



Title	シアノバクテリアの形質転換法
Author(s)	岩井, 雅子; 広瀬, 侑; 池内, 昌彦
Description	5章 形質転換 1. シアノバクテリア a
Relation	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
Citation	低温科学, 67, 575-582
Issue Date	2009-03-31
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/39195
Type	departmental bulletin paper
File Information	67-079.pdf



1. シアノバクテリア

a. シアノバクテリアの形質転換法

岩井 雅子¹⁾, 広瀬 侑²⁾, 池内 昌彦²⁾

シアノバクテリアは真正細菌の一種として、相同組換による遺伝子操作がよく整備されているものが多いが、重要な種でも形質転換できないものもある。代表的な形質転換のプロトコルとともに今後の展望を述べる。

Transformation of Cyanobacteria

We summarized principles and technical protocols for transformation of several representative species of cyanobacteria.

1.a.1 シアノバクテリアの形質転換の概要

1.a.1.1 多コピーゲノム

大腸菌などと異なるシアノバクテリアの大きな特徴は、細胞内に複数のゲノムコピーが存在する点であり、例えば *Synechocystis* sp. PCC 6803 では一細胞当たり約 12 コピーのゲノム DNA が存在する¹⁾。このため必須遺伝子を破壊するコンストラクトで形質転換しても、変異体は薬剤スクリーニングで容易に得られる。このとき野生型 DNA と変異体 DNA が細胞内に共存している。したがって、形質転換後にさらに 1～数ヶ月間培養を続けて、変異体 DNA が野生型から完全に分離する (segregation) を確認する必要がある。segregation の確認には感度が高い PCR 法がよく使われるが、その増幅効率は DNA の長さに逆の依存性があるので注意が必要である。一方、サザン法は DNA の長さにそれほど依存せず segregation の割合を推定することに適しているが、微量の DNA の有無を確認できるほどの感度はない。なお、segregation 途中であっても、必須遺伝子の変異体も含めて表現型が確認できることもある。

1.a.1.2 形質転換法

シアノバクテリアの形質転換法としては、自然形質転換法、エレクトロポレーション法、接合法などが一般的である。自然形質転換は、単に DNA を細胞と混合するだけで細胞内に取り込まれて、相同組換でゲノムに組み換えられる現象であり、多くのシアノバクテリアで見られる (例: *Synechocystis* sp. PCC 6803, *Thermosynechococcus*

elongatus BP-1, *Synechococcus elongatus* PCC 7942, *Synechococcus* sp. PCC 7002)。この取込には細胞表面の線毛やいくつかの遺伝子が必要である²⁾。一方、シアノバクテリアの多くは制限酵素をもっており、これが外来 DNA による形質転換を阻んでいる。接合による形質転換では、その制限酵素に対抗する DNA メチラーゼを組み込んだ大腸菌が使われている³⁾。今後は、ゲノム情報から推定した DNA メチラーゼ遺伝子を組み込むことで、これまで形質転換できなかった種の形質転換を可能にできるかもしれない。野外に生息するシアノバクテリアの多くは細胞外多糖類などを多量に分泌して細胞を保護している。このため、DNA を添加しても細胞に到達できないことも多い。細胞の生存率を保持したまま、このような細胞外物質を除去することはこれまで成功しておらず、今後の課題である。

1.a.1.3 光合成遺伝子の操作

いくつかのシアノバクテリアは炭素源として有機物を取込み、従属栄養で増殖できる。たとえば、*Synechocystis* 6803 や *Plectonema boryanum* dg5 はグルコースを利用でき、*Anabaena variabilis* ATCC 29413 はフルクトースを、*Synechococcus* 7002 はグリセロールを利用できる。このような株では、光合成の必須遺伝子のノックアウトや部位特異変異導入などができる。一方、われわれは絶対独立栄養型の *Thermosynechococcus* にグルコース輸送体の遺伝子を組み込んで、光合成の必須遺伝子の操作を目指したが、これまでのところ従属栄養増殖を実現できていない。

1) 東京理科大学応用生物学科

2) 東京大学大学院総合文化研究科広域科学専攻生命環境科学系

1.a.2 形質転換各論

1.a.2.1 *Synechocystis* sp. PCC 6803

自然形質転換の報告は古くからあり、効率が非常に高い⁴⁾。*Synechocystis* の特質はグルコース輸送体の遺伝子を持ち、グルコースを供給することで光合成の必須遺伝子を完全にノックアウトできることにある。このとき、DuPont の Williams が開発したグルコース耐性株の使用が重要である⁵⁾。グルコースは通常、培地に最終 5 mM ほど添加する。

