

New methods for selective plasmid elimination from *Lactococcus lactis* and characterization of the genetic variability of variants derived from Lactococcal starter for milk fermentation

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2019-03-22 キーワード (Ja): キーワード (En): Lactic acid bacteria, plasmid, growth rate, milk fermentation 作成者: 小林, 美穂 メールアドレス: 所属:
URL	https://doi.org/10.24514/00002175

乳業用乳酸菌 *Lactococcus lactis* のプラスミド育種改良法の開発と 乳発酵特性変異の解明に関する研究

小林美穂

畜産物品質研究チーム

要 約

乳製品製造に汎用されている *Lactococcus lactis* の遺伝子構成は、2 Mb 程度の小型の染色体遺伝子と、複数のプラスミド遺伝子を細胞内に保有することが特徴的である。*L. lactis* のプラスミドは、ごく一部の例外を除いて θ -複製型プラスミドであり、乳発酵に必須な形質をコードする 경우가多く、ラクトース資化、プロテイナーゼ活性、クエン酸取込み、ファージ耐性、バクテリオシン生産、粘性物質生産などの形質に関与する。*L. lactis* の内在プラスミドの種類や組合せは菌株ごとに異なり、菌株特異的な表現型を決定する。*L. lactis* の分離原は乳製品、生乳、漬物、生草など多岐にわたり、プラスミド構成を変えながら生育環境に適応していると考えられる。中には細胞内に10種類程度のプラスミドを保有する株もあり、機能が特定されていないプラスミドも多く残されている。プラスミドの機能解析は、通常まずプラスミド除去株を作出し、変異株の表現形質と親株の表現形質を比較して研究の端緒とする。従って、除去するプラスミドを任意にコントロールすることができれば、プラスミド上の遺伝子機能や関係する表現形質を効率良く推定することができる。また、必要不可欠なプラスミドを損なわずに、1種類のプラスミドを除去する方法は、発酵産業に利用可能な実用菌株の改良にも利用できる。第1章では、宿主DNAにランダムに作用する変異剤処理などを行わず、複数の内在プラスミドのうち1種類のプラスミドを選択的に除去し、親株と発酵特性の異なる新菌株を作出する方法、即ち、任意の θ プラスミドの複製単位を *in vitro* で再構成し、不和合性プラスミド（競合プラスミド）による θ -プラスミド選択的除去法を開発した。本法は、1)複製単位の再構成に共通して用いることのできるプラスミドベクター（pDB1）の作成、2)任意の*L. lactis* θ プラスミドの不和合性配列を増幅しうるPCRプライマーペア（VF3-VF4）の設計、3) *in vitro* での不和合性プラスミドの再構成と、*L. lactis* wild type プラスミドの除去操作、からなる。

この方法で作出した変異株は、細胞内に外来遺伝子を保有せず、また発酵に不都合な遺伝変異も起こっていないと考えられるため、食品加工用のスターターに利用できる。そこで第2章では本法を用いた*L. lactis* プラスミド変異株の育種例2例について記述した。1例目としては、前段で*L. lactis* DRC1に内在し、宿主の増殖速度を抑制するプラスミドの発見と、その解析について述べ、続いてプラスミドの選択的除去法を用い、当該プラスミドを除去することで親株より増殖速度の早いプラスミド変異株を作出したことを上げた。また2例目としては、*L. l. lactis bioval. diacetylactis* N7からクエン酸透過性プラスミドを選択的に除去し、クエン酸の代謝産物であるジアセチルの生成能を失わせたフレーバー変異株育種の試みについて記述し、作出したプラスミド変異株の乳発酵スターターとしての能力について考察した。

第3章には、プラスミドの選択的除去で見出された新しいプラスミド性因子の解析例「宿主遺伝子の安定化に働くプラスミドの発見」についてまとめた。

L. lactis subsp. *cremoris* NIAI712は、乳発酵スターター乳酸菌のプロトタイプとして、世界中で広く研究に用いられている*L. lactis* NCDO712の派生株である。*L. lactis* NIAI712は、5種類のプラスミドを有し、そのうち約9 kbのプラスミドpAG6はコピー数も多く、非常に安定である。それゆえ従来のプラスミド除去法では欠失されず、その機能

は調べられていなかった。そこで開発したプラスミドの選択的除去方法を試みたところ、効率よく pAG6 除去株 (712 Δ pAG6) が得られた。712 Δ pAG6 の乳発酵能を調べたところ、乳中での増殖能および乳酸生成能が親株よりも著しく劣っていた。712 Δ pAG6 と親株からゲノム遺伝子を抽出し、その制限分解パターンを比較したところ、pAG6 の除去に伴って、短期間のうちに遺伝子組み換えによる変異が起こることが明らかとなった。さらにこのゲノム変異によって、カゼイン分解物の取り込みに働く一連の遺伝子群 *opp-pepO* が、例外なく消失していることを突き止め、発酵遅延の主原因であると結論した。

pAG6 には、宿主 DNA のメチル化配列を決定する因子がコードされていた。遺伝子プロモーター近傍の DNA のメチル化状態が、遺伝子の転写活性に影響することは周知の事実である。特に遺伝子の転移を仲介するトランスポゾン の転移酵素遺伝子 *tnp* の転写減衰はよく知られている。それゆえ pAG6 の除去操作中、すなわち、pAG6 と競合プラスミドが同一細胞中に共存する状態で *tnp* の転写活性が上昇するのではないかと予想した。そこで、pAG6 と競合プラスミドが共存する変異株を作成し、*tnp* 転写活性を解析した。その結果、競合プラスミドの共存によって pAG6 の複製が不安定になっている最中には、ある種の *tnp* の発現量が特異的に上昇することを明らかにした。*L. lactis* のプラスミドが、共存する他のプラスミドやクロモゾームなど宿主のゲノム構造の安定化に働く現象は、本研究で明らかにされた新規な知見である。宿主は細胞内で pAG6 を安定に保持することで、ゲノム遺伝子のメチル化状態を正常に保ち、ゲノム内トランスポゾンなど可動性遺伝因子の転移活性を小さくし、ゲノム構造や菌株特異的なプラスミド構成を維持するのかもしれない。*L. lactis* において、DNA メチル化による転写制御の研究はごく少ない。本研究で作出した変異株が、メチル化と菌株特異的な遺伝子発現との関連を解析するモデル菌株になるのではないかと期待している。

キーワード：乳酸菌，プラスミド，生育速度，乳発酵

緒 論

乳酸菌の研究は、酪農食品の歴史が古いヨーロッパで始まった。したがって現在では多くの種に分類される乳酸菌群の中であって、チーズ製造用乳酸菌 *Lactococcus lactis* (*L. lactis*) の研究蓄積は群を抜いている。*L. lactis* は、1873 年に Lister によって酸敗した乳から *Bacterium lactis* として初めて分離された。1919 年には Orla-Jensen により牛乳やクリームに酸を生成する菌として *Streptococcus* 属に位置付けられた⁶⁷⁾。ランスフィールドの血清学的分類ではグループ N に分類される。Bergey's Manual of Systematic Bacteriology 第 9 版ではグループ N の乳酸球菌は *Streptococcus* 属から独立し、新たに *Lactococcus* 属に位置付けられた³⁸⁾。ゲノム DNA の G+C 含量は 38–40 mol% で、低 GC 含量の細菌群に分類される。形態的にはグラム陽性球菌で、二連あるいは短連鎖を形成し、グルコースから L-乳酸を生成する。通性嫌気性でカタラーゼを生産せず、運動性を示さない。

L. lactis は、様々な乳製品の発酵に関与する微生物として分離されているが、特にチーズ製造においてはカード形成や食感・風味の生成に適した条件を作り出す細菌「発酵スターター」の主役である。乳成分の資化能、

乳酸や各種フレーバー成分の生成能、発酵基質中での増殖能など発酵スターターの能力は、製品の品質に直結する。そこでこれまでに乳発酵の成否を決定付ける形質、すなわち乳糖の代謝経路、乳タンパク質の分解過程、フレーバーや菌体外多糖などの生成経路、バクテリオファージの感染経路と防御機構などに関して数多くの成果が報告されており、またこれらの形質の支配遺伝子が特定されている⁷³⁾。

近年では、乳発酵食品に対する消費者の期待は多様化し、美味しさの向上に加え、整腸作用や免疫賦活作用など健康機能の強化を目指した発酵食品の開発が行われている^{5, 71, 91)}。最近人気が高まっている機能性ヨーグルトなどの機能性発酵食品では、その効能は発酵スターター (*Lactobacillus casei* シロタ株; ヤクルト, *Lactobacillus gasseri* LG21 株; 明治乳業, 等) の菌株特異性、すなわち菌株に特徴的な菌体成分や代謝産物の保健効果に依存している^{75, 82)}。このことは、近年スターターの菌株名を積極的に商品に表示するようになったことで、一般消費者にも広く認識される所となった。また、今迄あまり意識されていなかったが、伝統的な乳製品の評価基準である保存性、美味しさ、製造安定性なども実は菌株特異的な性質であった。店頭に並ぶ発酵乳製品の種類が増え、『美味しさの評価基準』も多様化してきた中で、個性の

際立った乳酸菌を発酵に利用して製品のバリエーションを増やすことも、乳製品の消費拡大を図る一手段と言える。このような背景の中で、いま菌株特異性の分子レベルでの解明に光が当たっている。菌株特異性の解明こそ特定の乳酸菌の付加価値を裏付ける明解な科学的データだからである。菌株特異性は、表現型に関わる遺伝子の有無だけで決まるわけでは無い。すなわち、関わる遺伝子群の発現強度や、実際に働いているタンパク質の分解速度などが複雑に影響する。

L. lactis の遺伝子構成が、2 Mb 程度の小型の染色体と、通常複数の染色体外遺伝子（プラスミド）を細胞内に保有することを特徴とすることから、著者は、乳系乳酸菌 *L. lactis* subsp. *lactis* および subsp. *cremoris* のプラスミドを研究対象としてきた^{52, 79, 81}。各々のプラスミドは宿主細胞の増殖と同調して、あるいは無関係に一定のコピー数を自己複製し、通常正確に次世代の細胞に分配される (Fig. 1)。

L. lactis のプラスミドのうち、最初にクローニングされ、全配列が決定されたのは、ローリングサークル (RC) 型で複製する小型のプラスミド pWVO1 と pSH71 である^{22, 56}。これらのプラスミドは *Escherichia coli* (*E. coli*), *Bacillus subtilis* (*B. subtilis*) を宿主としても複製できる広宿主域プラスミドで、現在汎用している *L.*

lactis ベクターの基礎となっている。しかしその後の研究から、*L. lactis* に広く分布するほとんどのプラスミドは、pWVO2 および pCI305 に代表される θ -複製型プラスミドであることが明らかとなった⁴⁵。現在までに *L. lactis* で RC 型プラスミドを2種類以上保有する菌株は報告されておらず、*L. lactis* に内在する RC 型プラスミドは全て pWVO1-type ファミリーに属することが示唆されている⁸⁰。pWVO2 ファミリーに属する θ -プラスミドは宿主域が狭く、安定で、80–100 kb 程度の大型のプラスミドも報告されている。*L. lactis* の θ -プラスミドの特徴として、乳発酵に必要な不可欠な表現形質をコードすることが上げられる。現在迄に、ラクトース資化、プロテイナーゼ活性、クエン酸取込み、ファージ耐性、バクテリオシン生産、粘性物質生産などの形質に関与するプラスミドが確認されている^{20, 76}。*L. lactis* の内在プラスミドの種類や組合せは菌株ごとに異なり、菌株特異的な表現型を決定している。*L. lactis* の分離源は乳製品、生乳、漬物、生草など多岐にわたり、プラスミド構成を変えながら生育環境に適応していると考えられる。中には細胞内に10種類程度のプラスミドを保有する株も多く、未知機能の発見・解明が期待されている。

プラスミド研究ではプラスミド除去株と野生株の表現型比較を解析の端緒とすることも多く、複製が安定で、既存の方法では除去することが難しいプラスミドの解析は遅れている。従来プラスミド除去株の作出には、アクリジン色素等の変異剤添加培地での継代培養、高温培養、プロトプラスト形成、およびそれらの組合せ法が用いられている^{25, 31, 32, 60, 85}。これらの方法では、比較的不安定なプラスミドが先に消失してしまうため、研究に都合の良いプラスミド除去株を、任意に作出することができなかった。また先に述べたように、乳酸菌細胞内のプラスミドの種類や組合せを変えることで、親株とは性質の違う菌株を新しく作出することができる。したがってプラスミド変異株を発酵スターターとして使うと、発酵製品の味や風味の改善が期待できる。しかし従来法では、通常発酵に必須な大型のプラスミドから除去されることから、発酵産業に利用可能な実用菌株の改良方法としての適用は難しかった。さらに、変異剤は菌の遺伝子にランダムに作用するため、菌の生育や、発酵性能に関与する他の有用な遺伝子群の変異も同時に誘起するほか、有害な遺伝変異が被検菌に導入される可能性も否定できない。そのため、プラスミド除去に汎用されている従来法は、食品の発酵に利用するための菌株の改良には、安全面の点でも不向きであった。

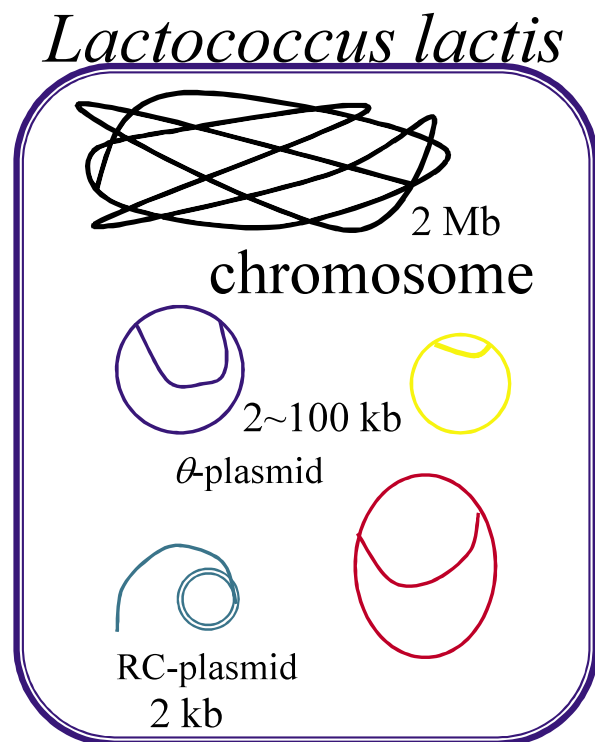


Fig. 1. Theta-replicating (θ -) and rolling circle replicating (RC-) plasmids in *Lactococcus lactis*.

同一の細菌細胞内に、近縁の2種類以上のプラスミドが安定に共存できない性質は、「プラスミドの不和合性」として知られ、良く研究されている^{4, 12, 21, 65)}。*L. lactis*の θ -型プラスミドの場合、プラスミドの増幅を制御している複製領域のうち、プラスミドの分配やコピー数などを決めている一部の遺伝子配列(不和合性決定配列)が一致すると、それらのプラスミドは不和合性となり、同一細胞内に安定して共存し続けることはできない^{4, 65)}。そこで第1章ではプラスミド解析の効率化を目指し、*L. lactis*細胞内に複数種類内在している θ -プラスミドのうち任意の1種類を、不和合性を利用して選択的に除去する方法を開発した。この方法の最大の利点は、目的とするプラスミドの除去に際して、内在する他のプラスミド構成に影響しないことであり、発酵食品の製造に用いるスターター乳酸菌の育種法としても応用が可能である。そこで第2章では本法を用いたスターター乳酸菌株の実際の育種例について記述した。続いて第3章では、*L. lactis*に内在する8.7 kbのプラスミドを、選択的に除去することで高頻度に出現する発酵遅延変異株を試験に用い、除去したプラスミドの機能解析を行った結果について詳述する。得られた発酵遅延変異株では、乳資化性遺伝子群の転写活性が著しく低下していた。乳酸菌における菌株特異性には、保有遺伝子の構成や、配列のバリエーションに加えて、保有遺伝子の発現強度も大きく影響すると考えられている。本研究で除去した8.7 kbのプラスミドには、宿主DNAのメチル化配列を決定する因子がコードされていた。DNAのメチル化状態が、転写活性に影響することは周知の事実である¹¹⁾。それゆえ本研究で作出した変異株が、DNAメチル化と菌株特異性との関連を解析するモデル菌株になるのではないかと期待している。本章では、プラスミド除去株で発現抑制を受けている遺伝子群を明らかにするとともに、発酵遅延の原因について考察した。

第1章 乳製品のスターター (*Lactococcus lactis* subsp.) に内在するプラスミドの選択的除去法の開発

緒 言

乳業用乳酸菌 *Lactococcus lactis* (*L. lactis*) は、細胞内に通常複数のプラスミドを保有しており、発酵特性を支配している遺伝子群をコードしている場合が多い (Fig. 1)。緒論で述べた通り、*L. lactis* に広く分布するほとんどのプラスミドは、pWVO2-type の θ -複製型プラスミ

ドである⁴⁵⁾。また Seegers らは、プラスミド複製領域のDNA配列を認識するプローブを用いてサザン解析を行い、1) *L. lactis* から分離されるプラスミドの大多数は、pWVO2-type のプラスミドファミリーであること、2) 多くの *L. lactis* 菌株は細胞内に、複数の pWVO2-type プラスミドを保有することを示している⁸⁰⁾。pWVO2-type プラスミドは、複製に際してシスに働くDNA配列、すなわち複製起点 (*ori*) と、トランスに働き、*ori* 配列に特異的に結合してプラスミドの複製開始に働く複製開始因子 (RepB) を必要とする³³⁾。通常 *ori* の3'側に隣接して RepB 遺伝子 (*repB*) がコードされている。pWVO2-type の *ori* の構造については、Kiewiet らが詳しく研究し⁴⁵⁾、保存性が高く、アデニンおよびチミン残基に富む AT-rich box、続いて 22-bp の配列が 3.5 回繰り返される 22-bp repeat (イテロン)、および 2 セットのインバーテッドリピート配列 (IR1, IR2) を *ori* に特徴的な DNA 配列として報告している。イテロンをコードするプラスミド複製領域の詳細な構造と複製メカニズムは、大腸菌の F 因子や P1, *Pseudomonas* 由来の pPS10 などのプラスミドで研究が先行し、不和合性を決定する *ori* の DNA 配列をはじめ、複製開始に必要な複製開始因子の 2 量化や、*ori* との結合に関与するアミノ酸配列とモチーフなどが特定されている^{12, 21, 65)}。

pWVO2-type ファミリーに属するプラスミドの複製領域は、互いに高い相同性を示す^{34, 45, 80)}。*L. lactis* の細胞内に、同じファミリーに属し、相同性の高い複製モジュールを含む多数のプラスミドが不和合性を示さず、なぜ安定に共存するのかという疑問を解明するために、pWVO2-type プラスミドの複製領域の構造が詳しく研究されてきた^{29, 33, 37, 80)}。Seegers らおよび Gravesen らは、*L. lactis* θ -プラスミドおよび、P1 プラスミドなどイテロンをコードする既知のプラスミドの *ori* を比較し、pWVO2-type プラスミドでは、*ori* 内の 22-bp repeat と、22-bp repeat に重なる IR1 の配列が不和合性に関与していると結論した^{34, 80)}。また RepB についても、既知複製因子との相同性やモチーフ解析から、*ori* との特異的結合や不和合性に関与するアミノ酸配列を推定している^{26, 34)}。

L. lactis は、様々な分離源から得られ、環境に適応したプラスミド構成を持つ。したがってその機能が特定されていないプラスミドも多く残されている。プラスミドの機能解析においては、通常まずプラスミド除去株を作出し、除去株の表現形質と親株の表現形質を比較して研究の端緒とする。従って、対象とするプラスミドを選択

的に除去することができれば、プラスミド上の遺伝子機能や、関係する表現形質を効率良く推定することができる。また発酵の種菌（発酵スターター）として不可欠なプラスミドの保有状態を変えず、不必要なプラスミドを選択的に除去することができれば、スターターの改良にも便利である。しかし緒論で述べた通り、汎用されているプラスミド除去法では、除去するプラスミドを選べない。

外来プラスミドの導入によって、内在している近縁のプラスミドが不和合性となり選択的に除去される現象は、良く知られている^{12, 65)}。近年 *L. lactis* に広く分布する pWVO2-type プラスミドの複製領域の構造について多くの知見が集積されており、*ori* および *repB* 配列のうち、不和合性やコピー数を決定する可変配列と RepB 構造の維持に必要な保存配列を推定できる。そこで、第1章では、効率的な *L. lactis* プラスミド研究と、発酵スターターの改良を目的とし、不和合性を利用したプラスミド除去法を検討した。

これまで不和合性な競合プラスミドをキュアリングに用いている例は多くあるが、競合プラスミドの作成には、目的プラスミドのレプリコンが用いられている。この点を改良すべく、著者は、pWVO2-type プラスミド複製領域の可変配列を効率よく増幅しうるプライマーペアを設計するとともに、保存配列を含むベクターを作成した。またそれらを用いて競合プラスミドを *in vitro* で合成し、*L. lactis* θ -プラスミドを選択的に除去する方法を開発した。本法は、競合プラスミドの作成に際して、目的プラスミドの抽出や、シーケンシングによる複製領域の解析を必要とせず、PCRで複製領域の可変配列を増幅できれば、*L. lactis* で複製可能な競合プラスミドを作成できる点が簡便であり新規である。さらに本法は変異剤等を用いないことから、発酵に不都合な遺伝変異や、不可欠なプラスミドの脱落が起りにくいと考えられるため、発酵産業に利用可能な実用菌株の改良にも利用できる。

Lactococcus lactis subsp. *lactis* biovar *diacetylactis* DRC1 は、5種類のプラスミドを保有し、*L. lactis* のプラスミド抽出に汎用されるマッケイらの方法で再現性良くトータルプラスミドが得られた。また以前、畜産試験場の藤田らは、*L. lactis* DRC1の全プラスミドを除去し、プラスミドフリー株 *L. lactis* DRC1021 を育種している^{30, 97)}。そこで、[不和合性を利用したプラスミドの除去] システムの構築に用いる θ -プラスミドの供与菌として、*L. lactis* DRC1 を、維持するための宿主として *L. lactis*

DRC1021 を用いることとした。

第1節 *L. lactis* θ -複製型プラスミドの複製単位 (*ori-repB*) の取得

1. 材料および方法

菌株およびプラスミド

本研究で使用した微生物およびプラスミドは Table 1 にまとめた。*Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetylactis* DRC1 は、National Institute for Research in Dairying (現在 Agricultural and Food Research Council (AFRC) of the Institute of Food Research, Shinfield, UK) から20年以上前に分譲された。*L. lactis* DRC1021 は、*L. lactis* DRC1の全プラスミドを除去したプラスミドフリー株で、藤田らが作出した⁹⁷⁾。*Escherichia coli* XL1-Blue は、プラスミドベクターおよび組換えプラスミドの宿主として用いた。プラスミドベクター pBluescript II は、遺伝子クローニングおよび *E. coli* - *L. lactis* シャトルベクターの作成に用いた。XL1-Blue と pBluescript II KS+ は、Stratagene Cloning Systems (La Jolla, CA, USA) から購入した。

培地と培養条件

L. lactis の培養には TYG 培地 (1% トリプトン, 0.5% 酵母エキス, 0.5% 塩化ナトリウム, 1% グルコース, 1% コハク酸ナトリウム; pH 6.8), TYL 培地 (1% トリプトン, 0.5% 酵母エキス, 0.5% 塩化ナトリウム, 1% ラクトース, 1% コハク酸ナトリウム; pH 6.8) または 10% スキムミルク培地を用い、30°C で静置培養した。*E. coli* は、LB 培地を用いて 37°C で震盪培養した。菌株を繰り返して継代培養する場合には、培養液を 0.1% 接種した。また平板培養には、各々の培地に 1.5% アガーを添加した培地を用いた。TYG 培地, TYL 培地および LB 培地は 121°C で 15 分間, 10% スキムミルク培地は 110°C で 10 分間, それぞれオートクレーブで滅菌し、培養に用いた。

プラスミドの調製と組換えプラスミドの作成

E. coli XL1-Blue プラスミド DNA の抽出は、Molecular Cloning: a laboratory manual second edition の記述に従って行った⁷⁷⁾。*L. lactis* プラスミド DNA の抽出は、Anderson and McKay (1983) の方法で行った³⁾。*L. lactis* からプラスミド DNA を抽出する際には、10 mM DL-スレオニンを添加した TYG 培地 (TYG リシス培地) で一晩培養後、定常期の細胞を集菌して用いた。抽出した DNA 画分には、最終濃度が 1 mg/ml になるよ

Table 1. *L. lactis* Strains and Plasmids

Strains and Plasmids	Properties	References or sources
Strains		
<i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>lactis</i>		
DRC1	Wild type	Swartling (1951); Colling and Harrey (1962)
NIAI N7	Wild type	Lab. collection
527	Wild type	Lab. collection
<i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>cremoris</i>		
NIAI712	Wild type	Lab. collection
IL1403	Plasmid-free derivative of IL594	Chopin <i>et al.</i> , (1984)
DRC1021	Plasmid-free derivative of DRC1	Fujita <i>et al.</i> , (1999)
DRC1121	DRC1021 harboring pGKV21 and pDR1-1	This study
DRC1521	DRC1021 harboring pGKV21 and pDR1-1B	This study
<i>Escherichia coli</i>		
XL1-Blue		
Plasmids		
pGKV21	<i>E. coli</i> , <i>B. subtilis</i> , <i>L. lactis</i> shuttle vector, Em ^R , Cm ^R	van der Vossen <i>et al.</i> , (1985)
pDR1-1	7.4 kb θ -plasmid from <i>L. lactis</i> DRC1	This study
pDR1-1B	7.3 kb θ -plasmid from <i>L. lactis</i> DRC1	This study
pDB1	Receptor vector, a partial replicon of pDR1-1B with an Em ^R gene cloned into pBluescriptII, Ap ^R , Em ^R	This study
pCV(x)	Part of optional θ -replicon including incompatibility determinant cloned into pDB1, Em ^R	This study
pBLs1	pDR1-1 cloned into the Sall site of pBluescriptII, Ap ^R	This study
pBLb1	pDR1-1B cloned into the HincII site of pBluescriptII, Ap ^R	This study
pBluescriptII	<i>E. coli</i> cloning vector, Ap ^R	
p8Em1	pUC118 containing pAM β 1 Em ^R gene	Ito <i>et al.</i> , (1992)
Em ^R , resistance to erythromycin; Ap ^R , resistance to ampicillin Lab. collection, National Institute of Livestock and Grassland Science collection		

うに RibonucleaseA (RNase A) を添加し, 37°C で 30 分間インキュベートし, RNA を分解した。RNase A 処理後, フェノール:クロロホルム (1:1) を等量加えて処理し, エタノール沈澱法でプラスミド DNA を精製した。プラスミド DNA の制限分解, 末端平滑化反応 (ブランチング), ライゲーション反応には, 各種制限酵素 (Toyobo, Osaka, Japan), DNA Blunting Kit (Takara, Otsu, Japan), Ligation Kit ver. II (Takara) を添付の使用説明書に従って用いた。

プラスミドおよび DNA フラグメントのアガロースゲル電気泳動

L. lactis から抽出したトータルプラスミドおよび制限酵素で切断した DNA フラグメントは, 0.8% または 1% LO3-アガロース (Takara) で調製した 52 mm (W) × 60 mm (L) ゲル, あるいは 107 mm (W) × 60 mm (L) ゲルを用い, Mupid-2 (Advance, Tokyo, Japan) を使用して泳動し, 分画した。電気泳動バッファーには, 1 × TBE バッファー (89 mM トリス-ホウ酸, 2.5 mM EDTA, pH 8.3) を用い, 100 V で 30 分~1 時間泳動した。

泳動終了後のアガロースゲルは、エチジウムブロマイドで染色後、紫外線ランプ照射下で観察した。アガロースゲル電気泳動で分画したプラスミドおよび DNA フラグメントの抽出と精製には、QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen, Chatsworth, CA, USA) を用いた。

形質転換

1) 大腸菌の形質転換

E. coli XL1-Blue の形質転換は、Molecular Cloning: a laboratory manual second edition の記述に従って行った⁷⁾。形質転換体は 50 mg/ml のアンピシリンナトリウム (Ap) を添加した LB 寒天プレートで選択した。また組換えプラスミド保有菌は、Ap に加えて、IPTG (0.5 mM) と X-Gal (100 mg/ml) を添加した LB 寒天プレートで選択した。

2) 選択マーカーを有するプラスミドベクターまたは組換えプラスミドによる *L. lactis* の形質転換

E. coli - *L. lactis* シャトルベクター pGKV21 (エリスロマイシン耐性; Em^R, クロラムフェニコール耐性; Cm^R) および Em^R フラグメントを有する組換えプラスミドによる *L. lactis* の形質転換は、Bio-Rad gene pulser (Bio-Rad Laboratories, Richmond, CA, USA) を使用し、Holo and Nes の記述に従って、エレクトロポレーション法で行った³⁸⁾。すなわち、あらかじめ氷冷した 2 mm gap のエレクトロポレーションキュベットに、プラスミド DNA (10 ng) と 40 ml のコンピテントセルを混合して入れ、25 mF、200 Ω and 2.5 kV のシングルパルスに暴露しプラスミドを導入した。パルス暴露直後に 1 ml の SGM17 培地 (GM17 (Difco, Detroit, USA) containing 1% glucose, 20% sucrose) をキュベットに添加し、30℃ で 1.5 時間復帰培養した。培養後、100 ml あるいは 10 ml の培養液をエリスロマイシン (Em) (5 mg/ml) 添加 SR アガープレート (1% tryptone, 0.5% yeast extract, 1% glucose, 20% sucrose, 2.5% gelatin, 2.5 mM MgCl₂, 2.5 mM CaCl₂ and 1.5% agar, ;pH 6.8) に塗布し、30℃ で 1 晩~3 日間静置培養し、Em 耐性を指標に形質転換体を分離した。

3) 野生型プラスミドによる *L. lactis* の形質転換

プラスミド内に、Em^R などの選択マーカー遺伝子の配列を含まない非組換え *L. lactis* プラスミド (wild type plasmid) を用いた形質転換体の取得には、pGKV21 (Em^R) をインジケータープラスミドとして用いた^{16, 51)}。

方法の概略は Fig. 2 に示した。すなわち、Bio-Rad 社製のエレクトロポレーションキュベットに、*L. lactis* プラスミド画分 (100 ng), pGKV21 (10 ng) および 40 ml のコンピテントセルを混合して入れ、2) と同条件のシングルパルスに暴露し、プラスミドを導入した。形質転換体は、まず Em 添加 SR 寒天プレートで培養し、Em^R コロニーを単離した。次に単離した各々の Em^R 菌株からプラスミドを抽出してアガロース電気泳動でプラスミドプロファイルと比較し、pGKV21 の他に、同時に導入した *L. lactis* プラスミドを保有する菌を探索した。分離した菌株を TYG 培地に植菌し、39℃ で連続して継代培養することで、内在する pGKV21 を除去した。

DNA 配列解析

供試した *L. lactis* プラスミドを適当な制限酵素で切断し、pBluescript II のマルチクローニングサイトにクローニングした。次に Deletion Kit for Kilo Sequencing (Takara) を用いてデリションクローンを作成し、シークエンスのテンプレートとして用いた。Taq dye-primer cycle sequencing kit と M13 universal dye primer (Perkin Elmer) を用いてシークエンス反応し、Applied Biosystems 373A automated DNA sequencer (Applied

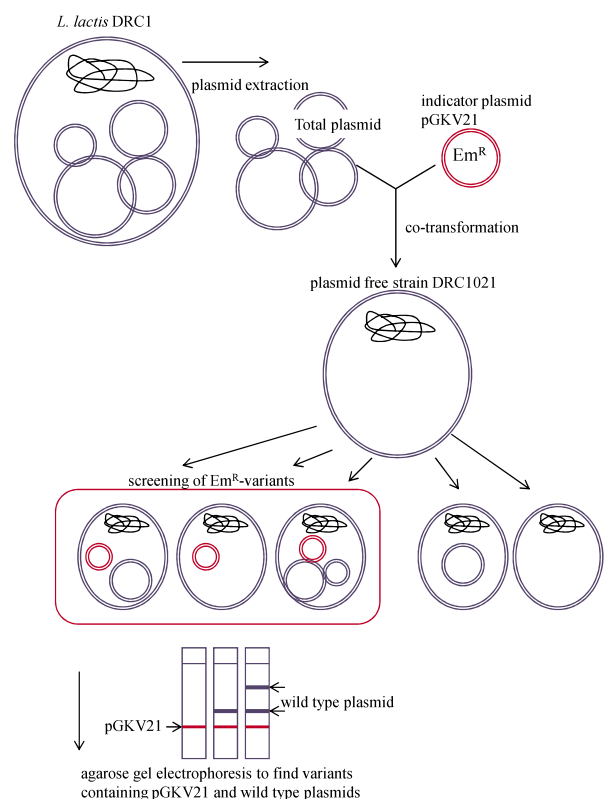


Fig. 2. Isolation of variants containing an indicator pGKV21 and wild type plasmids.

