

平成 18 年度卒業 修士論文

遺伝子操作による水素発生細菌の
水素発生能力の改善の研究

環境情報学府 環境生命学専攻 生命環境コース

谷生研究室

05HA053 原田槿子

目次

第1章 緒言	1
1-1 研究背景	
1-2 先行研究	
1-3 本研究の目的	
第2章 理論	3
2-1 <i>E. aerogenes</i> による発酵水素生産	
2-1-1 発酵経路	
2-1-2 水素発生メカニズム	
2-2 生体内における糖の分解	
2-2-1 嫌氣的分解	
2-2-1-1 解糖系(Embden-Meyerhof 経路)	
2-2-2 好氣的分解	
2-2-2-1 TCA(tricarboxylic)サイクル	
2-2-2-2 酸化的リン酸化	
2-2-2-3 電子伝達系の構成成分	
2-3 硝酸呼吸	
2-4 遺伝子発現のメカニズム	
2-4-1 セントラルドグマ	
2-4-2 遺伝子の形態	
2-5 遺伝的組換え	
2-6 相同組換えによる遺伝子破壊	
2-7 研究計画	
2-7-1 標的遺伝子の決定	
2-7-2 実験計画	
第3章 遺伝子組み換え実験を行う上での法的規制の調査	21
第4章 実験方法	23
4-1 培養	
4-1-1 使用菌体	
4-1-2 培地	
4-1-3 プラスミド及びプライマー	
4-2 遺伝子破壊コンストラクトを用いた、相同組み換えによる <i>E. aerogenes</i> の <i>nuoG</i> 破壊実験	
4-2-1 遺伝子破壊ベクターの作製および導入実験	
4-2-1-1 遺伝子破壊ベクターの作製	
4-2-1-1-1 <i>E. aerogenes</i> のゲノム DNA の抽出と 16SrDNA の増幅による確認	
4-2-1-1-2 PCR による <i>nuoG</i> と <i>Cm^r</i> の増幅	
4-2-1-1-3 制限酵素処理による <i>nuoG</i> と pBR322 の切断	
4-2-1-1-4 <i>Cm^r</i> PCR 産物と <i>nuoG</i> 制限酵素処理産物の平滑末端化	
4-2-1-1-5 pBR322 制限酵素処理産物の脱リン酸化	
4-2-1-1-6 サンプルのフェノール/クロロホルム抽出およびエタノール沈殿による精製	
4-2-1-1-7 ライゲーション反応による <i>nuoG</i> 、 <i>Cm^r</i> 、pBR322 の連結	
4-2-1-2 エレクトロポレーション法による <i>E. aerogenes</i> への遺伝子破壊ベクターの導入	
4-2-1-2-1 コンピテントセルの作製	
4-2-1-2-2 エレクトロポレーション	

4-2-1-3	破壊株の選別	
4-2-1-3-1	クロラムフェニコール(Cm)入り寒天培地による選別	
4-2-1-4	形質転換株の相同組み換えの確認	
4-2-1-4-1	形質転換株のゲノム DNA 抽出	
4-2-1-4-2	PCR による形質転換株の <i>nuoG</i> 増幅およびサイズの確認	
4-2-1-4-3	PCR による形質転換株の <i>Cm^r</i> の増幅	
4-2-2	遺伝子破壊カセットの作製および導入実験	
4-2-2-1	Fusion PCR 法 ^[18] による遺伝子破壊カセットの作製	
4-2-2-1-1	プライマーの設計	
4-2-2-1-2	PCR による <i>nuoG</i> の上流・下流部分と <i>Cm^r</i> の増幅	
4-2-2-1-3	Fusion PCR による遺伝子破壊カセットの増幅	
4-2-2-2	エレクトロポレーション法による <i>E. aerogenes</i> への遺伝子破壊カセットの導入	
4-2-2-2-1	コンピテントセルの作製	
4-2-2-2-2	エレクトロポレーション	
4-2-2-3	破壊株の選別	
4-2-2-3-1	クロラムフェニコール入り寒天培地による選別	
4-2-2-3-2	酸化タングステン(VI)による選別	
4-2-2-3-3	コロニーPCR による破壊株の選別	
4-2-3	相同領域の長さの長い遺伝子破壊カセットの作製	
4-2-3-1	Fusion PCR 法による相同領域の長さの長い遺伝子破壊カセットの作製	
4-2-3-1-1	プライマーの設計	
4-2-3-1-2	PCR による <i>nuoE</i> ~ <i>G</i> ・ <i>nuoG</i> ~ <i>J</i> と <i>Cm^r</i> の増幅	
4-2-3-1-3	Fusion PCR による遺伝子破壊カセットの増幅	
第 5 章	実験結果と考察	34
5-1	遺伝子破壊ベクターを用いた、相同組み換えによる <i>E. aerogenes</i> の <i>nuoG</i> 破壊実験	
5-1-1	遺伝子破壊ベクターの作製	
5-1-1-1	ゲノム DNA 抽出と 16SrDNA の増幅	
5-1-1-2	PCR による <i>nuoG</i> と <i>Cm^r</i> の増幅	
5-1-1-3	制限酵素処理による <i>nuoG</i> と pBR322 の切断	
5-1-2	エレクトロポレーション法による <i>E. aerogenes</i> への遺伝子破壊ベクターの導入 および破壊株の選別	
5-1-2-1	クロラムフェニコール(Cm)入り寒天培地による選別	
5-1-2-2	PCR による形質転換株の <i>nuoG</i> 増幅およびサイズの確認	
5-1-2-3	PCR による形質転換株の <i>Cm^r</i> の増幅	
5-2	遺伝子破壊カセットを用いた、相同組み換えによる <i>E. aerogenes</i> の <i>nuoG</i> 破壊実験	
5-2-1	PCR による <i>nuoG</i> の上流・下流部分と <i>Cm^r</i> の増幅	
5-2-2	Fusion PCR による遺伝子破壊カセットの増幅	
5-2-3	破壊株の選別	
5-2-3-1	Cm 入り寒天培地による選別	
5-2-3-2	酸化タングステン(VI)による選別	
5-2-3-3	コロニーPCR による破壊株の選別	
第 6 章	結言	41
第 7 章	Supplements	42
	謝辞	
	参考文献	

第1章 緒言

1-1 研究背景

水素は低環境負荷・高効率に利用できるエネルギーとして近年注目を集めている。特に石油などの化石燃料はもとより太陽光、風力、バイオマスなどの再生可能エネルギーからも製造でき、水以外を排出しないゼロエミッションシステムとして地球温暖化対策にも期待されている。水素エネルギー社会構築は我が国のエネルギー利用において、地球上に局在化する石油資源依存からの脱却、エネルギー多様化などエネルギーセキュリティの意味合いからも重要である。^[1]

特に地球温暖化の防止という視点から見た場合、水素の製造方法に注目する必要がある。現在の水素製造方法は化石燃料からの改質が主要となっているが、これでは地球温暖化の根本的な解決にはならない。一方、本研究室でも研究が行われているバイオマスによる発酵水素生産は、環境に負荷の少ない水素生産方法として期待できる。発酵水素生産の過程で発生する二酸化炭素は元々植物によって固定されていたものなので、カーボンニュートラルという考え方が適応され、温暖化に寄与しないと考えることができるからである。また、現在廃棄処分されているバイオマス資源を利用することで、廃棄物処理という観点からも期待が高い。

しかし、発酵水素生産の実用化に向けての課題として基質当たりの水素収率が悪いことが挙げられる。水素収率が高いとされている偏性嫌気性菌 *Clostridium butyricum* を用いてもグルコース 1mol 当たり約 2.3mol の水素しか生成せず^[2]、また発酵による水素発生の最大理論収率はグルコースを分解する際の代謝産物として酢酸のみを生成した場合に達成される、 $4\text{mol}\cdot\text{H}_2/\text{mol}\cdot\text{glucose}$ にとどまる。さらに、実際の発酵後の廃液には様々な有機酸が含まれ、その処理のしにくさも問題とされている。

1-2 先行研究

本研究で用いる通性嫌気性細菌 *Enterobacter aerogenes* は、NADH (Nicotinamide Adenine Dinucleotide, reduced form) からヒドロゲナーゼを介して水素を発生するとされている^[3]。通常、嫌気状態では解糖にて 2mol の NADH が生成され、そのうち 1mol が代謝産物生成に、残り 1mol が水素生産に用いられて水素を 1mol 生産する。一方好気状態では、TCA サイクルと合わせて 10mol の NADH が生成されるが、この NADH は電子伝達系にて全て再酸化されてしまうため、水素は発生しない。

そこで本研究室では、好気条件下で生成される 10mol の NADH を水素生産に使うべく、NADH の再酸化を行っている電子伝達系の complex I (NADH デヒドロゲナーゼ複合体) を阻害、もしくは破壊する方法を模索してきた。これまでに菅沼らに

よって、紫外線照射による complex I 欠損株取得や阻害剤 Lauryl Gallate による complex I の阻害がなされてきた。阻害剤を用いた実験では、硝酸呼吸下で complex I を阻害することで水素収率が向上することが確かめられた。しかし、前者では変異がランダムに起こること、後者では再現性の低いことなどがネックとなり、思うような成果が得られていない^[4]。

1-3 本研究の目的

そこで本研究では、遺伝子操作によって *E.aerogenes* を complex I を欠いた細菌に改良し、基質当たりの水素収率を改善することを目的とした。

第2章 理論

2-1 *E. aerogenes* による発酵水素生産

水素発生細菌の一種である *E. aerogenes* は土壌や水中、ヒトや動物の腸管などに生息するグラム陰性の通性嫌気性桿菌で、その生態は大腸菌 *Escherichia coli* とよく似ている。好気・嫌気の両条件下で生育が可能であるので、偏性嫌気性菌と比べて培養が容易であるという特長をもつ。また、幅広い炭水化物をエネルギー源として利用することができ、生ごみや廃糖蜜、廃グリセリンなどを基質とした発酵でも良好な水素発生を行うことが確認されている。このように発酵水素生産の実用化にあたって有利な特長をもつ *E. aerogenes* であるが、グルコースを基質とした発酵では水素収率約 $1\text{mol}\cdot\text{H}_2/\text{mol}\cdot\text{glucose}$ と、やや低いことが課題として残る。この節では、*E. aerogenes* の発酵経路や水素発生メカニズムについて説明する。

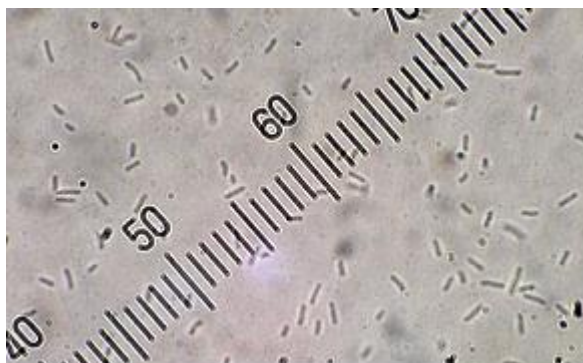


Fig.2-1 *E. aerogenes* の顕微鏡写真 (YNY 嫌気培地にて一晚培養)

2-1-1 発酵経路

E. aerogenes による発酵の様式はブタンジオール発酵 butanediol fermentation であり、グルコースを基質とした発酵では主として水と二酸化炭素、アルコール (2,3-ブタンジオール、エタノール)、有機酸 (酢酸、乳酸、ギ酸) を生成する。(Fig.2-2)

2-1-2 水素発生メカニズム^[3]

E. aerogenes による水素発生は代謝産物生成過程において余剰となった NADH (Nicotinamide Adenine Dinucleotide, reduced form) の再酸化によると考えられている。その水素発生反応は Fig.2-3 に示したように、細胞膜に結合した酵素ヒドロゲナーゼが細胞内で NADH から電子を受け取り、細胞外でプロトンに電子を渡すことで起こるとされており、その反応式は以下のように考えられる。

細胞の内側(cytoplasm side)の反応



細胞の外側(periplasm side)の反応



2-2 生体内における糖の分解

2-2-1 嫌氣的分解

2-2-1-1 解糖系(Embden-Meyerhof 経路)^{[5][6]}

グルコースを分解するときの基本的な経路であり、あらゆる生物の生体内反応に広く存在することが知られている。Fig.2-4 にその代謝経路を示す。1mol のグルコースから 2mol のピルビン酸が生じるときに差引き 2mol の ATP 生成反応が随伴しており、この分に相当するエネルギーがほかの合成反応や運動、その他の目的に使用できる。このとき 2mol の NAD⁺は NADH に還元されたままである。細胞内の NAD⁺量はわずかであるので NADH を NAD⁺に酸化させる反応と共役させない限り解糖系の反応はすぐに停止することになる。生体内での NADH の酸化反応は好氣的には呼吸により酸素で酸化するが、嫌氣的にはピルビン酸を還元する反応、もしくはピルビン酸から脱炭酸により生じたアセトアルデヒドを還元する反応によって行っている。代表的な例としては、前者では乳酸が生成する乳酸発酵、後者ではエタノールが生成するアルコール発酵が知られている。

2-2-2 好氣的分解

2-2-2-1 TCA(tricarboxylic)サイクル^{[5][6]}

TCA サイクルの反応経路図は Fig.2-5 に示したとおりである。この系では合成に必要な材料の骨格（炭素鎖）がつくられると同時に、反応に要するエネルギーを生産する反応系でもあり、生体における物質合成に極めて重要なものである。以上のことより、TCA サイクルが物質的・エネルギー的に重要な働きを担うことを念頭に置きつつ、ここではエネルギー的側面に重点を置いて見ていきたい。

糖より生成したピルビン酸は、ピルビン酸脱水素酵素複合体（3 種類の酵素よりなる）により次の反応をうけてアセチル CoA に変化する。

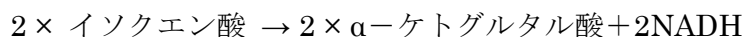


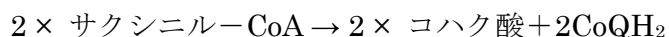
TCA サイクルはアセチル CoA とオキザロ酢酸が縮合してクエン酸を合成する反応から始まり、脱水素反応を 4 回受けその間に 2 分子の二酸化炭素を発生してもとのオキザロ酢酸に戻る。この間にアセチル-CoA のアセチル基が完全燃焼したことになる。グルコースが解糖系と TCA サイクルを通過して完全に燃焼する最も代表的な呼吸系を考えてみると、

解糖系



TCA サイクル





となり、エネルギー関係では $4\text{ATP} + 10\text{NADH} + 2\text{CoQH}_2$ が残る。NADH が酸素により NAD^+ に酸化される反応は $3\text{ADP} \rightarrow 3\text{ATP}$ の反応 (大腸菌などでは係数は 1 または 2) と共役しているため $\text{NADH} = 3\text{ATP}$ とエネルギー的に換算できる。また CoQH_2 は 2ATP (大腸菌では 1ATP) と換算できるので、以上の換算率を用いるとグルコース 1 分子が完全燃焼するとき 38 分子の ADP から 38 分子の ATP が最大理論値として発生することになる。大腸菌ではこの値は 16~26ATP である。

2-2-2-2 酸化的リン酸化^{[7][8]}

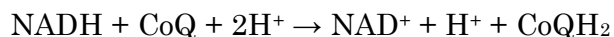
解糖では基質から本来得られるはずのエネルギーのほんの一部しか取り出せない。好氣的な条件下では、解糖で生じたピルビン酸がクエン酸回路によってさらに酸化され、還元型の補酵素 NADH と CoQH_2 が生じる。こうしてできた NADH と CoQH_2 が膜に埋め込まれた一連の酵素複合体から成る電子伝達系によって酸化され、ATP が生成される過程全体は酸化的リン酸化とよばれている。電子伝達系は真核細胞ではミトコンドリアの内膜に、細菌では細胞膜に存在する。ミトコンドリアの電子伝達系の模式図を Fig.2-6 に、原核微生物の電子伝達系の模式図を Fig. 2-7 に示す。

2-2-2-3 電子伝達系の構成成分^[7]

(1) complex I : NADH-CoQ レダクターゼ複合体

complex I は NADH から CoQ への 2 電子伝達を触媒する。complex I は一番大きく、またきわめて複雑な酵素である。

ミトコンドリアマトリックスの NADH 分子は complex I に電子を渡す。電子は水素化物イオン (H^-) として一度に 2 個移動する。complex I を介する電子移動の第一段階として、水素化物イオンが FMN(フラビンモノヌクレオチド) という FAD と似た構造をもつ分子に転移され、 FMNH_2 が精製する。 FMNH_2 はセミキノン中間体を経て 2 段階で酸化されるが、その際に 2 つの電子を 1 つずつ次の酸化剤である鉄-硫黄クラスターに渡す。したがって FMN は、NAD が関与するデヒドロゲナーゼ類の 2 電子転移反応を、これ以降の電子伝達鎖の I 電子転移反応に切り換える役割をする。最後に CoQ が電子を 1 つずつ受け取り、還元された CoQH_2 の状態になる。ここでの全反応をまとめると以下ようになる。



