

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2006-14631

(P2006-14631A)

(43) 公開日 平成18年1月19日(2006.1.19)

(51) Int. Cl.	F 1	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 Z N A A	4 B O 2 4
C O 7 K 14/195 (2006.01)	C O 7 K 14/195	4 H O 4 5

審査請求 未請求 請求項の数 6 O L (全 20 頁)

(21) 出願番号	特願2004-194349 (P2004-194349)	(71) 出願人	899000057 学校法人日本大学 東京都千代田区九段南四丁目8番24号
(22) 出願日	平成16年6月30日 (2004. 6. 30)	(74) 代理人	100066692 弁理士 浅村 皓
		(74) 代理人	100072040 弁理士 浅村 肇
		(74) 代理人	100102897 弁理士 池田 幸弘
		(74) 代理人	100088926 弁理士 長沼 暉夫
		(72) 発明者	中嶋 睦安 東京都千代田区九段南四丁目8番24号 学校法人日本大学内

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 細胞外多糖産生調節遺伝子

(57) 【要約】 (修正有)

【課題】 ロドコッカス (*Rhodococcus*) 属細菌における細胞外多糖 (EPS) の合成に関する遺伝子の同定と機能解析。

【解決手段】 *Rhodococcus rhodochrous* からクローニングされた EPS 産生調節遺伝子及び上記 EPS 産生調節遺伝子によりコードされる EPS 産生調節因子。

【選択図】 なし

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

配列番号 1 で示される塩基配列からなる核酸、又は該核酸とストリンジントな条件下でハイブリダイズし、かつ細胞外多糖 (EPS) 産生調節機能を有するタンパク質をコードする核酸を含んでなる EPS 産生調節遺伝子。

【請求項 2】

該遺伝子がロドコッカス (*Rhodococcus*) 属細菌から得られたものである請求項 1 記載の遺伝子。

【請求項 3】

該遺伝子がロドコッカス・ロドキュラス (*Rhodococcus rhodochrous*) から得られたものである請求項 2 記載の遺伝子。

【請求項 4】

該遺伝子がロドコッカス・ロドキュラス (*Rhodococcus rhodochrous*) S-2 株から得られたものである請求項 3 記載の遺伝子。

【請求項 5】

配列番号 2 で示されるアミノ酸配列からなるタンパク質、又は配列番号 2 で示されるアミノ酸配列において 1 若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換、挿入若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ細胞外多糖 (EPS) 産生調節機能を有するタンパク質。

【請求項 6】

配列番号 2 で示されるアミノ酸配列をコードする単離された核酸、又は該核酸とストリンジントな条件下でハイブリダイズし、かつ EPS 産生調節機能を有するタンパク質をコードする核酸、を含んでなる EPS 産生調節遺伝子。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明はロドコッカス (*Rhodococcus*) 属に属する細菌の細胞外多糖 (EPS) 産生の調節に関与する遺伝子に関する。

【背景技術】

【0002】

ロドコッカス (*Rhodococcus*) 属細菌は、グラム陽性で高 GC 含量を有する、土壌や海洋に広く存在するコリネ型細菌の一種である。ロドコッカス属細菌は、石油系炭化水素、PCB 等多くの難分解性化合物に対して分解・資化能力を有することから環境浄化のために利用価値の高い細菌群である。

またロドコッカス (*Rhodococcus*) 属細菌は、酵素やバイオサーファクタントなど産業的に有用な物質の生産菌である等の理由からも利用価値の高い細菌群である。

【0003】

一方で、このロドコッカス属細菌はコロニー形態変化の激しい細菌としても知られている。このことは、自然環境中から単離されるものの多くがラフ型のコロニー形態を示すのであるが、継代培養中にラフ型からムコイド型への、又はムコイド型からラフ型へのコロニー形態変化が頻繁に観察されることから伺える。

【0004】

最近の研究結果から、このコロニー形態変化とロドコッカス属細菌の炭化水素分解活性との間に関連があることが分かっている。Whyteら (非特許文献 1) は、*Rhodococcus* sp. Q15 がディーゼルオイルを分解する際に細胞外高分子物質を生産してコロニー形態をムコイド型に変化させることを示した。また、Iwabuchiら (非特許文献 2) は同一菌由来のコロニー形態変異株を使った研究により、ラフ型株は石油感受性であるのに対し、ムコイド型が石油耐性であることを明らかにした。

【0005】

10

20

30

40

50

一方で、このコロニー形態変化は、微生物の界面への吸着にも大きな影響を与えている。同細菌はミコール酸を含有し細胞表面の疎水性が高い場合が多く、廃水処理場での培養障害の一つであるスカミングの原因菌であることが知られている。Sunairiら（非特許文献3）とIwabuchiら（非特許文献4）は、細胞外多糖（EPS）の生産性と細胞表面の疎水性との観点から、EPS生産性の上昇と、コロニー形態の変化・細胞表面への親水性の付与とが深く関連していることを明らかにし、またEPSの産生がスカミング形成を阻害することも示した。更に、Iwabuchiら（非特許文献5）は、微生物の応用的側面から、細胞外多糖（EPS: Extracellular PolySaccharide）が海洋での石油分解を促進するバイオリメディエーションに有効な物質であることを示した。

10

【0006】

EPSは多種類の微生物に比較的共通して見られる細胞外構成物の代表的なものの一つである。EPSは、微生物とその周囲の環境との相互作用に関与する重要な因子として考えられている。特に、ロドコッカス属に属する細菌により生産される細胞外多糖が海洋細菌の増殖を促進することが見出されている（特許文献1）。

【0007】

【特許文献1】特開2001-247601

【特許文献2】特許第2983602号

【非特許文献1】Whyte, L. G. et al. (1999) Appl. Environ. Microbiol. 65: 2961-2968

20

【非特許文献2】Iwabuchi, N. et al. (2000) Appl. Environ. Microbiol. 66: 5073-5077

【非特許文献3】Sunairi, M. et al. (1997) J. Appl. Microbiol. 82: 204-210

【非特許文献4】Iwabuchi, N. et al. Colloid Surf. B: Biointerface. 30, 51-60. (2003)

【非特許文献5】Iwabuchi, N. et al. (2002) Appl. Environ. Microbiol. 68: 2337-2343

【非特許文献6】Katz et al. J Gen Microbiol. 1983 Sep;129 (Pt 9):2703-14. Cloning and expression of the tyrosinase gene from Streptomyces antibioticus in Streptomyces lividans. Katz E, Thompson CJ, Hopwood DA

30

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0008】

海洋での原油の流出事故における流出油の除去については、機械的、化学的処理だけでは不十分であり、合成界面活性剤等の投与による化学的処理も行われているが、これはまた環境汚染等の二次的な問題を含んでいる。これらの代替手段としてバイオリメディエーションが検討されているが、自然の浄化力には限界があり、より効果的なバイオリメディエーション手段が求められている。

【0009】

ロドコッカス属細菌は石油系炭化水素等の分解・資化能力をもつことから、バイオリメディエーション手段としての利用が期待されている。ロドコッカス属細菌を有効利用する上で、EPS生産によるコロニー形態の変化とそれに伴う各種生理活性の変化を理解することが重要であるが、ロドコッカス属細菌におけるEPSの生合成系は未だ明らかではなく、EPS合成に関与する遺伝子の同定も全くなされていない。

40

【課題を解決するための手段】

【0010】

上述の従来技術を踏まえて、本発明者らは遺伝子導入系等を種々検討し、ロドコッカス・ロドキュラスS-2株のEPS合成に関連する遺伝子を単離・配列決定し、その機能が細胞外多糖（EPS）の産生を調節するものであることを見出し、本発明を完成するに至った。

50

【0011】

従って、本発明は以下の通りである。

(1) 配列番号1で示される塩基配列からなる核酸、又は該核酸とストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ細胞外多糖 (EPS) 産生調節機能を有するタンパク質をコードする核酸、を含んでなるEPS産生調節遺伝子。

(2) 該遺伝子がロドコッカス (Rhodococcus) 属細菌から得られたものである上記(1)記載の遺伝子。

(3) 該遺伝子がロドコッカス・ロドキュラス (Rhodococcus rhodochrous) から得られたものである上記(2)記載の遺伝子。

(4) 該遺伝子がロドコッカス・ロドキュラス (Rhodococcus rhodochrous) S-2株から得られたものである上記(3)記載の遺伝子。 10

(5) 配列番号2で示されるアミノ酸配列からなるタンパク質、又は配列番号2で示されるアミノ酸配列において1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換、挿入若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつEPS産生調節機能を有するタンパク質。