Biosystems, Foster City, CA, USA) を用いて配列データを得た。配列データは Genetyx-Mac ver.9.0.1 を用いて解析した。ORF 解析および相同性解析には, BLAST または FASTA 解析を用いた^{2, 69)}。

2. 結果

θ -型プラスミド pDR1-1 および pDR1-1B の単離

L. lactis DRC1 からトータルプラスミドを抽出し, 0.8% アガロースゲル電気泳動でプラスミドプロファイル調べた (Fig. 3)。 *L. lactis* DRC1 のプラスミドは, 以前藤田らが研究し, クエン酸透過性プラスミド (pDR-Cit: 8.3 kb), 乳糖およびカゼイン資化性プラスミド (pDR-Lac: 50 kb), バクテリオシン生産性プラスミド (約 60 kb; 本研究で用いた電気泳動の条件では泳動されなかった。) を同定しているが, 最も分子量の小さい多コピープラスミド pDR1-1 の機能は報告されていない⁹⁷⁾。乳糖資化性遺伝子群の構成遺伝子 *lacG* (phospho-b-galactosidase gene), *citP* (citrate permease gene) を認識するプローブを用いてサザン解析を行い確認した所, 約 50 kb のプラスミドバンドが *lacG*-プローブで, 約 8 kb のバンドが *citP*-プローブで認識された (Fig. 3)。

L. lactis DRC1 のトータルプラスミドと, インジケータープラスミド (pGKV21) を 10 : 1 の比率で混合し, プラスミドフリー株 *L. lactis* DRC1021 に導入し, *L. lactis* DRC1 由来の wild type プラスミドを 1 個以上保有する形質転換体 9 株 (DRC1121 ~ DRC1921) を得た。そのうち DRC1121 と DRC1521 には, 共に pDR1-1 に相当するプラスミドが導入されていた。しかし制限酵素処理の結果, DRC1121 には *SacI* で切断される約 7.5 kb のプラスミドの導入, DRC1521 には *BamHI* で切断される約 7.5 kb のプラスミドの導入が確認された。このことは, アガロースゲル電気泳動で, pDR1-1 とされていたプラスミドバンドは, 少なくとも 2 種類のプラスミドを含んでいたことを示唆している。そこで, *SacI* で切断されるプラスミドを pDR1-1, *BamHI* で切断されるプラスミドを pDR1-1B と名付けた。

塩基配列分析

L. lactis DRC1 の wild type plasmid pDR1-1 および pDR1-1B は *HincII* で 1 箇所切断された。そこで pBlue-script II の *SalI* サイトに両プラスミドをクローニングし, pBLs1 および pBLb1 を作成した。pBLs1 および pBLb1 のデリーションクローンをシークエンスし, 両プラスミドの全配列を決定した (Fig. 4)。その結果,

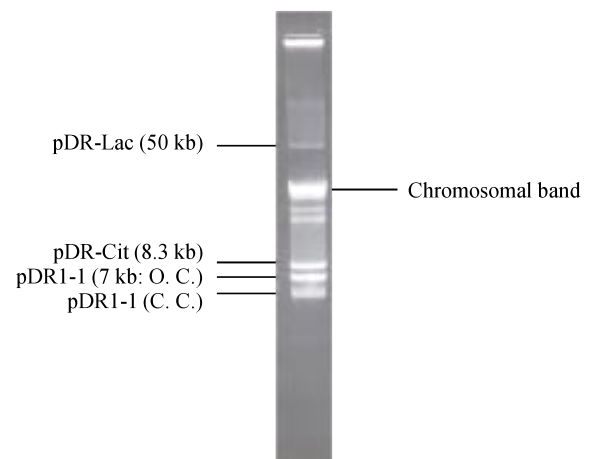


Fig. 3. Plasmid profile of *L. lactis* DRC1. Southern hybridization showed that pDR-Lac contained *lac* genes, pDR-Cit contained *citP* gene. C. C. indicates closed circular plasmid. O. C. indicates open circular plasmid.

pDR1-1 と pDR1-1B の大きさはそれぞれ 7412 bp および 7344 bp で, その GC 含量はどちらも 33.7% だった。またその制限酵素地図は, 一部の領域を除いて一致していた。オープンリーディングフレーム (ORF) 解析の結果, 両プラスミド共に 6 個の ORF が見つかった。pDR1-1 および pDR1-1B の ORF の大きさと相同性解析の結果を Table 2 に示した。pDR1-1, pDR1-1B 両プラスミドにおいて, 第 1 番目の ORF は, *L. lactis* に広く分布している θ -複製型プラスミドの複製開始因子遺伝子 (*repB*) と高い相同性があった。*repB* の開始コドンの 10 - 15 bp 上流にはリボソーム結合部位 (RBS), 77 ~ 104 bp 上流にはプロモーター配列 (-10, -35) が存在し, 113 - 188 bp 上流には, 22-bp フラグメントの 3.5 回繰返し配列 (22-bp repeat), さらに上流に保存性が高く, AT 塩基に富んだ配列 (AT-rich Box) を含む θ -プラスミドの複製起点 (*ori*) が存在した。通常 *L. lactis* の θ -プラスミドでは, *repB* 配列直後に, プロモーター配列の無い 1 ないし 2 つの ORF が隣接し, *repB* と共に複製領域を形成している^{79, 80)}。

pDR1-1 および pDR1-1B においても, *repB* 直下に *L. lactis* プラスミド pCIS3 で最初に報告された *orfX*, さらに下流に type I 制限・修飾システムの認識サブユニット遺伝子 (*hdsS*) と相同性の高い ORF が隣接していた^{29, 79)}。また *orfX* および *hdsS* 上流にはプロモーター配列が存在しないことから, *repB-orfX-hdsS* はオペロンを形成し, *repB* 上流のプロモーターによって転写されること

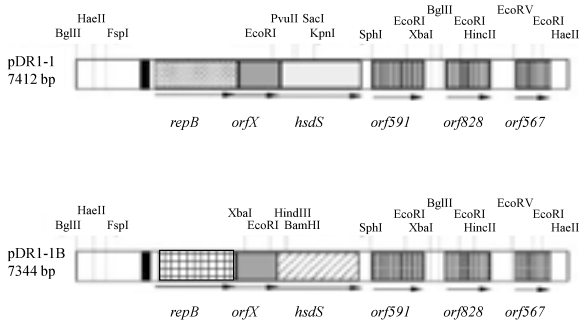


Fig. 4. Physical and genetic map of plasmid pDR1-1 and pDR1-1B in *L. lactis* DRC1.
Same patterns indicate the same DNA sequences.

が示唆された (Fig. 4)。pDR1-1 の *repB*, *orfX*, *hsdS* はそれぞれ 423 アミノ酸残基, 214 アミノ酸残基, 414 アミノ酸残基をコードしていた。また pDR1-1B の *repB*, *orfX*, *hsdS* はそれぞれ 386 アミノ酸残基, 211 アミノ酸残基, 414 アミノ酸残基をコードしていた。pDR1-1 および pDR1-1B の *repB-orfX-hsdS* 領域 (各々約 3.4 kb, 3.3 kb) の配列は 77.4% 一致した。一方 *repB-orfX-hsdS* 以外の配列は, 95% 以上一致した。一致領域に含まれる 3 つの ORF のうち, ORF519 と ORF567 は, 他の乳酸菌で報告されている integrase / recombinase (*int / rec*) と高い相関性があった^{1, 17, 18, 26)}。一方 ORF828 の機能は報告されていない。

pDR1-1 および pDR1-1B の複製単位 (*ori-repB*) の遺伝子配列を, DDBJ データバンクの既知配列と比較解析したところ, pDR1-1 の複製単位は新規であったが, pDR1-1B の複製単位は *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* UC317 の pCI305, および *L. lactis* subsp. *lactis* DPC721 の pAH33, さらに *L. lactis* subsp. *cremoris* UC509.9 の pCIS3 で既に報告されている配列と一致した (Fig. 5)

29, 37, 67, 79)。この結果は, pDR1-1B の複製単位をコードする野生型プラスミドが, *Lactococcus* 属乳酸菌に広く分布していることを示唆する。本研究で解析した pDR1-1 および pDR1-1B の全配列は, DDBJ に登録した。アクセッションナンバーは AB079381 (pDR1-1) および AB079380 (pDR1-1B) である。

3. 考察

本研究では, *L. lactis* に広く分布している θ -プラスミドを選択的に除去するために, θ -プラスミドの複製単位を *in vitro* で再構築し, 不和合性プラスミドを作成することを計画した。任意の *L. lactis* θ -プラスミドに対する不和合性プラスミドの作成に際しては, 1) 複製単位の再構築に共通して用いることのできるプラスミドベクターの作成, 2) 任意の *L. lactis* θ -プラスミドの不和合性配列を増幅しうる PCR プライマーペアの設計が必要である。

θ -複製型プラスミドの供与菌としては, 研究室保存株 *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar diacetylactis DRC1 を用いた。*L. lactis* DRC1 の 3 種類のプラスミドの機能は既に特定されているが, 最も分子量の小さい多コピープラスミド pDR1-1 の機能は明らかにされていない。またサザン解析によって, pDR1-1 は, *L. lactis* DRC1 のクエン酸透過性プラスミドの *repB* と相関性のある配列を含むことが示されている (未発表)。そこで, pDR1-1 が多コピーで複製しうる θ -型の複製領域 (*ori + repB*) を含むと予想し, 目的とするベクター構築のための素材とした。

L. lactis DRC1 全プラスミドをアガロースゲル電気泳動で分離し, ゲルから抽出・精製した pDR1-1 のプラスミドバンドは, 2 つの異なるプラスミド pDR1-1 および pDR1-1B を含んでいた。pDR1-1 と pDR1-1B の両プラ

Table 2. ORF encoded by pDR1-1 and pDR1-1B

pDR1-1						
name	<i>repB</i>	<i>orfX</i>	<i>hsdS</i>	<i>orf591</i>	<i>orf828</i>	<i>orf567</i>
gene	<i>repB</i>	<i>orfX</i>	<i>hsdS</i>	<i>int / rec</i>	unknown	<i>int / rec</i>
size (bp)	1,302	699	1,314	591	828	567
pDR1-1B						
name	<i>repB</i>	<i>orfX</i>	<i>hsdS</i>	<i>orf591</i>	<i>orf578</i>	<i>orf567</i>
gene	<i>repB</i>	<i>orfX</i>	<i>hsd</i>	<i>int / rec</i>	unknown	<i>int / rec</i>
size (bp)	1,224	633	1,314	591	828	567
similarity to						
pDR1-1 (%)	68.8%	67.3%	71.5%	100%	100%	100%

pDR1-1B	1	MSSISKNEH	NC	KQVG	---	LNELSKRKVV	EHNSLIT	SI	AKMDKT	PL	KMPELAV	SCIN	54
pCI305	1	MSSISKNEH	NC	KQVG	---	LNELSKRKVV	EHNSLIT	SI	AKMDKT	PL	KMPELAV	SCIN	54
pAH33	1	MSSISKNEH	NC	KQVG	---	LNELSKRKVV	EHNSLIT	SI	AKMDKT	PL	KMPELAV	SCIN	54
pCIS3	1	MSSISKNEH	NC	KQVG	---	LNELSKRKVV	EHNSLIT	SI	AKMDKT	PL	KMPELAV	SCIN	54
pDR1-1	1	MEI	IA	KKYHY	NY	SDNER	VCS	L	K	E	I	K	60
pDR1-1B	55	TEEPPKDHT	VYLSKEEL	F	AFFKVS	DNDKHS	RFKQ	AVEN	M	Q	Q	AFFQI	112
pCI305	55	TEEPPKDHT	VYLSKEEL	F	AFFKVS	DNDKHS	RFKQ	AVEN	M	Q	Q	AFFQI	112
pAH33	55	TEEPPKDHT	VYLSKEEL	F	AFFKVS	DNDKHS	RFKQ	AVEN	M	Q	Q	AFFQI	112
pCIS3	55	TEEPPKDHT	VYLSKEEL	F	AFFKVS	DNDKHS	RFKQ	AVEN	M	Q	Q	AFFQI	112
pDR1-1	61	EDNPPK	NNH	II	LS	NT	EL	F	AFFK	V	S	N	120
pDR1-1B	113	SIVPIPY	VEWTDY	HDDVK	IE	FHRE	IMP	YL	IN	L	K	Q	172
pCI305	113	SIVPIPY	VEWTDY	HDDVK	IE	FHRE	IMP	YL	IN	L	K	Q	172
pAH33	113	SIVPIPY	VEWTDY	HDDVK	IE	FHRE	IMP	YL	IN	L	K	Q	172
pCIS3	113	SIVPIPY	VEWTDY	HDDVK	IE	FHRE	IMP	YL	IN	L	K	Q	172
pDR1-1	121	V	I	S	L	E	E	T	T	N	D	Y	180
pDR1-1B	173	MNYNQY	EHYSYK	GGRR	EEQ	VEAY	RNPT	I	S	M	R	E	232
pCI305	173	MNYNQY	EHYSYK	GGRR	EEQ	VEAY	RNPT	I	S	M	R	E	232
pAH33	173	MNYNQY	EHYSYK	GGRR	EEQ	VEAY	RNPT	I	S	M	R	E	232
pCIS3	173	MNYNQY	EHYSYK	GGRR	EEQ	VEAY	RNPT	I	S	M	R	E	232
pDR1-1	181	MNYNQY	EHYS	S	K	G	G	R	R	E	E	Q	240
pDR1-1B	233	INENTS	FNVTYD	KIKK	GRS	IDS	SIV	F	H	I	T	K	292
pCI305	233	INENTS	FNVTYD	KIKK	GRS	IDS	SIV	F	H	I	T	K	292
pAH33	233	INENTS	FNVTYD	KIKK	GRS	IDS	SIV	F	H	I	T	K	292
pCIS3	233	INENTS	FNVTYD	KIKK	GRS	IDS	SIV	F	H	I	T	K	292
pDR1-1	241	I	N	A	H	T	S	F	N	V	T	Y	299
pDR1-1B	293	K	Q	A	M	S	K	Y	T	R	L	L	351
pCI305	293	K	Q	A	M	S	K	Y	T	R	L	L	351
pAH33	293	K	Q	A	M	S	K	Y	T	R	L	L	351
pCIS3	293	K	Q	A	M	S	K	Y	T	R	L	L	351
pDR1-1	300	A	G	E	N	L	K	Y	T	R	L	L	359
pDR1-1B	352	SSKKEA	YSKRN	VAKYL	KKA	E	Q	Y	L	P	T	V	386
pCI305	352	SSKKEA	YSKRN	VAKYL	KKA	E	Q	Y	L	P	T	V	386
pAH33	352	SSKKEA	YSKRN	VAKYL	KKA	E	Q	Y	L	P	T	V	386
pCIS3	352	SSKKEA	YSKRN	VAKYL	KKA	E	Q	Y	L	P	T	V	386
pDR1-1	360	A	S	K	K	E	A	Y	S	K	R	N	407

Fig. 5. Alignment of the RepB of pDR1-1B, pDR1-1 and three lactococcal plasmids.

Amino acid sequences identical to RepB of pDR1-1B are boxed.

The complete plasmid sequences of pDR1-1, pDR1-1B, pCI305 (Hayes *et al.* 1991), pAH33 (O'sullivan *et al.* 2000), and pCIS3 (Seegers *et al.* 2000) have been assigned to DDBJ with accession numbers AB079381, AB079380, AF179848, AF207855, and AF153414, respectively.

スミドは、*ori-repB-orfX-hsdS* 遺伝子クラスターからなる典型的な θ -型複製モジュールをコードしていた。*L. lactis* θ -型プラスミドの複製モジュール内に頻繁に見出される *hsdS* は、Type-I 制限/修飾の認識サブユニット HsdS をコードしており、プラスミドの複製には関与しない^{29, 79)}。HsdS は乳酸菌細胞内で自己と非自己遺伝子を見分ける役割を担い、バクテリオファージ感染など外来遺伝子の侵入防衛に働くプラスミド性因子である⁸⁾。多くのファージとファージの進化に対抗するためには、認識配列の異なる多くの HsdS 種を細胞内に発現

している必要がある。*L. lactis* の細胞内に複数共存する θ -型プラスミドの *ori-repB-orfX-hsdS* 配列は、しばしば相同組換えを起こすことが知られている。その結果、親プラスミドと異なる不和合性グループに属し、かつ異なる DNA 配列を認識する「新 HsdS」をコードする組換えプラスミドを生じさせる⁶⁷⁾。O' Sariban らは、内在プラスミドとは配列の異なる *hsdS*-コードプラスミドの導入によって、ファージ抵抗性が高まることを報告している。*L. lactis* DRC1 から分離した双子プラスミド pDR1-1 と pDR1-1B も、おそらくファージ感染に対抗する進化

の過程で生じたものであろう。FASTA プログラムによる相同解析の結果、pDR1-1 の *ori-repB-orfX-hsdS* 配列は新規であったが、pDR1-1B の同配列は、*L. lactis* subsp. *lactis* および *L. lactis* subsp. *cremoris* のプラスミドで既に 100% 一致した配列が報告されていた。この結果は、pDR1-1B と同じ複製単位を有する野生型プラスミドが、*Lactococcus* 属乳酸菌に広く分布することを示唆する。もしかすると pDR1-1B の *repB* 配列の方が系統進化的に古く、pDR1-1 は pDR1-1B から派生したものかも知れない。

本研究で計画したプラスミドベクターの構築と、任意の *L. lactis* θ - プラスミドの不和合性配列を増幅できる PCR プライマーペアの設計には *Lactococcus* 属乳酸菌に広く分布する θ - 型複製単位の利用が望ましいと考えた。そこで、pDR1-1B の複製単位の配列を利用することとした。

第2節 不和合性誘導プラスミドの作成

1. 材料および方法

菌株およびプラスミド

本研究で使用した微生物およびプラスミドは Table 1 にまとめた。pAMb1 由来のエリスロマイシン耐性遺伝子 (Em^R) とマルチクローニングサイトを含む p8Em1 は、明治乳業の佐々木博士から分譲して頂いた。

培地と培養条件

L. lactis の培養には TYG 培地または TYL 培地を用い、30°C で静置培養した。*E. coli* は、LB 培地を用いて 37°C で振とう培養した。また平板培養には、各々の培地に 1.5% 寒天を添加した培地を用いた。培地は 121°C で 15 分間オートクレーブして滅菌し、培養に用いた。

プラスミドの調製と組換えプラスミドの作成

E. coli プラスミド DNA および *L. lactis* プラスミド DNA の抽出と精製、さらにプラスミド DNA の制限分解、ランニング、ライゲーション反応は、第 1 章、第 1 節に記述した方法で行った。

プラスミドおよび DNA フラグメントのアガロースゲル電気泳動

プラスミドおよび DNA フラグメントは、1% LO3-アガロースゲル 52 mm (W) × 60 mm (L) あるいは 107 mm (W) × 60 mm (L) を用い、第 1 章、第 1 節に記述した方法で行った。アガロースゲル電気泳動で分画し

たプラスミドおよび DNA フラグメントの抽出と精製には、QIAquick Gel Extraction Kit を用いた。

形質転換

1) 大腸菌の形質転換

プラスミドベクターの作成および増幅には、宿主として *E. coli* XL1-Blue を用いた。形質転換は、第 1 章、第 1 節に記述した方法で行った。ベクターを保有する形質転換体は Ap (50 mg/ml) と Em (500 mg/ml) を添加した LB アガー培地で選択し、継代培養および保存には Ap 添加 LB 培地を用いた。

2) *L. lactis* の形質転換

L. lactis の形質転換は、第 1 章、第 1 節に記述した方法で行った。Em^R 遺伝子を有する組換えプラスミドによる *L. lactis* の形質転換では、10 ng の組換えプラスミド DNA を用いて第 1 章、第 1 節に記述した方法で行った。不和合性誘導プラスミドの導入には、精製したプラスミド DNA を 10 ng あるいは 100 ng 用いた。

Polymerase chain reaction (PCR)

PCR には、Perkin-Elmer 社 (Wellsley, MA, USA) 製の GeneAmp PCR System 2400 と、KOD-plus DNA polymerase (Toyobo) を用いて、20 ml あるいは 50 ml 容量の反応液で PCR 反応を行った。テンプレートには DNA を 1 ng/ml 程度に希釈し、2 ml 用いた。pDR1-1B の複製配列上の、PCR プライマーの認識部位および増幅フラグメントの名称を Fig. 6 に図示した。

pDR1-1B の *ori* 配列の上流部分を含むフラグメントを (FUb1)、および pDR1-1B の *repB* の下流部分を含むフラグメントを (FDb1) と名付け、FUb1 と FDb1 を増幅できる PCR プライマーを設計した。その増幅条件は、ヒートショック 94°C で 2 分間保持、続いて 1) 変性、94°C で 15 秒、2) アニーリング 53°C で 30 秒、3) 伸長 68°C で 45 秒、1) ~ 3) の反応を 40 サイクル行い、最後に 68°C で 7 分間保持した。これまでに報告されている *L. lactis* θ - プラスミドの複製領域との DNA 配列の比較から、FUb1 は θ - 型複製単位の 5' 側不変配列、すなわち AT-rich Box を含むように設計した。また FDb1 は、*repB* の 3' 領域を含むように設計した (Fig. 6)。pDR1-1B の *ori* 配列の 22-bp repeat, IR1、および *repB* の上流部分を含む可変領域 (variable fragment) すなわち「pDR1-1B 不和合性決定配列」を VF と名付けた。VF を増幅し、FUb1 と FDb1 間に結合できる PCR プラ

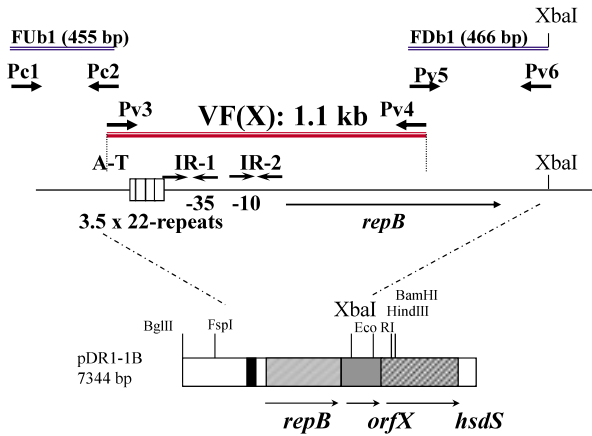


Fig. 6. Genetic organization of the replication module pDR1-1B and positions of PCR primers to amplify Fub1, FDb1, and VF(X).

Relevant features of the plasmids and noticeable restriction sites are indicated. Thin arrows indicate ORFs. The rightward- and leftward-pointing thick arrows indicate the relative positions of PCR primers Pc1, Pc2, Pv3, Pv4, Pc5, and Pc6. The Fub1, FDb1, and VF(X) correspond to the PCR fragments resulting from the amplification of Pc1-Pc2, Pc5-Pc6, and Pv3-Pv4 primer sets, respectively. The A-T, 22-repeat, IR1 and IR2 correspond to the A-T rich box, 22 bp direct repeats, and two inverted repeats in replication origin, respectively.