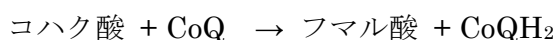
輸送される各電子は約 360mV の電位差を下がるが、このとき放出されるエネルギーの多くは、complex I によって酸化される NADH 当たり 4 個の H^+ を内膜を横切って輸送するために使われるが、その輸送機構はわかっていない。

(2) complex II : コハク酸-CoQ レダクターゼ複合体

complex II はコハク酸から電子を受け取り、complex I と同様、CoQ を

CoQH₂に還元する反応を触媒する。哺乳類の complex IIは、4つのサブユニットから成っている。最も大きな2つのサブユニットがコハク酸デヒドロゲナーゼで、FAD 補欠分子族と3つの鉄-硫黄クラスターをもっている。コハク酸デヒドロゲナーゼはクエン酸回路でコハク酸をフマル酸にし、あとの2つのサブユニットは、細胞内でコハク酸デヒドロゲナーゼを膜に結合させ、電子を生理的な電子受容体である CoQ に渡すのに必要であると考えられている。

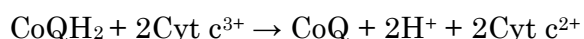
コハク酸から CoQ への2電子伝達反応は、水素化物イオンによる FAD の還元で始まり、続いて還元型フラビンから3つ連続した鉄-硫黄クラスターへ、2回の1電子伝達反応が起こる。反応全体は以下ようになる。



complex IIが触媒する反応で開放される自由エネルギーは小さいので。したがって、complex IIでの H⁺輸送はなく、電子伝達系のこの部分では水素イオン駆動力は発生しない。

(3) complex III : CoQH₂-シトクロム c レダクターゼ複合体

安定な二量体中のそれぞれの単量体は、11種類のたんぱく質鎖を含むが、そのうちの3個だけが酸化還元タンパク質である。それは[2Fe-2S]たんぱく質、シトクロム b、シトクロム c₁などがある。CoQH₂1分子が酸化されると、4個のプロトンが内膜の外側へ移行するが、これらのうちでマトリックスからのものは2つだけで、あとの2つは CoQH₂に由来する。complex IIIは電子を1電子伝達体のシトクロム c に転移し、シトクロム c は内膜の細胞質ゾル面を移動して complex IV に電子を転移する。1対の電子が伝達されるときに complex IIIによって触媒される反応全体は以下のとおりである。



この反応で開放される自由エネルギーは大きいので、1対の電子がに complex III を通して伝達されるとき、4個の H⁺がマトリックスからミトコンドリア内膜を経てくみ出される。

(4) complex IV : シトクロム c オキシダーゼ複合体

complex IVは呼吸の電子伝達系の最後の構成要素である。この複合体は、分子状酸素を水にする4電子還元反応を触媒し、その際にプロトンを膜間腔へ送り込む。complex IIIとIVを連結する移動性のタンパク質シトクロム c の Fe(II)型が電子を供給する。

哺乳類の酵素は13種のポリペプチド鎖から成る二量体で、全体の分子量は約400,000である。complex IVの2つのポリペプチド鎖がすべての酸化還元補因子をもっている。1本の鎖が Cu_Aとよばれる2つの銅イオンを持つ。この2つの銅

イオンは Cu-Cu 結合でつながり、Fe-S クラスターのように 1 回に 1 つの電子を受け取ったり、渡したりする。もう 1 つのポリペプチド鎖は、2 つの鉄補因子であるシトクロム a と a₃ をもつ。これらの中のヘム補欠分子族は同じような構造をしているが、複合体内部での微小環境の違いによって、標準還元電位が異なっている。この鎖は Cu_B とよばれるもう 1 つの銅イオンをもち、電子伝達にかかわるときには Cu(II) と Cu(I) の状態を交互にとる。隣接しているシトクロム a₃ のヘムと Cu_B が、O₂ を還元する活性部位である。1 対の電子が伝達された場合、complex IV によって触媒される反応全体は以下ようになる。

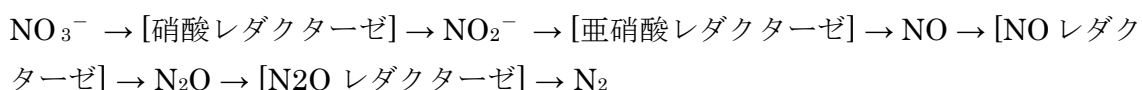


一対の電子が complex IV を経て伝達される間に、H⁺2 個が膜を横切って輸送される。

2-3 硝酸呼吸^{[9][10]}

破壊株からの水素発生実験の際、培地を微好気状態に保つ必要がある。発生気体の測定の観点から、酸素を供給しながらの発酵実験は不都合である。そこで *E. aerogenes* が硝酸呼吸を行う点を利用し、酸素の代わりに硝酸を添加して擬似好気状態をつくり実験を行うこととした。節では硝酸呼吸の機構を簡単に述べておく。

呼吸における最終電子受容体として酸素の代わりに硝酸を用いることを硝酸呼吸という。Fig. 2-8 に大腸菌の酸素呼吸および硝酸呼吸の仮説モデルを示す。通性嫌気性細菌に多く見られ、NO³⁻ は還元されて、N₂ または N₂O として捨てられることが多い。このときの脱窒反応は以下のように段階的に進む。



また、NO₃⁻ が NO₂⁻ にまでしか還元されない、あるいは NH₄⁺ に還元される場合もあり、*E. coli* や *E. aerogenes* は NO₂⁻ までしか還元されないことが知られている。硝酸呼吸によるグルコース代謝反応全体および NO₃⁻ による NADH 酸化の反応は以下のようなになる。



2-4 遺伝子発現のメカニズム

2-4-1 セントラルドグマ^[11]

設計図としての DNA が実際にタンパク質になる際、細胞は DNA に刻まれた設計図を直接タンパク質に変えてゆくのではなく、いったん RNA という核酸のポリマーに写し変えて、その RNA 上の情報を使ってタンパク質を合成してゆく。この

DNA→RNA→タンパク質という情報の流れに対して、Crick は 1958 年、生物における中心的原理という意味で、セントラルドグマという名前を与えた。DNA から RNA が合成されるステップは転写 (transcription)、RNA の情報からタンパク質が合成されるステップは翻訳 (translation) と呼ばれている。(Fig. 2-9)

2.4.2 遺伝子の形態^[11]

遺伝子は DNA であるが、DNA というのはあくまでデオキシリボ核酸という化合物にすぎない。これに対して遺伝子は、ある形質を与える機能的最小の単位といえる。例えば、X というタンパク質をコードする X という遺伝子について考えたとき、X 遺伝子のタンパク質に翻訳される部分 (ORF、open reading frame ; 読み枠) だけを細胞に導入しても、X タンパク質は合成されない。X 遺伝子が発現し、X というタンパク質が合成されるためには、ある法則に則った遺伝子の形態とでもいべきものが必要になる。

単なる A,G,C,T の無機質な羅列である DNA 鎖中で、ある領域にタンパク質をコードする設計図があるということを識別するためには、その ORF 部分の前後に特徴的な塩基の並びが必要になる。その特徴的な並びのうち、ORF の前にある配列をプロモーター、ORF の後ろにある配列をターミネーターと呼ぶ。つまり、プロモーターは DNA が RNA に転写されるのを促進 (promote) し、ターミネーターは転写を終結 (terminate) させる目印である。(Fig. 2-10)

2-5 遺伝的組換え^[12]

有性的あるいは無性的方法によって、供与細胞の遺伝子を受容細胞が受け入れ、この外来遺伝子が宿主遺伝子と置きかわることがある。この現象を遺伝的組換え (genetic recombination) という。2種の相同染色体間においては、組換えは染色体の切断と再結合によりおこる。細菌を用いた実験により、組換えは多数の遺伝子産物が関与する DNA の切断と再結合に基づくことが示された。大腸菌の組換えには RecA タンパク質が重要な役割を果たしている。RecA タンパク質はアニラーゼと呼ばれる機能を持ち、二本鎖 DNA の中に相同な一本鎖 DNA を侵入させ、新たな対合を形成し、ヘテロ二本鎖となり、これまでの対合相手であった一本鎖を押し出して、D ループと呼ばれる構造をつくる。(Fig. 2-11) この組換えには、recA の他、recB、recC、recE、recF、sbcA、sbcB などの遺伝子が関与していて、いずれもエキソヌクレアーゼの産生およびその調節を司っている。こうした遺伝的組換えは相同な DNA の任意の部分でおこるので、一般組換え (general recombination) と呼ばれる。

一般組換えと対称的に、細胞には RecA タンパク質を必要としない座位特異的組換え (site-specific recombination) と、非相同性組換え (illegitimate recombination) が知られる。座位特異的組換えは、染色体 DNA の特定部位のみでおこる。λ ファージが溶

原化する時、大腸菌染色体の att λ 部位に組み込まれるのは、その一例である。非相同性組換えには、挿入配列(insertion sequence, IS)による F 因子の染色体への組み込みや、トランスポゾンによる薬剤耐性遺伝子の組み込みが知られる。

2-6 相同組換えによる遺伝子破壊^[13]

遺伝子の破壊は挿入破壊 (integrative disruption) と置換破壊 (one-step gene disruption) に大別される。

挿入破壊法では、2 つの離れた部位に変異を導入した標的遺伝子と選択マーカーを保持した挿入ベクターを用い、染色体上の標的遺伝子との間で相同組換えを起こさせる (Fig. 2-12 (a))。結果として、2 コピーの不完全な遺伝子が染色体上に存在するようになる。この方法による遺伝子破壊株では、2 コピー間の部分が組換えにより脱落し、もとの遺伝子型に戻ってしまう可能性がある。

置換破壊法では、標的遺伝子内部にマーカー遺伝子を挿入して標的遺伝子を分断した置換ベクターを用いる。導入された DNA 断片が選択マーカーの両側の二重交差によって標的遺伝子と置換され、標的遺伝子は破壊される (Fig. 2-12 (b))。

2-7 研究計画

2-7-1 標的遺伝子の決定

E. aerogenes の電子伝達鎖に関する遺伝子研究は見あたらなかったが、この菌に非常に近いとされる *E. coli* を用いた欠損株の研究は電子伝達鎖の機構解明の観点から盛んに行われていた。*E. coli* の complex I は Fig.2-13 のように 14 の構造遺伝子 nuo(NADH:ubiquinone oxidoreductase) A~N から成るとされ、そのなかでも nuoG は特に主要な働きをするとされている^{[14][15]}。よって *E. aerogenes* の complex I 破壊実験の標的遺伝子を nuoG とした。

2-7-2 実験計画

以上、第 2 章で述べてきたことを踏まえて本研究の実験計画を示す。

1. *E. aerogenes* の nuoG をターゲットとした遺伝子破壊コンストラクトの構築
2. エレクトロポレーション法による *E. aerogenes* への遺伝子破壊コンストラクトの導入 (ターゲット遺伝子の破壊)
3. 破壊株の選別
4. 水素発生能確認実験

