

微生物による多様な金属酸化物の合成に関する研究

○山本 兼由 (法政大学生命科学部)

要旨

Mn(II)を酸化してMn(IV)酸化物を合成する真菌や細菌が報告されている。Actinobacteria門、Firmicutes門、Proteobacteria門を含む様々な細菌がMn酸化能をもつことが推測されている。本研究では、微生物の金属酸化システムを再構成させ、金属酸化物の効率的な発酵合成と多様な金属酸化物合成デザイン制御を目指し、Mn酸化物を合成する*Pseudomonas putida*から逆遺伝学的にMn酸化物合成酵素遺伝子を単離同定することを行った。*P. putida* KT2440株を、金属を含むM9グリセロール寒天培地に30°Cで画像培養し、コロニーの呈色を確認した。また、KT2440株のシングルコロニーを、金属を含むM9グリセロール液体培地に30°Cで終夜培養し、培養液および培養上清の呈色を確認した。*P. putida* GB-1株で推定される全7種類のMn酸化遺伝子のすべてをKT2440で確認した。KT2440株の*lapA* (PP_0168), *cumA* (PP_1034), *copA2* (PP_2205), *mopA* (PP_2561), *mcoA* (PP_3184), *mnxG* (PP_3490), *copA1* (PP_5380)のそれぞれの遺伝子上流側300 bpと下流側300 bpを、一方の末端にベクターの挿入領域との相同配列をもつように設計したプライマー対を用い、KT2440ゲノムを鋳型としてPCRで増幅し、精製した。つぎに、ゲンタマイシン耐性遺伝子カセットを、増幅した遺伝子の上流領域の一部と相同な配列を一方の末端に、増幅した遺伝子の下流領域の一部と相同な配列を他方の末端にもつように設計したプライマー対を用い、pPS856プラスミドを鋳型として、PCRで増幅し、精製した。これら3つのDNA断片と*Sal I*と*Pst I*を用いて線状化したpK19mobsacBを混合し、試験管内組換え酵素によって、全てが連結した組換え遺伝子をもつプラスミドを大腸菌DH5αへの形質転換によって、PP_5380, PP_0168, PP_1034, PP_2205, PP_2561, PP_3490, PP_3184のそれぞれがゲンタマイシン耐性遺伝子カセットで破壊された組換え遺伝子プラスミドを構築した。ゲンタマイシン耐性遺伝子カセットで破壊された組換え遺伝子プラスミドは、大腸菌S17-1 λ pirへ導入し、大腸菌形質転換体とKT2440株と混合し、接合反応後、クロラムフェニコールとゲンタマイシンへの耐性によって、まずシングルクロスオーバー組換えにより目的組換え遺伝子がKT2440ゲノム上に導入された形質転換体を選抜した。その後、ダブルクロスオーバー組換えにより目的遺伝子がゲンタマイシン耐性遺伝子カセットで破壊された形質転換体を、スクロース耐性株とした。*P. putida* KT2440株はGB-1株と同様に、培地中のMn(II)の存在で呈色するコロニーを形成した。また、銅(II)と亜鉛(II)でも呈色コロニーを確認した。これらの呈色した成分は細胞外に分泌されており、培養液の上清に存在することが明らかとなった。KT2440を親株とした*lapA*, *cumA*, *copA2*, *mopA*, *mcoA*, *mnxG*, *copA1*の欠失株は、親株と比較して、寒天培地上のMn(II)添加による呈色コロニー形成に顕著な違いを確認できなかった。また、銅(II)と亜鉛(II)添加による呈色コロニーでも同様に違いを確認できなかった。これらの結果より、KT2440株の金属酸化能は複数の遺伝的要因で行われることが示唆された。

