

遺伝子組換え菌の培養システム

Cultivation System of *Escherichia coli* Harboring Hybrid Plasmids

遺伝子組換え技術により、天然には微量にしか存在しない有用物質を微生物に生産させられるようになった。そこで β -galを生産する遺伝子組換え菌を造成し、効率的な培養システムを検討した。

遺伝子組換え菌の菌体内に約10万分子の β -galを生産できる複合プラスミドの造成により、発現ベクタpTRE 1の有効性を確認した。また、溶存酸素濃度や呼吸商の変化を指標として、発現誘導剤の添加時期を検知した。更に、培養液中に蓄積する菌体増殖阻害物質が酢酸であることを明らかにし、培養上清液を遠心分離によって除去する反復流加培養法により、菌体濃度を20g/l以上に高密度化した。以上のことから、有用物質の大量生産に適した培養システムを提供することができた。

清水範夫* Norio Shimizu
福園真一** Shin'ichi Fukuzono
藤原清志*** Kiyoshi Fujiwara

1 緒言

最近のバイオテクノロジーの中心技術である遺伝子組換え技術は、生体組織から目的の遺伝子を単離し、微生物に入れて増やすことを可能にした。更に、微生物の増殖速度が非常に速いことを利用して、天然には微量にしか存在しない生理活性物質であるインシュリンやインターフェロンなどを、微生物を培養することによって生産できるようになった¹⁾。しかし、大部分はまだ実験室レベルであり、遺伝子操作した微生物を用いて生理活性物質や酵素などを効率的に大量生産する技術はまだ開発されていない。したがって、これらを工業的に大量生産するには遺伝子組換え菌を効率よく培養できる培養システムの開発が重要となる。

遺伝子組換え菌を用いて有用物質を大量生産できる培養システムの開発には、遺伝子を連結する発現ベクタ^{*1)}の種類、その発現方法及び菌体の増殖方法などが重要課題となる。そこで日立製作所は、強力なプロモータと言われているtrp(トリプトファン)-プロモータを持つ発現ベクタに乳糖分解酵素である β -gal(β -ガラクトシダーゼ)遺伝子を連結した複合プラスミドpTREZ 1を保持する大腸菌をモデルとして、遺伝子組換え菌の培養システムを開発した。本論文では、発現ベクタ、遺伝子発現及び組換え菌の培養方法を中心にシステムの特徴について述べる。

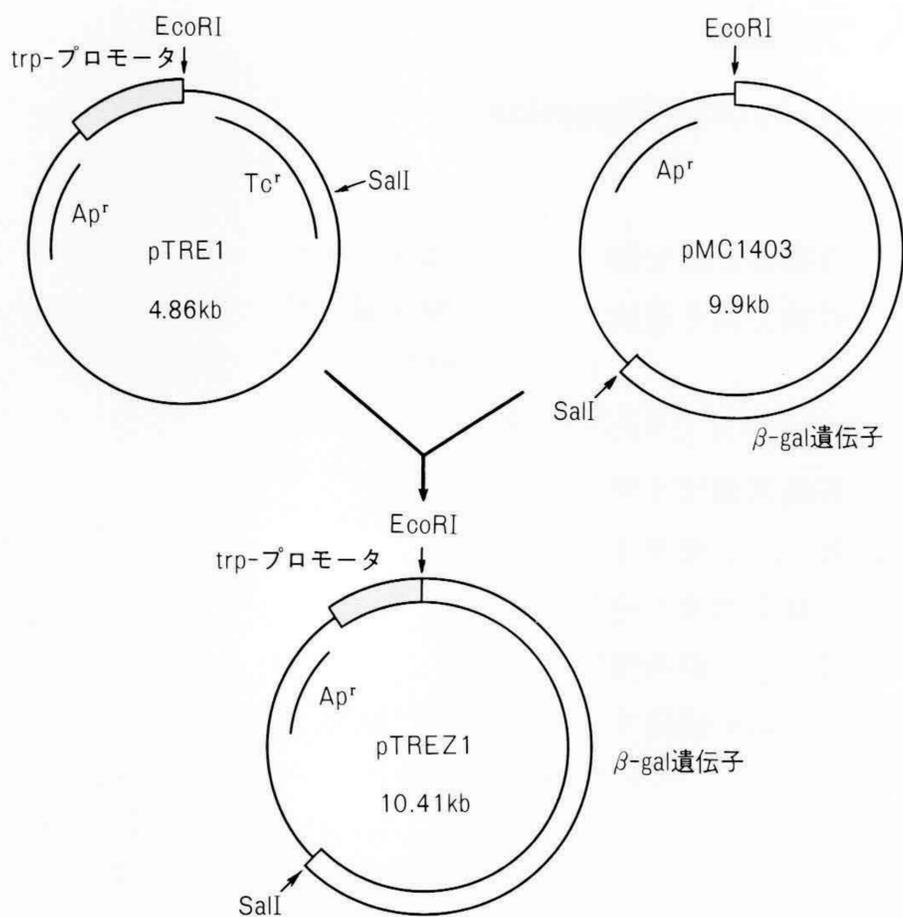
2 遺伝子組換え菌の発現ベクタ

有用物質を遺伝子組換えによって大腸菌に合成させるには、その物質の遺伝子を発現させるための効率的なプロモータを持つ発現ベクタを選択する必要がある。発現ベクタの各種プロモータの中でも、特にtrp-プロモータは発現効率が高いと言われている。そこで日立製作所はtrp-プロモータへの目的遺伝子の連結が容易になるように造成した発現ベクタpTRE 1²⁾を採用した。そして、この発現ベクタに β -gal遺伝子を連結した複合プラスミドpTREZ 1を保持する大腸菌を遺伝子組換え菌として用いた。 β -galは合成基質のo-ニトロフェノール- β -D-ガラクトシドの分解による黄色の発色で、迅速に酵素生産量を測定可能なことから、これを用いることで発現ベクタの発現効率や培養方式の評価などを容易に実施できる。

