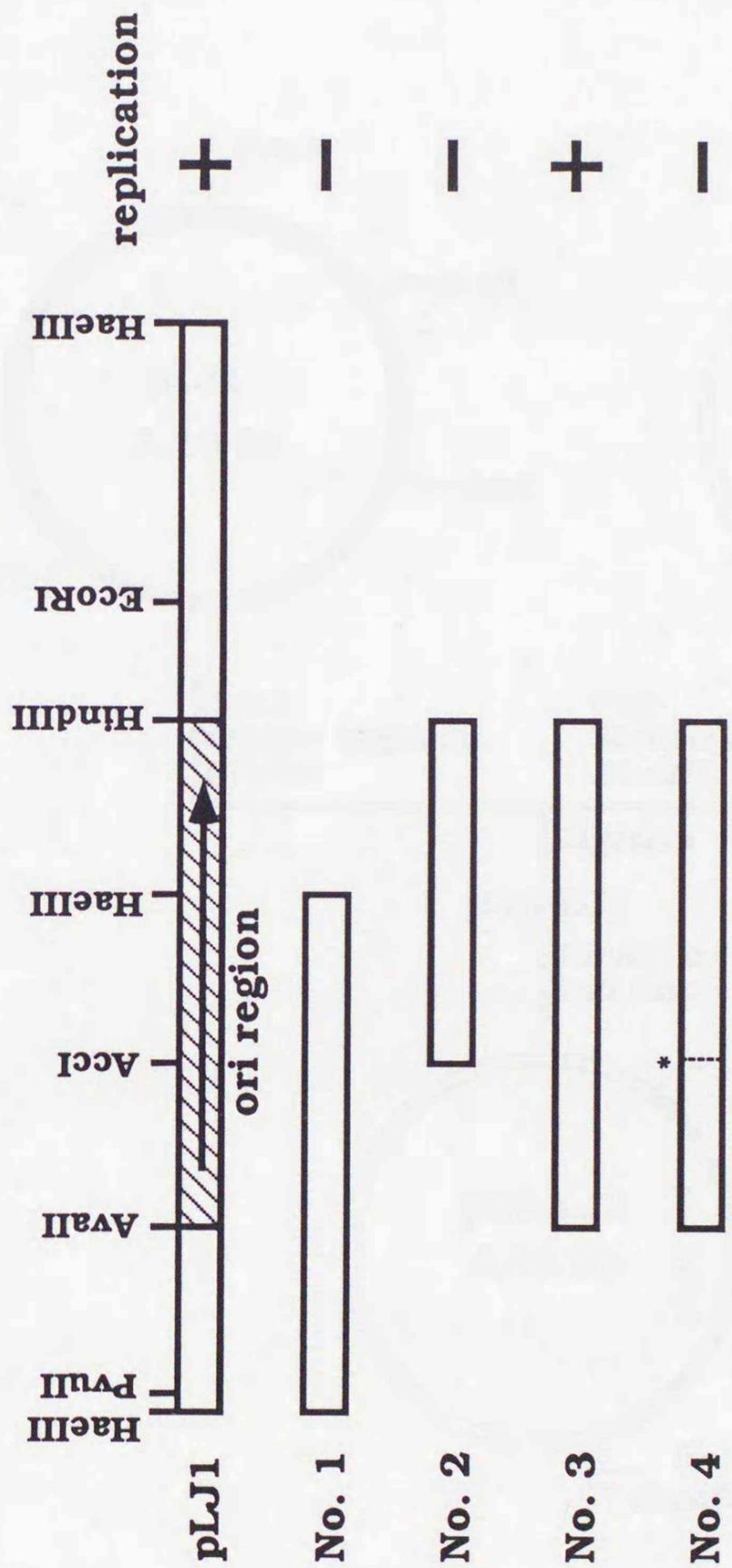
	<b>Strain</b>			
<b>Medium</b>	<b>SBT2161C</b>	<b>SBT2195</b>	<b>SBT2195 (pBG8Em1)</b>	<b>SBT2195 (pBG8Em2)</b>
<b>MRS</b>	+	+	+	+
<b>MRS(Em)</b>	-	-	+	+
<b>lactose-MRS</b>	+	-	+	-
<b>skim milk(8%)</b>	+	-	+	-

**SBT2195 :  $\beta$ -galactosidase-deficient mutant derived from SBT2161C.  
MRS(Em) : MRS medium supplemented with erythromycin(30  $\mu$ g/ml).  
lactose-MRS : Glucose in MRS medium was replaced by lactose.  
+, growth; - , no growth.**

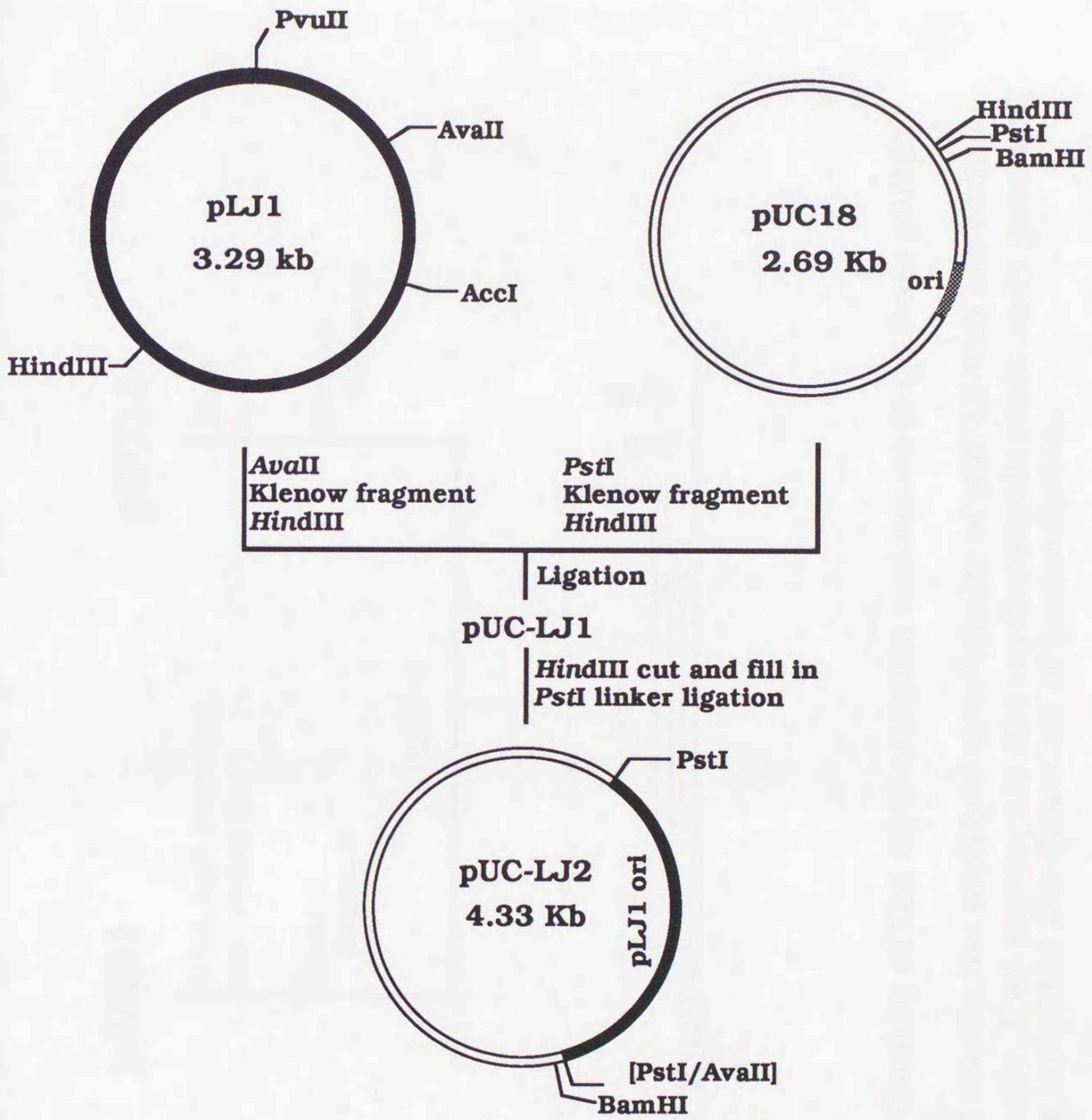
**Table 7-2.  $\beta$ -galactosidase activity in crude cell extracts of *L. helveticus* SBT2161C, SBT2195 and SBT2195 containing various plasmids.**

Strain	Specific activity (U/mg protein)	Relative activity
<i>L. helveticus</i> SBT2161C	1.44	1.00
<i>L. helveticus</i> SBT2195	0.00	0.00
<i>L. helveticus</i> SBT2195 (pBG8Em1)	15.18	10.54
<i>L. helveticus</i> SBT2195 (pBG8Em2)	0.58	0.40
<i>L. helveticus</i> SBT2195 (pBG10)	15.25	10.59

