

Ⅱ－９０ 大腸菌 H B 1 0 1 株の好気培養・嫌気培養におけるプラスミド
p B K 9 の保持特性

東北学院大学 学生員 ○及川 栄作
同 正員 遠藤 銀朗

１．はじめに

環境工学分野における遺伝子工学の活用のための研究は、世界的に見ても緒についたばかりである。一方、農林水産・工業生産の分野及び環境制御分野で新しいバイオテクノロジーが実用化されようとしている現在、例えば、組換え DNA 技術によって改変された微生物を開放環境中に意図的に放出して (Deliberated Release) 利用しようとする試みがなされ始めている。しかし、環境中で DNA 組換え体を利用するにあたっては、その効果と同時に環境生態系に及ぼす影響と安全性について十分な基礎情報を得ておく必要がある。本研究においては、大腸菌 (以下 E. coli) ベクタープラスミド pUC4K 由来のカナマイシン (Kan) 耐性遺伝子汎用性クローニングベクタープラスミド pBR322 に継いで作成したプラスミド pBK9 を保有する E. coli H B 1 0 1 形質転換株を用いて、この組換え体の増殖に伴う遺伝子の保持性について調べた。E. coli の増殖条件としては、通常の L-ブロス好気振とう培養と、Hungate によるガス噴射法によって作られる絶対嫌気条件下での振とう培養との２つの条件を与え、プラスミド pBK9 の各培養条件下での増殖に伴う遺伝的保持性について比較した。

２．実験材料、装置、及び方法

(１) 実験材料

- (大腸菌) : E. coli H B 1 0 1 東北大学農学部 神尾是氏より譲渡していただいた。
(プラスミド及び DNA) : pUC4K (ファルマシア), pBR322, λ-DNA (宝酒造)
(制限酵素) : EcoRI (東洋紡), HindIII (洋紡)
(その他の制限酵素) : リゾチーム (シグマ), T-4 DNA リガーゼ (宝酒造)

(２) 実験装置

組換え体培養装置は、500ml の三角フラスコに L-ブロス 100ml を入れ滅菌シリコン栓 (好気培養) または滅菌ゴム栓 (嫌気培養) で封じたもの。及び 37℃ にセットした振とう恒温水槽である。

(３) 実験方法

(多剤耐性プラスミドの組換えによる作成と形質転換)

(イ) EcoRI による pUC4K の切断 :

マイクロ遠心管に dd-H₂O, pUC4K 5μg, 反応緩衝液, EcoRI 28unit を入れ 37℃ で 2 時間反応させて pUC4K から Kan 耐性遺伝子を切り取る。

(ロ) EcoRI による pBR322 の切断 :

同様に dd-H₂O, pBR322 3.9μg, 反応緩衝液, EcoRI 14unit を入れ 37℃ で 2 時間反応させて直鎖 DNA に切断する。

(ハ) HindIII による λ-DNA の切断 :

同様に λ-DNA を HindIII で切断し電気泳動観察用のサイズマーカーとする。

(ニ) プラスミド pBR322 (EcoRI 切断) と Kan 遺伝子とのスプライシング :

制限酵素活性をフェノールクロロホルム処理によって失活させた後、各々の制限酵素切断プラスミド及び遺伝子をエタール沈殿によって回収し、10μl の TE 緩衝液に溶解する。この溶液を混合し、DNA ライゲース反応緩衝液 160μl を添加した後 20μl の T4 DNA リガーゼを加え、

16℃で1時間反応させて多剤耐性プラスミドを作成する。

(ホ) 多剤耐性プラスミドによる *E. coli* HB101 の形質転換：

OD₅₅₀ が約 0.4 になるまで新しく培養した *E. coli* HB101 株を常法通り Mg, Ca で処理しコンピテントセルを得る。この 200 μl に (ニ) のライゲーションミクスチャー 40 μl を加えて 0℃ で 30 分放置し、その後 2 分間 42.5℃ のヒートショックを加えた後 LB ブロス中に移し 37℃ で 2 時間振とう培養した後カナマイシン、アンピシリン、テトラサイクリンが各々 50 μg/ml ずつ入った LB 寒天平板に塗抹し一夜培養してコロニー形成を見る。