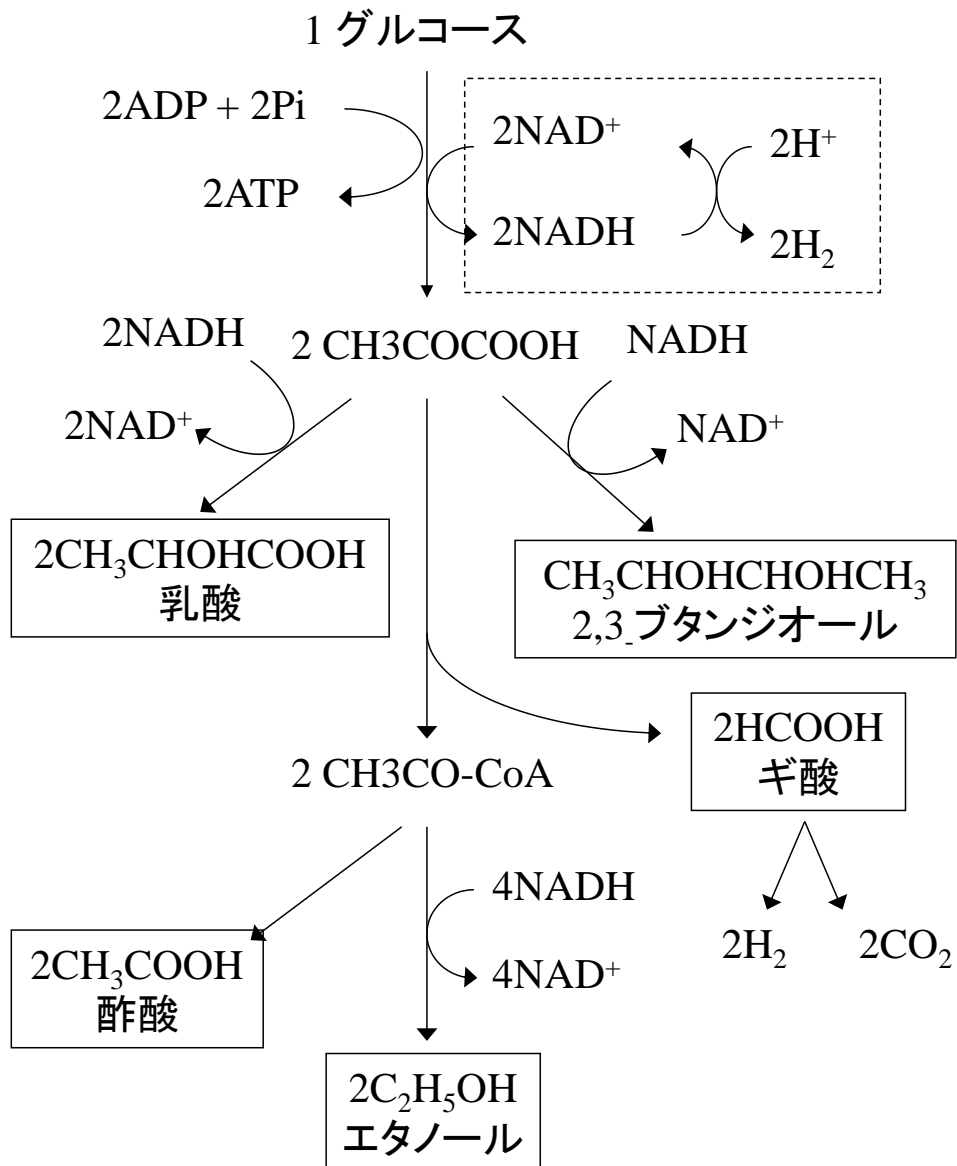


Fig.2-2 *Enterobacter aerogenes*による

発酵水素発生の経路

※点線内のNADH経路の水素発生は仮説として提唱されている

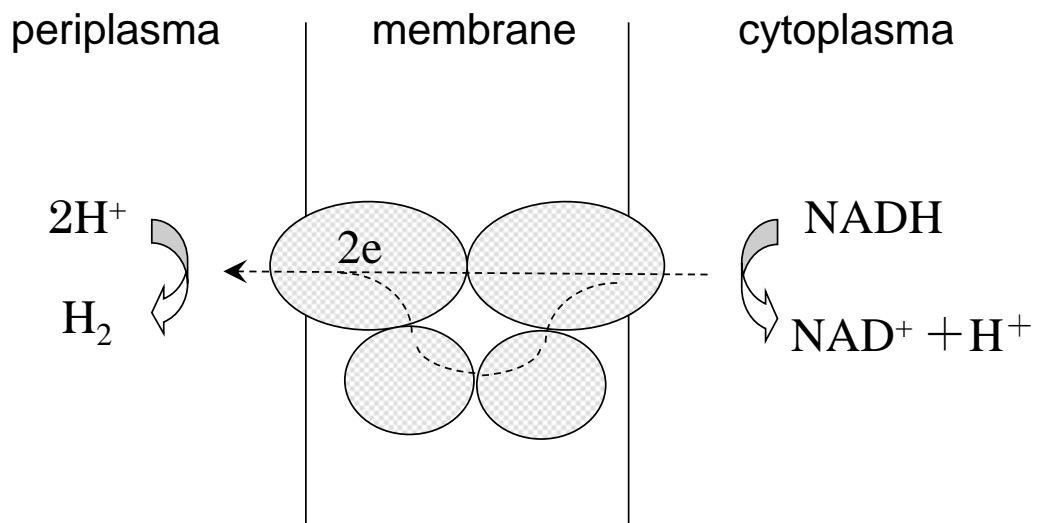


Fig. 2-3 NADH-水素発生の電子伝達機構

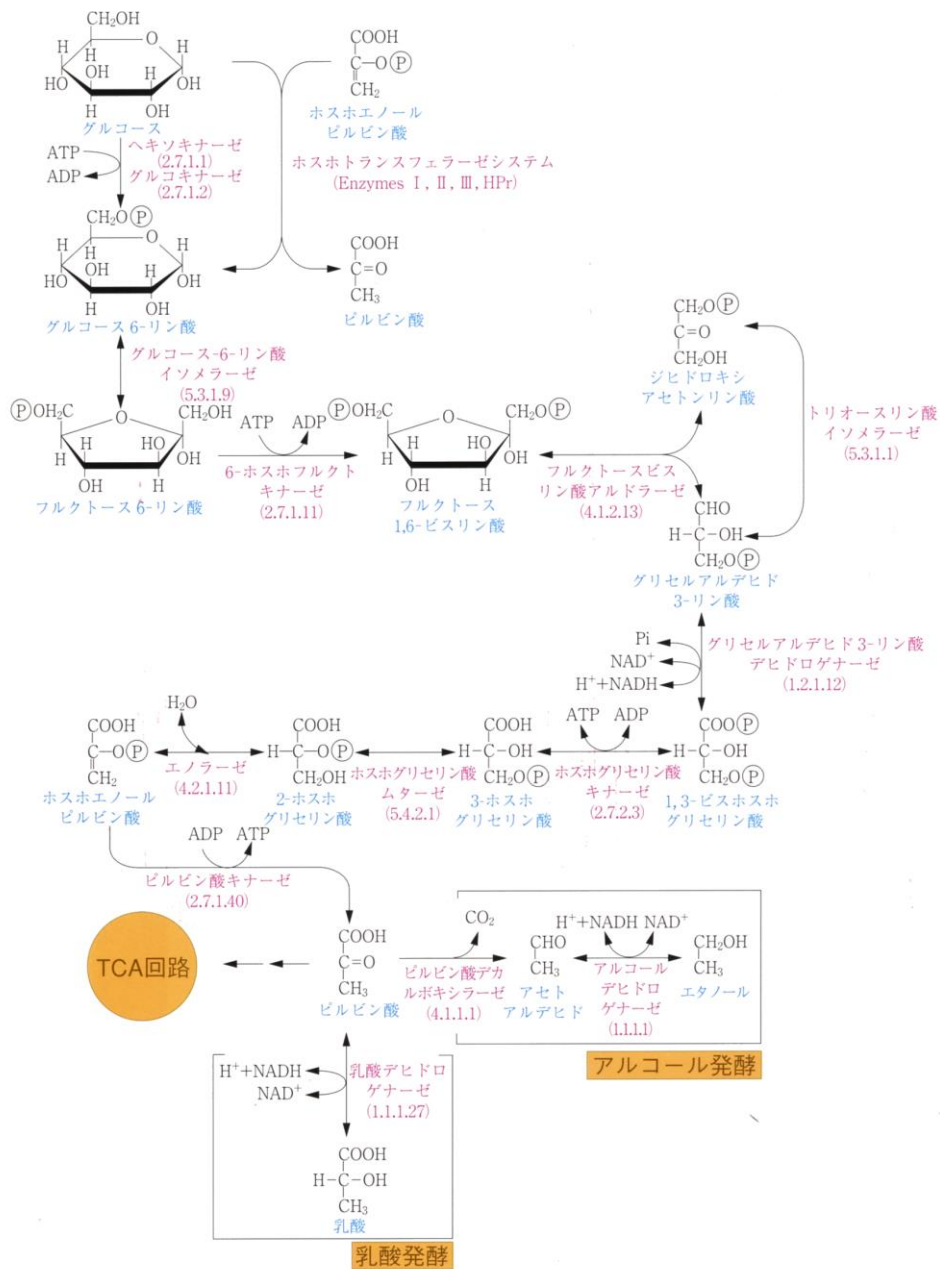


Fig.2-4 解糖系 [8]

- ① ピルビン酸脱素酵素
- ② クエン酸合成酵素
- ③ アコニテートヒドラーターゼ
- ④ イソシトレート脱水素酵素
- ⑤ 2-オキソグルタル酸脱水素酵素
- ⑥ ジヒドロリポアミドトランスサクシナーゼ
- ⑦ サクシニル-CoA-合成酵素
- ⑧ コハク酸脱水素酵素
- ⑨ フマル酸ヒドラーターゼ
- ⑩ リンゴ酸脱水素酵素
- ⑪ ジヒドロリポアミド脱水素酵素

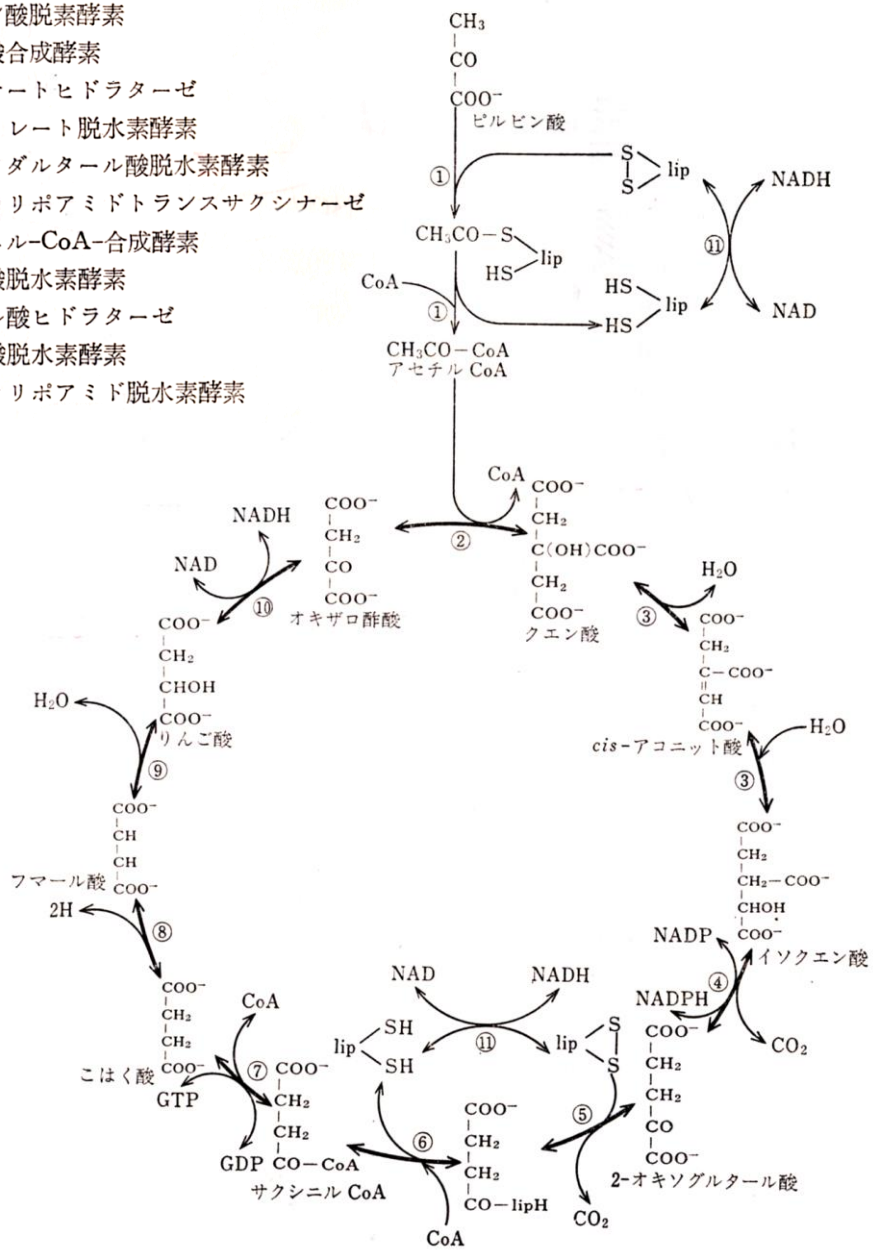


Fig.2-5 TCAサイクル [6]

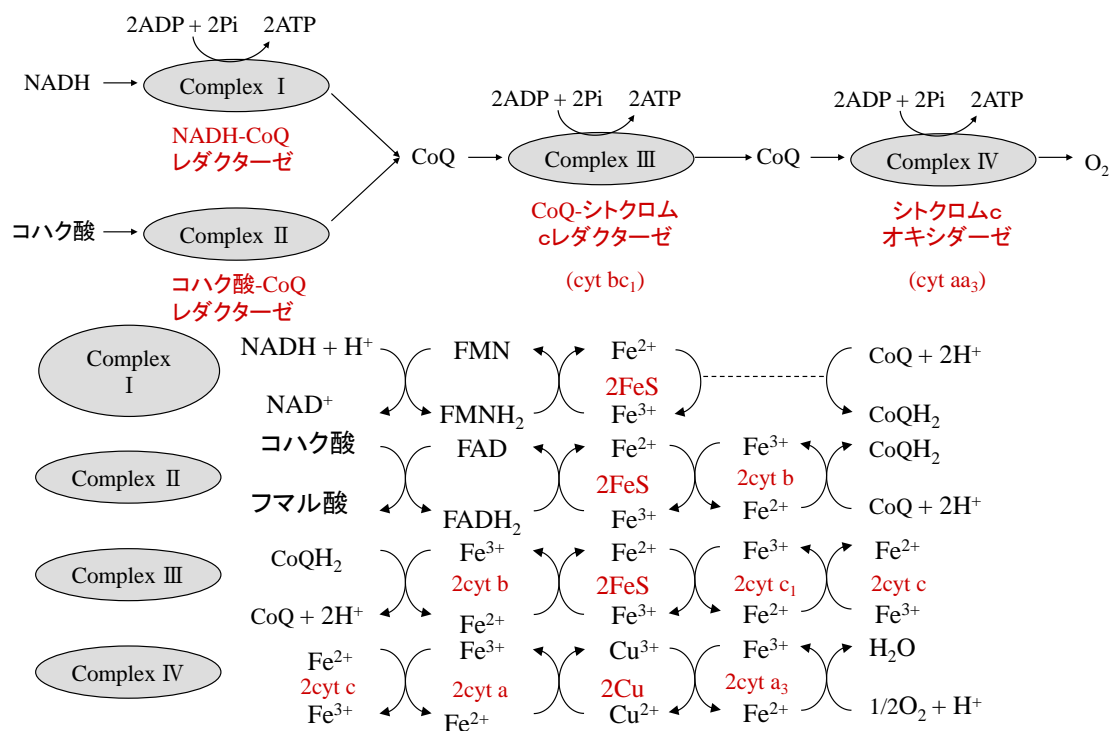
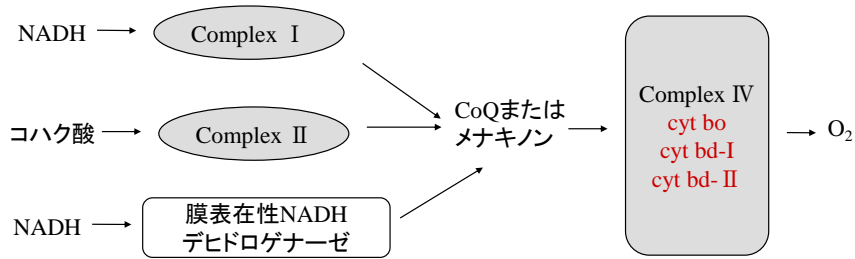


Fig. 2-6 ミトコンドリアの電子伝達系の模式図^[8]

Escherichia coli



Paracoccus denitrificans

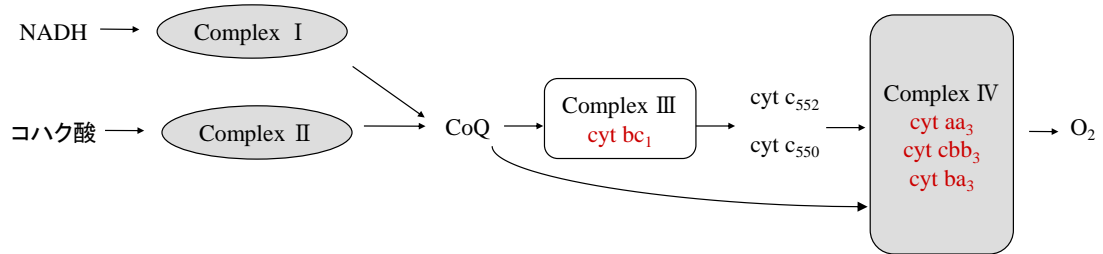


Fig. 2-7 原核微生物の電子伝達系の模式図^[8]

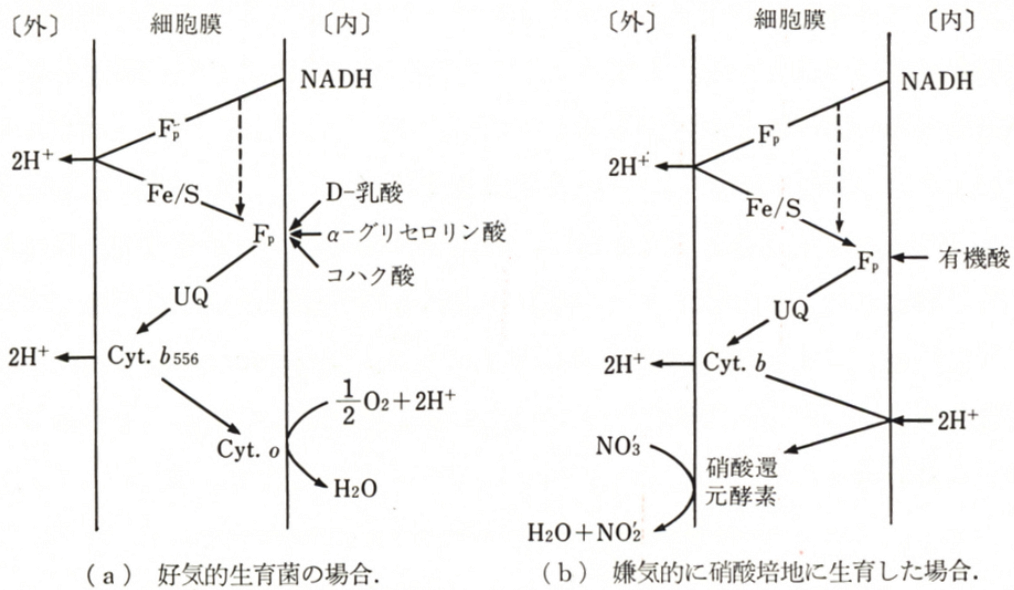


Fig. 2-8 大腸菌における呼吸鎖成分の内膜分布についての仮説^[10]

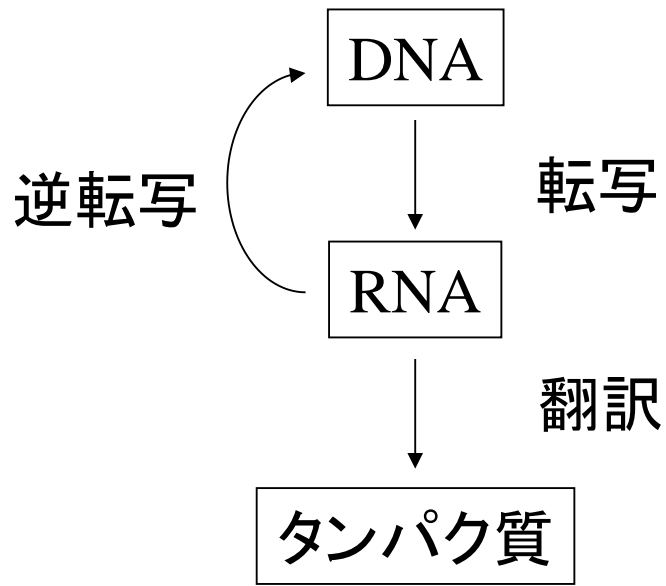


Fig.2-9 セントラルドグマ



Fig.2-10 遺伝子の形態

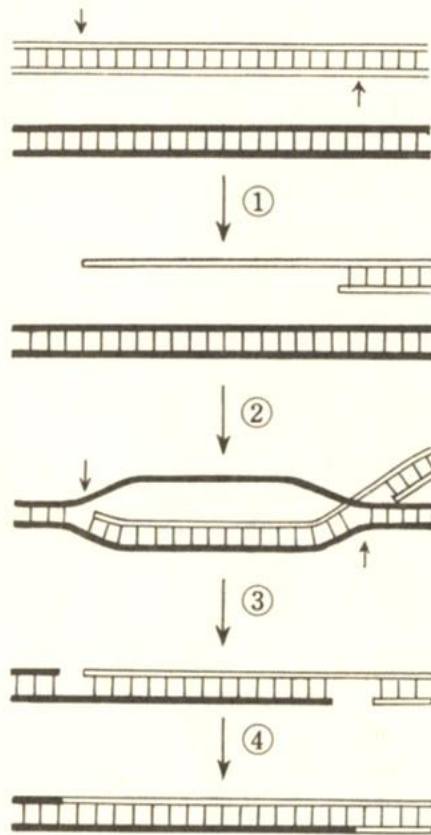


図 2.27 DNA の組換えのモデル

① 相同な DNA の一部がエンドヌクレアーゼ、エキソヌクレアーゼで切られ一本鎖の部分ができる。② RecA タンパク質の働きで一本鎖の DNA が二本鎖の DNA 分子中へ侵入し対合する。③ ヌクレアーゼの働きで余分な部分が切られる。④ DNA ポリメラーゼ、DNA リガーゼによってギャップの部分が埋められ、再結合がおこる。

Fig.2-11 DNAの組換えモデル^[12]

