

研究課題 (テーマ)		有機溶媒耐性微生物のゲノム改変技術の確立および有用物質生産への応用	
研究者	所属学科等	職	氏名
代表者	生物工学科	助教	戸田 弘
研究結果の概要			
<p>医薬品原料などの各種化学物質をバイオプロセスにより効率的に生産するためには、遺伝子組み換え等により目的の酵素遺伝子を宿主微生物のなかで発現させる必要がある。一方、これら医薬品原料などには疎水性の高い化合物や細胞に対する毒性が高い化合物も多く、宿主微生物に対して強い毒性を示すことが多々ある。こうした化合物をターゲットとしたバイオプロセスを構築するに当たり、有機溶媒や化学物質に対してあらかじめ耐性の高い微生物を宿主として用いることが望ましい。</p> <p>我々はこれまでに、有機溶媒に耐性を示すコクリア属細菌 <i>Kocuria rhizophila</i> DC2201 を用いて、各種キラル化合物の生産を魚醤より単離したコクリア属細菌、<i>Kocuria palustris</i> IPUFS-1 菌体内に、複数の内在性プラスミドが存在することを確認した。これらのプラスミドをクローニングし、その塩基配列を決定した 3 種類の野生型プラスミドを単離することができた。これらのプラスミドが有する、コクリア細胞内における複製保持に必要な配列領域(複製最小領域)を特定し、大腸菌用ベクターと融合させることにより大腸菌-コクリアシャトルベクターを開発した。異なる複製機構を有する 2 種類のシャトルベクターを構築し、それらを <i>K. rhizophila</i> DC2201 へ形質転換したところこれらのベクターは互いに共存が可能であることが示された。すなわち、複数の外来遺伝子をコクリア細胞内で同時に発現させることが可能である。コクリア細胞内で外来酵素遺伝子を効率的に発現させるために、コクリアゲノム配列中の解糖系酵素遺伝子の発現に関与するプロモーター領域を特定し、それらプロモーター配列下流にスチレン酸化酵素(RhSMO)やアルコール脱水素酵素(LSADH)を連結させたものを構築したシャトルベクターを用いて発現させた。その結果、コクリア細胞内でそれぞれの酵素が発現し、且つ両酵素をカップリングさせて機能させることも可能であることが示された。</p> <p>さらに、<i>K. rhizophila</i> DC2201 自身が持つ遺伝子等を破壊、増強させることにより効率的な物質生産が期待される。しかしながら、<i>K. rhizophila</i> に適用可能なゲノム編集技術は現時点において確立されていない。そこで本研究で構築したシャトルベクターに変異を導入し、生育温度により複製が制御されるプラスミドの構築を試みたが有意な変異体を得るには至らなかった。おそらく、本プラスミドが持つ複製機構により温度感受性を付与することが困難であると推測された。</p>			
今後の展開			
<p>今回構築した 2 種類の大腸菌-コクリアシャトルベクターは異なる複製機構や安定性を示す。そこでこれらを組み合わせ、両方のプラスミドが共存して初めて複製保持が可能であるサポートベクターシステムを構築する。さらに自殺遺伝子を利用することにより、薬剤耐性遺伝子がゲノム DNA 上に挿入された菌体のみが生き残るようなシステムを構築し、コクリア菌体のゲノム DNA 中に任意の遺伝子配列を挿入できるようなゲノム編集技術を開発する。</p>			