[実験方法] 代表的な自然形質転換法

1. 形質転換用 DNA を用意。プラスミド DNA の場合、環状を切断する必要なし、特別な精製も不要。
2. OD 730=0.5–1.0 の細胞 1 mL に 1–5 μg の DNA を混合する。
3. 薬剤の入っていない BG11 プレートにニトロセルロース膜(ミリポア, 界面活性剤フリー, 孔径 0.2 μm) をのせ、細胞/DNA を塗布する。
4. 24時間、光照射 ($50 \mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$) する。
5. 薬剤入りのプレートにニトロセルロース膜を移す。
6. 1–2 週間、光照射 ($50 \mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$) する。

* 簡便法として、ニトロセルロース膜に細胞を塗布してから、DNA を 1–2 μL 滴下してもよい。この場合は、形質転換効率は低下するが、1 枚のプレートで多数の形質転換を行える。

[その他の参考事項]

- カナマイシン耐性カセット：Tn5 由来 (pRL161) や Tn903 由来 (pUC4K) などがある。いずれも readthrough 型で、挿入部位の下流の遺伝子の発現を許すので、オペロン中の遺伝子の破壊などに適している。カナマイシン濃度は 20–100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ 。
- クロラムフェニコール耐性カセット：pACYC184 由来。readthrough 型と思われるが、確かな証拠はない。クロラムフェニコールはエタノールに溶解し、最終濃度は 20 $\mu\text{g mL}^{-1}$ 。
- スペクチノマイシン耐性カセット：pRL453 由来。両側にオメガ因子のターミネータ配列がある⁶⁾。スペクチノマイシン濃度は 20 $\mu\text{g mL}^{-1}$ 。
- エリスロマイシン耐性カセット：20 mg mL^{-1} エタノール溶液を作製し、最終濃度は 20 $\mu\text{g mL}^{-1}$ 。コンストラクト作製時には大腸菌がエリスロマイシン耐性なので、100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ 以上の高い濃度で選別する必要がある。

- このほかに、アンピシリンやハイグロマイシン、ゲンタマイシンなども使用例がある。
- DCMU：光化学系 II 阻害剤。10 mM エタノール溶液を作製、最終濃度 10 μM 。
- グルコース：2 M 溶液を作製、フィルター滅菌、最終濃度 5 mM で使用する。ただし、*Synechocystis* は完全暗所ではグルコースによる従属栄養でも生育できない。1 日に 1 回、15 分程度光を照射する必要がある、light-activated heterotrophic growth という⁷⁾。
- ニトロセルロースメンブレンフィルター：ミリポア社の HATF, 孔径 0.2 μm 。Advantec 社のものも代用可。“detergent-free” の方がコロニー出現率は高い。

[実験方法] 表現型相補による新規遺伝子の同定

2 回交叉型の自然形質転換能を利用して、変異株の変異部位を容易に同定できる。変異株だけが増殖できない培養条件で、その変異株に野生株または抑圧株由来のゲノム DNA またはそのライブラリー DNA を添加すると、形質転換した細胞だけが生育できるというのがその原理である (図 1)。変異株が増殖できる場合でも、増殖速度が大きくちがってれば、表現型の相補を検出できる。このような方法で、これまでに実に多くの遺伝子が単離されている。

1. 増殖できる株からゲノム DNA を単離し、いくつかの制限酵素で消化したものでまず相補を確認する。
2. 相補できる DNA を低融点アガロース電気泳動などでサイズ分画し、相補できるサイズを求める。
3. サイズ分画した DNA を大腸菌にクローニングし、相補できるクローンを単離する。
4. 相補できる DNA インサートの両端をシーケンスし、CyanoBase をサーチして領域を決定する。
5. 相補できる DNA インサートの塩基配列に基づいて、約 1 kbp の断片に分割し、相補する領域を同定する。
6. こうして絞り込んだ相補できる領域を野生株と変異株でシーケンスし、変異部位を決定する。

[具体例]

図 1 は、メチルビオロゲン耐性株の DNA を野生株に添加して耐性を付与した結果を示す。培地は 10 μM メチルビオロゲンを含んでおり、100 $\mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ の光条件下で培養すると、発生する活性酸素によって野生株は死滅する。しかし、形質転換して耐性となった細胞だけが生育して、緑色のコロニーを形成する。この図では、大腸菌にクローニングした *EcoRI* 断片 4–6 kbp の各クロー