trp-プロモータに β -gal遺伝子を連結した複合プラスミドpTREZ 1の造成法を図1に示す。発現ベクタpTRE 1のtrp-プロモータ下流の制限酵素^{*2)}EcoRI切断部位に、プラスミドpMC1403の β -gal遺伝子先端部に存在するEcoRI切断部位を利用して連結した。まず、二つのプラスミドを制限酵素EcoRIとSalIで切断し、trp-プロモータを含む4.21kb(千塩基対数)のDNA(デオキシリボ核酸)断片と β -gal遺伝子を含む6.2kbのDNA断片を得た。次にこの2断片をDNAリガーゼで連結してpTREZ 1を造成した。図2に、EcoRIとSalIで切断したとき

※1) 発現ベクタ：目的遺伝子を微生物に導入するには、遺伝子を運ぶ道具であるベクタが必要で、この役目をプラスミドと呼ばれる核外遺伝子に持たせている。ベクタに組み込まれた遺伝子は、プロモータにより発現することができるので、プロモータを持ったプラスミドベクタを発現ベクタと言う。

※2) 制限酵素：DNA(デオキシリボ核酸)の特定の塩基配列を認識して切断する酵素を言う。



注：略語説明

trp(トリプトファン), Ap^r(アンピシリン耐性遺伝子)
 Tc^r(テトラサイクリン耐性遺伝子), β-gal(β-ガラクトシダーゼ)
 kb(千塩基対数)

図1 複合プラスミドpTREZ1の造成 発現ベクタpTRE1のtrp-プロモータに、プラスミドpMC1403から切り出したβ-gal遺伝子を連結して、複合プラスミドpTREZ1を造成した。

のDNA断片のアガロースゲル電気泳動写真を示す。レーンIIがpTREZ1であり、分子量の大きなDNA断片はレーンIのpMC1403のβ-gal遺伝子と一致し、分子量の小さなDNA断片はレーンIIIのpTRE1のtrp-プロモータを含むDNA断片と一致した。これから造成したpTREZ1は、目的のプラスミドに相違ないことが確認できた。そこで、本プラスミドを大腸菌M182株に導入して遺伝子組換え菌とした。

3 遺伝子の発現誘導³⁾

複合プラスミドpTREZ1はtrp-プロモータの働きによりβ-gal遺伝子を発現させることができ、この複合プラスミドを保持する大腸菌はβ-galを合成し、菌体内に蓄積する。プロモータはリプレッサ³⁾の結合によってその働き、つまりRNA合成酵素によるmRNA(メッセンジャーリボ核酸)の合成開始が抑えられているが、誘導剤を加えるとリプレッサが不活性化しプロモータから離れるため、mRNAの合成が開始される。続いてこのmRNAの情報に従ってタンパク質が合成される。そこでこのtrp-プロモータの働きを開始させるための誘導剤IA(3-β-インドールアクリル酸)の添加量をL字形試験管を用いて検討した。なお培地はM9倍地⁴⁾にカザミノ酸2.5g/l, グルコース5g/l, アンピシリン50mg/l添加したものを用いた。図3に示すようにIA添加量は15μg/mlが最適であり、それ以上多くなるとβ-gal生産量は低下した。生菌数はIA添加量が増加するに従い低下した。これはβ-gal大量生産により大腸菌の増殖が抑えられること以外に、IAそのものによるタンパク合成の阻