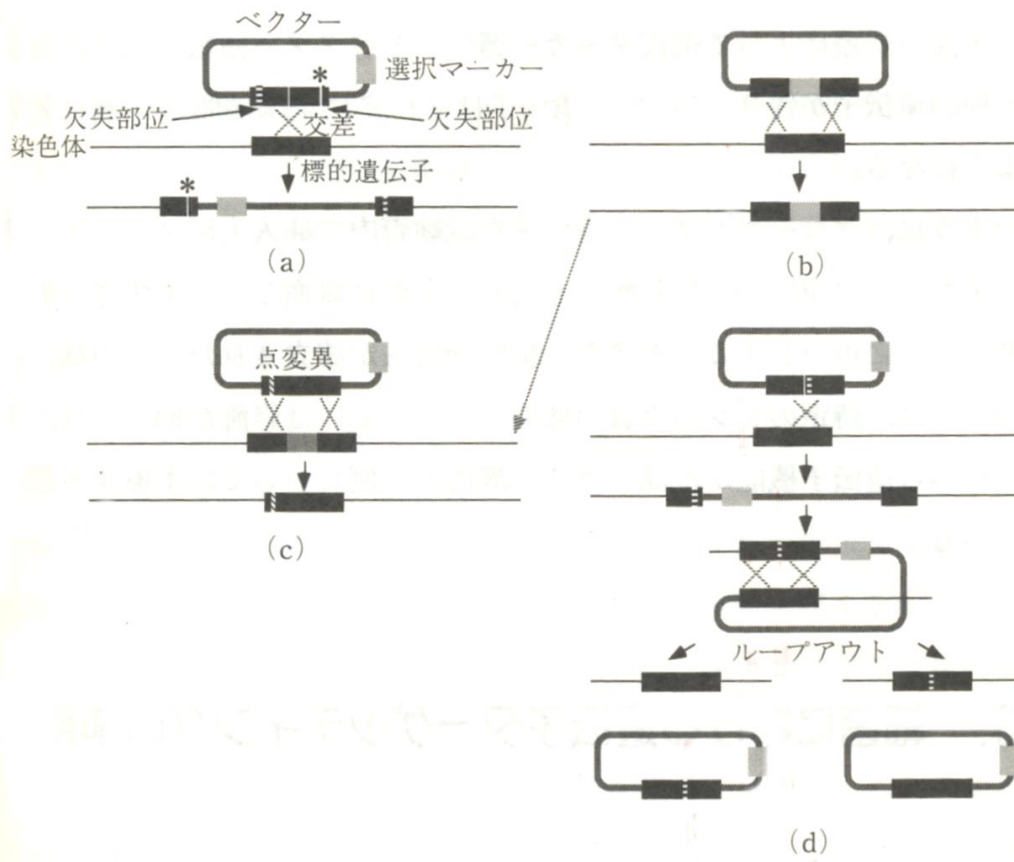


Fig.2-12 DNAの組換えモデル^[14]

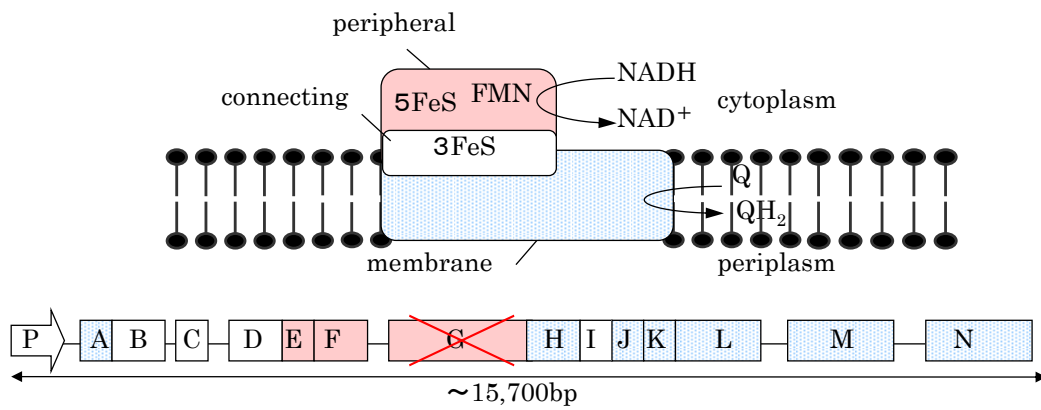


Fig. 2-13 *Escherichia coli*のcomplex I および *nuo*遺伝子座の模式図 [15]

第3章 遺伝子組み換え実験を行う上での法的規制の調査^[16]

－ *E. aerogenes* を用いた遺伝子組み換え実験の場合－

遺伝子組換え生物等による生物多様性への影響を防止するため「生物の多様性に関する条約のバイオセーフティに関するカルタヘナ議定書」が平成12年1月に採択された。日本では、本議定書の締結に必要な国内措置を定めた「遺伝子組換え生物等の使用等の規制による生物の多様性の確保に関する法律（平成十五年法律第九十七号）」を平成15年6月18日に公布し、同議定書を平成15年11月21日に締結した。同法はカルタヘナ議定書が日本に効力を発する平成16年2月19日から施行されている。）そこで *E. aerogenes* を用いた遺伝子組み換え実験である本実験についても、「遺伝子組換え生物等の使用等の規制による生物の多様性の確保に関する法律」（以下「法」。）および「研究開発等に係る遺伝子組み換え生物等の第二種使用等に当たって執るべき拡散防止措置等を定める省令」（以下「二種省令」。）に定められた実験危険度の分類や執るべき拡散防止措置について調査を行った。その結果を次にまとめる。

- ・ 第二種使用（環境中への拡散を防止しつつ行う使用）に相当。（法第2条第6項）
- ・ 機関実験に相当し、文部科学大臣への手続きは不要。（法第12条）
- ・ 使用の区分→微生物使用実験（二種省令第2条）
- ・ 遺伝子組み換え実験の分類は原則として、宿主の実験分類と核酸供与体の実験分類の高い方に従って定められる。（二種省令第5条）

今回の実験では

宿主 *Enterobacter aerogenes* 【クラス1】

供与核酸 pHSG398（同定済み核酸でかつ病原性及び伝達性に関係しないとされるので宿主の実験分類に従う）

であるから、実験分類はP1レベルに相当する。

- ・ P1レベルの実験実施時に執る拡散防止措置の内容（二種省令別表第2）
- ・ 通常の生物の実験室としての構造及び設備を有すること。
 - ・ 遺伝子組み換え生物を含む廃棄物は不活性化してから廃棄すること。
- ・ 遺伝子組み換え生物が付着した設備、機器、及び器具については、廃棄または再使用前に遺伝子組み換え生物を不活性化すること。
- ・ 実験台については、実験を行った日の実験終了後、及び遺伝子組み換え生物が付着したときは直ちに不活性化するための措置をとること。
- ・ 実験室の扉については、閉じておくこと。（出入りする時を除く）

- ・実験室の窓等については、昆虫などの侵入を防ぐため、閉じておくこと。
- ・エアロゾルの発生を最小限にとどめること。
- ・遺伝子組み換え生物を実験室から持ち出すときは、漏出しない構造の容器に入れること。
- ・遺伝子組み換え生物の付着・感染防止のために手洗いなどの措置を執ること。
- ・関係者以外の者の入室を制限すること。

保管について（二種省令第6条）

- ・ 遺伝子組み換え生物が漏出しない構造の容器に入れ、容器の外側に遺伝子組み換え生物である旨を表示すること。
- ・ 容器は所定の場所に保管すること。
- ・ 容器を冷蔵庫等に保管する場合には、設備の見やすい箇所に遺伝子組み換え生物等を保管している旨を表示すること。

以上のことに注意して実験を行わなければならない。なお本研究室で行われている *E. aerogenes* 以外の微生物を用いた遺伝子操作でも、宿主の危険度分類のレベルは同じであるので今回の調査結果を適応することができる。

第4章 実験方法

4-1 培養

4-1-1 使用菌体

本実験で用いた菌体は、*E. aerogenes* JCM1235 (2005年4月～2006年12月) と *E. aerogenes* IFO 13534 (2007年1月～) である。この2株の関係は以下に示す通りである。

Type strain: strain ATCC 13048 = IFO (now NBRC) 13534 = JCM 1235

菌株は独立行政法人製品評価技術基盤機構バイオテクノロジー本部生物遺伝資源部門 (NBRC) から購入し、寒天培地に定期的 (2週間に1度程度) に植え継いで保存した。

4-1-2 培地

本実験で使用した培地の組成は TABLE.7-1～7-6 に示す。

4-1-3 プラスミド及びプライマー

本実験で使用したプラスミド及びプライマーを TABLE. 7-7、7-8 に示す。

4-2 遺伝子破壊コンストラクトを用いた、相同組み換えによる *E. aerogenes* の *nuoG* 破壊実験

遺伝子破壊の方法には本実験で用いる相同組み換えによる置換破壊の他にもトランスポゾンによるランダムな破壊や、紫外線や変異原物質を用いた突然変異の誘発などもある。しかし標的の遺伝子をピンポイントに破壊できるという点において相同組み換えによる置換破壊は優れている。

相同組み換えによる破壊を行うには遺伝子破壊コンストラクトが必要である。その形態には標的遺伝子の間にマーカー遺伝子を挟みこんだ線状 DNA 断片の遺伝子破壊カセットと、遺伝子破壊カセットをベクターに組み込んだ環状の遺伝子破壊ベクターとの2つがあり、いずれを用いた方法でも遺伝子破壊成功の報告がされている^{[15][17]}。そこで今回相同組み換えによる *E. aerogenes* の *nuoG* 破壊を行うべく、遺伝子破壊ベクターと、遺伝子破壊カセットの2種類の遺伝子破壊コンストラクトの作製を行い、それぞれ *E. aerogenes* への導入を試みた。

4-2-1 遺伝子破壊ベクターの作製および導入実験

遺伝子破壊ベクター作製の流れを Fig.4-1 に示した。マーカー遺伝子には pHSG398 のクロラムフェニコール耐性遺伝子(Cm^r)、ベクターには pBR322 を用いた。各操作の説明を次に述べる。

4-2-1-1 遺伝子破壊ベクターの作製

4-2-1-1-1 *E. aerogenes* のゲノム DNA の抽出と 16SrDNA の増幅による確認

抽出には YNUB 培地 40ml で 30°C、16 時間培養した菌体を使用し、DNeasy Tissue Kit (QIAGEN)を使用した。

また、ゲノム DNA が正しく抽出されていることを確認するために 16SrDNA のうち約 1,500bp の増幅を行った。鋳型として 3-2 で抽出したゲノム DNA、プライマーとして UNV27F と UNV1492R (16S rDNA の領域を増幅するためのプライマー) を用いた。反応後、増幅産物のサイズ確認をアガロースゲル電気泳動によって行った。

—(Supplement 3, 4, 5)

4-2-1-1-2 PCR による *nuoG* と *Cm^r* の増幅

E. aerogenes の *nuoG* の増幅には、鋳型として 4-2-1-1 で抽出した *E. aerogenes* のゲノム DNA、プライマーとして *nuoG_395-416f* と *nuoG_2110-2092r* を用いて *nuoG* 約 2,700pb 中の 1,700bp を増幅した。なお、このプライマーは制限酵素 *Sse8387I* の認識部位が DNA 配列のほぼ中央の一箇所に位置するように設計してある。

マーカー遺伝子 *Cm^r* は、鋳型として *pHSG398*、プライマーとして *Sse_Cmr_3-17f* と *Sse_Cmr_1145-1131r* を用いて約 1,100pb を増幅した。

反応後、各 PCR 増幅産物のサイズ確認をアガロースゲル電気泳動により行った。

—(Supplement 4, 5)

4-2-1-1-3 制限酵素処理による *nuoG* と *pBR322* の切断

4-2-2 で得られた *nuoG* の PCR 産物を制限酵素 *Sse8387 I* で、ベクターに使用する *pBR322* を制限酵素 *Pvu II* で処理した。

—(Supplement 6)

4-2-1-1-4 *Cm^r* PCR 産物と *nuoG* 制限酵素処理産物の平滑末端化

T4 DNA Polymerase(TaKaRa)を用いて 4-2-1-2 の *Cm^r* PCR 産物と 4-2-1-3 の *nuoG* 制限酵素処理産物の平滑末端処理を行った。

—(Supplement 7)

4-2-1-1-5 *pBR322* 制限酵素処理産物の脱リン酸化

BAPping Kit(TOYOBO)を用いて 4-2-1-3 の *pBR322* 制限酵素処理産物の脱リン酸化処理を行った。

—(Supplement 8)

4-2-1-1-6 サンプルのフェノール/クロロホルム抽出およびエタノール沈殿による精製

酵素の失活および DNA の精製の目的で、4-2-1-4 の平滑末端処理を施した *Cm^r*、*nuoG* と 4-2-1-5 の脱リン酸化処理を施した *pBR322* を混ぜ合わせてフェノール/クロロホルム抽出を 3 回繰り返した。その後エタノール沈殿を行い、サンプルを水に溶解させた。

—(Supplement 9,10)

4-2-1-1-7 ライゲーション反応による *nuoG*、*Cm^r*、pBR322 の連結

4-2-1-6 の *nuoG*、*Cm^r*、pBR322 混合液のライゲーションを行った。反応後、エタノール沈殿を行い、滅菌水 3 μ l に溶解した。

—(Supplement 10,11)

4-2-1-2 エレクトロポレーション法による *E. aerogenes* への遺伝子破壊ベクターの導入

4-2-1-2-1 コンピテントセルの作製

4-3 の遺伝子破壊カセットを導入するためにエレクトロポレーション用のコンピテントセルの作製を行った。

—(Supplement 12)

4-2-1-2-2 エレクトロポレーション

4-2-1-7 のライゲーション産物 3 μ l をコンピテントセルに加え、条件(1.8kV、1pulse)でエレクトロポレーションを行った。

—(Supplement 13)

4-2-1-3 破壊株の選別

4-2-1-3-1 クロラムフェニコール(*Cm*)入り寒天培地による選別

E. aerogenes の *Cm* に対する感受性試験を行ったところ、完全に自然耐性株が出現しなくなる濃度は 150 μ g/ml であった。(Fig.4-1) また、カセットに使用した *Cm^r* を持つプラスミド pHSG398 を *E. aerogenes* に導入した実験では、pHSG398 を取り込んだ形質転換株は *Cm* 濃度 150 μ g/ml の寒天培地上で生育することが確認されている。(Fig.4-2) つまり相同組み換えが起こった破壊株であれば *Cm* 濃度 150 μ g/ml の寒天培地上でも生育する可能性が高いと考えられる。そこで、*Cm* 耐性による破壊株の選別を試みた。

Cm 濃度 150 μ g/ml の寒天培地数枚にエレクトロポレーション後の培養液を 150 μ l ずつ塗布し、36 $^{\circ}$ C で 3 日間培養した。

4-2-1-4 形質転換株の相同組み換えの確認

4-2-1-3-1 で得られた *Cm* 耐性株は *Cm^r* を取り込んでいる可能性が高い。しかし今回の遺伝子破壊ベクター作製方法では目的のベクター以外にも様々な形の産物ができるとは期待しているものとは別の形で *Cm^r* が取り込まれていることも考え得る。そこで得られた *Cm* 耐性株についてゲノム DNA 抽出・PCR による *nuoG* の増幅を行い、*nuoG* のサイズから相同組み換えによる遺伝子破壊の有無を調べた。また、抽出したゲノム DNA を鋳型として *Cm^r* を増幅する PCR を行い、ゲノム中に *Cm^r* が取り込まれているかを確認した。

4-2-1-4-1 形質転換株のゲノム DNA 抽出

抽出には 4-2-1-3-1 で得られた Cm 耐性株を Cm 濃度 100 μ g/ml の LB 培地 5ml で 37 $^{\circ}$ C、6 時間培養した菌体を使用し、DNeasy Tissue Kit (QIAGEN)を用いて形質転換株のゲノム DNA 抽出を行った。

—(Supplement 3)

4-2-1-4-2 PCR による形質転換株の nuoG 増幅およびサイズの確認

鋳型として 4-2-1-4-1 で抽出した形質転換株のゲノム DNA、プライマーとして nuoG_395-416f と nuoG_1818-1838r を用いて nuoG を増幅した。反応後、増幅産物のサイズ確認をアガロースゲル電気泳動によって行った。

—(Supplement 4, 5)

4-2-1-4-3 PCR による形質転換株の Cm^r の増幅

鋳型として 4-2-1-4-1 で抽出した形質転換株のゲノム DNA、プライマーとして Sse_Cmr_3-17f と Sse_Cmr_1145-1131r を用いて Cm^r の増幅を行った。反応後、増幅産物の確認をアガロースゲル電気泳動によって行った。

—(Supplement 4, 5)

4-2-2 遺伝子破壊カセットの作製および導入実験

4-2-2-1 Fusion PCR 法^[18]による遺伝子破壊カセットの作製

以前、制限酵素処理・ライゲーション反応とワンステップの PCR を組み合わせて遺伝子破壊カセットの作製を試みたが非特異的な増幅が見られ良好な増幅が行われなかった。そこで Fig. 4-2 に示した流れで Fusion PCR 法によって *E. aerogenes* の nuoG 上流部分(約 900bp)と下流部分(1,000bp)の間にクロラムフェニコール耐性遺伝子(Cm^r)(約 1,200bp)を挟み込んだ、サイズ約 3,100bp の遺伝子破壊用カセットの作製を行った。

