

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

メタデータ	言語: Japanese
	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場合が多く,ラクトース資化,プロティナーゼ活性,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にあって、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38-40mol%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種 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.



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

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 ロティナーゼ活性、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。

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 ー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、シークエンスによる複製領域 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こ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℃で静置培養した。E. coli は, LB 培地を用いて 37℃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℃で 15 分間, 10% スキムミルク培地は 110℃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³⁰。 *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		
Lactococcus lactis ssp. lactis		
DRC1	Wild type	Swartling (1951);
		Colling and Harrey (1962)
NIAI N7	Wild type	Lab. collection
527	Wild type	Lab. collection
Lactococcus lactis ssp. cremoris		
NIAI712	Wild type	Lab. collection
IL1403	Plasmid-free derivative of IL594	Chopin et al., (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
Escherichia coli		
XL1-Blue		
Plasmids		
pGKV21	E. coli, B. subtilis, L. lactis shuttle	
	vector, Em ^R , Cm ^R	van der Vossen et al., (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 SalI 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 et al., (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℃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⁷⁷⁾。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1ml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10ml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 ドプロフィールを比較し, 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査した。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)を用いてデリー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* dyeprimer 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ィールを調 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7.5kbの プラスミドの導入、DRC1521には Bam HI で切断され る約7.5kb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 pBluescript 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 (hsdS) と相同性の高い ORF が隣接していた^{29,} ⁷⁹⁾。また orfX および hsdS 上流にはプロモーター配列が 存在しないことから, repB-orfX-hsdS 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 高い相同性があった^{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* と相同性の 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

