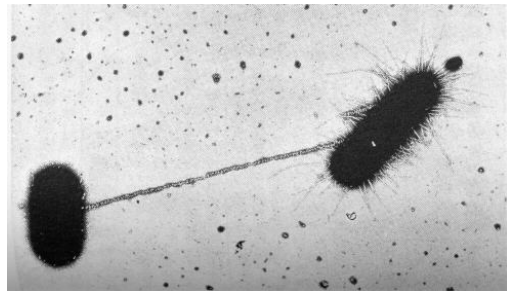
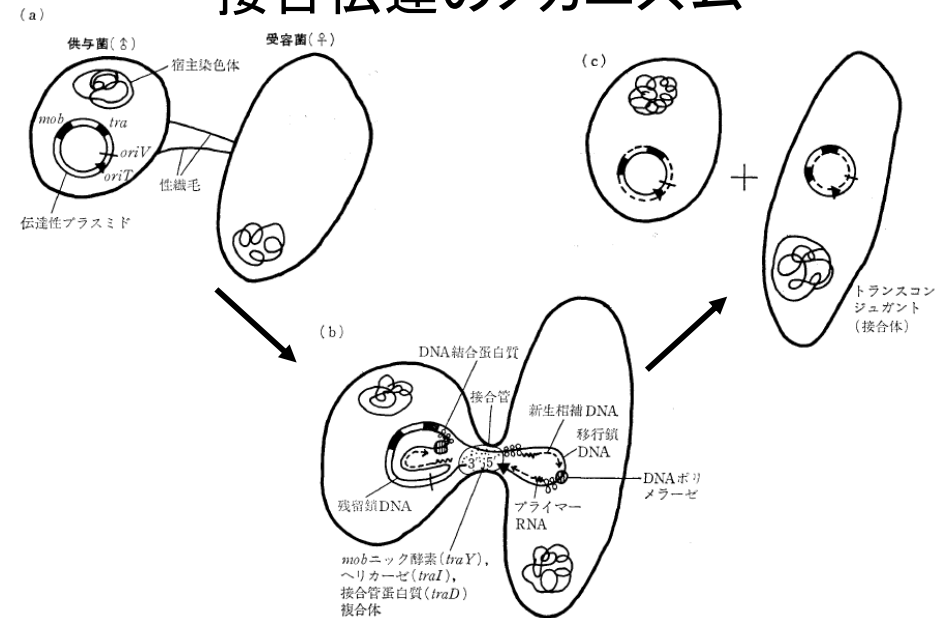


(参考) 接合伝達



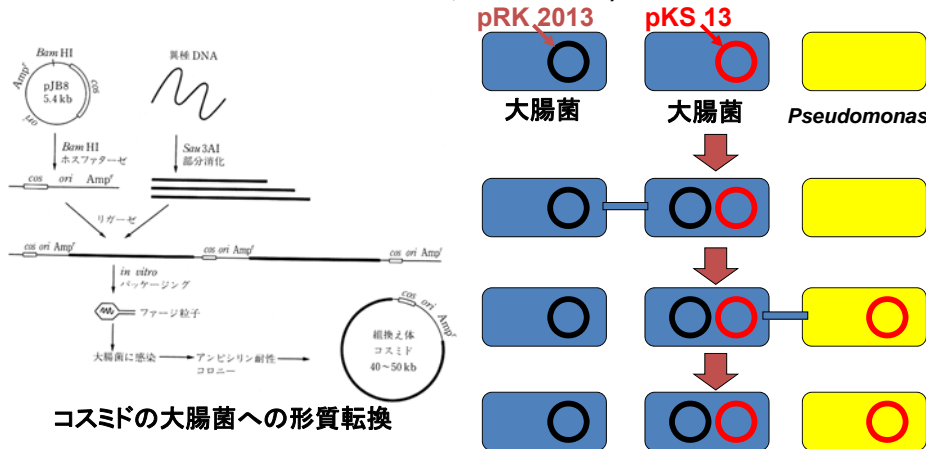
Charles C. Binton Jr.の有名な大腸菌の接合の写真。
細菌にはF因子と呼ばれる性別を決定する因子があり写真右の雄(F因子を持っている)から左の雌にF因子の受け渡しが行われています(雌が雄化します)。このときに雄の遺伝子情報が雌に遺伝子組み換えされることがあります。

