



Title	PCRを使ったSynechocystisの高速簡便遺伝子破壊法
Author(s)	佐藤, 直樹
Citation	低温科学, 67, 583-586 光合成研究法. 北海道大学低温科学研究所, 日本光合成研究会共編
Issue Date	2009-03-31
Doc URL	http://hdl.handle.net/2115/39196
Type	bulletin (article)
Note	5章 形質転換 1. シアノバクテリア b
File Information	67-080.pdf



[Instructions for use](#)

1. シアノバクテリア

b. PCR を使った *Synechocystis* の 高速簡便遺伝子破壊法

佐藤 直樹¹⁾

外来 DNA を取り込む性質のある *Synechocystis* sp. PCC6803 では、遺伝子破壊のために必要な遺伝子破壊コンストラクトを PCR によって簡便に作る事ができ、多数の遺伝子破壊を平行して行うことができる。

A rapid method for gene disruption in *Synechocystis*

Naoki SATO

A rapid and convenient method for making DNA constructs to be used in gene disruption in *Synechocystis* sp. PCC6803 is presented.

1.b.1 はじめに

1996年にシアノバクテリアとして最初にゲノム塩基配列が決められた *Synechocystis* sp. PCC6803 は、外来 DNA を容易に取り込み、相同組換えによって、遺伝子ターゲティングが容易にできる。これまで、薬剤耐性カセットによって分断した遺伝子を含むプラスミドによる遺伝子破壊や、変異株のゲノム DNA・プラスミドクローンによる相補を利用したクローニング¹⁾などが行われている。これまで多くの研究では、遺伝子破壊コンストラクトとしてプラスミドが用いられてきたが、これには目的の遺伝子を含む DNA 断片のプラスミドへのクローニング、遺伝子内部の制限部位における切断、薬剤耐性カセットの挿入、という3つの段階を踏む必要がある。適当な遺伝子内部の制限サイトがない場合も多く、また、遺伝子によっては、プラスミドへのクローニングがうまくできないこともある。筆者の研究室でも以前は、遺伝子破壊コンストラクトを1個作るために1ヶ月程度要することも稀ではなかった。近年、PCRを利用した遺伝子改変技術が進歩し、これを活用することによって、クローニングを経ることなく容易に融合遺伝子を作ることができるようになった。本稿ではその一例として、相同組換えに使う薬剤耐性カセットを含んだ直鎖 DNA の作製とそれによる形質転換^{2,3)}について述べる。このような遺伝子破壊法の基本は前項 1.a に述べられているので、ここでは、本法に特有の事柄を中心として解説する。

1.b.2 PCR を用いた遺伝子破壊コンストラクトの作製

図1に方法の概略を示す。全部で4個の DNA を PCR によって増幅し、これを順次つないでいく。すべてを一度につなぐということもよく行われるが、失敗した場合にどこが悪いのか全くわからず、また、多くの場合、複数のバンドが出るため、あまり適切ではない。少し手間がかかるが、3回にわけて PCR を進めることにする。なぜ薬剤耐性カセットを分断するのかという疑問があるかもしれない。このようにすれば、最後にできる正しいコンストラクト以外の DNA が細胞に入っても薬剤耐性を与えることはないからである。PCR 自体は、各研究室で行われている方法を利用すればよい。

本法で用いるプライマーは表1にまとめた。プライマーの長さは研究室ごとに好みがある。プライマーの設計は経験に頼らず、適当なプライマー設計プログラムを利用するのがよい。私の場合、長いにこしたことはないと思ってほしい 25塩基くらいで設計しており、AT に富む場合は、さらに長くしている。また、参考までに、研究室で使っている PCR のプロトコルを表2、3に示した。実際に研究室で使っている装置は、BioRad 社の iCycler である。酵素としてはごく一般的なタカラの ExTaq を用いているが、特に変異率を低く抑えたい場合には他の適当な酵素を利用することをお勧めする。

まず、カナマイシン耐性カセットを2つに分けて増やす。私たちは pUC4K というプラスミドに入っているカナマイシン耐性カセットを使った。どこで分割しても構わないが、分割した2つの断片は互いに重なり合うよう

