

分子遺伝学I

「*pomAB*のクローニング」

Contents: 190510

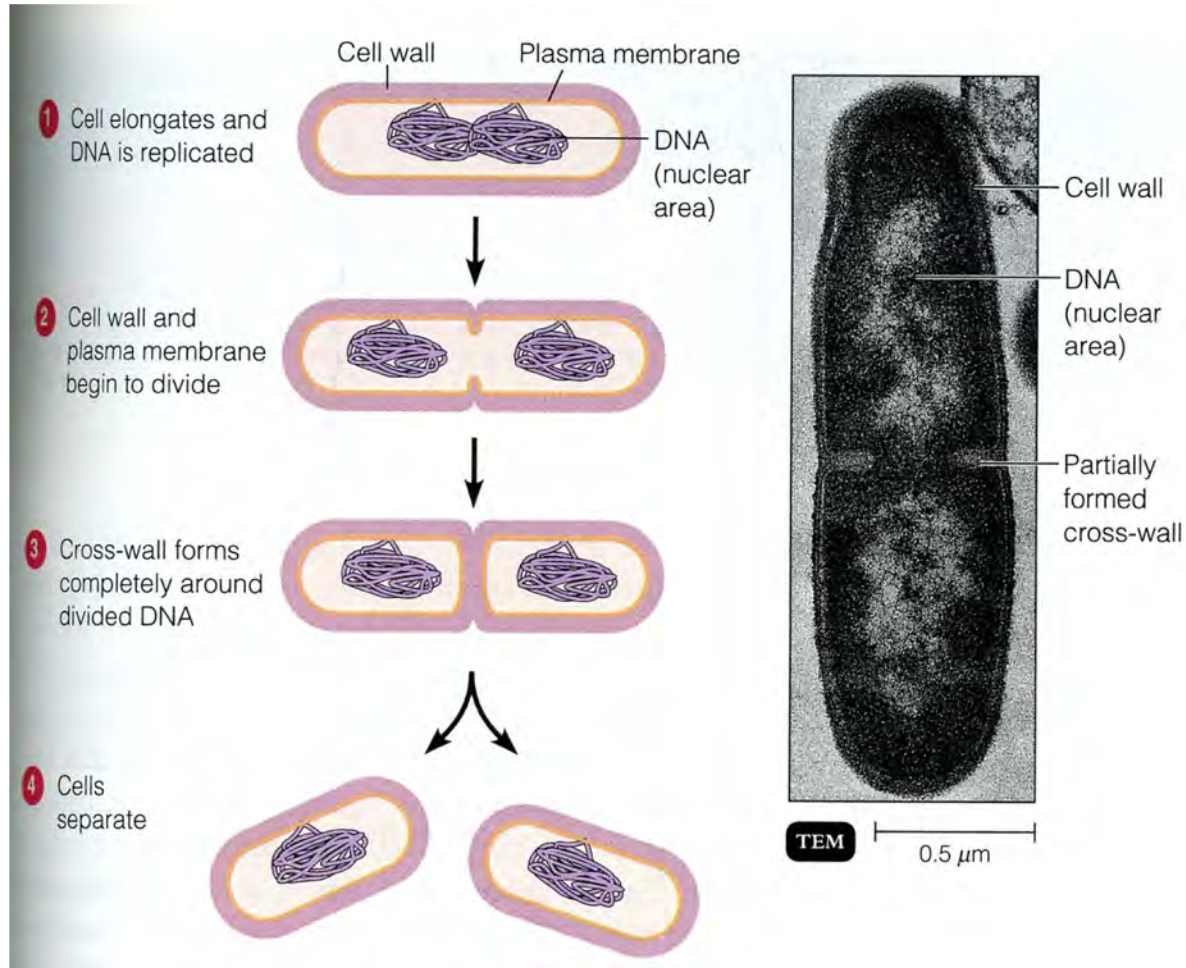
1 大腸菌のことを知ろう！（株、生育、増殖曲線、クローン、処理方法）

2 生命科学の進め方：変異体の意味

3 遺伝子のクローン化の実際(*pomA*の例)

ライブラリ、クローン、シングルコロニーの意味、相補

大腸菌：遺伝学のツール



単細胞、核がない、外膜と内膜・ペリプラズム・サイトプラズム、細胞壁(ペプチドグリカン)

生命科学のモデル生物: クローニングホスト、タンパク質大量発現、えさ(線虫)