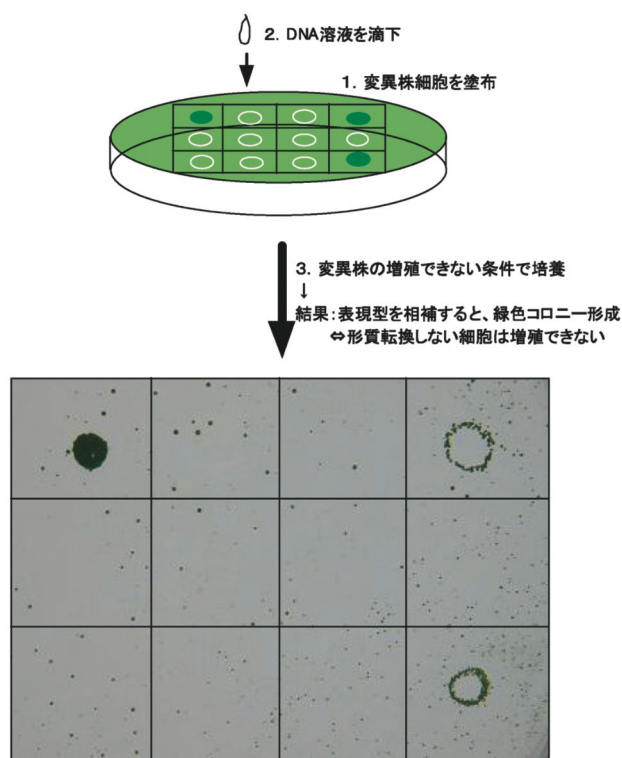


図1: *Synechocystis* 6803 の表現型相補の例。ここではメチルビオローゲンを含むプレートに野生株の細胞を塗布し、耐性株の DNA を分画したものをもスポットした。特定の画分でのみ耐性コロニーが多数出現している。

ンによる相補の結果を示している。DNA 溶液を滴下したところ以外に生じたコロニーは、本来生育できない細胞から生じた自然抑圧変異体であり、これから DNA を単離してさらに抑圧のしくみを解析することも可能である。数十個から数百個のクローンをスクリーニングすればたいい相補できる DNA を同定できる。そこで筆者らは、10 個ずつまとめた DNA を用いてスクリーニングし、相補できるものから個別クローンを同定する 2 段階のスクリーニングを行っている。また、大腸菌にクローニングできない場合、複数の制限酵素による相補できる断片のサイズを求め、CyanoBase をサーチするだけで領域を決定できることがある。なお、*Synechocystis* の形質転換は 2 回交叉型なので、プラスミドライブラリー DNA で相補してもプラスミド部分は挿入されておらず、プラスミドレスキューはできない。

[注] ゲノムライブラリーを作成するとき、制限マイナスの大腸菌を使用する。*Synechocystis* の修飾系はわかっていないが、通常の大腸菌でのクローニング効率は非常に低い。筆者らは、エレクトロポレーション用の XL1Blue MRF' (StrataGene) を使用している。なお、*Synechocystis* は、大腸菌の制限修飾系を拒否しない、

つまり表現型相補などの形質転換において、PCR 産物とプラスミド DNA で効率に大差ない。

1.a.2.2 *Thermosynechococcus elongatus* BP-1 および *T. vulcanus* RKN

好熱性シアノバクテリアはその遺伝子産物であるタンパク質の高い熱耐性と、光化学系複合体のようなタンパク質複合体の高い安定性を特徴としており、これを生かすためにはその遺伝子操作が必須である。*Thermosynechococcus elongatus* BP-1 に適用できる形質転換法には自然形質転換、エレクトロポレーション、接合法などがある。一方、*T. vulcanus* RKN では自然形質転換は確認されているが、エレクトロポレーションはこれまで成功していない。*T. vulcanus* RKN は電気パルスでの生存率が低いことがその理由かもしれない。本項では、当研究室の経験に基づいて、エレクトロポレーションと自然形質転換について述べる⁸⁾。

[実験方法]