4-2-2-1-1 プライマーの設計

E. aerogenes の nuo 遺伝子の塩基配列データは DDBJ などの国際塩基配列データベースにはまだ登録されていなかった。そこで *E. aerogenes* の nuo 遺伝子の増幅にあたっては *E. aerogenes* とごく近い関係にあり、かつ全ゲノム DNA 配列が公開されている *E. coli* (K-12 株)の nuo 遺伝子の塩基配列データを用いた。更に DDBJ の相同性検索プログラム (BLAST) で検索して *E. coli* の nuo 遺伝子と相同性の高い *Shigella sonnei* と *Salmonella enterica subsp* の nuo 遺伝子の塩基配列データを取得し、保存性の高い箇所を選んでプライマーの設計を行った。*E. aerogenes* の nuoG 上流部分の約 900bp と下流部分の約 1,000bp、それぞれ *E. coli* の nuoG2,733pb 中 143~1,011bp と 1,423~2,460bp の位置に相当する範囲を増幅するプライマーを設計した。なお Fusion PCR によって間に挟み込むマーカー遺伝子と連結させるために、nuoG 上流の

reverse プライマーの 5' 末端にはマーカー遺伝子の forward プライマーと相同な配列を付加し、nuoG 下流の forward プライマーの 5' 末端にはマーカー遺伝子の reverse プライマーと相同な配列を付加した。設計したプライマーを nuoG-up_f、nuoG-up_r、nuoG-down_f、nuoG-down_r と名づけた。(詳細は TABLE 7-7)

マーカー遺伝子としては pHSG398 のクロラムフェニコール耐性遺伝子(Cm^r)を用いた。pHSG398 の 2,227bp の配列のうち、2,083~1,031bp の約 1,200bp の範囲を増幅するプライマーを設計した。設計したプライマーを Cmr_f、Cmr_r と名づけた。(詳細は TABLE 7-7)

プライマー設計の際の注意点は Supplement 14 に示した。

-(Supplement 14)

4-2-2-1-2 PCR による nuoG の上流・下流部分と Cm^r の増幅

nuoG の上流・下流の増幅には鋳型として 2-2 で抽出した *E. aerogenes* のゲノム DNA、プライマーとして上流には nuoG-up_f と nuoG-up_r、下流には nuoG-down_f と nuoG-down_r を用いた。Cm^r の増幅には鋳型として pHSG398、プライマーとして Cmr_f と Cmr_r を用いて行った。

各 PCR 増幅産物のサイズ確認をアガロースゲル電気泳動により行った。

-(Supplement 4, 5)

4-2-2-1-3 Fusion PCR による遺伝子破壊カセットの増幅

まず nuoG 上流と Cm^r、Cm^r と nuoG 下流の Fusion PCR を行い、カセットの上流(約 2,100bp) と下流(約 2,200bp) の断片を作製した。カセット上流の増幅には鋳型として nuoG 上流と Cm^r の DNA 断片、プライマーとして nuoG-up_f と Cmr_r を用いた。カセット下流の増幅には鋳型として Cm^r と nuoG 下流の DNA 断片、プライマーとして Cmr_f と nuoG-down_r を用いた。このとき鋳型として使用した nuoG 上流・下流、Cm^r の増幅産物はアガロースゲル電気泳動により DNA 断片の分離を行い、それぞれ目的の位置のバンドをゲルから切り出し精製した物を使用した。

次いで遺伝子破壊カセット全長の増幅を行った。鋳型としてカセット上流・下流の各 PCR 産物、プライマーとして nuoG-up_f と nuoG-down_r を用いた。PCR 増幅産物のサイズ確認をアガロースゲル電気泳動により行った。

-(Supplement 4, 5, 15)

4-2-2-2 エレクトロポレーション法による *E. aerogenes* への遺伝子破壊カセットの導入

4-2-2-2-1 コンピテントセルの作製

4-3 の遺伝子破壊カセットを導入するためにエレクトロポレーション用のコンピテントセルの作製を行った。

–(Supplement 12)

4-2-2-2 エレクトロポレーション

遺伝子破壊カセットを増幅させた PCR 産物 150 μ l をエタノール沈殿によって濃縮し 1 \times TE 2 μ l に溶解した DNA 溶液をコンピテントセルに加え、条件(1.8kV、1pulse)でエレクトロポレーションを行った。

–(Supplement 10,13)

4-2-2-3 破壊株の選別

4-2-2-3-1 クロラムフェニコール入り寒天培地による選別

4-2-1-3-1 クロラムフェニコール(Cm)入り寒天培地による選別と同じ考えに基づき、Cm 耐性による破壊株の選別を試みた。

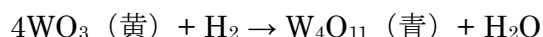
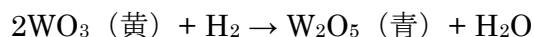
Cm 濃度 150 μ g/ml の寒天培地数枚にエレクトロポレーション後の培養液を 100~200 μ l ずつ塗布した。なお、エレクトロポレーション後の塗布後の菌体は電気ショックで弱っているので、培養温度はやや低めの 30 $^{\circ}$ C とした。

4-2-2-3-2 酸化タングステン(VI)による選別

破壊株は Cm^r を nuoG が中断された形でゲノム DNA 上に持つので、プラスミドの形で持つ場合と比べて Cm 耐性が低い可能性がある。なぜなら、プラスミドはゲノム DNA とは独立した複製開始点を持ち、ゲノム DNA の動向にかかわらず、複製・発現がなされるからである。しかも pHSG398 は多コピー型のプラスミドなので、Cm^r の発現性も高い。つまり破壊株は Cm 濃度 150 μ g/ml では生育できなくても、もっと低い濃度であれば生育できるということも考えられる。そこで下記のような性質を持つ酸化タングステン(VI)を利用して水素発生能の違いによる破壊株の選別を試みた。

エレクトロポレーション後の菌体を SOC 培地中にて 30 $^{\circ}$ C で一晩静置培養した後、Cm 濃度 50 μ g/ml の寒天培地に塗布し、30 $^{\circ}$ C で 2~3 日間培養した。その後コロニーのできた寒天培地一面に酸化タングステン(VI)をまぶし、37 $^{\circ}$ C で 1~3 日程度培養した後、判定を行った。

酸化タングステン(VI) WO₃ はレモン黄色結晶性粉末で、水素と反応して青色の W₂O₅ あるいは W₄O₁₁、次いで褐色の酸化タングステン(IV)、更に金属となる性質を持つ^[19]。



4-2-2-3-3 コロニーPCR^[20]による破壊株の選別

コロニーPCR とは、PCR 反応液にテンプレートとしてコロニーを直接加える方法であり、4-2-1-4 相同組み換えの確認のように抽出・精製した DNA をテンプレートと

する場合と比べて非常に簡便な方法である。破壊株は *nuoG* と遺伝子破壊カセットが入れ替わり、*nuoG* がサイズアップしている。そこで、コロニーPCR によって *nuoG* の増幅を行い、親株の *nuoG* のサイズと比べることで破壊株の選別を試みた。

まず 4-2-4-2 の酸化タングステンによる破壊株の選別と同じ考えに基づき、エレクトロポレーション後の培養液を Cm 濃度 50 μ g/ml の寒天培地に塗布し、30 $^{\circ}$ C で数日間培養した。できた各コロニーについて *nuoG* 増幅用のプライマーを用いてコロニー PCR を行った。その後 PCR 産物をアガロースゲル電気泳動に供し、サイズの確認を行った。

–(Supplement 4,5)

4-2-3 相同領域の長さの長い遺伝子破壊カセットの作製

4-2-3-1 Fusion PCR 法による相同領域の長さの長い遺伝子破壊カセットの作製

4-2-2 遺伝子破壊カセットの作製および導入実験で相同組み換えによる遺伝子破壊に至らなかったのは、遺伝子破壊カセットの相同領域の長さが短く、組み換え効率が低いためと考えた。そこで Fig. 4-3 に示した流れで Fusion PCR 法によって *E. aerogenes* の *nuoE*~*G* 部分(約 2,200bp)と *nuoG*~*J* 部分(2,500bp)の間にクロラムフェニコール耐性遺伝子(*Cm^r*)(約 1,100bp)を挟み込んだ、サイズ約 5,800bp の遺伝子破壊用カセットの作製を試みた。

4-2-3-1-1 プライマーの設計

4-2-2-1-1 と同様の方法でプライマーの設計を行った。*E. aerogenes* の *nuoE*~*G* 部分の約 2,200bp と *nuoG*~*J* 部分の約 2,500bp、それぞれ *E. coli* の *nuoE* の 40bp~*nuoG* の 362bp と *nuoG* の 2,011~*nuoJ* の 261bp の位置に相当する範囲を増幅するプライマーを設計した。なお Fusion PCR によって間に挟み込むマーカー遺伝子と連結させるために、マーカー遺伝子の forward プライマーの 5' 末端には *nuoE*~*G* の reverse プライマーと相同な配列を付加し、マーカー遺伝子の reverse プライマーの 5' 末端には *nuoG*~*J* の forward プライマーと相同な配列を付加した。設計したプライマーを *nuoE*-*G*_40-60f、*nuoE*-*G*_r、*nuoG*-*J*_f、*nuoG*-*J*_r と名づけた。(詳細は TABLE 7-7)

マーカー遺伝子としては pHSG398 のクロラムフェニコール耐性遺伝子(*Cm^r*)を用いた。pHSG398 の 2,227bp の配列のうち、3~1,145bp の約 1,200bp の範囲を増幅するプライマーを設計した。設計したプライマーを *Cm^r*-fusion_3-17f、*Cm^r*-fusion_1145-1131r と名づけた。(詳細は TABLE 7-7)

–(Supplement 14)

4-2-3-1-2 PCR による *nuoE*~*G*・*nuoG*~*J* 部分と *Cm^r* の増幅

nuoE~*G*・*nuoG*~*J* 部分の増幅には鋳型として 2-2 で抽出した *E. aerogenes* のゲノム DNA、プライマーとして *nuoE*~*G* には *nuoE*-*G*_40-60f と *nuoE*-*G*_r、下流には

nuoG-J_f と nuoG-J_r を用いた。Cm^rの増幅には鋳型として pHSG398、プライマーとして Cmr-fusion_3-17f と Cmr-fusion_1145-1131r を用いて行った。

各 PCR 増幅産物のサイズ確認をアガロースゲル電気泳動により行った。

—(Supplement 4, 5)

4-2-3-1-3 Fusion PCR による遺伝子破壊カセットの増幅

まず nuoE~G と Cm^r、Cm^r と nuoG~J の Fusion PCR を行い、カセットの上流（約 3,300bp）と下流（約 3,600bp）の断片を作製した。カセット上流の増幅には鋳型として nuoE~G と Cm^r の DNA 断片、プライマーとして nuoE-G_40-60f と Cmr-fusion_1145-1131r を用いた。カセット下流の増幅には鋳型として Cm^r と nuoG~J の DNA 断片、プライマーとして Cmr-fusion_3-17f と nuoG-J_r を用いた。このとき鋳型として使用した nuoE~G・nuoG~J、Cm^r の増幅産物はアガロースゲル電気泳動により DNA 断片の分離を行い、それぞれ目的の位置のバンドをゲルから切り出し精製した物を使用した。

次いで遺伝子破壊カセット全長の増幅を行った。鋳型としてカセット上流・下流の各 PCR 産物、プライマーとして nuoE-G_40-60f と nuoG-J_r を用いた。PCR 増幅産物のサイズ確認をアガロースゲル電気泳動により行った。

—(Supplement 4, 5, 15)

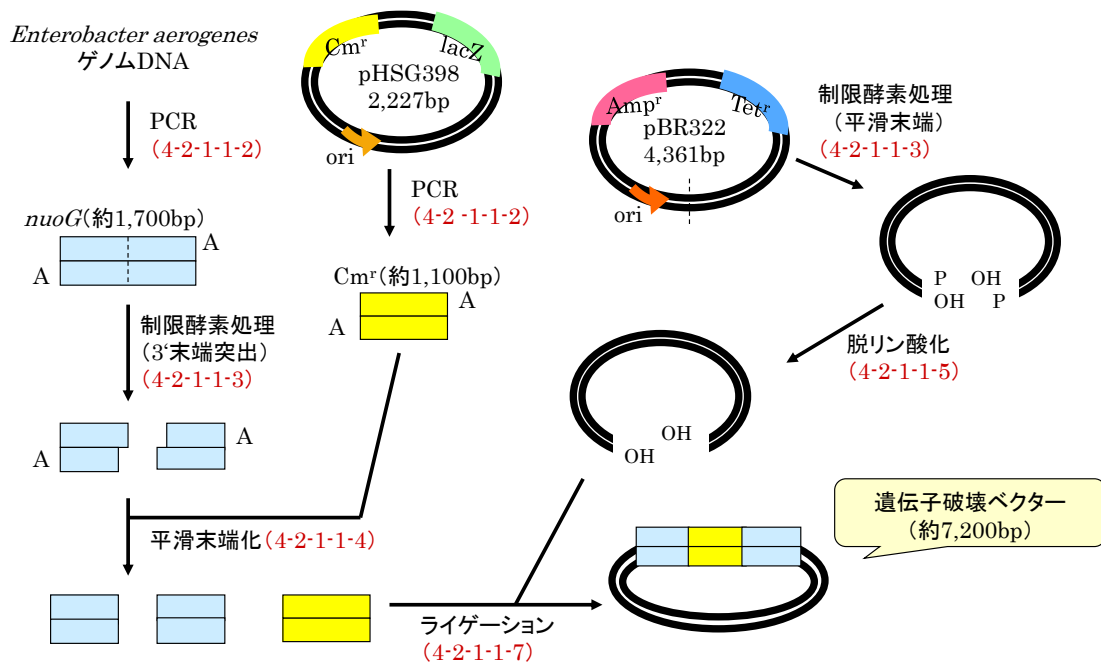


Fig. 4-1 遺伝子破壊ベクター作製の流れ

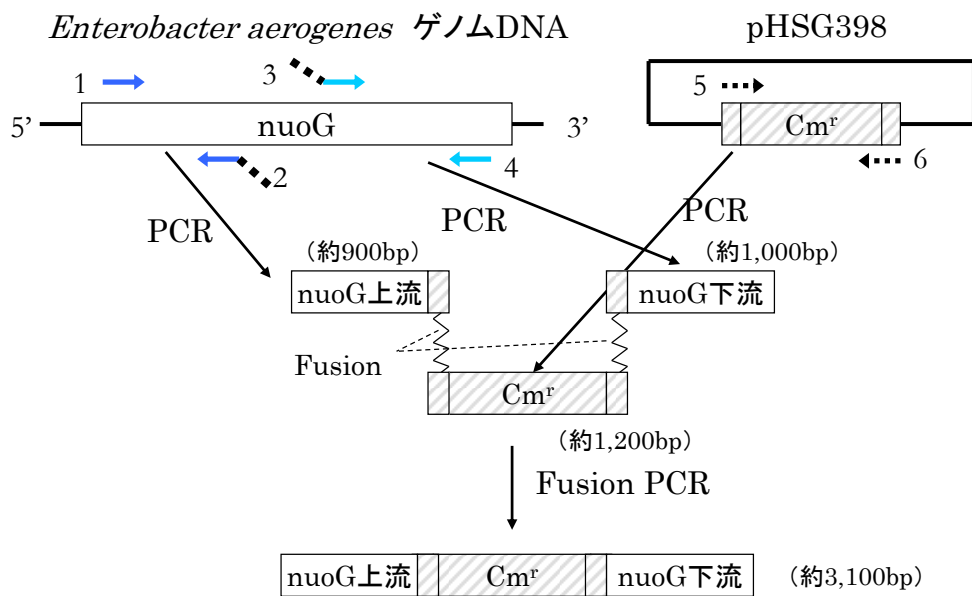


Fig. 4-2 Fusion PCR法による
遺伝子破壊カセット作製の流れ

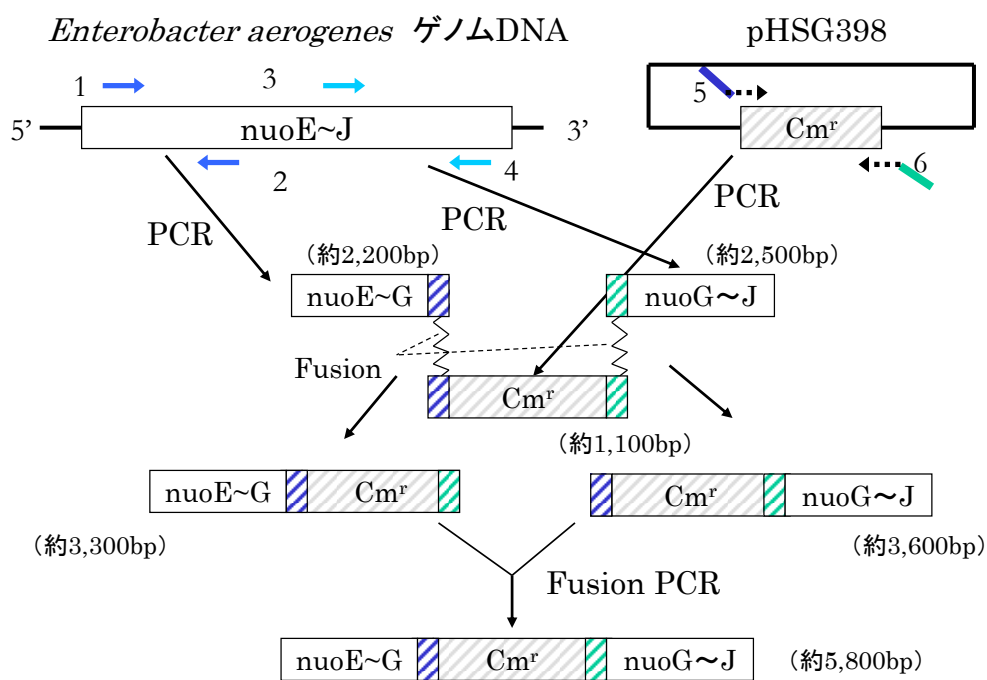


Fig. 4-3 Fusion PCR法による
 相同領域の長さの長い遺伝子破壊カセット作製の流れ

第5章 実験結果と考察

5-1 遺伝子破壊ベクターを用いた、相同組み換えによる *E. aerogenes* の *nuoG* 破壊実験

5-1-1 遺伝子破壊ベクターの作製

5-1-1-1 ゲノム DNA 抽出と 16SrDNA の増幅

PCR 反応後、PCR 産物を電気泳動に供した結果を Fig.5-1 に示す。電気泳動の結果より約 1,500bp の目的のサイズの増幅断片が得られた。以上の結果より、ゲノム DNA 抽出および 16SrDNA の増幅共に正しく行われた。

