

機関番号：84421

研究種目：若手(B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21780105

研究課題名(和文) 異種生物由来の遺伝子を発現するためのコドン同調化大腸菌の開発

研究課題名(英文) Generation of codon-synchronized *Escherichia coli* for expression of heterologous genes

研究代表者

駒 大輔 (KOMA DAISUKE)

地方独立行政法人大阪市立工業研究所・研究員

研究者番号：80443547

研究成果の概要(和文)：

3種類の手法(Red 相同組換え、FLP/FRT 部位特異的組換え、および P1 形質導入)の最適な組み合わせにより、大腸菌の染色体 DNA の任意の位置に自由自在に多数の遺伝子を導入する技術を開発した。遺伝子発現に関するプロモーターのバリエーションを作製することで、染色体 DNA 上に挿入した遺伝子の発現量を制御することも可能となった。挿入する遺伝子のコピー数、プロモーターの種類、挿入位置の3つの条件を調整することで遺伝子発現量の厳密な制御を行うことができ、大腸菌の tRNA の発現量を自由に調整するための基盤技術が整った。したがって、本研究で作製した手法を用いることで、大腸菌のコドン使用頻度を自由に改良し、コドン同調化大腸菌を作製することが可能である。

研究成果の概要(英文)：

Combination and optimization of three method, Red recombination, FLP/FRT recombination, and P1 transduction, allowed us to insert multiple genes into favorite loci of *E. coli* chromosome. The promoter variant was also developed, so that the inserted gene expression could be regulated. Three elements for insert, which were copy number, promoter, and locus, allowed tight regulation of desired gene containing tRNAs. Thus, it is possible to develop a codon-synchronized *E. coli* by using this method.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2010年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農芸化学・応用生物化学

キーワード：微生物、バイオテクノロジー、ゲノム、コドン、大腸菌、染色体挿入

## 1. 研究開始当初の背景

大腸菌は遺伝学的・生化学的に最も解明されている生物種のひとつであり、異種生物由来の遺伝子を発現させるための宿主株としてよく用いられる。しかしながら、異種生物由来の遺伝子を大腸菌で発現させた場合、タンパク質の正常なフォールディングが行われ

ず、不活性型のタンパク質として発現する場合がある。その主な原因のひとつは、大腸菌と異種生物間でのコドンの使用頻度の違いである(コドンバイアス)。したがって、異種生物由来の遺伝子を大腸菌内で正常にフォールディングさせるためには、コドンバイアスを大腸菌と異種生物間で同調させるこ

とが重要である（コドンの同調化）。したがって、宿主株の改良によりコドンの同調化を行い、異種生物由来の遺伝子を簡便かつ網羅的に活性型タンパク質として発現可能な大腸菌発現システムを開発することは、ゲノムや遺伝子情報を活用した網羅的な遺伝子発現ライブラリーの構築が可能となり、基礎研究や応用研究、ならびに産業利用において有益なツールとなる。

## 2. 研究の目的

### <全体構想および目標>

宿主株の遺伝子工学的な改良によりコドンの同調化を行い、異種生物由来の遺伝子を簡便かつ網羅的に活性型タンパク質として発現可能な大腸菌発現システムを開発することを最終的な目的とする。生物の各遺伝子は、コドンの適切な配置により翻訳速度が調節され、その結果、タンパク質の正常な立体構造が形成される。しかしながら、通常の大腸菌発現系では異種生物の mRNA の翻訳速度が乱れて、タンパク質の正常なフォールディングが妨げられる。そこで、コドン同調化大腸菌では、遺伝子発現時期に翻訳速度を適正化することにより、正常なフォールディングを促進させる。そのために、①大腸菌染色体上に自由自在に遺伝子を挿入する技術を開発する、②挿入遺伝子の発現量を調整可能とする、ことでコドン同調化大腸菌を作製するための基盤技術を開発することを目的とする。