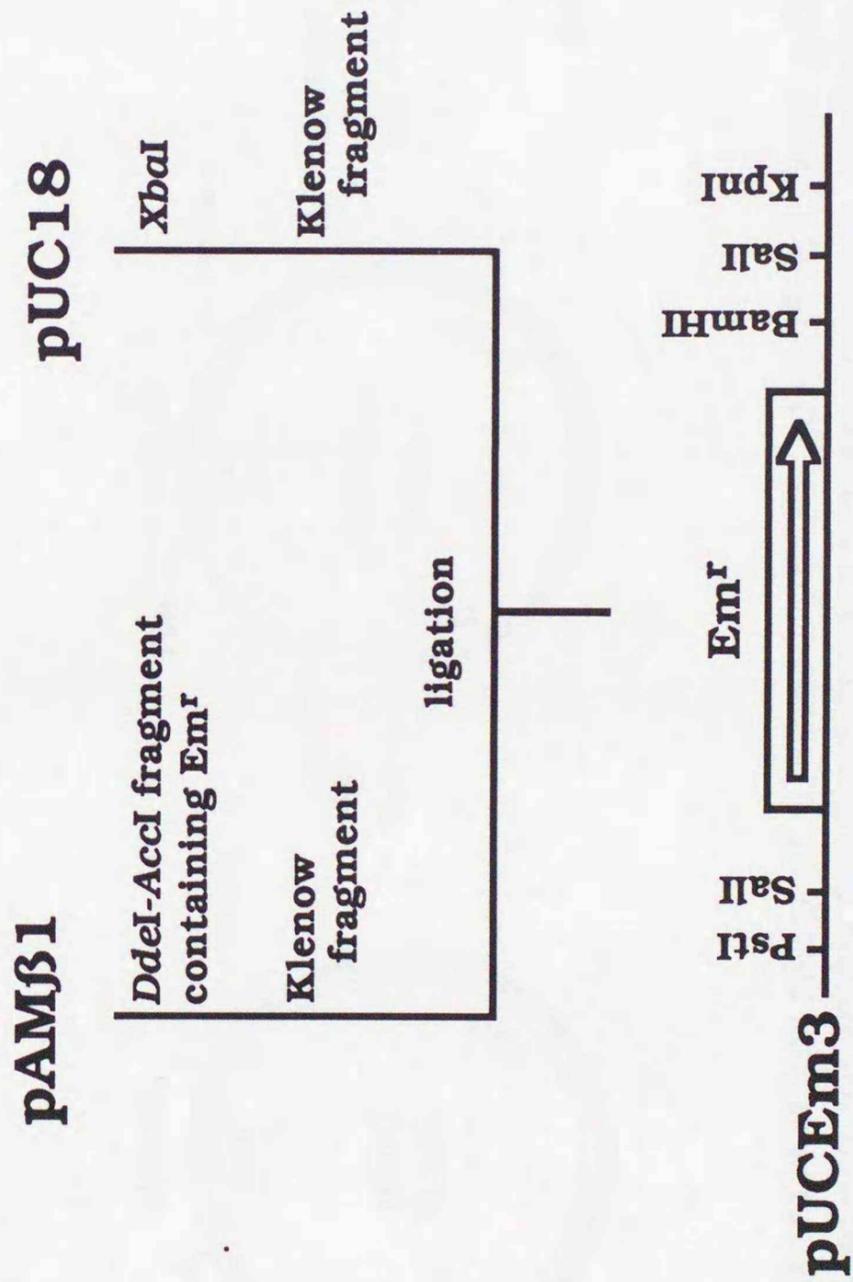
*L. helveticus* SBT2195 was  $\beta$ -galactosidase-deficient mutant derived from *L. helveticus* SBT2161C.



**Fig. 7-1. Determination of ori region of pLJ1. Symbols: , essential region for replication of pLJ1; \*, fill in site(AccI). The arrow indicates the direction of transcription of unknown protein gene.**



**Fig. 7-2. Construction of pUC-LJ2.**



**Fig. 7-3. Cloning of the erythromycin resistance gene from pAMβ1 to pUC18. The *smaI* site in the multiple cloning site of pUC18 was converted to a *SmaI* site. Em<sup>r</sup> represents the erythromycin resistance gene and the arrow indicates the direction of transcription.**

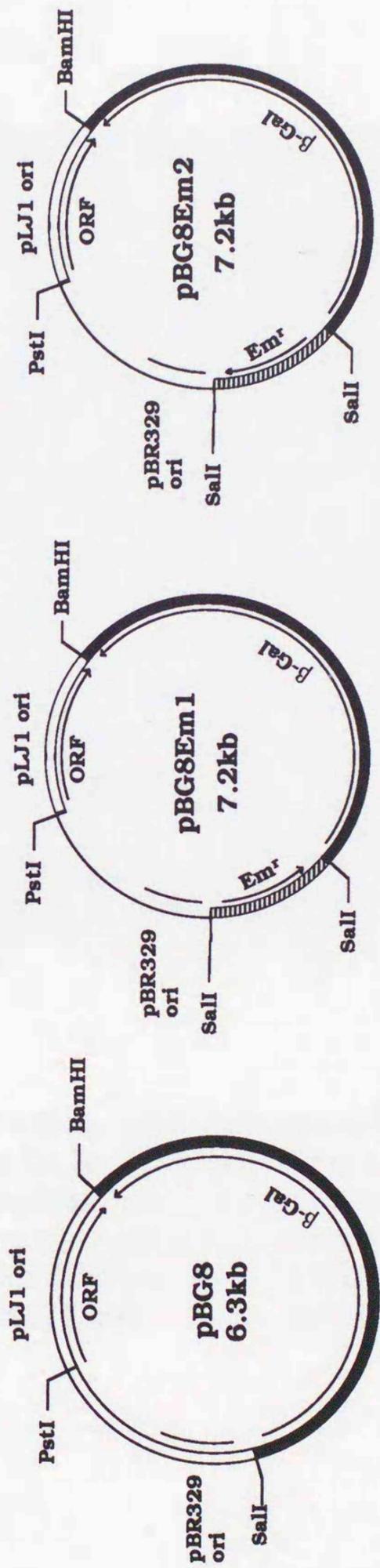
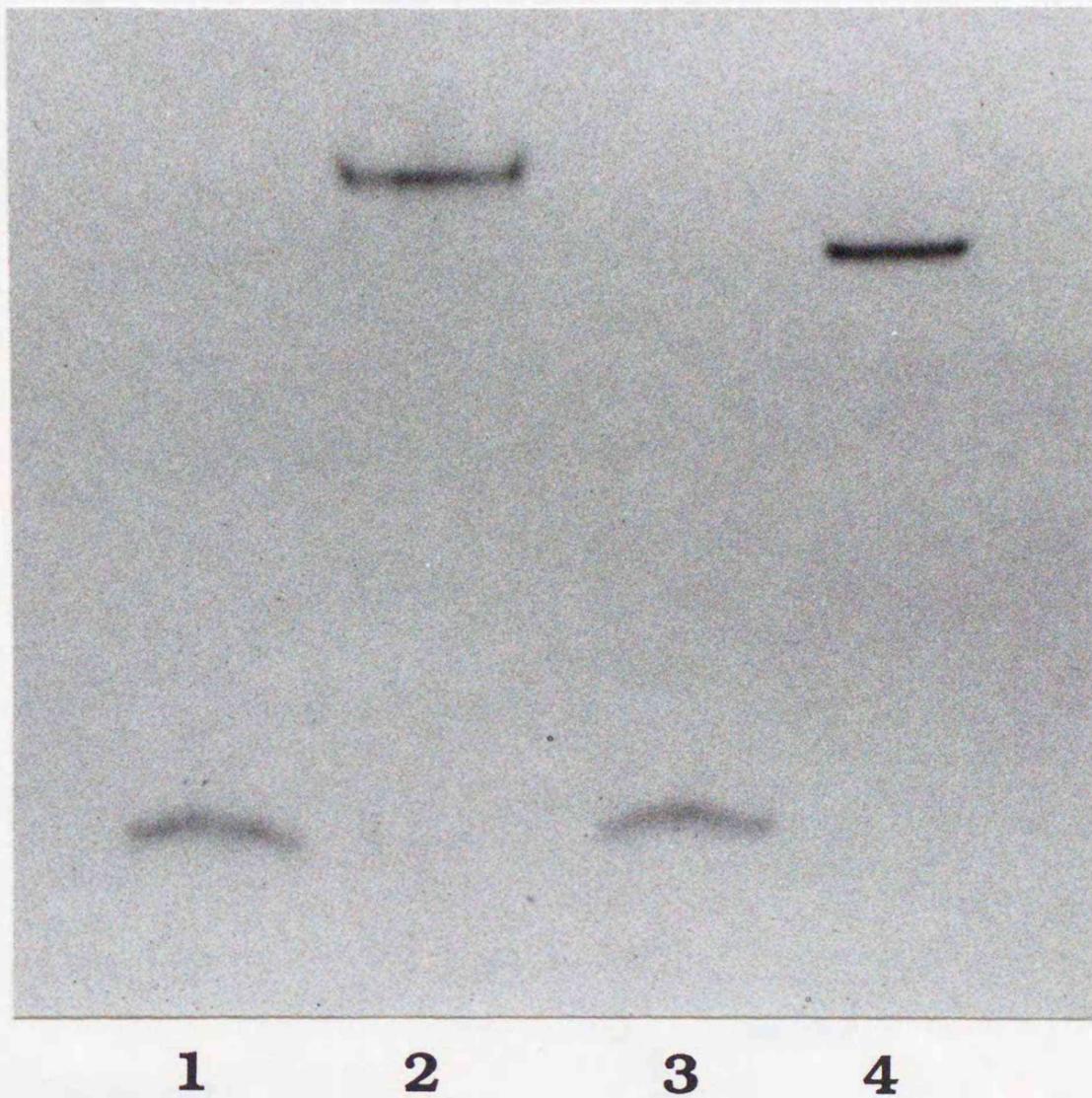
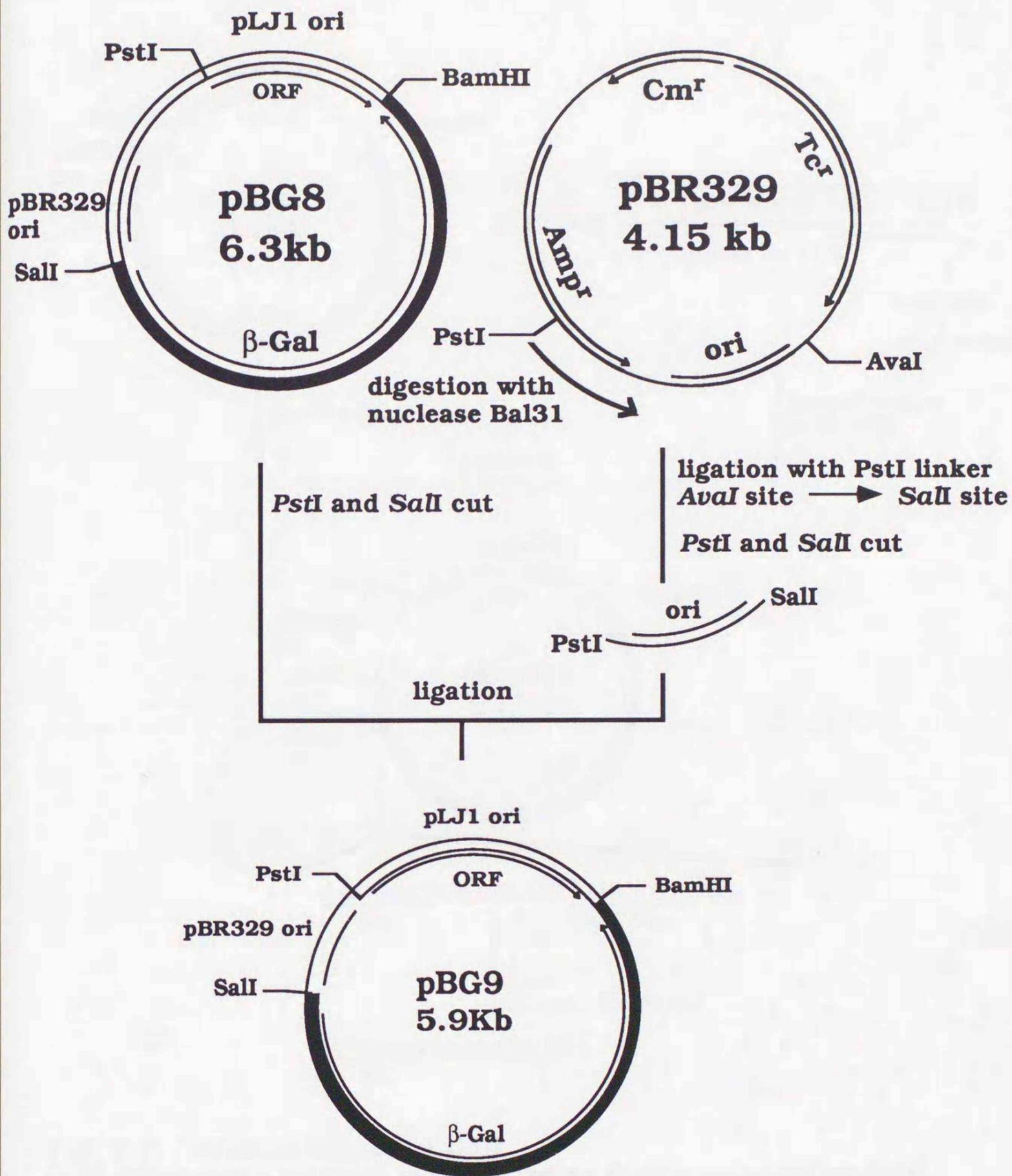