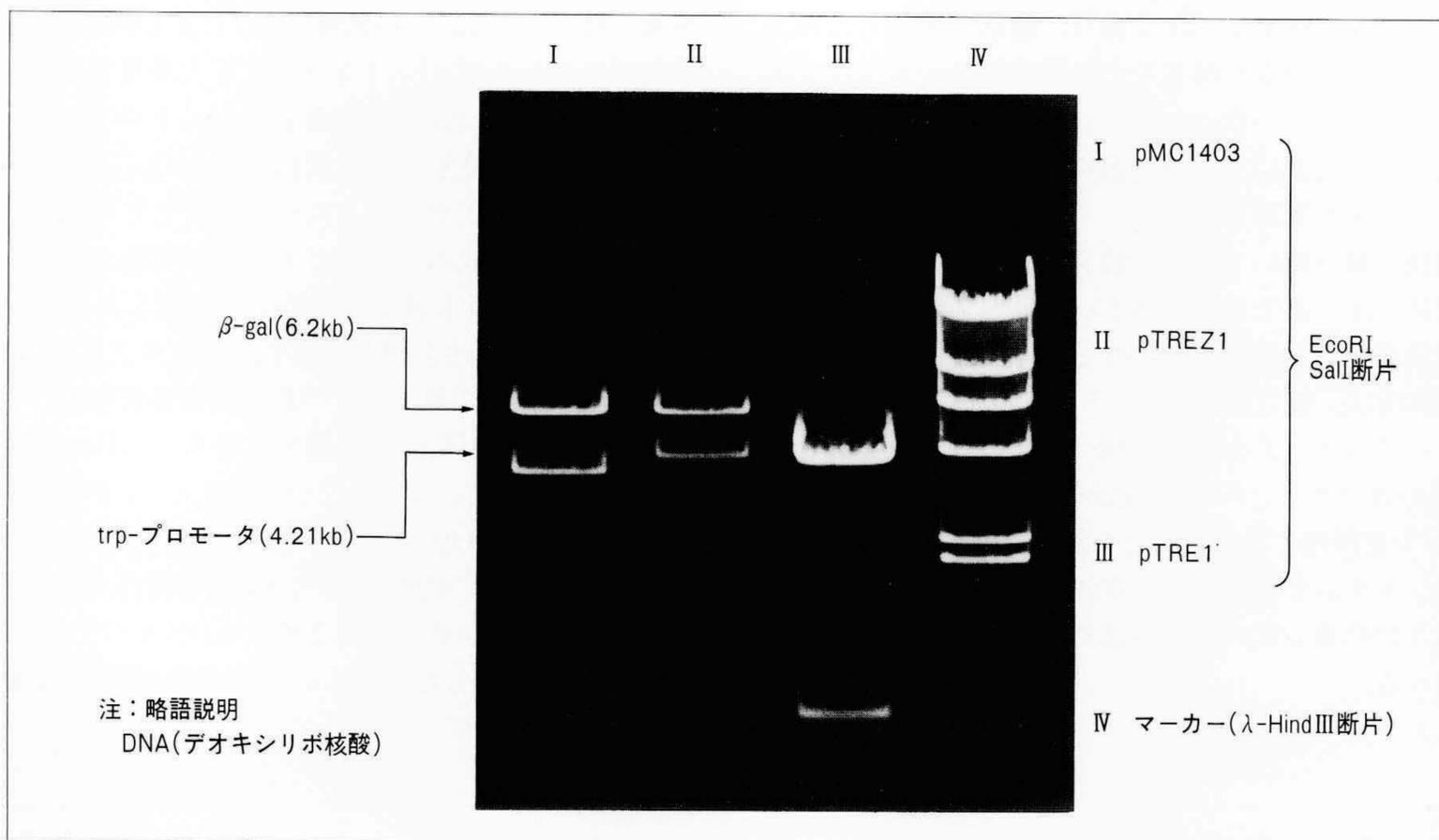


図2 DNA断片のアガロースゲル電気泳動 複合プラスミドpTREZ1は、trp-プロモータを含む4.21kbのDNA断片とβ-gal遺伝子を含む6.2kbのDNA断片から構成されている。