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

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

pDR1-1B	1	MSSISKNEP-NG-KOVG-TLNELSKRKVVEHNSLITSIAKMDKTPLKMFELAVSCIN	54
pCI305	1	MSSISKNEF-NG-KOVG-TLNELSKRKVVEHNSLITSIAKMDKTPLKMFELAVSCIN	5.4
pAH33	1	MSSISKNEF-NG-KOVG-TLNELSKRKVVEHNSLITSIAKMDKTPLKMFELAVSCIN	54
pCIS3	1	MSSISKNEF-NG-KOVG-TLNELSKRKVVEHNSLITSIAKMDKTPLKMFELAVSCIN	5.4
nDR1-1	1	METHANKYNYNNYNDNERTVCSURETEKRATIVEHNDLI TSVAKMDRVPLRTFELAVSLUD	60
pont i			
nDR1-1B	55	TEEPPKDHTVYLSKEELFAFFKVSDNDKHSRFKOAVENMOKOAFFOIKE-EVGKG-FKFR	112
pDICI 1D	55	TEEPPKDHTVYLSKEELFAFFKVSDNDKHSRFKOAVENMOKOAFFOIKE-EVGKG-FKFF	112
pC1505	55	TEEPPKDHTVYLSKEELFAFFKVSDNDKHSRFKOAVENMOKOAFFOIKE-EVGKC-FKFR	112
pAII33	55	FREDEKDHTVYLSKERLEAFFKVSDNDKHSBEKOAVENMOKOAFFOTKE EVCKC-FKFB	112
pCISS pDP1_1	61		130
pDK1-1	0.1	The standing of the set of the se	
nDD1 1D	113	STUDIEVVENTENDEDVKTEENERINEVLINLKONFTONALSELARLNSKVSTILVENLS	172
PDK1-1D	113	STUDTOVERUTOVEDUVETEVEDETNOVI, TNI KONFTONAL SDIAELNSKI STIMIKALS	172
pC1505	112	DIVETEVUDAMENUEDUKTETRELADITADUT TUT KONPACUAT CETADI NEKVETTI VOMI C	172
ранзз	113	SIVETEVUEWEDVEDEVETEVEVETEVETEVETEVETEVETEVENEN	174
pCIS3	113	SIVPIPTVEWTDYHDDVKIEPHREIMPYLINLKUNPTUHALSDIAELNSKYSIILYRWLS	1/2
pDR1-1	121	ARSHTERLIMUD ANTI I SMIALK STUDAT REPAIRE ALVELDAVE ADEN 2KAZI I FAKTEZ	180
pDR1-1B	173	MNYNQYEHYSYKGGRREEQVEAYRNPTISNRELRENTDTVDEYPRFDRLEHRVLKEPIEE	Z 3 Z
pCI305	173	MNYNQYEHYSYKGGRREEQVEAYRNPTISMRELREMTDTVDEYPRFDRLEHRVLKEPIEE	232
pAH33	173	MNYNQYEHYSYKGGRREEQVEAYRNPTISMRELREMTDTVDEYPRFDRLEHRVLKEPIEE	232
pCIS3	173	MNYNQYEHYSYKGGRREEQVEAYRNPTISMRELREMTDTVDEYPRFDRLEHRVLKEPIEE	232
pDR1-1	181	MNYNQYEHYSINKGGREIAEQVEAYRNEISLIPVKELEIVILTUNUNVEPOSLEITWULEIKELEE	24C
pDR1-1B	233	INENTSFNVTYDKIKKGRSIDSIVFHITKKRRADDNSYKLEDKDYQSDKEEKSRNEADLL	292
pCI305	233	INENTSFNVTYDKIKKGRSIDSIVFHITKKRRADDNSYKLEDKDYQSDKEEKSRNEADLL	292
pAH33	233	INENTSFNVTYDKIKKGRSIDSIVFHITKKRRADDNSYKLEDKDYQSDKEEKSRNEADLL	292
pCIS3	233	INENTSFNVTYDKIKKGRSIDSIVFHITKKRRADDNSYKLEDKDYQSDKEEKSRNEADLL	292
pDR1-1	241	INAHTSFNYTYDKIKKGRSIDSIVFHIEKKHMADDNSYKLDNRAYGEDKKONE-TDNRLL	299
1			
pDR1-1B	293	N-OAMESKYTRLLIENFLLSPLEMTDTALMAGLOKNVYPLYDELKELRGLNGVKDHLSYT	351
nCI305	293	S-DAMESKYTRLLIENFLLSPLENTDTALMAGLOKNVYPLYDELKELRGLNGVKDHLSYT	351
pC1505	293	-DAMESKVTRLLTENELLSPLEMTDTALMAGLOKNUVPLVDELKELRGLNGVKDHLSVT	351
p/1155	293	COMPSEVERITEMELI SPLENTDTALNAGLOKNUVPLVDELKELRGINGVKDHI SVT	351
pC135	300	ACRESS REPORT A TRANSPORTED AND A DEPARTMENT OF A DEPARTMENT AND A	350
pDR1-1	200	warenduk i interrituk manji ni interrituk nanjika (i mi neminjika manja konsela ik	2.73
DD1_1D	353	CONTRANCED NUMBER OF TROM DOWNDODD ND	385
PDK1-1B	322	DONNEN IONNIVAN I ENATEONI DESURDODI NELE	385
pC1305	332	DOWNERS WORDS WAT AND TROVID DEVELOPMENT OF	386
pAH33	352	SSKKLAYSKRIVAKYLKKAI EUYLPTVKRUDLNH-B	386
pCIS3	352	SSKKEAYSKNNVAKYLKKAIEQYLPTVKRQDLNH-B	386
pDR1-1	360	ASKKEAYSKRNVAKYLKKAIEQYLPTVRLDDIEQPERAKVRGKGASHE	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, pCl305 (Haves *et al.* 1991), pAH33 (0

The complete plasmid sequences of pDR1-1, pDR1-1B, pCl305 (Hayes *et al.* 1991), pAH33 (O'sullivan *et al.* 2000), and pClS3 (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/修飾の認識ザブユニッ 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御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℃で静置培養した。E. coli は、LB 培地を用いて 37℃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℃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, 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。

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℃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45秒,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。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 rightwardand 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)アニーリング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 を認識するフォワードプライマー 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 Nrul 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