でも、分かっていないこともたくさんある！

さまざまな大腸菌株

K-12

1922年にアメリカの病院で快復期のジフテリア患者の便から分離、Stanfordで保存
DH5 α やJM109などのクローニングホストはK-12株由来

B株

1942年にファージT1, T7の研究から名前がつけられた
プロテアーゼ遺伝子 *lon*, *ompT* を欠損しているので、タンパク発現用に使われる
BL21(DE3)など

病原性大腸菌

腸管病原性大腸菌 (EPEC, enteropathogenic) 小腸に感染、下痢、腹痛等急性胃腸炎をおこす
腸管侵入性大腸菌 (EIEC, enteroinvasive) 大腸に感染、赤痢様の症状をおこす
毒素原性大腸菌 (ETEC, enterotoxigenic) 小腸に感染し下痢をおこす。毒素を産生
腸管出血性大腸菌 (EHEC, enterohemorrhagic) 腹痛、下痢、血便をおこし、ベロ毒素産生により
溶血性尿毒症症候群 (HUS)、脳症をおこす。O157など。

大腸菌を生育させる

必要な元素

Carbon (C): エネルギー源、細胞のメインの構成要素、細胞の乾燥重量の50%

Nitrogen (N): タンパク質や核酸、細胞の乾燥重量の14%

Sulfur (S): タンパク質、細胞の乾燥重量の4%

Phosphorus (P): タンパク質や核酸、細胞の乾燥重量の4%

trace elements (Fe, Cu, Zn, molybdenumなど、cofactorに使われる)

M9 medium

Na_2HPO_4
 KH_2PO_4
 NaCl
 NH_4Cl

M9 salt

Glucose

MgSO_4

CaCl_2 (ビタミン、アミノ酸を加える場合もある)

LB medium

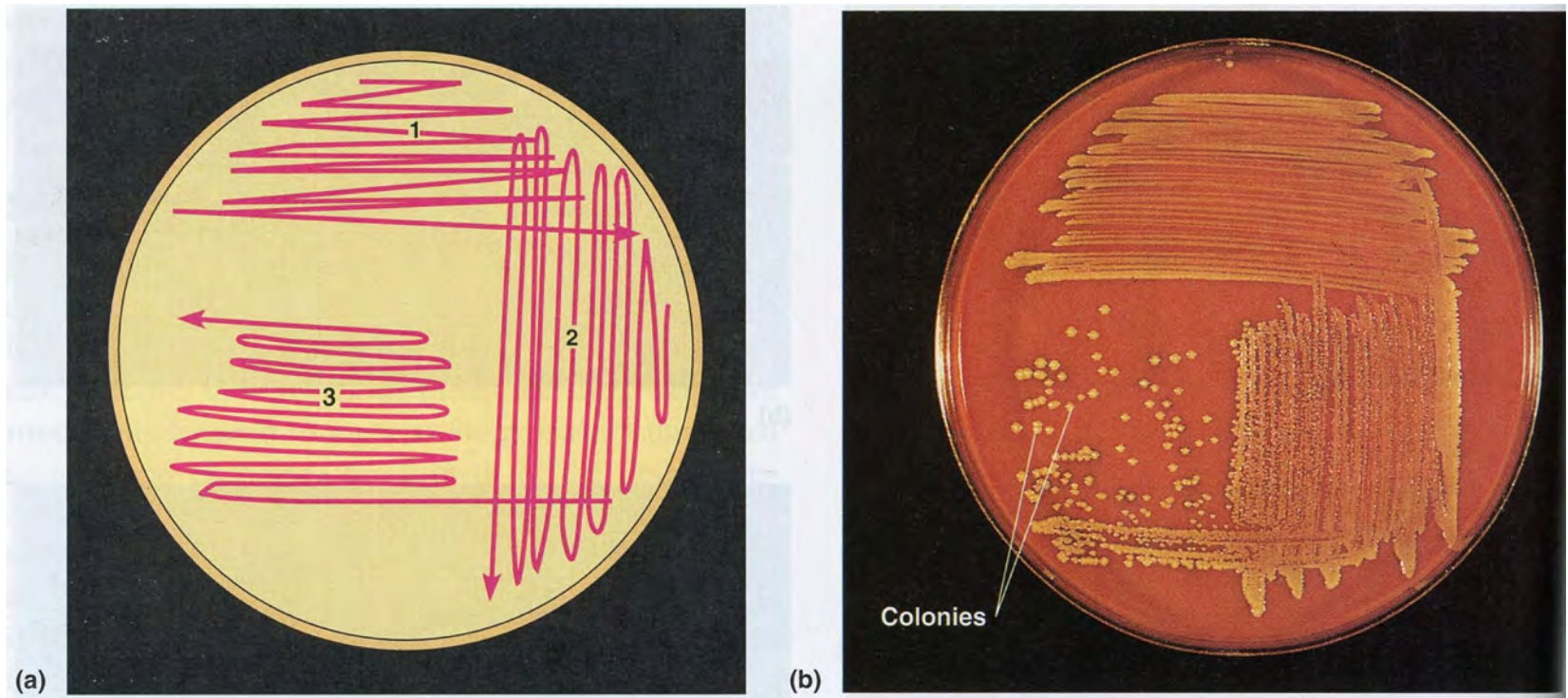
bacto-tryptone

bacto-yeast extract

NaCl

震盪培養する！
(酸素が必要)

