



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	光合成細菌Rhodobacter capsulatusにおける大量発現系と形質転換
Author(s)	藤田, 祐一; 野亦, 次郎
Description	5章 形質転換 8
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, 649-653
Issue Date	2009-03-31
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/39206
Type	departmental bulletin paper
File Information	67-090.pdf



8. 光合成細菌 *Rhodobacter capsulatus* における大量発現系と形質転換

藤田 祐一¹⁾, 野亦 次郎²⁾

光合成細菌 *Rhodobacter capsulatus* は、遺伝子操作系が確立されており、さまざまなタンパク質の大量発現系として有望な系である。本節では、*R. capsulatus* の発現ベクター系と形質転換系、特定の遺伝子破壊株の単離方法について紹介する。

Transformation system of photosynthetic bacteria

Yuichi Fujita, Jiro Nomata

The purple nonsulfur bacterium *Rhodobacter capsulatus* provides a promising system for overexpression of various proteins as an alternative system of *E. coli*. Here we describe transformation system of *R. capsulatus* including overexpression vectors and targeted interposon mutagenesis.

8.1 光合成細菌 *Rhodobacter capsulatus* における大量発現系と形質転換

光合成細菌は、酸素を発生しない光合成を行う一群の光合成生物である¹⁾。紅色非硫黄細菌 *Rhodobacter capsulatus* は、好気的環境では呼吸により、嫌気的環境では光合成により生育するなど、おかれた環境により多様な生育モードを採って生育できる多彩な能力を備えた光合成細菌である²⁾。このため、1970年代から遺伝学的手法が開発され、光合成、呼吸、窒素固定、水素生成など多様な生物現象の生化学的、分子生物学的研究に用いられてきた。興味深いことに、光合成に関連した一群の遺伝子(集光性バクテリオクロロフィル結合タンパク質や反応中心タンパク質、バクテリオクロロフィルの生合成系、カロテノイドの生合成など光合成に関わる一揃いの酵素の遺伝子)がクロモゾーム上の46 kbという限られた領域に密集し複数のオペロンを形成している。この光合成

遺伝子クラスターは、外界の酸素条件や光条件などにより精緻に制御されている³⁾。特に、バクテリオクロロフィル生合成系遺伝子 *bch* 群の同定は、その後の植物のクロロフィル生合成系の解明への道しるべとなった⁴⁾。筆者らは、バクテリオクロロフィル生合成系のプロトクロロフィリド還元酵素の生化学的解析のために、*R. capsulatus* を用いたタンパク質の大量発現系を確立してきた^{5,6)}。*R. capsulatus* は、培養が容易であり、世代時間も比較的短く、高い細胞濃度まで培養できることから、光合成関連タンパク質のみならず膜タンパク質を含むさまざまなタンパク質の大量発現系として有望な系である⁷⁾。本節では、*R. capsulatus* の発現ベクター系と形質転換系、特定の遺伝子破壊株の単離方法について紹介する。

表1: *R. capsulatus* で用いられる抗生物質とその濃度

抗生物質	ストック溶液	使用濃度(μg/ml)	備考
カナマイシン	10 mg/ml _{water}	10.0	
スペクチノマイシン	10 mg/ml _{water}	10.0	
ゲンタマイシン	20 mg/ml _{water}	0.5	
ストレプトマイシン	50 mg/ml _{water}	0.5	
リファンピシン	50 mg/ml _{DMSO}	100	SB1003 由来の株は Rif ^r で、接合の際に含まれる <i>E. coli</i> の生育を阻害し、形質転換体の単離を容易にしている。