pBlb1 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

Primer	Gene target	Fragment size (bp)	Sequence	
		445 bp		
Pc1	upstream sequence		AACGCTCTAAAAAATCGATTTAAGCGA	
	of <i>ori</i>		* containing a substitution (boldface) generating	
			a BanIII site	
Pc2	AT-rich box in ori		AAAGAATTCGCGATAAATATATATATAGGC	
			* containing six substitutions (boldface) generating	
			a NruI and an EcoRI site	
		1,100 bp		
Pv3	AT-rich box in ori		ATATTATGCATATATATTTTAATCTTTTGTTCTTTTG	
			* containing four substitutions (boldface) generating	
			an EcoT22I site	
Pv4	consensus sequence		TTTATCCTCGAGCTTGTAGCTGTTATCATCTGC	
	in <i>repB</i>		* containing three substitutions (boldface) generating	
			an XhoI site	
		466 bp		
Pc5	consensus sequence		CAGCTGCAGGCTCGAGGATAAAGATTATCAATCCGA	
	in <i>repB</i>		* containing five substitutions (boldface) generating	
			a PstI site and an XhoI site	
Pc6	d o u n s t r e a m sequence		CTGGAGAGTATCATCTGCTTCATCAATA	
	of <i>repB</i>			
			\checkmark	
GAA	******	AGGCGAAGCOTAT	ATATATATTTATCTTATATATTTTAATCTTTTA 62	
→	← P	22: 3'-CGGATA	AT-rich box TATATATAAATAGCGCTTAAGAAA-5'	
			► Pv3: 5'-TATATATTTTAATCTTTATTCTTT	
3 170	TTTTGCGTCAAAA	AAAAATCAATATT	44 TTCAAGGCTTTATAGAATTA <u>TATACCAACAAAA</u> 124	
5 440	TGTGTATATACCA	ACAAAAAACTGTG	CATACACCAACAAAAAACTGT <u>GC</u> ATATACCAAC 186	
		22-bp repeats	IRI	
7 110	TTTGTTTGTTTCG	TEGTATATAATG	ATATAATAAAAGCATGAAGAATCTCTCTXCGAA 248	
ало Ало	IR2	ІКІ ТТАТСТАААСТСА	CTCACAAAGGAGCAGTTTTCTATGTCTAGTATA 310 RBS RepB M S S I	
			-	

Table 3.	Oligonucleotide primers and probes used in this study

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'-AACGCTCTAAAAATCGATTTAAGCGA-3'), Pc2, and Pv3 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 AAGTGTTTCTTCATGCTTATCTAAACTCACTCACAAAGCAGCAGTTTTCTATGTCTAGTATA RBS RepB $\stackrel{\mbox{\scriptsize transform}}{\longrightarrow}$ M S S I

TTGAATTAGCCGTGTCTTGTATTAATACCGAAGAACCACCCAAAGATCATACGGTTTATCTC LAVECINTEEPPKDHT W. Y. TCAAAAGAAGTGTTTGCCTTTTTTAAGGTATCTGATAATGACAAACATAGTGGTTTTAA SKEELFAFFKVSDNDKHSRFK ACAAGCAGTAGAGAATATOCAAAAACAAGCCTTTTTTCAAATTAAAGAAGAAGTAGGTAAAG A V E N M O K O A F F O I K E E V G K G GATTTAAATTTAGGAGTATTGTTCCCATTCCATATGTCGAGTGGACAGATTATCATGATGAC FKFRSIVPIPYVEWTDYHDD GTAAAAATTGAATTTCATOGTGAAATCATGCCCTACTTAATTAAPCTAAAACAAAATTTCAC F HREIM P Ϋ́. T NLKQNF

GCAACATGCTTTGTCTGATATTGCAGAGCTGAATAGCAAATACTCTATTATCTTGTACCGTT O H A L S D T A E L N S K Y S T T L 100 - 160 H. \mathbb{N} Y N Q Y E H Y S Y K G G R CAAGTGGAAGCCTACCGCAATCCTACCATTTCAATGCGAGAATTACGAGAAATGACGGATAC O V E A Y R N P T I S M R E L REMT D . TP. AGTTGATGAATACCCCCCCCTTTGATAGATTAGAACATAGAGTTTTAAAAGAACCAATAGAAG V D E <u>Y P R F D R L E H R V L K E P I E E</u>

GATTCTATTGTCTTTCATATCACGAAAAAAACGTCGAGCAGATGATAACAGCTACAAGTTAGA D S I V F H I T K K R R A D D N S Y K L E $\leftarrow PV4_4 3' - CGTCTACTATTGTCGATOTTCGAGCTCCTATTT - 5'$ 1001

 $\rightarrow Po5_{4} 5' - CAGCTGCAGGCTGGA$

AGATAAAGATTATCAATCOGACAAAGAGGGAAAAATCAAGAAATGAAGCTGACTTATTAAAAC D K D V O S D K E E K S R N E A D L L K Q GGATAAAGATTATCAATCCGA-3'