イマーを設計した (Fig. 6)。VF の増幅条件は、ヒートショック 94℃ で 2 分間保持, 続いて 1) 変性, 94℃ で 15 秒, 2) アニール 45℃ で 30 秒, 3) 伸長 68℃ で 2 分, 1) ~ 3) の反応を 40 サイクル行い, 最後に 68℃ で 7 分間保持した。PCR 反応後の増幅産物はすべて PCR purification Kit (Takara) で精製した。

2. 結果

pDR1-1B の複製単位を再構成するためのスキームとプライマーの設計

pDR1-1B の複製単位は, *ori* 配列および 386 アミノ酸残基をコードする *repB* からなる。pDR1-1B の複製単位を *in vitro* で再構成するためのスキームと, 複製単位の部分配列を増幅しうるプライマーの位置を, Fig. 6 に示した。*L. lactis* θ -プラスミドの複製単位における, 5' 側共通配列 (FUb1) を増幅するために, pDR1-1B の複製起点上流を認識するフォワードプライマー Pc1, AT-rich-box を認識するリバースプライマー Pc2 を設計した。3' 側共通配列 (FDb1) を増幅するために, pDR1-1B の *repB* 内部配列を認識するフォワードプライマー Pc5, *repB* を認識するリバースプライマー Pc6 を設計した。さらに pDR1-1B の不和合性決定配列を増幅するために, AT-rich-box を認識するフォワードプライ

マー Pv3, *repB* 内部配列を認識するリバースプライマー Pv4, を設計した (Fig. 6)。設計したプライマーの配列と, 予想される増幅産物の大きさを Table 3 に示した。

緒言でも言及したが, これまでに配列が決定され, データベースに登録されている *L. lactis* θ -プラスミドの *ori* 配列の比較から, *L. lactis* θ -プラスミドの不和合性は, 22-bp repeat と IR1 の配列によって決定されることが示唆されている^{28, 33)}。Fig. 7 には, pDR1-1B の *ori* 配列と, プライマー Pc2 と Pv3 の位置, および DNA 配列を示した。図中の四角で囲った AT-rich-box は, 特に保存性の高い配列であることから, この部分を認識するフォワードプライマー Pv3 とリバースプライマー Pc2 を図の様に設計した。Pc1 - Pc2 で増幅される FUb1 を市販ベクター pBluescript II に組込むために, Pc1 配列内に BanIII サイトを, Pc2 配列内に EcoRI サイトを作った。また Pv3 - Pv4 で増幅される pDR1-1B の不和合性決定配列と結合するために, Pc2 配列内に NruI サイトを作った。Fig. 8 には, pDR1-1B の *repB* と推定アミノ酸配列, およびプライマー Pv4, Pc5, Pc6 の位置とその DNA 配列を示した。*L. lactis* θ -プラスミドの RepB は, *E. coli*, *B. subtilis*, で報告された θ -型プラスミドの複製因子と比較され, プラスミドの複製開始に働く 2 量化, コピー数制御, *ori* 特異的 DNA 結合活性に関与するアミノ酸配列が特定されている^{12, 26)}。Fig. 8 ではそれぞれを実線, 二重線, 太線で示した。図中の点線で示した部分は, 特に保存性の高い配列であることから, この部分を認識するリバースプライマー Pv4 とフォワードプライマー Pc5 を図の様に設計した。Pc5 - Pc6 で増幅される FDb1 を pBluescript II に組込むために, Pc5 配列内に PstI サイトを作った。また Pv3 - Pv4 の増幅断片と結合するために, Pv4 および Pc5 配列内に XhoI サイトを作った (Fig. 8)。

ベクターの構築

pB1b1 をテンプレートとして PCR 反応を行い, 455 bp の FUb1 と, 466 bp の FDb1 を得た。FUb1 を BanIII および EcoRI で, FDb1 を PstI と XbaI でそれぞれ制限分解し, pBluescript II の BanIII - EcoRI サイトおよび PstI - XbaI サイトにクローニングした。またその SacI サイトに, p8Em1 を SacI 分解して得た Em^R フラグメントをクローニングし, pDB1 と名付けた (Fig. 9)。プラスミドベクター pDB1 は, pBluescript II 由来の *ori* を有するので *E. coli* を宿主として増幅できるが, pDR1-1B の複製単位から, *ori* と *repB* の一部約 1.1-kb からなる不和合

Table 3. Oligonucleotide primers and probes used in this study

Primer	Gene target	Fragment size (bp)	Sequence
		445 bp	
Pc1	upstream sequence of <i>ori</i>		AACGCTCTAAAAATCGATTAAAGCGA * containing a substitution (boldface) generating a BanIII site
Pc2	AT-rich box in <i>ori</i>		AAAGAATTCGCGATAAATATATATATAGGC * containing six substitutions (boldface) generating a NruI and an EcoRI site
		1,100 bp	
Pv3	AT-rich box in <i>ori</i>		ATATTATGCATATATATTTTAATCTTTTGTCTTTTG * containing four substitutions (boldface) generating an Eco22II site
Pv4	consensus sequence in <i>repB</i>		TTTATCCTCGAGCTTGTAGCTGTTATCATCTGC * containing three substitutions (boldface) generating an XhoI site
		466 bp	
Pc5	consensus sequence in <i>repB</i>		CAGCTGCAGGCTCGAGGATAAAGATTATCAATCCGA * containing five substitutions (boldface) generating a PstI site and an XhoI site
Pc6	downstream sequence of <i>repB</i>		CTGGAGAGTATCATCTGCTTCATCAATA

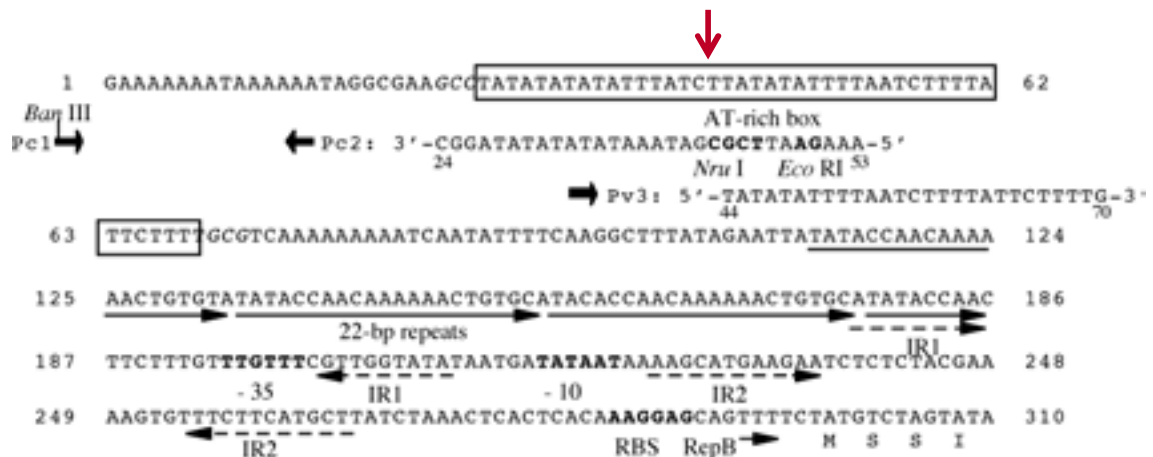


Fig. 7. Replication origin of pDR1-1B.

The -35 and -10 boxes of *repB* promoter and RBSs are indicated in boldface. AT-rich boxes among the q-replicons are boxed. The solid arrows indicate 22-bp direct repeats. The dashed arrows indicate two inverted repeats, IR1 and IR2. The PCR primers Pc1 (5'-AACGCTCTAAAAATCGATTAAAGCGA-3'), Pc2, and Pc3 are illustrated at their positions, and nucleotide substitutions are indicated in boldface. The red arrow indicates a substitution of one nucleotide in the AT-rich box when synthetic replicons were constructed.

性決定配列を欠失しているため、*L. lactis* では複製できなかった。

親プラスミド pDR1-1B の複製単位の再構成

pBlb1 をテンプレートとして PCR 反応を行い、1.1-kb の特異的フラグメントを増幅し、VF5 と名付け

た。VF5 を XhoI で制限分解した後、pDB1 の NruI - XhoI サイトに結合し、pDR1-1B に対する不和合性誘導プラスミド作成し pCV5 と名付けた。pCV5 は、NruI サイトの導入に起因し、AT-リッチボックス内に 1 塩基置換された (Fig. 7)。また XhoI サイトの導入に起因し、*repB* 内に 3 塩基置換された (Fig. 8)。ただし *repB* 内の

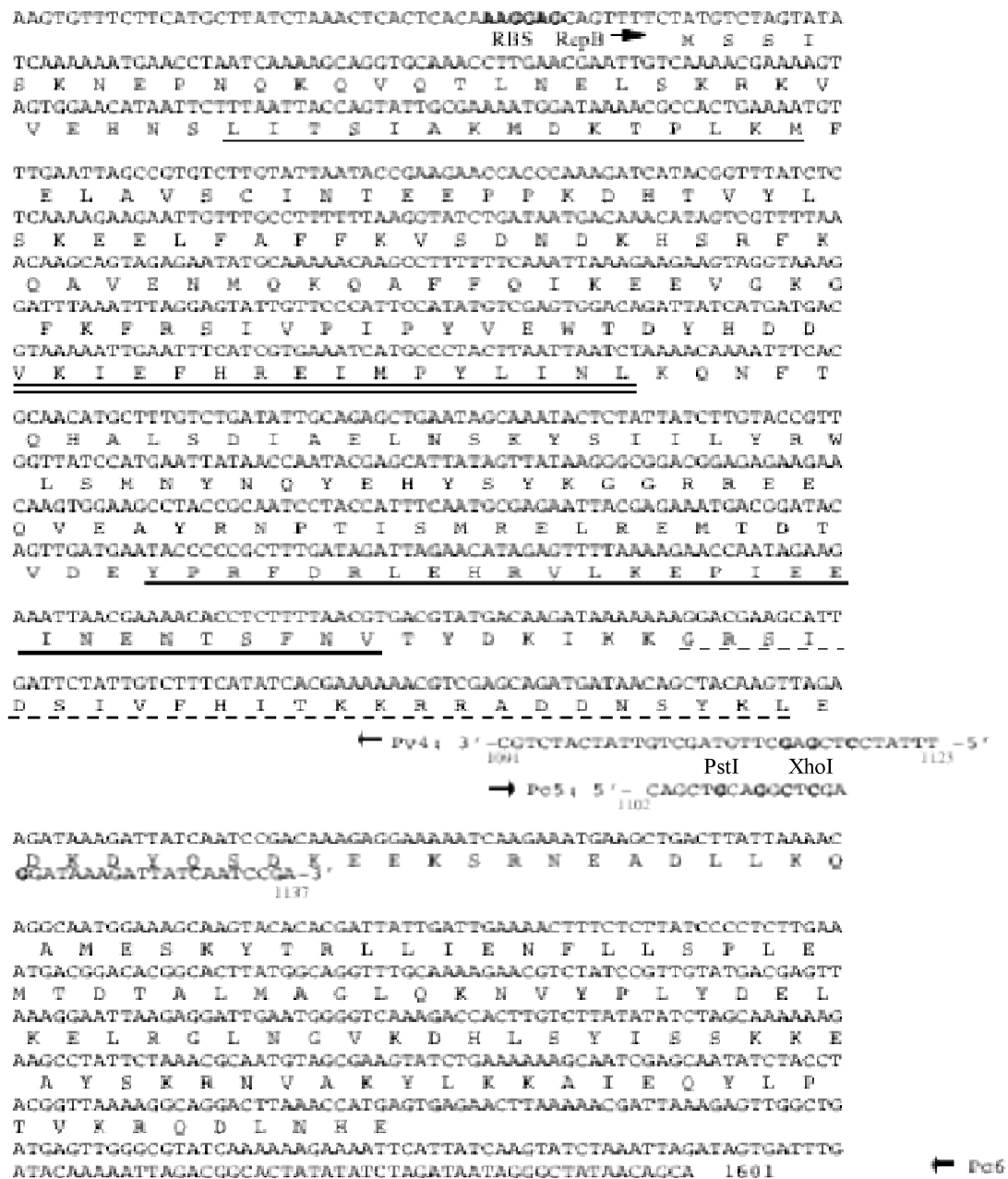


Fig. 8. RepB of pDR1-1B.

The one-letter code is used for deduced amino acid sequences. The thin line indicates the conserved domain of RepB for protein dimerization. The double line indicates the conserved domain for copy number control. The thick line indicates the conserved domain for governing ori-specific interactions. The dashed line indicates conserved amino acid sequences, which were located from 249 to 272, among lactococcal θ -replicons.

The PCR primers Pv4, Pc5 and Pc6 (5'-CTGGAGAGTATCATCTGCTTCATCAATA-3') are illustrated at their positions, and nucleotide substitutions are indicated in boldface.

塩基置換はアミノ酸配列には影響しない。

pCV5 の *L. lactis* における複製能の確認

再構成した複製単位を持つ pCV5 の *L. lactis* での複製能の回復を確かめるために、*L. lactis* DRC1021 にエレクトロポレーションで導入し、エリスロマイシン耐性を指標に形質転換体を 16 株取得した。アガロース電気泳

動の結果、全ての形質転換体で 6.1 kb プラスミド pCV5 の導入が確認された。このことは、pDR1-1B の複製単位の再構成に際して、AT-リッチボックス内に 1 塩基置換、*repB* 内に 3 塩基置換が起こっても、プラスミドの自立的複製能力が回復したことを示す。

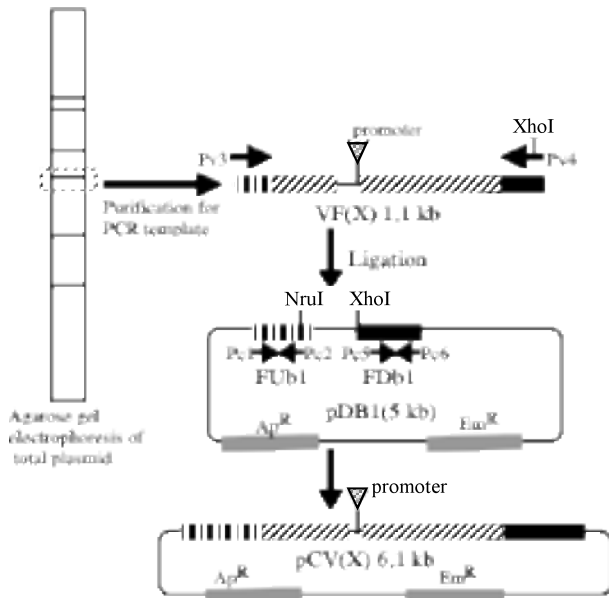


Fig. 9. Schematic illustration of the strategy for the construction of pCV(X).

The antibiotic markers for ampicillin and erythromycin are indicated as Am^R and Em^R respectively. Relevant PCR primer sets Pc1-Pc2, Pv3-Pv4, and Pc5-Pc6, with restriction sites useful for ligation, are indicated. The vector pDB1 contained a sequence of an upstream part (FUb1) and a downstream part (FDb1) of pDR1-1B with an erythromycin resistance gene. The NruI and XhoI sites of pDB1 indicate VF(X) insertion sites.

不和合性誘導プラスミド pCV5 による pDR1-1B の選択的除去試験

pCV5 を *L. lactis* DRC1 に導入し、不和合性プラスミド pDR1-1B の除去を試みた。操作の概要は Fig. 10 に示した。pCV5 の導入には、精製した pCV5-DNA を 10 ng あるいは 100 ng 用いた。形質転換頻度は、1 mg DNA あたり 2.1×10^3 CFU だった。pDR1-1B 非保有菌の判定は、pDR1-1B の *hdsS* 配列の有無を PCR で確認した。TYL-E 培地で 5 回継代培養して TYL-E 寒天培地に塗布し、出現したコロニーを PCR スクリーニングして pDR1-1B 非保有菌 DRC1 Δ pDR1-1B^{ER} を得た。DRC1 Δ pDR1-1B^{ER} を TYL で 5 回継代培養して TYL アガーに展開し、出現したコロニーのうち、エリスロマイシン感受性菌 DRC1 Δ pDR1-1B を得た。分離した DRC1 Δ pDR1-1B から抽出したトータルプラスミドをアガロースゲル電気泳動したところ、pCV5 に相当するバンドは検出されなかった。

3. 考察

pDR1-1B の複製単位の内部配列 1.1 kb (VF5) を増幅するプライマーペア Pv3 - Pv4 と、PCR 増幅フラグメン

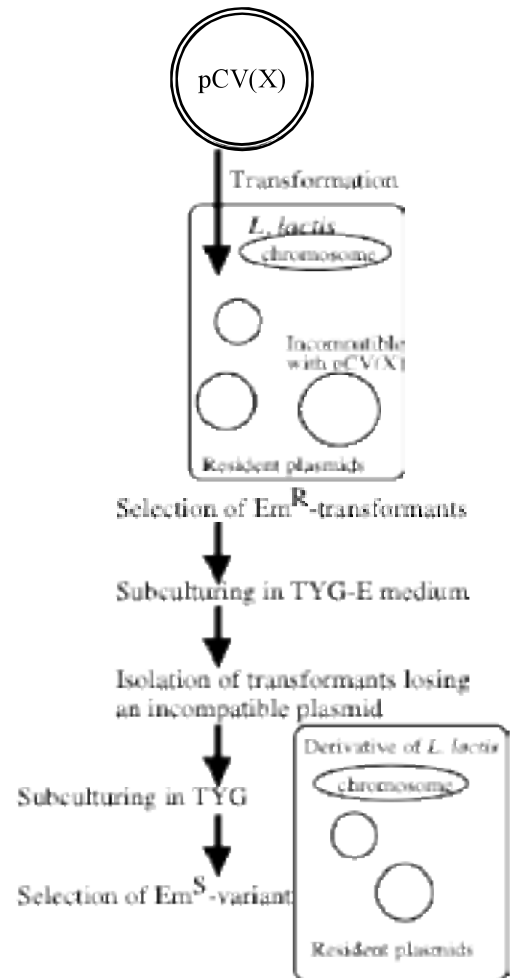


Fig. 10. Strategy for plasmid elimination with pCV(X). Resident plasmids in *L. lactis* are indicated by single circles. Synthetic replicon pCV(X) is indicated by the double circle.

ト VF5 を組込むことで、pDR1-1B の複製単位を再構築できるプラスミドベクター pDB1 を作出した。VF5 を pDB1 に組込んで構築した合成複製単位は、*L. lactis* で複製能を回復した。作出した組換えプラスミド pCV5 は、プラスミドフリー株 DRC1021 および、形質転換頻度は著しく低下したものの、親株 *L. lactis* DRC1 で複製することが確認された。以前の研究でも指摘されているが、*L. lactis* DRC1 における形質転換頻度の低下は、内在する野生型プラスミド pDR1-1B と pCV5 との不和合性が原因であると推定された⁶⁵。PCR スクリーニングの結果、TYG-E 培地で分離直後の形質転換体は、Em^R 形質を持ちながらも、pDR1-1B を保持している。このことは、*L. lactis* DRC1 細胞内で、pDR1-1B と pCV5 が共存することを示唆する。しかし TYG-E 培地で継代的に培養し、pCV5 保有株を選択することで、pDR1-1B は選択的に細胞内から失われた。

本研究で考案した *L. lactis* θ - プラスミドの選択的除去システムは、以下の優れた特徴を持つ。1) pDR1-1B との不和合性を有するプラスミド pCV5 を *in vitro* で構築できること。2) pCV5 を用いて、*L. lactis* DRC1 の他の内在プラスミドの保有状態を変えずに、pDR1-1B を選択的に除去できること。3) 選択圧が無い場合 pCV5 は複製が不安定で、Em 無添加培地による継代で速やかに欠失すること。そこで次節では、本システムが任意の *L. lactis* θ - プラスミドの除去にも用いることができるか試験することとした。

第3節 任意の *L. lactis* θ - プラスミドの選択的除去への応用

1. 材料と方法

菌株およびプラスミド

試験に供した微生物およびプラスミドは Table 1 にまとめられた。*L. lactis* は全て研究室保有株を用いた。

培地と培養条件

E. coli および *L. lactis* の培養は、第1章、第2節に記述した方法で行った。

プラスミドの調製と組換えプラスミドの作成

E. coli プラスミド DNA および *L. lactis* プラスミド DNA の抽出と精製、さらにプラスミド DNA の制限分解、ブランチング、ライゲーション反応は、第1章、第1節に記述した方法で行った。

L. lactis トータルプラスミドのアガロース電気泳動

L. lactis のプラスミドサンプルは、約 10^{10} 個の *L. lactis* 細胞から調製して 20 ml の TE (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA; pH 8.0) に溶解し、その全量を 1 ウェルで泳動した。トータルプラスミドの泳動には、0.8% LO3-アガロースゲル 109 mm (W) × 100 mm (L) を用い、100 V で 90 分間通電した。電気泳動で分離したプラスミドバンドは、エチジウムブロマイドで染色し可視化した。

PCR テンプレートの調製

アガロース電気泳動で分離したプラスミドバンドを、長波長の紫外線照射下でカミソリを用いて切り出し、QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen) を用いて精製し、50 ml の滅菌蒸留水に懸濁した。ゲルから 20 kb 以上のプラスミドを抽出する場合には、ゲル溶解液をピペッ

ティングし、大型のプラスミドを物理的に切断してから処理した。精製したプラスミド溶液 2 ml を PCR のテンプレートに供した。

形質転換

1) 大腸菌の形質転換

不和合性誘導プラスミド pCV (X) による *E. coli* XL1-Blue の形質転換および形質転換体の選択は、第1章、第1節に記述した方法で行った。

2) *L. lactis* の形質転換

不和合性誘導プラスミド pCV (X) の *L. lactis* への導入は、第1章、第2節で記述した pCV5 の *L. lactis* DRC1 への導入と同じ条件で行った。

PCR

任意の *L. lactis* θ - プラスミドの不和合性決定配列は、VF の文字を共通させて名付けた。(VF (X)) を得るために、第1章、第2節で記述した pDR1-1B の不和合性決定配列 (VF5) の増幅と同じ条件で PCR を行った。PCR 反応後のサンプルは、1% LO3-アガロースゲルで電気泳動し、増幅フラグメントが得られた場合には QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen) を用いて精製した。

プラスミド安定性の検定

エリスロマイシン耐性プラスミドを保有する菌株を、TYG-E 培地で 12 時間前培養し 0 世代とした ($T = 0$)。前培養した培養液 10 ml を 10 ml の TYG 培地に接種し、定常期まで培養した ($T = 1$)。以降、定常状態まで培養した試験菌を TYG 培地に 0.1% 接種し、30°C で定常期まで静置培養する作業を 10 回繰り返した。 $T = 0$ および 5 回目 ($T = 5$) と 10 回目 ($T = 10$) の培養が終了した培養液 10 ml を滅菌蒸留水 1 ml で希釈し、TYG アガープレートに展開した。30°C で 24 時間培養し、形成したコロニーをランダムに 100 個釣菌し、TYG-E アガープレートにレプリカした。30°C で 24 時間培養し、増殖したエリスロマイシン耐性コロニーを数え、プラスミド保有菌の割合を算出した。

2. 結果

任意の θ - プラスミドの不和合性誘導プラスミドの作成

プラスミドを複数保有し、畜産草地研究所で乳発酵に用いている *L. lactis* DRC1, 527, NIAI712, N7 を、試験

菌株とした。各々の菌株から抽出したトータルプラスミドをアガロース電気泳動で分離し、DNA をエジジウムブロマイド染色で可視化した。ゲルから切り出したプラスミドバンドを PCR のテンプレートに用い、不和合性決定配列 VF (X) を増幅した。得られた約 1.1-kb のインサートを *XhoI* で制限分解した後、pDB1 の *NruI* - *XhoI* サイトに結合し、作成した不和合性誘導プラスミドを *E. coli* を宿主として増幅させた。本試験では 8 種類の不和合性誘導プラスミドが得られた。各々のインサート (VF (X)) の増幅に用いたプラスミドバンドは Fig. 11 に図示した。不和合性誘導プラスミドの名称は、pCV を共通させた。作成した pCV (X) と、テンプレートに用いた親プラスミド、および菌株名は Table 4 にまとめた。Table 4 のプラスミド番号は、Fig. 11 のプラスミドバンドの番号と一致させた。プラスミドのアガロース電気泳動では、同じ種類のプラスミドであっても閉環型、開環型、直線型では移動度が異なり、トータルプラスミドの電気泳動像は複雑になる。Fig. 11 のプラスミド番号と矢印は、テンプレートに用いたプラスミドバンドのうち、閉環状プラスミドを指している。

pCV (X) の複製起点の配列解析

pBluescript II の T3 プロモーター配列を認識する T3 プライマー：5' -AATTAACCCCTACTAAAGGG-3' を用いて、8 つの pCV (X) のインサートの DNA 配列をシーケンスで確認した (Fig. 12)。FASTA プログラムによる相同性解析の結果、pCV (X) のインサートは全て *L.*

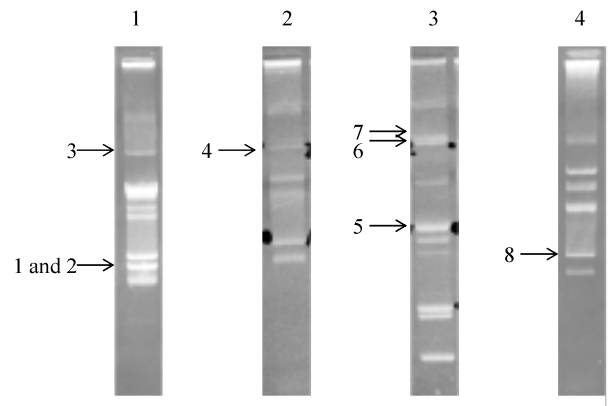


Fig. 11. Agarose gel electrophoresis for isolation of *L. lactis* plasmids to make competitors (pCV(X)) to wild type plasmids in parent strains. Total plasmids from *L. lactis* subsp. *lactis* DRC1 (lane 1), *L. lactis* subsp. *lactis* 527 (lane 2), *L. lactis* subsp. *cremoris* NIAI712 (lane 3), and *L. lactis* subsp. *lactis* N7 (lane 4).

lactis θ -プラスミドの複製領域と高い相同性があった。このことは、pDR1-1B の不和合性決定配列を増幅するプライマー Pv3 および Pv4 が、任意の θ -プラスミドの複製領域も認識することを示している。図中の赤矢印で示した塩基は、プライマー Pc2 の配列に由来する 1 塩基置換箇所である。

***L. lactis* における pCV (X) の複製能の確認と形質転換効率の解析**

プラスミドフリー株 *L. lactis* IL1403 は、*L. lactis* の実験株として広く世界中で用いられており、厳しい制限・

Table 4. Origin of pCV (X)

Stain and Plasmid	Plasmid size	Properties	pCV (X)	No. in Fig. 10
<i>L. lactis</i> DRC1				
pDR1-1	7.4kb	unknown	pCV1	1
pDR1-1B	7.3kb	unknown	pCV5	2
pLac-DRC1	50kb	Lac ⁺ , prt ⁺	pCV28	3
<i>L. lactis</i> 527				
pLac-527	50kb	Lac ⁺ , Prt ⁺	pCVL3	4
<i>L. lactis</i> NIAI712				
pAG6	8.7kb	unknown	pCVm6	5
pAG3	50kb	unknown	pCVL1	6
pLac-Prt	55kb	Lac ⁺ , Prt ⁺	pCVL10	7
<i>L. lactis</i> N7				
pCit-712	8.3kb	Cit ⁺	pCVc8	8

Lac⁺, lactose utilization activity; Prt⁺ proteinase activity; Cit⁺ citrate utilization activity

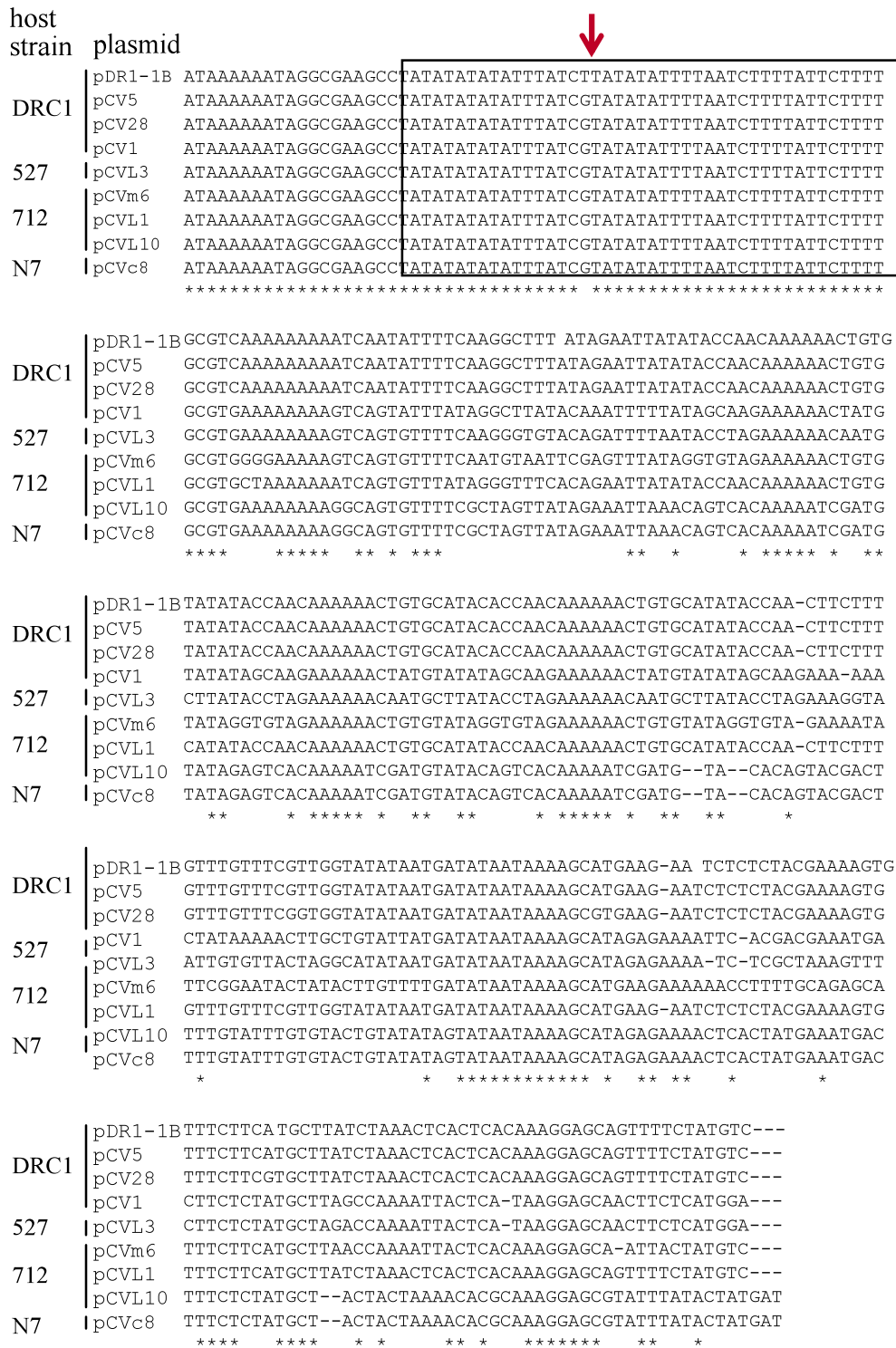


Fig. 12. Alignment of the Replication Origins of pDR1-1B and Synthetic Hybrid Replicons. Sequences identical in all plasmids are indicated by asterisks. AT-rich boxes are boxed. An arrow indicated a substitution of one nucleotide in the AT-rich box when synthetic replicons are constructed.