T. elongatus BP-1 のエレクトロポレーション

1. 対数増殖期の *T. elongatus* BP-1 の細胞を用意する。定常期の細胞では効率は低い。ddH₂O で細胞を洗浄し塩を除く。このときの遠心は室温で行う。細胞密度 OD₇₃₀ = 20 になるように ddH₂O に懸濁し、40 μ L になるようにエッペンチューブに分注 (約 1×10^9 cells mL⁻¹)。
2. コンストラクト DNA (3 μ g μ L⁻¹) を 4 μ L 加えて混合し、エレクトロポレーション用セル (幅 2 mm) に移し、1 分間氷上におく。
3. 電気パルスをかける。10 kV/cm, time constant 5 m 秒, 10 μ F コンデンサー、島津エレクトロポレーション装置 GTE10 を使用。
4. すぐに BG11 培地 1 mL を加える。
5. 45°C で 24 時間, dim light (10–20 μ E $\cdot$ m⁻² $\cdot$ s⁻¹), 120 rpm で振盪する。
6. 溶解したトップアガー (0.75% バクトアガー / BG11) を 3 mL 加えて、薬剤入りのプレートにプレーティング。
7. トップアガーが固化後、インキュベータへ。培養条件: 45°C, 弱光 (約 20 μ E $\cdot$ m⁻² $\cdot$ s⁻¹)。
 - * トップアガーがある方が出現するコロニーが多いが、コロニーサイズは小さい (図 2)。
8. 約 1 週間でコロニーが出現し、2 週間で 2 枚めのプレートへ移す。移す時はコロニーを P 20 のピペットマンで吸い取り、5–10 μ L の BG11 培地で懸濁して、2 枚めのプレートにスポットして培養。

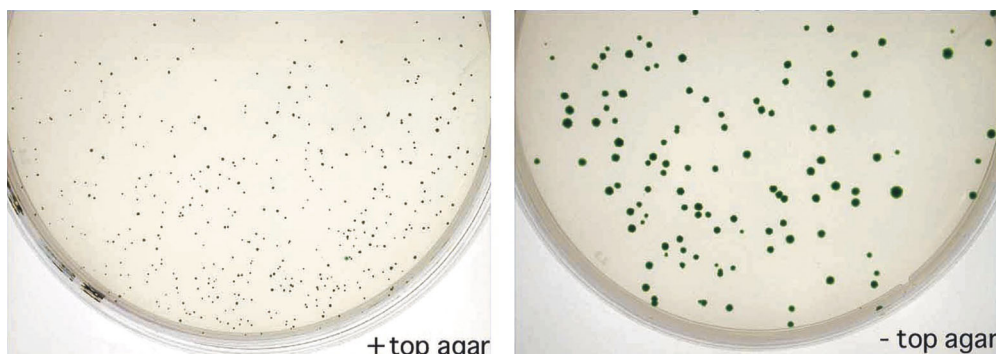


図2： *Thermosynechococcus elongatus* BP-1 のエレクトロポレーションによる形質転換の例。左のトップアガーを用いた場合は、コロニーサイズは小さいが、出現したコロニー数は非常に多い。

- * 通常、1週間で3枚めに移せ、さらに1週間で4枚めに移せる。3、4枚めのプレートで生育している細胞を白金耳でかき集め、ゲノム DNA を単離して segregation チェックを行う。多くの変異体はこの段階で segregation が完了している。
- * プラスミド DNA は ddH_2O に対して透析し、塩を除く。
- * エレクトロポレーション法は *T. vulcanus* RKN に適用できない。

[実験方法] 自然形質転換法

どちらの株にも同じように適用できる。プロトコルは、パルスをかけないことを除けば、エレクトロポレーション法に近い。

1. 対数増殖の細胞を濃縮し、 $\text{OD}_{730}=20$ で $40\ \mu\text{L}$ になるようにエッペンチューブに分注。
2. コンストラクト DNA ($\sim 3\ \mu\text{g}\ \mu\text{L}^{-1}$) を $4\ \mu\text{L}$ 加えて、室温で5-10分インキュベートする。
 - * この時間や光条件を最適化することで形質転換効率が高くなる可能性がある。
3. BG11 培地を $1\ \text{mL}$ を加える。あとはエレクトロポレーション法と同じである。
 - * 自然形質転換の効率はエレクトロポレーションよりも低く、*Synechocystis* の自然形質転換効率より非常に低いので、高い濃度のプラスミド DNA を用意する必要がある。

- * *T. vulcanus* RKN はエレクトロポレーションによる形質転換はできない。また、自然形質転換効率も低い。もし、形質転換が難しいときは、筆者らは、*T. elongatus* BP-1 と非常に近縁関係にあることを利用して、まず *T. elongatus* BP-1 にエレクトロポレーションで変異を導入する。さらに、そこから変異体ゲノム DNA を単離して、ゲノム DNA による自然形質転換によって *T. vulcanus* RKN の変異体を得ている⁹⁾。

[参考事項]