## 3. 研究の方法

### (1) 1 遺伝子挿入法の開発

大腸菌の遺伝子破壊方法である Datsenko らの手法 (Datsenko *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97:6640-5, 2000) を改良し、染色体 DNA 上への簡便な遺伝子挿入方法を開発した。pET21a および pET21d プラスミドの *Bgl*III サイトに FRT-Km-FRT フラグメントを挿入し、pET21a-FRT および pET21d-FRT プラスミドを構築した。同様に pETDuet プラスミドの *Cla*I サイトに FRT-Km-FRT フラグメントを挿入し、pETDuet-FRT プラスミドを構築した。それぞれのプラスミドのマルチクローニングサイトに導入したい遺伝子をクローニングした後、FRT-Km-FRT サイトと遺伝子を含むフラグメントを PCR で増幅し、Red-recombinase を用いた手法で染色体 DNA 上の任意の位置に目的遺伝子を挿入することを可能とした。

### (2) 多重遺伝子挿入法の開発

上記で開発した 1 遺伝子挿入法、FLP/FRT recombination、および、P1 transduction を組み合わせることにより、大腸菌染色体上に複数の遺伝子を自由自在に導入する手法を開発した。作製したさまざまな 1 遺伝子挿

入株の染色体上の目的遺伝子を含むセグメントを P1 transduction により、別の目的遺伝子を染色体上に有する大腸菌に導入することで 2 つの目的遺伝子を染色体上に有する大腸菌を作製することを可能にした。大腸菌の選抜をカナマイシン耐性で行い、選抜・単離後にカナマイシンカセットを FLP/FRT recombination を用いて削除することにより、複数回の P1 transduction の施行を行い、複数の目的遺伝子を大腸菌染色体上に導入することを可能とした。

### (3) プロモーター領域の改良

pET21a-FRT のプロモーター領域を T7 プロモーターから T7 プロモーターバリエーションに変更することで、目的遺伝子を染色体 DNA 上に導入した場合に、発現量を調整することを可能とした。具体的には、*in vitro* での発現量が T7 プロモーターの 75%、30%、および 10% となるようなプロモーターを作製した (-4TC、-5CT、-8CT プロモーター)。さらに、IPTG 発現誘導型の T7 系プロモーター以外に、構成性プロモーター等 (*tyrR* プロモーター、*lacI* プロモーター、*tktA* プロモーター、*pgi* プロモーター) を含むベクターを開発し、染色体 DNA 上へ目的遺伝子を導入した際に、目的遺伝子の発現量を制御することを可能とした。

## 4. 研究成果

### (1) 1 遺伝子挿入法の開発

大腸菌の染色体 DNA に自由に遺伝子を挿入する手法を開発した (Fig. 1)。本手法の特徴は、PCR で導入断片を増幅するため、プライマー設計により染色体 DNA 上の任意の位置に遺伝子を挿入することができる点である。また、目的遺伝子の挿入とともに、不要な遺伝子を欠失させることが可能である。Fig. 1 に手法をまとめる。