修飾システムを持たないことが報告されている⁶⁾。そこで、作成した pCV (X) を *L. lactis* IL1403 に導入し、複製能を確認した。形質転換効率およびプラスミドの安定性は Table 5 にまとめた。 $1.2 \times 10^5 \sim 9.8 \times 10^5$ の効率で全ての pCV (X) は *L. lactis* IL1403 に導入され、TYL-E 培地での継代培養では、宿主に安定に保持された。アガロース電気泳動の結果、全ての形質転換体で 6.1 kb プラスミド pCV (X) の導入が確認された (Fig. 13)。これらの結果は、任意の *L. lactis* θ -プラスミドの複製単位に由来するインサートを pDB1 に組込むことで、プラスミドの複製能が回復したことを示唆する。

pCV (X) の導入による不和合性の誘導とプラスミドの選択的除去

各々の pCV (X) を、インサートの鋳型にしたプラスミドを含む親株に導入し (Table 4, Fig. 11)、内在する不和合性プラスミドの除去を試みた。10 ng あるいは 100 ng の pCV1, pCV5, pCV28 を *L. lactis* DRC1 に、pCVL3 を *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* 527 に、pCVm6, pCVL1, pCVL10 を *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* 712 に、pCVc8 を *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetylactis* N7 にエレクトロポレーションで導入し、エリスロマイシン耐性を指標に選抜したところ、pCV1, pCV5, pCVm6 および pCVc8 の導入株 DRC1 (including pCV1)^{ER}, DRC1 (including pCV5)^{ER}, 712 (including pCVm6)^{ER}, N7 (including pCVc8)^{ER} が得られた。導入した pCV (X) を選択するために、TYL-E 培地で 5 回継代培養して TYL-E 寒天培地に展開し、コロニーを形成させた。pCV1, pCV5 の親プラスミド pDR1-1, pDR1-1B 非保有菌の判定は、内在する各 *hsdS* 配列の有無を PCR で確認した。pCVm6 および pCVc8 の親プラ

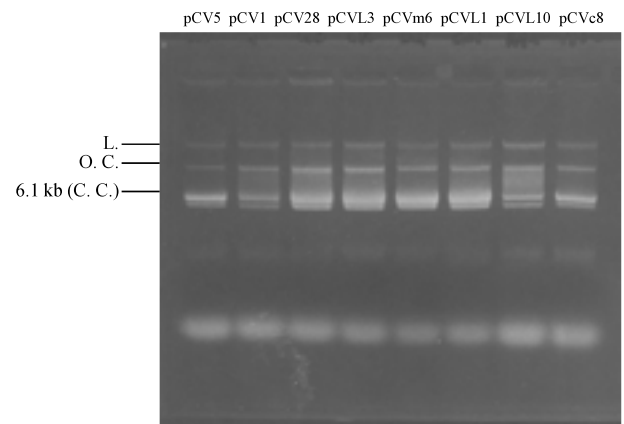


Fig. 13. Agarose gel electrophoresis of synthetic hybrid replicons (pCV(X)).
Plasmid free strain *L. lactis* IL1403 was used as a host.
C. C. indicates closed circular plasmid.
O. C. indicates open circular plasmid.
L. indicates linear plasmid.

スミド非保有菌の判定は、電気泳動でプラスミドパターンを親株と比較した。試験に供した pCV (X) 導入株全てでインサートの鋳型となった親プラスミドの除去株が得られた。pCV1 による pDR1-1 の除去、pCVc8 によるクエン酸資化性プラスミド pN7-Cit の除去は、次章に詳述した。また pCVm6 による機能未知プラスミド pAG6 の除去は第 3 章に詳述した。

L. lactis IL1403 を宿主に用いた場合、エリスロマイシン無添加培地では、pCV (X) の安定性は低かった (Table 5)。そこで、得られたプラスミド除去株を TYL で 5 回継代培養し、pCV (X) の除去を試みた。継代培養後 TYL 寒天培地に展開してコロニーを形成させ、レプリカ法でエリスロマイシン感受性菌を得た。また分離したエリスロマイシン感受性菌が、pCV (X) を含まないこ

Table 5. Transformation Efficiency and Stability of pCV(X) in IL1403

Tested plasmid	Transformation efficiency *	Em ^R colony at T = 0 **	Em ^R colony at T = 5 **	Em ^R colony at T = 10 **
pCV1	8.1 x 10 ⁵	100	5	0
pCV5	9.8 x 10 ⁵	100	13	2
pCV28	7.8 x 10 ⁵	100	0	0
pCVc8	1.2 x 10 ⁵	100	0	0
pCVL3	5.0 x 10 ⁵	100	6	2
pCVL1	3.2 x 10 ⁵	100	5	0
pCVL10	6.2 x 10 ⁵	100	12	0
pCVm6	8.3 x 10 ⁵	100	24	0

Em^R, resistance to erythromycin

T indicates transfer times in TYG

* number of transformants per microgram of pCV(X) DNA

** percentage of Em^R colonies in the population

とをアガロースゲル電気泳動および PCR で確認した。これらの結果は、pDB1 および PCR プライマーペア Pv3-Pv4 を利用した不和合性誘導プラスミド pCV (X) の構築と、pCV (X) を用いたプラスミドの選択的除去が、任意の *L. lactis* θ -プラスミドに適応が可能であることを示唆している。また、最終的に得られたプラスミド除去株は、組換え遺伝子を含まず、食品加工に利用が可能であると考えられた。

3. 考察

Lactococcus lactis subsp. *lactis* 527, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar diacetylactis DRC1, N7, および *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* NIAI712 のプラスミドから、*L. lactis* IL1403 で複製する 8 種類の合成レプリコン (pCV (X)) を得た。すなわち、プライマーセット Pv3-Pv4 によって、任意の *L. lactis* θ -プラスミドの不和合性決定配列を PCR で増幅でき、pDB1 にクローニングすることで、*L. lactis* での複製能を回復することを確認した。これら *in vitro* で作成した競合プラスミドを用いて、*L. lactis* DRC1, N7, および NIAI712 のプラスミドを選択的に除去することができ、考案した方法が、*lactis* および *cremoris* の両亜種で使用可能であることを確認した。

L. lactis DRC1 のプラスミドからは、3 種類の競合プラスミド (pCV1, pCV5 および pCV28) を得た。そのうち pCV28 に組込んだ VF28 は、藤田らがラクトース資化性プラスミドと同定したプラスミドより得たフラグメントである。*L. lactis* DRC1 への pCV5 の導入によって、pDR1-1B は除去されたが、派生株 DRC1 Δ pDR1-1B はスキムミルクで生育でき、電気泳動でも 50 kb のラクトース資化性プラスミドが確認された。Fig. 12 で示した通り、pCV5 の *ori* と、pCV28 の *ori* 配列の違いは、3 塩基であった。したがって、pCV5 は、3 塩基の違いを区別し、pDR1-1B 特異的に不和合性を誘導できることが示唆された。

pCVc8 に組込んだ VFc8 は、クエン酸資化性プラスミドと同定されている約 8.3 kb のプラスミドより得たフラグメントである⁹⁷⁾。pCVc8 の *ori* 配列は、pCVL10 と一致した。pCVL10 は、*L. lactis* subsp. *cremoris* NIAI712 のプラスミドに由来した。現在迄に、*cremoris* 亜種から CitP プラスミドが分離された報告はなく、実際 *L. lactis* NIAI712 はクエン酸を資化しなかった。このことは、*cremoris* 亜種には CitP 遺伝子は存在しないが、複製単位は組換えによって受継がれ、CitP とは別の機能をコー

ドする、もっと大型の (> 40 kb) プラスミドの複製単位として利用されていることを示唆する。

本研究で、供試菌株から除去できたプラスミドはいずれも 10-kb 以下の多コピープラスミドで、ラクトース資化やプロテイナーゼ活性に関与する 20-kb 以上の大型のプラスミドの除去には成功しなかった。ラクトース資化プラスミド等の大型のプラスミドは、概してコピー数が少ない⁸³⁾。考案したシステムでは、除去するプラスミドが多コピーで、細胞内に pCV (X) と親プラスミドが共存する状態が必要なかもしれない。また大型のプラスミドは、通常分子内に複製領域を 2 カ所以上コードしている⁸³⁾。その場合、*in vitro* で構築した競合プラスミドで、不和合性によるプラスミド除去を誘導できない可能性がある。しかしながら、大型でコピー数の少ないプラスミドは、変異剤等を用いる従来法で効率よく除去できるため^{23, 32)}、機能解析も進んでいる。一方 θ -複製型で、10-kb 以下の多コピープラスミドは複製が安定で、従来法による除去操作に抵抗し、機能の推定が難しかった。本研究で考案した方法は、従来法では難しいプラスミドを効率よく除去できることから、プラスミドの新機能の発見が期待できる。

考案したシステムでは、プラスミド除去に用いる競合プラスミドの複製が不安定であるため、最終的に育種されるプラスミド除去株は、細胞内に外来遺伝子を含まない。現在食品の加工に、組換え微生物の使用が許可されている国は無い。また医療現場では、水平伝搬によって複数の抗生物質耐性遺伝子を保有する多剤耐性菌の出現が問題視されている⁷²⁾。*L. lactis* においても、抗生物質の暴露によって、自然耐性菌の出現例が古くから報告されているが²⁷⁾、有害微生物への耐性遺伝子の水平伝搬が危惧されることから、食品加工には、耐性菌を用いるべきではない。従って本法は、食品加工に用いる *L. lactis* のプラスミド育種に適した方法である。第 2 章には本法を用いた乳加工用乳酸菌の育種例を記述した。

第 2 章 プラスミドの選択的除去操作を利用した乳発酵スターターの育種

緒 言

Lactococcus lactis が、菌の生育上不可欠なプラスミドの他に、機能の特定されていない、あるいは明らかに生育に不必要なプラスミドも多数保有していることは前述した。プラスミドを保有する様々な微生物において、プラスミドの保有と、細胞増殖速度の関係について多くの

研究がなされており、プラスミドの複製や、コードしている遺伝子産物の発現が宿主細胞の増殖速度を抑制する例が報告されている^{10, 24, 36)}。しかし *L. lactis* 野生株に内在する wild type プラスミドと、宿主増殖速度との関係は調べられていない。

本章、第1節ではまず、*L. lactis* DRC1 に内在し、宿主の増殖速度を抑制するプラスミドの発見と、その解析について述べた。次に第1章に記述した、プラスミドの選択的除去法を用いたスターターの育種例について述べた。スターターの増殖速度の改善は、発酵の効率化に直結する。そこで、親株 *L. lactis* DRC1 から増殖速度を抑制するプラスミドを選択的に除去し、増殖速度の早いプラスミド除去株の作出を試験した。

続いて第2節では、*Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetylactis* N7 からクエン酸透過酵素 (CitP) をコードする 8.3-kb プラスミドの選択的除去の試みについて述べた。*Lactococcus* のうち、ジアセチラクティスとして区別される菌群は、牛乳中に 0.1 ~ 0.2% 含まれるクエン酸を代謝し、芳香成分ジアセチルを生産する。ジアセチルはポップコーンなどの香り成分として好まれ、添加されたりもするが、発酵乳の香りとしては好まれない⁹⁴⁾。しかし、近年 *Lactococcus* 属乳酸菌、特にジアセチラクティスの機能性が着目され、機能性ヨーグルト開発をめざして試験されるようになってきており⁴⁶⁾、クエン酸透過性プラスミドを除去できれば、ジアセチラクティスを用いた機能性ヨーグルトの風味改善をはかることができると考えられる。ところがクエン酸透過性プラスミドは安定で、選択的な除去は困難であるとされている⁷⁰⁾。そこで本章では、第1章で開発した方法を用いてジアセチル生成能欠損株の育種を試み、作出したプラスミド除去株の乳発酵スターターとしての能力について考察した。

第1節 宿主の増殖速度を決定しているプラスミドの発見と増殖速度の速い菌株の育種

1. 材料および方法

菌株およびプラスミド

本研究で使用した微生物およびプラスミドは Table 6 にまとめた。DRC1121, および DRC1521 の作出手順は第1章、第1節に記述した。DRC121 は、DRC1021 に pGKV21 をエレクトロポレーションで導入して作出した。DRC11 は、DRC1121 を TYG 培地で高温条件(39°C)のもと連続して培養することで pGKV21 除去して派生させた。pDR1-1 のデリベーションプラスミド pBE1 は、

pDR1-1 の EcoRI – BglII フラグメント (3-kb) と、Em^R フラグメントを結合して作成し、DRC1021 を宿主として増幅した (Fig. 14)。

プラスミドの調製と形質転換

プラスミド DNA の調製、制限酵素分解、ブランチング、ライゲーション反応および形質転換は、第1章、第1節に記述した方法で行った。

増殖速度の測定

供試菌は、菌体培養液 0.1% を 10 ml の TYG 培地に植菌し、30°C で 2 回以上繰返して培養して活性化し、準備した。活性化後、一晚培養した定常状態の供試菌培養液 10 ml を、あらかじめ 30°C に加温した新鮮な TYG 培地に植菌し、30°C で静置培養した。試験には 11 mm 径のねじ口試験管を使用した。菌の増殖は、Bausch & Lomb Model 21 spectrophotometer (Bausch & Lomb, Rochester, NY) を使用し、620 nm の波長で培養液の濁度を 1 時間毎に測定した。生菌数は、100 ml の培養液を滅菌蒸留水で段階的に希釈して TYG 寒天プレートでカウントした。バッチ培養における対数増殖期の細胞倍加時間 (ジェネレーションタイム = T) は、経時的な生菌数の増加をグラフにプロットし、対数増殖期のグラフの傾きから求めた。また比増殖速度 (μ) は、以下のように算出した。すなわち、対数増殖期のジェネレーションタイムを T とした場合、 $\mu = \ln 2 / T$ 。

統計処理

増殖速度の測定は、すべての供試菌で 3 回繰返し

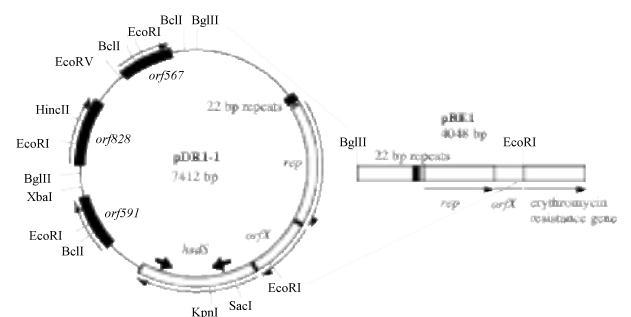


Fig. 14. Construction of recombinant plasmid pBE1. Thin arrows indicate ORFs. The 22 bp repeats refer to the putative replication origin (*ori*) preceding the replication genes (*rep*). Open boxes indicate the *rep-hsdS* operon-like structure (replication module). The rightward- and the leftward-pointing thick arrows indicate the relative positions of the PCR primers SES1 and SC15c, respectively.

Table 6. *L. lactis* Strains and Plasmids

Strains and Plasmids	Properties	References or sources
Strains		
<i>Lactococcus lactis ssp. lactis</i>		
DRC1	Wild type	Swartling (1951); Colling and Harrey (1962)
NIAI N7	Wild type	Lab. collection
13675	Wild type	Lab. collection
DRC1021	Plasmid-free derivative of DRC1	Fujita <i>et al.</i> , (1999)
DRC121	DRC1021 harboring pGKV21	This study
DRC1121	DRC1021 harboring pGKV21 and pDR1-1	This study
DRC1821	DRC1021 harboring pGKV21 and pDR1-1	This study
DRC1921	DRC1021 harboring pGKV21 and pDR1-1	This study
DRC1321	DRC1021 harboring pGKV21 and pDR1-1B	This study
DRC1521	DRC1021 harboring pGKV21 and pDR1-1B	This study
DRC1621	DRC1021 harboring pGKV21 and pDR1-1B	This study
DRC11	DRC1021 harboring pDR1-1	This study
DRC1 ² pDR1-1	DRC1 eliminating pDR1-1	This study
N7 ² CitP	N7 eliminating pN7-Cit	This study
Plasmids		
pGKV21	<i>E. coli</i> , <i>B. subtilis</i> , <i>L. lactis</i> shuttle vector, Em ^R , Cm ^R	van der Vossen <i>et al.</i> , (1985)
p8Em1	pUC118 containing pAM β 1 Em ^R gene	Ito <i>et al.</i> , (1992)
pDR1-1	7.4 kb θ -plasmid from <i>L. lactis</i> DRC1	This study (chapter 1)
pDR1-1B	7.3 kb θ -plasmid from <i>L. lactis</i> DRC1	This study (chapter 1)
pN7-Cit	7.8 kb θ -plasmid from <i>L. lactis</i> N7, Cit ⁺	This study (chapter 1)
pBE1	Em ^R gene from p8Em1 fused to 3.0 kb BglIII – EcoRI fragment of pDR1-1	This study
pCV1	competitor to pDR1-1	This study (chapter 1)
pCVc8	competitor to pN7-Cit	This study (chapter 1)

Em^R, resistance to erythromycin; Cit⁺ citrate utilization activity.

Lab. collection, National Institute of Livestock and Grassland Science collection

た。統計処理は、Student's *t*-test を用い、統計学的有意差は、危険率 5% 水準未満で判定した。

コロニー PCR によるスクリーニング

pDR1-1 がコードしている *hsdS* 遺伝子 (*hsdS*/pDR1-1) 保有株のスクリーニングはコロニー PCR で行った。供試菌は TYG 寒天プレートで培養してコロニーを形成させ、100 ml の滅菌蒸留水に 1 個のコロニーを釣菌し懸濁した。*hsdS*/pDR1-1 の内部配列を認識するプライマーペア SES1 - SC15c (SES1: 5' -GGTGGAA-CACCAAGTACATCGAACTCTG-3', SC15c: 5' -CTA-CACTGCCTTTAGAGATATTCAGTTG-3') と、テンプレートとしてコロニー懸濁液 2 ml を用い、反応液量 20 ml で PCR 反応を行った。増幅条件は、ヒートショック

94℃ で 2 分間保持、続いて 1) 変性、94℃ で 15 秒、2) アニーリング 53℃ で 30 秒、3) 伸長 68℃ で 1 分、1) ~ 3) の反応を 30 サイクル行い、最後に 68℃ で 7 分間保持した。フラグメントの増幅は、1% アガロース電気泳動で確認した。また増幅したフラグメントの DNA 配列を調べた。

2. 結果

野生株とプラスミドフリー菌株の増殖速度の比較

L. lactis DRC1 は、乳糖およびカゼイン資化性プラスミド (50 kb)、バクテリオシン生産性プラスミド (約 60 kb) など大型のプラスミドを含む少なくとも 5 種類のプラスミドを有している (第 1 章、第 1 節参照, Fig. 3)。 *L. lactis* DRC1 およびそのプラスミドフリー株

DRC1021の増殖を比較した。TYG培地で培養した場合、DRC1021は*L. lactis* DRC1よりも明らかに増殖が早かった (Fig. 15)。乳酸球菌の培養に汎用されるGM17培地 (1% グルコース添加 M17, Difco) を用いた測定でも同じ結果であった。

L. lactis DRC1 の増殖速度を抑制するプラスミドの同定

L. lactis DRC1 の増殖速度に影響する内在プラスミドの有無を調べるために、*L. lactis* DRC1 のトータルプラスミドをインジケータープラスミド pGKV21 と同時に DRC1021 に導入し、*L. lactis* DRC1 由来のプラスミドを1個以上保有する派生株を9株 (DRC1121 ~ DRC1921) 得た。得られた派生株の増殖を DRC1021 と比較したところ、増殖の遅い3株 DRC1121, DRC1821, DRC1921 を得た。アガロースゲル電気泳動で確認したところ、DRC1 の最も小さいプラスミドが導入されており、導入されたプラスミドを pDR1-1 と名付けた。しかし、アガロース電気泳動の結果、DRC1021

と増殖の変わらない派生株のうち5株が、pDR1-1と同じ大きさのプラスミドを保有することが示された。そこで、増殖の遅い DRC1121, DRC1821, DRC1921 と、増殖の早い DRC1321, DRC1521, DRC1621 からトータルプラスミドを抽出し、制限酵素の切断パターンを比較した。その結果、どちらのグループのプラスミドも HincII で切断されるが、増殖の遅いグループのプラスミドは SacI, KpnI で切断され、増殖の早いグループのプラスミドは BamHI で切断された。そこで、宿主の増殖に影響し、SacI で切断されるプラスミドを pDR1-1、宿主の増殖に影響せず、BamHI で切断されるプラスミドを pDR1-1B とした。pDR1-1 および pDR1-1B の構造は第1章、第1節の (Fig. 4) に、その DNA 配列から予想される6つの ORF の相同性を Table 2 に示した。pDR1-1 および pDR1-1B の複製領域は、プラスミドの複製に際してシスに働く *ori* 配列の下流に *repB*、続いてプロモーター配列を伴った *orfX* と *hsdS* が近接し、*L. lactis* に広く分布する θ -複製型プラスミドの典型的な構造を示した。*hsdS* 下流の ORF591, ORF578, ORF567 のアミノ酸配列は、100%一致した。そこで、pDR1-1 の最小複製単位と Em^R を結合して作出した組換えプラスミド pBE1 を DRC1021 に導入し、影響を調べた。pBE1 保有株 (DRC117) の増殖速度は DRC1021 と有意な差は無かった。Table 7 に本研究で作出した *L. lactis* DRC1 派生株の増殖速度をまとめた。*L. lactis* DRC1 および菌体内に pDR1-1 のみ保有する派生株 DRC11 の μ は互いに有意差がなく、pDR1-1 非保有株よりも有意に小さいことが示された。これらの結果から、*L. lactis* DRC1 の増殖速度は、共存するプラスミドの複製による総和的な抑制ではなく、実質的に1種類のプラスミド pDR1-1 の抑制によって決定されることが示唆された。

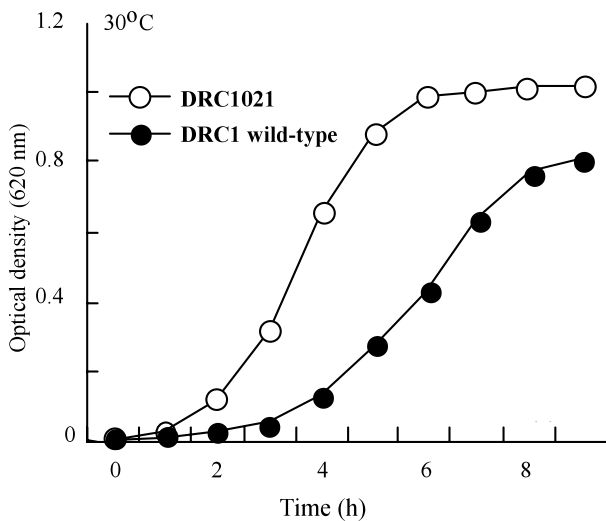


Fig. 15. Growth of DRC1 wild-type and a plasmid-free derivative. Cultures were incubated at 30 °C.

Table 7. Specific growth rate (μ) of DRC1 and variants

Strains	Presence of pDR1-1 ^{a)}	μ (h ⁻¹) ^{b)}	Generation (<i>T</i> , min)
<i>L. lactis</i> DRC1 (Wild type)	+	0.853 (\pm 0.044)	49
DRC11	+	0.833 (\pm 0.071)	50
DRC1021	-	1.14 (\pm 0.032) ^{c)}	36
DRC117	-	1.12 (\pm 0.077) ^{c)}	37
DRC1 ² pDR1-1	-	1.12 (\pm 0.013) ^{c)}	37

a), pDR1-1 was detected by PCR. +, PCR products were obtained with pDR1-1 specific primers; -, no PCR products were obtained.

b), Values are means of 3 trials (\pm S. D.)

c), Significantly different from the value of the DRC1 wild type strain ($P < 0.05$)

pDR1-1 類似プラスミドの *L. lactis* における分布

研究室で保存している *L. lactis* 24 株をコロニー PCR で試験したところ、*L. lactis* DRC1 および *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetyllactis* 13675 に由来する増幅フラグメントが得られた。得られたフラグメントはいずれも 972 bp で、DNA 配列は 100% 一致した。また増幅フラグメントの内部配列からプライマーを合成し、プライマー walking で *hsdS* の全配列を決定したところ、*L. lactis* 13675 は *hsdS*/pDR1-1 と一致する遺伝子を有することが明らかとなった。サザン解析の結果、*hsdS*/pDR1-1 は、*L. lactis* 13675 においても pDR1-1 とほぼ同じ大きさのプラスミドにコードされていた (Fig. 16)。

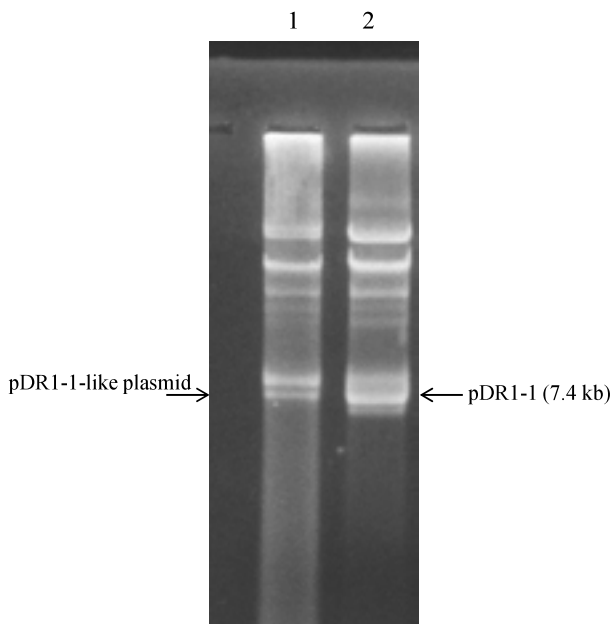


Fig. 16. Plasmid profile of *L. lactis* DRC1 and *L. lactis* 13675.
1, *L. lactis* 13675 wild type strain
2, *L. lactis* DRC1 wild type strain

pDR1-1 を保有する乳酸菌株と保有しない乳酸菌株の増殖比較

pDR1-1 を保有する乳酸菌株 (*L. lactis* DRC1 と *L. lactis* 13675) と保有しない乳酸菌株 *L. lactis* N7 と *L. lactis* DRC1021) の増殖を比較した。1 時間ごとの吸光値をグラフにプロットしたところ、pDR1-1 を内在している *L. lactis* DRC1 と *L. lactis* 13675 の増殖カーブは一致し、pDR1-1 を内在していない *L. lactis* N7 の増殖カーブは DRC1021 と一致した (Fig. 17)。また対数増殖期の μ も、pDR1-1 保有株と非保有株では有意に異なっていた (Table 8)。

増殖速度の速い菌株の育種

第 1 章、第 3 節で作出した不和合性誘導プラスミド pCV1 のインサートは、pDR1-1 の複製単位を鋳型に増幅した。*L. lactis* DRC1 に pCV1 を導入し、pCV1 の不和合性プラスミド pDR1-1 を除去したプラスミド除去株 DRC1 Δ pDR1-1 を作出した (Fig. 18)。DRC1 Δ pDR1-1 は、親株 *L. lactis* DRC1 よりも対数増殖期の増殖速度が

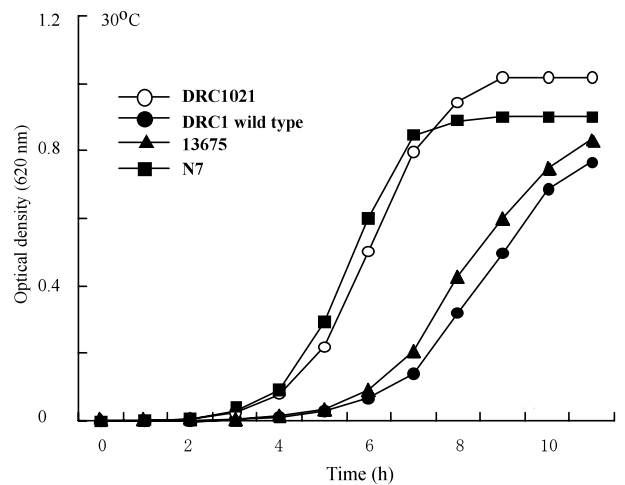


Fig. 17. Comparison of growth of *L. lactis* strains with or without pDR1-1.
Cultures were incubated at 30 °C.