Fig. 7-4. Restriction map of plasmid pBG8, pBG8Em1, and pBG8Em2. ORF represents an open reading frame for an unknown protein. Symbols:  $\square$ , pLJ1-derived part containing the origin of replication;  $\blacksquare$ , *L. bulgaricus*  $\beta$ -galactosidase gene;  $\text{---}$ , pBR329-derived part of containing the origin of replication;  $\text{|||||}$ , pAM $\beta$ 1-derived part of containing the erythromycin resistance gene. Arrows shows the direction of transcription.



**Fig. 7-5. Location of  $\beta$ -galactosidase activity after electrophoresis of cell extracts in SDS-polyacrylamide gel(6%). After electrophoresis, the gel was incubated in 5-bromo-4-indolyl- $\beta$ -D-galactopyranoside solution for activity staining. Lanes; 1, *L. bulgaricus* SBT0034; 2, *L. helveticus* SBT2161C; 3, *L. helveticus* SBT2195(pBG8Em2); 4, *E. coli*  $\beta$ -galactosidase.**



**Fig. 7-6. Construction of pBG9.**

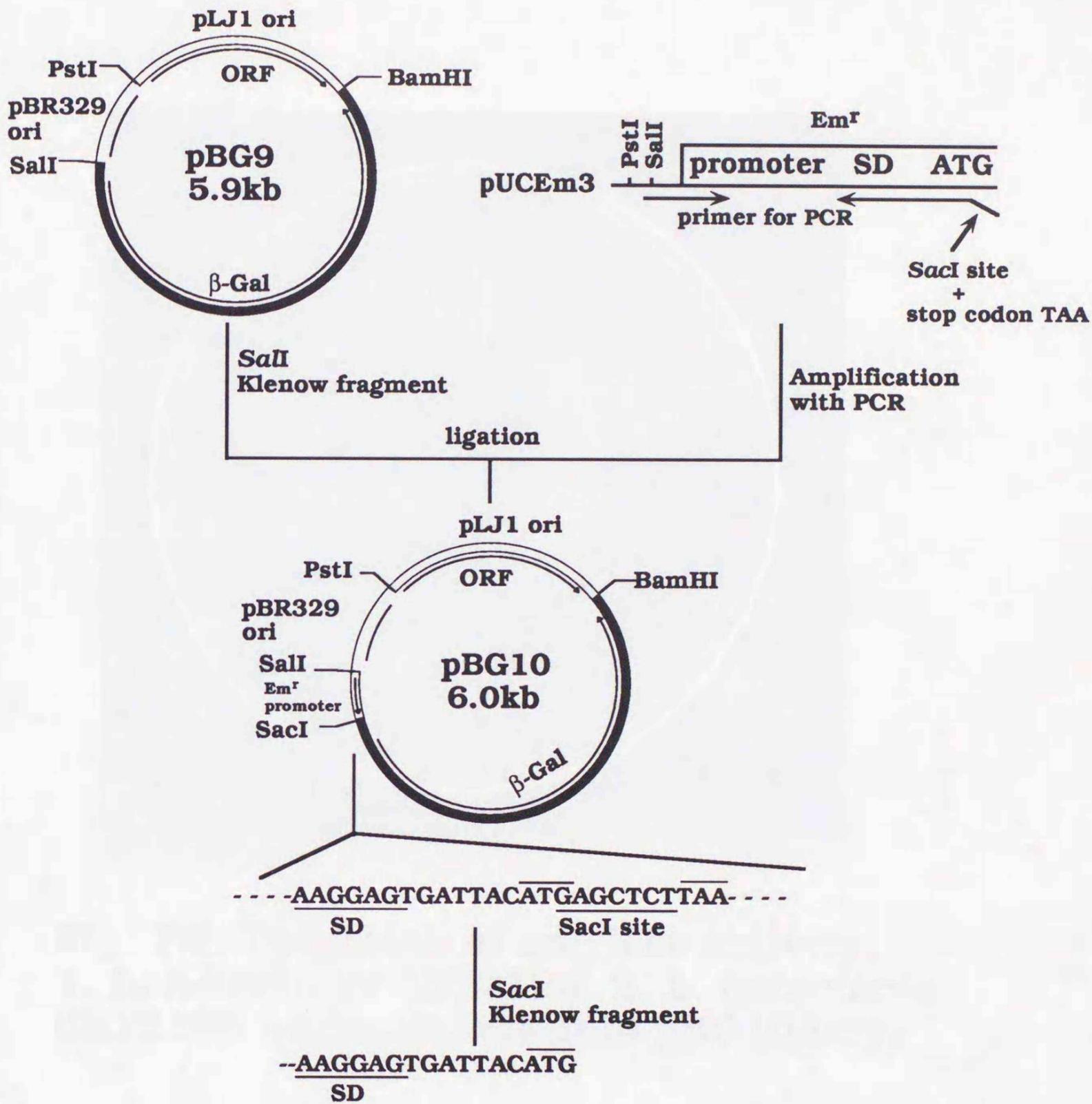
ORF represents an open reading frame for an unknown protein.

Symbols: , pLJ1-derived part containing the origin of replication;

, *L. bulgaricus* β-galactosidase gene; —, pBR329-derived part

of containing the origin of replication. Arrows show the direction of

transcription. Amp<sup>r</sup>, ampicillin resistance gene; Cm<sup>r</sup>, chloramphenicol resistance gene; Tc<sup>r</sup>, tetracycline resistance gene.



**Fig. 7-7. Construction of pBG10.**

ORF represents an open reading frame for an unknown protein.

Symbols: , pLJ1-derived part containing the origin of replication;

, *L. bulgaricus* β-galactosidase gene; —, pBR329-derived part

of containing the origin of replication. Arrows show the direction of transcription. The Shine-Dalgarno(SD) sequence, the initiation codon

(ATG) of the erythromycin resistance gene(Em<sup>r</sup>), the synthesized SacI

site, and the synthesized stop codon(TAA) on pBG10 are shown in

expanded view.