(6) 配列番号2で示されるアミノ酸配列をコードする単離された核酸、又は該核酸とストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつEPS産生調節機能を有するタンパク質をコードする核酸、を含んでなるEPS産生調節遺伝子。

また、本発明においては、配列番号2に記載の配列を有するポリペプチドと比較した場合、アラインメントのスマイス・ウォーターマン法に基づいて少なくとも70%同一性を有する、少なくとも299アミノ酸 (又は298アミノ酸) のポリペプチドをコードする塩基配列も包含される。 20

また、本発明においては、

(a) 上記(1)～(4)又は(6)に記載の核酸分子でゲノムライブラリーをプロービングすること；

(b) 上記(1)～(4)又は(6)に記載の核酸分子にハイブリダイズするDNAクローンを同定すること；および

(c) 工程(b)で同定されたクローンを含むゲノムフラグメントの配列を決定すること、を含んで成り、配列決定されたゲノムフラグメントが調節タンパク質をコードする、調節タンパク質をコードする核酸分子を得る方法も包含される。 30

また、本発明においては、

(a) 配列番号2に記載の配列の一部に対応する少なくとも1つのオリゴヌクレオチドプライマーを合成すること；および(b)工程(a)のオリゴヌクレオチドプライマーを使用して、クローニングベクター中に存在する挿入物を増幅すること；を含んで成り、増幅された挿入物は調節タンパク質をコードするアミノ酸配列の一部をコードする、調節タンパク質をコードする核酸分子を得る方法も包含される。

また、本発明においては、上記方法の産物も包含される。

【発明の効果】

【0012】

本発明のEPS産生調節遺伝子は、本来石油系炭化水素の分解・資化能力を発揮し、又は産業的に有用な物質の生産能を有するロドコッカス属の菌株を、石油耐性であるムコイド型に変化させる機能を有し、これにより、石油分解能力の発現や更なる向上を図ることができるという効果を有する。 40

【発明を実施するための形態】

【0013】

本発明のEPS産生調節遺伝子は、ロドコッカス属細菌、特にロドコッカス・ロドキュラス種 (S-2株) から単離され、配列決定された新規な遺伝子である。

本発明者らは、ロドコッカス・ロドキュラス種の細菌株としてS-2株 (RR S-2) を、独立行政法人産業技術総合研究所 特許生物寄託センター (〒305-8566 茨城県つくば市東1-1-1 中央第6) に平成16年(2004年)6月29日に寄託しており、この菌株について受領番号FERM AP-20106が付与されている。 50

【0014】

本発明者らは種々の遺伝子導入系等に基づいて、ロドコッカス・ロドキュラス S-2 株の EPS 合成に関与する遺伝子の単離を試み、その結果、EPS 生産性の低い非ムコイド型変異株を相補する遺伝子断片を S-2 株から取得することに成功した。この遺伝子断片には 8 個のオープンリーディングフレーム (ORF) が含まれており、その中で ORF 4 がムコイド型のコロニーを形成するために必要であることを見出した。この ORF 4 が、本発明のロドコッカス・ロドキュラス S-2 株の EPS 合成に関連する遺伝子であり、その塩基配列は配列番号 1 として示されている。

【0015】

この遺伝子はそのコードするアミノ酸配列 (配列番号 2) に基づく相同性検索により、この ORF 4 がコードするタンパク質が TetR ファミリーに属する調節タンパクであることが推定される。ORF 4 を導入することにより得られるムコイド型の形質転換体は、その EPS 生産量が非形質転換体に比べ明らかに上昇する。これらのことから、ORF 4 が EPS の生合成に関与していると考えられる。

【0016】

一方、ロドコッカス・ロドキュラス S-2 株の ORF 4 の遺伝子破壊により破壊株 T184-1 株を取得した。T184-1 株は非ムコイド型のコロニーを形成し、EPS の生産性が低く、細胞表面の疎水性が上昇していたことから、ORF 4 が EPS の生合成に関与する遺伝子であることが示された。

また、ORF 4 は、他のミコール酸を含有する細菌、および放線菌から、ORF 4 をプロンプに用いたサザンハイブリダイゼーションや PCR プライマー P1 と P4 (配列番号 3、6) を用いた PCR 法によって取得可能であった。

また、本発明において、配列番号 1 で示される塩基配列からなる核酸、又は配列番号 2 で示されるアミノ酸配列をコードする単離された核酸等とハイブリダイゼーションを行うためのストリンジントな条件とは、例えば、次のハイブリダイゼーション条件を言う：

5×SSC、68℃下でのハイブリダイゼーションを行い、単離された核酸を 2×SSC、0.1% SDS、続いて 0.1×SSC、0.1% SDS で洗浄する。

本発明において核酸とは塩基配列で示される核酸分子に相補的である単離された核酸をも包含する。

以下、本発明を実施例により具体的に説明するが、本発明はかかる実施例により何ら限定されるものではない。

【実施例】

【0017】

実施例 1 (ORF4 のクローニング)

ムコイド型コロニーの形成に関与する遺伝子のクローニング

R. rhodochrous S-2 株から UV ライトによる変異原処理により非ムコイド型変異株、R. rhodochrous B-29 株、D-8 株を単離し、これらを宿主としてショットガンクローニングを試みた。ジーンライブラリーの作成に用いた S-2 株の染色体 DNA、プラスミド pK4 (特許文献 2: 特許第 2983602 号 (平成 9 年)) は、定法により抽出精製した。

【0018】

S-2 株の染色体 DNA を制限酵素 EcoRI、KpnI、PstI でそれぞれ処理し、定法により精製した。また、プラスミド pK4 もまた制限酵素 EcoRI、KpnI、PstI でそれぞれ消化し、定法により脱リン酸化した。これらサンプルをそれぞれを T4 リガーゼでライゲーションし、S-2 株の EcoRI、KpnI、PstI ライブラリーを作製した (図 1)。これらのライブラリーを B-29 株、D-8 株にエレクトロポレーションにより導入した。

【0019】

その結果、供試した 2 株の変異株から、一つずつのムコイド型の形質転換体を得た。これらのムコイド型形質転換体の画線培養を 3 回繰り返すことにより、単一のコロニーに分離し、全ての菌株がムコイド型のコロニーを形成することを確認した。次に、得られたムコイド型の形質転換体からプラスミド DNA を抽出し、再びもとの変異株へ導入した (リトラ

ンスフォーメーション)。その結果、得られたカナマイシン耐性コロニーが、全てムコイド型を示した。このリトランスフォーメーションをその後2回繰り返して行ない、全ての形質転換体がムコイド型のコロニーを形成することを確認した。

【0020】

挿入断片の解析

B-29株およびD-8株のムコイド型の形質転換体から取得したプラスミドをそれぞれpK4B29P及びpK4D8Kとした。一次サブクロニングの結果、これら二つのプラスミドには、約3.7-kbのPstI-KpnI断片が共通して含まれていた(図2)。また、その領域が導入された場合にB-29株、D-8株はともにムコイド型を示した(図2)。以上のことから、約3.7-kbのPstI-KpnI断片がムコイド型を相補するために必要な領域と考えられた。

10

【0021】

シーケンスとサブクロニング

ムコイド型コロニー形成に関与する遺伝子の塩基配列の決定

ムコイド型コロニー形成に関与する遺伝子として取得された3.7-kbのPstI-KpnI断片の上流域および下流域を含む約6.0kbの遺伝子断片のシーケンス解析を行った。シーケンス解析に必要なデリベーションミュータントは、取得された遺伝子断片をpGEM5Zf(+)またはpGEM7Zf(+)にサブクロニングして、Erase-A-Base System (Promega)を用いてlacZの上流、下流方向からデリベーションを行なうことにより取得した。塩基配列の決定は、シーケンサー(DNA sequencer model 4000、Li-COR)を用いて解析した。シーケンス反応は Thermo Sequence fluorescent labelled primer cycle sequencing kit with 7-deaza-dGTP (Amersham)のシステムで行なった。図3には、決定した塩基配列のGCプロット解析と推定される5つのオープンリーディングフレーム(ORF)を示した。高G+C含量の生物でのGCプロット解析では、口の開いたように見える部分がタンパク質の読み取り枠に相当する。