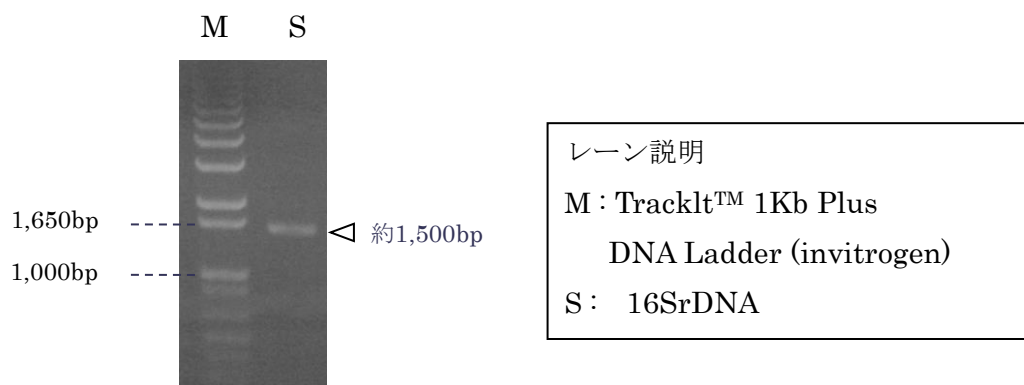


Fig.5-1 PCR 産物の電気泳動結果

5-1-1-2 PCR による *nuoG* と *Cm^r* の増幅

反応後の PCR 産物を電気泳動に供した結果を Fig.5-2 に示す。電気泳動の結果より *nuoG* は約 1,700bp、*Cm^r* は約 1,100bp のサイズの増幅断片が得られた。以上の結果より、それぞれの DNA 断片の増幅は正しく行われたことが確認された。

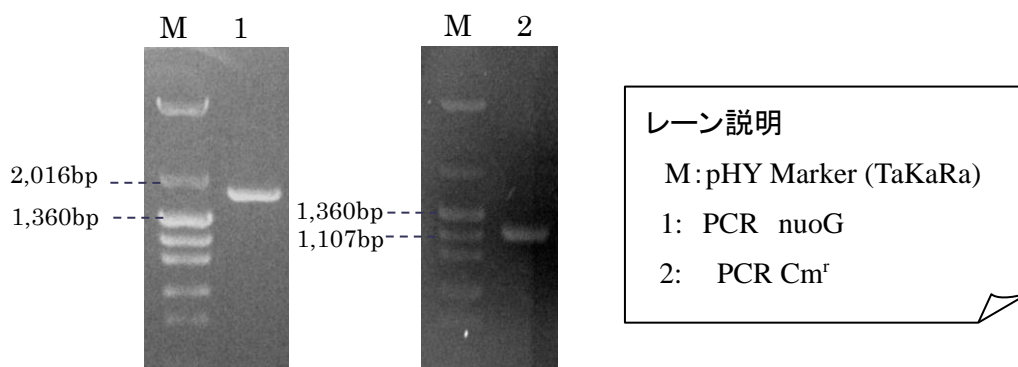


Fig.5-2 PCR 産物の電気泳動結果

5-1-1-3 制限酵素処理による *nuoG* と pBR322 の切断

制限酵素処理後の *nuoG* と pBR322 を電気泳動に供した結果、*nuoG* は中央付近で一箇所切断され約 850bp の位置に、pBR322 は一箇所切断されて線状になり約 4,360bp

の位置にバンドが確認された。(写真データなし) によって各操作は正しく行われたと考えた。

5-1-2 エレクトロポレーション法による *E. aerogenes* への遺伝子破壊ベクターの導入および破壊株の選別

5-1-2-1 クロラムフェニコール(Cm)入り寒天培地による選別

エレクトロポレーションおよび Cm 濃度 150 μ g/ml の寒天培地への塗布による破壊株の選別を行った結果、培養 3 日後には塗布した 7 枚の内 6 枚に 2~6 個のコロニーが形成された。(Fig. 5-3) によって Cm 耐性を持つ形質転換株が得られたと考えた。



Fig. 5-3 培養 3 日後の寒天培地 (Cm 濃度 150 μ g/ml)

5-1-3 形質転換株の相同組み換えの確認

5-1-3-1 PCR による形質転換株の *nuoG* 増幅およびサイズの確認

反応後の PCR 産物を電気泳動に供した結果を Fig.5-4 に示す。電気泳動の結果より形質転換株の *nuoG* のサイズアップは確認されなかった。以上の結果より、形質転換株の *nuoG* はカセットと相同組み換えを起こしていないことが確認された。

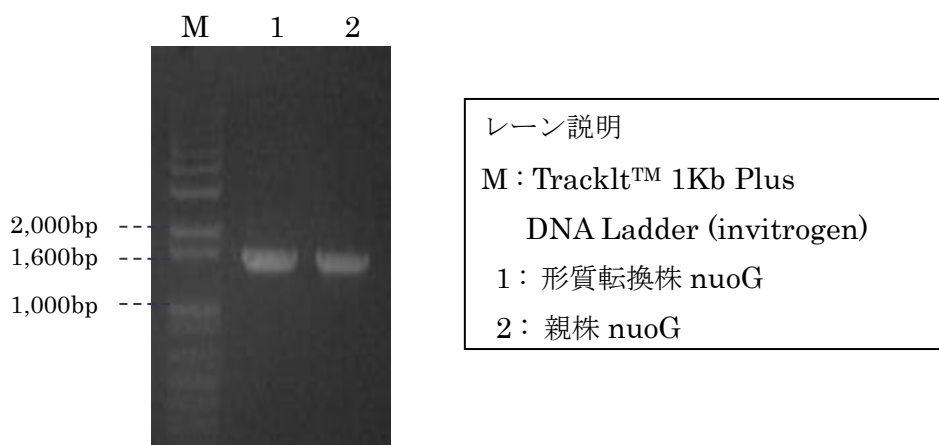


Fig. 5-4 PCR 産物の電気泳動結果

5-1-3-2 PCR による形質転換株の Cm^r の増幅

反応後の PCR 産物を電気泳動に供した結果を Fig.5-5 に示す。形質転換株のゲノム DNA をテンプレートとした PCR では Cm^r が増幅された。よって形質転換株のゲノム DNA 中には Cm^r が取り込まれていることが確認された。

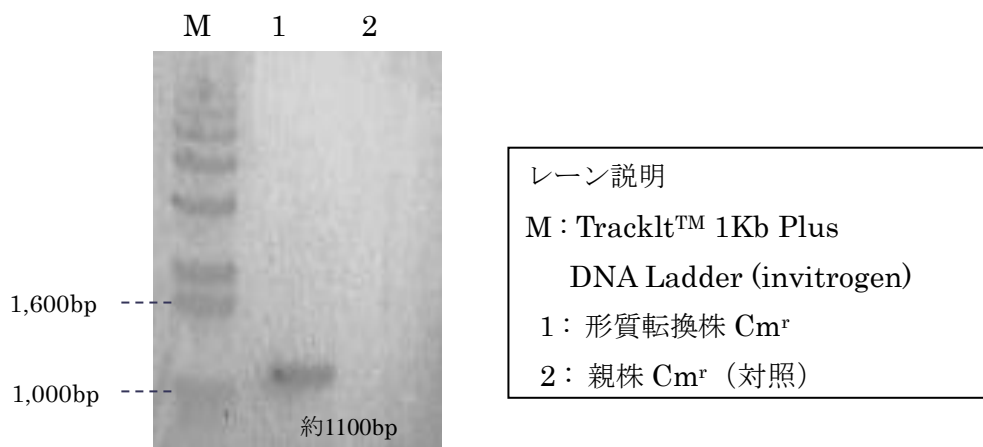


Fig. 5-5 PCR 産物の電気泳動結果

以上の結果より、今回の遺伝子破壊ベクターの導入では Cm^r はゲノム DNA 中の何らかの位置に取り込まれたものの、形質転換株の *nuoG* は破壊されていないことが確認された。今回行った作製方法は標的遺伝子、マーカー遺伝子、ベクターをそれぞれ連結できる状態に調整した後は一括で反応させることができ、簡便であるという特徴を持つ。しかし、各断片が連結する向きや順番がランダムであり、ライゲーション産物中に含まれる目的の遺伝子破壊ベクターの割合は極めて少なかったと考えられる。今後、遺伝子破壊ベクターを作製するにあたっては、より確実な方法を用いる必要がある。

また遺伝子破壊には至らなかったものの、今回の実験より、PCR によって増幅した Cm^r がゲノム中で機能することが確認された。

5-2 遺伝子破壊カセットを用いた、相同組み換えによる *E. aerogenes* の *nuoG* 破壊実験

5-2-1 PCR による *nuoG* の上流・下流部分と Cm^r の増幅

PCR 反応後、PCR 産物を電気泳動に供した結果を Fig5-6 に示す。電気泳動の結果より *nuoG* 上流は約 900bp、下流は約 1,000bp、 Cm^r は約 1,200bp のサイズの増幅断片が得られた。以上の結果より、それぞれの DNA 断片の増幅は正しく行われたことが確認された。

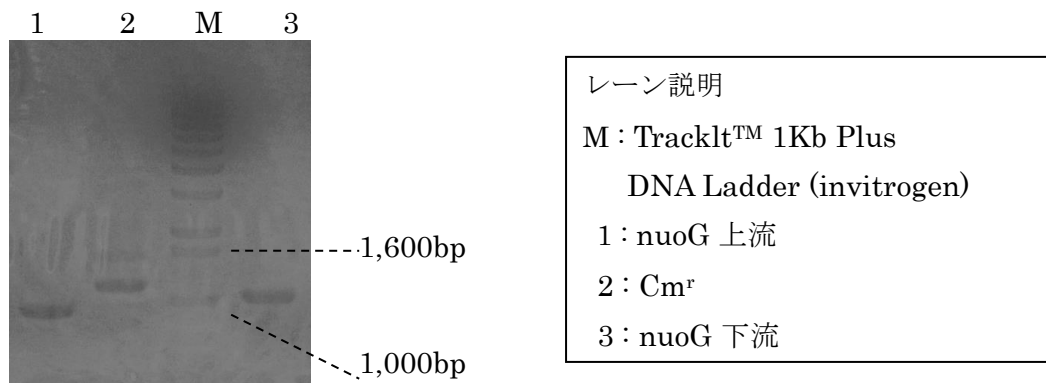


Fig. 5-6 PCR 産物の電気泳動結果

5-2-2 Fusion PCR による遺伝子破壊カセットの増幅

反応後、カセット上流と下流の PCR 産物を電気泳動に供した結果を Fig. 5-7 に、遺伝子破壊カセットの結果を Fig. 5-8 に示す。電気泳動の結果よりカセット上流は約 2,100bp、下流は約 2,200bp、遺伝子破壊カセットは約 3,100bp のサイズの増幅断片が得られた。以上の結果より、それぞれの DNA 断片の増幅は正しく行われたことが確認された。

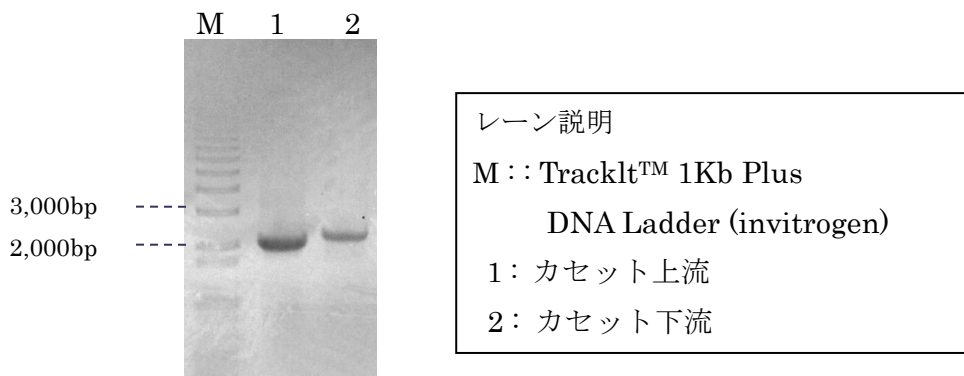


Fig. 5-7 PCR 産物の電気泳動結果

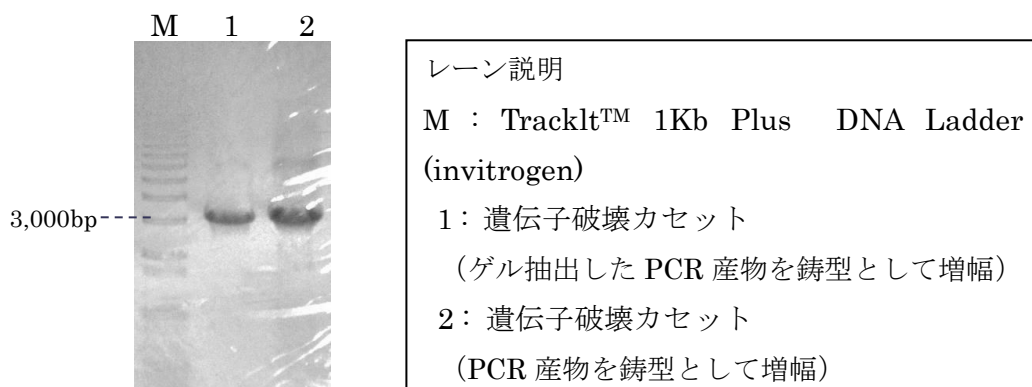


Fig. 5-8 PCR 産物の電気泳動結果

5-2-3 破壊株の選別

5-2-3-1 Cm 入り寒天培地による選別

エレクトロポレーションおよび Cm 入り寒天培地への塗布による破壊株の選別を行ったが、Cm 濃度 150 μ g/ml の寒天培地上では一週間を経ても菌体の増殖は確認されなかった。(Fig. 5-9) よって今回の実験では遺伝子破壊カセットと標的遺伝子の相同組み換えは起こっておらず、遺伝子破壊には至らなかったと考えられる。



Fig. 5-9 一週間培養後の寒天培地 (Cm 濃度 150 μ g/ml)

5-2-3-2 酸化タングステン(VI)による選別

Fig.5-10 はエレクトロポレーションを行った菌体を塗布し、30 $^{\circ}$ Cで3日間培養した Cm 濃度 50 μ g/ml の寒天培地である。Fig.5-11 はエレクトロポレーションを行っていないコンピテントセル(親株)を LB 培地 1ml に混ぜて Cm 濃度 50 μ g/ml の寒天培地に塗布し、30 $^{\circ}$ Cで3日間培養したもの(別の日に行った実験)で、Cm 濃度 50 μ g/ml でのどの程度自然耐性株が得られるのかの参考にした。Fig.5-12 は酸化タングステン(VI)をまぶし 37 $^{\circ}$ Cで培養を行った寒天培地の1日後、Fig.5-13 は3日後の写真である。