Table 8. Specific growth rate (μ) of *Lactococcus lactis* strains

Strains	Presence of pDR1-1 ^{a)}	μ (h^{-1}) ^{b)}	Generation (<i>T</i> , min)
<i>L. lactis</i> DRC1	+	0.853 (\pm 0.044)	49
DRC1021	-	1.14 (\pm 0.032) ^{c)}	36
<i>L. lactis</i> 13675	+	0.933 (\pm 0.054)	44
<i>L. lactis</i> N7	-	1.22 (\pm 0.029) ^{c)}	34

a), pDR1-1 like plasmid was detected by PCR. +, PCR products were obtained with pDR1-1 specific primers; -, no PCR products were obtained.

b), values are means of 3 trials (\pm S. D.)

c), significantly different from the value of the DRC1 wild type strain ($P < 0.05$)

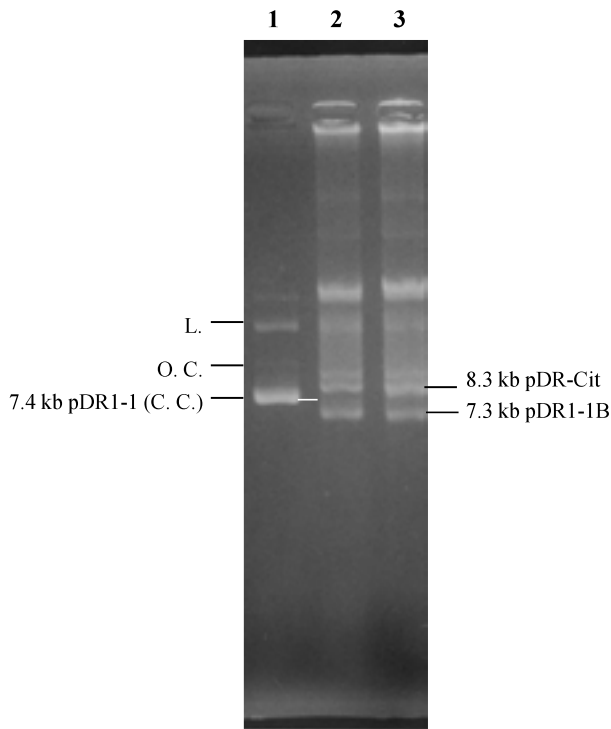


Fig. 18. Plasmid profile of *L. lactis* DRC1 and variants.
 1, DRC11 (*L. lactis* DRC1021 containing pDR1-1)
 2, *L. lactis* DRC1 wild type
 3, DRC1ΔpDR1-1 (DRC1 eliminating pDR1-1)
 pDR-Cit indicates CitP-plasmid.
 C. C. indicates closed circular plasmid.
 O. C. indicates open circular plasmid.
 L. indicates linear plasmid.

25%以上早かった (Table 7)。さらに pDR1-1 の除去に用いた pCV1 は Em 無添加培地で培養すると宿主から用意に除去された (第 1 章, 第 3 節)。したがって DRC1 Δ pDR1-1 は, 菌体内に外来遺伝子を含まず, 乳発酵スターターとして用いることができる。

3. 考察

核外遺伝子を保有する様々な微生物で, プラスミドの保有に起因する宿主増殖速度の低下が報告されている。プラスミドの複製や, コードしている遺伝子産物の生産, 蓄積が, 宿主の代謝や細胞成分の生合成の負担になり, 増殖速度の低下や総菌数の減少をもたらすと説明されている^{10, 24, 36)}。*L. lactis* は, 細胞内に多くのプラスミドを保有する代表的な菌種である^{52, 80, 81)}。これまで *L. lactis* で用いられる代表的なプラスミドベクターと宿主増殖速度についての報告はあるものの⁵⁷⁾, 内在する wild type- プラスミドと宿主増殖速度の関係は調べられていなかった。以前藤田らは, *L. lactis* DRC1 のプラスミドフリー株 *L. lactis* DRC 1021 を育種した。DRC 1021

と親株 *L. lactis* DRC1 の増殖速度を比較したところ, DRC 1021 の方が, 対数増殖期の増殖速度が約 25% 早いことを見出した。そこで *L. lactis* DRC1 のプラスミドを *L. lactis* DRC1021 にランダムに導入し, 増殖の遅いプラスミド変異株を分離した。分離した菌株の増殖速度は, *L. lactis* DRC1 と有意差が無く, 全ての変異株が 7.4 kb のプラスミド pDR1-1 を保有していた。第 1 章で記述した通り, *L. lactis* DRC1 は, pDR1-1 の他に, 60 kb, 50 kb, 8.3 kb, 7.3 kb の少なくとも 5 種類の wild type- プラスミドを保有している。それゆえ, *L. lactis* DRC1 の増殖速度は, 共存するプラスミドの複製による総和的な抑制ではなく, 実質的に 1 種類のプラスミド pDR1-1 の抑制によって決定されていると結論した。抑制の原因としては, デリションプラスミド pBE1 には増殖速度抑制効果がないこと, pDR1-1 とは複製モジュールの構造のみが異なる pDR1-1B には抑制効果がないことから, pDR1-1 の複製モジュールの *hsdS* の遺伝子産物が, 宿主の増殖に何らかの影響を与えるのではないかと予想している。HsdS は制限/修飾システムのサブユニットであり, DNA メチル化配列を決定する機能を持つ⁶¹⁾。DNA のメチル化は, 様々な遺伝子の発現に関与することが報告されていることから, 著者は *L. lactis* DRC1 と DRC1 Δ pDR1-1 のメチル化状態の比較解析や, 代謝性遺伝子の発現比較に興味を持っている。しかしその解析は今後の課題である。

pDR1-1 がコードする *hsdS* (*hsdS*/pDR1-1) の可変領域を認識するプライマーペアを用いて, 研究室保存株の中から *hsdS*/pDR1-1 を保有する菌株をスクリーニングした。その結果, *L. lactis* subsp. *lactis* biovar diacetylactis 13675 が, 全く同じ配列の複製モジュールを含むプラスミド保有していた。*L. lactis*13675 の増殖速度は, *L. lactis* DRC1 と有意差が無く, また *hsdS*/pDR1-1 を保有しない *L. lactis* subsp. *lactis* biovar diacetylactis N7 の増殖速度は DRC 1021 と有意差がなかった。従って pDR1-1 類似プラスミドは他の *L. lactis* にも分布し, *L. lactis* DRC1 と同様な機作で宿主増殖を抑制すると予想した。

第 1 章で詳述した方法で *L. lactis* DRC1 から選択的に pDR1-1 を除去することができた。作出したプラスミド除去株 *L. lactis* DRC1 Δ pDR1-1 は野生株よりも約 25% 増殖速度が速かった。発酵産業において, スターター微生物の増殖速度は生産効率に直結する。この結果は, wild type- プラスミドの選択的除去による発酵製造の効率化の可能性を示唆する。

第2節 ジアセチル臭を生じさせない菌株の育種

1. 材料および方法

菌株およびプラスミド

Lactococcus lactis subsp. *lactis* biovar diacetylactis N7 は、研究室保存株である。

pCVc8 の作成法および性質は第1章、第3節に記述した。

形質転換と不和合性プラスミドの除去

エレクトロポレーションによる pCVc8 の *L. lactis* N7 への導入と、内在プラスミドの選択的除去操作は、第1章、第3節に記述した。

乳酸生成能の検定

供試菌株は、前日から一晩 TYG で培養し用いた。500 μ l の培養液を 16,000 g、10 分間遠心分離して菌を回収し、滅菌蒸留水で 2 回洗浄して等量の滅菌蒸留水に再懸濁し、全量を 50 ml のスキムミルク培地に植菌した。植菌後 0, 6, 12, 24 時間後の pH を測定した。

プロティナーゼ活性の検定

ミルク培地で培養した乳酸菌のプロティナーゼ活性は、*o*-フタルジアルデヒド (*o*-phthalaldehyde) 法 (OPA 法) で検定した。試験に用いた OPA 溶液 (50 mM クエン酸三ナトリウム, 1% SDS, 6 mM OPA, 0.2% β -メルカプトエタノール) は、使用直前に調製した。試験菌は 10% スキムミルク培地に 1% 接種し、30°C で 24 時間培養した。50 μ l のミルク培養液を 1 ml の OPA 溶液に加えて混合し、室温で 2 分間インキュベートした後、BECKMAN DU 640 Spectrophotometer (BECKMAN, CA, USA) を用いて 340 nm の吸光値を測定した。

クレアチンテスト

スキムミルク培地で培養した乳酸菌のジアセチル生成能は、クレアチンテストで確認した。供試菌を 10% スキムミルク 5 ml で一晩培養後、1 ml の 0.5% クレアチンと、試験直前に調製した 1 ml の 2.5 M 水酸化ナトリウム、5% *a*-ナフトールを添加して混合し、室温で 1 時間放置し、赤色化の有無を観察した。

2. 結果

プラスミド除去株の取得

pCVc8 のインサートは、*L. l. lactis* biovar diacetylactis

N7 に内在するプラスミドの複製単位を鋳型に増幅した。pCVc8 のインサートの DNA 配列は、既知のクエン酸資化性プラスミドの複製単位の配列と高い相同性があった⁷⁰⁾。*L. lactis* N7 に pCVc8 を導入して内在する不和合性プラスミドを除去し、プラスミド除去株 *L. lactis* N7 Δ pCit を育種した (Fig. 19)。

プラスミド除去株の乳発酵能の解析

L. lactis N7 とプラスミド除去株 *L. lactis* N7 Δ pCit を接種したスキムミルク培地の pH 変化と、スキムミルクの凝固時間を比較した。*L. lactis* N7 Δ pCit 接種区のスキムミルクの pH 低下は、*L. lactis* N7 接種区よりも早く、短い時間でスキムミルクを凝固させた (Table 9)。この結果は、プラスミド除去株の乳発酵能は、pCVc8 によるプラスミド除去操作で低下せず、むしろ野生株よりも乳発酵完了までの時間が短縮されたことを示唆している。また OPA 法で N7, N7 Δ pCit およびプロティナーゼ活性の無いプラスミドフリー株のプロティナーゼ活性を比較した。 Δ OD340 nm の測定値は各々 0.084, 0.091, 0.002 であり、プラスミド除去株には野生株と同等のプロティナーゼ活性があった。

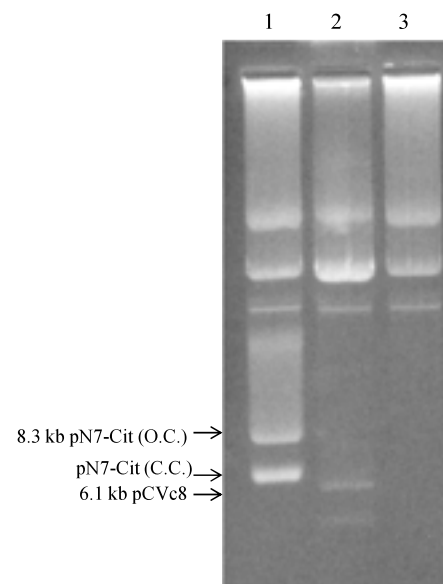


Fig. 19. Plasmid profile of *L. lactis* N7 and variants.

1, *L. lactis* N7 wild type strain

2, *L. lactis* N7 containing pCVc8 and eliminating pN7-Cit
3, N7 Δ pCit variant (*L. lactis* N7 eliminating pN7-Cit and pCVc8)

C.C. indicates closed circular plasmid

O.C. indicates open circular plasmid

pCVc8 indicates competitor to pN7-Cit

Table 9. Comparison of milk fermentation ability of *L. lactis* N7 with N7²pCit

Strain	Lactose utilization	Proteinase activity	Diacetyl production	6h-pH ^{a)}	12h-pH ^{b)}	Coagulation time ^{c)}
<i>L. lactis</i> N7	+	+	+	5.8	4.7	12
N7ΔCitP	+	+	-	5.4	4.5	10

a), culture pH of *L. lactis* N7 and N7²pCit -N7 in sterile 10% (w/v) reconstituted skim milk from a 1% inoculum after 6 h of growth at 30°C (initial pH of 10% reconstituted skim milk was 6.6).

b), culture pH of *L. lactis* N7 and N7²pCit -N7 after 12 h of growth at 30°C

c), coagulation time (hour) of skim milk from a 1% inoculum

a), b), and c), values are means of 3 trials.

プラスミド変異株のジアセチル生成能の解析

クレアチンテストの結果、プラスミド除去株 N7 Δ pCit は、クエン酸代謝によって生じるジアセチルの生成能を失っていた (Table 9)。したがって除去された約 8 kb のプラスミドは、クエン酸資化性プラスミドであることが確認された。*L. lactis* N7 Δ pCit も第 2 章、第 1 節に記述した DRC1 Δ pDRI-1 と同様に、菌体内に外来遺伝子を含まず、乳発酵スターターとして用いることができる。

3. 考察

Lactococcus lactis subsp. *lactis* の中には、牛乳中のクエン酸を代謝し、ジアセチルやアセトインを生産する菌株があり、*Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetyllactis* として区別されている¹⁵⁾。*diacetyllactis* は、pH5.0 - 6.0 に至適 pH をもつプロトン共輸送系のクエン酸パーミアーゼ (citrate permease: CitP) の働きで、培地中のクエン酸を菌体細胞内に取込み、クエン酸リアーゼによってオキサロ酢酸と酢酸に分解する。オキサロ酢酸はオキサロ酢酸デカルボキシラーゼによってピルビン酸に転換され、いくつかの中間体を経て芳香成分であるジアセチルを生成する。*L. lactis* のクエン酸代謝経路のうち、CitP は、通常プラスミドにコードされているが、その他の遺伝子はクロモソーム支配である^{43, 44)}。またクエン酸リアーゼはクエン酸誘導酵素であることから、CitP- プラスミドを持たない菌株では、クエン酸リアーゼ活性がかなり低くなる。したがって、*L. lactis* のジアセチル生成能は、実質 CitP- プラスミドの内在によって決定される。

L. l. lactis biovar *diacetyllactis* N7 は、乳製品から分離された研究室保有株で、3 種類のプラスミドを保有している。サザン解析の結果から、そのうち 8.3-kb のプラスミドが CitP- プラスミドと推定された (未発表)。

L. lactis N7 は、胆汁酸耐性、pH 耐性共に高く、マウスの試験では生きたまま腸に到達することが確認されており、プロバイオティクスとしての利用が期待されている (木元ら特許: 特許第 3777296 号)。また増殖期の菌体は、培地中のコレステロールを除去する能力が高い、抗酸化能力が高いなど、生体調節機能を付加した発酵食品、例えば機能性ヨーグルトなどの種菌としての利用が期待されている⁴⁶⁾。

ジアセチルは非常に強い臭いを有する化合物であり、微量でも発酵飲食品の香味品質に大きな影響を与える。同時に抗菌性も有し、200 μg/ml でイーストやグラム陽性菌の、300 μg/ml でグラム陰性菌の増殖を阻止する。乳酸菌自体は 350 μg/ml でも抑制されない。発酵乳製品では、ジアセチル臭を品質特徴とするものが多い。特にカッテージチーズやクリームチーズなどの非熟成チーズ、発酵バター、サワークリームなどでは好まれる香りであり、その製造には種菌としてジアセチル生成能の高い *L. l. lactis* biovar *diacetyllactis* や *Leuconostoc cremoris* などが用いられる。しかしこのジアセチル臭は、アセトアルデヒドの爽やかな香りが好まれる発酵乳や乳酸菌飲料では、むしろ感じられない方が好ましい。特に我が国の場合、欧米に比べ、ジアセチルに対する馴染みのなさが指摘されている⁹⁴⁾。

L. lactis N7 の 8.3-kb プラスミドに対する不和合性プラスミド pCVc8 を構築し、*L. lactis* N7 に導入することによって、本プラスミドを選択的に除去し、*L. lactis* N7 Δ CitP を育種した。クレアチンテストの結果、*L. lactis* N7 Δ CitP はジアセチルを生成しないことが確かめられた。親株あるいは *L. lactis* N7 Δ CitP をスターターに用いて 6 時間および 12 時間発酵させた発酵乳中の乳酸菌数に有意差は無く、乳中での両菌株の増殖能は変わらなかった (未発表)。しかし *L. lactis* N7 Δ CitP を用いた場合には、親株よりも発酵乳の pH 低下が早く、乳凝固時間が

有意に短縮し、発酵乳の最終 pH も低かった。また *L. lactis* N7 Δ CitP を用いた発酵乳は、親株を種菌としたものよりもカードが固く、酸味が際立ち、ヨーグルト臭が強く感じられた。クエン酸透過性プラスミド除去株は、牛乳中に約 0.1 – 0.2% 含まれるクエン酸を全く代謝しない。そのため *L. lactis* N7 Δ CitP を用いた発酵乳では味やフレーバーに違いが感じられたのかもしれない。

L. lactis の CitP- プラスミドは、変異剤などで処理しても容易に欠損株を得られないことが知られている。本研究で考案したプラスミドの選択的除去は、CitP- プラスミドの除去を容易にした。本法により乳発酵能を損なうこと無く種菌の発酵特性を変更でき、製品の風味改良に繋がる。

第3章 プラスミドの選択的除去で見出された新しいプラスミド性因子の解析

– 宿主遺伝子の安定化に働くプラスミドの発見 –

緒 言

遊離アミノ酸量が少ない牛乳中で、*Lactococcus lactis* が生育するためには、細胞壁結合型プロティナーゼ (PrtP および PrtM) と幾つかのペプチダーゼが働いて、カゼインを *L. lactis* が必要とするアミノ酸や分子量の小さなペプチドにまで分解することは極めて重要である。さらに細胞膜に位置し、カゼイン分解ペプチドの取込みに働くオリゴペプチドトランスポーター (Opp) が、fast-coagulation-phenotype (短時間に乳を凝固する表現形質) には必要不可欠であることが示されている^{20, 93)}。Opp システムは初め、*Lactococcus lactis* subsp. *lactis* SSL135 のクロモゾームに由来する約 8.9 kb フラグメントとしてクローニングされ、ミルク培地における *L. lactis* の速やかな生育に必要な遺伝子群として同定された⁹⁰⁾。またその後の遺伝子解析によって、8.9 kb フラグメントは、*oppA*, *B*, *C*, *D*, *F* およびペプチダーゼ (*pepO*) を含む遺伝子クラスターをコードしていることが明らかとなった⁸⁹⁾。通常 *prt* や *opp*、さらに乳糖分解に働く *lac* など発酵に重要な形質は、insertion sequence (IS) に隣接し、時には複合トランスポゾン形成し、乳酸菌のゲノム内を転移することが知られている⁷⁴⁾。

Lactococcus lactis subsp. *cremoris* NCDO712 とその派生株は、*L. lactis* のプロトタイプとして、世界中で最も研究されてきた菌株である^{32, 92)}。*L. lactis* NCDO712 は、pLP712, pSH74, pSH73, pSH72, および pSH71 の 5 種類のプラスミドを内在している³²⁾。そのうち pSH71 と

pLP712 については詳しく研究されている。すなわち pSH71 はローリングサークル複製型プラスミドで、*L. lactis*, *E. coli*, および *Bacillus subtilis* で複製することから、その複製領域の DNA 配列が、*L. lactis* で汎用するクローニングベクターの構築に利用されている^{22, 56)}。一方 *L. lactis* NCDO712 に内在する最も分子量の大きい 55 kb のプラスミド pLP712 は、 θ -複製型プラスミドであり、*lac*-遺伝子クラスター、*prtP* および *prtM*、さらに *opp-pepO* 遺伝子クラスターをコードしている⁵⁹⁾。Le Bourgeois らは、*L. lactis* NCDO712 とその派生株のクロモゾームを NotI, ApaI, および SmaI で消化し、パルスフィールド電気泳動を用いて制限酵素分解多型を調べている。その結果、*opp-pepO* クラスターの遺伝子座は、ごく近縁の菌株間でも一致せず、*opp-pepO* クラスターが隣接する IS エlement と共に複合型トランスポゾン形成し、短い期間に転移を繰り返していることを示唆した⁵³⁾。*L. lactis* NCDO712 においては、*opp-pepO* クラスターは前述の通り pLP712 にコードされていたが、クロモゾームにも ISS1 と IS982 に挟まれ 1 コピー存在した⁵³⁾。隣接する IS と共に *opp-pepO* がゲノム内を転移する状況証拠は多く得られているものの、転移を誘起する特異的な信号や、細胞の状態は特定されていない。

我々の研究室で継代し保存している *L. lactis* subsp. *cremoris* NIAI712 も *L. lactis* NCDO712 の派生株である。しかし 55 kb プラスミド (*L. lactis* NCDO712 では pLP712) の制限酵素分解パターンが、親株の pLP712 とは異なるなど、研究所での継代期間中に、既にプラスミドの組み換えが起こったことが示唆されている (Fig. 20)。*L. lactis* NIAI712 は、親株である *L. lactis* NCDO712 と同様に、5 種類のプラスミドを有している (Fig. 20)。そのうち約 9 kb のプラスミド pAG6 はコピー数も多く、非常に安定である。*L. lactis* NCDO712 においても同じ分子量のプラスミド pSH73 は、特異的な除去株が得られおらず、その機能は調べられていない³²⁾。本章では、第 1 章に記述した方法を用いて、pAG6 を選択的に除去し、その機能解析を行った。*in vitro* で作出した競合プラスミドによって pAG6 を選択的に除去すると、高頻度で発酵遅延株が出現した。この結果は、pAG6 除去株では、乳発酵能を損なうような遺伝子変異が高頻度で起こっていることを示唆している。本章では pAG6 の選択的除去を端緒として見出されたプラスミドの新しい機能とその解析結果について記述した。

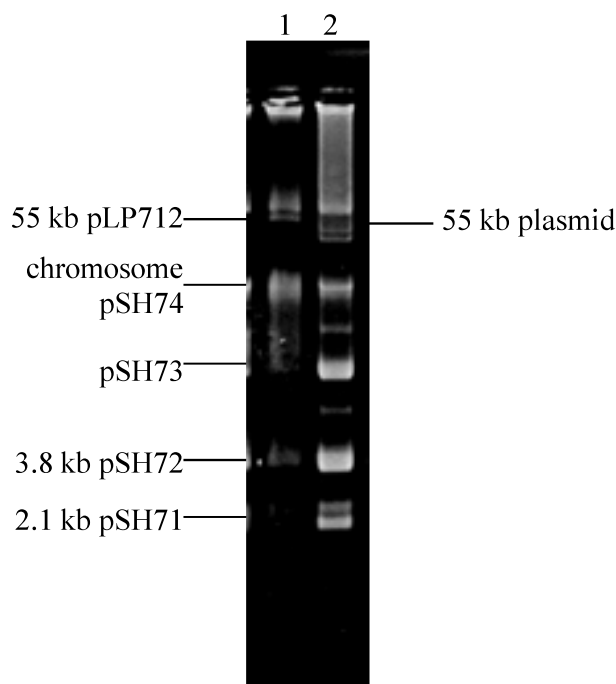


Fig. 20. Plasmid profile of *L. lactis* NIAI712 and parent strain *L. lactis* NCDO712.
 1, Total plasmid of *L. lactis* subsp. *cremoris* NCDO712
 2, Total plasmid of *L. lactis* subsp. *cremoris* NIAI712
 The accurate sizes and properties of pSH73 and pSH74 have not been studied.

第1節 プラスミドの選択的除去による発酵不良の原因解明

1. 材料および方法

菌株およびプラスミド

本研究で使用した微生物およびプラスミドは Table 10 にまとめた。*Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* NIAI712 は、定期的に復帰培養し、20年以上保存している当研究室の研究室保存株であるが、最初の由来は *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* NCDO712 の派生株である³²⁾。

培地と培養条件

E. coli および *L. lactis* の培養は、第1章、第2節に記述した方法で行った。Em^Rをコードしたプラスミドを保有する *L. lactis* は、TYGに2 μg/mlのエリスロマイシンを添加したTYG-Eで培養した。

プラスミドの調製、組換えプラスミドの作成および形質転換

E. coli プラスミド DNA および *L. lactis* プラスミド DNA の抽出と精製、さらにプラスミド DNA の制限分

解、ブランチング、ライゲーション反応および形質転換は、第1章、第1節に記述した方法で行った。pAG6 に対する不和合性誘導プラスミド pCVm6 の作出法、性質、および pCVm6 を用いたプラスミドの除去法は第1章、第3節に記述した。

アガロースゲル電気泳動

プラスミドおよび DNA フラグメントのアガロースゲル電気泳動は、第1章に記述した方法で行った。

DNA 配列解析

供試したプラスミド pAG6 は、*L. lactis* NIAI712 トータルプラスミドのアガロース電気泳動ゲルから精製し、実験に供した。プラスミドの全配列を解析するために、約 9-kb の pAG6 を Hind III で 4-kb と 5-kb のフラグメントに切断し、pBluescript II にクローニングした。作出したプラスミド pBAG61, pBAG62 から、デリーションクローンを作成し、シーケンズのテンプレートとして用いた。BigDye Kilo Terminator v3.1 cycle sequencing kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) を用いてシーケンズ反応し、Applied Biosystems 3730 automated DNA sequencer (Applied Biosystems) を用いて配列データを得た。配列データは GenetixMac ver. 11 (Genetyx, Tokyo, Japan) を用いて解析した。ORF 解析および相同性解析には、DNA Data Bank of Japan (DDBJ) database の BLAST または FASTA 解析を用いた。全配列を DDBJ データバンクに登録した (アクセッションナンバー: AB198096)

増殖測定

第2章、第1節の方法に従って行った。

乳酸生成能の検定

第2章、第2節の方法に従って行った。

乳発酵能の検定

乳発酵能は、接種した試験菌の乳酸生成によるカード形成を指標に評価した。すなわち TYG で前培養した供試菌 5 μl を 10% スキムミルク 5 ml (11 mm 試験管) に接種し、30℃ で 12 時間静置培養した。培養後試験管を転倒し、発酵乳の凝固状態を調べた。発酵乳のカードが壊れなければ凝固と判定した。また試験培養中の発酵乳を 1 時間毎に静かに転倒し、供試菌接種から凝固までの時間を測定して乳凝固時間とした。

Table 10. *Lactococcus lactis* strains and plasmids

Strain or Plasmid	Properties	Reference or source
<i>Lactococcus lactis</i>		
NIAI712	Wild type	Lab. Collection
MG1363	Plasmid-free derivative of NCDO712	Gasson <i>et al.</i> , (1983)
Δ pAG6 variant		
712d35	pAG6-cured derivative of NIAI712	This study
712d51	pAG6-cured derivative of NIAI712	This study
712d61	pAG6-cured derivative of NIAI712	This study
712dR variant		
712dR1	derivative of NIAI712 harboring pAG6dR	This study
712dR2	derivative of NIAI712 harboring pAG6dR	This study
712dR3	derivative of NIAI712 harboring pAG6dR	This study
Plasmids		
pAG6	8.7-kb θ -plasmid from <i>L. lactis</i> NIAI712	This study
pAG3	50-kb θ -plasmid from <i>L. lactis</i> NIAI712	This study
pLac-Prt	55-kb θ -plasmid from <i>L. lactis</i> NIAI712 carrying Lac-operon and PrtP/M	This study
pDR1-1B	7.3-kb θ -plasmid from <i>L. lactis</i> DRC1	Kobayashi <i>et al.</i> (2007)
pDB1	shuttle vector for <i>E. coli</i> and <i>L. lactis</i> . Partial replicon of pDR1-1B with an EmR gene cloned into pBluescriptII, ApR, EmR	Kobayashi <i>et al.</i> (2007)
pCVm6	Competitor to pAG6. An incompatibility determinant of pAG6 cloned into pDB1, EmR (strongly incompatible with pAG6 and unstable)	Kobayashi <i>et al.</i> (2007)
pAG6dR	A competitor to pAG6. A truncated- <i>rep</i> and <i>ori</i> of pAG6 with an EmR gene cloned into pBluescriptII, ApR, EmR (weakly incompatible with pAG6)	This study
p8Em1	pUC118 containing pAM β 1 EmR gene	Ito and Sasaki (1994)

EmR, resistance to erythromycin; ApR, resistance to ampicillin

RNA の調製

供試菌株は、前日から一晩 TYG で培養し用いた。40 μ l の培養液を 40 ml TYG リシス培地に接種して、30°C で OD = 0.25 ~ 0.3 まで静置培養し、菌を 1,800 g で 10 分間遠心分離して集菌した。菌は滅菌蒸留水で 2 回洗浄し、100 μ l のリゾチーム (3 mg/ml) 添加 TE バッファー (pH 8.0) に懸濁して 37°C で 15 分間インキュベートした。細胞壁を消化した後、RNeasy Mini Kit (Qiagen) を用い、付属の使用説明書にしたがってトータル RNA を精製した。RNA の濃度と精製度は、DU 640 spectrophotometer (BECKMAN) を用いて 260 nm と 280 nm の吸光度を測定して確認した。

マイクロアレイ解析

マイクロアレイ解析に用いるジーンチップの設計、ハイブリダイゼーション、RAM (Robust Multi-chip Analy-

sis) アルゴリズムによるデータ補正、解析、および統計処理はジーンフロンティア社に依頼した (GeneFrontier Corporation, Tokyo, Japan)。 *L. lactis* strain は通常、約 2-Mb のクロモソームと複数のプラスミドを有する。また乳発酵に重要な遺伝子は、プラスミドにコードされている。そこで GenBank (DDBJ) に登録されている、プラスミドフリー株 *L. lactis* IL1403 の全遺伝子配列および *L. lactis* 由来のプラスミド配列 (J05748, AF247159, X99798, AF409136, AF242367, AF036485, AF243383, AF207855, J04962, AE005176) をもとにアレイを設計した。マイクロアレイのスペックは Table 11 にまとめた。アレイには 2,533 遺伝子を搭載したが、これはアレイ設計に用いた *L. lactis* IL1403 およびプラスミドの DNA 配列から推定される ORF の合計なので、機能の同じ遺伝子を重複する場合もある。マイクロアレイの詳細なスペックは、NCBI Gene Expression Omnibus (GEO)

