

乳酸菌のゲノムエンジニアリング

橋本 昌征

(信州大学 ファイバーナノテク国際若手研究者育成拠点)

研究の目的

現在、大腸菌および枯草菌において全一遺伝子破壊株群が作製されている。さらに、大腸菌において網羅的な領域欠失株群が報告されており、その実験結果から両細菌において約 300 の必須遺伝子が見積もられている¹⁻³⁾。例えば約 4,400 の遺伝子を持つ大腸菌の場合、トランスポゾンなどによるランダムな変異によって全ての非必須遺伝子の欠損を網羅するためには数万の変異株群が必要となる。そのため、この様なライブラリーを用いてスクリーニングを行うには簡便なアッセイ系を用いる必要がある。一方、一遺伝子破壊株群を用いた場合は約 300 の必須遺伝子を除いた 4,100 変異株によって全ての非必須遺伝子の欠損を網羅することができ、さらに網羅的領域欠失株群の場合は 551 株で全てを網羅できる。つまり、より少ない変異株群によって全ての非必須遺伝子をカバーすることができるため、アッセイに手間のかかるスクリーニングが可能となる。実際、これらはバイオフィーム形成・スウォーミング・ATP生成など様々なスクリーニングに用いられている。

乳酸菌とは炭水化物を乳酸へと代謝する細菌の総称で、様々な種の細菌を含んでいる。有用な乳酸菌は世界中で食品加工に広く用いられてきており、近年では乳酸菌のプロバイオテクスが注目を集め、さらに脱石油エネルギーを目指したバイオプラスチックの原料生産にも利用されている。この様な観点から、乳酸菌のゲノム配列が多数報告されており、ゲノムスケールでの代謝工学が本格化しつつある。しかし、乳酸菌染色体の網羅的変異株群として挿入配列やトランスポゾンを用いた報告はなされているが、網羅的な一遺伝子破壊株群や領域欠失株群の報告は我々が知る限りない。今回用いている *Lactococcus lactis* は非病原性の乳酸菌で、チーズのスターターとして良く利用されており、*L. lactis* IL1403 株は乳酸菌の中で初めてゲノムが解読された菌株である⁴⁾。我々は、この乳酸菌 *L. lactis* IL1403 の網羅的領域欠失株群の作製を試みている。

実験方法および結果

L. lactis IL1403の染色体領域削除は温度感受性のプラスミドを利用して相同組換えの系で行った(Fig. 1)。温度感受性プラスミドpGh9をベースに、欠失用プラスミドベクター (pGhT000) を次のように作製した⁵⁾。まず始めに、pGh9のエリスロマイシン耐性遺伝子の中にある制限酵素 *XcmI* サイトをアミノ酸置換がないように削除した。次に、*L. lactis* IL1403由来の *upp* 遺伝子をクローニングし、pGhT00を構築した。*upp* は uracil phosphoribosyltransferase をコードし、ウラシルからUMPを生成する。野生株の *L. lactis* は5-フルオロウラシルを含む培地上で生育できないが、*upp* の欠損株は生育することができる⁶⁾。そこで、これをネガティブセレクションマーカーとして利用して5-fluorouracilを含む培地上で *upp* を持たない組換え体の選抜を容易に行うこと

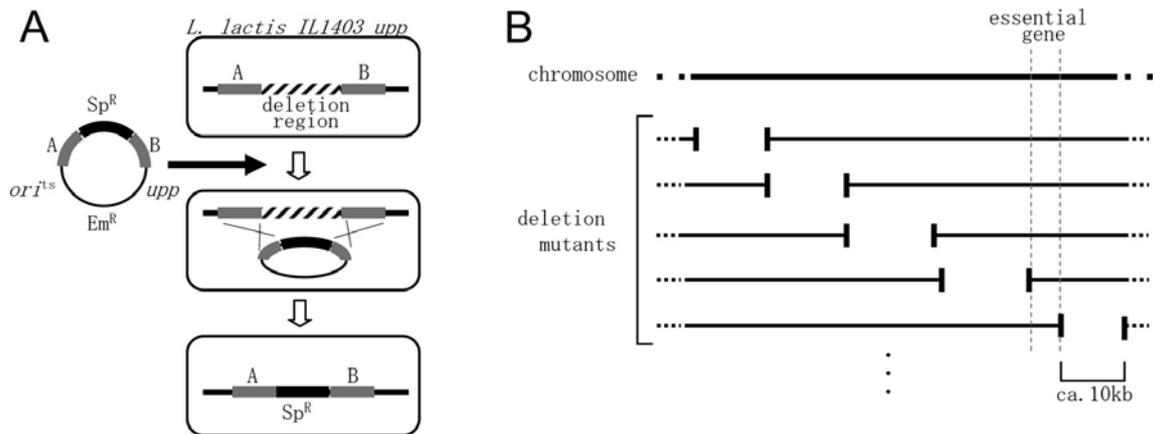


Fig. 1 (A)The chromosomal deletion system. (B)Schematic drawing of a series of consecutive chromosomal deletion mutants.