20

【0022】

PstI-KpnI断片のサブクロニング

以上の結果をもとに、PstI-KpnI断片のより詳細なサブクロニングを行なった(図4)。まず、ORF2-3の領域に相当するPstI-SacII断片のサブクロニングを行なった。具体的には、プラスミドpK4B29PをPstI及びSacIIで消化し、平滑末端にした。この断片をpK4のKpnI部位を平滑末端したpK4の誘導体にライゲーションを行ない、E. coli HB101に導入し、pKMM5及び挿入断片が逆向きのpKMM5/Rを得た。これらのプラスミドをB-29株とD-8株へ導入した結果、B-29株とD-8株の形質転換体はラフ型のコロニーを形成した。この結果から、ORF2-3に相当する領域、つまりPstI-SacII断片は、B-29株とD-8株に関して、ムコイド型のコロニー形成に関与しないものと考えられた。

30

【0023】

この結果をもとに、次に、ORF4-6に相当するPmaCI-KpnI断片のサブクロニングを行なった。具体的には、pKMM2よりEcoRI処理により生成した4.2-kbのEcoRI断片を、pGEM7Zf(+)のEcoRI部位にライゲーションし、pGEM7Zf(+)の誘導体を得た(pGEM7MM2、pGEM7MM2/R)。この2つのプラスミドのうち、pGEM7MM2/RをPmaCI、ClaIで処理し、生成する2.6-kbの断片を、SmaCI、ClaIで処理したpGEM7Zf(+)に導入した。(pGEM7MM6)。このpGEM7MM6をEcoRIで処理し、生成する2.6-kbの断片を、pK4のEcoRI部位にライゲーションして、E. coli HB101に導入しpKMM6及び挿入断片が逆向きのpKMM6rを得た。これらのプラスミドをB-29株とD-8株へ導入したところ、B-29株とD-8株の形質転換体はムコイド型のコロニーを形成した。この結果は、ORF4-6の領域に相当するPmaCI-KpnI断片が、B-29株とD-8株のムコイド型コロニーの形成に関与することを示している。

40

【0024】

続いて、ORF6に相当する領域のサブクロニングを試みた。具体的には、前項と同様にPmaCI、ClaI処理により生成する2.6-kbの断片を、SmaCI、AccIで処理したpUC19に挿入し、pUCMM6を得た。このpUCMM6をSacIIで消化した後、生成する3.8-kbの断片(pUC19を完全に含んでいる)を分子内セルフライゲーションし、pUCMM9を得た。このpUCMM9をEcoRIで処理し、生成する1.2-kbの断片を、pK4のEcoRI部位にライゲーションして、E. coli HB101に導入

50

しpKMM9及び挿入断片が逆向きのpKMM9/Rを得た。これらのプラスミドをB-29株とD-8株へ導入したところ、ラフ型を示した。この結果から、ORF6に相当する領域はB-29株とD-8株に関してはムコイド型のコロニー形成に関与しないものと考えられた。

【0025】

上述の結果を踏まえ、次にORF4-5に相当する領域、PmaCI-XhoI断片のサブクローニングを試みた。具体的には、pGEM7MM6をXhoIで処理し、生成する1.8-kbの断片をpGEM7Zf(+)のXhoI部位にライゲーションし、pGEM7Zf(+)の誘導体を得た(pGEM7MM8、pGEM7MM8/R)。このうちpGEM7MM8をEcoRIで処理し、生成する1.8-kbの断片を、pK4のEcoRI部位にライゲーションして、E. coli HB101に導入し、pKMM8及び挿入断片が逆向きのpKMM8/Rを得た。これらのプラスミドをB-29株とD-8株へ導入した結果、B-29、D-8株の形質転換体はムコイド型のコロニーを形成した。

【0026】

最後に、ORF4に相当する領域のデリーションとサブクローニングを試みた。具体的には、pGEM7MM6をPshAIで処理した後、生成する4.3-kbの断片(pGEM7Zf(+))を完全に含んでいる)を切り出し、分子内セルフライゲーション反応を行なって、pGEM7MM10を得た。このpGEM7MM10をEcoRIで処理し、生成する1.3-kbの断片を、pK4のEcoRI部位にライゲーションして、E. coli HB101に導入しpKMM10及び挿入断片が逆向きのpKMM10/Rを得た。これらをB-29株とD-8株へ導入したところ、B-29、D-8株の形質転換体はラフ型のコロニーを形成した。また、ORF4に相当する領域のみをプライマーP1、P4をもちいてPCRにより増幅し、pK4のEcoRI部位に挿入したpKMM11及び挿入断片が逆向きのpKMM11/Rを得た。これらのプラスミドをB-29株とD-8株へ導入したところ、B-29、D-8株の形質転換体はムコイド型のコロニーを形成した。

以上の結果から、B-29株とD-8株のムコイド型のコロニー形成には、少なくともORF4に相当する領域が必須であることが判明した。このORF4の推定されるアミノ酸配列の相同性を検索したところ、転写調節因子であるTetRファミリーに属するタンパク質のアミノ酸配列と高い相同性を示したことから、転写調節タンパクであると考えられた。

【0027】

実施例2 (ORF4遺伝子破壊株の作製と性質の検討)

本実験に用いたプライマーの配列を以下に示し、図5にはその位置関係を示した。

- P1 (5' - CCG AAT TCG GTC GAG TGA GA -3') (配列番号3) 、
 P2 (5' -CGG ATA TCA AGG CGA ATA CTT CAT ATG CGG -3') (配列番号4) 、
 P3 (5' - CCG ATA TCA TCA CTG ACG AAT CGA GGT CG -3') (配列番号5) 、
 P4 (5' - CCG AAT TCG GTG CGA TCG G-3') (配列番号6))
 P5 (5' - TTG CTG TCG AAA CAG TCC TGG-3') (配列番号7)
 P6 (5' - CCG GAT CCC TGT TTC GAC AGC AAG G-3') (配列番号8)
 P7 (5' - GCT CTA GAG CGA GTA CGC CAT GAT GCC GCG AAA ACC GCC GCG G-3') (配列番号9)

【0028】

2回組換えによる破壊

プラスミドの作製

ORF4遺伝子を破壊するためのプラスミドp18T4の作製は以下の要領で行った。S-2株DNAよりプライマーP1、P5の組み合わせでORF4の前半の領域を、プライマーP6、P7の組み合わせでORF4の後半の領域を増幅させた。また、プライマーP2、P3を用いて、ストレプトマイセス(*Streptomyces*)属細菌のプラスミドpIJ702(非特許文献6:Katz et al. J Gen Microbiol. 1983 Sep;129 (Pt 9):2703-14. Cloning and expression of the tyrosinase gene from *Streptomyces antibioticus* in *Streptomyces lividans*.Katz E, Thompson CJ, Hopwood DA)からthiostreptone (以後ts) 耐性遺伝子を増幅させた。それぞれのPCRにおいて、目的の分子量であるDNA断片を得た。これらの断片を精製し、シークエンスを確認したところ、対応する配列と完全に一致したことから、これらの遺伝子断片を以降の実験に用いた。pUC18のEcoRI部位に両末端をEcoRI処理したP1-P5断片を、SmaI部位にブ

ラントエンドにしたP2-P3断片を、そしてBamHI-XbaI部位に両末端をそれぞれの制限酵素処理したP6-P7断片を挿入した。シークエンスにより各挿入断片の向きを確認し、これを遺伝子破壊用のプラスミドとした(図6)。

【0029】

S-2株への導入

S-2株の染色体上のORF4の遺伝子破壊を行うため、ORF4遺伝子破壊用プラスミドp18T4をS-2株へエレクトロポレーションにより導入し、ampicillin(以後amp)とtsをそれぞれ1種類のみ、また共存下に培養し選択した。その結果、ampのみ、amp+tsでは耐性株は得られず、tsのみを加えた培地でムコイド型のコロニーを18つ、非ムコイド型コロニーを2つ取得した。この非ムコイド型コロニー1つをts含有IB液体培地に植菌し、振とう培養を行った。培養2、4、6、8、10時間後、そして5日後にサンプリングし、適当に希釈し、植菌してコロニーの形態を観察した。どの培養時間の菌体も非ムコイド型の形態を示した(図6右下の写真)。この株をT184-1とし、以降の実験に用いた。