Table 11. Microarray specification

Strain	<i>Lactococcus lactis</i>
Data source	DDBJ accession No (J05748, AF247159, X99798, AF409136, AF242367, AF036485, AF243383, AF207855, J04962, and AE005176)
Number of genes	2,533
Number of probes	44 perfect match probes × 2,533 (111,452)
Probe size	24 mer

に登録した。アクセッションナンバーは、GPL6536 である。マイクロアレイ解析結果は同じく GEO に登録した。*L. lactis* NIAI712 の結果はアクセッションナンバー GSM269644, 712d35 の結果は GSM269645 である。

コロニー PCR による保有遺伝子の確認

遺伝子の確認に用いた PCR プライマーは Table 12 にまとめた。操作は第 2 章, 第 1 節に記述した方法で行った。

パルスフィールド電気泳動 (PFGE ; Pulsed-Field Gel Electrophoresis)

パルスフィールドゲル電気泳動を用いた染色体電気泳動は、Kojic らの方法を参考に行った。供試菌は OD = 0.6 まで TYG リシス培地で培養し、遠心分離で集菌した。EET バッファー (100 mM EDTA, 10 mM EGTA, 10 mM Tris-HCl, pH 8.0) で 2 回洗浄し、10⁹ cell/ml になるように、TEE に再懸濁した。溶解した 2% Certified™ Low Melt Agarose (Bio-Rad Laboratories) と懸濁した菌とを 1 : 1 に混合し、100 μl のキャストリングモールドに入れ、4℃, 10 分間冷却して固めた。細胞壁を分解するために、4 個のプラグを N-lauroyl sarcosine (0.05% w/v) と lysozyme (1 mg/ml) を含んだ TEE バッファー 1 ml に入れ、37℃で 4 時間インキュベートした。次にアガロースプラグをプロテイナーゼ K バッファーに移し、55℃で一晩インキュベートした。プロテイナーゼ K 処理後、プラグは 20 ml の TE バッファー (10 mM Tris-HCl 1mM EDTA pH 8.0) で 2 時間ずつ 2 回洗浄した。

Table 12. Oligonucleotide primers and probes used in this study

Primer	Gene target	Fragment size (bp)	Sequence
CdAF	<i>cadA</i>		TTGCCAGGAGTTACGAGTGCACACAGT
CdAR	<i>cadA</i>	1200	TGGTTGCAATGAAATCCGTTACGACA
HsF1	<i>hsdS</i> in pAG6		GGGGTTATTATCTAATTATAGACC
HsR1	<i>hsdS</i> in pAG6	690	TCGGTTCATTCTTTAAACAGCTGG
HsF2	<i>hsdS</i> -homolog		AAAATGTTCCCTAAAAATGGT
HsR2	<i>hsdS</i> -homolog	552	AAACATCTTTTGTA AAAAGCC
LGF1	<i>lacG</i>		GAATGCCACAAGCGTCATGTTGAACC
LGR1	<i>lacG</i>	1000	TGACCATGAGAAAACGTCCATAAGTG
763prF	<i>priP</i>		ACATGTCCTTAGGATCTGATTACAG
763prR	<i>priP</i>	950	TTGATGGCTGGGCAGTATTCATC
OpAF	<i>oppA</i>		ACTCCTAAGTGCTTGTGGTTCTAA
OpAR	<i>oppA</i>	1700	TCAAGCGTCATTCCAACACTACAG
OpDF	<i>oppD</i>		CACTCACTGCGCTTAATCCATTGATG
OpFR	<i>oppF</i>	790	TCTGTCACTCGATTAAGAAACCA
OpCF	<i>oppC</i>		TCTAGTTGCTGTCTTTCTAATCGT
OpCR	<i>oppC</i>	770	GCCACTCGTCTTAGTGCATTCCG
S1F	<i>tmpS1</i>		GCGCCCTCTATTGGTTCTGCATTTAG
S1R	<i>tmpS1</i>	162	GGTTGAGGCAGTTCGTAGACTTCGAT
981F	<i>tmp981</i>		TAACCGAGGAATCTATGGTGCTCCTA
981R	<i>tmp981</i>	157	GTGATCACTTAGTGAGTATCCAGGCT
982F	<i>tmp982</i>		CCTCTTACCGAGTATCCAAGTCATTC
982R	<i>tmp982</i>	154	GCCAACATTGCATAATCTCCAAGAC
1077F	<i>tmp1077</i>		TAAATGACAGACGCTTCAGAAGCTT
1077R	<i>tmp1077</i>	156	GAGATATGATAACTAATCACCTCGCT

次に 1 ml の *Apa*I バッファーに浸漬し、4℃で 30 分間インキュベートした。次に *Apa*I 20 ユニットを含む 200 μ l の *Apa*I バッファーにプラグを 1 個ずつ入れ、37℃でインキュベートし、2 時間後、さらに *Apa*I 20 ユニートを加えて 2 時間反応させた。次にプラグを染色バッファー (40% シュークローズ、10 mM EDTA、0.01% BPB) に移して制限酵素反応を止めた。制限分解後のプラグをナイフで 1/2 に切断し、1% アガロースゲルのサンプル well に詰め、0.5 \times TBE (45 mM Tris、45 mM ホウ酸、1 mM EDTA、pH 8.0) で泳動した。PFGE は、CEFF DR-III (Bio-Rad) を用いて以下の設定で行った。電圧 6 V/cm、スイッチングタイム 50 - 90 秒、アングル 120°, 22 時間、14℃。ランニングバッファーには 0.5 \times TBE 2 I を用いた。サイズマーカーとしてファージ λ コンカテマーを用いた⁹¹⁾。

Southern 解析

Southern トランスファーには Hybond - N メンブレン (Buckinghamshire, UK) を使い、VacuGene XL (GE Healthcare, Tokyo, Japan) で、付属の使用説明書に従って行った。ハイブリダイゼーションプローブは、*lacG*、および ISS1、IS982、IS1077 の転移酵素 *tnpSI*、*tnp982*、*tnp1077* の内部配列を DIG-High Prime DNA Labeling and Detection Starter Kit II (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) を用いて DIG- 標識して調製した。ハイブリダイゼーション操作および検出操作は、Kit 付属のロシュ社の使用説明書に従って行った。ハイブリダイゼーションおよびメンブレン洗浄の条件は次の通りである。すなわち、ハイブリダイゼーションは、トランスファーメンブレンと DIG- 標識プローブを 42℃一晩インキュベートして行った。メンブレンの洗浄は、2 \times SSC、0.1% SDS、室温 5 分間 2 回、0.5 \times SSC、0.1% SDS、68℃、15 分間 2 回、いずれもフナコシ社の HB-1000 Hybridizer で振とうしながら洗浄した。

2. 結果

プラスミドの選択的除去による変異株の作出

L. lactis NIAI712 は、約 9-kb の機能未知なプラスミド pAG6 を含む 5 種類のプラスミドを保有している。pAG6 の機能を調べるために、*in vitro* で作成した競合プラスミド pCVm6 を *L. lactis* NIAI712 にエレクトロポレーションで導入し、異なるコロニー由来の pAG6 除去株 (Δ pAG6) を作出した (Fig. 21)。すなわち、pCVm6 導入菌株 NIAI712 (including pCVm6)^{ER} を TYL-E アガープレ

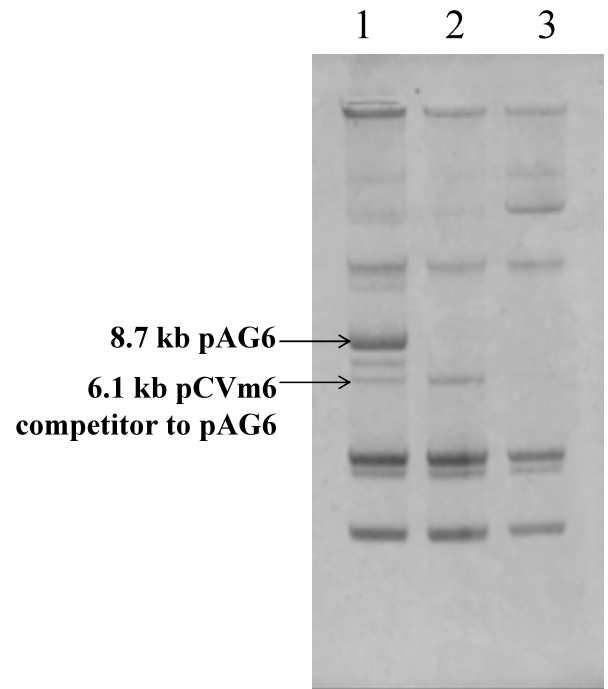


Fig. 21. Plasmid profile of *L. lactis* NIAI712 and variants.
1, *L. lactis* NIAI712 containing a competitor pCVm6
2, *L. lactis* NIAI712 containing pCVm6 and eliminating pAG6
3, Δ pAG6 variant (*L. lactis* NIAI712 eliminating pAG6 and pCVm6)

ートで培養して出現したコロニーを釣菌し (Fig. 21, lane 1), 10 ml の TYL-E 培地で 5 回培養を繰り返した後、再び TYL-E アガープレートでコロニーを形成させた。コロニーを釣菌して TYG リシス培地で培養してプラスミドを抽出し、pAG6 除去菌株を選抜した (Fig. 21, lane 2)。最後にプラスミド除去に用いた競合プラスミド pCVm6 を除去するために TYL 培地で 5 回培養を繰り返した後、TYL アガープレートでコロニーを形成させ、TYL-E アガープレートにレプリカしてエリスロマイシン感受性菌を選抜した。選抜した菌株 (Δ pAG6 株) はすべて pCVm6 非保有菌で、トータルプラスミドの電気泳動像は、Fig. 21, lane 3 に示したものと同じだった。異なる NIAI712 (including pCVm6)^{ER} コロニー由来の菌株の内、9 株を保存した。Table 10 に、本章の研究に用いた菌株とプラスミドをまとめた。作出した Δ pAG6 株のうち 3 株 *L. lactis* 712d35, 712d51, 712d61 を発酵試験に用いた。 Δ pAG6 株と親株 *L. lactis* NIAI712 をスキムミルクに接種し、乳発酵能を比較した。菌接種 12 時間後の発酵乳の凝固状態を調べたところ、 Δ pAG6 株接種区のスキムミルクはカードを形成せず、乳発酵能が野生株に比べて著しく劣っていた (Fig. 22)。*L. lactis*



Fig. 22. Skim milk after 12 h fermentation using *L. lactis* NIAI712 or ΔpAG6 variants.

Five μl of TYG-culture solutions were inoculated into 5 ml of skim milk and fermentation were performed at 30 °C. 1 and 2, Fast coagulation phenotype (*L. lactis* NIAI712 wild type strain). 3 and 4, Slow coagulation phenotype (ΔpAG6 variant 712d35 and 712d51).

NIAI712 は、当研究所でチーズスターターとして用いており、乳の発酵能力が高い。しかし乳発酵試験の結果から、機能未知プラスミド pAG6 を除去すると乳発酵遅延が起こった。このことから著者は pAG6 が乳発酵に重要な未知の機能に関与すると考え、pAG6 の機能解析を行った。

発酵不良原因の調査

Δ pAG6 株の示す発酵不良の原因を調べるために、乳糖資化能とカゼイン資化能を *L. lactis* NIAI712 と比較した。まず Δ pAG6 株の乳糖資化能を試験するために、*L. lactis* 712d35 の TYL 培地における増殖を野生株と比較した。*L. lactis* 712d35 は TYL 培地で良く増殖すると共に、ラクトースを糖源として乳酸を生成し、培地の pH

を速やかに低下させた。Δ pAG6 株の増殖カーブおよび pH カーブは *L. lactis* NIAI712 のものと一致し、ラクトース代謝能力は野生株と変わらないことが示唆された。次に、Δ pAG6 株のカゼイン資化能を試験するために、*L. lactis* 712d35 のスキムミルク培地、および 1% トリプトン添加スキムミルク培地における増殖を野生株と比較した。*L. lactis* NIAI712 をスキムミルクに接種し、発酵乳の pH 低下を測定するとともに乳凝固時間を調べた。その結果、発酵開始から 7 時間後、pH4.8 で発酵乳は凝固した。また発酵 8 時間後の pH は 4.6 に低下し、カゼインの等電点 (pH4.6) に達した。しかし 712d35 を接種した試験区では、培養 24 時間後においても発酵乳の pH は 5.1 であり、カードは形成しなかった。一方スキムミルクにトリプトンを添加した培地で培養すると、*L. lactis* 712d35 を接種した試験区でも pH は速やかに低下し、培養 7 時間後、pH4.6 でカードが形成された。*L. lactis* 712d51 および 712d61 の生育試験の結果は *L. lactis* 712d35 の結果と一致した。これらの結果から、Δ pAG6 株の発酵不良原因は、カゼイン代謝能の欠陥によることが明らかとなった。

pAG6 の塩基配列分析

pAG6 の機能を調べるために、プラスミドの全 DNA 配列を決定した。また pAG6 の全配列および推定されるオープンリーディングフレーム (ORF) の情報を DDBJ に登録した (アクセッションナンバー; AB198096)。pAG6 全配列中の G+C 含量は 33.7% で、8,662 bp からなり、6 個の ORF が存在した。pAG6 の制限酵素地図および ORF の大きさと向きを Fig. 23 に、FASTA プログラムによる相同性解析の結果を Table 13 示した。第 1 番目の ORF は、*repB* と高い相同性があり、*repB* 上流には、22-bp フラグメントの 3.5 回繰返し配列を含む *ori* が存在した。また *repB* 直下に *orf588*, *orfX*, さらに type I 制限/修飾システムの認識サブユニット遺伝子 *hdsS* が隣接し、典型的な *L. lactis* θ -複製型プラスミドの複製領域の構造が保存されていた。*orf588*, *orfX* および *hdsS* の 5' 側にはプロモーター配列が無く、*orf588*,

Table 13. ORF encoded by pAG6

Gene name	<i>repB</i>	<i>orf588</i>	<i>orfX</i>	<i>hdsS</i>	<i>cadC</i>	<i>cadA</i>
properties	plasmid replication	unknoun	plasmid replication	type I-R/M subunit	transcriptional regulatory repressor	cadmium resistance
size (bp)	1,221	588	651	1,236	369	2,130

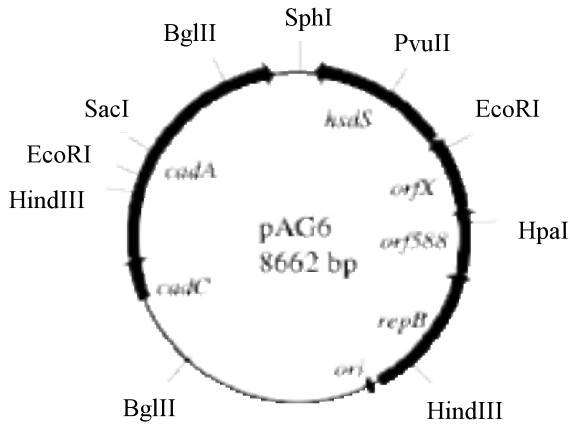


Fig. 23. Physical and genetic map of plasmid pAG6 in *L. lactis* NIAI712.

orfX および *hsdS* の転写は、上流の *repB* プロモーターに制御されていることが示唆された。*hsdS* 下流の5番目と6番目のORFは、既知のCd²⁺-specific P-type efflux ATPase (CadA; カドミウム耐性因子) と転写レPRESSA (CadC) の遺伝子配列と一致した^{41, 55, 58, 66})。 *L. lactis* のカドミウム耐性プラスミドは、1994年にLuiらによって最初に報告された⁵⁸)。同定されたカドミウム耐性プラスミド pND302 は8.8-kbと報告されているが、その制限酵素地図、最小複製単位 (*ori* and *repB*) および *cadA-cadC* 領域の配列は、pAG6と完全に一致した。*L. lactis* NIAI712のカドミウム耐性を試験したところ、野生株は300 μM CdCl₂ 添加培地で生育したが、Δ pAG6株は20 μM 添加培地で生育できなかった (data not shown)。このことからpAG6もpND302と同様に、宿主のカドミウム耐性を決定することが示唆された。

L. lactis NIAI712 および *L. lactis* 712d35 の発現遺伝子の網羅的解析

対数増殖期の *L. lactis* NIAI712 とそのΔ pAG6株 *L. lactis* 712d35 の遺伝子発現を、マイクロアレイを用いて比較解析した。本試験で使用したマイクロアレイは、1遺伝子あたり、44のパーフェクトマッチプローブを用いている。

2サンプル間で発現に有意差 (危険率5%以下) が認められた276遺伝子中、1.5倍以上発現量の異なる遺伝子は53あった。そのうち、野生株と比較して、*L. lactis* 712d35で75%以下に発現が低下している遺伝子は43で、12.5%以下に低下しているものが33遺伝子あった。33遺伝子は、i) ラクトース資化 (Lac) に関する10

遺伝子、ii) プロテイナーゼ活性 (Prt) に関する10遺伝子、iii) オリゴペプチドトランスポーター (Opp) に関する4遺伝子の、iv) 除去されたpAG6にコードされている9遺伝子の、4つのグループに分類された。グループi) およびii) に分類される遺伝子の発現量の低下は、1/10～1/20であるのに対して、グループiii) およびiv) に分類される遺伝子では1/80以下に発現量が低下しており、Oppシステムの構成遺伝子である *oppF* は約1/200に低下していた。また *L. lactis* 712d35では、遺伝子転移の原因となるISS1, IS982, IS1077の転移酵素 (トランスポゼース; Tnp) の発現量が、野生株の75%～25%に低下していた。

遺伝子の確認

アレイ解析の結果、*L. lactis* 712d35では、野生株 *L. lactis* NIAI712と比較して乳糖資化性遺伝子群 (*lac*)、菌体外プロテイナーゼ遺伝子 (*prtP*, *prtM*)、およびオリゴペプチドトランスポーター遺伝子群 (*opp*) の発現が著しく低下していることが明らかとなった。変異剤やプロトプラスト形成法によるランダムなプラスミドの除去操作では、同時に2種類以上のプラスミドが失われる現象がしばしば起こる。また、*L. lactis* NIAI712の近縁株 *L. lactis* NCDO712では、*lac*, *prt*, *opp* 遺伝子群は、同じ55-kbのプラスミド pLP712にコードされている³²)。そこで、*L. lactis* 712d35で1/8以下に発現量の低下した *lac*, *prt*, *opp* 遺伝子群の有無を、コロニーPCRで確認した。増幅フラグメントの有無はTable 14にまとめた。*L. lactis* NIAI712の試験区では、*cadA*, *hasS*, *lacG*, *prtP*, *oppA*, および *oppD* に由来する増幅フラグメントが得られ、その大きさは既知配列の予想と一致した (Table 14)。一方 *L. lactis* 712d35の試験区では、*lacG*, *prtP* に由来する増幅フラグメントのみ得られた。*L. lactis* 712d51 および 712d61の試験区の結果は712d35と同じだった。このことは、Opp遺伝子群がΔ pAG6株のゲノムから消失していることを示唆している。

オリゴペプチドトランスポーターオペロンの確認

Fig. 24には、以前報告された *L. lactis* NCDO712の pLP712にコードされている *lac*, *opp* 遺伝子群のオペロン構造を示した。*L. lactis* NCDO712では、約9kbにわたるOppクラスターは、Prt遺伝子群 (*prtP* & *prtM*) およびLacクラスターと共に約55KbのpLP712にコードされ、さらにクロモゾームにも同じ構造の遺伝子群がコードされていることが確認されている⁵³)。コロニー

Table 14. PCR analysis to confirm the residence of the *lac*-cluster, *prtP/M*, and *opp-pepO* in *Lactococcus lactis* NIAI712 and variants.

Strain	<i>cadA</i>	<i>hsdS</i> (pAG6)	<i>hsdS</i>	<i>lacG</i>	<i>prtP</i>	<i>oppA</i>	<i>oppD</i>
<i>L. lactis</i> ssp. <i>cremoris</i>							
NIAI712	+	+	ND	+	+	+	+
MG1363 (plasmid-free)	-	-	+	-	-	+	+
712d35 (Δ pAG6)	-	-	+	+	+	-	-

+ a specific amplicon could be obtained by PCR

- no product could be amplified

ND, not done

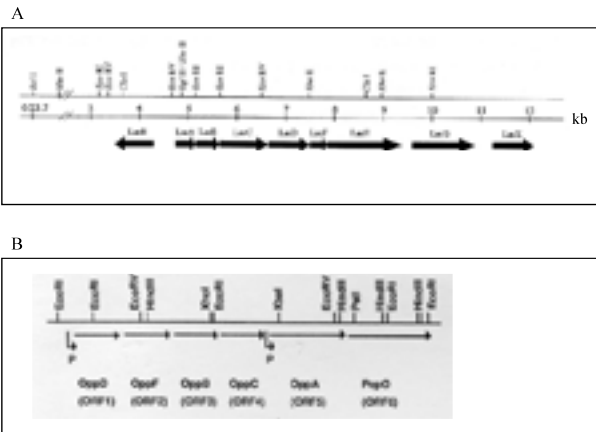


Fig. 24. Construction of Lac-operon and Opp-PepO-operon.

A: This figure (Lac-operon) was copied from 乳酸菌の科学と技術 (学会出版センター) p190

B: This figure (Opp-PepO-operon) was copied from *J. Bacteriology* (1993) 175 (23) 7523 - 7532

PCRの結果、 Δ pAG6株でのOppクラスターの消失が示唆されたが (Table 14), 本研究の供試菌株 *L. lactis* NIAI712においては、Oppクラスターが、どのプラスミドに存在しているのか、さらにクロモゾームにも存在しているのかは不明であった。そこで、*L. lactis* NIAI712と Δ pAG6株のプラスミドプロフィールと、クロモゾーム遺伝子の制限分解多型を調べた。さらにサザン解析でOppクラスターの所在を調べた。

1) *L. lactis* NIAI712と Δ pAG6株のプラスミドの解析

L. lactis NIAI712と Δ pAG6株 *L. lactis* 712d35, 712d51のトータルプラスミドの電気泳動パターンを比較したところ、 Δ pAG6株では、全プラスミドのうち2番目に大きい約50 kbのプラスミド pAG3が消失していた (Fig. 25)。サザン解析の結果、*L. lactis* NIAI712では、*lacE*および*prtP*のプロープは、最も大きい55 kbのプラスミド pLacPrtを認識し (data not shown), *oppC*プロープはpAG3を認識した (Fig. 26)。これらの結果

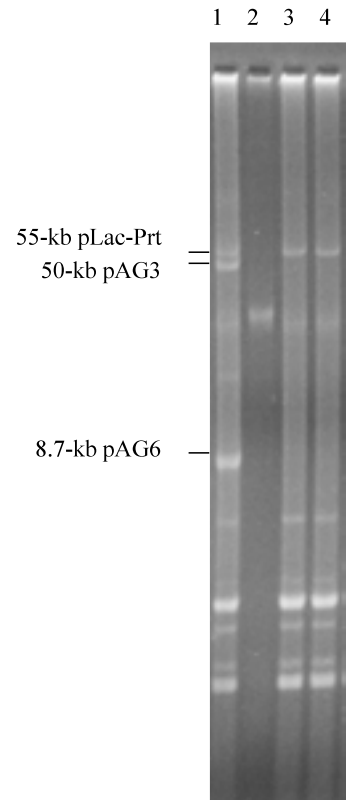


Fig. 25. Plasmid profiles of *L. lactis* NIAI712 strain and variants.

Total plasmids from NIAI712 (lane 1), MG1363 plasmid-free variant (lane 2), 712d35 (lane 3) and 712d51 (lane 4). pLac-Prt contained *lac* and *prt* genes and pAG3 contained *opp-pepO* genes.

は、*L. lactis* NIAI712の保存中にプラスミド間およびプラスミド-クロモゾーム間で組換えが生じ、親株 *L. lactis* NCDO712とは異なるプラスミド構成となっていることを示唆する。

2) *L. lactis* NIAI712と Δ pAG6株のクロモゾームの解析

*ApaI*で切断したフラグメントのPFGEパターンを比較した (Fig. 26)。ほとんどの切断フラグメントは一致したが、野生株の230 kbのフラグメントが変異株ではなかった。この切断多型は、クロモゾーム遺伝子に

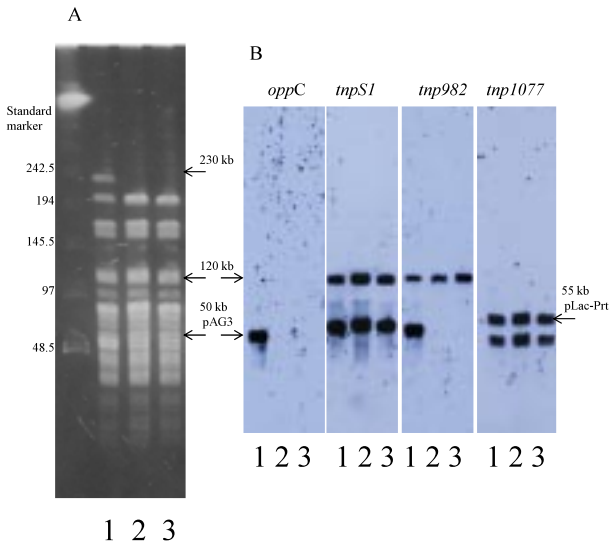


Fig. 26. PFGE analysis, and Southern hybridization using *oppC* probe, *tnpS1* probe, *tnp982* probe, and *tnp1077* probe. PFGE (A) and Southern hybridization (B) were performed on *Apal* digests of total DNA isolated from NIAI712 (lane 1) and ΔpAG6 variants 712d35 (lane 2) and 712d51 (lane 3).

組換えが生じたことを示唆している。*opp-pepO* に対するサザン解析の結果、ポジティブシグナルは、*L. lactis* NIAI712 の 50 kb フラグメントだけ認識した。*oppC* ポジティブシグナルの大きさは、pAG3 と一致した。

3) *L. lactis* NIAI712 および ΔpAG6 株の insertion sequence (IS) エLEMENTの解析

親株 *L. lactis* NCDO712 といくつかの近縁株の研究から、Opp クラスターは IS エLEMENT と共に複合型トランスポゾン形成してゲノム内を頻りに転移し、時には欠失し、多くの派生株を生ずる原因となっていることが状況証拠と共に示唆されている^{53, 92)}。しかし転移を誘引する具体的なきっかけは明らかになっていない。本研究で行ったマイクロアレイ解析の結果から、野生株と ΔpAG6 株では 3 種類のトランスポゼース遺伝子 *tnpS1*, *tnp1077*, *tnp982* の発現量が有為に異なることが明らかとなった。著者は、ΔpAG6 株で生じた Opp クラスターの消失が、トランスポゼース *TnpS1*, *Tnp1077*, *Tnp982* がコントロールする、3 種類の IS エLEMENT (ISS1, IS1077, IS982) の転移と関係があると予想し、*L. lactis* NIAI712 と ΔpAG6 株の IS エLEMENT の位置をサザン解析で調べた (Fig. 26)。サザン解析のプロローブは、*tnpS1*, *tnp1077*, *tnp982* の配列をテンプレートして合成した。その結果、*tnp982* プロローブのハイブリパターンが *L. lactis* NIAI712 と ΔpAG6 株で異なることが明らか

となった。*L. lactis* NIAI712 では、50 kb と 120 kb のフラグメントが *tnp982* プロローブで認識されたが、ΔpAG6 株では 120 kb のフラグメントのみ認識された。50 kb の *tnp982* ポジティブフラグメントは、その大きさから pAG3 と推定された。この結果は、pAG3 が、Opp クラスターと *tnp982* をコードしていることを示唆している。*L. lactis* NIAI712 と ΔpAG6 株の両方に存在する 120 kb の *tnp982* ポジティブフラグメントは、クロモゾーム由来と推定される。一方 *tnpS1* と、*tnp1077* プロローブは、pLacPrt を認識した。*tnpS1* と、*tnp1077* プロローブによるサザン解析では、*L. lactis* NIAI712 と ΔpAG6 株の結果は同じであった。

3. 考察

研究室保存株 *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* NIAI712 は、もともと *L. lactis* NCDO712 から派生した³²⁾。*L. lactis* NIAI712 のプラスミドプロファイルは、親株の *L. lactis* NCDO712 と区別がつかなかった。しかし、パルスフィールド電気泳動を用いた制限分解多型とは両菌株で異なり、また両菌株共に保有している 55-kb のラクトース資化性プラスミドの制限分解パターンが一致しなかった。*L. lactis* NIAI712 では、*lac*-オペロンと、*prtP*/*prtM* 遺伝子群は 55-kb のプラスミド pLac-Prt にコードされていた。しかしオリゴペプチドトランスポーター遺伝子クラスター (*opp-pepO*) は、50 kb のプラスミド pAG3 にコードされ、クロモゾームには存在していない。これらの結果から、我々の研究室での継代と保存の間に、*opp-pepO* の転移が起こり、*L. lactis* NIAI712 が派生したと考えられる。*L. lactis* NIAI712 は乳発酵能が優れている。しかし ΔpAG6 株は、発酵遅延の表現型を示す。野生株と ΔpAG6 株のゲノム遺伝子を *Apal* で分解し、制限フラグメント多型を比較すると、野生株にある 230 kb のクロモゾーム由来のフラグメントと、プラスミド由来の 50 kb フラグメントが ΔpAG6 株には無かった。このことは、pAG6 除去株では、ゲノム遺伝子にコンスタントな組み換え変異が起こることを示唆している。PFGE とマイクロアレイ結果から、ΔpAG6 株の乳発酵遅延は、pAG3 にコードされている *opp-pepO* の欠失によるものであると結論した。

第2節 プラスミド除去に伴うトランスポゼースの発現解析

1. 材料および方法

菌株およびプラスミド

本研究で使用した微生物およびプラスミドは Table 10 にまとめた。

培地と培養条件

E. coli および *L. lactis* の培養は、第1章、第1節に記述した方法で行った。

L. lactis NIAI712 はカドミウム自然耐性菌である。カドミウムとエリスロマイシンを同時にセレクションマーカーとして用いる場合には、20 nM Cd, 0.5 μg/ml Em を添加した TYG-EC 培地あるいはスキムミルク-EC 培地を用いた。

競合プラスミド pAG6dR の作成

E. coli プラスミド DNA および *L. lactis* プラスミド DNA の抽出と精製、さらにプラスミド DNA の制限分解、ブランピング、ライゲーション反応および形質転換は、第1章、第1節に記述した方法で行った。本研究では、pAG6 の複製起点から *hsdS* のターミネーターまでの複製領域全配列を PCR で増幅し、Em^R フラグメントとともに pBluescript II にクローニングし、pAG6RS を作出した (Fig. 27)。この組換えプラスミドをテンプレートとして、PCR で *orf588*, *orfX*, *hsdS* を除いた約 7 kb を増幅して環状化し、pAG6dR を作出した (Fig. 27)。

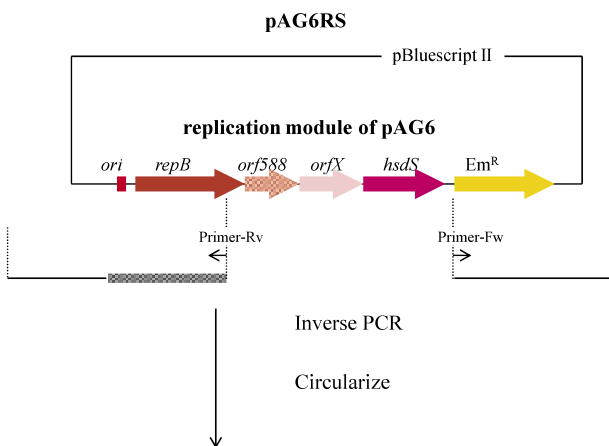


Fig. 27. Physical and genetic map of replication module of pAG6 and schematic representation of pAG6dR.