ができる。最後に、両脇に制限酵素 *XcmI* サイトを含むカナマイシン耐性遺伝子を pGhT00 のマルチクローニングサイトにクローニングして pGhT000 を構築した。このプラスミドを *XcmI* で処理するとその切断部位の 3' 末端に T が一つ付加した形で切断されるように設計しており、これによって PCR 産物を TA クローニングすることができる。削除させたい領域に隣接する上流・下流の各 1 kb の配列の間にスペクチノマイシン耐性遺伝子を挟んだ DNA 断片を 2 回の PCR によって調製し、pGhT000 をベクターに TA クローニングした。まず、このプラスミドを用いて *L. lactis* IL1403 *upp* を形質転換した。得られたスペクチノマイシン耐性 (Sp^R) 形質転換体を 28 °C で 150 分間液体培養し、その後 35 °C にてさらに 150 分間培養し、その一部をスペクチノマイシンを含む培地にプレーティングして 35 °C でインキュベーションした。得られたコロニーを 28 °C で液体培養し、スペクチノマイシンと 5-fluorouracil を含む培地にプレーティングして 35 °C でインキュベーションした。これによって得られたコロニーはほとんどが染色体の領域欠失株であり、効率的に組換え体を得ることができた。なお、組換え体の染色体構造は PCR にて確認した。

網羅的な領域欠失株群を効率よく作製するためには、欠失する領域に必須遺伝子が含まないように設計することが重要である。しかし、*L. lactis* の必須遺伝子に関する報告はあまり多くない。そこで、*L. lactis* と同じグラム陽性細菌である枯草菌の必須遺伝子 (271 遺伝子) を参考に *L. lactis* の必須遺伝子を予測した。予測した必須遺伝子 (約 300 遺伝子) と *L. lactis* IL1403 の染色体長 (約 2.4 Mb) から、欠失させる領域長を平均 10 kb とした。現在、必須遺伝子を除く領域を欠失させた株を上記の方法で順次作製している。

結論

乳酸菌 *L. lactis* IL1403 の染色体領域を削除させるためのプラスミド pGhT000 を構築した。pGhT000 は温度感受性複製起点とネガティブセレクションマーカとして *L. lactis* 由来の *upp* 遺伝子を含み、制限酵素 *XcmI* で処理する事で TA クローニングが可能なベクターである。温度感受性複製起点とネガティブセレクションマーカを組み合わせたこのプラスミドを利用して効率的な *L. lactis* の染色体領域欠失に成功した。*L. lactis* の必須遺伝子を枯草菌の必須遺伝子から推定し、約 10 kb の非必須領域を欠失さ

せた株を順次作製している。

参考文献

- 1) Baba T, Ara T, Hasegawa M, Takai Y, Okumura Y, Baba M, Datsenko KA, Tomita M, Wanner BL, Mori H. (2006) Construction of *Escherichia coli* K-12 in-frame, single-gene knockout mutants. *Mol Syst Biol.*, **2**, 2006.0008.
- 2) Kobayashi K *et al.* (2003) Essential *Bacillus subtilis* genes. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, **100**, 4678-4683.
- 3) Kato J, Hashimoto M. (2007) Construction of consecutive deletions of the *Escherichia coli* chromosome. *Mol Syst Biol.*, **3**, 132.
- 4) Bolotin A, Wincker P, Mauger S, Jaillon O, Malarne K, Weissenbach J, Ehrlich SD, Sorokin A. (2001) The complete genome sequence of the lactic acid bacterium *Lactococcus lactis ssp. lactis* IL1403. *Genome Res.*, **11**, 731-753.
- 5) Maguin E, Prévost H, Ehrlich SD, Gruss A. (1996) Efficient insertional mutagenesis in lactococci and other gram-positive bacteria. *J Bacteriol.*, **178**, 931-935.
- 6) Martinussen J, Hammer K. (1994) Cloning and characterization of *upp*, a gene encoding uracil phosphoribosyltransferase from *Lactococcus lactis*. *J Bacteriol.*, **176**, 6457-6463.