※3) リプレッサ：プロモータの近傍に結合して遺伝子の発現を抑制するタンパク質である。

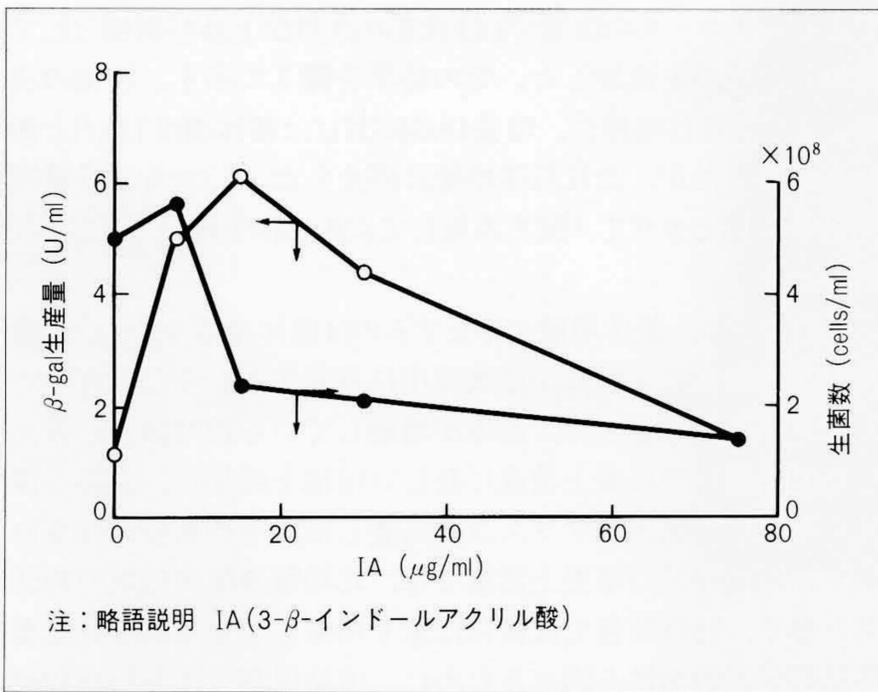


図3 誘導剤IAの添加がβ-galの生産と生菌数に及ぼす影響 IAの添加量が15µg/mlのときβ-gal生産量が最大になるが、生菌数は増殖阻害のため低下する。

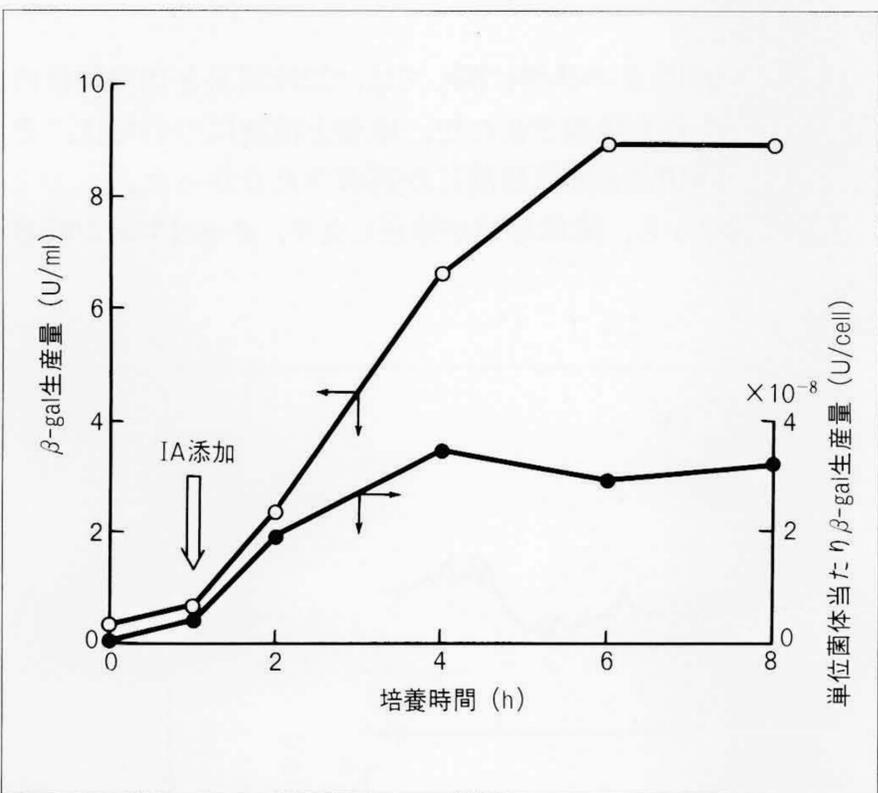


図4 β-gal生産の経時変化 IAの添加により、β-galの生産が誘導される。

害があるからであろう。

IAを培養1時間目に添加したときのβ-gal生産の経時変化を図4に示す。単位液量当たりのβ-gal生産量は培養6時間目以降8.9U/mlとほぼ一定になったが、単位菌体当たりのβ-gal生産量は培養4時間目以降約 3×10^{-8} U/cellと一定になった。培養4時間目から6時間目での単位液量当たりのβ-gal生産量の増加は、菌体濃度の増加によるものである。純粋なβ-gal 1mgは340Uである⁵⁾ことから、大腸菌1個当たりのβ-gal分子数として表わすと約10万分子となり、菌体タンパクの20%以上のβ-galが生産されたことになる。

このようにβ-galを菌体内に大量に蓄積できることから、発現ベクタpTRE1は目的遺伝子の発現に極めて有効なベクタであることが証明できた。

4 誘導剤の添加指標³⁾

誘導剤の添加によりβ-galの生産が誘導されるが、その添加時期がβ-galの生産性に大きく影響する。したがって、培養工程を菌体増殖期とβ-gal生産期の二つに分け、菌体濃度が最大に達した時点で、誘導剤を添加する方式が効率的であるとした。そこで培地中のグルコースが消費されると、酸素消費量が減少してDO(溶存酸素)濃度が上昇することから、DO濃度を指標にして、IA及びβ-gal合成の基質としてカザミノ酸を同時に添加した。

5l小形培養装置を用いた培養結果を図5に示す。DO濃度は酸素消費量が増大するとともに低下し、同時に培地中のグルコース濃度も減少した。グルコースが消費されDO濃度が急激に上昇した培養1.5時間目にIAとカザミノ酸をそれぞれ15mg/l、2.5g/l添加した。この時点で菌体濃度は4.3g/lとほぼ最大値に達した。添加後DO濃度は低下せず、5.5mg/l前後の高い状態であったが、培養6時間目にはβ-gal生産量は添加時の16.6U/mlから1.3倍の21.8U/mlに、単位菌体量当たりでは4.8U/mgに向上した。

一方、培養時のRQ(Respiratory Quotient:呼吸商)、つまり炭酸ガス生成量と酸素消費量の比は、菌体の生理状態を反映することが知られている。特に、パン酵母培養ではRQの上昇とエタノールの生成が関連している⁶⁾。このことから、50l精密制御培養装置⁸⁾を用いてRQを誘導剤の添加指標に利用する方法を検討した。図6に示すように菌体増殖時のRQは0.9