AGGCAATGGAAAGCAAGTACACAGGATTATTGAATGAAAACTTTCTCTTATCCCCTCTTGAA A M E S K Y T R L L I E N F L L S P L E ATGACGGACACGGCACTTATGGCAGGTTTGCAAAAGAACGTCTATCOGTTGTATGACGAGTT M T D T A L M A G L Q K N V Y P L Y D E L AAAGGAATTAAGAGGATTGAATGGGGTCAAAGACCACTTGTCTTATATATCTAGCAAAAAAG LRGLNG VKDHLEY IE 5 K E. E 100 AAGCCTATTCTAAACGCAATGTAGCGAAGTATCTGAAAAAAGCAATCGAGCAATATCTACCT Y S K R N V A K V L K K A T E O V L P <u>n</u> – ACGGTTAAAAGGCAGGACTTAAACCATGAGTGAGAACTTAAAAACGATTAAAGAGTTGGCTG TVKRODLNHE ATGAGTTGGGCGTATCAAAAAAGAAAATTCATTATCAAGTATCTAAATTAGATAGTGATTTG ATACAAAAATTAGACGCCACTATATATCTAGATAATAGGGCTATAACAGCA 1601

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。

Po6



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 Nrul and Xhol 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 × 10³ CFU だった。pDR1-1B 非保有菌 の判定は,pDR1-1B の hsdS 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 10¹⁰ 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℃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℃ 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℃ 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 をエシジウムブ 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'-AATTAACCCTCACTAAAGGG-3'を用 いて,8つの pCV(X)のインサートの DNA 配列をシー クエンスで確認した(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*.





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・

Stain and	Plasmid	Plasmid size	Properties	pCV (X)	No. in Fig. 10	
L. lactis DRC	1					
pDF	R1-1	7.4kb	unknown	pCV1	1	
pDF	R1-1B	7.3kb	unknown	pCV5	2	
pLa	c-DRC1	50kb	Lac ⁺ , prt ⁺	pCV28	3	
L. lactis 527						
pLa	c-527	50kb	Lac ⁺ , Prt ⁺	pCVL3	4	
L. lactis NIAI	712					
pAG	36	8.7kb	unknown	pCVm6	5	
pAG	33	50kb	unknown	pCVL1	6	
pLa	c-Prt	55kb	Lac+, Prt+	pCVL10	7	
L. lactis N7	L. lactis N7					
pCit	-712	8.3kb	Cit ⁺	pCVc8	8	

Table 4. Origin of pCV (X)