1. マンガン酸化土壌に含まれる細菌とマンガン酸化細菌

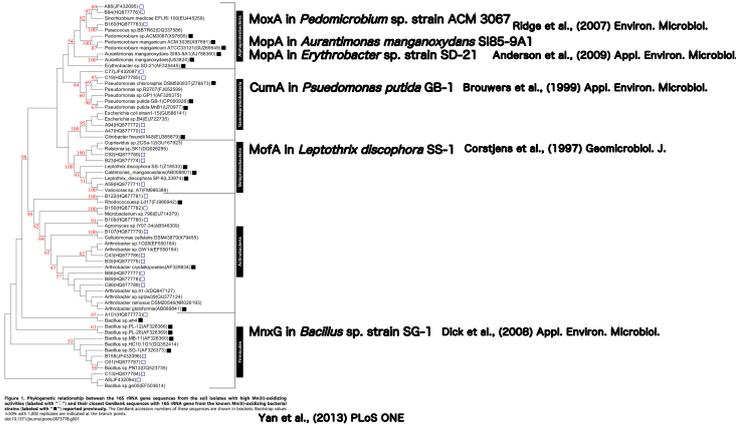


Figure 1. Phylogenetic relationships between the 16S rRNA gene sequences from the soil isolates with high Mn(II)-oxidizing activities. Scale bar = 0.1 substitutions per site. The accession numbers for the 16S rRNA gene from the GenBank database are indicated in the tree. The scale bar represents the number of substitutions per site. The scale bar represents the number of substitutions per site.

Yan et al., (2013) PLoS ONE

2. Pseudomonas putida GB-1のマンガン酸化能

Pseudomonas putida GB-1 strain



Francis & Tobe (2001) Appl. Environ. Microbiol.

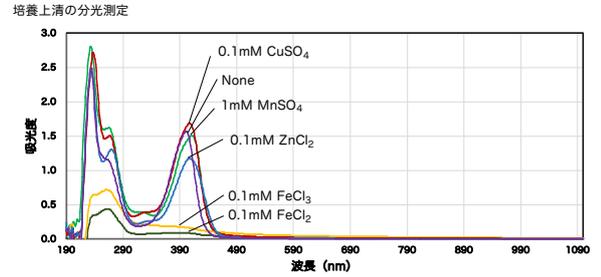
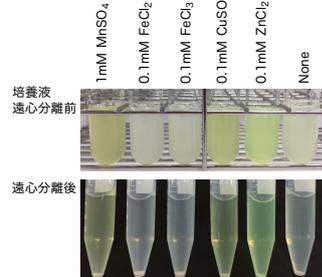
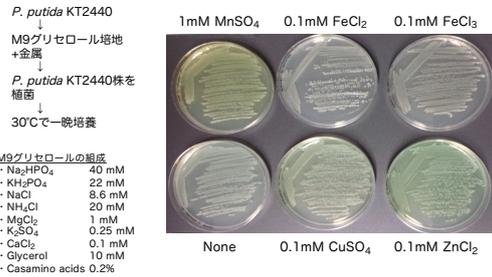
Gene	Organism	Accession	Protein function in <i>P. putida</i> GB-1	E value
<i>moxA</i> (CG2948026)	<i>Pedomicrobium</i> sp. strain ACM 3067	EF087811_1828	Copper resistance protein CopA	3.1 × 10 ⁻²²
		EF087811_1831	Multicopper oxidase CumA	1.1 × 10 ⁻²²
		EF087811_1837	Copper resistance protein CopA	6.2 × 10 ⁻²⁴
		EF087811_2065	Multicopper oxidase (moxA)	2
<i>moxB</i> (CG294843251)	<i>Leptothrix discophora</i> SS-1	EF087811_2147	Hypothetical protein (moxB)	1.1 × 10 ⁻²²
<i>moxC</i> (CG294812248)	<i>Bacillus</i> sp. strain SG-1	EF087811_3353	Animal hemin peroxidase (moxC)	0
<i>mopA</i> (CG19417986)	<i>Aurantimonas manganoxydans</i> S185-9A1	EF087811_2186	Adhesion protein LapA	4.1 × 10 ⁻⁶

Lexicon tag	Nonoxidizing strains											
	FB	KT2440	WA19	PK-1	LAR	temp	PP5	A191	DC5000	T1	PAC1	α^2 percent ^b
<i>moxA</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	ND
EF087811_1837	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	No
EF087811_1831 (lapA)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	No
EF087811_1835 (moxA)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	No
EF087811_1828	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	No
EF087811_2065 (moxC)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	Yes
EF087811_2147 (moxB)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	Yes
EF087811_3353 (moxC)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	Yes
EF087811_2186	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	Possible ^c