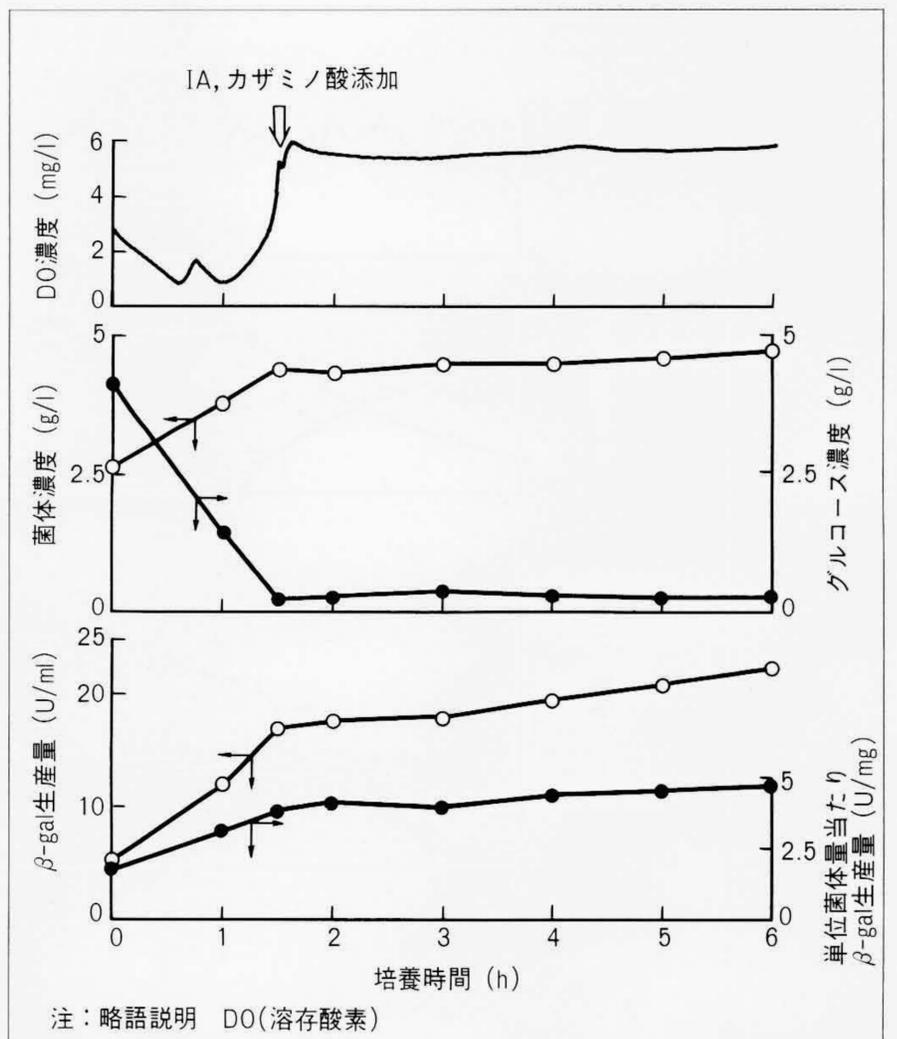


図5 DO濃度を指標とした誘導剤の添加 培地中のグルコースが消費され、菌体濃度が最大になった時点でDO(溶存酸素)濃度が上昇するため、それを指標として誘導剤を添加した。

mol/mol程度であったが、培養4時間20分目にRQが1.4mol/molにまで急激に上昇した。この時点は基質であるグルコースが消費され、菌体濃度が最大になった時点と一致した。そこで培養5時間目にIAとカザミノ酸を添加したところ、RQが漸次低下し0.8~0.9mol/molの範囲になった。培養14時間目ごろに再びRQが上昇したが、以後β-galは生産されていない。したがって、この時点でβ-gal生産が終了したと判定できる。これら基質消費時やβ-gal生産停止時でのRQの上昇は、菌体の代謝変化による酸素消費速度の低下のほうが炭酸ガス生成速度の低下よりも大きいことを示している。β-gal生産量はIA添加時の7.2U/mlから11U/mlにまで増加し、単位菌体量当たりのβ-gal生産量は4.6U/mgになった。

以上のようにDO濃度及びRQ変化をモニタすることで、菌体濃度が最大になる時点、すなわち誘導剤の効果的な添加時期を検知できることが明らかになった。

5 高密度培養

遺伝子組換え菌による有用物質の大量生産で、培養槽の生産性を向上させるには培養液中の菌体濃度を高くする高密度培養が有効であると考えられる。そこで、5l小形培養装置を用いて、培養中に消費された基質を添加する流加培養法により高密度培養を行った。流加用培地にはグルコース、カザミノ酸及び酵母エキスを主体とした培地を用い、増殖制限基質

であるグルコースの消費をDO濃度の急激な上昇を指標として検知し、培地を流加した。その結果を図7に示す。培地の流加により菌体は増殖し、培養18時間目には菌体濃度13g/lと最大値に達したが、これ以後増殖は停止した。しかも、培養32時間目にIAとカザミノ酸を添加してもβ-galの生産は誘導されなかった。

このように、菌体増殖が停止するのは菌体増殖やβ-gal生産の誘導を阻害する物質が培養液中に存在するからではないかと考えられた。そこで、菌体が増殖している12時間目と停止した19時間目の培養上清液に新しい培地を添加し、新鮮な菌体を接種して振とうフラスコで培養した。その結果を図8に示す。12時間目の培養上清液では、比増殖速度が対照の約50%と悪く、19時間目では菌体は全く増殖しなかった。また菌体自体の増殖活性を調べるために、凍結保存しておいた12時間目と19時間目の菌体を新鮮な培地に接種し培養したところ、その比増殖速度はそれぞれ $0.36 \frac{1}{h}$ と $0.32 \frac{1}{h}$ であり、対照の70~80%であった。凍結保存したための菌体の活性低下を考慮すると、培養期間中の菌体増殖活性は対照とほぼ同じであると考えられる。

また、β-gal生産の誘導に関しては、12時間目と19時間目の菌体では両方とも誘導されたが、培養上清液については、それぞれ対照の10%と8%程度しか誘導されなかった。