1) 名古屋大学大学院生命農学研究科；さががけ・JST

2) 名古屋大学大学院生命農学研究科；日本学術振興会特別研究員

8.2 *R. capsulatus* における大量発現ベクター

R. capsulatus でのタンパク質大量発現のためのベクターとして、筆者らが構築し活用している pJN3 と pJNY を図 1 に示す。これらのベクターは、多様な原核生物において複製維持が可能な広宿主域ベクター pBBR1-MCS2⁸⁾ から構築した。タンパク質の大量発現系では、どのようなプロモータを利用して目的タンパク質の発現を誘導するかが重要である。pJN3 と pJNY では *puc* プロモータを利用している。*puc* プロモータは、光合成遺伝子クラスターにおいて集光性バクテリオクロロフィル結合タンパク質をコードする *pucAB* の発現を制御しており、嫌気条件に応答して強く転写が誘導される⁹⁾。さらに、目的タンパク質をより簡便、迅速に精製するために、N末端にアフィニティタグが付加されるような塩基配列が開始コドンの直後に挿入されている。pJN3 では His タグ (6 xHN タグ) が、pJNY では Strep タグが N 末端に付加されるように設計されている。クロニング部位は、pJN3 では *Kpn*I, pJNY では *Bam*HI-*Kpn*I である。薬剤耐性マーカーとして元のベクターが有していたカナマイシン耐性に加えて、新たにスペクチノマイシン耐性遺伝子を付加している。

8.3 *R. capsulatus* における形質転換系

R. capsulatus の形質転換 (構築した発現ベクターの

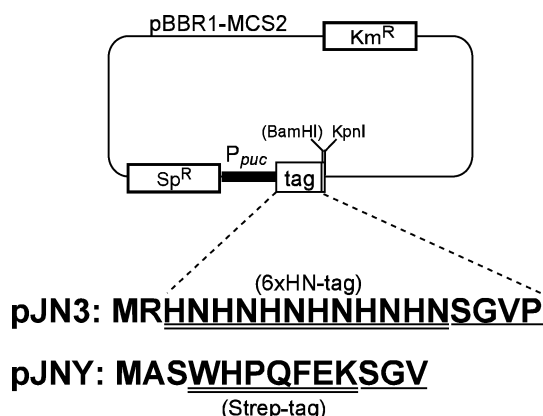


図 1: *R. capsulatus* 発現用プラスミド pJN3 と pJNY 広宿主域ベクターとして開発された pBBR1-MCS2 のマルチクロニング部位に、スペクチノマイシン耐性カートリッジ、*puc* プロモータ、開始コドンに続くアフィニティタグをコードする配列を挿入して構築した。pJN3 では *Kpn*I をクロニング部位、アフィニティタグとして His タグ (HN タグ) が、pJNY では *Bam*HI と *Kpn*I をクロニング部位、アフィニティタグとして Strep タグが付加される。

R. capsulatus への導入)は、*E. coli* との接合を利用する。*R. capsulatus* に導入したいプラスミドを有するドナー *E. coli* と接合を誘発するヘルパー *E. coli* および、プラスミドを導入したいレシピエント *R. capsulatus* という 3 者で行うことから triparental mating とよばれる方法である¹⁰⁾。ドナー *E. coli* は、JM105 などプラスミド構築に使う *E. coli* であり、ヘルパー *E. coli* はヘルパープラスミド pDPT51 をもつ XL1-Blue, DH5, C600 などが使われる。また、最終的な発現宿主となるレシピエント *R. capsulatus* は、*puc* プロモータが野生株よりもより強く誘導される DB176 を使うが、当然、野生株やさまざまな変異株でも利用できる。

8.3.1 使用する菌株

1. 遺伝子破壊用プラスミドを持つ *E. coli* JM105 など
2. ヘルパー *E. coli* XL1-Blue/pDPT51, DH5/pDPT51 など
3. レシピエント *R. capsulatus* DB176 など
4. GTA 大量生産株 *R. capsulatus* R121 など (後述; 8.4 参照)

8.3.2 *R. capsulatus* 培養用培地と溶液

RCV 培地 (1 l)