- ・制限系：これまでに *T. elongatus* BP-1 には CGCG を認識する II 型制限酵素 *SeI* の存在や、ゲノム DNA の RGATCY 配列が特異的にメチル化を受けていることなどが知られているが、これらが形質転換の障害となっているかどうかは不明である。一方、ゲノム配列から I 型制限系の遺伝子 (*tlh2228-tlh2230*) が発見された。このうちの制限系の *tlh2230* を破壊した株は有意に形質転換効率が高く、必要に応じて形質転換の親株として使用されている⁸⁾。
- ・薬剤耐性：これまで *Synechocystis* で長年使われてきたカナマイシン耐性カセット、クロラムフェニコール耐性カセット、スペクチノマイシン／ストレプトマイシン耐性カセットなどが使われてきた (表1)。注意を要するのは、培養温度が高いと抗生物質の効力の低下がみられることで、2週間以上培養したものは耐性カ

表1： *Thermosynechococcus* の選択に使用する薬剤耐性カセットと抗生物質濃度。

薬剤耐性カセット	由来	薬剤濃度 ($\mu\text{g}\ \text{mL}^{-1}$)	
		液体培地	プレート
クロラムフェニコール耐性カセット	pACYC184	Cm 5~7	Cm 3.4
Sp/Sm 耐性カセット	pRL453	Sp 5+Sm 10	Sp 5+Sm 10
カナマイシン耐性カセット	pRL161 (Tn5 由来)	Km 40~80	Km 40~80

Cm：クロラムフェニコール、Sp：スペクチノマイシン、Sm：ストレプトマイシン、Km：カナマイシン

セットを持たない細胞でも増殖できるようになるので注意が必要である。また、耐熱性生物のカナマイシン耐性遺伝子を利用したカセットも作製されている¹⁰⁾。擬陽性のコロニーがカナマイシン耐性、スペクチノマイシン/ストレプトマイシン耐性では生じるので注意が必要であるが、クロラムフェニコール耐性の擬陽性は生じたことがない。そのため、共通のプラットフォーム作製のためのカセットには前者を用い、個々の遺伝子破壊などでは後者のカセットを使用している。

- 温度：われわれは通常 45°C でスクリーニングや segregation のための培養を行っている。この温度は本来の最適増殖温度より 10°C 以上低いが、使用しているカセットが中温性生物由来であること、また上述したように抗生物質自身の安定性も考慮したためである。また、実際の形質転換効率も 45°C の方が 50°C よりも有意に高かった。
- 組換え様式：これまでに相同 2 回交叉と相同 1 回交叉が報告されているが、前者が普通である。後者は *psbTc* 付近の DNA を使用したとき非常に高かったが、ほかの部位の DNA では成功していないので、まだ適用は限定的である。
- 接合法：ブロードホストベクター RSF1010 をベースとしたシャトルベクターも開発されている¹¹⁾。
- プロモータ：われわれはこれまで多数の内在プロモータや外来プロモータを試みたが、まだ十分なコンセンサスはない。内在のプロモータはコンストラクト作製時に大腸菌で発現するものとししないものがある。*T. elongatus* BP-1 の *psbAI* プロモータは大腸菌で強く発現し、毒性のある遺伝子の多コピーベクターへのクローニングができなかったことがある。
- コンストラクト設計：組換え効率は *Synechocystis* よりもかなり低いので、カセットの両側の相同領域は上流、下流とも各 1 kbp 以上必要である。われわれは約 1.5 kbp くらい用意している。

1.a.2.3 *Nostoc punctiforme* ATCC 29133

Nostoc punctiforme ATCC 29133 (以後 *Nostoc* 29133 と略) は、ホルモゴニア (連鎖体) を形成して滑走運動する、緑/赤色光に応答して光合成の集光装置の合成を調節する (補色適応) など、興味深い現象を示す。これまで窒素固定遺伝子やヘテロシスト形成の研究には、*Anabaena* 7120 がおもに使われてきたが、*Anabaena* 7120 には窒素固定以外の現象がほとんど見られない (*Nostoc* 29133 で同定される遺伝子の多くは *Anabaena* 7120 にも存在するので、一種の変異体かもしれない)。そのため、*Nostoc* 29133 のゲノム決定後は注目を浴びて

いるが、日本ではまだ研究者が少ない。筆者らは、Jack Meeks 教授 (米・カリフォルニア大学) の指導を受けて *Nostoc* 29133 の形質転換に成功した。この方法は煩雑であるが、*Nostoc* 29133 はこれから注目される生物なので、ここで詳しく紹介する。*Nostoc* 29133 の形質転換法は Jack Meeks 教授のホームページ¹²⁾ にも記載されているが、筆者らは一部を改変している。全般的には大腸菌の接合を用いた *Anabaena* 属の形質転換法に準じている¹³⁾。*Nostoc* 29133 の形質転換は、①接合に用いる大腸菌体量が少ない、②擬陽性コロニーの数が多い、③適切な薬剤カセットの使用が必要、という点において、*Anabaena* 7120 の形質転換と異なっている。