**Fig. 7-8. Detection of amylase activity.**  
**1, *L. helveticus* SBT2195; 2, *L. helveticus***  
**SBT2195 harboring plasmid pBG10Amy.**

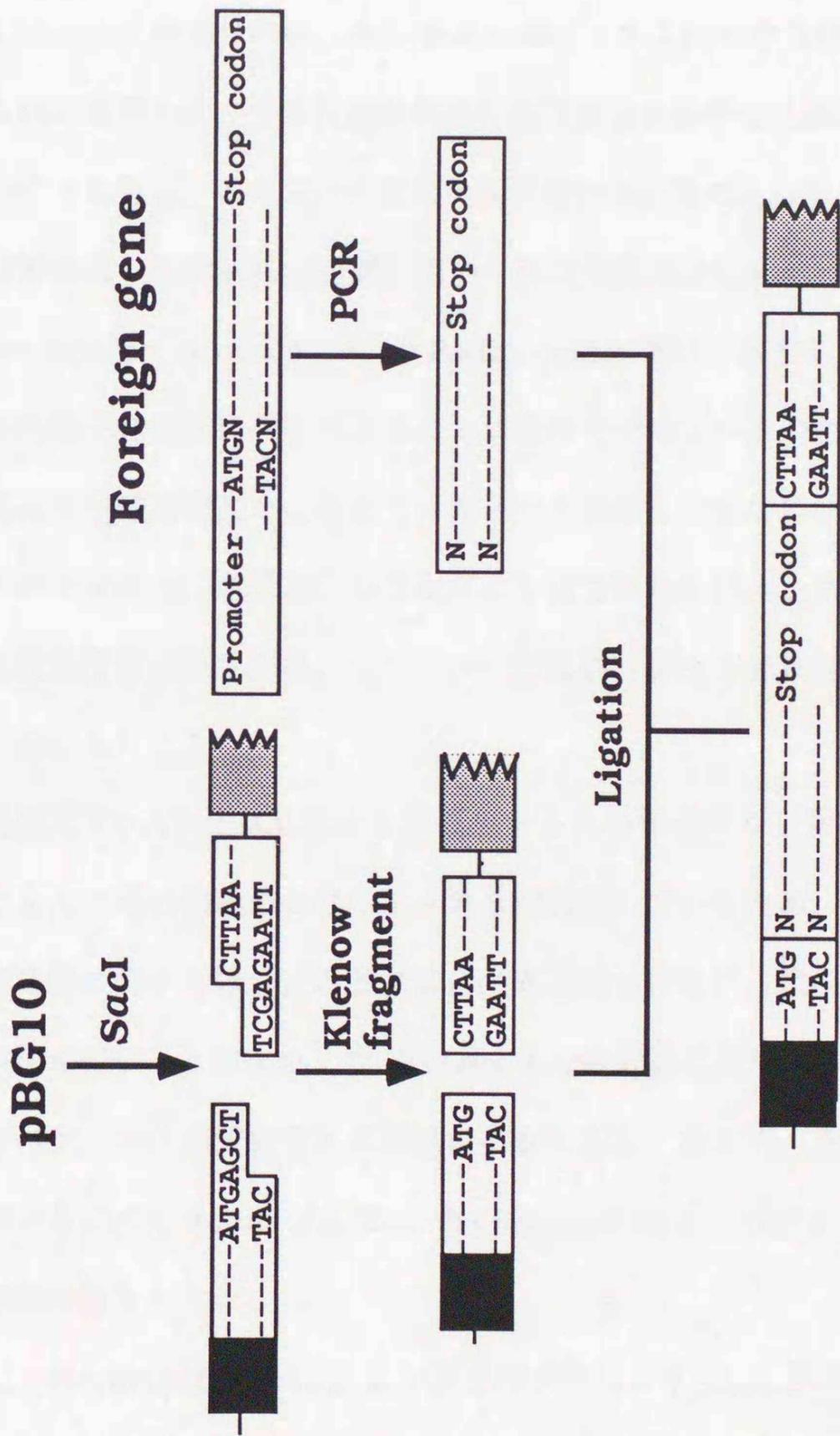


Fig. 7-9. Expression of foreign gene in *Lactobacillus helveticus* by pBG10. Symbols: ■, promoter region of erythromycin; ▨,  $\beta$ -galactosidase gene.

## 第8章 総括

微生物は有史以前より人間が摂取する食品の製造や加工に関与し、微生物による発酵は食品を保存するために知られる最も古い方法の一つである。その結果、現在においては発酵食品や発酵飲料は食品加工工業においてかなりの部分を占めるに至っている。乳酸菌は牛乳、肉、野菜を原料とする様々な発酵食品や飼料の菌叢の重要な構成菌であり、その役割は利用可能な糖源を素早く乳酸に転換し、pHを低下させることにある。このことが製品の品質保持に必要である。

発酵食品や発酵飲料の調製に用いられる乳酸菌は*Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Streptococcus* *Pediococcus* 属に所属する。種々の*Lactobacillus* 属の菌株が経済的に有用であることは疑うまでもない。つねに一定品質であり、かつ高品質の発酵製品をえるために今日の大規模な発酵では性質のよく解かったスターターカルチャーを添加することにより行なわれている。スターターとして用いられる乳酸桿菌は酸生成能、フレーバー生成能、食感の様な望ましい性質を土台において選択されてきた。

組換え DNA手法は乳酸菌を改良をするための有用な方法である。しかし、遺伝的改良のための信頼のおけるシステムが欠如しているため、過去においては乳酸桿菌の発酵に関する諸性質の改良には変異処理を行ない、選択するというような古典的方法が用いられて来た。特定の*Lactobacillus*属に遺伝的な改良を可能とするためにはベクターと形質転換系の開発が必要である。そこで、チーズやヨーグルト製造に用いられている*Lactobacillus helveticus*の宿主-ベクター系の開発を目的として研究を行なった。

*L. helveticus* SBT2161 より潜在性プラスミドpLJ1を単離し、制限酵素地図を作成した。本プラスミドにクローニング部位として使用可能な7個のユニーク切断部位 (*Ava*II, *Acc*I, *Eco*RI, *Hind*III, *Kpn*I, *Hpa*I, *Pvu*II) を確認した。そのうち

の *EcoRI* と *HindIII* 部位を用いて *E. coli* 用ベクター pBR329 に連結しシャトルプラスミド pLHP100 と pLEP100 を構築した。

Sanger らの方法により pLJ1 の全塩基配列を決定した。pLJ1 は 3,292 bp よりなり、GC 含量は 35.3% であった。また、アミノ酸 353 個、分子量 41 kDa の蛋白質をコードしている 1,059 bp より成るオープンリーディングフレーム (ORF) を確認した。マキシセル法によりシャトルプラスミド pLHP100 および pLEP100 が未知蛋白質を生産していることが確認された。グラム陽性細菌では複製に必要とされる情報のすべてが約 1.5 kb の断片上に存在することが知られている。pLJ1 の複製に必須な最小断片もまた未知の蛋白質をコードするアミノ酸 353 個よりなる ORF 含む 1.5 kb の *AvaI-HindIII* 断片であった。pLHR 中の pLJ1 由来の ORF 中の *AccI* を平滑末端化すると pLHR は SBT2161C 中では複製されない。このことより、この未知蛋白質が pLJ1 の複製に関与していることが強く示唆される。しかし、この未知蛋白質のアミノ酸配列とプラスミド中で複製に関与することが知られている他の乳酸菌のプラスミド上にコードされている Rep 蛋白質のアミノ酸配列を比較したが、類似性は認められなかった。

Bio-Rad 社製の Gene Pulser を使用してエレクトロポレーションによる *L. helveticus* の形質転換条件を検討するために、*L. helveticus* 中で発現することが知られている *E. faecalis* 由来の pAM $\beta$ 1 のエリスロマイシン耐性遺伝子を pLHP100 に挿入連結して pLHR を構築した。

エレクトロポレーションに使用する細胞の生育期と電圧が重要である。電圧の最適値は菌種や菌株により異なる。*L. helveticus* では 4 kV/cm までは形質転換効率は増加するが、これ以上高くすると細胞が破壊されるため形質転換効率は低下した。一般的に微生物のエレクトロポレーションには対数増殖期の細胞が用いられるが、*L. helveticus* ではそのような細胞では形質転換体は得られず定常期後期 (22~23

時間培養) で最も高い形質転換効率を得られた。

形質転換に必要な他の因子としてエレクトロポレーションに用いられる菌体の培養時におけるグリシンの添加が挙げられる。1.2%のグリシンを添加したMRS培地で生育した菌体で高い形質転換効率を得られた。また、グリシン無添加では形質転換体は得られなかった。

至適条件である1.2%のグリシンを含むMRSで22時間培養した菌体を用い、電圧4 kV/cmで $1.3 \times 10^4$ 形質転換体/mlの効率を得られた。プラスミドを持たない*L. helveticus* は1  $\mu\text{g/ml}$ のエリスロマイシンで生育阻害されるのに対し、pLHRを保有する*L. helveticus* は1 mg/mlのエリスロマイシンでも生育可能であった。また、*L. helveticus* より単離されたプラスミドDNAは制限酵素切断パターンやサイズに変化が認められないことから欠落や再配列を受けていないことが示された。

制限・修飾系は異種のDNAを修飾したり分解したりすることにより細菌の形質転換を著しく阻害することが知られている。宿主菌の制限・修飾系の有無にかかわらずエレクトロポレーションによる形質転換では制限・修飾系の影響を受けないという報告があるが、*L. helveticus* では*L. helveticus* より単離精製したプラスミドでは*E. coli* より単離精製したものより100倍形質転換効率は高く、*L. helveticus* SBT2161Cには弱い制限・修飾系が存在することが示唆された。

乳糖はミルクに存在する唯一の糖源であるため、乳糖資化能は食品に利用可能な効果的選択マーカーといえる。そこで、*L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* SBT0034の染色体DNAを用いてショットガンクローニングを行い、pBR329をベクターとしてLac<sup>-</sup>の*E. coli* JM105 に $\beta$ -ガラクトシダーゼ遺伝子をクローン化した。クローンから得られたプラスミドをpBG1と命名した。このpBG1に挿入された $\beta$ -ガラクトシダーゼ遺伝子の塩基配列を決定した。 $\beta$ -ガラクトシダーゼ遺伝子をコードするORFの塩基数は3,024 bpで、アミノ酸1,008個(分子量114,154

Da) より成っていた。このORFがコードするアミノ酸の配列を Schmidt が報告している *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* B131の  $\beta$ -ガラクトシダーゼ遺伝子のアミノ酸配列と比較検討した。その配列は SBT0034の  $\beta$ -ガラクトシダーゼにロイシンが一個挿入されている以外は全く同じであった。

$\beta$ -ガラクトシダーゼ活性を選択マーカーとするベクター用の  $\beta$ -ガラクトシダーゼを欠損した宿主株を得るため、*L. helveticus* SBT2161Cを 300 $\mu$ g/mlの NTG で30分間37 $^{\circ}$ Cで処理した。本処理によるアンピシリン耐性株の出現頻度は自然変異による耐性株出現頻度の100-1000倍高かった。また、 $\beta$ -ガラクトシダーゼ欠損変異株は  $2.4 \times 10^2$  の頻度で得られた。しかし、これらの変異は高頻度で復帰したが、そのなかで変異を安定に保持している一株を SBT2195と命名した。この SBT2195株の形質転換効率は親株のわずか1/20であった。この低い形質転換効率のためエレクトロポレーション法では遺伝子操作したプラスミドDNAを直接 *L. helveticus* にクローニングすることはできない。しかし、*E. coli* の系で組換え操作を行ない、そのDNAを *L. helveticus* に導入するためにシャトルベクターの形で用いるならば低い形質転換効率であるエレクトロポレーション法でも十分である。