10% リンゴ酸 (DL-malic acid)	40 ml
10% (NH ₄) ₂ SO ₄	10 ml
0.64 M KPO ₄ ^{‡1}	15 ml
150 μg/ml D-ビオチン	0.1 ml
Super Salts solution ^{‡2}	50 ml

PY 培地 (1 l)

Peptone	3.0 g
---------	-------

^{‡1} 0.64 M KPO₄ (500 ml)

KH ₂ PO ₄	20 g
K ₂ HPO ₄	30 g

^{‡2} Super Salts solution (500 ml)

1% EDTA	20 ml
20% MgSO ₄ ·7 H ₂ O	10 ml
7.5% CaCl ₂ ·2 H ₂ O	10 ml
0.5% FeSO ₄	24 ml
1 g/l thiamine-HCl	1 ml
Trace Elements***	10 ml

*** Trace Elements (200 ml)

Na ₂ EDTA	2.5 g
MnCl ₂ ·4 H ₂ O	0.2 g
H ₃ BO ₃	0.1 g
Na ₂ MoO ₄ ·2 H ₂ O	0.1 g
ZnCl ₂	0.05 g
NiCl ₂ ·6 H ₂ O	0.05 g
CoCl ₂ ·6 H ₂ O	0.02 g
CuCl ₂ ·2 H ₂ O	0.01 g
Na ₂ SeO ₃	0.005 g
NaVO ₃ ·nH ₂ O (meta)	0.005 g

Yeast extract 3.0 g

各培地ともに、寒天培地には agar 1.5%, 重層用のソフト寒天には 0.8% になるように BactoAgar (Difco) を添加してオートクレーブする。

1 x GTA パッファー

10 mM Tris-HCl; pH 7.8

1 mM MgCl₂

1 mM CaCl₂

1 mM NaCl

500 µg/ml BSA

8.3.3 器具装置

小型冷却遠心機

インキュベータ (*R. capsulatus* 用 34°C, *E. coli* 用 37°C)
GasPak (*R. capsulatus* の光合成条件での培養用; BBL

GasPak 100 anaerobic systems, Becton Dickinson and Company, Sparks, MD; 嫌気性細菌培養用の専用容器)

8.3.4 実験操作

まず、ドナー *E. coli*, ヘルパー *E. coli* および、レシピエント *R. capsulatus* (PY 培地) を一晩培養する。翌朝、ドナー、ヘルパー両 *E. coli* の各培養液 500 µl を SOC 液体培地 5 ml (抗生物質を加えないこと) に植え継ぎ、培養する。*R. capsulatus* の培養はそのまま継続する。2 時間後、ドナー、ヘルパー、レシピエントの三者を各 2 ml ずつボルトトップフィルター (0.22 µm, cellulose acetate membrane, CORNING など) 上に吸引する (アスピレータ使用)。1 分間吸引した後に滅菌したメスを用いてフィルターメンブレンを切り取り、菌体に乗った面が上になるように PY 寒天培地 (抗生物質を含まない) に乗せ、暗所で 34°C にて保温する。5 時間後、菌体に乗ったフィルターメンブレンをプレートから剥がし、50-ml 滅菌遠沈管 (CORNING など) に移す。遠沈管に PY 液体培地を 2 ml 入れ、ふたを閉めてよくボルテックスしフィルターメンブレン上の菌体を培地に再懸濁する。その後、フィルターメンブレンを取り除き、懸濁液の入った遠沈管に PY ソフト寒天 (リファンピシン 0.5 mg/ml, カナマイシン 5 µg/ml, スペクチノマイシン 10 µg/ml を含む) を 4 ml 加え、素早く PY 寒天培地 (抗生物質は必要に応じて含む) に移し、前後左右に傾けて均一になるように広げる。固まりやすいので素早く行う。重層したソフト寒天が固化したら、暗所 34°C にて保温する。通常 3 日後ソフト寒天中に 5000 個以上のコロニーが生じるが、その中には目的とする形質転換体の他にドナーとして用いた *E. coli* のコロニーも混ざっている。そこで、次は *R. capsulatus* のコロニーのみを選別し、単離を