接合伝達のメカニズム



5.4.2 3親伝達法

pRK 2013...pRK 2由来の41.7 kb断片 (Tra^+ , Km^r)とCol E1プラスミドの6.3 kb断片(レプリコン;複製起点を含む断片)を連結
pKS 13...21.7 kb (Tc^r , cos , Mob^+), RK2由来のレプリコンの上に入ファージ由来の cos 部分をつないだコスミド。 Tra^+ の助けによって、 Mob^+ を含むコスミドが接合伝達(被伝達能; mobilization)する。



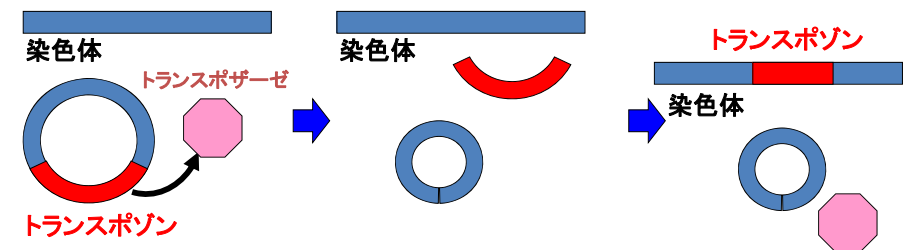
(参考) トランスポゾンについて

トランスポゾン(Transposon)は、細胞内においてゲノム上の位置を転移することができる塩基配列である。

トランスポゾン...DNA断片が直接転移するDNA型
レトロポゾン...転写と逆転写の過程を経て転移するRNA型

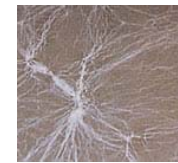
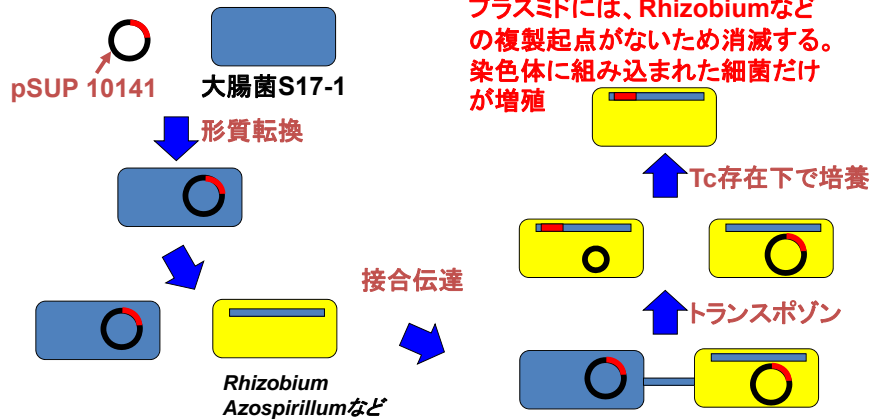
トランスポゾンが転移するためには、トランスポゾン塩基配列内にあるトランスポザラーゼ(Transposase)が必要である。

1940年バーバラ・マクリントリックにより発見 → 1983年ノーベル生理学・医学賞受賞



5.4.3 自殺ベクター

pSUP 10141 ...15.2 kb, Km^r, Tc^r, Cm^r、大腸菌ベクター由来の複製起点をもつ。
トランスポゾンTn5(Km^r)上にさらにTc^r遺伝子を組み込む。
大腸菌宿主S17-1株...RP4由来の接合伝達能(Tra⁺)の遺伝子をもつ。



5.4.4 酢酸菌

酢酸菌 (*Acetobacter acetii*) は、大腸菌と同様の酸化カルシウム法で形質転換が可能である。

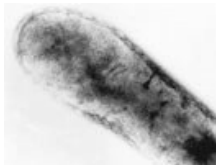
また、多くの小型のプラスミドが見つかっており、大腸菌のベクターとの連結により、Ap^r, Km^r, Cm^rなどの薬剤耐性マーカーを付与したシャトルベクターが開発されている。



(応用例)

酢酸菌のアセトアルデヒドデヒドロゲナーゼ遺伝子のクローン化による、酢酸発酵能の強化

pSA 19...セルロース産生菌 *Acetobacter* sp. 由来の pHA 4 と大腸菌のプラスミド pUC 18 と連結したアンピシリン耐性マーカーをもったシャトルベクター。コピー数は約10で、アンピシリン非存在下でも非常に安定。