$\beta$ -ガラクトシダーゼ活性を選択マーカーとする *L. helveticus* の宿主-ベクター系を構築した。pLJ1の複製に関与する領域を含む断片、pBR329のori断片、*L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* の  $\beta$ -ガラクトシダーゼ遺伝子および pAM $\beta$ 1の エリスロマイシン耐性遺伝子を連結することによりプラスミド pBG8Em1 と pBG8Em2を構築した。pBG8Em1 と pBG8Em2は エリスロマイシン耐性遺伝子と  $\beta$ -ガラクトシダーゼ遺伝子が同一方向と反対方向にそれぞれ挿入されている。pBG8Em2では  $\beta$ -ガラクトシダーゼ遺伝子は エリスロマイシン耐性遺伝子と pLJ1のORFのプロモーターと反対方向に挿入されているため、 $\beta$ -ガラクトシダーゼ遺伝子はそれ自身のプロモーターで発現していると考えられる。それにもかか

わらず, pBG8Em2を保有している*L. helveticus* SBT2195は乳糖選択プレートではコロニーを形成することはできなかった。一方, pBG8Em1を保有するSBT2195は乳糖選択培地で生育した。さらに, SBT2195 (pBG8Em2) とSBT2195 (pBG8Em1) の $\beta$ -ガラクトシダーゼ活性は親株であるSBT2161Cのそれぞれ0.4倍と10倍であった。これらの結果は*L. helveticus* SBT2195が乳糖選択培地で生育するにはそれ自身のプロモーターによる $\beta$ -ガラクトシダーゼ遺伝子の発現では不十分であり, エリスロマイシン耐性遺伝子のプロモーターからのリードスルーが必須であることを示している。

SBT2195 (pBG8Em1) は脱脂乳プレートで選択可能であるが, pBG8Em1は食品に応用するには不適當なエリスロマイシン耐性遺伝子とアンピシリン耐性遺伝子の一部を含んでいる。そこで, エリスロマイシン耐性遺伝子の構造遺伝子部分とアンピシリン耐性遺伝子の一部を除去することによりpBG10を構築した。pBG10はpLJ1の複製に関与する領域, pBR329のori断片, *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* の $\beta$ -ガラクトシダーゼ遺伝子およびエリスロマイシン耐性遺伝子のプロモーター領域より成っている。pBG10で形質転換したSBT2195は脱脂乳プレートで選択することができる。このpBG10の形質転換効率は非常に低いだが*E. coli* JM105中で増幅することができるため*L. helveticus* SBT2195を形質転換するには十分な効率と考える。

これらの宿主-ベクターの組み合わせはミルク中では安定である。それは $\beta$ -ガラクトシダーゼ欠損の宿主がミルク中で生育するためにpBG10の存在が必須であるため, この宿主中のpBG10はミルク中で培養している限りは安定である。

SBT2195 (pBG10) の $\beta$ -ガラクトシダーゼ活性もまた親株の10倍である。このことはpBG10中のエリスロマイシン耐性遺伝子のプロモーターは強く, 外来性遺伝子発現に利用できることを示唆している。本ベクターのエリスロマイシン耐性遺

伝子のプロモーターの下流に発現ベクターとしても使用できるように外来性遺伝子のクローニング部位としてのSacI 部位を配した。SacI 部位の3'-末端をKlenow断片で除くことにより外来性遺伝子は翻訳開始コドンATGの下流に挿入可能となり、*L. helveticus*で発現する。もし、外来性遺伝子のATG以降をPCRで増幅するならば不必要なアミノ酸の付加なしに外来性遺伝子は発現するであろう。pBG10では、このSacI 部位に加えてBamHI, SalI, PstI部位が一般的クローニング部位として利用可能である。

ATG以降から停止コドンまでをPCRで増幅し、pBG10のエリスロマイシン耐性遺伝子のプロモーターの下流のSacI 部位に挿入した*Bacillus licheniformis*の $\alpha$ -アミラーゼ遺伝子の構造遺伝子 (1,536 bp) は*L. helveticus* で発現し、その形質転換体は脱脂乳プレートや乳糖-MRSプレートで生育可能であった。これらの結果は $\alpha$ -アミラーゼ遺伝子断片 (1,536 bp) の大きさまでの外来性遺伝子は $\beta$ -ガラクトシダーゼ遺伝子の発現には影響しないことを意味する。他の乳酸菌の系では $\alpha$ -アミラーゼは分泌されているけれど、*L. helveticus* では分泌していることは確認できなかった。もし、*L. helveticus* で $\alpha$ -アミラーゼが分泌されているならば、この $\alpha$ -アミラーゼ遺伝子のシグナル配列を用いて分泌ベクターを構築できるかも知れない。

$\beta$ -ガラクトシダーゼ欠損株である*L. helveticus* SBT2195株と $\beta$ -ガラクトシダーゼ活性を唯一の選択マーカーとするpBG10との組み合わせは食品に利用な宿主-ベクターシステムである。本システムはフレーバーの生産、酸耐性の付与、酸生成の調整等食品への応用において外来性遺伝子をクローニングし発現させるために役立つであろう。

## Summary

Microorganisms have been involved in the preparation and processing of foods in the human diet since before recorded history, and their fermentations present one of the oldest techniques known for the preservation of food. As a consequence, fermented foods and beverages now represent a significant part of the food processing industry.

The lactic acid bacteria are important components of microflora of a wide variety of fermented foods and feeds from milk, meat and vegetable origin. Their main function is the rapid conversion of the available sugar to lactic acid resulting in the low pH which is necessary to good product quality. The species used in the preparation of fermented food and beverages belong to the genera *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, and *Streptococcus*. The economic importance of various *Lactobacillus* strains is beyond doubt. To obtain fermentation products of reproducible and high quality, today's large-scale fermentations are initiated by the addition of well-defined starter cultures. *Lactobacillus* strains to be used as starters are being selected on the basis of desirable characteristics such as acid production, flavor production or texture formation etc.

Recombinant DNA technique is useful for the improvement of lactic acid bacteria. However, due to the lack of reliable systems for genetic manipulation, improvement of the fermentation properties of *Lactobacillus* starter cultures in the past has mainly relied on classic methods such as mutation and selection. In order to be able to genetically

modify *Lactobacillus* species, vector and transformation systems have to be developed.

The present study aims at constructing host-vector system in *Lactobacillus helveticus* used in cheese and yogurt making

A small cryptic plasmid, pLJ1, was isolated from *Lactobacillus helveticus* and its restriction map was constructed. The pLJ1 had single restriction endonuclease sites for *PvuII*, *KpnI*, *XbaI*, *AccI*, *HindIII*, *HpaI*, and *EcoRI*. The pLJ1 was cloned into *Escherichia coli* HB101 by using pBR329 as a vector. The resulting shuttle plasmids were designated pLEP100 and pLHP100. The complete nucleotide sequence of pLJ1 was determined by using the method of Sanger. It was a 3,292 base pairs long and had a low GC content of 35.3%. A 1,059-bp open reading frame(ORF) was found. It was capable of coding for a 41-kilodalton protein of 353 amino acid residues. In a maxicell system, it was confirmed that pLEP100 and pLHP100 produced an unknown protein of about 41 kilodalton. In gram-positive bacteria, all of the information necessary for replication is located on fragments of about 1.5 kb. The smallest fragment required for replication of pLJ1 was also an *XbaI-HindIII* fragment (about 1.5 kb) that contains an ORF(353 amino acid residues) for an unknown protein. To confirm that the unknown protein is essential for replication, the *AccI* site in the ORF on pLJ1 fragment in pLHR was cut, filled in with Klenow fragment, and religated. The resulting plasmid, a frame-shift derivative, did not replicate in *L. helveticus*. The result strongly suggests that the unknown protein

encoded on ORF is involved in replication of pLJ1. The putative amino acid sequence of the unknown protein was compared to those of Rep protein of the plasmids from lactic acid bacteria but homologies were not found.

To examine conditions of transformation of *L. helveticus* by using Gene Pulser apparatus(Bio-Rad), pLHR(8.5 kb) was constructed. The pLHR, consists of a cryptic plasmid, pLJ1, from *L. helveticus*, the *E. coli* vector, pBR329, and the erythromycin resistance gene of pAM $\beta$ 1 from *Enterococcus faecalis*.

The voltage and the growth phase of cells used for electroporation are important. Optimum values of voltage may depend on the bacterial species and strains being examined. In SBT2161C, the efficiency of transformation increased with increasing field strength up to 4 kV/cm and decreased at more than 4.5 kV/cm since cells were broken by the high field strength. Generally high efficiencies were obtained with cells in middle- or late-log phase in most of the methods of transforming for several bacteria by electroporation. However, such cells gave few transformants in our system and high efficiency was achieved with cells in stationary phase (22~23 hr).

Another important factor for transformation of SBT2161C is the presence of glycine in the growth medium before electroporation. Maximum efficiency is obtained with cells grown in MRS broth adding 1.2% glycine. No transformants were observed without glycine in growth medium.

The efficiency of  $1.3 \times 10^4$  transformants per  $\mu\text{g}$  of DNA was obtained at 4 kV/cm with cells grown for 22 hr in MRS broth containing 1.2% glycine. These are optimum conditions for transformation of SBT2161C by electroporation. SBT2161C transformed with pLHR (8.5 kb) could grow in a medium containing 1 mg of erythromycin/ml, while growth of the parental nontransformed strain was inhibited by 1  $\mu\text{g}$  of erythromycin/ml. The lack of detectable changes in size or restriction endonuclease cleavage patterns in DNA isolated from transformants indicates that transformed plasmids have not undergone rearrangement or deletion.

