

細菌リポ多糖修飾制御機構と選択的希少金属粒子生産

加藤 明宣

近畿大学 農学部バイオサイエンス学科

研究の目的

グラム陰性菌の外膜はリポ多糖 (LPS) に覆われ、その修飾は抗菌剤抵抗性や宿主自然免疫からの回避等に重要である。サルモネラ菌において、二成分制御系の PmrA/PmrB は、細胞外 Fe^{3+} に応答し、LPS 修飾遺伝子群を制御する主要調節機構である (図 1) ^{1,2)}。最近、LPS 修飾状態と PmrA/PmrB 系間の相互フィードバック調節機構を明らかとした (図 1) ^{3,4)}。

一方、サルモネラ菌と同じグラム陰性の γ プロテオバクテリアに属する鉄還元細菌のシュワネラは、金/銀/白金/パラジウム等有用金属ナノパーティ

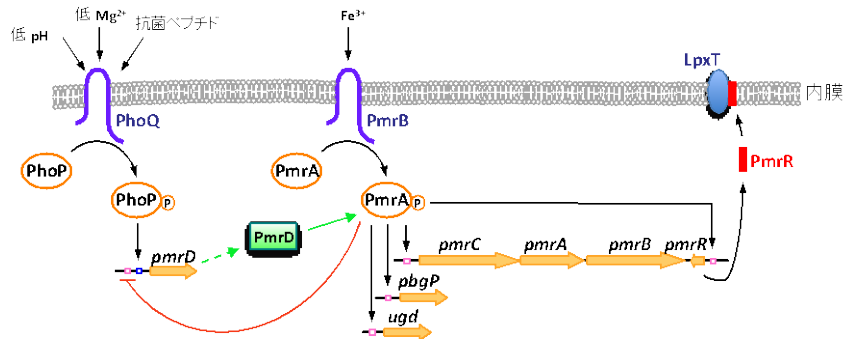


図 1. サルモネラ菌のリポ多糖 (LPS) 修飾遺伝子調節ネットワーク

クル(NPs)の生合成(図 1)、レアメタルのリサイクル等の技術開発に利用されているため、その生理機能の解明と機能性向上は有効となる。サルモネラ菌がリポ多糖(LPS)のリン酸部位を高度に修飾することで、 Fe^{3+} との結合性を制御するのに対し、シュワネラ菌は同様の LPS 修飾調節機構を保持しない。本研究では、サルモネラ菌の LPS 修飾制御機構を利用し、シュワネラ菌の金属結合親和性及び特異性を改良し、金属 NPs 加工・希少貴金属回収技術等の向上に役立てる。

方法

まず、(1) Fe^{3+} 耐性を付与する複数のサルモネラ菌 LPS 修飾遺伝子群 (比較的大きな遺伝子クラスター) をシュワネラ菌に導入するまでの過程で、以下の操作を行う。サルモネラ菌の染色体上で LPS 修飾調節遺伝子群を、FRT 配列により 2 回分断する。これを受容菌とし、P22 ファージによるトランスダクションにて、pBAC108L-FRT ベクターを保持した受容菌に移し、FLP により部位特異的に組換えることで *in vivo* クローニングする (図 2) ⁵⁾。次に、(2) シュワネラ菌のペリプラズムを選択的な希少貴金属生産のプラットフォームとする為、外膜 c-type シトクロムに非依存的なペリプラズム内 NPs 形成経路のみを有するシュワネラ菌株を構築する。この遺伝学的操作には allelic exchange vector の pDMS197 を用いる。欠損させる遺伝子群の上流・下流 500 bp 領域の

2つの断片をクローニングする際に、FRT 部位を間に挟み込み、pDMS197-up-FRT-down プラスミドとする。既に (1) にて FRT に挟まれた LPS 修飾遺伝子群 DNA 断片を、pDMS197-up-FRT-down に乗り換え組込みすることで、外膜主要 c-type シトクロム欠損、及び、LPS 修飾遺伝子群の接合導入が可能なベクターとする。また、(3) シュワネラ菌の全二成分制御系を個別に欠失した菌株の構築を目指し、シュワネラ菌に即した二成分制御系の包括的な破壊欠損株作成の為にプラスミドの構築を行い、順次、欠損系列の作成へと移行する。(4) (1-3) で作成した菌株と野生株を希少貴金属混合溶液存在下で培養後、SEM 等で元素分析することで、目的の性質を獲得したかを評価する。