10

【0030】

遺伝子の確認

サザンハイブリダイゼーション

取得したts耐性TF体T184-1株よりtotal DNAを抽出し、制限酵素ClaI、PstI処理した。同様に制限酵素で処理したS-2株のDNAと共に、DIGラベルしたORF4断片、あるいはts耐性遺伝子をプローブに用いて、サザンハイブリダイゼーションを行った。その結果、ORF4をプローブとしたとき、S-2株DNAでは5.0 kbに、ts耐性TF体では1.5 kbと4.6 kbの位置にシグナルを検出した(図7)。また、ts耐性遺伝子をプローブとしたときは、S-2株DNAにはシグナルは無く、ts耐性TF体の1.5 kbと4.6 kbの位置にシグナルを検出した(図7)。

20

【0031】

PCR

続いて、PCRによる遺伝子破壊位置の確認を行った。PCRプライマーP1-P4のORF4の全長を増幅させる組み合わせでは、野生株からは、0.9kbの増幅断片が確認されたのに対し、遺伝子破壊株ではts耐性遺伝子の分だけ増幅産物の分子量が大きくなった2.0kbの増幅産物が確認された。また、PCRプライマーP2-P3のts耐性遺伝子を増幅させる組み合わせでは、遺伝子破壊株のみでts耐性遺伝子由来の遺伝子断片の増幅が確認された。

(図8) これらのPCRによって増幅した各断片を抽出、精製し、シークエンス解析を行ったところ、増幅した全ての断片が、対応する配列に一致した。以上の結果から、ts耐性遺伝子は目的的位置に挿入されたことが分かった。以後この株をT184-1株とした。

30

【0032】

ORF4の再導入

得られた遺伝子破壊株T184-1のコロニー形態がORF4の導入により、ムコイド型に復帰するかどうかを確認するため、プラスミドpKMM11、pKMM11Rをエレクトロポレーションにより導入した。その結果、M13-Fowardプライマー結合部位に対してORF4が同じ向きのプラスミドpKMM11を導入した形質転換体は(図9)はムコイド型形態を示したのに対し、ORF4の向きが逆向きのプラスミドpKMM11Rを導入した形質転換体は、pK4のみを導入した形質転換体と同様に非ムコイド型形態を示した。このことから、ORF4はムコイド型コロニーの形成に必須であると考えられた。以上の結果から、ORF4を細胞外多糖調節遺伝子とした。

40

【0033】

石油存在下での生育の検討

アラビアンライト原油由来の芳香族画分(AF-oil)を終濃度1%になるように加えた海水培地(SW)における生育を検討した。非ムコイド型ORF4破壊株では、培養12時間後は急激に生菌数が減少しており、その後も顕著な増殖は見られなかった(図10)。培養後の試験管は、S-2株の培養試験管では石油の乳化が見られたが、T184-1株では石油の乳化が見られなかった(図10)。

【0034】

細胞表面特性の検討

50

T184-1株の細胞表面特性を検討するため、EPS生産量およびMATH (Microbial adhesion to hydrocarbons)法、接触角法による細胞表面の疎水性を測定した。T184-1株のEPS生産量は、S-2株と比較して大幅に減少しており、さらにその細胞表面はより疎水性を示した(表1)。

【0035】

【表1】

	S-2株	T184-1株	T184-1株(pKMM11)
コロニー	ムコイド型	非ムコイド型	ムコイド型
EPS生産量	136.6 (±7.9)	19.1 (±4.0)	109.3 (±38.4)
MATH	-8.1 (±4.2)	8.7 (±0.5)	-4.6 (±6.2)
接触角	34.3 (±1.2)	83.5 (±4.1)	49.9 (±4.0)

10

【産業上の利用可能性】

【0036】

本発明は石油の分解・資化により環境の浄化や、酵素やバイオサーファクタントなどの生産等において、より活性の高いロドコッカス・ロドキュラスを含むロドコッカス属細菌の開発に利用することができる。

