

## 論文の内容の要旨

申請者 外川 陽一郎

### 論文題目

Development of a Cre/lox-based multiple markerless gene disruption method for the extreme thermophile *Thermus thermophilus*

*Thermus thermophilus* HB27 株 (以下、*T. thermophilus* HB27) は、65~72 °C の高温を至適生育温度とするグラム陰性菌で、全ゲノム塩基配列が既に決定されており遺伝子操作系が確立されていることから高度好熱菌のモデル生物として位置づけられている。同菌のタンパク質は精製が容易であることからその機能・構造に関する研究は盛んに行われているが、生理学的な研究については大腸菌等の中温菌と比べると十分に進んでおらず、未解明の部分が多い。その主な要因として、遺伝子の破壊に必要な不可欠な耐熱性の薬剤耐性選択マーカー遺伝子が少ないために、多重遺伝子破壊株の作製や相補実験による遺伝子の機能解析が困難なことが挙げられる。この様な問題の一般的な解決策として、染色体にマーカーを残さない、いわゆる markerless 遺伝子破壊法が様々な生物で用いられており、*T. thermophilus* でも counter selection を利用して標的遺伝子の破壊後にマーカー遺伝子を除去する方法がこれまでに 5 例報告されている。しかしこれらの方法には共通して、それぞれ特定の薬剤耐性による counter selection でマーカーを除去する過程において、薬剤耐性菌が自然発生する問題がある。また、2 例は親株として特定の変異株を用いるために、野生株は使用できない。

本研究ではこれらの問題点を克服するため、counter selection とは異なるアプローチとして Cre/lox 部位特異的組換えに着目した。Cre/lox システムでは、同方向の loxP 配列で挟んだマーカーを Cre 酵素による部位特異的組換えで除去できるため、中温生物では markerless 遺伝子破壊法として数多くの使用実績があるが、高度好熱菌で使用された報告例はない。組換え酵素 Cre について調べると、活性が確認された最高温度は in vitro における 46 °C であったが、CD スペクトル解析では 54 °C 付近で熱変性が始まると報告されている。本研究ではこれらの情報から、*T. thermophilus* HB27 の生育下限温度である 50 °C では Cre の活性が維持されており選択マーカーの除去が可能なのではないかと考え、Cre/lox システムを応用したマーカーレス遺伝子破壊法の開発を試みた。

遺伝子破壊の後に選択マーカーを Cre/lox 部位特異的組換えにより除去するため、耐熱性カナマイシン耐性遺伝子 *htk* を同方向の loxP 配列で挟んだ遺伝子破壊用カセット (*loxP-htk-loxP*)、および *cre* 発現プラスミド (pSH-Cre) を作製した。これらの有効性を検証するために、まず *T. thermophilus* の遺伝子破壊の常法に従い TTC1535 遺伝子に *loxP-htk-loxP* カセットを挿入した DNA 断片を構築し、これを HB27 野生株に導入して相同組換えにより TTC1535 破壊株 (ST1) を作製した。次に、Cre/lox 部位特異的組換えにより *htk* を除去するため、ST1 に pSH-Cre を導入して 50 °C で 5 日間プレート培養したところ、調べた 6 クローン全てがカナマイシン感受性になっていた。各菌株のゲノムを PCR により確認したところ、

*htk* 遺伝子由来の DNA 断片は増幅されなかった。これらの結果から、50 °C でも Cre の活性が維持されており、*T. thermophilus* においても Cre/lox システムにより効率よく *htk* マーカーが除去可能であることが示された。得られた markerless 遺伝子破壊株 (ST1Δ*htk*/pSH-Cre) を抗生物質を含まない液体培地で継代培養し、pSH-Cre を除去して ST1Δ*htk* を作製した。

次に、同様の手順を繰り返すことにより三重遺伝子破壊株の作製を試みた。まず ST1Δ*htk* を親株として、*loxP*-*htk*-*loxP* を用いて TTC1576 を破壊した二重破壊株 (ST2) を作製し、pSH-Cre を導入して 50 °C で培養した。その結果、調べた全クローンから *htk* が除去されたが、染色体上には TTC1535 および TTC1576 に挿入された逆方向の 2 つの *loxP* が存在するため、これらの *loxP* 間でさらに Cre/lox 部位特異的組換え反応が起こった TTC1535-TTC1576 領域 (34.5 kbp) の逆位をもつクローンも確認された。そのため、逆位の起きていない markerless 二重破壊株 (ST2Δ*htk*) PCR 法により同定した。続いて、ST2Δ*htk* を親株として、上記と同様の手順で TTC1454 を破壊した三重破壊株 (ST3) を作製し *htk* を除去したところ、染色体上の 3 か所の *loxP* 間で起こりうるすべての逆位、すなわち TTC1535-TTC1576 領域 (34.5 kbp)、TTC1454-TTC1535 領域 (88.4 kbp)、および TTC1454-TTC1576 間の欠失 (122.9 kbp) を単独または複数もつクローンも確認された。PCR 法により逆位・欠失が起きていないクローンを同定して pSH-Cre を除去することにより、markerless 三重破壊株 (ST3Δ*htk*) の作製に成功した。この一連の遺伝子破壊実験において *htk* マーカーの除去効率は 100% であり、また、5~6 クローンを調べることにより逆位・欠失の起きていないクローンを同定できたことから、本 markerless 遺伝子破壊法により実用的な効率で多重遺伝子破壊株を作製できることを実証できたと考える。

しかし、三重遺伝子破壊では実用上問題ないものの、これ以上の遺伝子を破壊する場合には起こり得る逆位・欠失のパターンが飛躍的に増加するため、これら目的外の組換えを防ぐ方法として植物や細菌で用いられる変異 *lox* 配列 (*lox66*、*lox71*) が *T. thermophilus* で利用可能であるかを検証した。変異 *lox* を導入した遺伝子破壊用カセット (*lox66*-*htk*-*lox71*) を用いて近接した TTC1535 および TTC1537 遺伝子の markerless 二重破壊株の作製を試みたところ、*lox66*-*htk*-*lox71* カセットからの *htk* の除去効率は 12.5% に低下したが、*lox66* と *lox71* の組換え反応により生成した染色体上の同方向の *lox72* 配列間では組換えによる 0.7 kbp の染色体領域の欠失は起こらなかった。この結果から、*lox66*-*htk*-*lox71* を用いることにより目的外の組換えを誘発することなく二重破壊株を作製できることが確認された。

本研究で開発した遺伝子破壊法は野生株に使用可能であり、カナマイシン感受性によってマーカーが除去されたクローンを選択するため薬剤耐性菌が発生する可能性が低く、実際にカナマイシンに対する自然耐性菌は実験中に一度も確認されなかった。よって、counter selection を利用した方法の問題点を克服した markerless 遺伝子破壊法の開発という研究目的の達成できたと考える。本研究の成果は、*T. thermophilus* における研究の進展に大きく寄与することが期待される。