行う。実体顕微鏡下で見ると、ソフト寒天中では *E. coli* のコロニーが球状であるのに対し、*R. capsulatus* のコロニーは輪郭がはっきりとしたラグビーボールのような形なので容易に区別できる。後者のようなコロニーを、爪楊枝を用いてピックアップし、PY 寒天培地上でシングルのコロニーを形成、単離する。

8.4 *R. capsulatus* における特定遺伝子破壊

R. capsulatus における特定の遺伝子の破壊についても、前述した接合によって遺伝子破壊用のプラスミドによる形質転換でも原理的には可能である。しかし、遺伝子導入効率が低い場合必ずしもうまくいかない場合がある。そこで、*R. capsulatus* では、GTA というファージ様粒子を利用した遺伝子破壊法が用いられる。GTA (Gene Transfer Agent; GTA) とは、*R. capsulatus* に特有のファージ様粒子のことである¹¹⁾。GTA は、リファンピシン耐性をもつ株の培養液 (0.45 µm フィルター濾液) からリファンピシン感受性株を耐性化する因子として発見された¹²⁾。GTA は、ファージ様粒子で、ドナーとなる細胞のゲノム DNA からランダムに 4.5 kb 断片を切出しビリオン粒子に取り込んで細胞外に出て、レシピエントとなる細胞に付着してビリオン内の DNA を注入する¹³⁾。GTA は、ファージではなくレシピエント細胞を溶菌するような作用は示さないが、DNA 注入の結果、レシピエント細胞のゲノムとの間で相同組換えが誘発される。ドナー細胞におけるランダムな DNA 断片の切り出しとパッケージングは、ゲノムと同様にプラスミドに対しても行われることから、特定の遺伝子を薬剤耐性遺伝子によって破壊した変異株を単離するための高効率な遺伝子導入法として GTA が広く活用されている¹⁴⁾。野生株は GTA を少量しか生産しないため、GTA の解析のために GTA を大量に生産する特別な変異株 Y262 が単離された¹⁵⁾。その後、この株を遺伝子操作に利用しやすくするため、GTA 大量生産能に加えてカロテノイド生合成系の変異 *crtG121* をもつ株 R121 (カロテノイド生合成系遺伝子 *crtG* の変異のため緑色のコロニーを形成する) やリファンピシン耐性の CB1127 などが単離され、活用されている。

8.4.1 破壊用プラスミドによるヘルパー *E. coli* の形質転換

ヘルパー *E. coli* (XL1-Blue/pDPT51 または DH5/pDPT51 など) を遺伝子破壊用プラスミド (ターゲットの遺伝子を薬剤耐性カートリッジで分断したプラスミ

ド)により形質転換する。この形質転換は、塩化カルシウム法などの定法でも上述の接合による方法でも可能である(図2 A および A')。ヘルパー-*E. coli*の保持するヘルパープラスミド pDPT51 は、トリメトプリム耐性をもつので、培養の際には50 µg/mlのトリメトプリム(ストック溶液10 mg/mlはDMSOに溶かす)を添加しておく。*R. capsulatus*の遺伝子破壊でよく用いられる薬剤耐性は、カナマイシン耐性、スペクチノマイシン耐性、ゲンタマイシン耐性などがある(表1)。ここでは、ゲンタマイシン耐性カートリッジを利用する場合を紹介する。

