

酢酸菌 *Komagataeibacter europaeus* を宿主とする

異種タンパク質生産の試み

関西学院大学理工学研究科

生命科学専攻 藤原伸介研究室 東久保 遥

【研究目的】酢酸菌 *Komagataeibacter europaeus* は食酢製造に広く用いられている。本菌は通気攪拌培養が可能であり、十分な菌体収量を確保することができる。本菌には3種の内在性プラスミドが存在し、遺伝子操作系も確立している(1)。酢酸菌はエタノール酸化により酢酸を産生し、外環境 pH の低下を引き起こすことで他の微生物の繁殖を防ぐ。本菌は、培地 pH は低下させる一方で、細胞内の pH は定常期初期まで5以上に保つことが示されている(2)。このような性質は、物質生産のための宿主として相応しい。本研究では、大腸菌 β -ガラクトシダーゼ(β -Gal)を標的モデルタンパク質として、*K. europaeus* の宿主としての可能性を検証した。超好熱菌の分子シャペロニン CpkB は、分子認識に関与する領域が負電荷を帯びている(3)。今回、*K. europaeus* 内で CpkB を共発現し、 β -Gal 活性に与える影響も調べた。

【実験方法】酢酸菌及び大腸菌で複製可能なシャトルベクター pBE1(Amp^r, Tet^r)及び pCE2(Sm^r)を構築した。 β -ラクタマーゼ遺伝子プロモーター(P_{bla})の直下に β -Gal 遺伝子(*lacZ*)を導入したプラスミド pBE1- P_{bla} -*lacZ* を構築した。テトラサイクリン耐性を指標にして、pBE1- P_{bla} -*lacZ* を KGMA0119 株(野生株)に導入し、 β -Gal 発現株 KGMA0119(pBE1- P_{bla} -*lacZ*)を構築した。pUC19 由来のラクトースオペロンプロモーター(P_{lacUV5})の直下に分子シャペロニン遺伝子(*cpkB*)を導入したプラスミド pCE2- P_{lac} -*cpkB* を構築した。ストレプトマイシン耐性を指標にして、pCE2- P_{lac} -*cpkB* を KGMA0119 株に導入し、CpkB 発現株 KGMA0119(pCE2- P_{lac} -*cpkB*)を構築した。テトラサイクリン耐性を指標にして、pBE1- P_{bla} -*lacZ* を KGMA0119(pCE2- P_{lac} -*cpkB*)株に導入し、 β -Gal、CpkB 共発現株 KGMA0119(pBE1- P_{bla} -*lacZ*, pCE2- P_{lac} -*cpkB*)を構築した。 β -Gal 発現株及び β -Gal、CpkB 共発現株を培養して継時的にサンプリングし、細胞内の β -Gal 活性を調べた。

【実験結果と考察】*K. europaeus* 細胞内における β -Gal 活性は、対数期から定常期初期では検出されたが定常期で消失した。 β -Gal 活性は対数期後期の細胞で最大活性を示した。一方、CpkB を共発現させた結果、 β -Gal 活性は対数期後期の細胞で最大活性を示し、定常期においても活性は維持されることが分かった。 β -Gal 発現株に比べて β -Gal、CpkB 共発現株の β -Gal 活性は最大で9倍も高くなった。CpkB の C 末端領域は酸性アミノ酸に富み、基質の認識・捕捉に関わる。 β -Gal の pI は中性付近であり、大腸菌の細胞内 pH(pH 7.6)で安定に機能する(4)。一方、*K. europaeus* の細胞内 pH は定常期初期まで pH 5 付近で、それ以降 pH 5 より酸性に傾く。つまり、*K. europaeus* の細胞内では pH は低いため CpkB が正に荷電した β -Gal を捕捉したと考えられる。以上より、*K. europaeus* において、耐熱性分子シャペロニンの共発現は、異種タンパク質の安定化に効果的と思われる。

【参考文献】(1) Akasaka, N., *et al.*, *J. Biosci. Bioeng.*, **119**, 661-668 (2015) (2) 繁宥樹ら., 第69回日本生物工学大会要旨集., p.121. (2017) (3) Gao, L., *et al.*, *J. Bacteriol.*, **197**, 2642-2652 (2015) (4) Wilks, J. C., *et al.*, *J. Bacteriol.*, **189**, 5601-5607 (2007)