5.4.5 高度好熱菌

温泉に生息する *Thermus* 属の高度好熱菌は、同種のDNAを取り込んで染色体と組み換える古典的な形質転換の能力が高い。

Thermus thermophilus HB27では、生育のすべての段階で、生菌の全てが形質転換能を持っていることが知られている。

- *Thermus thermophilus* の pTT 8 をもとにした耐熱性の Kmr 遺伝子を連結したベクター
- トリプトファンシンターゼ遺伝子を付与したベクター
- 小型のプラスミド pNHK 101 (1.6 kb) を用いたベクター

5.5 グラム陽性菌

- ここでは、枯草菌、*Bacillus* 属、乳酸菌、アミノ酸発酵菌について述べる

5.5.1 枯草菌(*Bacillus subtilis*)

機能不明の小型プラスミドが存在、薬剤耐性などのマーカーは持たないが、子孫細胞内に安定に存在し続ける。



適当なマーカーを付与することでベクターとすることができる。

Staphylococcus由来の小型の各種の薬剤耐性プラスミド



枯草菌に形質転換すると、そのまま枯草菌中でプラスミドとして薬剤耐性を発現するので、枯草菌用のベクターとして用いられる

(例) pUB110 (4.6kb, Km^r), pE194 (3.6kb, Em^r), pC194 (4.5kb, Cm^r), pTP4 (4.2kb, Cm^r)などがある。

これらのプラスミドと大腸菌のベクター pBR 322などと連結したものは、枯草菌と大腸菌間のシャトルベクターとなる

※異種DNAをクローン化するためには、制限酵素による分解を避けるための宿主として、*B. subtilis* 168由来の制限酵素欠損株RM125が作成され、異種DNAによる形質転換効率のよい受容菌として用いられている。

5.5.3 *Bacillus brevis*

Bacillus brevis 47は、菌体外に細胞外壁タンパク質を合計10 g/L以上分泌する特殊な性質を持っている。pUB 110などを用いて、ポリエチレングリコール法で形質転換できるが、プラスミドが安定に保持されない。



*B. brevis*由来のプラスミドに、*Staphylococcus*プラスミド由来のマクロライド耐性を付与したベクター-pHY 481は、非常に安定である。しかしながら、このベクターは低コピー数である。



B. brevis 47の変異によって、コピー数が10倍になる宿主Cop 11が得られている。

(利用例)

細胞外壁タンパク質の遺伝子のプロモーターと分泌シグナル配列を利用して、高能率の異種タンパク質分泌プラスミドpNU 200が作成されている。



ヒト上皮増殖因子(hEGF)、タンパク質ジスルフィドイソメラーゼ(hPDI)を培地中1L中に数g程度分泌生産する事ができる。

5.5.2 好熱性*Bacillus*

65°Cまでの温度で生育できる中等度好熱菌*Bacillus sterothermophilus* SIC 1のプロトプラストは、各種のプラスミドによって効率よく形質転換することができる。枯草菌用のpUB 110をベクターとして用いることができる。

好熱菌由来のベクター

高コピー・・・pTB 913 (Km^r)

低コピー・・・pTB 53 (Km^r, Tc^r), pTB 522 (Tc^r)

5.5.4 乳酸菌

乳酸菌*Lactobacillus*と*Lactococcus*は、ヨーグルトやチーズなどの乳製品の製造のほか、漬物などの発酵食品、牧草のサイロ貯蔵中の乳酸発酵などに重要な菌である。*Lactobacillus*菌株の約40%がプラスミドを保有しており、*Lactococcus*にも多くのプラスミドが知られている。

乳酸菌由来のベクター

OpLUL 631・・・*Lactobacillus leuteri*由来、エリストロマイシン耐性 (Em^r)

○各種グラム陽性菌に形質転換できる広域プラスミドもある。

遺伝子操作した乳酸菌を発酵食品に安心して使えるように、薬剤耐性マーカーを持たない”Food grade”ベクターが作られている。

(例)

1. *Lactococcus lactis*のプリン要求変異株を用意し、プリン生産遺伝子を選択マーカーとしたもの
2. 乳酸菌由来のバクテリオリシンnisinの遺伝子のプロモーターは、微量のnisinを培地に加えることで発現誘導されるので、これを利用した安全で強力な発現ベクターが作られている。

※ビフィズス菌(*Bifidobacterium*)は、分類学的には、アミノ酸発酵菌に近縁であるため、次の項を参照