8.4.2 *R121*株へのプラスミド導入

R. capsulatus R121をRCV培地にて光条件下34°Cでほぼ1日培養する。破壊用プラスミドをもつヘルパー-*E. coli*を終夜培養(LB培地50 µg/mlトリメトプリムおよび10 µg/mlゲンタマイシン含有)する。ヘルパー-*E. coli*を集菌し、同体積のRCV培地で洗浄し、再度同体積のRCV培地に懸濁する。RCV寒天培地(抗生物質は含まない)にR121の懸濁液を200 µlずつ何カ所かに分けてスポットする。それらのスポット上にさらにヘルパー-*E. coli*の懸濁液200 µlをスポットする。クリーンベンチなどでしばらくシャーレのふたを開けてスポットを乾燥させた後、暗所34°Cにて5時間インキュベートする。この間に、R121とヘルパー-*E. coli*との間で接合が起こり、ヘルパー-*E. coli*の保持する遺伝子破壊用プラスミドがR121細胞へと移動する(図2 B)。次に、ゲンタマイシン5 µg/mlを含むソフト寒天(0.8%)RCV培地4 mlを重ね層する。光合成条件(明所嫌気条件)にて3日程度培養する。R121特有の緑色のゲンタマイシン耐性コロニーが多数出現する。これが遺伝子破壊用プラスミドをもつR121(図2 C)であり、この株からGTAを調製する。

8.4.3 *R121*からGTA調製

ゲンタマイシン耐性R121をRCV培地で一旦生育させて、1/20容の割合でPY培地に植菌し、光条件にて34°Cで培養する。細胞の増殖が静止期に達したところで(植菌後1日~2日)、2 mlの培養液を0.45 µmフィルター(Sterile Ascodisc 0.45 µm; Gelman Scienceなど)でろ過し、濾液を回収する(図2 D)。この濾液にGTAが大量に含まれている。濾液の1/9容の10 xGTAバッファーを添加し、数時間以内に使用する場合は水上で保存、また長期保存する場合はこのまま-80°Cで凍結する。

8.4.4 GTAによる形質転換

レシピエントとなる*R. capsulatus*をPY培地で培養する。この培養液4 mlを遠心により集菌し、細胞ペレットを同体積の1 xGTAバッファーに懸濁する。このレシ

ピエント細胞の懸濁液100 µlと上記のGTA濾液100 µlおよび400 µlの1 xGTAバッファーを混合(GTAはガラス表面に吸着しやすいので、ガラス容器は使わずにプラスチック製の容器を用いる。)し、35°Cで1時間静置する(図2 E)。この混合液を2.5 mlのソフト寒天(0.8%)PY培地と混ぜて、PY寒天培地上に重層し、34°Cで4時間培養する。その後、形質転換体を選抜するためにゲンタマイシン(6.7 µg/ml)を含むソフト寒天PY培地を重ね層(寒天培地全体に希釈されると0.5 µg/ml程度になる)し、34°Cで培養する。この間に、GTAから導入されたゲンタマイシン耐性遺伝子をもつDNA断片がレシピエント細胞に導入され、ゲノム上のターゲット遺伝子の野生株コピーと相対的組み換えを起こし、破壊遺伝子コピーと入れ替わる(図2 F)。3から4日後、生じてきたゲンタマイシン耐性のコロニーが目的とする遺伝子