以上の結果から、菌体増殖が停止したり、β-gal生産が誘導

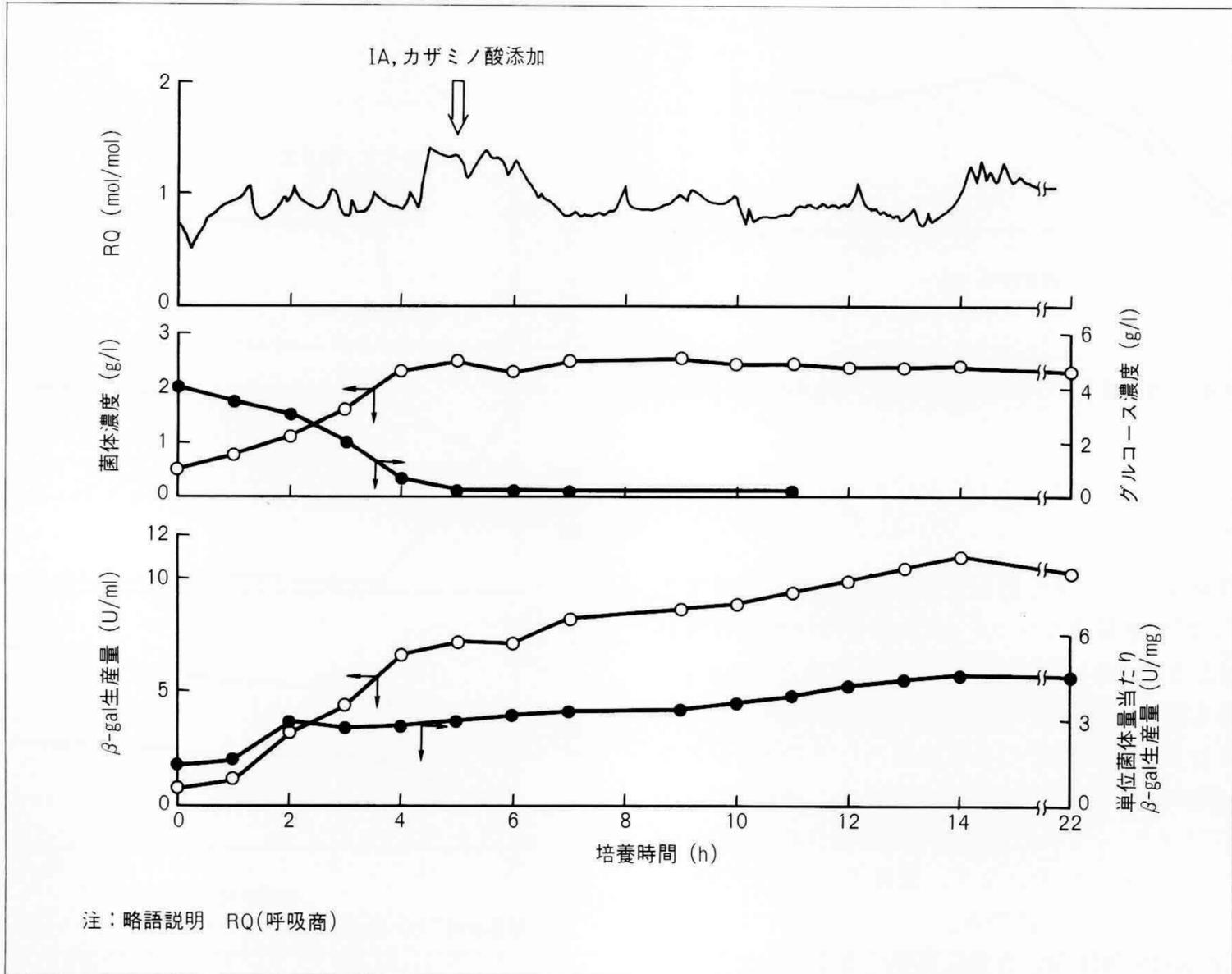


図6 RQを指標とした誘導剤の添加 培地中のグルコースが消費され、菌体濃度が最大になった時点でRQ(呼吸商)が上昇するため、それを指標として誘導剤を添加した。

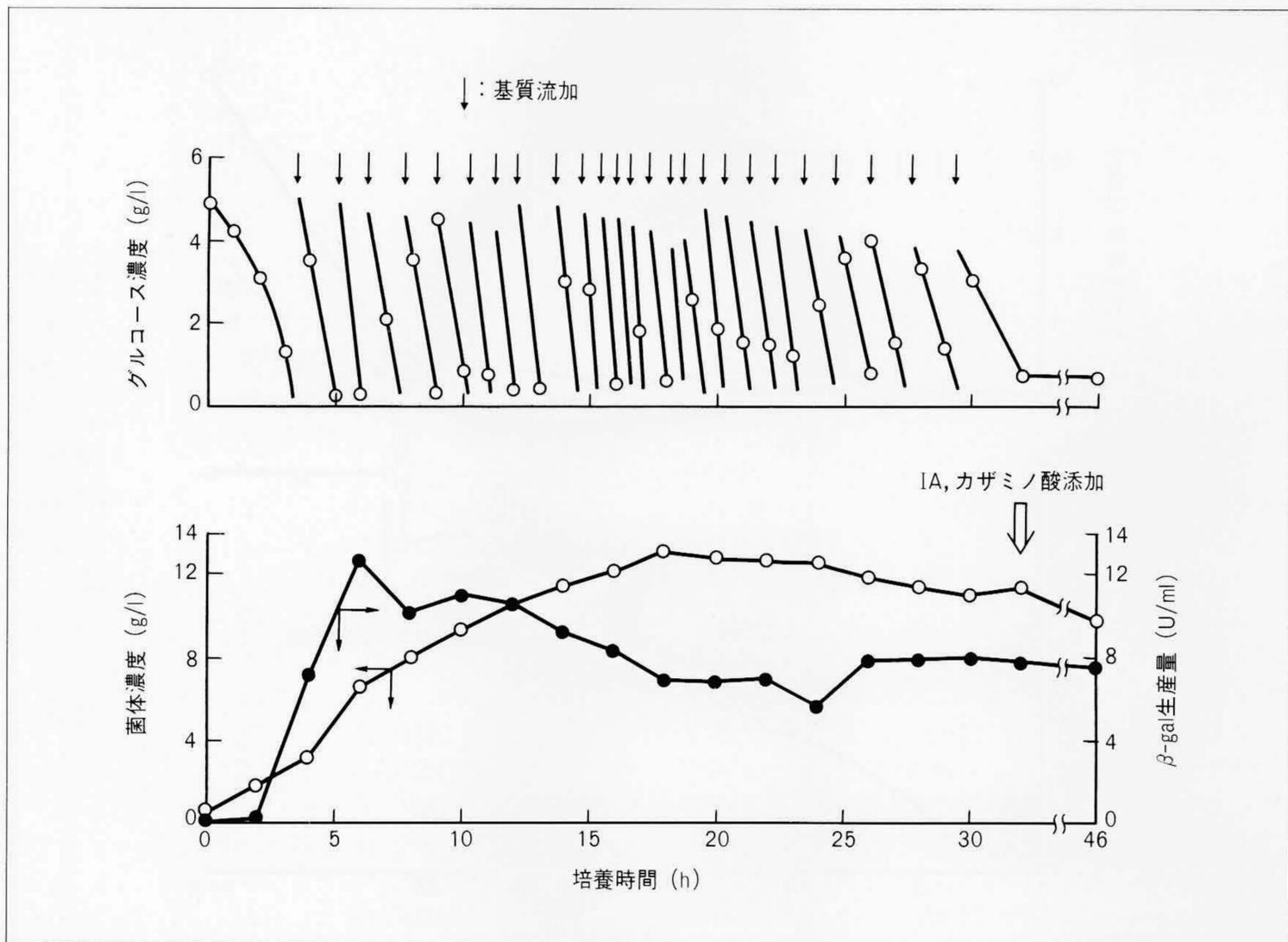


図7 基質流加による高密度培養 DO濃度が急激に上昇した時点で基質を流加したが、培養18時間目には基質の流加にもかかわらず菌体の増殖が停止した。

されない原因は、菌体自体の活性低下によるものでなく、培養の経過とともに培養液中に菌体増殖阻害物質が蓄積して行くためであることが分かった。

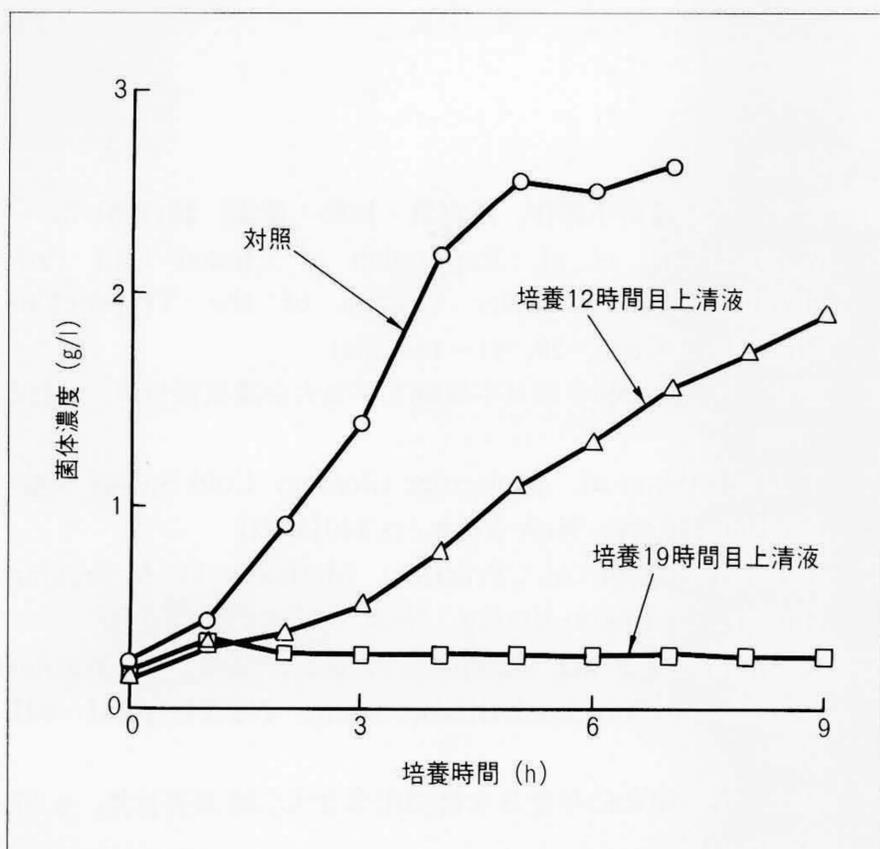


図8 培養上清液による菌体増殖の阻害 菌体増殖が停止した培養19時間目の培養上清液では、菌体は全く増殖しなかった。

この菌体増殖阻害物質を同定するため、19時間目の培養上清液を限外濾過膜によって分子量分画した後、イオン交換樹脂を用いて増殖阻害物質を分離した。それを細管式等速電気泳動装置とガスクロマトグラフを用いて同定したところ酢酸であることが分かった。この酢酸は19時間目の培養上清液中に約30g/l蓄積していた。

以上のように、菌体が生成する酢酸によって菌体増殖が阻害されることから、これを除去すれば高密度培養が可能になることが分かった。

6 反復流加培養⁷⁾

培養液中に蓄積した酢酸を除去すれば菌体は増殖し、かつβ-gal生産を誘導できる。そこで遠心分離によって菌体を回収し、再び新鮮な培地に懸濁して培養する反復流加培養法を採用して、菌体の高密度化を図ることにした。

その結果を図9に示す。菌体増殖が低下した培養12時間目、18時間目、22時間目及び26時間目で遠心分離により上清を除去して流加培養を行ったところ、菌体濃度は21g/lの高濃度に達した。培養26.5時間目にIAを50mg/lとカザミノ酸を25g/l添加したところ、培養41.5時間目にβ-gal生産量はIA添加前の約8倍の16U/mlに達した。これらの結果、菌体増殖阻害物質である酢酸を遠心分離によって除く反復流加培養により、菌体を高濃度に培養でき、かつ目的遺伝子を誘導剤によって発現させることで、有用物質を大量に得ることができた。