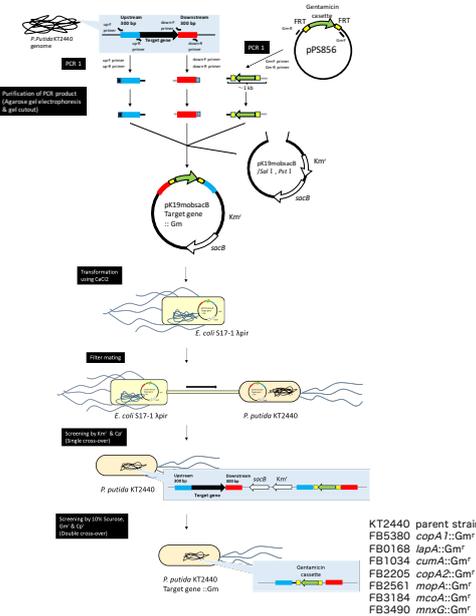
^a Oxidizing organisms are *P. putida* GB-1, *P. putida* KT2440, *P. putida* WA19, *P. putida* PK-1, *P. putida* LAR, *P. putida* temp, *P. putida* PP5, *P. putida* A191, *P. putida* DC5000, *P. putida* T1, and *P. putida* PAC1.

Geiswein et al. (2013) Appl. Environ. Microbiol.

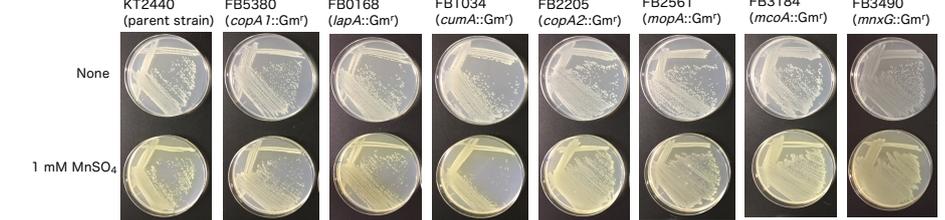
3. Pseudomonas putida KT2440の金属酸化



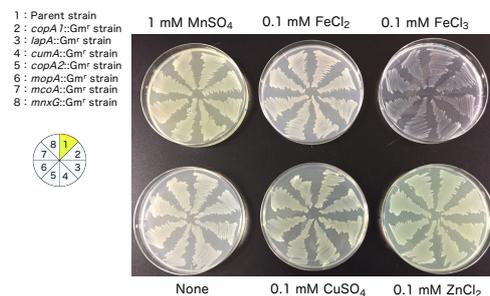
4. P. putida KT2440のマンガン酸化遺伝子破壊株



5. マンガン酸化遺伝子破壊株のマンガン酸化能



6. マンガン酸化遺伝子破壊株の金属酸化能



7. まとめ

- (1) *P. putida* KT2440株はGB-1株と同様に、培地中のMn(II)の存在でマンガン酸化物生成能を示した。
- (2) また、銅(II)と亜鉛(II)の存在でも金属酸化物を生成していることを確認した。これらの金属酸化物は呈色が異なる性質をもっていた。
- (3) これらの呈色した金属酸化物は細胞外に分泌された。
- (4) KT2440ゲノム上の*lapA*, *cumA*, *copA2*, *mopA*, *mcoA*, *mnxG*, *copA1*のそれぞれの単独欠失株では、マンガンを含む金属酸化物生成能に顕著な違いを確認できなかった。

↓
KT2440株の金属酸化能は複数の遺伝的要因で行われることが示唆された。今後、(1)多重遺伝子欠失株を作成し、金属酸化物生成に関わる遺伝子群を同定する。また、(2)金属酸化物生成に関わる遺伝子群の発現を一括で制御する遺伝子を探査する。

*本研究は東京大学生物生産工学センター野尻秀昭教授との共同研究で行われた。