Fig.5-10 が Fig.5-11 よりもコロニーの数が多いのは、必ずしも破壊株が得られたからではなく、一晚抗生物質抜き培地で培養したため細菌が増殖したことが原因であると考えられる。酸化タングステン(VI)塗布1日後にはコロニーは青くなり、日が経つと徐々に青色が濃くなることがわかった。しかし、期待していたほどコロニー間の色の違いはなく、またその違いも菌体の生育状況によるもので、水素発生能の違いによるものとは言い難い。酸化タングステン(VI)塗布によって水素発生の有無を確認することは可能だが、水素発生能の違いによるスクリーニングに利用するには更なる検討が必要である。

Fig.5-10 エレクトロポレーション
3日後

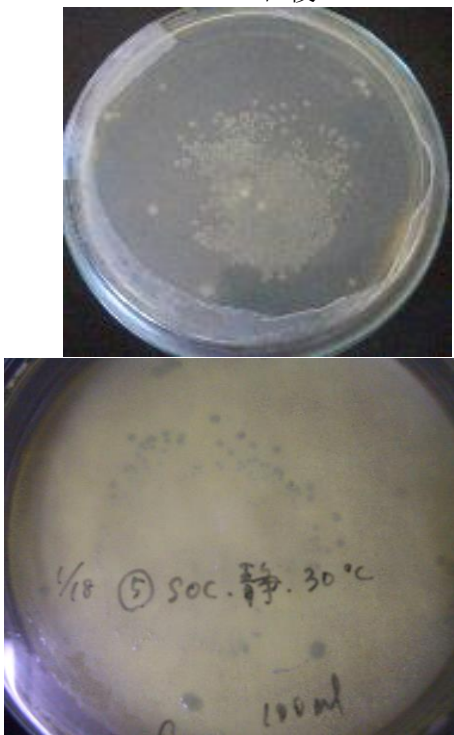


Fig.5-12 酸化タングステン(VI)
塗布 1 日後

Fig.5-11 対照 (Cm 濃度 50 μ g/ml の
寒天培地に親株を塗布)

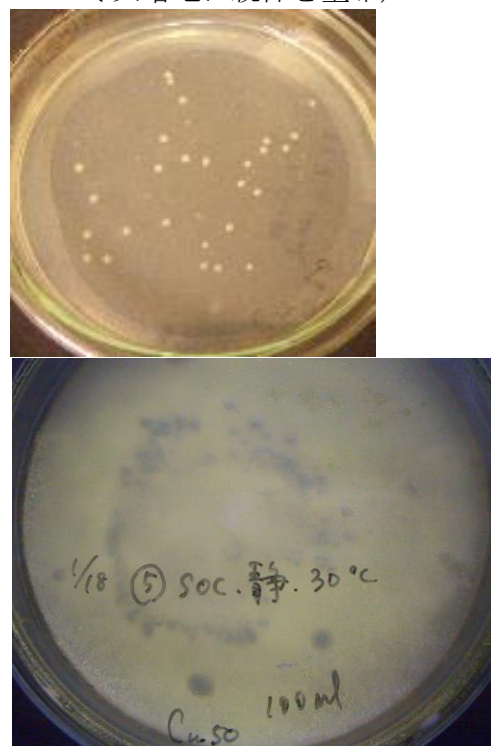


Fig.5-13 酸化タングステン(VI)
塗布 3 日後

5-2-3-3 コロニーPCR による破壊株の選別

コロニーPCR 産物を 0.9%アガロースゲル電気泳動に供した結果を Fig.5-14 に示す。いずれのサンプルも親株と比べてサイズアップは見られなかった。よって今回のエレクトロポレーションでは破壊株は得られなかったと考えた。

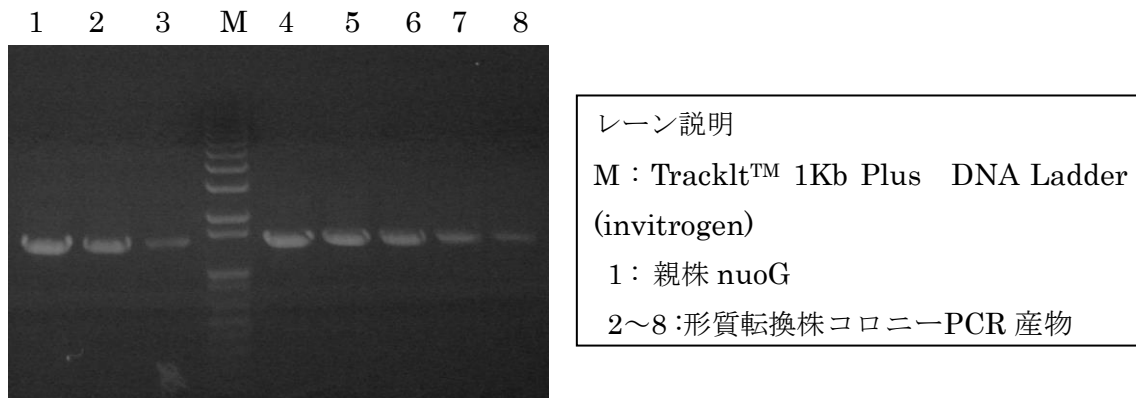


Fig. 5-14 コロニーPCR 産物の電気泳動結果

5-3 相同領域の長さの長い遺伝子破壊カセットの作製

5-3-1 PCR による nuoE~G・nuoG~J 部分と Cm^r の増幅

PCR 反応後、PCR 産物を電気泳動に供した結果を Fig5-15 に示す。電気泳動の結果より nuoE~G は約 2,200bp、nuoG~J は約 2,500bp、Cm^r は約 1,100bp のサイズの増幅断片が得られた。以上の結果より、それぞれの DNA 断片の増幅は正しく行われたことが確認された。

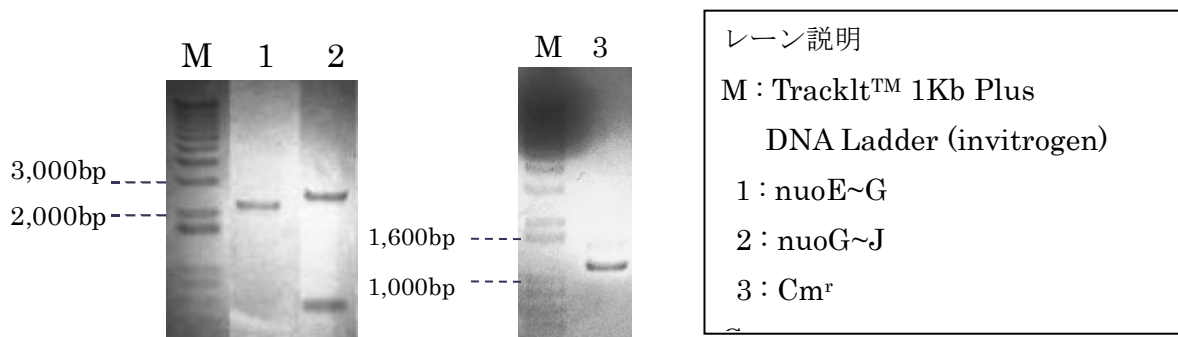


Fig. 5-15 PCR 産物の電気泳動結果

5-3-2 Fusion PCR による遺伝子破壊カセットの増幅

反応後、カセット上流と下流および遺伝子破壊カセットの Fusion PCR の結果を Fig. 5-16 に示す。電気泳動の結果よりカセット上流は約 3,300bp、下流は約 3,600bp の増幅断片が得られた。遺伝子破壊カセットはスメアバンドとなっており、良好な増幅は行えなかった。その原因として、PCR 反応による DNA の増幅は 3,000bp 程度までは良好に行われるが、今回のように 6,000bp 近い大きなサイズの増幅には適していないということが考えられる。ただし、伸長時間などの条件を検討することで改善される可能性もある。

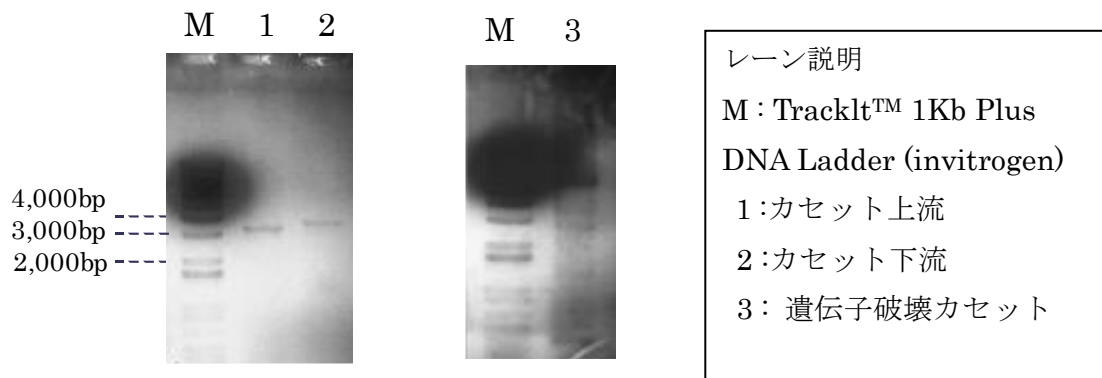


Fig. 5-16 Fusion PCR 産物の電気泳動結果

第6章 結言

実験から以下のことが言える。

- 遺伝子破壊ベクターの作製およびエレクトロポレーションによる *E. aerogenes* への導入の結果、今回の方法では破壊株は得られなかった
- PCR によって増幅した Cm^r がゲノム中で機能することが確認された
- Fusion PCR 法によって遺伝子破壊用カセットを作製することができた
- 遺伝子破壊カセットの作製およびエレクトロポレーションによる *E. aerogenes* への導入の結果、今回の方法では破壊株は得られなかった
- 酸化タングステン(VI)によって細菌からの水素発生の有無を確認することはできたが、水素発生能の違いによるスクリーニングに利用するには更なる検討が必要である

破壊株が得られなかった原因の一つに遺伝子破壊カセットが線状であるために相同組み換え効率が低いことも考えられる。今後は遺伝子破壊カセットをベクターに組み込む方法で遺伝子破壊ベクターを作製し、導入実験も試みる。

また、実際に相同組み換えが起こっているのに、破壊株が生育できていないという可能性もある。よってエレクトロポレーション後の培養方法や、スクリーニング用の培地の種類等を検討し、破壊株取得を目指す。

第7章 Supplements

Supplement 1 使用培地

1. YNUB 培地

TABLE 7-1 YNUB 培地組成

	容量 (g/L-water)
D(+)-Glucose (Wako)	15
Casamino acids (NIHON SEIYAKU)	5
(NH ₄) ₂ SO ₄ (JUNSEI)	2
MgSO ₄ ·7H ₂ O (JUNSEI)	0.2
Sodium citrate tribasic 2H ₂ O (JUNSEI)	1
Na ₂ HPO ₄ ·12H ₂ O (Wako)	14
KH ₂ PO ₄ (Wako)	6

2. Lurea-Bertani(LB)培地

TABLE 7-2 LB 培地組成

	容 量 (g/L-water)
Polypepton S (NIHON SEIYAKU) ※ ¹	10
Dried Yeast Extract D-3 (NIHON SEIYAKU) ※ ²	5
NaCl (JUNSEI)	10

※ 1 Tryptone, Bacto の代わりに使用

※ 2 Yeast extract, Bacto の代わりに使用

3. SOC 嫌気培地

TABLE 7-3 SOC 嫌気培地組成

	容量 (L-water)
Polypepton S (NIHON SEIYAKU) ※ ¹	20g
Dried Yeast Extract D-3 (NIHON SEIYAKU) ※ ²	5g
	0.5g
NaCl (JUNSEI)	10ml
250mM KCl (JUNSEI)	

以上の組成をオートクレーブした後、2M MgCl₂ 1ml、1M ブドウ糖液を無菌的に追加した。250mM KCl、2M MgCl₂は調整後オートクレーブ滅菌したもの、1M ブドウ糖液はポアサイズ 0.2um のメンブレンフィルターで濾過滅菌したものを使用した。な

おコンタミしていないことを確認するために 30℃で一晩放置し、白濁しないことを確認した。

4. YNU 嫌気培地

TABLE 7-4 YNU 嫌気培地組成

	容量 (g/L-water)
Casamino acids (NIHON SEIYAKU)	10
Dried Yeast Extract S (NIHON SEIYAKU)	10
L-Cysteine Hydrochloride Monohydrate (JUNSEI)	0.3
Thioglycolic acid (JUNSEI)	0.3
D(+)-Glucose (Wako)	5

5. ABCM 半流動培地

TABLE 7-5 ABCM 半流動培地組成

	容量 (g/L-water)
ABCM SEMISOLID AGAR (Eiken)	48

6. 寒天培地

TABLE 7-6 寒天培地組成

	容量 (g/L-water)
D(+)-Glucose (Wako)	5
Sodium citrate tribasic 2H ₂ O (JUNSEI)	1
NaCl (JUNSEI)	5
寒天 (JUNSEI)	15
Casamino acids (NIHON SEIYAKU)	20

※ 抗生物質添加が必要な時は培地温度が 60℃程度に冷めてから無菌的に加えた

Supplement 2 プラスミドおよびプライマー

TABLE 7-7 使用したプラスミドの一覧

プラスミド名	特徴	source
pHSG398	クロラムフェニコール耐性、lacZ 遺伝子	TaKaRa
pBR322	アンピシリン耐性、テトラサイクリン耐性	TaKaRa

TABLE 7-8 使用したプライマーの一覧

プライマー名	配列(5'→3')	向き
UNV27F	AGAGTTTGATCMTGGCTCAG	Forward
UNV1492R	GGCTACCTTGTTACGACTT	Reverse
nuoG_395-416f	CCGGTAACCTGGTTGAAGTCTG	Forward
nuoG_1818-1838r	GCATCGATGACGTGGTCCAAC	Reverse
nuoG_2110-2092r	TCCAGGCTTGTGGGGAGTT	Reverse
Sse_Cmr_3-17f	TATATCCTGCAGGCTGGTAGCGGTGGTT	Forward
Sse_Cmr_1145-1131r	TAAAACCTGCAGGCGGGAAACCTGTCGT	Reverse
Cmr_f	GTAGCTCTTGATCCGGCAA	Forward
Cmr_r	AGTCGGGAAACCTGTTCGTG	Reverse
nuoG-up_f	GCCAGTGTGCGGTGAAGCAA	Forward
nuoG-up_r	<u>TTGCCGGATCAAGAGCTAC</u> *TTCGCTACCGACCAGCTC	Reverse
nuoG-down_f	<u>CACGACAGGTTTCCCGACT</u> *GATGGCCTGAGCCATGAC	Forward
nuoG-down_r	TCGCTGCCAAACAGGTG	Reverse
Cmr-fusion_3-17f	<u>TGCCACCTGCTGGATATGACGGTGGTAGCGGTGGTT</u>	Forward
Cmr-fusion_1145-1131r	<u>GCATCGATGACGTGGTCCAACGGGAAACCTGTCGTG</u>	Reverse
nuoE-G_40-60f	CTGAGTGCGGCAGAGCGTGAA	Forward
nuoE-G_r	CCGTCATATCCAGCAGGTGGCA	Reverse
nuoG-J_f	GTTGGACCACGTCATCGATGC	Forward
nuoG-J_r	CCACTGGCGTTCCTGTTTCGAT	Reverse

下線* : Fusion PCR を行うために付加した配列

Supplement 3 ゲノム DNA の抽出

Materials

DNeasy Tissue Kit (QIAGEN)

YNUB 培地

99.5%エタノール(JUNSEI)

Protocols

1. 菌体を植え継いだプレートから単一コロニーをとって、40ml の YNUB 培地に植菌し、28°Cで一晩培養した。
2. 前培養液 1ml を 1.5ml エッペンチューブに入れ、9,000rpm×10min で遠心分離し、菌体を回収した。
3. 上澄みを除去し、Buffer ATL 180μl を加えた。

4. proteinase K 20 μ l を加えボルテックスし、55°C で時々ボルテックスしながら 1~3h インキュベートした。
5. 15s ボルテックスし、Buffer AL 200 μ l を加えボルテックスしてから、70°C で 10min インキュベートした。
6. ethanol(%) 200 μ l を加えボルテックスした。
7. 2ml collection tube に DNeasy Mini spin column をセットしたものに 6 の混和物を移して 8,000rpm \times 1min で遠心分離した。
8. 2ml collection tube とフォロースルー液を捨て DNeasy Mini spin column を新しい 2ml collection tube にセットし、Buffer AW1 500 μ l を加えて 8,000rpm \times 1min で遠心分離した。
9. 2ml collection tube とフォロースルー液を捨て DNeasy Mini spin column を新しい 2ml collection tube にセットし、Buffer AW2 500 μ l を加えて DNeasy membrane が乾くよう 14,000rpm \times 3min で遠心分離した。
10. 2ml collection tube とフォロースルー液を捨て DNeasy Mini spin column を新しい 1.5ml エッペンチューブにセットした。DNA の溶出のために DNeasy membrane 上に Buffer AE 200 μ l を加え、室温で 1min インキュベートし 8,000rpm \times 1min で遠心分離した。(ステップ 10 の操作は必要に応じてもう 1 度繰り返した。)

Supplement 4 PCR

Materials

TaKaRa Ex TaqTM (TAKARA)