(プラスミド PBK9 形質転換株のスクリーニング)

上記 (ホ) において得られた形質転換株には多様なプラスミドが含まれる。この中から pBR322 の 1 分子に kan^r 1 分子が結合したプラスミド (これを pBK9 と呼ぶ) のみを保有する組換え体を得るために、得られたコロニーすべてを LB ブロス (抗生物質の入った) で培養した後、リゾチーム処理、エタノール沈殿などによってプラスミドを回収し、電気泳動によってプラスミドの大きさをチェックし pBK9 保有組換え体をスクリーニングする。

3. 実験結果

前述の組換え体を LB ブロス (抗生物質を含まないもの) で好氣的及び嫌氣的に増殖させた時の培養液の OD₅₅₀ の増加に伴う LB 寒天プレートで計数した全大腸菌数と、カナマイシン、アンピシリン、テトラサイクリンの各抗生物質入りの LB 寒天プレートで計数した組換え体菌数の変化を図-1 及び図-2 に示した。好氣的培養においては、図-1 のように OD 値の増加 (すなわち増殖) に伴って全菌数に対する組換え体の割合が次第に低下することが知られた。このことは、大腸菌 HB101 株が分裂増殖の回数が増えるに従って多剤耐性プラスミド PBK9 を脱落して行くことを示している。一方、嫌氣的培養においては、図-2 に示したように OD の増加に伴って全大腸菌数と抗生物質耐性菌の菌数は、ほとんど同じように増加し、分裂増殖した大腸菌 HB101 株のほとんどがプラスミドを脱落しなかったことを示した。

以上の結果より、DNA 組換え体である大腸菌 HB101 株は、好氣的環境、嫌氣的環境のような生育条件の違いによりプラスミド遺伝子の保持性が異なることが知られ、遺伝子組換え微生物の生存性は、単に組換え微生物の特性だけでなく生育の環境条件との関係においても把握しておく必要があると考えられる。

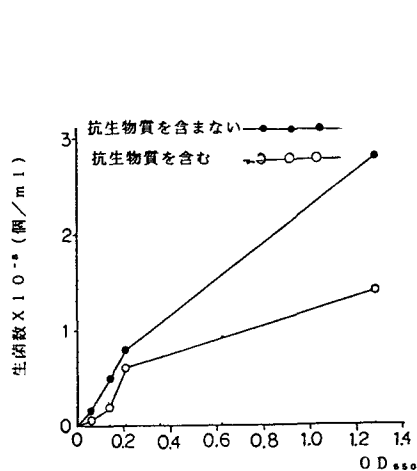


図-1 好気培養での *E. coli* の OD₅₅₀ と生菌数との関係

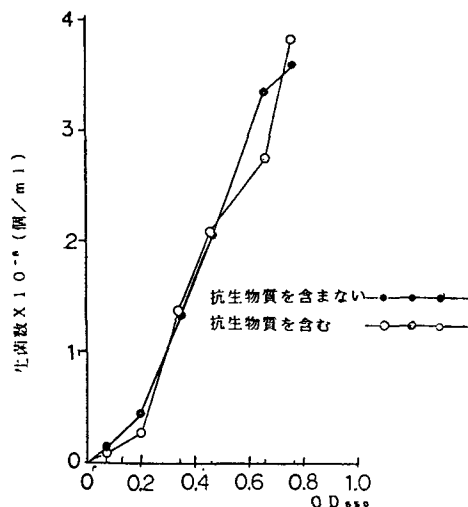


図-2 嫌気培養での *E. coli* の OD₅₅₀ と生菌数との関係