Restriction and modification systems can severely inhibit the transformation of bacteria by degradation and modification of heterologous DNA. Although in *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* it has reported that the efficiency of transformation of by electroporation was unaffected whether the recipient had a restriction and modification system or not, our data suggest that SBT2161C has a restriction and modification system that is capable of lowering by two orders of magnitude the efficiency of transformation with plasmid DNA isolated from *E. coli* HB101(pLHR).

Since lactose is the only fermentable sugar present in milk, the ability to ferment lactose will be an effective food-grade selection marker.  $\beta$ -galactosidase gene from *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* SBT0034 was cloned as a food-grade selection marker into *E. coli* JM105 by using pBR329 as a vector. The resulting plasmid was designated pBG1.

The fragment containing  $\beta$ -galactosidase gene in pBG1 was sequenced. The open reading frame(ORF) encoded  $\beta$ -galactosidase was composed of 3,024 bases and 1,008 amino acids with a molecular weight 114,154 dalton. The putative amino acid sequence encoded on the ORF was compared to that of *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* B131 reported by Schumidt<sup>110</sup>. The amino acid sequence was almost identical to that of B131. Only one amino acid(Leu) was inserted to the  $\beta$ -galactosidase of SBT0034.

The  $\beta$ -galactosidase gene showed no homology with chromosomal DNA from *L. helveticus* SBT2161C on Southern blot hybridization. This characteristics is expected to contribute to the maintenance of stability of plasmid pBG10 in *L. helveticus* SBT2195.

To obtain a  $\beta$ -galactosidase-deficient host strain for the vector with  $\beta$ -galactosidase activity as a selection marker, *L. helveticus* SBT2161C, parent strain, was treated with 300  $\mu\text{g/ml}$  of *N*-methyl-*N'*-nitro-*N*-nitrosoguanidine for 30 min at 37°C . The frequency of rifampicin resistance mutants was about 100-1000 fold greater than that of spontaneous resistance mutants under the condition.  $\beta$ -galactosidase-deficient mutants were obtained at a frequency of  $2.4 \times 10^2$ . These mutants exhibited a high frequency for backmutation. One strain, which was maintained mutation stably, was designated SBT2195. The transformation efficiency of SBT2195 was 20 fold lower than that of the parent strain, SBT2161C. Because of low efficiency of transformation observed, the current protocol is not available for shotgun cloning of

manipulated plasmid DNA directly into *L. helveticus* SBT2195. However, electroporation can use a bifunctional shuttle vector to transfer recombinant DNA into SBT2195 that has been characterized in *E. coli*.

A host-vector system was established in *L. helveticus* with  $\beta$ -galactosidase activity as a selection marker.

Plasmids pBG8Em1 and pBG8Em2 were constructed by joining of the  $\beta$ -galactosidase gene from *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, the ori region of pBR329, the ORF of pLJ1, and the erythromycin resistance gene. In pBG8Em1 and pBG8Em2, the erythromycin resistance gene fragment was inserted in the same and reverse orientation to the  $\beta$ -galactosidase gene, respectively. Since the  $\beta$ -galactosidase gene was located in the opposite orientation to the erythromycin resistance gene and ORF of pLJ1 in pBG8Em2, the  $\beta$ -galactosidase gene was considered to be expressed by its own promoter in SBT2195. Nevertheless, SBT2195 transformed with pBG8Em2 did not form a colony on lactose-selection plates (lactose-MRS or skim milk plate). In contrast, SBT2195 harboring pBG8Em1 grew on the lactose-selection plates. Furthermore,  $\beta$ -galactosidase activity of SBT2195 (pBG8Em2) and SBT2195(pBG8Em1) were 0.4 and 10 fold of that of the control strain SBT2161C, respectively. These results show that the expression of the  $\beta$ -galactosidase gene by its own promoter was not sufficient for the growth of SBT2195 on the lactose-selection plates and that readthrough from the erythromycin resistance gene promoter was essential.

SBT2195 (pBG8Em1) was selected on skim milk plate. However,

pBG8Em1 contained an erythromycin resistance gene and a part of an ampicillin resistance gene which are unsuitable for food applications.

By removing the structural gene of erythromycin resistance gene and a part of the ampicillin resistance gene, pBG10 was constructed. pBG10 consists of the  $\beta$ -galactosidase gene from *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, the promoter region of the erythromycin resistance gene from pAM $\beta$ 1, the replication region of pBR329, and the replication region of the *L. helveticus* cryptic plasmid pLJ1. SBT2195 transformed with pBG10 was selected for  $\beta$ -galactosidase activity on skim milk plates. The transformation efficiency of pBG10 was extremely low, but we consider it to be adequate for transformation of *L. helveticus* SBT2195 because pBG10 can be amplified in the host *E. coli* JM105. pBG10 contains the replication origin for *E. coli* but finally, by removing the replication origin for *E. coli* from pBG10, a food-grade vector is constructed.

This host-vector system was stably maintained in milk. Since the presence of pBG10 is essential to enable the Lac<sup>-</sup> host to grow in milk, pBG10 in the Lac<sup>-</sup> host is stable so long as the transformant is cultured in milk.

The  $\beta$ -galactosidase activity of SBT2195 (pBG10) was also about ten-fold greater than that in the control SBT2161C. This result suggests that the erythromycin resistance gene promoter in pBG10 is available for expression of a foreign gene. By digestion with *SacI* and removal of 3' tails of the *SacI* site with Klenow fragment, a foreign gene can be inserted downstream of initiation codon ATG and expressed in *L. helveticus*. If the

foreign gene has been amplified with PCR from a codon following the initiation codon(ATG) to stop codon sequence, the gene will be expressed without unnecessary additional amino acid. In addition, a stop codon (TAA) synthesized downstream of the *SacI* site prevents useless protein from being produced from the initiation codon ATG when no foreign gene is inserted. In addition to the *SacI* site, *Bam*HI, *Sal*II and *Pst*II sites in pBG10 are available for general cloning site.

The structural gene of  $\alpha$ -amylase gene (1,536 bp) from *Bacillus licheniformis*, which was amplified with PCR from a codon following the initiation codon to stop codon and inserted to *SacI* site of pBG10 inserted the downstream of promoter region of the erythromycin resistance gene of pBG10, was expressed in *L. helveticus* SBT2195 and this transformant grew on skim milk plate and lactose-MRS plate. These results suggest that a foreign gene of up to the size of the  $\alpha$ -amylase gene (1,536 bp) can be expressed without affecting the expression of  $\beta$ -galactosidase-gene marker. Although  $\alpha$ -amylase was secreted in other lactic acid system, we could not confirmed that  $\alpha$ -amylase was secreted in *L. helveticus*. If  $\alpha$ -amylase is secreted in *L. helveticus*, a secretion vector may be constructed by using the signal sequence of the  $\alpha$ -amylase gene.

The combination of *L. helveticus* ( $\text{Lac}^-$  mutant) and pBG10 is a food-grade host-vector system. This system is considered to be useful for cloning and expression of foreign genes in the food applications, enhancement of flavor, addition of acid tolerance, and control of acid

productivity etc.

## 謝辞

本論文の作成にあたり，御指導と御校閲を賜りました北海道大学農学部 富田房男教授，北海道大学農学部 本間守教授，北海道大学低温科学研究所生理学部門 匂坂勝之助教授に深く感謝の意を表します。さらに，御助言，御高配を賜りました北海道大学農学部 故大野哮司教授に深く感謝の意を表します。

*Bacillus licheniformis* 由来の $\alpha$ -アミラーゼ遺伝子を御供与下さいました名古屋大学農学部 鵜高重三教授に感謝致します。

また，本研究の機会と多大なる御指導と御高配を賜りました，雪印乳業株式会社 専務取締役 十河幸夫氏（前研究本部長），同取締役研究本部長 井門和夫氏，同技術研究所長 中島一郎氏，岩手大学教授 種谷真一氏（前技術研究所長），同技術研究所主幹 廣田哲二氏に深く感謝致します。さらに，本研究の実施にあたり絶大な御協力と御支援を頂いた技術研究所 瀧口隆一氏，青山 顕司氏および関係各位に感謝致します。

参考文献

- 1) L. L. McKay and K. A. Baldwin, *Appl. Environ. Microbiol.*, **36**, 360 (1978).
- 2) W. M. de Vos and G. Simons, *Biochimie*, **70**, 461 (1988).
- 3) T. D. Thomas and G. G. Pritchard, *FEMS Microbiol. Rev.*, **46**, 245 (1987).
- 4) J. Kok and G. Venema, *Biochimie*, **70**, 475 (1988).
- 5) W. M. De Vos, *FEMS Microbiol. Rev.*, **46**, 281 (1987).
- 6) A. von Wright, S. Wessels, S. Tynkkynen, and M. Saarela, *Appl. Environ. Microbiol.*, **56**, 2029 (1990).
- 7) C. Kaletta and K.-D. Entian, *J. Bacteriol.*, **171**, 1597 (1989).
- 8) M. J. V. Belkum, B. J. Hayema, A. Geis, J. Kok, and G. Venema, *Appl. Environ. Microbiol.*, **55**, 1187 (1989).
- 9) G. W. Stoddard, J. P. Petzel, M. J. van Belkum, J. Kok, and L. L. McKay, *Appl. Environ. Microbiol.*, **58**, 1952 (1992).
- 10) T. R. Klaenhammer, *FEMS Microbiol. Rev.*, **46**, 313 (1987).
- 11) B. R. Froseth and L. L. McKay, *J. Dairy Sci.*, **74**, 1445 (1991).
- 12) W. M. De Vos, P. Vos, G. Simons, and S. David, *J. Dairy Sci.*, **72**, 3398 (1989).
- 13) P. Ross, F. O'gara, and S. Codon, *Appl. Environ. Microbiol.*, **56**, 2164 (1990).
- 14) T. Scheirlinck, J. De Meutter, G. Arnaut, H. Joos, M. Claeysens, and F. Michiels, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **33**, 534 (1990).