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

39

host		
strain	plasmic	. ∀
	pDR1-1B	ATAAAAAATAGGCGAAGCCTATATATATATTATCTTATATATTTTAATCTTTTATCTTTT
DRC1	pCV5	ATAAAAAATAGGCGAAGCCTATATATATATTTTATCGTATATATTTTAATCTTTTATTCTTTT
	pCV28	ATAAAAAATAGGCGAAGCCTATATATATATTTTATCGTATATATTTTAATCTTTTATTCTTTT
	pCV1	ATAAAAAATAGGCGAAGCCTATATATATATTTTATCGTATATATTTTAATCTTTTATTCTTTT
527	pCVL3	
712	pCVm6	
/12		
N7		
11/	peveo	***************************************
	pDR1-1E	3 GCGTCAAAAAAAAATCAATATTTTCAAGGCTTT ATAGAATTATATACCAACAAAAAACTGTG
DRC1	pCV5	GCGTCAAAAAAAATCAATATTTTCAAGGCTTTATAGAATTATATACCAACAAAAAACTGTG
DRUI	pCV28	${\tt GCGTCAAAAAAAAATCAATATTTTCAAGGCTTTATAGAATTATATACCAACAAAAAACTGTG$
	pCV1	${\tt GCGTGAAAAAAAGTCAGTATTTATAGGCTTATACAAATTTTTATAGCAAGAAAAAACTATG}$
527	pCVL3	${\tt GCGTGAAAAAAAAGTCAGTGTTTTCAAGGGTGTACAGATTTTAATACCTAGAAAAAAAA$
	pCVm6	GCGTGGGGAAAAAGTCAGTGTTTTCAATGTAATTCGAGTTTATAGGTGTAGAAAAAACTGTG
712	pCVL1	GCGTGCTAAAAAAATCAGTGTTTATAGGGTTTCACAGAATTATATACCAACAAAAAACTGTG
	pCVL10	GCGTGAAAAAAAAGGCAGTGTTTTCGCTAGTTATAGAAATTAAACAGTCACAAAAATCGATG
N7	pCVc8	GCGTGAAAAAAAAGGCAGTGTTTTCGCTAGTTATAGAAATTAAACAGTCACAAAAATCGATG
		**** ***** ** * * * * * * * * * * * * *
		>
DD C1	PDRI-IE	
DRCI	pCVJ	
	pCV20	TATATAGCAAGAAAAAACTATGTATATAGCAAGAAAAAACTATGTATATAGCAAGAAA-AAA
527	DCV13	CTTATACCTAGAAAAAACAATGCTTATACCTAGAAAAAACAATGCTTATACCTAGAAAGGTA
	pCVm6	TATAGGTGTAGAAAAAACTGTGTATAGGTGTAGAAAAAACTGTGTATAGGTGTA-GAAAATA
712	pCVL1	CATATACCAACAAAAAACTGTGCATATACCAACAAAAAACTGTGCATATACCAA-CTTCTTT
	pCVL10	${\tt TATAGAGTCACAAAAATCGATGTATACAGTCACAAAAATCGATGTACACAGTACGACT}$
N7	pCVc8	${\tt TATAGAGTCACAAAAATCGATGTATACAGTCACAAAAATCGATGTACACAGTACGACT$
		** * **** * ** ** * ***** * ** *
		S GTTTGTTTCGTTGGTATATAATGATATAAAAGCATGAAG-AA TCTCTCTACGAAAAGTG
DRC1	pCV5	GTTTGTTTCGTTGGTATATAATGATATAATAAAAGCATGAAG-AATCTCTCTACGAAAAGTG
	pCV28	GTTTGTTTCGGTGGTATATAATGATATAATAAAAGCGTGAAG-AATCTCTCTACGAAAAGTG
507	pCV1	CTATAAAAACTTGCTGTATTATGATATAATAAAAGCATAGAGAAAATTC-ACGACGAAATGA
527	pCVL3	ATTGTGTTACTAGGCATATAATGATATAATAAAAGCATAGAGAAAA-TC-TCGCTAAAGTTT
712	pCVm6	${\tt TTCGGAATACTATACTTGTTTTGATATAAAAAGCATGAAGAAAAAACCTTTTGCAGAGCA$
/12	pCVL1	${\tt GTTT}{\tt GTTT}{\tt G}{\tt GTTT}{\tt G}{\tt G}{\tt T}{\tt A}{\tt T}{\tt A}{\tt A}{\tt A}{\tt A}{\tt A}{\tt G}{\tt C}{\tt A}{\tt A}{\tt A}{\tt C}{\tt C}{\tt C}{\tt A}{\tt A}{\tt A}{\tt A}{\tt A}{\tt G}{\tt G}{\tt G}{\tt A}{\tt A}{\tt A}{\tt A}{\tt G}{\tt G}{\tt G}{\tt A}{\tt A}{\tt A}{\tt A}{\tt G}{\tt G}{\tt A}{\tt A}{\tt A}{\tt A}{\tt A}{\tt G}{\tt G}{\tt A}{\tt A}{\tt A}{\tt A}{\tt A}{\tt G}{\tt G}{\tt A}{\tt A}{\tt A}{\tt A}{\tt A}{\tt A}{\tt G}{\tt G}{\tt A}{\tt A}{\tt A}{\tt A}{\tt A}{\tt A}{\tt G}{\tt A}{\tt A}{\tt A}{\tt A}{\tt A}{\tt A}{\tt A}{\tt A$
N7	pCVL10	TTTGTATTTGTGTACTGTATATAGTATAATAAAAGCATAGAGAAAACTCACTATGAAATGAC
1 ()	pCVc8	TTTGTATTTGTGTACTGTATATAGTATAATAAAAGCATAGAGAAAACTCACTATGAAATGAC
		* * * * * * * * * * * * * * * *
	• DD1 15	
	PDRI-IE	
DRC1	pCV3	
	pCV20 pCV1	CTTCTCTATGCTTAGCCAAAATTACTCA-TAAGGAGCAACTTCTCATGGA
527	InCVL3	CTTCTCTATGCTAGACCAAAATTACTCA-TAAGGAGCAACTTCTCATGGA
541	IpCVm6	TTTCTTCATGCTTAACCAAAATTACTCACAAAGGAGCA-ATTACTATGTC
712	pCVI.1	TTTCTTCATGCTTATCTAAACTCACTCACAAAGGAGCAGTTTTCTATGTC
/ 14	pCVL10	TTTCTCTATGCTACTACTAAAACACGCAAAGGAGCGTATTTATACTATGAT
N7	pCVc8	TTTCTCTATGCTACTACTAAAACACGCAAAGGAGCGTATTTATACTATGAT
	-	**** **** * * ** ***** ** *