[実験方法]

1. 使用菌株とプラスミドの準備

①モビライゼープラスミド (pRK2013: クロラムフェニコール耐性) とヘルパープラスミド (pRL528: カナマイシン耐性) を形質転換した大腸菌 HB101. Jack Meeks 教授より取り寄せが可能。

②カーゴプラスミド (pRL271: クロラムフェニコールおよびエリスロマイシン耐性) のマルチクローニングサイトにコンストラクトをクローニングし、大腸菌 HB101 へ形質転換。相同組み換えには薬剤カセットの上流・下流には 1 kbp 以上の配列が必要。

③ *Nostoc* 29133 細胞

AA 培地 (1 章 2 参照) に 5 mM MOPS, 2.5 mM NH_4Cl , pH=7.8 (最終) を加え、 ddH_2O を加えて 4 倍に希釈する (以下、AA/4+N 培地という)。約 100 mL の AA/4 培地で *Nostoc* 29133 を $\text{OD}_{730}=1-2$ 程度まで液体培養する (BG11 でも代用できるかもしれない)。

2. *Nostoc* 29133 細胞の準備

①約 100 mL の AA/4+N 液体培地で育てた *Nostoc* 29133 を、フィラメントあたり 4-6 個の細胞になるように超音波処理し、その後、数時間回復培養させる。

②クロロフィル *a* 濃度を測定する。細胞を遠心して沈殿させ、上清を除き、メタノールを加えてボルテックスする。その後、遠心した上清を波長 665 nm の吸光度 (A_{665}) で測定する。クロロフィル *a* 濃度は次の式を用いて算出する。

$$\text{クロロフィル } a \text{ 濃度 } (\mu\text{g mL}^{-1}) = 12.7 \times A_{665} \quad (\text{式 } 1)$$

③大腸菌の回収を行なう直前に、*Nostoc* 29133 の細胞を室温で遠心する。クロロフィル濃度 75-100 μg

mL^{-1} (約 $0.75-1.0 \times 10^8 \text{ cells mL}^{-1}$) になるように AA/4+N 培地を加え、細胞培養液とする。

3. 大腸菌の準備

- ①大腸菌 HB101 (pRL271) と HB101 (pRK2013, pRL528) をそれぞれ 100 mL の抗生物質入りの LB で培養し、 OD_{600} = 約 0.6 まで培養する。培養液を混合し、計 200 mL とする。
- ②室温で遠心して細胞を回収し、抗生物質を含まない LB 培地を加えて懸濁し、再び室温で遠心(細胞の洗浄)。
- ③同じ作業をもう一度繰り返す。ペレットの状態で長時間放置しないこと。10 mL の抗生物質を含まない LB 培地に懸濁し、大腸菌混合液とする。

4. 接合

- ①AA+N+LB 培地のプレート (5 mM MOPS, pH = 7.8, 2.5 mM NH_4Cl , 0.5% LB, 1% バクトアガー) を 10 枚作製し、ニトロセルロースメンブレンフィルター (HATF, 孔径 $0.45 \mu\text{m}$, Millipore) を密着させる。
- ②エッペンチューブに 0.5 mL の大腸菌混合液と 0.5 mL の *Nostoc* 培養液を加えて混合し、室温で 30 秒間遠心する、上清 600-700 μL を捨て、ペレットを穏やかに懸濁する。そして、懸濁液全量をできるだけ均一にフィルターに塗り広げる。細胞数が多い部分は抗生物質が効かないので注意。
- ③プレートをパラフィルムで封し、1% CO_2 , 弱光 ($2-3 \text{ W m}^{-2}$) の元で一晩培養。
- ④フィルターを LB を除いた AA+N 培地のプレートに移し、弱光で 2 日間培養。
- ⑤通常光 ($4-6 \text{ W m}^{-2}$) へプレートを移し、2 日間培養。
- ⑥フィルターを適切な抗生物質入りのプレートに移し、通常光で 2 週間程度培養するとコロニーが出現する。コロニーの出る個数はプレート間でのばらつきが大きい。以後、全ての培養は通常光のもとで行なう。