- 15) H. Hashiba, T. Takiguchi, K. Joho, and K. Aoyama, *Biosci. Biotech. Biochem.*, **56**, 190 (1992).
- 16) T. Scheirlinck, J. Mahillon, H. Joos, P. Dhaese, and F. Michiels, *Appl. Environ. Microbiol.*, **55**, 2130 (1989).
- 17) S. Jones and P. J. Warner, *Lett. Appl. Microbiol.*, **11**, 214 (1990).
- 18) J. Lj. Rasic and J. A. Kurmann, "Yoghurt: Science Grounds, Technology, Manufacture and Preparations," Technical Dairy Publishing House, Copenhagen. (1978) pp. 1 .
- 19) A. Y. Tamime and R. K. Robinson, "Yoghurt: Science and technology," Pergamon. Press, (1985) pp. 2.
- 20) W. E. Sandine, *Biochimie*, **70**, 519 (1988).
- 21) E. I. Gracie in *Advanced in Microbiology and Biochemistry of Cheese and Fermented Milk*, Elsevier, New York (1984) pp. 35.
- 22) R. E. Kunkee, R. w. Goswell in *Alcoholic Beverages*, Academic Press, New York. (1977) pp. 315.
- 23) M. A. Daeschel, R. E. Andersson, and H. P. Fleming, *FEMS Microbiol. Rev.*, **46**, 357 (1987).
- 24) K. H. Steinkraus, *Antonie Van Leeuwenhoek*, **49**, 337 (1983).
- 25) B. J. B. Wood in "Fermented Food", Academic Press (1982) pp.39.
- 26) H. A. Hill and J. E. Hill, *Curr. Microbiol.*, **13**, 91 (1986).
- 27) 大塚謙一, "醸造学", 養賢堂 (1891) pp. 33.
- 28) G. Bryan-Jones in *Lactic acid Bacteria in Beverages and Food*, Academic press, New York (1975) pp. 165.
- 29) A. E. Egan, *Antonie Van Leeuwenhoek*, **49**, 327 (1983).

- 30) E. Mechnikoff, "The prolong of life." G. P. Putnam's and Sons, New York (1908).
- 31) B. R. Goldin and S. L. Gorbach, *Devel. Indust. Microbiol.*, **25**, 139 (1984).
- 32) G. Hepner, R. Fried, S. S. Jeor, and L. Fusetti, *Am. J. Clin. Nutr.*, **32**, 19 (1977).
- 33) K. K. Grunewald, *J. Food Sci.*, **47**, 2708 (1982).
- 34) A. D. Ayebo, K. M. Shahani, and R. Dam, *J. Dairy Sci.*, **64**, 2318 (1981).
- 35) G. Perdigon, M. E. N. de Macias, S. Alvarez, and G. Oliver, *Infect. Immun.*, **53**, 404 (1986).
- 36) C. Welch, *Cultured Dairy Products J.*, **22**(2), 23 (1987).
- 37) S. E. Gilliland, *J. Dairy Sci.*, **72**, 2483 (1989).
- 38) F. M. Driessen and R. de Boer, *Neth. Milk Dairy J.*, **43**, 367 (1989).
- 39) R. C. Lawrence, T. D. Thomas, and B. E. Terzaghi, *J. Dairy Res.*, **43**, 141 (1978).
- 40) A. Kilara and K. M. Shahani, *J. Dairy Sci.*, **61**, 1793 (1978).
- 41) M. L. Speck, *Food Technol.*, **35**, 71 (1981).
- 42) J. Singh and B. Ranganathan, *J. Food Protect.*, **40**, 600 (1977).
- 43) J. Singh and B. Ranganathan, *Folia Microbiol.*, **23**, 82 (1978).
- 44) J. Singh and B. Ranganathan, *Milchwissenschaft*, **40**, 600 (1977).
- 45) L. L. McKay, *Antonie van Leeuwenhoek*, **49**, 259 (1983).
- 46) G. Venema and J. Kok, *Trends in Biotechnol.*, **5**, 144 (1987).

- 47) B. M. Chassy and J. L. Flickinger, *FEMS Microbiol. Lett.*, **44**, 173 (1987).
- 48) M. Ingram in *Lactic acid Bacteria in Beverages and Food*, Academic Press (1975) pp. 1.
- 49) P. W. Postma and S. Roseman, *Biochim. Biophys. Acta*, **457**, 213 (1976).
- 50) H. L. Kornberg, *Curr. Top. Cell Regul.*, **18**, 313 (1981).
- 51) J. Thompson, *Biochimie*, **70**, 325 (1988).
- 52) O. Kandler, *Antonie van Leeuwenhoek*, **49**, 209 (1983).
- 53) M. D. Chollins, U. Rodrigues, C. Ash, M. Aguirre, J. A. E. Farrow, A. Martinez-Murcia, B. A. Phillips, A. M. Williams, and S. Wallbanks, *FEMS Microbiol. Lett.*, **77**, 5 (1991).
- 54) J. L. Johnson, C. F. Phelps, C. S. Cummins, J. London, and F. Gasser, *Int. J. Syst. Bacteriol.*, **30**, 53 (1980).
- 55) R. E. Buchanan and N. E. Gibbson, "Bergey's manual of determinative bacteriology", The williams and Wilkins Company, Bortimore, PP. 582 (1974).
- 56) J. Rasic and S. Mitic, *Phrehr. Ind.*, **12**, 158 (1962).
- 57) H. Haenel. I. Emanuiloff, L. Natscheff, Muller-Beuthow, and J. Davot, *Milchwissenschaft*, **18**, 454 (1963).
- 58) 田中克成, 酪農の科学・食品の研究, **36**, 266 (1987).
- 59) H. J. Bartels, M. E. Johnson, and F. Olson, *Milchwissenschaft*, **42**, 83 (1987).

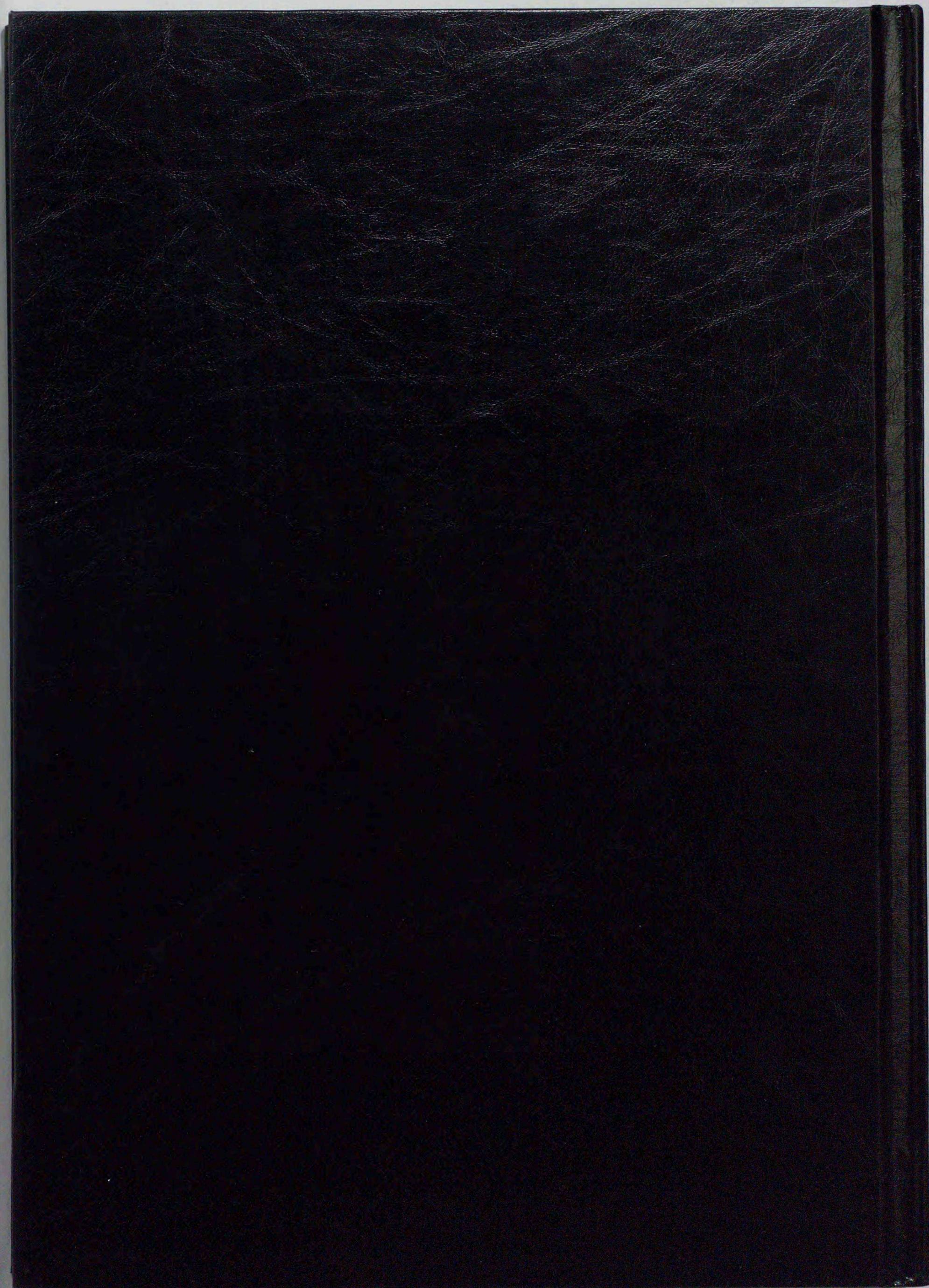
- 60) M.E. Soda, M. J. Desmazeaud, S. Aboudonia, and A. Badran,  
*Milchwissenschaft*, **37**, 325 (1982).
- 61) C. J. Oberg, R. K. Merrill, L. V. Moyes, R. J. Brown, and G. H.  
Richardson, *J. Dairy Sci.*, **74**, 4101 (1991).
- 62) B. M. Chassy, E. Gibson, and A. Giuffrida, *J. Bacteriol.*, **127**, 1576  
(1976).
- 63) T. R. Klaenhammer, and S. M. Sutherland, *Appl. Environ.  
Microbiol.*, **35**, 592 (1980).
- 64) J. H.-C. Lin, and D. Savage, *Appl. Environ. Microbiol.*, **49**, 100  
(1985).
- 65) M. B. Smiley, and V. Fryder, *Appl. Environ. Microbiol.*, **35**, 777  
(1978).
- 66) K. Kanatani, T. Tahara, K. Yoshida, H. Miura, M. Sakamoto, and M.  
Oshimura, *Biosci. Biotech. Biochem.*, **56**, 648 (1992).
- 67) B. M. Chassy, E. M. Gibson, and A. Giuffrida, *Current Microbiol.*, **56**,  
648 (1992).
- 68) L.-J. Lee, J. B. Hansen, E. K. Jaquoztyn-Krynicka, and B. M. Chassy,  
*J. Bacteriol.*, **152**, 1138 (1982)
- 69) H. W. Boyer and D. Roulland-Dussoix, *J. Mol. Biol.*, **41**, 459 (1969).
- 70) A. Sancar, and C. S. Rupert, *Nature*, **272**, 471 (1978).
- 71) T. Maniatis, E. F. Fritsch and J. Sambrook, "Molecular cloning: a  
laboratory manual", Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring  
Harbor, N. Y. 1982, pp440.
- 72) C. Yanisch-Perron, J. Vieira and J. Messing, *Gene*, **33**, 103 (1985).