【図面の簡単な説明】

【0037】

20

【図1】 R. rhodochrous S-2株由来の非ムコイド型の変異株に S - 2株の EcoRI、KpnI、PstIライブラリーを作製することを示す。

【図2】 pK4B29P及びpK4D8K又はpK4D8Krの大まかな制限酵素地図とサブクローニングの結果を示す

【図3】 3.7-kbのPstI-KpnI領域の塩基配列の100 bpを区分として行ったGCプロット解析の結果を示す。

【図4】 PstI-KpnI断片のより詳細なサブクローニングの結果を示す。

【図5】 ORF 4の増幅のためのプライマーP1-P7の位置関係を示す。

【図6】 ORF 4遺伝子破壊用のプラスミドの作成と、ムコイド型(右上)と非ムコイド型(右下)の写真を示す。

30

【図7】 ts耐性TF体T184-1株とS-2株のDNAのサザンハイブリダイゼーションの結果を示す。

【図8】 PCRによる遺伝子破壊位置を示す。

【図9】 ORF 4破壊株へのORF 4の導入を示す。

【図10】 ORF 4破壊株とS-2株の石油存在化における生育を示す。

【配列表フリーテキスト】

【0038】

配列番号3 ORF 4の増幅のためのプライマーP1

配列番号4 ORF 4の増幅のためのプライマーP2

配列番号5 ORF 4の増幅のためのプライマーP3

配列番号6 ORF 4の増幅のためのプライマーP4

配列番号7 ORF 4の増幅のためのプライマーP5

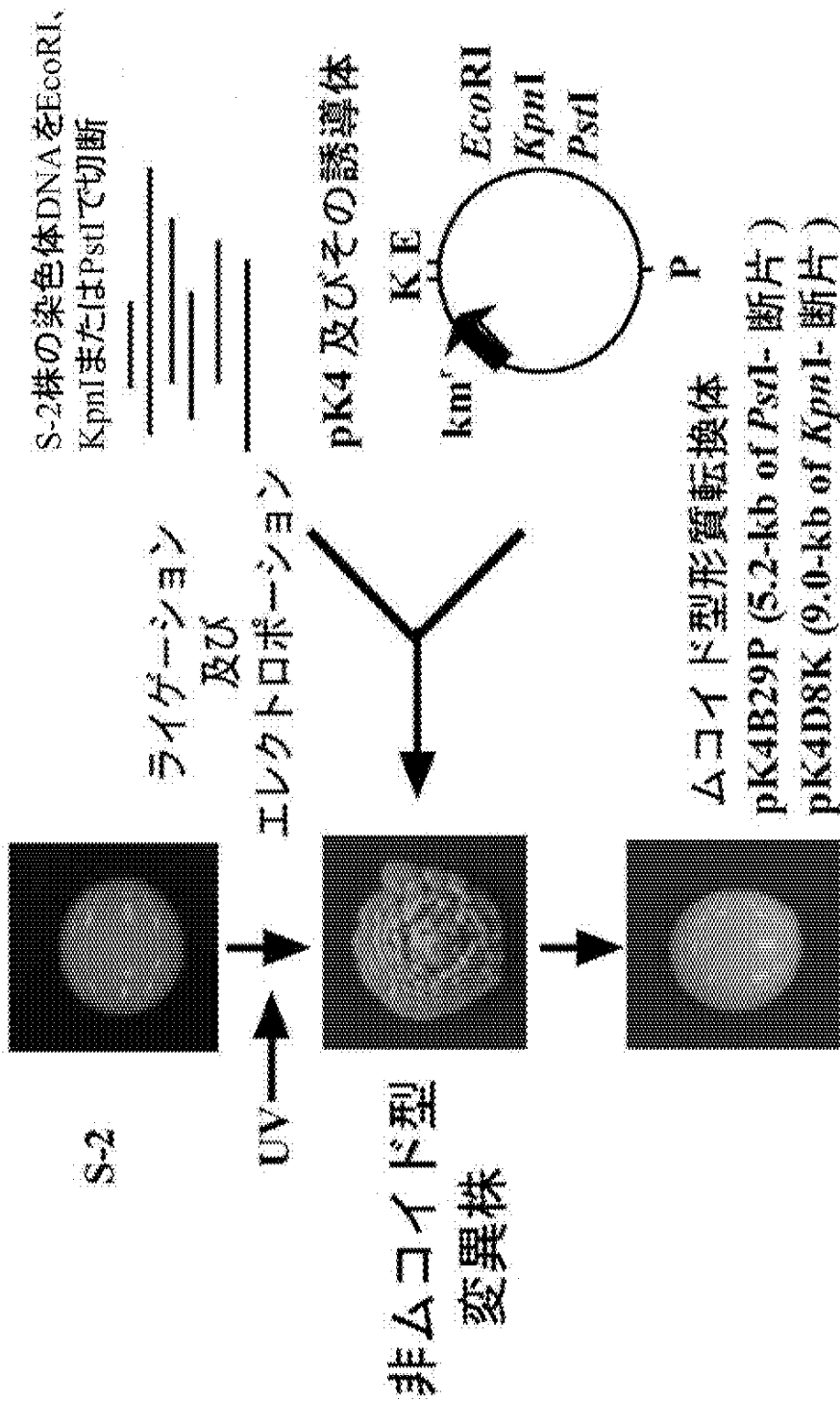
配列番号8 ORF 4の増幅のためのプライマーP6

配列番号9 ORF 4の増幅のためのプライマーP7

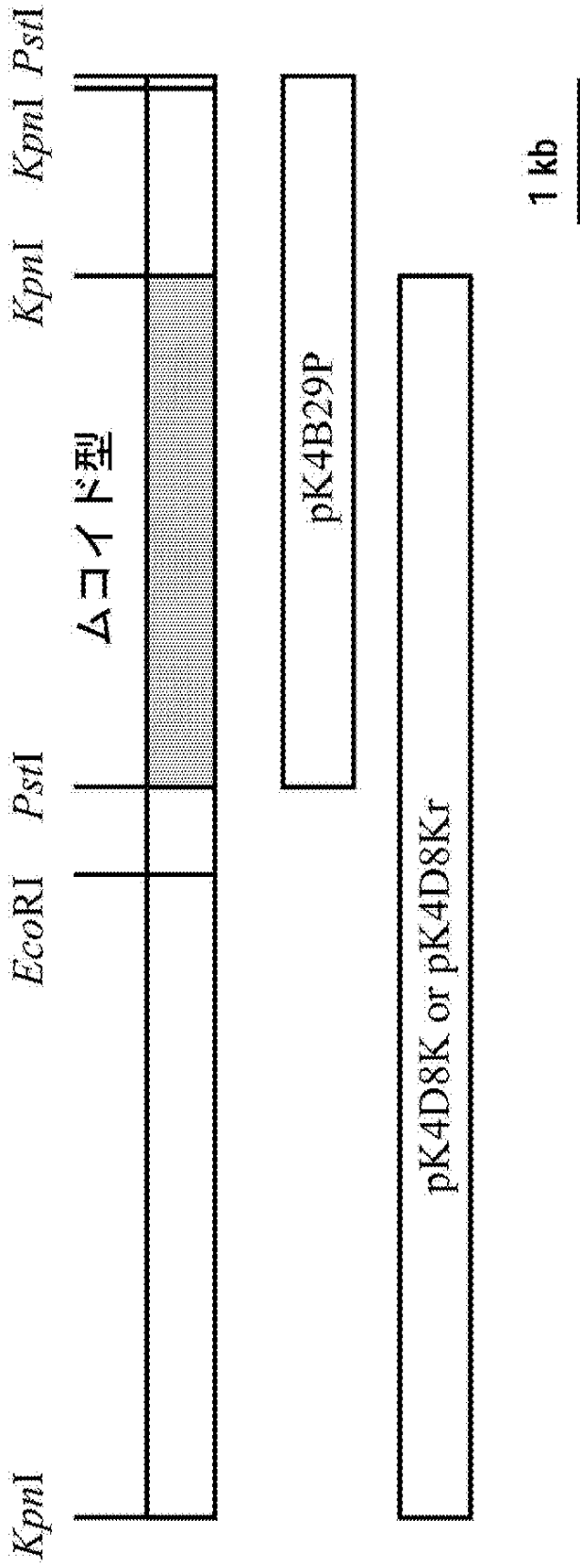
40

【図1】

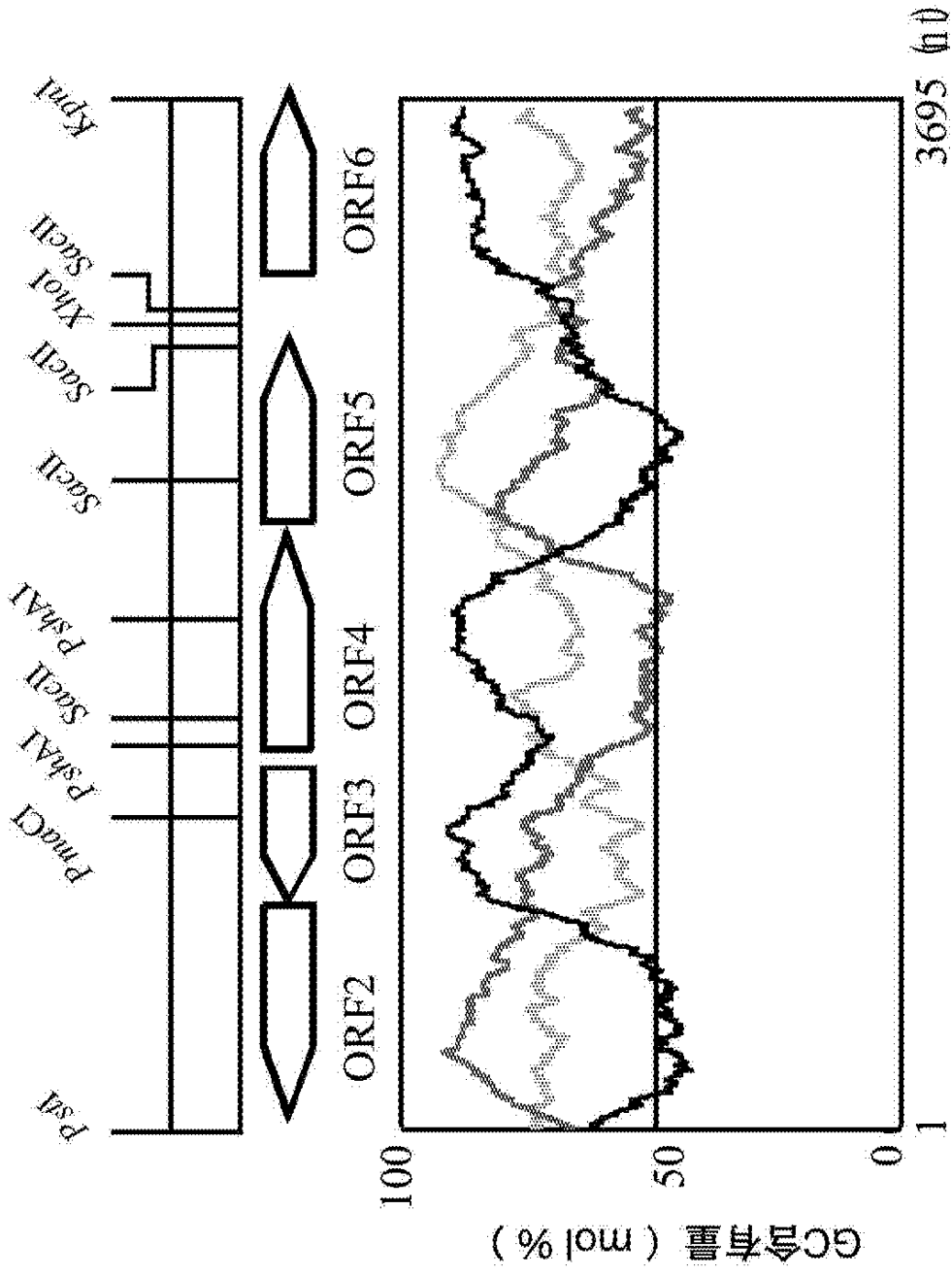