1) 東京大学大学院総合文化研究科

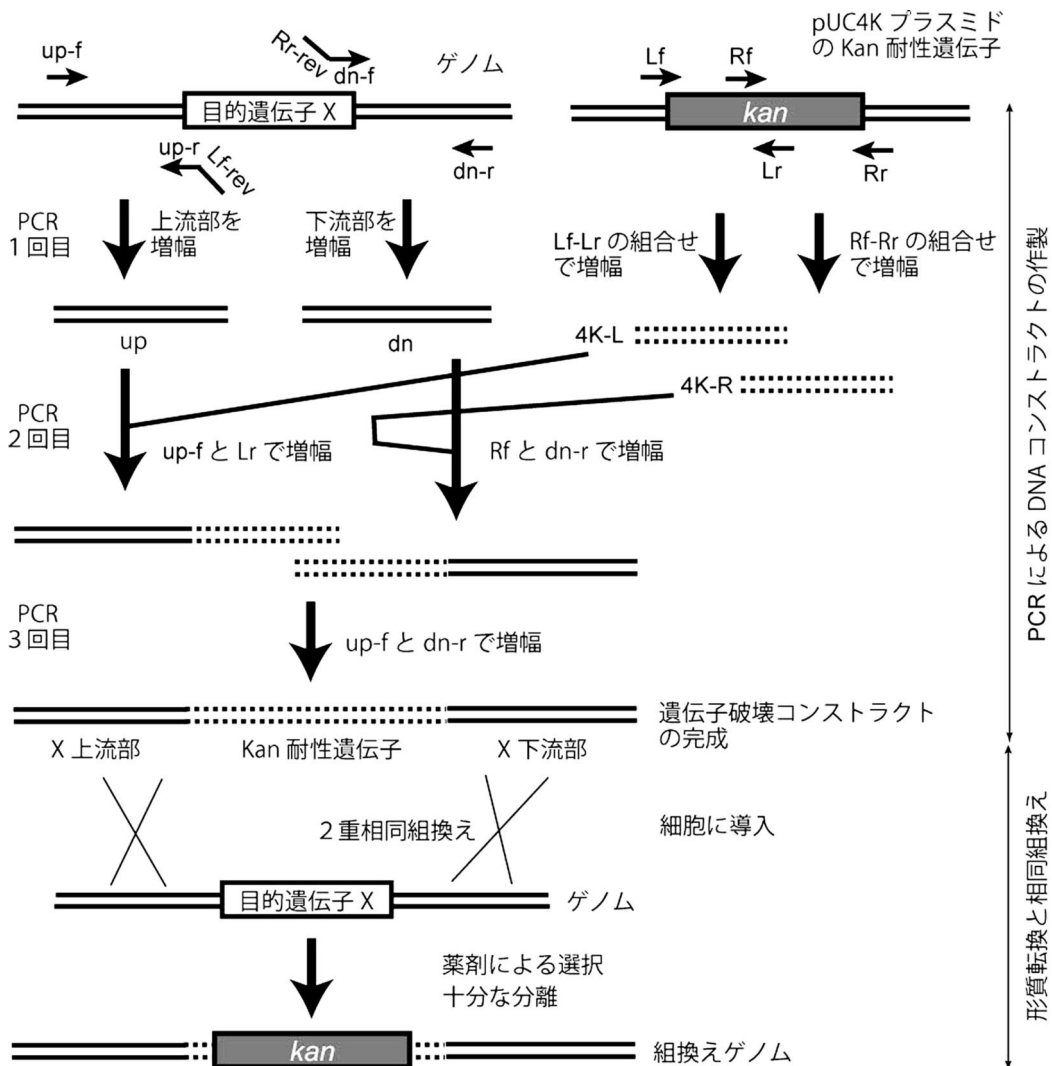


図1：PCRを用いた遺伝子破壊コンストラクトの作製

にする。ここでは、上流半分 4K-L(707 bp) と下流半分 4K-R(457 bp)としている。重なりは 50 bp となる。このカナマイシン耐性遺伝子は昔の GC テール法でクローニングされているので、上流側は G が並んでいるつなぎの部分のすぐ隣から使うことでプロモータを確保し、下流側は終始コドンの 150 塩基ほど後ろまで含むようにして

ある(表1)。他の耐性カセットを使う場合には適宜考えればよい。次に、目的遺伝子の上流約 1 kbp の領域を増やすようにプライマー up-f と up-r を設計する(図1)。up-r については、その 5' 側に、カナマイシン耐性カセットの 5' 末端を増やすプライマー Lf と相補的な配列である Lf-rev をつけた形で合成する。同様に、下流側につい

表1：本方法で用いる PCR プライマー

名称	配列 (5'-<3')
4K-Lf	AGCCACGTTGTGTCTCAAAATCTCTGATGT
4K-Lr	GAGAAATCACCATGAGTGACGACTGAATCC
4K-Rf	AAGCTTTTGCCATTCTCACCGGATTCAGTC
4K-Rr	AGAGCTTTGTTGTAGGTGGACCAGTTGGTG
Lf-rev - up-r	ACATCAGAGATTTTGAGACACAACGTGGCT - (遺伝子ごとに設計)
Rr-rev - dn-f	CACCAACTGGTCCACCTACAACAAAGCTCT - (遺伝子ごとに設計)
up-f	遺伝子ごとに設計
dn-r	遺伝子ごとに設計