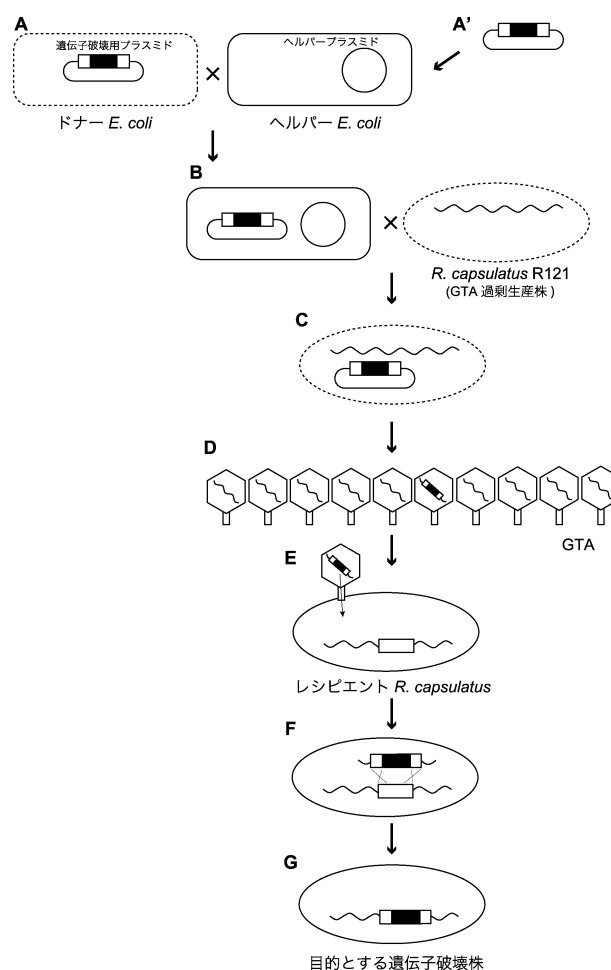


図2: *R. capsulatus*におけるGTAを用いた特定遺伝子破壊株の単離
破壊しようとするターゲット遺伝子を白いボックス、遺伝子破壊用の薬剤耐性カートリッジを黒いボックスで示した。*E. coli*は角の丸い四角形で、*R. capsulatus*は楕円形で表した。(詳細は本文参照)

破壊株と考えられる (図 2 G) ので, コロニーPCR などにより遺伝子破壊を確認する。

参考文献

- 1) M. T. Madigan, & D. O. Jung, The purple Photosynthetic Bacteria, eds. C. N. Hunter, F. Daldal, M. C. Thurnanuer & J. T. Beatty, Dordrecht, Springer Science + Bussiness Media B. V., 2009, p.1.
- 2) J. F. Imhoff, Anoxygenic Photosynthetic Bacteria, eds. R. E. Blankenship, M. T. Madigan & C. E. Bauer, Dordrecht, Kluwer, 1995, p.1.
- 3) S. Elsen, L. R. Swem, D. L. Swem, & C. E. Bauer, Microbiol. Mol. Biol. Rev. **68** (2004) P.263.
- 4) D. W. Bollivar, J. Y. Suzuki, J. T. Beatty, J. M. Dobrowolski, C. E., & Bauer, J. Mol. Biol. **237** (1994) P.622.
- 5) J. Nomata, L. R. Swem, C. E. Bauer, & Y. Fujita, Biochim. Biophys. Acta **1708** (2005) P.229.
- 6) J. Nomata, M. Kitashima, K. Inoue, & Y. Fujita, FEBS Lett. **580** (2006) P.6151.
- 7) J. Nomata, T. Ogawa, M. Kitashima, K. Inoue, & Y. Fujita, FEBS Lett. **582** (2008) P.1346.
- 8) M. E. Kovach, P. H. Elzer, D. S. Hill, G. T. Robertson, M. A. Farris, R. M. Roop II, & K. M. Peterson, Gene **166** (1995) P.175.
- 9) D. G. Nickens, & C. E. Bauer, J. Bacteriol. **180** (1998) P. 4270.
- 10) D. P. Taylor, S. N. Cohen, W. G. Clark, & B. L. Marrs, J. Bacteriol. **154** (1983) P.580.
- 11) A. S. Lang, & J. T. Beatty, Proc. Natl. Acad. Sci. USA **97** (2000) P.859.
- 12) B. Marrs, Proc. Natl. Acad. Sci. USA **71** (1974) P.971.
- 13) P. A. Scolnik, M. A. Walker, & B. L. Marrs, J. Biol. Chem. **255** (1980) P.2427.
- 14) P. A. Scolnik, & R. Haselkorn, Nature **307** (1984) P. 289.
- 15) H. C. Yen, N. T. Hu, & B. L. Marrs, J. Mol. Biol. **131** (1979) P.157.