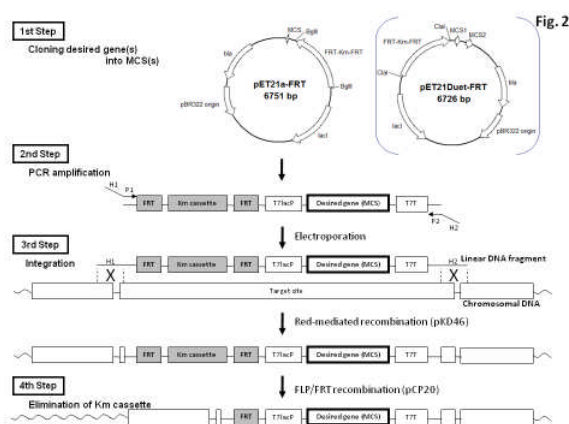


Fig. 1 1 遺伝子挿入方法

本手法は、はじめに作製した pET21a-FRT、pET21d-FRT、または pETDuet-FRT ベクターのマルチクロニングサイト (MCS) に、染色体 DNA 上に導入したい遺伝子をクローニングする。クローニングした遺伝子の upstream にフリパーゼ認識配列に挟まれたカナマイシンカセット (FRT-Km-FRT) が位置するように設計されており、最終的にカナマイシン遺伝子を酵母フリパーゼを用いて染色体 DNA 上から削除することで、カナマイシンマーカーのリサイクリングを行うことができる。プラスミド上に導入した遺伝子を、PCR によって FRT-Km-FRT 配列とともに増幅する。その際に、染色体 DNA 上の導入したい位置と相補的な配列 (50 ヌクレオチド) とベクターに固定の配列 (20 ヌクレオチド) から構成されるプライマーを用いることで、染色体 DNA 上の任意の位置に目的遺伝子を導入することが可能である。次に、PCR で増幅した DNA 断片をエレクトロポレーションで、 $\lambda$ ファージの Red recombinase を発現する大腸菌に導入し、相同組換えにより染色体 DNA 上に導入する。本手法を用いて、実際に遺伝子を染色体 DNA 上に導入し、目的とする遺伝子発現体が得られるか解析した。発現量の簡便性から、大腸菌 *lacZ* 遺伝子を染色体 DNA 上に挿入するモデル遺伝子とした。染色体上の 6 か所の位置 (*tyrR*, *acs*, *ackA-pta*, *mtlA*, *ybiYW*, *ascF*) に *lacZ* 遺伝子を挿入することに成功した。開発した手法を用いた場合には、ほぼ 100% の確率で目的位置に目的遺伝子を挿入することが可能であった。作製したそれぞれの株の *lacZ* 遺伝子の発現量を測定した結果、同じ遺伝子カセットを挿入した場合でも、挿入位置により発現量に差があるものの (Fig. 2)、染色体上で機能する形で導入することができた。

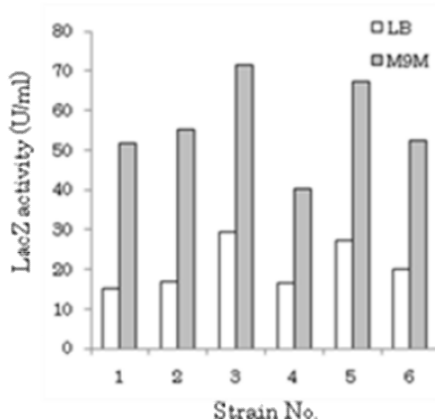


Fig. 2 1 コピー導入株の LacZ 活性

(2) 多重遺伝子挿入法の開発  
 上述の開発した 1 遺伝子挿入法では、目的遺伝子を複数挿入する場合、先に挿入した個所で相同組換えが起こることが明らかとなった。したがって、より確実に染色体 DNA 上に目的遺伝子を複数導入するために、Fig. 3 に示すような手法を開発した。本手法は、

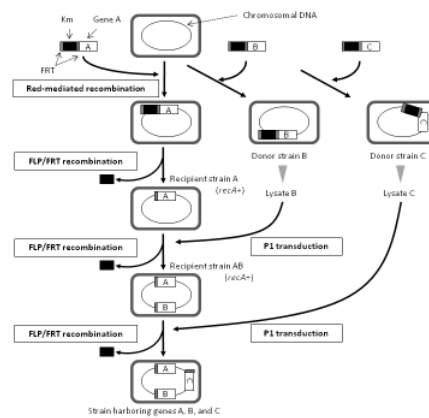


Fig. 3 多重遺伝子挿入法

Red-recombination と FLP/FRT recombination と P1 transduction を組み合わせた手法であり、理論的には 40 以上の遺伝子を導入することが可能である。また、種類の異なる遺伝子の多コピー導入は当然のことながら、同一遺伝子をコピー数を制御して複数導入することも可能である。本手法でははじめに、先に開発した Red recombinase を用いた 1 遺伝子挿入法で染色体 DNA 上のさまざまな位置に目的遺伝子を有する 1 遺伝子挿入株を作製する。次にアクセプターとなる菌株のカナマイシンカセットを FLP/FRT recombination で削除する。ドナーとなる 1 遺伝子挿入株を P1 ファージで溶菌させ、その溶菌液を用いてアクセプター菌を処理 (感染) し、カナマイシン耐性選抜を行うことにより、ドナー菌に導入されていた遺伝子を有するアクセプター菌を得ることができる。この操作を繰り返すことにより、目的遺伝子を多数染色体 DNA 上の有する菌株を作製することが可能である。