表 2 : PCR 反応の組成

滅菌蒸留水	76.5 μ l
10 x PCR 緩衝液	10
2.5 mM dNTP 混合液	8
5 mM プライマー 1	2
5 mM プライマー 2	2
変性 DNA テンプレート	1
ExTaq	0.5
全量	100

ゲノム DNA やプラスミド DNA は、アルカリ変性したものを用いると増幅効率が高い。すなわち、1 μ g/ μ l 程度の DNA を 1 μ l とり、9 μ l の 2 N KOH, 2 mM EDTA を加えて、37°C で 10 分間処理した後、1 μ l の 2 N 酢酸を加えて中和する。さらに 90 μ l の滅菌蒸留水を加える。通常さらに 5 倍程度希釈して PCR に用いる。-20°C で保存する。

でも一方は複合したプライマーとしておく。通常、遺伝子を完全に欠損した変異株を作ること考えるので、コード領域はほとんど含まない形で、上流側と下流側を別々に増やしている。但し、隣の遺伝子が近接している場合には、その発現に影響しないように配慮する必要がある。また、図 1 では、遺伝子の向きは指定していない。しかし、目的遺伝子 X の下流側にも遺伝子が並んでいる場合、共転写されているかどうかはわからないにしても、極性効果により下流側の転写ができなくなるのを避けるため、カナマイシン耐性カセットの転写方向と目的遺伝子 X の転写方向をそろえておくのが無難である。

こうして 1 回目の PCR で、4 個の DNA を作る。できた DNA はミニゲル電気泳動で確認し、DNA 精製キット (GE ヘルスケア社 GFX など) により精製する。100 μ l の反応液から得られた DNA を 50 μ l の純水に溶かしておく。

次に DNA を 2 個ずつ結合する。これは、目的遺伝子の上流部と下流部を増幅する際に用いた複合プライマーに含まれるカナマイシン耐性遺伝子の末端配列を利用する。up と 4K-L, dn と 4K-R をそれぞれアニーリングして、1 回の伸長反応を行う (表 4, 5)。このときはプライマーを使わず、アニーリング効率を高めるため、高濃度

表 4 : 接続反応の組成

滅菌蒸留水	68.5 μ l
10 x PCR 緩衝液	10
2.5 mM dNTP 混合液	1
DNA 1	10
DNA 2	10
ExTaq	0.5
全量	100

なお、DNA の量は適宜変更してもよく、その場合、水の量を加減する。

表 3 : PCR 反応のプログラム

サイクル	ステップ	温度 (°C)	時間
1 (x 1)	1	96	2 分
2 (x 4)	1	95	30 秒
	2	55	1 分 30 秒
	3	72	2 分
3 (x 25)	1	95	30 秒
	2	57	1 分 30 秒
	3	72	2 分
4 (x 1)	1	72	10 分
5 (x 1)	1	10	0 (無限)

この条件はかなりゆるめの条件なので、もう少しアニーリング温度 (ステップ 2) を高くしてもよい。また、短い DNA を増やす時は、ステップ 2 と 3 の時間も短くしてよい。

の DNA を使って反応する。結合する 2 つの DNA の濃度があまり大きく異ならないように留意する。反応後、DNA の一部をとり、純水で 50-200 倍に希釈する。このとき、いくつかの希釈率を試すのがよい。濃すぎると次の PCR 産物が複数バンドになり、薄すぎると何も増えない。

この希釈液をテンプレートとして、2 回目の PCR を行う。条件は表 2, 3 の通り。プライマーはそれぞれ、up-f と Lr, および Rf と dn-r である。産物を電気泳動で確認し、DNA を精製する。

こうして得られた 2 つの DNA を上記と同様にして結合し、PCR で増幅する。この 3 回目の PCR が曲者で、多数のバンドが出ることが多い。その場合、目的のバンドをピペットで吸い出して、再度 PCR で増幅すると、1 本のバンドになることが多い。但し再び多数のバンドになることもある。この際、ゲルを切り出して GeneClean などのキットで精製するというような必要はなく、先の細い微量ピペットで 1 μ l 程度吸い出せばよい。

1.b.3 相同組換えによる遺伝子破壊株の取得

ひとたび DNA コンストラクトが完成すれば、あとは難しくない。基本的な形質転換の方法については前項 1.a を参照していただくとして、ここでは *Synechocystis* の