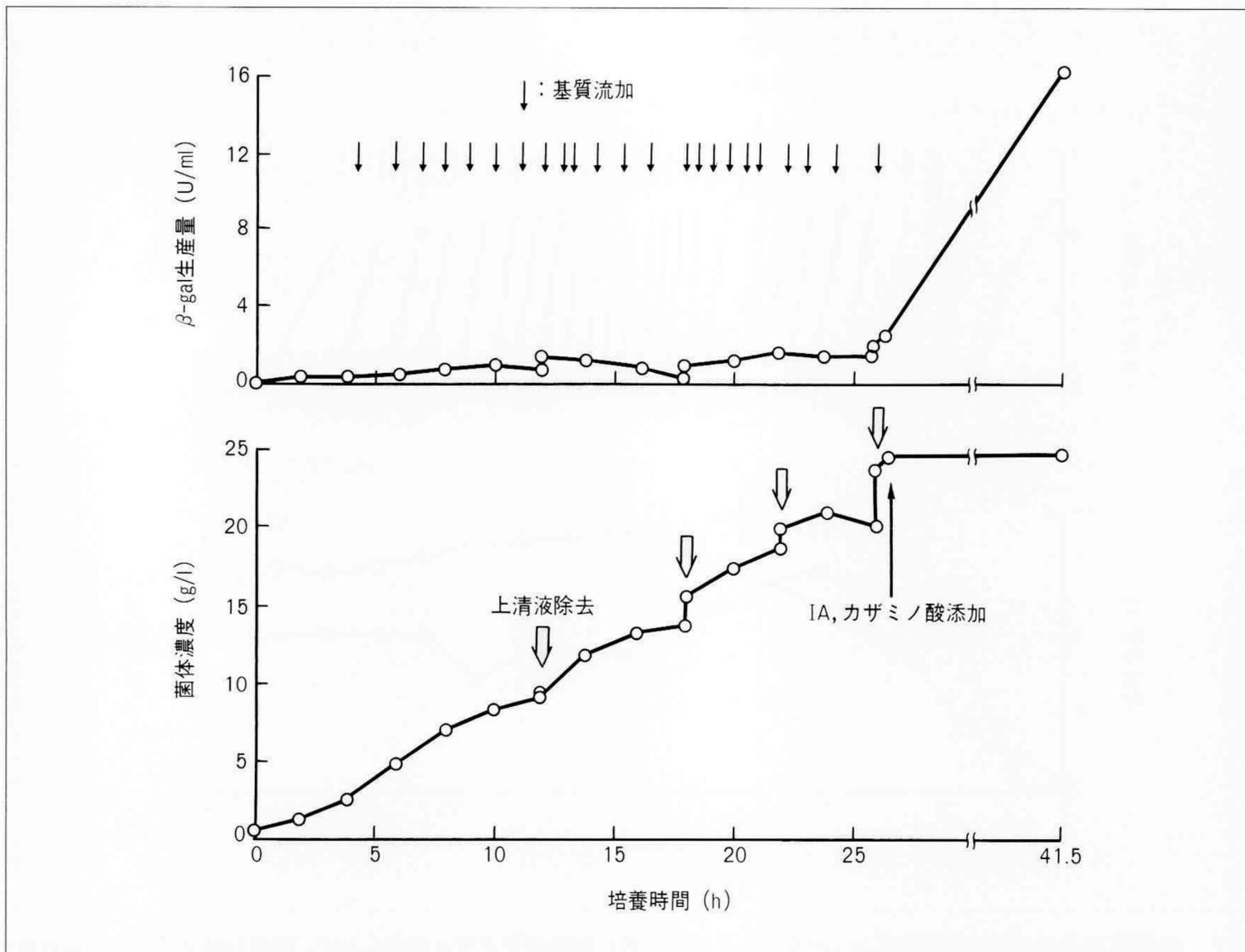


図9 反復流加培養による菌体の高密度化 菌体増殖が低下した時点で、遠心分離によって培養上清液を除去する反復流加培養により、菌体濃度の高密度化とβ-galの生産を図った。

7 精密制御培養装置⁸⁾

培養条件を意図的にきめ細かく制御し、管理することが必要な遺伝子組換え菌の大量培養は、既に報告した精密制御培養装置⁸⁾によって実現できる。すなわち、本装置はマイクロコンピュータによって培養温度、圧力、pH、DO濃度、RQなどを制御することにより流加培養を可能にしている。したがって、制御ソフトに誘導剤の添加処理機能を組み込むことによって、自動制御培養が可能になる。また、連続遠心分離機を用いる反復流加培養は、炭素収支や酸素収支から計算した菌体増殖量変化によって上清除去時期を検知することで自動化が可能になる。

以上、発現ベクタ、誘導剤添加時期の検知、反復流加培養方式及び精密制御培養装置を特徴とする遺伝子組換え菌の培養システムについて述べた。

8 結 言

精密制御培養装置を用いることで、遺伝子組換え菌の効率的な培養を達成できることを述べた。

遺伝子組換え菌の培養システムによって、β-galは菌体当たりで約10万分子、単位菌体量当たりでは約5 U/mgが得られ、菌体濃度は20g/l以上の高密度が可能になった。今後は遺伝子組換え菌の物質代謝を検討することで、酢酸生成の抑制やタンパク合成の高速化など、より高度な培養システムを開発し

てゆく考えである。

終わりに、本システムの開発に当たり、菌株及びプラスミドを分譲していただいた東京大学農学部・農芸化学科の別府輝彦教授に対し厚く御礼申し上げる次第である。

参考文献

- 1) 松原, 外: 遺伝子操作, 蛋白質・核酸・酵素, **26**(1981-3)
- 2) K.Nishimori, et al.: Expression of Cloned Calf Prochymosin cDNA under Control of the Tryptophan Promoter, *Gene*, **29**, 41~49(1984)
- 3) 清水, 外: 昭和60年度日本醸酵工学会大会講演要旨集, p.152 (1985-10)
- 4) T.Maniatis, et al.: *Molecular Cloning*, Cold Spring Harbor Laboratory, New York, p.440(1982)
- 5) R.F.Schleif, et al.: *Practical Methods in Molecular Biology*, Springer-Verlag, New York, p.45(1981)
- 6) N.Shimizu, et al.: *Computer Control of Fermentation Processes*, *Biotechnol. Bioeng. Symp.*, No.14, p.681~691 (1984)
- 7) 清水, 外: 昭和61年度日本農芸化学会大会講演要旨集, p.97 (1986-4)
- 8) 住谷, 外: 精密制御培養装置, 日立評論, **64**, 9, 675~678(昭57-9)