先に作製した *lacZ* 発現株 (1 コピー挿入株) を FRT/RLP recombination と P1 transduction を用いることで、遺伝子型を統合し、*lacZ* 遺伝子の多重挿入株を作製した。1~6 遺伝子を染色体上に有する菌株を作製し、その LacZ 活性を測定したところ、挿入する遺伝子数の増加に伴って活性の増大が確認された (5 遺伝子以上では発現はプラトーに達した) (Fig. 4)。染色体上に遺伝子を導入して発現させた場合、プラスミドを用いて遺伝子を導入した場合よりも高い菌体収率を示し、結果、培養

液あたりの LacZ 活性はプラスミドを用いた場合の3倍近くに達した。

SDS-PAGE で遺伝子の発現を解析した結果 (Fig. 5)、4 コピー挿入までは LacZ タンパク質がコピー数に応じて増加することが確認され、測定した LacZ 活性の結果と概ね一致した。

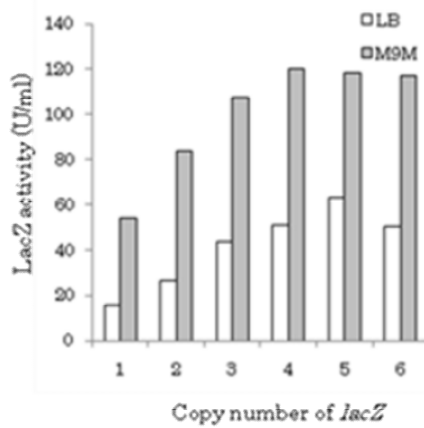


Fig. 4 多コピー挿入株の LacZ 活性

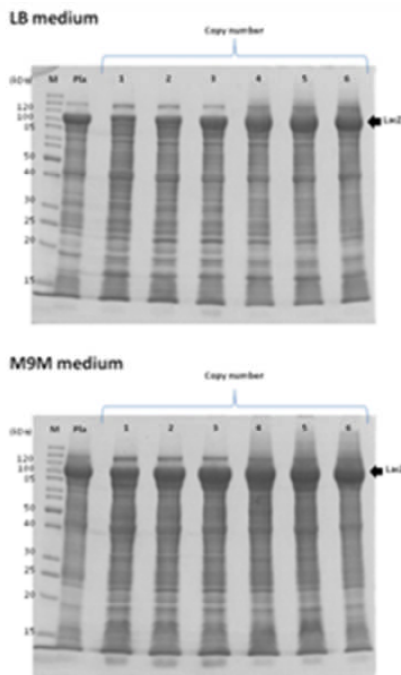


Fig. 5 多コピー挿入株の SDS-PAGE 解析

各種プロモーターおよび T7 プロモーターバリエーションを用いて、*lacZ* 遺伝子を染色体上に導入し、その活性を測定した。プロモーターには構成性プロモーターである *tyrR* プロモーターや *lacI* プロモーターなどを用いた。また T7 プロモーターのバリエーションとしては、プロモーター領域の塩基配列の一部を別の塩基に置換した (-4TC、-5CT、-8TC) ものを作製した。それらのプロモーターを導入したプラスミド (pET21a-FRT の改変プラスミド) に *lacZ* 遺伝子をクローニングし、染色体 DNA 上に導入して発現後、LacZ 活性を測定した。その結果、従来の T7 プロモーターを用いた場合と比較して、1%~75%までの範囲で、LacZ 活性を制御することが可能となった。また、先の多重遺伝子挿入法を適用し、プロモーターの活性と遺伝子の挿入コピー数で発現量を細かく制御することが可能となった。

### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[学会発表] (計 1 件)

- ① 駒大輔ら、大腸菌の染色体 DNA への目的遺伝子の挿入と代謝工学への応用、第 62 回日本生物工学会大会、2010 年 10 月、宮崎シーガイア

### 6. 研究組織

#### (1) 研究代表者

駒 大輔 (KOMA DAISUKE)

地方独立行政法人大阪市立工業研究所・  
研究員

研究者番号：80443547

#### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

#### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：

(3) プロモーター領域の改良