クローニング方法



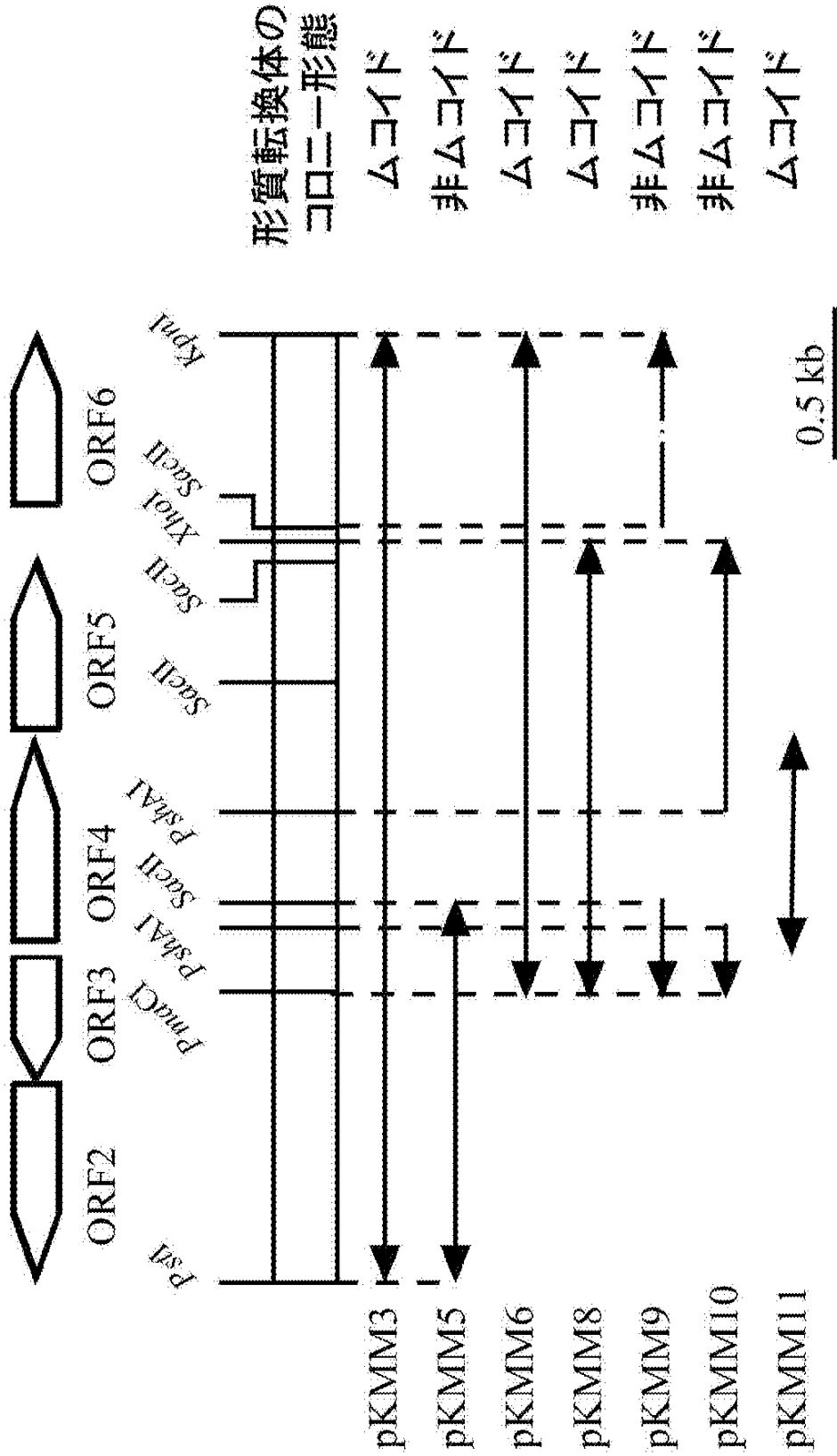
【図 2】



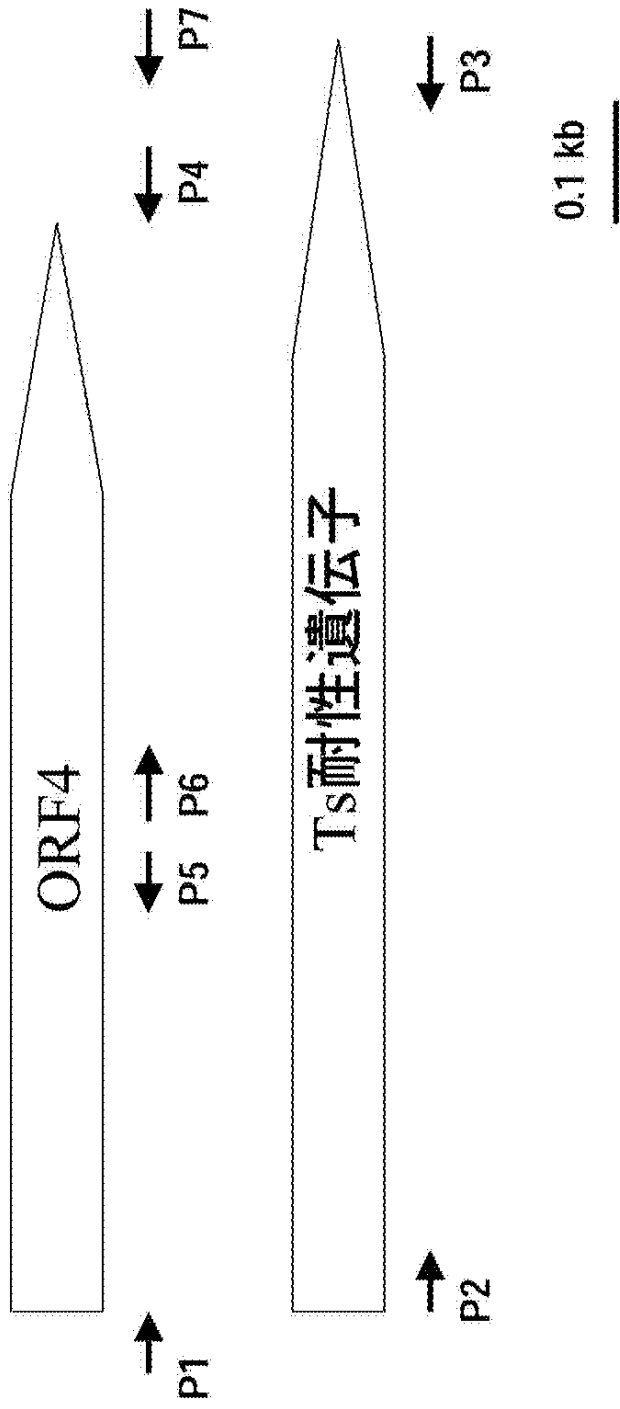
【図 3】



【図4】

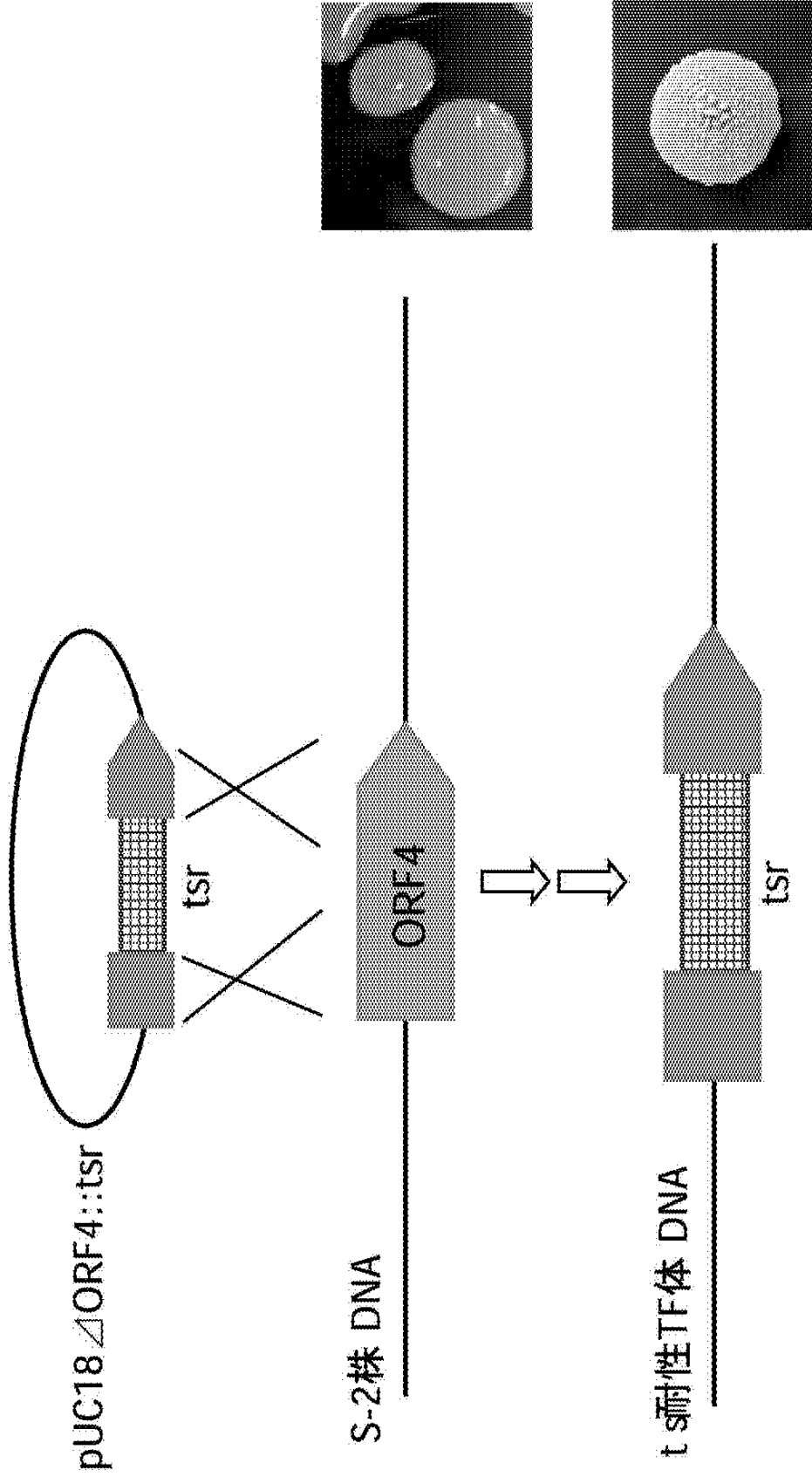


【図 5】



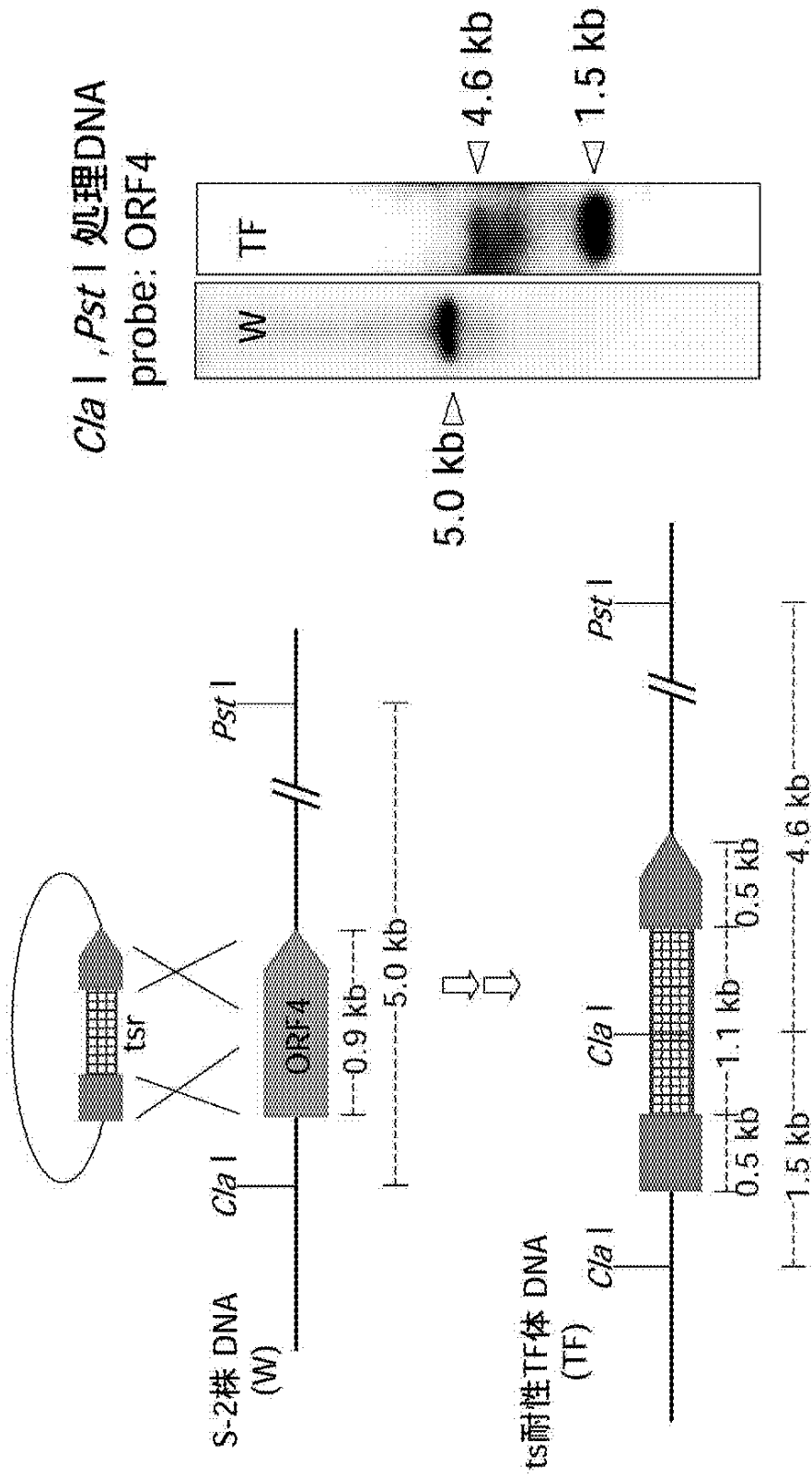
【図6】

ORF4破壊株の作製



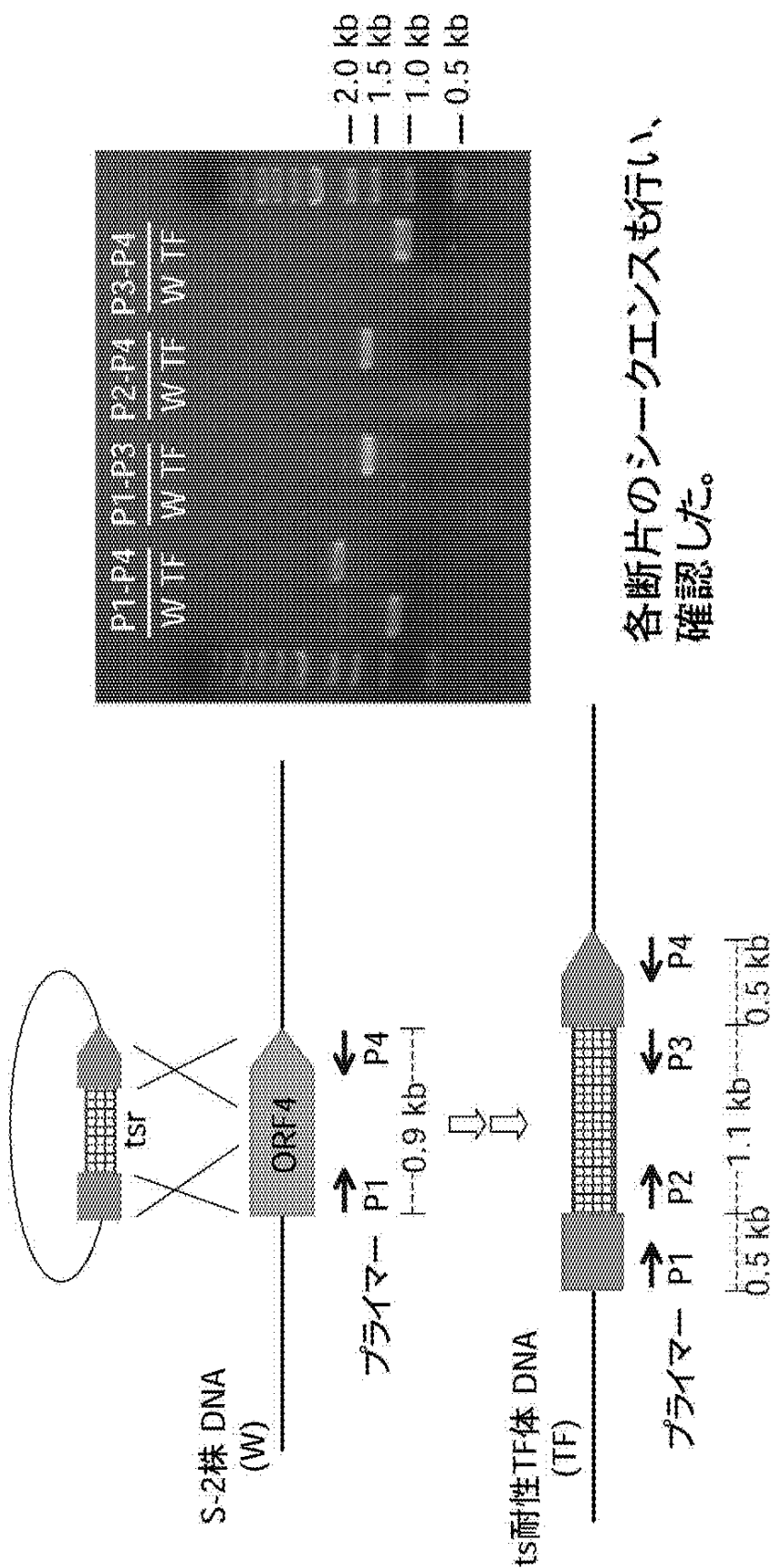
【図7】

サザンハイブリダイゼーション解析



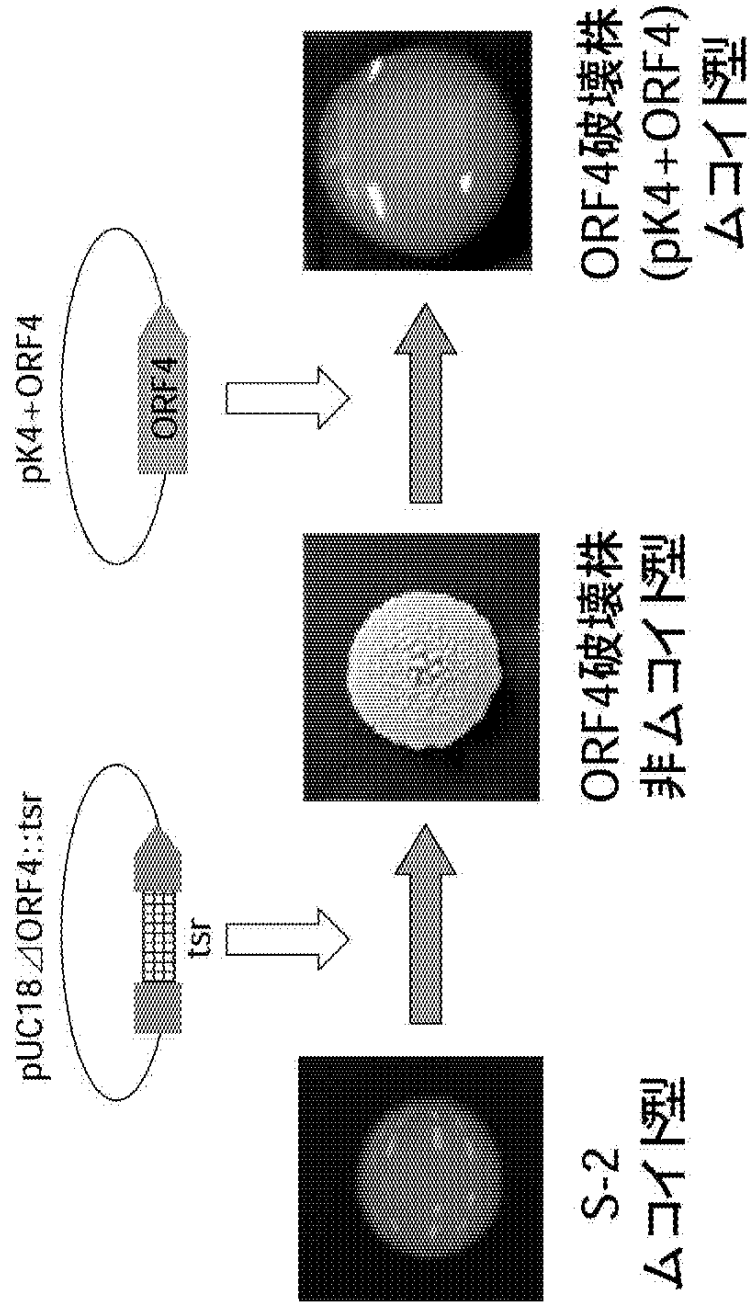
【図 8】

PCRによる確認



【図9】

ORF4の導入

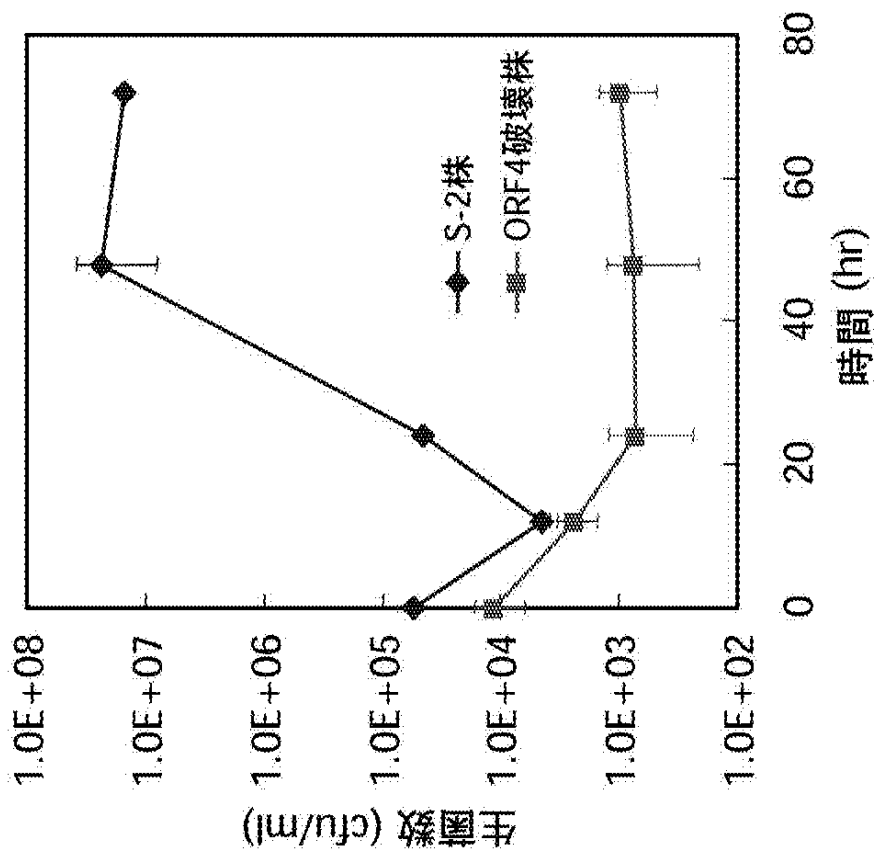
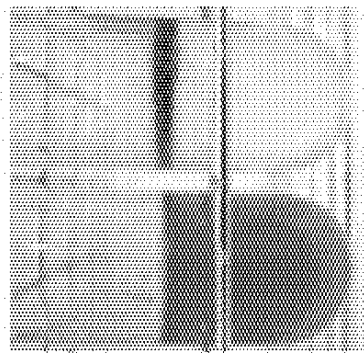


【図10】

石油存在下における生育

培養条件
 海水培地
 1 mg/ml 芳香族画分
 (アラビアンライト原油)
 28°C、110 rpm

S-2株
 ORF4
 破壊株



【配列表】
 2006014631000001.app

フロントページの続き

(72)発明者 砂入 道夫

東京都千代田区九段南四丁目 8 番 2 4 号 学校法人日本大学内

(72)発明者 岩淵 範之

東京都千代田区九段南四丁目 8 番 2 4 号 学校法人日本大学内

(72)発明者 小俣 せいほ

神奈川県厚木市飯山 3 2 1 9 - 1 5

F ターム(参考) 4B024 AA03 AA17 BA80 CA03 DA05 EA04 GA14

4H045 AA10 AA20 AA30 BA10 CA11 FA74