10 \times Ex TaqTM Buffer (TAKARA)

dNTP Mixture(2.5mM each) (TAKARA)

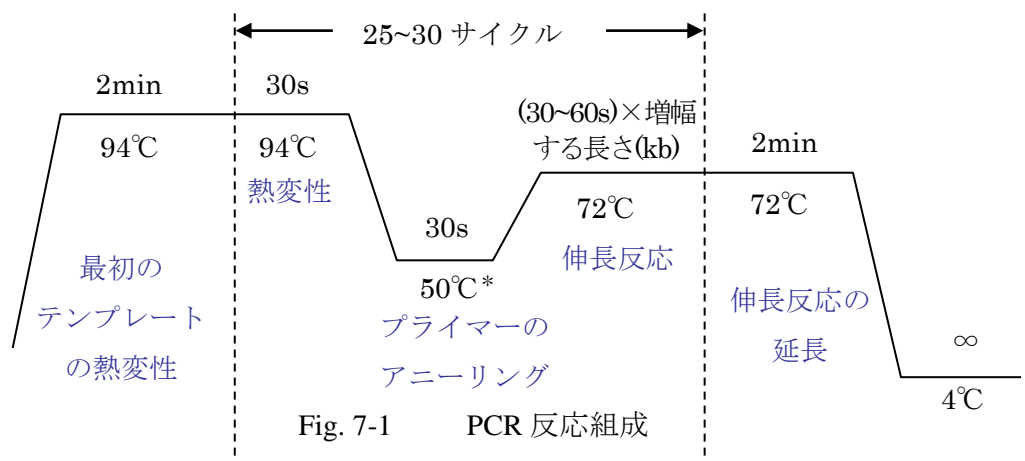
Protocols

PCR 反応には TAKARA PCR Thermal Cycler Dice (TAKARA) を使用した。PCR 反応を行う際の組成を TABLE 7-8 に示す。ただしテンプレート量やプライマー量は必要に応じて変更した。反応例は Fig. 7-1 に示す。72°C の伸長時間は 1 kbp の DNA 断片を増幅するのに 0.5~1 min で行い、アニーリング温度はプライマーの T_m 値を基にして随時変更した。

TABLE 7-9 PCR 反応組成

	容量 (100 μ l 中)
テンプレート	<1 μ g
10 \times Ex Taq TM Buffer	10 μ l
dNTP Mixture	8 μ l

TaKaRa Ex Taq™	0.5μl
Primer 1 (50μM)	1μl
Primer 2 (50 μM)	1μl
滅菌水	Up to 100μl



Supplement 5 アガロース電気泳動法

Materials

- 50×TAE buffer
- Agarose-I (Dojin) もしくは (SeaKem GTG Agarose)
- 6×Loading buffer (TAKARA)
- TrackIt™ 1Kb Plus DNA Ladder (invitrogen)
- λ -EcoT14 I digest (TAKARA)
- pHY Marker (TAKARA)
- Ethidium Bromide Solution, 0.625mg/ml concentration (CLP) もしくは 50×Mupid-Blue (ADVANCE)

Protocols

50×TAE を 50 倍希釈し、1×TAE Buffer を調整した。終濃度 0.7~1.2 % (目的断片の長さに準じた濃度) になるようにアガロースを加え、電子レンジで加熱し完全に溶解させた。ある程度冷却した後、型に流し込んでからコームを差込み、30 min 程度静置した。固まった後コームを抜き、プラットホームを電気泳動層に移し 1×TAE Buffer を注いだ。パラフィルム上でサンプルに 6×loading buffer を 1 / 6 量加え混和し、これをウェルに流し込んだ。泳動時間は 100 v で 40 min 程度で、6×loading buffer の先頭の青色が 2/3 程度移動したところで泳動を止めた。

ゲルの染色には Mupid-Blue もしくはエチジウムブロマイドを使用した。

Mupid-Blue は発ガン性もなく安全な試薬であるがエチジウムブロマイドに比べて感度が低い。一方エチジウムブロマイドは発ガン性があり扱いに注意を要するが感度は高い。そこでサンプルの DNA 濃度が極めて低い場合や写真撮影が必要な場合のみエチジウムブロマイドを使用し、それ以外の場合には Mupid-Blue を使用した。

Mupid-Blue による染色の場合、泳動後のゲルを室温に戻した 50×Mupid-Blue に 1~2 min 浸して染色後、70%エタノールによる脱色 1min を 2 回繰り返す、その後染色されたバンドが見やすくなるまでイオン交換水による脱色を繰り返した。

エチジウムブロマイドによる染色の場合、ゲルを型に流して固める直前にゲル 15ml に対して 1,2 滴の Ethidium Bromide solution を直接加えた。泳動後のゲルをトランスイルミネーターで観察した。

なお、DNA分子量の推定には、TrackIt™ 1Kb Plus DNA Ladderまたはλ-EcoT14 I digestを指標として用いた。

Supplement 6 制限酵素処理

Materials

10×buffer (TaKaRa)

0.1% BSA (TaKaRa)

制限酵素：Sse8387 I (TaKaRa)、Pvu II (TaKaRa)

Protocols

反応組成で混和後、至適温度でインキュベートした。反応後の制限酵素の失活は Pvu II はフェノール/クロロホルム抽出、Sse8387 I は 65°C、15 min で行った。

TABLE 7-10 制限酵素反応組成

	容量 (20μl 中)
DNA サンプル	<1μg
10× Buffer	2μl
制限酵素	1μl
滅菌水	Up to 20μl

Supplement 7 平滑末端化処理

Materials

T4 DNA Polymerase(TaKaRa)

10×T4 DNA Polymerase buffer (TaKaRa)

dNTP Mixture(2.5mM each) (TaKaRa)

Protocols

反応組成で混和後、12°Cで 20min インキュベートした。反応後の酵素失活は 75°C、

10 min で行った。

TABLE 7-11 平滑末端化処理反応組成

	容量 (20 μ l 中)
DNA サンプル	0.1~4 μ g
10 \times T4 DNA Polymerase buffer	2 μ l
dNTP Mixture	0.8 μ l
T4 DNA Polymerase	1 μ l
滅菌水	Up to 20 μ l

Supplement 8 脱リン酸化処理

Materials

BAPping Kit(TOYOBO)

Protocols

反応組成で混和後、60~65 $^{\circ}$ Cで 1h インキュベートした。反応後の酵素失活にはフェノール/クロロホルム抽出を行った。

TABLE 7-12 脱リン酸化処理反応組成

	容量 (20 μ l 中)
DNA サンプル	1 μ g
10 \times BAP buffer	2 μ l
BAP	1 μ l
滅菌水	Up to 20 μ l

Supplement 9 フェノール/クロロホルム抽出

Materials

フェノール/クロロホルム/イソアミルアルコール ()

Protocols

1. サンプル DNA 溶液と等量のフェノール/クロロホルム/イソアミルアルコールを加え、30 秒間ボルテックスした。
2. 室温で 10,000rpm \times 10min 遠心し、中間のタンパク質層を取らないように、上層(水層)を回収し、新しいチューブに移した。
3. 後処理としてエタノール沈殿を行った。

Supplement 10 エタノール沈殿

Materials

Ethachinmate (Nippon gene)

3M Sodium Acetate (Nippon gene)

99.5%エタノール(JUNSEI)

70%エタノール (JUNSEI)

Protocols

4. DNA 溶液 100 μ l に対して 3M Sodium Acetate を 3.3 μ l 加えた。
5. Ethachinmate を 1 μ l 加え、Vortex にかけた。
6. 2~2.5 倍量の冷 99.5%エタノールを加え、Vortex にかけた。
7. 0°C で 12,000rpm \times 10min 遠心し、DNA を沈殿させた。
8. 沈殿を吸わないように、上澄みをピペットチップで注意深く除いた。
9. 1ml の冷 70%エタノールを加えて沈殿をすすぎ、0°C で 12,000rpm \times 10min 遠心した。(エタノールリンス)
10. 入念な脱塩が必要な場合は操作 5,6 を繰り返した。
11. 沈殿を吸わないように、上澄みをピペットチップで注意深く除き、キムワイプで蓋をして 30°C インキュベーター内で乾燥させた。
12. TE などの適当な溶液を加え溶解させた。

Supplement 11 ライゲーション

Materials

T4 DNA Polymerase(TaKaRa)

10 \times T4 DNA Polymerase buffer (TaKaRa)

Protocols

反応組成で混和後、16°C で 3h 以上インキュベートした。

TABLE 7-13 ライゲーション反応組成

	容量 (20 μ l 中)
ベクターDNA	0.2~0.5 μ g
インサート DNA	※
10 \times T4 DNA Polymerase buffer	2 μ l
T4 DNA Polymerase	1 μ l
滅菌水	Up to 20 μ l

※ ベクターDNA の 1~3 倍量

Supplement 12 エレクトロポレーション用コンピテントセルの作製 (40 μ l \times 6 本)

Materials

LB 培地

10%グリセロール

Protocols

1. 菌体を植え継いだプレートから単一コロニーをとって、4ml の LB 培地に植菌し、28℃で一晩培養した。
2. 2本の40ml LB培地に0.4mlずつ前培養した菌体を植え継ぎ、OD₅₅₀が0.4程度になるまで37℃で振盪培養した。(2~4時間)
3. この間に以下のものを冷やしておいた。
 - ・ 40ml 遠心チューブ 2本 (氷上)
 - ・ 1.5ml エッペンチューブ 8本 (-20℃)
4. 冷やしておいた遠心チューブに移し、そのまま氷上で20分間冷却した。
5. 0℃で3,000rpm×15min 遠心した。
6. 上澄みを捨て、冷イオン交換水を30ml/チューブ加え、氷中で静かに手で攪拌してペレットを溶かした。
7. 0℃で3,000rpm×15min 遠心した。
8. 上澄みを捨て、冷SP水を10ml/チューブ加え、氷中で静かに手で攪拌してペレットを溶かした。
9. 0℃で3,000rpm×15min 遠心し、上澄みを捨てた。
10. 滅菌冷10%グリセロールを2mlずつ加え、氷中で静かに手で攪拌してペレットを溶かした。
11. 0℃で5,000rpm×15min 遠心し、上澄みを捨てた。
12. 滅菌冷10%グリセロールを120μlずつ加え、氷中で静かに手で攪拌してペレットを溶かした。
13. チューブを静かに攪拌して菌を均一にしてあらかじめ冷やしておいたエッペンチューブに40μlずつ分注し、-80℃フリーザーで凍結させ、そのまま保存した。
 - ※ 菌体処理は常に冷えた状態で、静かに、丁寧に、手早く行う
 - ※ チップも冷やして使う
 - ※ 濃度は1~3×10¹⁰細胞/mlになる

Supplement 13 エレクトロポレーション

Materials

LB培地もしくはSOC培地

コンピテントセル

DNA 溶液

1. コンピテントセル (40μl) を室温で溶かした。
2. コンピテントセルを氷上に移し、キュベットも冷やした。
3. DNA 溶液を1~2μl加え、氷上で5分放置した。

4. 冷やしておいたキュベットに移し、軽く振って底に落とした。
5. キュベットをエレクトロポレーターにセットし、パルスを打った。
(*E.coli*用プログラム：1.8kV、1pulse)
6. 速やかに LB 培地もしくは SOC 培地を 1ml 加えピペッティングし、1.5ml エッペンチューブに移し、30~32°Cで 30~60 分*インキュベートした。
※ 薬剤耐性遺伝子の発現が目的で、菌の増殖が目的ではないので、長すぎるのはよくない
※ 温度・時間は実験によって違う
7. プレート上に塗り広げた。(抗生物質濃度に応じて 10~200μl)
8. プレートを 30~32°Cにセットした恒温槽に移した。

Supplement 14

プライマー設計の注意点^[20]

- サイズは 17~25 塩基程度
- できるだけ特異的な箇所を選ぶ
- GC 含量は 40~60%前後とし、部分的に GC あるいは AT-rich にならないようにする
- プライマーの Tm 値は forward と reverse で揃える
- Forward・reverse プライマーの 3'末端同士が 3 塩基以上連続して相補的にならないようにする
- プライマー内に 4 塩基以上の自己相補配列を含まないようにする

Supplement 15 目的 DNA 断片のアガロースゲルからの切り出し・精製

Materials

Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega)

Protocols

1. あらかじめ重さを量っておいた 1.5 ml 無菌チューブに切り出したゲルをいれ、ゲルの重さをはかった。
2. ゲル 1mg あたり 1μl の Membrane Binding Solution を加えた。
3. ゲルが溶けるまで 50~65°Cで 10 min インキュベートした。その際、数分おきにボルテックスした。(ただし DNA サイズが 5kb 以上の場合はボルテックスせず、転倒により混和した。)
4. SV ミニカラムをコレクションチューブにセットしたものを 1 サンプルにつき 1 セット用意した。
5. 3 の液を 4 に移し、室温で 1min インキュベートした。

6. 5を14,000rpm×1minで遠心分離した。その後コレクションチューブ内の液を除いた。
7. 洗浄のため、Membrane Wash Solution 700μlを加え、14,000rpm×1minで遠心分離した。その後コレクションチューブ内の液を除いた。
8. Membrane Wash Solution 500μlを加え、14,000rpm×5minで遠心分離した。
9. 液でカラムの底を濡らさないよう注意してミニカラムを外し、液を除いた。残留エタノールを蒸発させるためにマイクロ遠心機の内蓋を開けたまま14,000rpm×1minで遠心分離した。
10. ミニカラムを1.5 ml無菌チューブに移し、30~50μlのNuclease-Free Waterを膜に触れないようにピペットチップで中央に注いだ。室温で1minインキュベートした後、14,000rpm×1minで遠心分離した。
11. ミニカラムを捨て、4℃もしくは-20℃で保存した。

謝辞

谷生先生にはこの3年間本当にお世話になりました。遺伝子というこの研究室ではまだ歴史の浅い研究テーマであったため試行錯誤でしたが、先生も一緒になって問題解決の手段を考えてくださいました。ここに厚く御礼申し上げます。

参考文献

- [1] 池谷知彦, “水素エネルギー社会構築に向けた課題と展望”, 水素エネルギーシステム, VOL.30, NO.2, P2-9, 2005
- [2] R.Nandi, S.Sengupta Critical Reviews in Microbiology, Volume24, Issue1, P 61-84, 1998
- [3] Tanisho S, Kamiya N, Wakao N: “Hydrogen evolution of *Enterobacter aerogenes* depending on culture pH”, Biochim. Biophys. Acta, 973(1), P1-6, 1989
- [4] 菅沼剛: “TCA 回路、電子伝達鎖の機能保持による発酵水素収率改善の研究”, 2001
- [5] 合葉修一著、永谷正治/訳、“生物化学工学 下”、東京大学出版会、1968
- [6] 田口久治/[ほか]、“微生物工学”、日本醗酵工学会、p74-82、1983
- [7] H. Robert Horton/[ほか]著、鈴木紘一/[ほか]監訳、“ホートン 生化学 第3版”、東京化学同人、318-333、2003
- [8] 今中忠行、“微生物利用の大展開”、エヌ・ティー・エス、2002
- [9] 山中建生、“改訂 微生物のエネルギー代謝”、学会出版センター、P62-4、1999
- [10] 小川和朗/[ほか]、“細胞生物学④ 細胞のエネルギー代謝”、理工学社、p190、1979
- [11] 木村光、“ゲノム微生物学”、シュプリンガー・フェアラーク東京、1999
- [12] 堀内忠郎/[ほか]、“現代微生物学 第3版”、朝倉書店、p25-6、1995
- [13] 緒方靖哉、“遺伝子ターゲティングの基礎と応用”、コロナ社、p10-2、1995
- [14] BIRGIT M. PRUB, JENNIFER M. NELMS, CHANKYU PARK, and ALAN J.WOLFE : “Mutations in NADH:Ubiquinone Oxidoreductase of *Escherichia coli* Affect Growth on Mixed Amino Acids”, J. Bacteriol. Vol.176, No.8, P2143-50, 1994
- [15] H. Falk-Krzesinski and A. Wolfe: “Genetic Analysis of the *nuo* Locus, Which Encodes the Proton- Translocating NADH Dehydrogenase in *Escherichia coli*”, J. Bacteriol. Vol.180, No.5, P1174-84, 1998
- [16] バイオセーフティクリアリングハウス (J-BCH) ホームページ <http://www.bch.biodic.go.jp/>
- [17] 小西仁、小林梢栄、上村毅: “発酵法によるバイオマスからの水素生産収率改善”, 第26回水素エネルギー協会大会 予稿集, P73-6, 2006

- [18] Hidekazu Kuwayama: "PCR-mediated generation of a gene disruption construct without the use of DNA ligase and plasmid vectors", *Nucleic Acids Research*, Vol.30, No.2, 2002
- [19] 化学大辞典編集委員会、"化学大辞典 3"、共立出版、p919、1993
- [20] 中山広樹合、"バイオ実験イラストレイテッド2 遺伝子解析の基礎"、秀潤社、P80-3、1995
- [21] http://bio.takara.co.jp/catalog_d.asp?C_ID=C1533