- 73) L. Covarrubias and F. Bolivar, *Gene*, **17**, 79 (1982).
- 74) H. C. Birnbiom and J. Doly, *Nucleic Acid Res.*, **7**, 1513 (1979).
- 75) T. Maniatis, E. F. Fritsch and J. Sambrook, "Molecular cloning: a laboratory manual," Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N. Y. 1982, pp93-94.
- 76) D. Hanahan, *J. Mol. Biol.*, **166**, 557 (1983).
- 77) F. Sanger, S. Nicklen, and A. R. Coulson, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **74**, 5463 (1977).
- 78) A. Sancar, A. M. Hack, and W. D. Rupp, *J. Bacteriol.*, **137**, 692 (1979).
- 79) J. C. Alonso, and R. H. Taylor, *Mol. Gen. Genet.*, **210**, 476 (1987).
- 80) M. Murai, H. Miyashita, H. Araki, T. Seki, and Y. Oshima, *Mol. Gen. Genet.*, **210**, 92 (1987).
- 81) I. E. Maciag, J.-F. Viret, and J. C. Alonso, *Mol. Gen. Genet.*, **212**, 232 (1988).
- 82) J. Perez-Martin, G. H. del Solar, A. G. de la Campa, and M. Espinosa, *Nucleic Acids Res.*, **16**, 9113 (1988)
- 83) S. J. Projan and R. Novick, *Plasmids*, **19**, 203 (1988)
- 84) L. A. Dempsey and D. A. Dubnau, *J. Bacteriol.*, **171**, 2866 (1989).
- 85) K. M. Devine, S. T. Hogan, D. G. Higgins, and D. J. McConnell, *J. Bacteriol.*, **171**, 1166 (1989).
- 86) K. Jossen, p. Soetaet, F. Michiels, H. Joos, and J. Mahillon, *J. Bacteriol.*, **172**, 3089 (1990).

- 87) A. Bouia, F. Bringel, L. Frey, B. Kamerer, A. Belarbi, A. Guyonvarch,  
and J. -C. Hubert, *Plasmid*, **22**, 185 (1989).
- 88) H. Hashiba, R. Takiguchi, K. Joho, K. Aoyama, and T. Hirota,  
*Biosci. Biotech. Biochem.*, submitted.
- 89) J. Brehn , G. Salmond and N. Minton, *Nucleic Acids Res.*, **15**, 3177  
(1987).
- 90) D. J. LeBlanc, R. J. Hawley, L. N. Lee and E. J. St. Martin, *Proc. Natl.  
Acad. Sci. USA*, **75**, 3484 (1978).
- 91) E. M. Gibson, N. M. Chance, S. B. London and J. London, *J.  
Bacteriol.*, **137**, 614 (1979).
- 92) B. M. Chassy, *FEMS Microbiol. Rev.*, **46**, 297 (1987).
- 93) J. H.-C. Lin and D. C. Savage, *J. Gen. Microbiol.*, **132**, 2107 (1986).
- 94) L. Morelli, P. S. Coconcelli, V. Bottazzi, G. Damiani, L. Ferreti and V.  
Sgaramella, *Plasmid*, **17**, 73 (1987).
- 95) M. Fromn, L. P. Taylor and V. Walbot, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*,  
**82**, 5824 (1985).
- 96) H. Hashimoto, H. Morikawa, Y. Yamada and A. Kimura, *Appl.  
Microbiol. Biotechnol.*, **21**, 336 (1985).
- 97) H. Potter, L. Weir and P. Leder, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **81**, 7161  
(1984)
- 98) T. Aukurst and I. F. Nes, *FEMS Microbiol. Lett.*, **52**, 127 (1988).
- 99) S. P. Allen and H. P. Blaschek, *Appl. Environ. Microbiol.*, **54**, 2322  
(1988).

- 100) J. B. Luchansky, P. M. Muriana, and T. R. Klaenhammer, *Mol. Microbiol.*, **2**, 637 (1988).
- 101) I. B. Powell, G. Achen, A. J. Hillier and B. E. Davidson, *Appl. Environ. Microbiol.*, **54**, 655 (1988).
- 102) J. F. Miller, W. J. Dower and L. S. Tompkins, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **85**, 856 (1988).
- 103) R. Takiguchi, H. Hashiba, K. Aoyama and S. Ishii, *Appl. Environ. Microbiol.*, **55**, 1653 (1989).
- 104) F. L. Macrina, J. A. Tobian, K. R. Jones, R. P. Evans and D. B. Clewell, *Gene*, **19**, 345 (1982).
- 105) C. A. Batt, *Food Technol.*, **40**, 95 (1986).
- 106) W. Hammes, K. H. Schleifer and O. Kandler, *J. Bacteriol.*, **116**, 1029 (1973).
- 107) P. Langella and A. Chopin, *FEMS Microbiol. Lett.*, **59**, 301 (1989).
- 108) R. E. Herman and L. L. McKay, *Appl. Environ. Microbiol.*, **52**, 45 (1986).
- 109) U. K. Laemmli, *Nature (London)*, **227**, 680 (1970).
- 110) B. F. Schmidt, R. M. Adams, C. Requadt, S. Power, and S. E. Mainzer, *J. Bacteriol.*, **171**, 625 (1989).
- 111) H. Hashiba, R. Takiguchi, S. Ishii, and K. Aoyama, *Agric. Biol. Chem.*, **54**, 1537 (1990).
- 112) V. Bryson and W. Szybalski, *Science*, **116**, 45 (1952).
- 113) A. Adelberg, M. Mandel, and G. C. G. Chen, *Biochem. Biophys. Res Commun.*, **18** 788 (1965).

- 114) 柳田友道, 高橋秀夫, 石川辰夫, 微生物科学, 学会出版センター, **5**, 122  
(1985).
- 115) B. D. Davis, *J. Amer. Chem. Soc.*, **70**, 4267 (1948).
- 116) R. L. Rodriguez and R. C. Tait, "Recombinant DNA techniques: An  
introduction" Addison-Wesley Publishing Co., Reading, MA., 1983,  
pp. 150.
- 117) J. E. Citti, W. E. Sandine, and P. R. Elliker, *J. Bacteriol.*, **89**, 937  
(1965).
- 118) R. K. Saiki, S. Scharf, F. Faloona, K. B. Mullis, G. T. Horn, H. A.  
Erlich, and N. Arnheim, *Science*, **230**, 1350 (1985).
- 119) R. K. Saiki, D. H. Gelfand, S. Stoffel, S. J. Scharf, R. Higuchi, G. T.  
Horn, K. B. Mullis, and H. A. Erlich, *Science*, **239**, 487 (1988).
- 120) T. Yuuki, T. Nomura, H. Tezuka, A. Tuboi, H. Yamagata, N.  
Tsukagoshi, and S. Udaka, *J. Biochem.*, **98**, 1147 (1985).

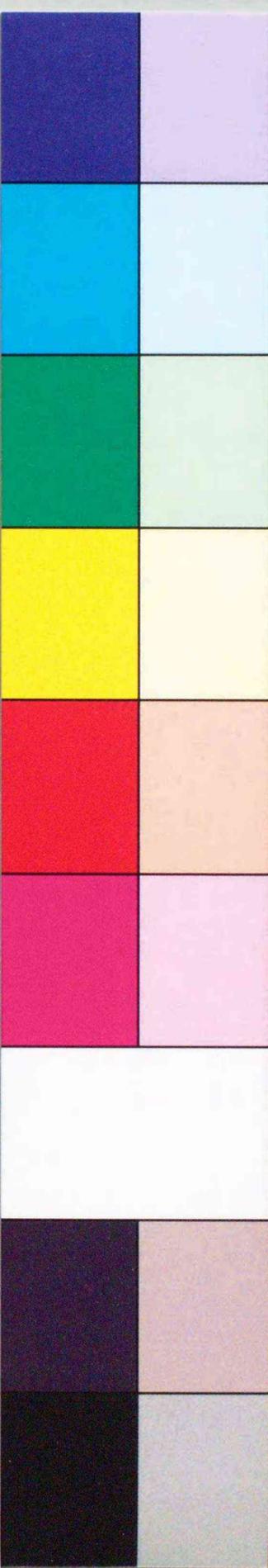


Inches 1 2 3 4 5 6 7 8  
cm 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19

# Kodak Color Control Patches

© Kodak, 2007 TM: Kodak

Blue Cyan Green Yellow Red Magenta White 3/Color Black



# Kodak Gray Scale



© Kodak, 2007 TM: Kodak

A 1 2 3 4 5 6 M 8 9 10 11 12 13 14 15 B 17 18 19