5. *sacB* による選別

- ①1×1 cm で区画わけをした抗生物質入りの AA プレートを用意する。
- ②出現したコロニーを 1 つずつ滅菌した爪楊枝でつつき、それぞれを区画に植えついでいく。破壊する遺伝子にもよるが、8-9 割以上のコロニーは植えついで後に死んでしまうので、なるべく多くのコロニーを拾うこと。
- ③通常光の下で 1 週間程度培養すると、薬剤耐性をもつコロニーが現れてくる。このコロニーを別のプ

レートに塗り広げて培養を続ける。

- ④育ったコロニーをエッペンチューブにかきとり、300 μL の AA/4+N 培地を加えて懸濁する。そして、穏やかに超音波処理する。
 - ⑤5% のショ糖および抗生物質を加えた AA プレートに細胞を撒き、通常光の下で 1 週間程度培養するとコロニーが現れる。筆者の経験では、ショ糖選択における擬陽性はかなり少ない。
- ### 6. 薬剤耐性カセットの挿入の確認
- ①5% のショ糖および抗生物質を加えた AA プレートで生育してきたコロニーを、別の抗生物質のみを加えた AA プレートに塗り広げて培養する。
 - ②育ってきた細胞の少量をかきとり、エッペンチューブに入れる。200 μL の TE pH 8.0 と 1% (v/v) Triton X-100 を加え、よくピペッティングする。少量の寒天は混入しても問題ない。
 - ③95°C, 3.5 min 処理する。溶液が濁る。
 - ④200 μL のクロロホルムを加え、ボルテックスをし、5 分間遠心する。その後水層を回収する。
 - ⑤上記の操作をもう一度繰り返す。
 - ⑥得られた水層を DNA の鋳型として PCR を行い、ゲノム上の DNA が完全に薬剤カセットと置き換わったことを確認する。もし置き換わっていなければ、ショ糖選択を行なう前の細胞を何回か植え継ぎ、置き換わるのを待つ。

注意事項

- * 大腸菌は 4°C で保存しておくのと徐々に死滅するので、 -80°C のフリーズストックを作製しておく。
- * *sacB* の遺伝子は変異が入りやすいので、形質転換前に pRL271 を持った大腸菌をショ糖入り LB プレートに塗り広げ、コロニーが現れないことを確認すること。
- * *Anabaena* 7120 よりも大腸菌の量が少ない。
- * *sacB*; レバンスクラゼ遺伝子。異常な糖転移産物を蓄積させて致死させる条件致死遺伝子。
- * 1 回目の組換 (integration) によって Cm (Em+Nm) 耐性のコロニーが生じる。この組換えは挿入カセットのどちらか片側の相同領域で起こる。こうして、プラスミド全体がゲノムに組み込まれる。一方、2 回目の組換 (resolution) が挿入カセットの反対側で起こると、*sacB* を含むプラスミドのベクター部分が脱落し、5% ショ糖に耐性のコロニーを生じる。また、このとき 1 回目に組換えた側で再び組換えが起こると、挿入されたプラスミド全体が脱落しショ糖耐性は回復するが、挿入カセットのネオマイシン耐性も失う。この原

理は, *Anabaena* の形質転換でも同じである。

- *大腸菌の pRL271 のコンストラクトが完成後, 大腸菌をショ糖プレートに塗り広げ, コロニーが出ないことを確認すること。
- **Nostoc* 29133 の形質転換に使用する抗生物質の濃度 Neomycin 25 $\mu\text{g mL}^{-1}$, Ampicillin 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$, Erythromycin 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$, Chloramphenicol 60 $\mu\text{g mL}^{-1}$, Streptomycin 1 $\mu\text{g mL}^{-1}$. なお, Kanamycin には本来耐性なので使用できない。
- **Nostoc* 29133 はカナマイシン耐性を持つため, スクリーニングにはネオマイシンを用いる必要がある。また, *Anabaena* 7120 でよく使われるストレプトマイシン/スペクチノマイシン耐性の Ω カセットは, 十分な耐性を付与しないので, *Amaranthus hybridus* の *psbA* プロモーターとネオマイシンホストランスフェラーゼ (*npt*) を融合させたカセットが開発されている (プラスミド pSCR9)¹⁴⁾。