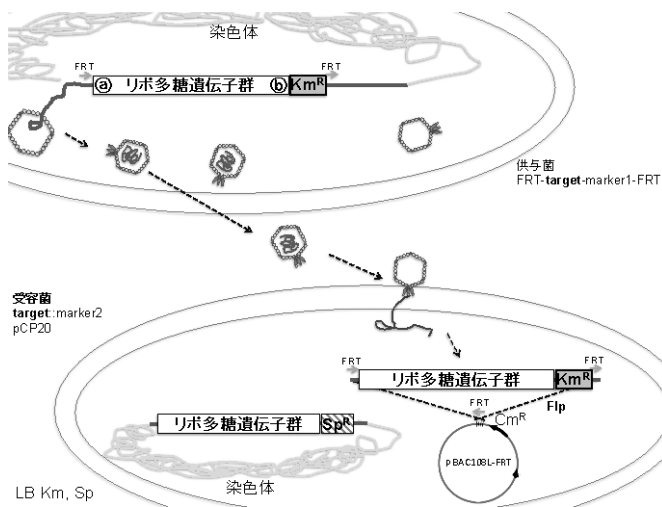


図2. P22 ファージと FLP リコンビナーゼを用いたリポ多糖遺伝子群の In vivo cloning

供与菌で、リポ多糖遺伝子群が FRT と Km^R-FRT にて、分断されている。P22 ファージは、「FRT-リポ多糖遺伝子群-Km^R-FRT 断片」を取り込み、pBAC108L-FRT を有する供与菌の FRT 部位への FLP 依存的な組入れを仲介する。

結果

本研究において、サルモネラ菌リポ多糖遺伝子群をシュワネラ菌へ導入する過程で、まず、比較的大きな、この遺伝子クラスターを正確にクローニングする必要があり、P22 ファージと FLP リコンビナーゼを介した新規の In vivo クローニング法を確立した⁵⁾。この際、正しいインサートを有するクローンの割合は概ね 70 パーセントで、少なくとも 20 kb 程度まで、その正確性が保たれていた。これにより、2つの FRT で挟まれた状態でリポ多糖遺伝子群が、pBAC108L に保持されたクローンが構築された。尚、このインサートは FLP を介し、FRT を有する別のプラスミドにも乗り換えさせることが可能である。一方、外膜主要 c-type シトクロムを欠損させる allelic exchange プラスミド pDMS197-up-FRT-down に FRT 部位を持たせる設計とした。両プラスミド間での交換反応後、接合によりリポ多糖遺伝子群をシュワネラ菌染色体に組込むことが可能となった。また、二成分制御系の欠損系列構築では、pDMS197 のうち、*sacB* 遺伝子を除く DNA 領域のみをベクターとして利用した。欠損させるレスポンスレギュレーター(RR)/ヒスチジンキナーゼ(HK)遺伝子のコーディング領域の一部のみをクローニングしたプラスミド系列を作成した。これを用いて、RR/HK オペロンの先頭の遺伝子に 1 回相同組換えでベクターごと組み入れ、下流遺伝子にポラーな欠損体の構築が行われた。得られた

シュワネラ菌株を希少貴金属混合溶液と反応させ、金属粒子形成能の解析を行っている。

結論

シュワネラ菌において、遺伝子欠損株の構築や、遺伝子導入のために利用できる遺伝学的ツールは、限定的である。特に、多数の遺伝子を系統的に欠損させる際や、複数の大きな遺伝子断片を導入する際は、ツールの開発も課題である。核酸供与体側でも行程整理が重要である。幾つかの試みがこれまでに成功し、方法論が確立されつつある。その一部として、サルモネラ菌にてリポ多糖遺伝子群など比較的大きな遺伝子クラスターを正確に *In vivo cloning* する手法が確立された。またこの過程で派生した **FRT** 部位は、リポ多糖遺伝子群をシュワネラ染色体上まで導く過程で再利用された。本研究にて構築されたシュワネラ菌株の潜在性が最大限発揮されるには、導入した遺伝子の発現を最適化し、金属選択性を更に高める必要がある。そのため、自然突然変異等にてより相応しい表現型を示すよう育種し、その都度、**SEM** 等による元素分析にて評価を繰り返していくことが、今後の課題である。

文献

1. Kato A, Groisman EA. (2004) Connecting two-component regulatory systems by a protein that protects a response regulator from dephosphorylation by its cognate sensor. *Genes Dev.* **18**: 2302-2313.
2. Kato A, Latifi T, Groisman EA. (2003) Closing the loop: the PmrA/PmrB two-component system negatively controls expression of its posttranscriptional activator PmrD. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **100**: 4706-4711.
3. Kato A, Chen HD, Latify T, Groisman EA. (2012) Reciprocal Control Between a Bacterium's Regulatory System and the Modification Status of its Lipopolysaccharide. *Mol Cell.* **47**: 897-908.
4. Kato A, Higashino N, and Utsumi R. (2017) Fe³⁺-dependent epistasis between the CpxR-activated loci and the PmrA-activated LPS modification loci in *Salmonella enterica*. *J. Gen. Appl. Microbiol.* **62**: 286-296.
5. Kato A. (2016) *In vivo cloning of large chromosomal segments into a BAC derivative by generalized transduction and recombineering in Salmonella enterica*. *J. Gen. Appl. Microbiol.* **62**: 225-232.