競合プラスミドによる形質転換と内在プラスミドの除去操作

L. lactis NIAI712 への pAG6dR の導入法と、内在プラスミド pAG6 の除去法は第1章、第3節に記述した方法で行った。

逆転写 PCR による cDNA の合成

トータル RNA の調製は、第3章、第2節に記述した方法で行った。逆転写反応には、供試菌から抽出した 500 ng のトータル RNA をテンプレートとして用いた。cDNA の合成は、QuantiTect Reverse Transcription Kit (Qiagen) を用い、添付の使用説明書に従って行った。

半定量リアルタイム PCR

半定量リアルタイム PCR は、QuantiTect SYBR green (Qiagen) を用い、添付の使用説明書に従って行った。テンプレートには 1 μl の cDNA を用い、20 μl の PCR ミクスチャーを反応に供した。リアルタイム PCR には、Light Cycler (Roche Diagnostics, Sant Cugat del Valles, Spain) を用いた。サイクルパラメーターは、95°C で 10 分間変性した後、変性 95°C で 15 秒、伸長 60°C で 60 秒を 50 回繰り返した。試験は 3 連で行った。すなわち、トータル RNA は 3 回調製し、各々のサンプルから cDNA を合成してリアルタイム PCR に供した。プライマーペアは、GTPases-translation elongation factors (*tuf*) および, *tnpS1*, *tnp982*, *tnp1077*, *tnp981* を認識する配列を用いた。プライマーの配列と増幅フラグメントの大きさは Table 13 にまとめた。解析結果の数値は、*tuf* の発現データを内部標準として用い補正した⁷⁾。

統計処理

統計処理は、Student's *t*-test を用い、統計学的有意差は、危険率 5% 水準未満で判定した。

2. 結果

pAG6 と競合プラスミドの両方を含む変異株の作出

本研究で見出された、pAG6 の除去に伴う Opp- クラスターの消失や、クロモゾーム内遺伝子の変異 (あるいは転移) は、細胞内に pAG6 と競合プラスミドが共存し、pAG6 の複製が不安定になる状況で起こると予想した。そこで、同一細胞内に pAG6 と競合プラスミドの両方を含む変異株の作出を計画した。しかし第1節で pAG6 の除去操作に用いた pCVm6 を *L. lactis* NIAI712 に導入し、派生株 (pCVm6⁺, pAG6⁺) をカドミウムと

エリスロマイシンを添加したダブルセレクション培地 TYG-EC で培養すると、その増殖速度は著しく低下した。また派生株 (pCVm6⁺, pAG6⁺) を TYG-E に移植すると、1 回の植継ぎ操作で pAG6 が失われ、目的とする解析が出来なかった。この結果は、pCVm6 の不和合性誘導能の強さが原因であると予想した。そこで、宿主の増殖を阻害せずに pAG6 と共存できる弱い競合プラスミドの作成を試みた。すなわちまずインバース PCR で pAG6RS の欠失プラスミドを作成し (Fig. 27), *L. lactis* NIAI712 に導入した。次に分離した派生株を TYG-E 培地で継代培養した後、TYG-EC 寒天培地に 10³ 細胞程度塗布し、形成したコロニー (Em^R, Cd^R) の数をカウントして pAG6 保有株の割合を算出した。試験した派生株のうち、*L. lactis* NIAI712 に pAG6dR を導入したものは、TYG-E 培地で 2 回培養後、80% 以上 pAG6 を保有していた。そこで、pAG6dR を用いて pAG6 と pAG6dR の共存する試験菌株 *L. lactis* 712dR1, 712dR2, 712dR3 を作出した (Table 10)。

weak competitor pAG6dR の配列解析

作出した pAG6dR のインサートの配列をシークエンスで確認したところ、pAG6dR の複製領域を構成している *repB* は 3' 領域が欠失し、内部に 1 塩基置換があった (Fig. 27)。

リアルタイム PCR を用いたトランスポゼース遺伝子 (*tnp*) の発現解析

マイクロアレイの結果から、*L. lactis* 712d35 では、*tnpS1*, *tnp1077*, *tnp982* の遺伝子発現が 1.5 ~ 4 倍低下していたが、*tnp981* や *tnp905* の発現に有意差はなかった。そこで半定量リアルタイム PCR を用いて、トランスポゼースの発現量の変化を確かめた。トータル RNA の調製に際しては、*L. lactis* NIAI712 および Δ pAG6 (712d35, 712d51, 712d61) を、TYG で一晩培養して活性化し、0.1% の培養液を新鮮な TYG に接種した。約 5 時間後、OD = 0.25 まで培養した細胞を集菌して RNA を抽出した。一方 712dR は、スキムミルク-EC 培地で継代培養し、pAG6 と競合プラスミド pAG6dR および *opp-pepO* coding プラスミド pAG3 を維持した。トータル RNA の調製に際しては、712dR (712dR1, 712dR2, 712dR3) を、TYG-EC で一晩培養して活性化し、0.1% の培養液を新鮮な TYG-E に接種した。約 5 時間後、OD = 0.25 まで培養した細胞を集菌して RNA を抽出した。リアルタイム PCR には、500 ng のトータル RNA から調製

した cDNA を 1 μ l 用いた。野生株と派生株の遺伝子発現量を標準化するために、*tuf* の発現量の測定を同時に行った。*tuf* の値で標準化したデータを元に、各 *tnp* の発現量を野生株と派生株と比較した (Fig. 28)。すなわち、野生株 *L. lactis* NIAI712 の発現量を 1 とし、派生株の当該 *tnp* の発現量の相対値を算出してグラフに示した。*L. lactis* NIAI712 と Δ pAG6 の比較では、*tnpS1* および *tnp982* のリアルタイム PCR の結果は、アレイ解析の結果と一致した。すなわち、 Δ pAG6 の *tnpS1* および *tnp982* 発現量は野生株よりも有意に低かった。しかし、712dR における *tnpS1* および *tnp982* 発現量は野生株の約 2 倍高かった。このことは、pAG6 の除去過程 (キューアリングプロセス) においては、*tnpS1* および *tnp982* の発現が高まり、Tnp 活性が高まることを示唆している。対照的に、*L. lactis* NIAI712 と Δ pAG6 および 712dR の

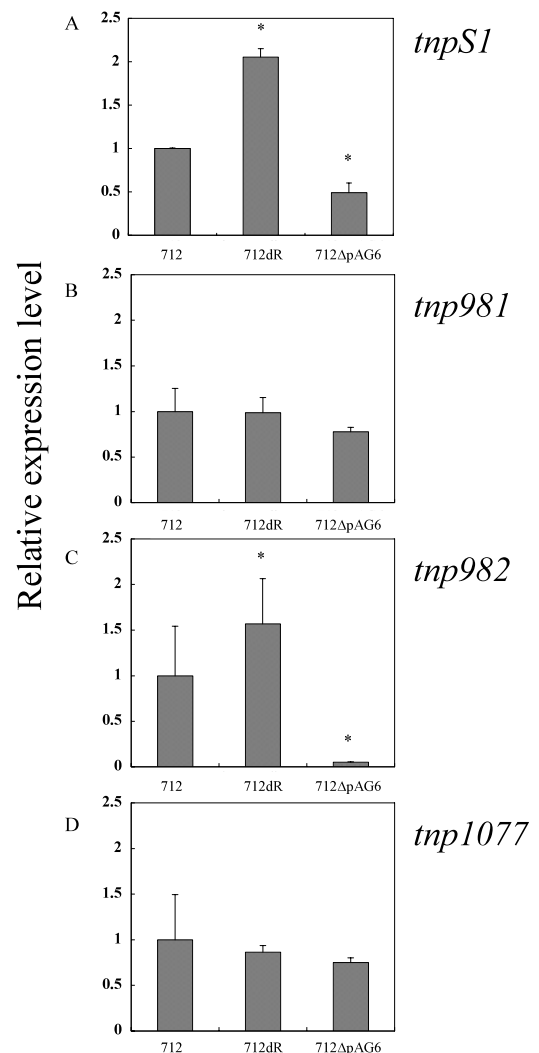


Fig. 28. Semiquantitative-realtime-PCR. Asterisks indicate significant difference from the wild type with $P < 0.05$.

比較では、*tnp1077* のリアルタイム PCR の結果に有意差はなかった。さらに、マイクロアレイ解析で有意差のなかった *tnp981* の発現量もリアルタイム PCR で比較した。*tnp981* の発現量は、リアルタイム PCR においても有意差がないことが確かめられた。この結果は、*IS1077* および *IS981* は、*pAG6* の選択的除去に起因する一連の現象とは関係しないことを示唆している。

3. 考察

L. lactis プラスミドは多くの IS エlement を含み、プラスミド間、或はクロモゾームへの遺伝子転移に働き、進化に寄与している^{19, 54)}。*L. lactis* NIAI712 が保有するプラスミド上の IS エlement を調べたところ、*opp-pepO* をコードする *pAG3* には *IS982* が含まれていた。一方 *lac*-オペロンと *prtP/prtM* をコードする *pLacPrt* には *ISS1* と *IS1077* が含まれていた。最近 *L. lactis* NIAI712 に近縁なプラスミドフリー株 MG1363 の全ゲノムが公開されたが、それによると *IS982* と *ISS1* は、全ゲノム内に各々 2 コピーしかなく、9 コピーある *IS1077* のトランスポゼース遺伝子の全てがシュードジーンだった⁹²⁾。本研究でも、*IS982* と *ISS1* はプラスミドとクロモゾームに 1 コピーずつ検出された。すなわち、*IS982* は *pAG3* とクロモゾーム由来の 120 kb フラグメントに、*ISS1* は *pLacPrt* とクロモゾーム由来の 120 kb フラグメントにコードされていた。プラスミドフリー株 MG1363 でメジャーな IS エlement は *IS981* や *IS905* であり、ゲノム内に 100 コピー以上コードされている⁹²⁾。対数増殖期の *L. lactis* NIAI712 においても、*IS982* と *ISS1* の転移酵素 *tnp982*、*tnpS1* の発現量は、コピー数の多い *IS981* や *IS905* の *tnp* の 1/100 以下だった。したがって、本研究で観察された、*opp-pepO* の消失を含む *L. lactis* NIAI712 ゲノム内再構成は、マイクロアレイ解析で変動のあった *tnp* の転写活性の上昇が引き金ではないかと予想した。すなわち、*opp-pepO* 近傍の IS エlement の転移活性が、宿主細胞内に *pAG6* と競合プラスミドが共存する状態で活性化されると予想した。しかし第 1 章で *pAG6* の除去に用いた *pCvm6* は、宿主細胞内で *pAG6* との共存が困難で、両プラスミドの保有を強制する TYL-EC 培地で培養すると、増殖速度が著しく低下した。さらに、TYL-E 培地で 1 回植え継ぐと *pAG6* が 100% 除去されるため、両プラスミド共存株の遺伝子発現を解析する試験菌株として不都合だった（未発表）。そこで、宿主の増殖を抑制することなく、宿主内で *pAG6* との共存状態を維持できる第 2 の競合プラス

ミド *pAG6dR* を作出した。*L. lactis* NIAI712 に *pAG6dR* を導入した派生株 712dR は、TYL-EC 培養で増殖抑制されず、TYL-E 培地の 5 回継代培養後においても、50% の菌が *pAG6* を保持していた。親株 *L. lactis* NIAI712、*pAG6/pAG6dR* 共存株 712dR、および *pAG6* 除去株 Δ *pAG6* の対数増殖期の細胞で、*tnp* の発現量を比較したところ、712dR 株の *tnp982* と *tnpS1* の発現量が有意に高かった。*pAG6/pAG6dR* 共存株 712dR では、*tnp982* と *tnpS1* の発現量が高まることから、*IS982* と *ISS1* の転移も活性化することが予想された。一方 *tnp981* と *tnp1077* の発現量に有意差は無く、*pAG6* 除去に伴うゲノム遺伝子の組み換え現象に、*IS981* と *IS1077* が関与する転移は無関係と考えられた。

本研究では、*L. lactis* NIAI712 の *pAG6* が、共存する *pAG3* やクロモゾームなど宿主のゲノム構造の安定化に働くことを示した。かつて親株 *L. lactis* NCD0712 から、プラスミドフリー株を含む様々なプラスミド除去株が得られているが、*pAG6* と同じ大きさの *pSH73* だけが除去された派生株は得られていない³²⁾。*L. lactis* NIAI712 の以前の試験でも、変異剤処理や高温培養などの従来法では、*pAG6* 欠損株は得られなかった（未発表）。*pAG6* の高い安定性の原因として、*pAG6* のコピー数や、コードしている遺伝子産物の細胞内濃度が厳密に制御されない状態では、宿主の生育に不利な組み換えや不可欠なプラスミドの欠損頻度が上昇し、結果的に *pAG6* 欠損株が環境中で不利になると推定している。

pAG6 がコードしている遺伝子産物の中で特に着目しているのは *HsdS* (*HsdS/pAG6*) である。*HsdS* は、Type I 制限/修飾 (Type I-R/M) システムの認識サブユニットである。*L. lactis* は常にバクテリオファージの攻撃に曝されており、様々なファージ耐性機構を有している²⁹⁾。制限/修飾システムは、自己と非自己の DNA を区別し、ファージ感染など外来遺伝子の侵入から宿主を防御するファージ耐性システムであり、*L. lactis* では Type I-R/M と Type II-R/M が報告されている²⁹⁾。Type I-R/M は、制限サブユニット (*HsdR*)、修飾サブユニット (*HsdM*)、認識サブユニット (*HsdS*) から構成され、*HsdR* と *HsdM* はクロモゾームにコードされている。一方 *HsdS* 遺伝子は、 θ -プラスミドの複製モジュールを構成し、これまでに多くの相同性遺伝子が報告されている^{61, 67)}。遺伝子のメチル化には、2 分子の *HsdM* と 1 分子の *HsdS* からなるメチル化コンプレックス (M_2S) で機能し、DNA 切断には M_2SR_2 で働く⁶¹⁾。複合酵素内の *HsdS* の種類によって認識配列が決定され、したがって

感受性ファージの種類にも影響する⁶¹⁾。Type I-R/Mの認識配列は単純なインバーテッドリピートではなく、これまでに *L. lactis* の Type I-R/M の認識配列が決定された報告はまだない。しかし HsdM および HsdR のアミノ酸配列の相同性から、アデニンメチラーゼ活性を持つと推定されており⁴²⁾、異なる HsdS と結合することで異なる配列を認識し、メチル化あるいは切断する⁷⁸⁾。細胞内で pAG6 がコードしている HsdS (HsdS/pAG6) の発現が不足し、メチル化酵素が十分に機能しない場合、メチル化されていない認識配列を含む pAG3 を切断酵素が分解し、結果 pAG6 & pAG3 欠損株の出現割合が増加するのかもしれない。また別の仮説も考えられる。すなわち、遺伝子のプロモーター領域近傍のメチル化状態は、遺伝子の転写活性に影響する^{14, 62)}。これまで報告されている IS エLEMENT の *tnp* のプロモーター領域近傍には、しばしば DNA adenine methylase (DAM) の認識配列が含まれ、そのメチル化状態が *tnp* の発現量に影響し、転移活性を制御しているという報告がある^{73, 86)}。*L. lactis* NIAI712 の場合、競合プラスミドの共存によって pAG6 複製が不安定になっている最中には、*tnp982* と *tnpS1* の発現量が増加した。細胞内で pAG6 を安定に保持することで、HsdS/pAG6 の認識配列を正常なメチル化状態に保ち、IS982 の転移活性を小さくし、IS982 をコードする pAG3 などのプラスミドの安定化に寄与する可能性も、今後の研究課題として興味深い。

総 括

乳製品製造に汎用されている *Lactococcus lactis* の遺伝子構成は、2 Mb 程度の小型の染色体と、複数のプラスミドを細胞内に保有することが特徴的である。各々のプラスミドは、宿主細胞の増殖と同調して、あるいは無関係に一定のコピー数を自己複製し、通常正確に次世代の細胞に分配される。*L. lactis* のプラスミドの特徴として、乳発酵に必要な不可欠な経済形質をコードすることが上げられる。現在迄に、ラクトース資化、プロテイナーゼ活性、クエン酸取込み、ファージ耐性、バクテリオシン生産、粘性物質生産などの形質に関与するプラスミドが確認されている。*L. lactis* の内在プラスミドの種類や組合せは菌株ごとに異なり、菌株特異的な表現型を決定する。*L. lactis* の分離源は乳製品、生乳、漬物、生草など多岐にわたり、プラスミド構成を変えながら生育環境に適応していると考えられる。中には細胞内に 10 種類程度のプラスミドを保有する株も多く、機能が特定されて

いないプラスミドも多く残されている。プラスミドの機能解析は、通常まずプラスミド除去株を作出し、除去株の表現形質と親株の表現形質を比較して研究の端緒とする。従って、対象とするプラスミドを選択的に除去することができれば、プラスミド上の遺伝子機能や関係する表現形質を効率良く推定することができる。また、必要不可欠なプラスミドを損なわずに、1 種類のプラスミドを除去する方法は、発酵産業に利用可能な実用菌株の改良にも利用できる。第 1 章では、宿主 DNA にランダムに作用する変異剤処理などを行わず、複数の内在プラスミドのうち 1 種類のプラスミドを選択的に除去し、親株と発酵特性の異なる新菌株を作出する方法を開発した。

L. lactis の内在プラスミドの殆どが、宿主域の狭い θ -複製型プラスミドであることが知られている。そこで、*L. lactis* に広く分布している θ -プラスミドを選択的に除去するために、任意の θ -プラスミドの複製単位を *in vitro* で再構成し、不和合性プラスミド(競合プラスミド)を作成する方法を開発した。本法は、1) 複製単位の再構成に共通して用いることのできるプラスミドベクター (pDB1) の作成、2) 任意の *L. lactis* θ -プラスミドの不和合性配列を増幅しうる PCR プライマーペア (VF3 - VF4) の設計、3) *in vitro* での不和合性プラスミドの再構成と、*L. lactis* wild type プラスミドの除去操作、からなる。本章では、考案した方法が、*L. lactis* subsp. *lactis* および subsp. *cremoris* の両亜種で使用可能であることを確認した。本法の利点は、以下の 3 点にまとめることができる。すなわち、1) 作出した変異株は外来遺伝子を保有せず、食品加工用のスターターに利用できる。2) 除去プラスミドを選択でき、利用目的に即したスターターの改良が可能である。3) 既存法では除去の難しい安定なプラスミドも選択的に除去でき、プラスミドの機能解析に応用できる。そこで第 2 章では、プラスミドの選択的除去を、乳業用乳酸菌の育種に応用した研究について記述し、第 3 章では本法を研究端緒とした *L. lactis* プラスミドの新機能の解析について記述した。

産業菌株において、安定した発酵性能と共に、発酵の効率性も重要な形質である。本研究では、*L. l. lactis* biovar diacetylactis DRC1 および diacetylactis のタイプストレインである *L. l. lactis* biovar diacetylactis 13675 において、宿主の増殖を抑制し、実質的に宿主の増殖速度を決定している 7.4 kb のプラスミド pDR1-1 を同定した。第 1 章に記述した方法で pDR1-1 を選択的に除去することで、親株より増殖の早い変異株を育種することができた。また産業菌株への利用例として、フレーバー変

異株の育種について第2章、第3節に記述した。すなわち、*L. l. lactis* biovar diacetylactis は、乳中のクエン酸を代謝し、ジアセチルを生成する。diacetylactis のジアセチルを生成能は、実際にはクエン酸透過性プラスミド pCit の有無で決定され、pCit を持たない菌株ではクエン酸リアーゼなどクエン酸の代謝に関係する遺伝子が正常であっても培地内のクエン酸を菌体内に取り込めないためジアセチルの生成も無い。ジアセチルは非常に強い臭いを有する化合物であり、微量でも発酵飲食品の香味品質に大きな影響を与える。発酵バター製造には必要なフレーバーとされているが、発酵乳製造には好まれない。特に我が国の場合、欧米に比べ、ジアセチルに対する馴染みのなさが指摘されてもいる。そこで本研究では *L. l. lactis* biovar diacetylactis N7 のクエン酸透過性プラスミドを選択的に除去し、ジアセチル生成能の無い変異株を育種した。N7 は胆汁酸耐性、コレステロール除去能などを有し、機能性発酵乳の製造が期待されている。*L. lactis* の CitP- プラスミドは、変異剤などで処理しても容易に欠損株を得られないことが知られている。本研究で考案したプラスミドの選択的除去法は、CitP- プラスミドの除去を容易にした。本法により乳発酵能を損なうこと無く種菌の発酵特性を変更でき、製品の風味改良に繋がる。

最後に第3章では、プラスミドの選択的除去によって、高頻度に出現する発酵遅延変異株を試験に用い、除去したプラスミドの機能解析を行った結果について詳述した。我々の研究室で継代し保存している *L. lactis* subsp. *cremoris* NIAI712 は、5種類のプラスミドを有している。そのうち約9 kb のプラスミド pAG6 はコピー数も多く、非常に安定であるが故にプラスミド除去株が得られておらず、その機能は調べられていなかった。そこで第1章に記述した方法で pAG6 を選択的に除去すると、高頻度で発酵遅延株が出現した。pAG6 を除去して得られた発酵遅延変異株 712 Δ pAG6 では、乳糖資化、カゼイン分解および取込みなど、乳資化性遺伝子群の転写活性が著しく低下していた。さらに、712 Δ pAG6 のゲノム内には、pAG6 の除去に伴って、短期間のうちに遺伝子組み換えによる変異が起こることが明らかとなった。本研究ではこのゲノム変異によって、カゼイン分解物の取り込みに働く一連の遺伝子群 *opp-pepO* が、例外なく消失していることを突き止め、発酵遅延の主原因であると結論付けた。

pAG6 には、宿主 DNA のメチル化配列を決定する因子、すなわち Type I 制限/修飾サブユニット HsdS が

コードされていた。遺伝子プロモーター近傍の DNA のメチル化状態が、遺伝子の転写活性に影響することは周知の事実である。特に遺伝子のゲノム内転移を仲介するトランスポゾンの転移酵素遺伝子 *tnp* の転写減衰はよく知られている。それゆえ pAG6 の除去操作中、すなわち、pAG6 と競合プラスミドが同一細胞中に共存する状態で *tnp* の転写活性が上昇し、トランスポゾンが転移して *opp-pepO* 欠失が起こるのではないかと予想し、pAG6 / 競合プラスミド共存株での *tnp* 転写活性を解析した。その結果、競合プラスミドの共存によって pAG6 複製が不安定になっている最中には、*tnp982* と *tnpS1* の発現量が特異的に上昇することを明らかにした。宿主は細胞内で pAG6 を安定に保持することで、HsdS/pAG6 の認識配列を正常なメチル化状態に保ち、ゲノム内トランスポゾンなど可動性遺伝因子の転写活性を小さくし、ゲノム構造や菌株特異的なプラスミド構成を維持するのかもしれない。

L. lactis には多くの HsdS バリエーションが知られているが、宿主の遺伝子発現との関係を試験した例は全くない。しかしながら Type-II R/M では、認識配列のメチル化状態が自己遺伝子の転写活性を制御することが報告され、乳酸菌の制限/修飾システムの、ファージ耐性以外の働きが初めて明らかにされた¹⁴⁾。特に乳発酵に関与する遺伝子群の発現と HsdS が決定するメチル化状態の関係は興味深い。なぜなら本研究で作出した 712 Δ pAG6 株では、遺伝子が欠失していないにも関わらず、遺伝子発現が異なる多くの乳資化性遺伝子を確認したからである。712 Δ pAG6 の除去プラスミド pAG6 上には、HsdS と共にカドミウム耐性因子 *CadA / C* がコードされている。*cadA / C* をコードするプラスミドは、乳発酵スターターに用いる *Lactococcus* strain に広く分布している⁸⁸⁾。著者らのスクリーニングでも、乳製品由来の *L. lactis* spp. *lactis* は全て pCad を保有していた(未発表)。 *L. lactis* をグルコース添加培地で培養すると、容易にラクトース資化性プラスミドが欠落するように、不要なプラスミドはしばしば失われる。したがって乳製品から分離された菌株の全てがカドミウム耐性プラスミドを保有したことには、何か合理的な必然性があるだろう。一つの可能性として、pCad と共にコードされている *hsdS* (HsdS/pAG6?) に着目している。すなわち、HsdS/pAG6 が乳中での生育に有利なメチル化状態を作り出しているのではないかと仮説は飛躍しすぎているだろうか。この仮説を裏付けるプロテオーム解析結果が報告されている。INRA の Chich らは、

L. lactis NIAI712の近縁株 *L. lactis* NCDO763 をケミカリー・ディファインド培地 (CDM) で培養し、全菌体タンパク質を2次元電気泳動で分画することで、400 スポットを検出・解析できたと報告している。彼等はまた *L. lactis* NCDO763 を M17 培地、およびスキムミルク培地で培養し、培地特異的に発現する菌体タンパク質を探索した。その結果、CDM や M17 培地よりも、ミルク培地培養による菌体から、有意に発現量の大きいスポットとして HsdS が同定された。ある種の HsdS が、乳環境下で乳酸菌の生育に有利な遺伝子産物として発現が強化されているとしたら、*L. lactis* が保有する *hsdS* 遺伝子の種類は、フェージ耐性に影響するだけでなくミルク中での菌株の優位性にも影響するだろう。

L. lactis で頻繁に見つかる *hsdS* 遺伝子は、DNA 配列中の保存領域で容易に組み換えを起こし、新種の *hsdS* を生じさせる。機能的な新種の *hsdS* が、細胞内に生じた菌株のメチル化状態は、親株とは異なるだろう。著者は、プラスミド構成の違いなど保有遺伝子そのものの違いと共に、ゲノム遺伝子全体のメチル化状態の違いも、*L. lactis* の菌株特異性や環境適応進化の根源ではないかと考えている。本研究で作出したプラスミド変異株は、菌株特異的なメチル化状態を解析するのに相応しい実験材料であり、メチル化状態と宿主の遺伝子発現との関係は、今後の研究課題として大変興味深い。