1.a.2.4 その他のシアノバクテリアの形質転換

- *Synechocystis* 6803 と並んで, 古典的な自然形質転換法が確立されている株は *Synechococcus elongatus* PCC 7942 と *Synechococcus* sp. PCC 7002 である。前者は絶対独立栄養だが, 形質転換能が非常に高い。後者はグリセロールを炭素源として従属栄養増殖ができるので, 光合成関連の遺伝子をノックアウトが可能。
- アオコを形成する単細胞性の *Microcystis aeruginosa* PCC 7806 は自然形質転換による遺伝子破壊の報告がある¹⁵⁾。しかし, *Synechocystis* 6803 と比べるとかなり効率は低い。
- 乾燥耐性でもっとも有名でよく研究されている *Nostoc commune* は形質転換の報告はない。しかし, 単細胞性で乾燥耐性が非常に強い *Chroococcidiopsis thermalis* PCC 7203 はエレクトロポレーションと接合によって形質転換できる¹⁶⁾。
- *Plectonema boryanum* IAM-M101 strain dg は糸状性で窒素固定するとともに完全暗所でグルコースで生育する。この株ではエレクトロポレーションによる形質転換が報告されており, プラスミドレスキューも可能である¹⁷⁾。
- 商業的に重要な種であるいわゆるスピルリナ (*Arthrospira* sp. PCC 9438) の形質転換法は非常に複雑な手法で報告されている。具体的には, トランスポゾン, トランスポザーゼをリポソームに組み込んでエレクトロポレーションによって細胞内へ導入している¹⁸⁾。*Arthrospira* は 6 種もしくはそれ以上の制限酵素を持っており, 大腸菌などで増幅したプラスミド DNA を供与体として使用するのは現実的に難しい。
- 海洋性 *Synechococcus* の場合, 接合によってブロードホストベクターと自殺ベクターを導入することによって目的の遺伝子の破壊に成功した例もある¹⁹⁾。この手法は, WH 8102 株, WH 8103 株, WH 7803 株で適応できるという。
- 最後に, 原始的な *Gloeobacter violaceus*, クロロフィル *d* をもつ *Acaryochloris marina*, 海洋性窒素固定型 *Cyanothece*, 海洋性で主要な生態的地位を占める *Prochlorococcus marinus* など, 形質転換は成功していない。DNA の取込や制限系など問題点が洗い出されてきており, ゲノム情報を利用して, 今後は新しい展開が期待できるだろう。

参考文献

- 1) J. Labarre, F. Chauvat, & P. Thuriaux, J. Bacteriol. **171** (1989) P.3449.
- 2) S. Yoshihara, X. Geng, S. Okamoto, K. Yura, T. Murata, M. Go, M. Ohmori, & M. Ikeuchi, Plant Cell Physiol. **42** (2001) P.63.
- 3) J. Elhai, A. Vepritskiy, A. M. Muro-Pastor, E. Flores, & C. P. Wolk, J. Bacteriol. **179** (1997) P.1998.
- 4) G. Grigorieva, & S. Shestakov, FEMS Microbiol. Lett. **13** (1982) P.367.
- 5) J. G. K. Williams, Methods Enzymol. **167** (1988) P.766.
- 6) P. Prentki, & H. M. Krisch, Gene **29** (1984) P.303.
- 7) S. L. Anderson, & L. McIntosh, J. Bacteriol. **173** (1991) P.2761.
- 8) M. Iwai, H. Katoh, M. Katayama, & M. Ikeuchi, Plant Cell Physiol. **45** (2004) P.171.
- 9) 早乙女敏行, 修士論文 (2005)。
- 10) K. Onai, M. Morishita, T. Kaneko, S. Tabata, & M. Ishiura, Mol. Genet. Genomics **271** (2004) P.50.
- 11) U. Muhlenhoff, & F. Chauvat, Mol. Gen. Genet. **252** (1996) P.93.
- 12) <http://microbiology.ucdavis.edu/meeks/>
- 13) 得平茂樹, 佐藤直樹, 「窒素固定能をもつ *Anabaena* 属ラン藻の遺伝子操作」, 化学と生物 **39** (2001), P.121.
- 14) M. F. Cohen, & J. C. Meeks, Mol. Plant Microbe Interact. **10** (1997) P.280.
- 15) E. Dittmann, B. A. Neilan, M. Erhard, H. von Dohren, & T. Borner, Mol. Microbiol. **26** (1997) P.779.
- 16) D. Billi, E. I. Friedmann, R. F. Helm, & M. Potts, J. Bacteriol. **183** (2001) P.2298.
- 17) Y. Fujita, H. Takagi, & T. Hase, Plant Cell Physiol. **37** (1996) P.313.
- 18) Y. Kawata, S. Yano, H. Kojima, & M. Toyomizu, Mar. Biotechnol. **6** (2004) P.355.

-
- 19) B. Brahamsha, Appl. Environ. Microbiol. **62** (1996) P. 1747.