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) $^{\text{ER}}$, DRC1 (including pCV5) $^{\text{ER}}$, 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

L._____ O. C.____ 6.1 kb (C. C.)____

pCV5 pCV1 pCV28 pCVL3 pCVm6 pCVL1 pCVL10 pCVc8

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

Tested plasmid	Transformation efficiency *	Em ^R colony	Em ^R colony	EmR colony
Testeu plasililu	Transformation enterency	at T = 0 **	at T = 5 **	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	$1.2 \ge 10^5$	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

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

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⁹⁷⁷。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 化やプロティ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のかもしれない。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気成分として好まれ, 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℃) 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 のデリーションプラスミド pBE1 は, pDR1-1のEcoRI – BgIII 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℃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、一晩培養した定常状態の供試菌培養液 10 ml を, あらかじめ 30℃に加温した新鮮な TYG 培地 に植菌し,30℃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回繰り返し



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* operonlike 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. Jactis Strains and Plasmid
--

Strains and Plasmids	Properties	References or sources
Strains		
Lactococcus lactis ssp. lactis		
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 et al., (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	E. coli, B. subtilis, L. lactis shuttle	
	vector, Em ^R , Cm ^R	van der Vossen et al., (1985)
p8Em1	pUC118 containing pAM β 1 Em ^R gene	Ito et al., (1992)
pDR1-1	7.4 kb θ -plasmid from <i>L</i> . <i>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 BglII – 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 Hincll 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, Sacl 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Table2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 ター配列を伴わな 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。

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

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

1 2 pDR1-1-like plasmid pDR1-1 (7.4 kb)

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 r	ate (µ) of La	actococcus	lactis strains
		N /		

Strains	Presence of pDR1-1 ^{a)}	μ (h ⁻¹) ^{b)}	Generation (T, min)
L. lactis DRC1	+	0.853 (± 0.044)	49
DRC1021	-	1.14 (± 0.032) ^{c)}	36
L. lactis 13675	+	0.933 (± 0.054)	44
L. lactis N7	-	1.22 (± 0.029) °)	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 (+ S, D.)

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



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、60kb、 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、デリーションプラスミド 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。

pDRI-1 がコードする hsdS (hsdS/pDRI-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/pDRI-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. lactis13675 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 µ1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-phthaldialdehyde) 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 1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5mlで一晩培養後、1mlの0.5%クレアチン と、試験直前に調製した1mlの2.5M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 孫種区よりも早 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∆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

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

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

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 $^\circ\!\mathrm{C}$

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 pDR1-1 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 diacetylactis として区別されている $^{15)}$ 。diacetylactis 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 permiase: 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ゾーム支配である^{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 diacetylactis 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⁴⁰。

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 diacetylactis 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もいる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。

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, fastcoagulation-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8.9kb 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を形成し,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 Notl, Apal, および Smal 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 エレメントと共に複合型トランスポゾン を形成し、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 NCD0712 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 NCD0712 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9kb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て 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、シークエンス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 てシークエンス反応し, 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 µ1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。

Strain or Plasmid	Properties	Reference or source
Lactococcus lactis		
NIAI712	Wild type	Lab. Collection
MG1363	Plasmid-free derivative of NCDO712	Gasson et al., (1983)
∆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 et al. (2007)
pDB1	shuttle vector for E. coli and L. lactis.	
	Partial replicon of pDR1-1B with an EmR gene	
	cloned into pBluescriptII, ApR, EmR	Kobayashi et al. (2007)
pCVm6	Competitor to pAG6. An incompatibility	
	determinant of pAG6 cloned into pDB1, EmR	
	(strongly incompatible with pAG6 and unstable)	Kobayashi et al. (2007)
pAG6dR	A competitor to pAG6. A truncated-rep and ori of pAG6	This study
	with an EmR gene cloned into pBluescriptII, ApR, EmR	
	(weakly incompatible with pAG6)	
p8Em1	pUC118 containing pAM β 1 EmR gene	Ito and Sasaki (1994)
EmR, resistance to erv	vthromvcin: ApR, resistance to ampicillin	