表 5 : 接続反応のプログラム

ステップ	温度 (°C)	時間
1	95	5 分
2	55	1 分
3	72	10 分
4	10	0 (無限)

ステップ 2 に進む段階のアニーリングを、時間をかけてゆっくりと温度を下げるようにすればもっとよいかもかもしれない。

形質転換について述べる。100 ml の三角フラスコに 25 ml 程度の BG11 培地をいれ、*Synechocystis* のシングルコロニーを植え込む。なお、私たちは 1 mM の NaHCO_3 (炭酸水素ナトリウム) を添加している。30°C で数日間、 $30 \mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$ 程度の白色蛍光灯 (15-20 W のランプを使い、20 cm 程度離す) で培養する。750 nm の吸光度 (濁度) が 0.5 程度の対数期の細胞を用いる。100 μl の培養液をマイクロチューブに取り、できあがった PCR 産物 (精製品) を 20 μl 加える。量は適宜変更してもよい。1.3% 寒天を含む新鮮な BG11 培地の上にセルロースアセテートフィルター (0.45 μm 口径のもの、アドバンテック製など、パッケージのものをそのまま使い、オートクレーブする必要はない) を滅菌したピンセットで載せ、この上に上記の細胞液をスプレッダーで広げる。軽く広げる程度で、刷り込まないこと。クリーンベンチで表面を乾かし、シャーレをテープ (パラフィルムを切って用いている) で巻いて、光を弱くして 1 日間培養を行う。なお、寒天培地の場合、BG11 培地には 0.05% $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ (チオ硫酸ナトリウム) と 1 mM NaHCO_3 を添加しておくことで、プレート効率が高まるとされている。

1 日または 2 日経って、フィルター表面がうす緑色になったら、フィルターを滅菌ピンセットではがし、30 $\mu\text{g}/\text{ml}$ のカナマイシンを含み 1.3% 寒天で固めた新鮮な BG11 培地に載せる。パラフィルムでシールし、今度は $20-30 \mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$ 程度の光を当てて培養する。特に明暗周期をつける必要はなく、多くの研究室は連続明期で培養している。数日で細胞は白くなるが、1 週間を過ぎると小さなコロニーが見えてくる。これが形質転換体である。十分にコロニーが大きくなったら、白金耳で 30 $\mu\text{g}/\text{ml}$ のカナマイシンを含み 1.3% 寒天で固めた新鮮な BG11 培地に移す。あとは、シングルコロニーを広げて植える作業を数回繰り返す。

コロニーが遺伝子破壊株であることを確認するには、コロニー PCR を行う。ただし、大腸菌のプラスミドのスクリーニングの場合とは異なり、1 回の PCR では十分

に DNA が増えないことが多い。通常、まず、up-f と dn-r で増やし、その産物の一部 (0.5 μl) を使って、2 回目の PCR を行う。その場合、up-f と Rr または Lf と dn-r の組み合わせを用いてカナマイシン耐性カセットを含む形質転換体を確認する。*Synechocystis* のゲノムはマルチコピーなので、完全に野生型コピーがなくなっていることを確認するため、目的遺伝子 X の内部配列を一方のプライマーとし、他方は up-f または dn-r を用いて PCR を行う (論文³⁾ 参照)。候補株が見つかったら、液体培養で殖やし、更に詳細な確認をする。

1.b.4 おわりに

この方法は非常に簡単で、同時に多数の遺伝子を扱うこともできる。月曜日にプライマーがあれば、PCR のやり直しを含めても、金曜日には形質転換までいくことができる。一人でも、1 週間で 8 個程度の遺伝子破壊が余裕をもってできる (選抜の段階は別)。元気のある研究者ならばその 2 倍でも可能であろう。*Synechocystis* の遺伝子は約 3,000 個なので、準備が順調にできれば、フルに働けば一人でも 1 年間で終わる計算である。筆者らは、このようにして 40 個の遺伝子破壊を行い、変異株の光合成特性などを調べた^{2,4)}。

参考文献

- 1) H. Wada, Z. Gombos, & N. Murata, *Nature* **347** (1990) p.200.
- 2) N. Sato, M. Ishikawa, M. Fujiwara, & K. Sonoike, *Genome Informatics* **16** (2005) p.56.
- 3) I. Sakurai, N. Mizusawa, H. Wada, & N. Sato, *Plant Physiol.* **145** (2007) p.1361.
- 4) M. Ishikawa, M. Fujiwara, K. Sonoike & N. Sato, *Plant Cell Physiol.* (オンライン版) doi : 10.1093/pcp/pcp027