謝 辞

本研究論文をまとめるにあたり、大学卒業以来終始ご指導とご高配を賜りました宇都宮大学農学部教授、東徳洋先生に深甚なる感謝の意を表します。また論文作成にあたり、きめ細かいご指導とご助言を頂きました東京農工大学共生科学技術研究院 高橋幸資教授、本論文の審査をお引き受け下さりました茨城大学農学部 米倉政実教授、宇都宮大学農学部 上田俊策教授、前田勇准教授に心より感謝申し上げます。本研究の遂行にあたり、格別のご理解とご鞭撻を頂きました畜産草地研究所、畜産物研究領域、新国佐幸研究管理監、大桃定洋元微生物利用研究室長に心より感謝申し上げます。また研究のご指導と貴重なご助言を頂きました畜産草地研究所畜産物品質チーム 野村将博士、畜産物機能研究チーム乳酸菌研究グループ 鈴木チセ博士、木元広実博士、北海道農業研究所業務1科長 岡本隆史博士、元加工第三研究室長 入江良三郎博士ならびに前微生物利用研究室長 藤田泰仁博士に心より御礼申し上げます。また九州大学内地

留学中に多大なるご指導とご高配を賜りました、崇城大学生物生命学部長 緒方靖哉教授、九州大学大学院農学研究院 園元謙二教授、土居克実講師、崇城大学生物生命学部助教 西山孝博士、農業生物資源研究所研究員 江口智子博士、に厚く御礼申し上げます。また本研究の遂行にあたり、実験指導と貴重なご助言を賜りました食品総合研究所微生物利用研究領域 楠本憲一博士、乳酸菌ベクターと試験菌株を供与下さり、研究にご助言頂きました明治乳業(株)研究本部食機能科学研究所 佐々木隆博士に心より感謝申し上げます。また日々の温かい励ましやご助言ご協力頂きました畜産草地研究所畜産物研究分野の皆様、生物資源研究所 細江実佐博士に心よりお礼申し上げます。最後に、研究遂行に理解を示し、常に励まして頂いた両親、家事を分担頂いた夫 赤尾和志に深く感謝いたします。

引用文献

- 1) Alpert, C. A., Cruz-Le Cop, A.M., Malleret, C. and Zagorec, M. (2003). Characterization of a theta-type plasmid from *Lactobacillus sakei*: a potential basis for low-copy-number vectors in lactobacilli, *Appl. Environ. Microbiol.*, 69, 5574-5584.
- 2) Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W. and Lipman, D. J. (1990). Basic local alignment search tool, *J. Mol. Biol.*, 215, 403-410.
- 3) Anderson, D. G. and McKay, L. L. (1983). Simple and rapid method for isolating large plasmid DNA from lactic streptococci, *Appl. Environ. Microbiol.*, 46, 549-552.
- 4) Austin, S. and Nordstrom, K. (1990). Partition-mediated incompatibility of bacterial plasmids, *Cell*, 60, 351-354.
- 5) Benno, Y., He, F., Hosoda, M., Hashimoto, H., Kojima, T., amazaki, K., Uno, H., Mykkanen, H. and Salminen, S. (1996). Effects of *Lactobacillus GG* yogurt on human intestinal microecology in Japanese subjects, *Nutr. Today*, 31 Supplement1, 12S.
- 6) Bhowmik, T. and Steele, J. L. (1994). Cloning, characterization and insertional inactivation of the *Lactobacillus helveticus* D(-) lactate dehydrogenase gene, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 41, 432-439.
- 7) Bolotin, A., Wincker, P., Mauger, S., Jaillon, O., Malarma, K., Weissenbach, J., Ehrlich, S. D. and Sorokin, A. (2001). The complete genome sequence of the lactic acid bacterium *Lactococcus lactis* ssp. *lactis*

- IL1403, *Genome Res.*, 11, 731-753.
- 8) Boucher, I., Emond, E., Parrot, M. and Moineau, S. (2001). DNA sequence analysis of three *Lactococcus lactis* plasmids encoding phage resistance mechanisms, *J. Dairy Sci.*, 84, 1610-1620.
 - 9) Bourniquel, A. A. and Bickle, T. A. (2002). Complex restriction enzymes: NTP driven molecular motors, *Biochimie.*, 84, 1047-1059.
 - 10) Caunt, P., Impoolsup, A. and Greenfield, P. F. (1989). The effect of oxygen limitation on stability of a recombinant plasmid in *Saccharomyces cerevisiae*, *Biotechnology Letters*, 11, 5-10.
 - 11) Cedar, H. (1988). DNA methylation and gene activity, *Cell*, 53, 3-4.
 - 12) Chattoraj, D. K. (2000). Control of plasmid DNA replication by iterons: no longer paradoxical, *Mol. Microbiol.*, 37, 467-476.
 - 13) Chopin, A., Chopin, M. C., Moillo-Batt, A. and Langella, P. (1984). Two plasmid determined restriction and modification systems in *Streptococcus lactis*, *Plasmid*, 11, 260-263.
 - 14) Christensen, L. L. and Josephsen, J. (2004). The methyltransferase from the LlaDII restriction-modification system influences the level of expression of its own gene, *J. Bacteriol.*, 186, 287-295.
 - 15) Collins, E. B. and Harvey, R. J. (1962). Failure in the production of citrate permease in *Streptococcus diacetylactis*, *J. Dairy Sci.*, 45, 32-35.
 - 16) Corneau, N., Dube, C., LaPointe, G. and Emond, E. (2001). A coelectroporation method for the isolation of cryptic plasmids from *Lactococcus lactis*, *Letters in Applied Microbiol.*, 33, 7-11.
 - 17) Cuozzo, S. A., Sesma, F., Palacios, J. M., de Ruiz Holgado, A. P. and Raya, R. R. (2000). Identification and nucleotide sequence of genes involved in the synthesis of lactocin 705, a two-peptide bacteriocin from *Lactobacillus casei* CRL 705, *FEMS Microbiol. Lett.*, 185, 157-161.
 - 18) Daming, R., Yinyu, W., Zilai, W., Jun, C., Hekui, L. and Jingy, Z. (2003). Complete DNA sequence and analysis of two cryptic plasmids isolated from *Lactobacillus plantarum*, *Plasmid.*, 50, 70-73.
 - 19) Daveran-Mingot, M. L., Campo, N., Ritzenthaler, P. and Le Bourgeois, P. (1998). A natural large chromosomal inversion in *Lactococcus lactis* is mediated by homologous recombination between two insertion sequences, *J. Bacteriol.*, 180, 4834-4842.
 - 20) Davidson, B. E., Kordias, N., Dobos, M. and Hillier, A. J. (1996). Genomic organization of lactic acid bacteria, *Antonie Van Leeuwenhoek*, 70, 161-183.
 - 21) Davis, M. A., Martin, K. A. and Austin, S. J. (1990). Specificity switching of the P1 plasmid centromere-like site, *EMBO J.*, 9, 991-998.
 - 22) de Vos, W. M. (1987). Gene cloning and expression in lactic streptococci, *FEMS Microbiol. Rev.*, 46, 281-295.
 - 23) de Vos, W. M., Underwood, H. M. and Davies, F. L. (1984). Plasmid encoded bacteriophage resistance in *Streptococcus cremoris* SK11, *FEMS Microbiol. Lett.*, 23, 175-178.
 - 24) Diaz Ricci, J. C. and Hernández, M. E. (2000). Plasmid effects on *Escherichia coli* metabolism, *Critical Reviews in Biotechnology*, 20, 79-108.
 - 25) Efsthathiou, J. D. and McKay, L. L. (1976). Plasmids in *Streptococcus lactis*: Evidence that lactose metabolism and proteinase activity are plasmid linked, *Appl. Environ. Microbiol.*, 32, 38-44.
 - 26) Emond, E., Lavallee, R., Drolet, G., Moineau, S. and Lapointe, G. (2001). Molecular characterization of theta replication plasmid and its use for development of a two-component food-grade cloning system for *Lactococcus lactis*, *Appl. Environ. Microbiol.*, 67, 1700-1709.
 - 27) Ferretti, J. J. and Curtiss, R. III (1987). *Streptococcal genetics*. Washington, D. C.: American Society for Microbiology.
 - 28) Foley, S., Bron, S., Venema, G., Daly, C. and Fitzgerald, G. F. (1996). Molecular analysis of the replication origin of the *Lactococcus lactis* Plasmid pCI305, *Plasmid*, 36, 125-141.
 - 29) Forde, A. and Fitzgerald, G. F. (1999). Bacteriophage defense systems in lactic acid bacteria.: *Antonie van Leeuwenhoek*, 76, 89-113.
 - 30) Fujita, Y. and Okamoto, T. (1999). Cloning and Identification of the Lactococcal A and M Gene Cluster from *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetylactis* DRC1, *Japan Agricultural Research Quarterly*, 33, 133-137.
 - 31) Gasson, M. J. and Davies, F. L. (1980). High-Frequency

- conjugation associated with *Streptococcus lactis* donor cell aggregation, *J. Bacteriol.*, 143, 1260-1264.
- 32) Gasson, M. J. (1983). Plasmid complements of *Streptococcus lactis* NCDO 712 and other lactic *Streptococci* after protoplast-induced curing, *J. Bacteriol.*, 154, 1-9.
 - 33) Gravesen, A., Josephsen, J., vonWright, A. and Vogensen, F. K. (1995). Characterization of the replicon from the lactococcal theta-replicating plasmid pJW563, *Plasmid*, 34, 105-118.
 - 34) Gravesen, A., von Wright, A., Josephsen, J. and Vogensen, F. K. (1997). Replication regions of two pairs of incompatible lactococcal theta-replicating plasmids, *Plasmid*, 38, 115-127.
 - 35) Handa, N., Ichige, A., Kusano, K. and Kobayashi, I. (2000). Cellular responses to post-segregational killing by restriction-modification genes, *J. Bacteriol.*, 182, 2218-2229.
 - 36) Harington, A., Watson, T. G., Louw, M. E., Rodel, J. E. and Thomson, J. A. (1988). Stability during fermentation of a recombinant α -amylase plasmid in *Bacillus subtilis*, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 27, 521-527.
 - 37) Hayes, F., Vos, P., Fitzgerald, G. F., de Vos, W. M. and Daly, C. (1991). Molecular organization of the minimal replicon of novel, narrow-host-range, lactococcal plasmid pCI305, *Plasmid*, 25, 16-26.
 - 38) Holo, H. and Nes, I. F. (1989). High-frequency transformation by electroporation of *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* growing with glycine in osmotically stabilized media, *Appl. Environ. Microbiol.*, 55, 3119-3123.
 - 39) Holt, J.G., Krieg, N. b., Sneath, P. H. A., Staley, J. T. and Williams, S. T. (1993). *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, 9th ed.
 - 40) Ito, Y., Sasaki, Y. and Sasaki, T. (1992). Novel plasmid pBUL1 derived from *Lactobacillus* and derivative thereof. U. S. Patent 5426047 (Oct. 22, 1992).
 - 41) Ivey, D. M., Guffanti, A. A., Shen, Z., Kudyan, N. and Krulwich, T. A. (1992). The *cadC* gene product of alkaliphilic *Bacillus firmus* OF4 partially restores Na^+ resistance to an *Escherichia coli* strain lacking an Na^+/H^+ antiporter (*NhaA*), *J. Bacteriol.*, 174, 4878-4884.
 - 42) Janscak, P., Dryden, D. T. F. and Firman, K. (1998). Analysis of the subunit assembly of the type IC restriction-modification enzyme EcoR124I, *Nucleic Acid Res.*, 26, 4439-4445.
 - 43) Kempfer, G. M. and McKay, L. L. (1979). Characterization of plasmid DNA in *Streptococcus lactis* subsp. *diacetylactis*: evidence for plasmid-linked citrate utilization, *Appl. Environ. Microbiol.*, 37, 316-323.
 - 44) Kempfer, G. M. and McKay, L. L. (1981). Biochemistry and genetics of citrate utilization in *Streptococcus lactis* SSP. *Diacetylactis*, *J. Dairy Sci.*, 64, 1527-1539.
 - 45) Kiewiet, R., Bron, S., de Jonge, K., Venema, G. and Seegers, J. F. M. L. (1993). Theta replication of the lactococcal plasmid pWV02, *Mol. Microbiol.*, 10, 319-327.
 - 46) Kimoto, H., Ohmomo, S. and Okamoto, T. (2002). Cholesterol removal from media by lactococci, *J. Dairy Sci.*, 85, 3182-3188.
 - 47) Kobayashi, I. (2001). Behavior of restriction-modification systems as selfish mobile elements and their impact on genome evolution, *Nucleic Acid Res.*, 29, 3742-3756.
 - 48) Kobayashi, M., Nomura, M., Fujita, Y., Okamoto, T. and Ohmomo, S. (2002). Influence of lactococcal plasmid on the specific growth rate of host cells, *Lett. Appl. Microbiol.*, 35, 403-408.
 - 49) Kobayashi, M., Nomura, M. and Kimoto, H. (2007). Manipulation for plasmid elimination by transforming synthetic competitors diversifies *Lactococcus lactis* starters applicable to food products, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 71, 2647-2654.
 - 50) Kojic, M., Strahinic, I. and Topisirovic, L. (2005). Proteinase PI and lactococcal A genes are located on the largest plasmid in *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* bv. *diacetylactis* S50. *Can. J. Microbiol.*, 51, 305-314.
 - 51) Kok, J., van der Vossen, J. M. B. M. and Venema, G. (1984). Construction of plasmid cloning vector for lactic streptococci which also replicate in *Bacillus subtilis* and *Escherichia coli*, *Appl. Environ. Microbiol.*, 48, 726-731.
 - 52) Kunnimalaiyaan, M. and Vary, P. S. (2005). Molecular Characterization of plasmid pBM300 from *Bacillus megaterium* QM B1551, *Appl. Environ. Microbiol.*, 71, 3068-3076.
 - 53) Le Bourgeois, P., Daveran-Mingot, M. L. and

- Ritzenthaler, P. (2000). Genome plasticity among related *Lactococcus* strains: Identification of genetic events associated with macrorestriction polymorphisms, *J. Bacteriol.*, 182, 2481-2491.
- 54) Le Bourgeois, P., Lautier, M., van den Berghe, L., Gasson, M. J. and Ritzenthaler, P. (1995). Physical and genetic map of *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* MG1363 chromosome: comparison with that of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* IL1403 reveals a large genome inversion, *J. Bacteriol.*, 177, 2840-2850.
- 55) Lebrum, M., Audurier, A. and Cossart, P. (1994). Plasmid-borne cadmium resistance genes in *Listeria monocytogenes* are similar to *cadA* and *cadC* of *Staphylococcus aureus* and are induced by cadmium, *J. Bacteriol.*, 176, 3040-3048.
- 56) Leenhouts, K. J., Tolner, B., Bron, S., Kok, J., Venema, G. and Seegers, J. F. M. L. (1991). Nucleotide sequence and characterization of broad-host-range lactococcal plasmid pWVO1, *Plasmid*, 26, 55-66.
- 57) Leenhouts, L., Bolhuis, A., Venema, G. and Kok, J. (1998). Construction of food-grade multiple-copy integration system for *Lactococcus lactis*, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 49, 417-423.
- 58) Liu, C. Q., Leelawatcharamas, V., Harvey, M. L. and Dunn, N. W. (1996). Cloning vectors for lactococci based on plasmid encoding resistance to cadmium, *Curr. Microbiol.*, 33, 35-39.
- 59) Maeda, S. and Gasson, M. J. (1986). Cloning, expression and location of the *Streptococcus lactis* gene for phospho-beta-D-galactosidase, *J. Gen. Microbiol.*, 132, 331-340.
- 60) Mesas, J.M., Rodriguez M. C. and Alegre M. T. (2004). Plasmid curing of *Oenococcus oen.*, *Plasmid*, 51, 37-40.
- 61) Murray, N. E. (2000). Type I restriction systems: sophisticated molecular machines, *Microbiol. Mol. Biol. Revs.*, 64, 412-434.
- 62) Nagy, Z. and Chandler, M. (2004). Regulation of transposition in bacteria, *Research in Microbiology*, 155, 387-398.
- 63) Naito, T., Kusano, K. and Kobayashi, I. (1995). Selfish behavior of restriction-modification systems, *Science*, 267, 897-899.
- 64) Nomura, M., Kobayashi, M., Narita, T., Kimoto-Nira, H. and Okamoto, T. (2006). Phenotypic and molecular characterization of *Lactococcus lactis* from milk and plants, *J. Appl. Microbiol.*, 101, 396-405.
- 65) Novick, R. P. (1987). Plasmid incompatibility, *Microbiol. Rev.*, 51, 381-395.
- 66) Nucifora, G., Chu, L., Misra, T. K. and Silver, S. (1989). Cadmium resistance from *Staphylococcus aureus* plasmid pI258 *cadA* gene results from a cadmium-efflux ATPase, *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 86, 3544-3548.
- 67) O'Sullivan, D., Twomey, D. P., Coffey, A., Hill, C., Fitzgerald, G. F. and Ross, R. P. (2000). Novel type I restriction specificities through domain shuffling of HsdS subunits in *Lactococcus lactis*, *Mol. Microbiol.*, 36, 866-875.
- 68) Orla-Jensen, S. (1919). *The lactic acid bacteria*, Copenhagen: HÆst and Son.
- 69) Pearson, W. R. and Lipman, D. J. (1988). Improved tools for biological sequence comparison, *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 85, 2444-2448.
- 70) Pedersen, M., Arned, K. R. and Johansen, E. (1994). Genetic analysis of minimal replicon of the *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetylactis* citrate plasmid, *Mol. Gen. Genet.*, 244, 374-382.
- 71) Perdigon, G., Nader de Macias, M. E., Alvarez, S., Oliver, G. and Pesce de Ruiz Holgado, A. A. (1990). Prevention of gastrointestinal infection using immunobiological methods with milk fermented with *Lactobacillus casei* and *Lactobacillus acidophilus*, *J. Dairy Res.*, 57(2), 255-264.
- 72) Rice, L. B. (2001). Emergence of vancomycin-resistant enterococci, *Emerging Infectious Diseases*, 7, 183-187.
- 73) Robert, D., Hoopes, B. C., McClure, W. R. and Kleckner, N. (1985). IS10 transposition is regulated by DNA adenine methylation, *Cell*, 43, 117-130.
- 74) Romero, D. A. and Klaenhammer, T. R. (1993). Transposable elements in Lactococci: a review, *J. Dairy Sci.*, 76, 1-19.
- 75) Sakamoto, I., Igarashi, M., Kimura, K., Takagi, A., Miwa, T. and Koga, Y. (2001). Suppressive effect of *Lactobacillus gasseri* OLL2716 (LG21) on *Helicobacter pylori* infection in humans, *J. Antimicrob. Chemother.*, 47(5), 709-710.
- 76) Salminen, S. and von Wright, A. (1998). *Lactic Acid Bacteria*: Marcel Dekker, Inc.
- 77) Sambrook, J., Fritsch, E. R. and Maniatis, T. (1989).

- Molecular Cloning: a Laboratory Manual, 2nd edn. :Cold Spring Harbor, NY:Cold Spring Harbor Laboratory.
- 78) Schouler, C., Gautier, M., Ehrlich, S. D. and Chopin, M. C. (1998). Combinational variation of restriction-modification specificities in *Lactococcus lactis*, *Mol. Microbiol.*, 28, 169-178.
- 79) Seegers, J. F. M. L., van Sinderen, D. and Fitzgerald, G. F. (2000). Molecular characterization of the lactococcal plasmid pCIS3: natural stacking of specificity subunits of a type I restriction/modification system in a single lactococcal strain, *Microbiology*, 146, 435-443.
- 80) Seegers, J. F. M. L., Bron, S., Franke, C. M., Venema, G. and Kewiet, R. (1994). The majority of lactococcal plasmids carry a highly related replicon, *Microbiology*, 140, 1291-1300.
- 81) Sesma, A., Sundin, G. W. and Murillo, J. (1998). Closely related plasmid replicons coexisting in the phytopathogen *Pseudomonas syringae* show a mosaic organization of replication region and altered incompatibility behavior, *Appl. Environ. Microbiol.*, 64, 3948-3953.
- 82) Shida, K., Makino, K., Morishita, A., Takamizawa, K., Hachimura, S., Ametani, A., Sato, T., Kumagai, Y., Habu, S. and Kaminogawa, S. (1998). *Lactobacillus casei* inhibits antigen-induced IgE secretion through regulation of cytokine production in murine splenocyte cultures, *Int. Arch. Allergy. Immunol.*, 115(4), 278-287.
- 83) Siezen, R., Renckens, B., van Swam, I., Peters, S., van Kranenburg, R., Kleerebezem, M. and de Vos, W. M. (2005). Complete sequences of four plasmids of *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* SK11 reveal extensive adaptation to the dairy environment, *Appl. Environ. Microbiol.*, 71, 8371-8382.
- 84) Simon, D., Rouault, A. and Chopin, M. C. (1986). High-efficiency transformation of *Streptococcus lactis* protoplasts by plasmid DNA, *Appl. Environ. Microbiol.*, 52, 394-395.
- 85) Sinha, R. P. (1989). A new simple method of curing plasmids in lactic streptococci (*Streptococcus cremoris*; *Streptococcus lactis*, plasmids), *FEMS Microbiol. Lett.*, 57, 349-352.
- 86) Spilemann-Ryser, J., Moser, M., Kast, P. and Weber, H. (1991). Factors determining the frequency of plasmid cointegrate formation mediated by insertion sequence IS3 from *Escherichia coli*, *Mol. Gen. Genet.*, 226, 441-448.
- 87) Swartling, P.F. (1951). Biochemical and serological property of some citric acid fermenting streptococci from milk and dairy products. *J. Dairy Res.*, 18, 256-267.
- 88) Trotter, M., Mills, S., Ross, R.P., Fitzgerald, G.F. and Coffey, A. (2001). The use of cadmium resistance on the phage-resistance plasmid pNP40 facilitates selection for its horizontal transfer to industrial dairy starter lactococci, *Letters in Applied Microbiol.*, 33, 409-414.
- 89) Tynkkynen, S., Buist, G., Kunji, E., Kok, J., Poolman, B., Venema, G. and Haandrikman, A. (1993). Genetic and biochemical characterization of the oligopeptide transport system of *Lactococcus lactis*, *J. Bacteriol.*, 175, 7523-7532.
- 90) von Wright, A., Tynkkynen, S. and Suominen, M. (1987). Cloning of a *Streptococcus lactis* subsp. *lactis* chromosomal fragment associated with the ability to grow in milk, *Appl. Environ. Microbiol.*, 53, 1584-1588.
- 91) Waterbury, P. G. and Lane, M. J. (1987). Generation of lambda concatamers for use as pulsed field electrophoresis size markers, *Nucleic Acid Res.*, 15, 3930.
- 92) Wegmann, U., O'Connell-Motherway, M., Zomer, A., Buist, G., Shearman, C., Canchaya, C., Ventura, M., Goesmann, A., Gasson, M. J., Kuipers, O. P., van Sinderen, D. and Kok, J. (2007). Complete genome sequence of the prototype lactic acid bacterium *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* MG1363, *J. Bacteriol.*, 189, 3256-3270.
- 93) Yu, W., Gillies, K., Kondo, J. K., Broadbent, J. R. and McKay, L. L. (1996). Loss of plasmid-mediated oligopeptide transport system in lactococci: Another reason for slow milk coagulation, *Plasmid*, 35, 145-155.
- 94) 井上喬 (2001). ジアセチル発酵飲食製造のキーテクノロジー, 幸書房.
- 95) 木元広実 (2004). 新しいプロバイオティック食品開発への取り組み, 畜産技術, 4月号, 21p.
- 96) 乳酸菌の科学と技術(1996). 乳酸菌研究集談会編, 学会出版センター.
- 97) 藤田泰仁 (1997). 乳業用乳酸球菌のプラスミドに関する研究, 博士論文 (北海道大学).

New methods for selective plasmid elimination from *Lactococcus lactis* and characterization of the genetic variability of variants derived from Lactococcal starter for milk fermentation

Miho KOBAYASHI

Animal Products Research Team

Summary

Chapter 1. Manipulation for selective Plasmid Elimination from *Lactococcus lactis*

Strains of lactococcal bacteria are used as starters in the fermentation of dairy products. Such strains generally carry a number of plasmids, varying in size from approximately 2 kb to 80 kb. Some plasmids encode properties essential to the manufacture of dairy products such as lactose fermentation, proteolysis, diacetyl production, and phage resistance, and others encode nonessential or unknown properties. Plasmid elimination is a fundamental technique for investigating the diverse properties of encoding plasmids. It is currently performed by culturing with a mutagenic chemical such as acridine orange, culturing in unbuffered medium, exposing cells to elevated growth temperatures, regenerating bacterial protoplasts, or a composite of these methods. With these methods, plasmids cannot be chosen for elimination, and the simultaneous loss of more than one plasmid is frequent. In addition, the resulting variants that have lost co-existing essential plasmids are ineffective as starters.

This study was designed selectively to eliminate a θ -plasmid from *Lactococcus lactis* strains by transforming synthetic competitors. A shuttle vector for *Escherichia coli* and *L. lactis*, pDB1, was constructed by ligating a partial replicon of pDR1-1B, which is a 7.3 kb θ -plasmid in *L. lactis* DRC1, with an erythromycin resistance gene into pBluescript II KS⁺. This versatile vector was used to construct competitors to common lactococcal θ -plasmids. pDB1 contains the 5' half of the replication origin and the 3' region of *repB* of pDR1-1B, but lacks the 1.1-kb region normally found between these two segments. A set of primers, Pv3 and Pv4, was designed to amplify the 1.1-kb middle parts of the general θ -replicons of lactococcal plasmids. When the PCR products were cloned into the *Nru* I and *Xho* I sites of pDB1, synthetic replicons were constructed and replication activity was restored. A number of θ -plasmids in *L. lactis* ssp. *lactis* and *cremoris* were eliminated selectively by transforming the synthetic competitors. These competitors were easily eliminated by subculture for a short time in the absence of selection. The resulting variants contained no exogenous DNA and are suitable for food products, since part of the phenotype was altered without altering other plasmids indispensable for fermentation.

Chapter 2. Breeding of new *Lactococcus lactis* starters by plasmid elimination

Lactococcus lactis subsp. *lactis* biovar diacetylactis DRC1 carries more than 6 plasmids, including a 7.4 kb cryptic plasmid, which was designated as pDR1-1. pDR1-1 was found to significantly affect the specific growth rate of the host cells because of its limiting effect on growth. When pDR1-1 was eliminated by an unstable competitor to pDR1-1, as described in chapter 1, the resulting variant, *L. lactis* DRC1 Δ pDR1-1, grew more efficiently than the DRC1 wild type. In addition, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar diacetylactis N7 carried an 8.3-kb plasmid, which was expected to be the citrate permease plasmid (CitP-plasmid). When the 8.3-kb plasmid was eliminated, the variant, *L. lactis* N7 Δ pCit, lost the ability to metabolize citrate and to produce the aromatic compound diacetyl from citrate. Diacetyl produces a buttery flavor in

fermented dairy products, but this aroma is undesirable for yoghurt. Therefore, selective elimination of CitP-plasmid may serve to breed a variant preferable for yoghurt starter. Neither *L. lactis* DRC1 Δ pDR1-1 nor *L. lactis* N7 Δ pCit contained exogenous DNA, making both suitable for food products.

Chapter 3. Characterization of a cryptic plasmid that contributes to the stable maintenance of host genome in *Lactococcus lactis*

Lactococcus lactis subsp. *cremoris* NIAI712 carries five different plasmids, including an 8.7-kb plasmid designated pAG6. pAG6 encodes a subunit of a type-I restriction and modification system (HsdS), as well as proteins involved in cadmium resistance (CadA and CadC). When we eliminated pAG6 by inserting a competitor into strain NIAI712, the resulting Δ pAG6 variants showed a slow-milk-coagulation phenotype, even though the cells retained their lactose fermentation and proteolysis activities. Pulsed-field gel electrophoresis followed by Southern hybridization analysis showed that chromosomal rearrangements as well as co-elimination of the 50-kb plasmid pAG3, which carried an oligopeptide transport system gene cluster (*opp*-cluster), occurred consistently in the genome of Δ pAG6 variants. These results suggest that the stable maintenance of pAG6 prevents destabilization of a co-existing plasmid and constant genome rearrangement of chromosome. In Δ pAG6 variants, transposases of IS982 and ISS1 were expressed at lower levels than in the parent NIAI712 strain. The expression of these transposases increased in an intermediate variant containing both pAG6 and competitor. Therefore, the frequency of chromosomal rearrangements and loss of pAG3 in association with the IS982 and ISS1 elements may increase during the process of pAG6 elimination.

Out of the entire sequence of pAG6, we have focused on the function of HsdS as a factor that serves in stable maintenance of the host genome. HsdS is part of multi-functional complexes, i.e. Type-I R/M systems composed of three different subunits, HsdS, HsdM, and HsdR. This complex is active in an N-6 adenine-specific DNA methylase, a DNA-dependent ATPase, a DNA translocase, and a restriction endonuclease. Since HsdS is responsible for the recognition of a specific DNA sequence, the restriction and methylation sites in the genomes would be altered by the elimination of HsdS/pAG6. We therefore expected that the restriction complex with HsdS/pAG6 would cleave pAG3 and part of the host chromosome, or that the gene transpositions regulated by IS982 or ISS1 would be promoted by aberrant transcription of the *tnp* genes following the methylation changes near the promoter regions.

Key words : Lactic acid bacteria, plasmid, growth rate, milk fermentation