Table 10.	Lactococcus	lactis	strains	and	plasmids

Emk, resistance to erythromycin; Apk, resistance to ampicini

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 1の培養液を40 ml TYG リシス培地に接種して、30℃ 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。菌は減菌蒸留水で2回洗浄 し,100 μ 1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℃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 Analysis)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 のクロモゾ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)

Strain	Lactococcus lactis
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 much probes × 2,533 (111,452)
Probe size	24 mer

Table 11. Microarray specification

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 μ1のキャスティングモール 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ィナーゼ K バッファーに移 し、55℃で一晩インキュベートした。プロティナーゼ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	cadA		TTGCCAGGAGTTACGAGTGCAACAGT
CdAR	cadA	1200	TGGTTGCAATGAAATCCGTTACGACA
HsF1	hsdS in pAG6		GGGGTTATTATCTAATTATAGACC
HsR1	hsdS in pAG6	690	TCGGTTCATTCTTTAAACAGCTGG
HsF2	hsdS-homolog		AAAATGTTCCCTAAAAATGGT
HsR2	hsdS-homolog	552	AAACATCTTTTGTAAAAAGCC
LGF1	lacG		GAATGCCACAAGCGTCATGTTGAACC
LGR1	lacG	1000	TGACCATGAGAAAACGTCCATAAGTG
763prF	prtP		ACATGTCCTTAGGATCTGATTCAG
763prR	prtP	950	TTGATTGGCTGGGCAGTATTCATC
OpAF	oppA		ACTCCTAAGTGCTTGTGGTTCTAA
OpAR	oppA	1700	TCAAGCGTCATTCCAACTACACG
OpDF	oppD		CACTCACTGCGCTTAATCCATTGATG
OpFR	oppF	790	TCTGTCACTCGATTAAAGAAACCA
OpCF	oppC		TCTAGTTGCTGTCTTTCTAATCGT
OpCR	oppC	770	GCCACTCGTCTTAGTGCATTTCCG
S1F	tnpS1		GCGCCCTCTATTGGTTCTGCATTTAG
S1R	tnpS1	162	GGTTGAGGCAGTTCGTAGACTTCGAT
981F	tnp981		TAACCGAGGAATCTATGGTGCTCCTA
981R	tnp981	157	GTGATCACTTAGTGAGTATCCAGGCT
982F	tnp982		CCTCTTACCGAGTATCCAAGTCATTC
982R	tnp982	154	GCCAACATTTGCATAATCTCCAAGAC
1077F	tnp1077		TAAATTGCACAGACGCTTCAGAACTT
1077R	tnp1077	156	GAGATATGATAACTAATCACCTCGCT

次に1 ml の ApaI 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 ApaI 20 ユニットを含む 200 μ l の ApaI 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 ApaI 20 ユニットを 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% シュークロース、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 × 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、 スウィッチングタイム 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 × TBE 21 を 用いた。サイズマーカーとしてファージ入コンカテマー 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) を用い, 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 Dignostics, 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 × SSC, 0.1% SDS, 室温5分間2回, 0.5 × 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



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, ΔpAG6 variant (*L. lactis* NIAI712 eliminating pAG6 and pCVm6)

レ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(ΔpAG6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ΔpAG6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、ΔpAG6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

1 2 3 4



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。ΔpAG6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、ΔpAG6株のカゼイン資化能力を試験するために、 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 hsdS 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 hsdS の 5' 側にはプロモーター配列が無く、orf588、

Table 13.	ORF encoded	l by pAG6
-----------	-------------	-----------

Gene name	repB	orf588	orfX	hsdS	cadC	cadA
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)と転写レプ レッサー (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 μ M CdCl₂ 添加培地で生育したが、Δ pAG6 株は 20 μ M 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能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)に関与する 10 遺伝子, ii) プロティナーゼ活性 (Prt) に関与する 10 遺伝子, iii) オリゴペプチドトランスポーター (Opp) に関与する 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), 菌体外プロティナーゼ遺伝子 (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∆ 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	cadA	hsdS(pAG6)	hsdS	lacG	prtP	oppA	oppD
L. lactis ssp. cremoris							
NIAI712	+	+	ND	+	+	+	+
MG1363 (plasmid-free)	-	_	+	-	-	+	+
712d35 (ΔpAG6)	_	-	+	+	+	-	-

