

研究課題 (テーマ)		<i>Kocuria</i> 属細菌を利用した有用物質生産系の開発	
研究者	所属学科等	職	氏名
代表者	生物工学	講師	戸田 弘
	生物工学	教授	西田 洋巳
研究結果の概要			
<p>(1)成政酒造の6つの異なる初添えサンプルより、蔵付きバクテリアとして <i>Kocuria</i> 属細菌23株を分離した。リボソーム RNA 遺伝子の部分塩基配列比較によって、これら23株は5株と18株の2つの系統に分けられることがわかった。2つの系統から TGY1120_3 株および TGY1127_2 株を選び塩基配列を決定した。その結果、TGY1120_3 には3つのプラスミド、TGY1127_2 には1つのプラスミドがそれぞれ内在し、これら4つのプラスミドには類似性が認められた。さらに、塩基配列が全く同一のトランスポゼースが TGY1120_3 にはクロモソームに2カ所と第二プラスミドに1カ所、TGY1127_2 にはプラスミドに1カ所存在していることがわかった。これらの結果より、これらの蔵付き <i>Kocuria</i> の株間におけるプラスミドを介した水平伝播および各細胞内におけるトランスポゾン介したゲノム変化が生じていると考えられた。また、エタノール耐性に関連すると予測されるアルコール脱水素酵素遺伝子が TGY1120_3 には4つ、TGY1127_2 には7つ存在し、酸耐性に関連すると予測されるウレアーゼ遺伝子が TGY1127_2 にコードされているが、TGY1120_3 にはされていないことなどがわかった。遺伝子欠失などを行って、その機能を明らかにする予定である。</p> <p>(2) <i>K. flava</i> NBRC107626, <i>K. turfanensis</i> NBRC107627 についてそれぞれ内在性プラスミドの存在を確認し、超遠心精製などにより精製した。トランスポゾンを用いたプラスミドレスキューによりプラスミドクローンを取得し、塩基配列を決定した。その結果 <i>K. flava</i> から2つのプラスミド、<i>K. turfanensis</i> より4つの新規プラスミドを得た。塩基配列解析の結果から、<i>Kocuria</i> sp. TGY1120-3, TGY1127-2 由来プラスミドには共通の配列が存在することが明らかとなり、複製保持に関与していることが示唆された。また <i>K. flava</i> および <i>K. turfanensis</i> 由来プラスミドには複製タンパク質(replication protein)がそれぞれコードされていたことから、このタンパク質が複製に関与すると考えられる。現在これらのプラスミドの変異体を作成し、複製最少領域の決定と新規プラスミドベクターの構築を試みている。</p> <p>(3) <i>K. rhizophila</i> DC2201 で各種カロテノイド合成を行うための発現系構築を試みた。<i>Paraccocus</i> 由来アスタキサンチン合成遺伝子(CrtWZY)をクローニングし、発現ベクターpKITE101Pに組み込んだ発現プラスミドを作成した。現在カロテノイド生産について試験中である。</p>			
今後の展開			
<p>TGY1120-3 および TGY1127-2 が高いエタノール耐性や酸耐性を示すことから、これらに関与する遺伝子の特定を試みる。それぞれの菌株が有するアルコール脱水素酵素遺伝子およびウレアーゼ遺伝子の破壊を試み、エタノール耐性や有機酸耐性の低下について評価する。また、新規に構築を試みているプラスミドベクターを用いて各種遺伝子の発現系を構築し、有機溶媒耐性コクリア細菌を用いたカロテノイド類や有用物質生産について研究を進めていく。</p>			