+ a specific amplicon could be obtained by PCR

no product could be amplified

ND, not done



Fig. 24. Construction of Lac-operon and Opp-PepOoperon. 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∆ 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 のプローブは,最も大きい 55 kb のプラスミド pLacPrt を認識し (data not shown), oppC プローブは 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∆ pAG6 株のクロモゾームの解析

Apal 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



1 2 3

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 DpAG6 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∆ pAG6 株の insertion sequence (IS) エレメントの解析

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 エレメントと共に複合型トラ ンスポゾンを形成してゲノム内を頻繁に転移し、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 Δ pAG6 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エレメント(ISS1, IS1077, IS982)の転移と関係があると予想し, L. lactis NIAI712とΔ pAG6株の IS エレメントの位置をサザン 解析で調べた (Fig. 26)。サザン解析のプローブは, tnpS1, tnp1077, tnp982の配列をテンプレートして合成 した。その結果, tnp982 プローブのハイブリパターン がL. lactis NIAI712 とA pAG6 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* プローブで認識されたが, Δ pAG6 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Δ pAG6 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* プローブは, pLacPrt を認識した。*tnpS1* と, *tnp1077* プローブによ るサザン解析では, *L. lactis* NIAI712 とΔ pAG6 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ィールは、親株のL. lactis NCD0712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Δ pAG6 株は,発酵遅延の表現型を示 す。野生株とΔ pAG6 株のゲノム遺伝子を ApaI 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∆ pAG6 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、Δ pAG6 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。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7kb 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1µ1の cDNAを用い、20µ1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℃で10分間変性した後、変性95℃で15秒、伸長 60℃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ApAG6 (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 1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で比較した(Fig. 28)。すなわ ち,野生株 L. lactis NIAI712 の発現量を 1 として,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 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.</p>

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 エレメントを含み, 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 エレメントを調べたとこ 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120kb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 エレメントは 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エレメントの転移活性が、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 培地で培養しすると、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* NCDO712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_oS)で 機能し、DNA切断にはM2SR2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 エレメントの 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、プロティナーゼ活 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9kb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 ∆ 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 712Δ 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∆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 ssp. 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?という仮説は飛躍し 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 査した。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,ファ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

- Alpert, C. A., Crutz-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.
- 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.
- 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.
- 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.

- 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.
- 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.
- Cedar, H. (1988). DNA methylation and gene activity, Cell, 53, 3-4.
- Chattoraj, D. K.(2000). Control of plasmid DNA replication by iterons: no longer paradoxical, Mol. Microbiol., 37, 467-476.
- 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 restrictionmodification system influences the level of expression of its own gene, J. Bacteriol., 186, 287-295.
- (15) Collins, E. Ba nd Harvey, R. J. (1962). Failure in the production of citrate permiase in Streptococcus diacetylacti, J. Dairy Sci., 45, 32-35.
- 16) Corneau, N., Dube, C., LaPointe, G. and Emond, E. (2001). A coelectroporation method for the isolation of criptic 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 insertdion sequences, J. Bacteriol., 180, 4834-4842.

65

- Davidson, B. E., Kordias, N., Dobos, M. and Hillier, A. J. (1996). Genomic organization of lactic acid bacteria, Antonie Van Leeuwenhoek, 70, 161-183.
- Davis, M. A., Martin, K. A. and Austin, S. J. (1990). Specificity switching of the P1 plasmid centromerelike 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 Hernàndez, M. E. (2000). Plasmid effects on Eschericha coli metabolism, Critical Reviews in Biotechnology, 20, 79-108.
- 25) Efstathiou, 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.
- Ferretti, J. J. and Curtiss, R.III(1987). Streptococcal genetics. Washington, D. C.: American Society for Microbiology.
- 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 Lactococcin 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.
- 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 *a*-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, 9 th 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) Kempler, 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) Kempler, 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 restrictionmodification 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 lactococcin 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 Bourgeouis, 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.
- 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 morecular

characterization of Lactococcus lactis from milk and plants, J. Appl. Microbiol., 101, 396-405.

- 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.
- Pedersen, M., Arnved, 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, Emarging 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.
- 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.a nd 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 restrictionmodification 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. Micribiol., 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 Eschericha 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 concatemaers 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 Researh 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 diacetilactis 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 diacetilactis 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