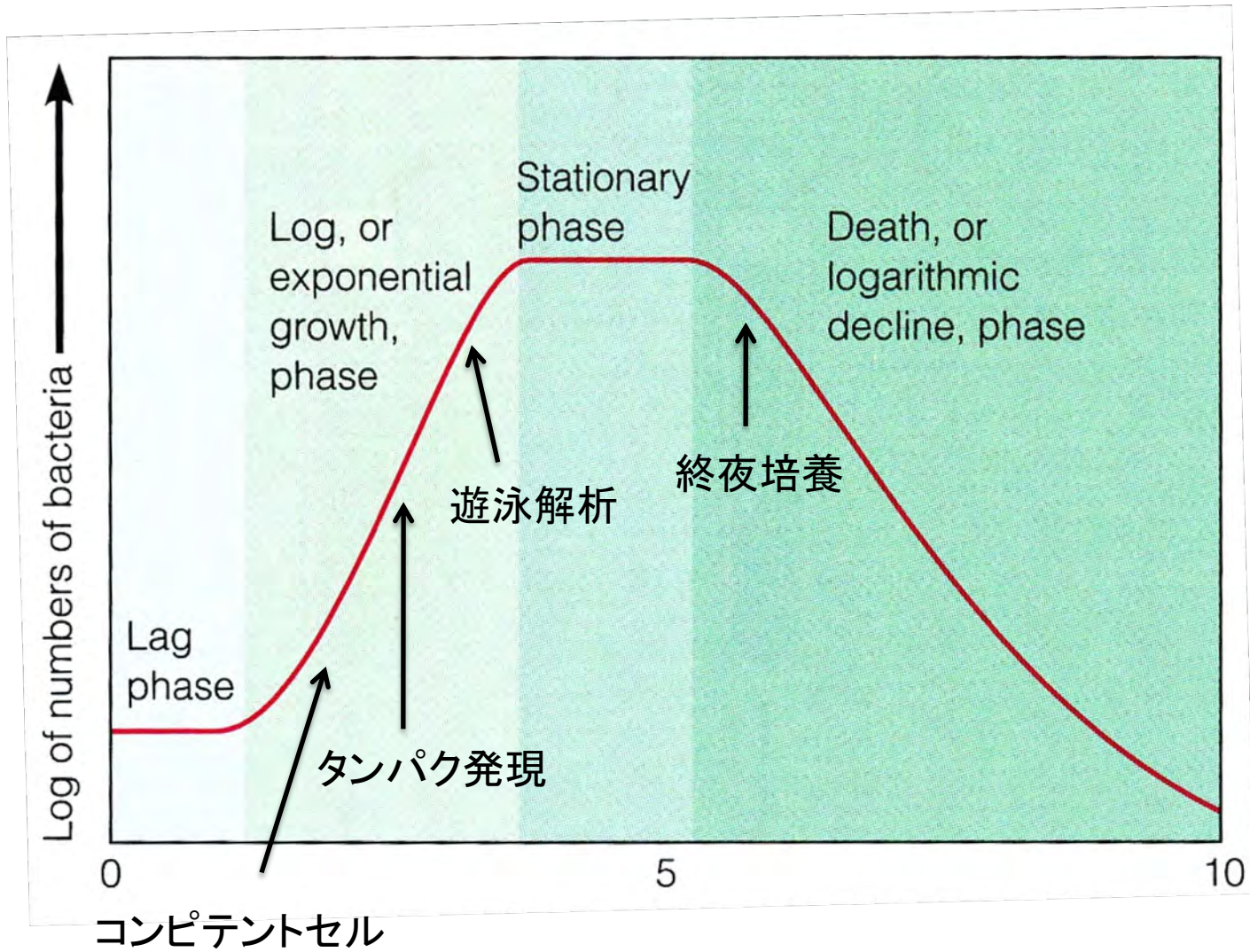
シングルコロニー形成



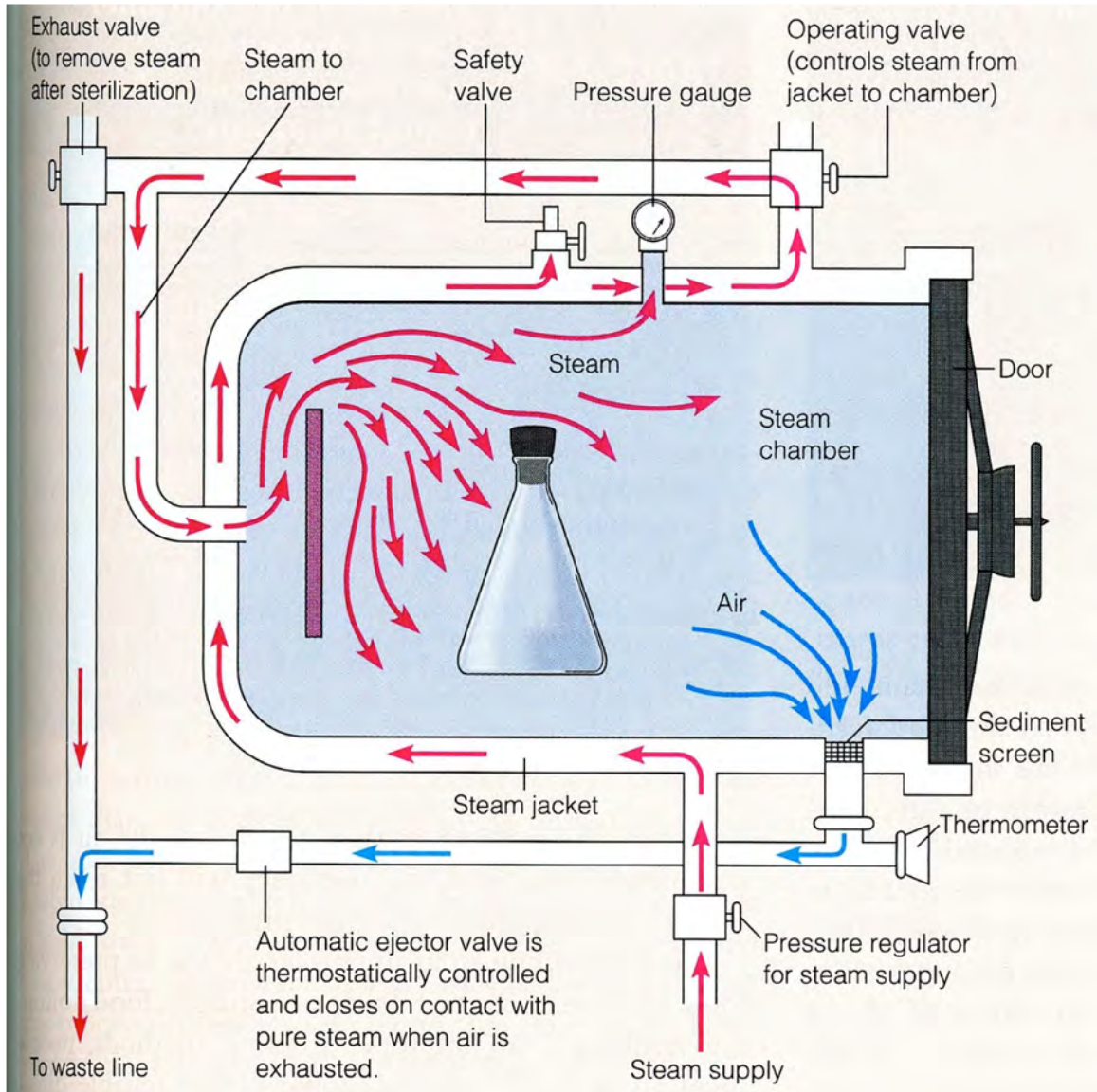
1つの細胞から1つのコロニーが形成される(シングルコロニー)
つまり、シングルコロニー内の菌は**遺伝的に同一のクローン**である

コンタミしたり、おかしなことが起こったら、シングルコロニーに戻って解析しなおす
(シングルコロニーには、数億から数10億個の菌が存在する)

生育曲線



オートクレーブ



高温の蒸気を循環させる



タンパク質内の水素結合が壊れて、凝固する。



細胞の機能が失われて死滅



100°Cの蒸気を海面から1気圧上(2気圧)におくと121°Cになる。
この条件で20分おくと、
完全に死滅する
(121.7°Cで107.8 kPa: TOMY)

生命科学の基本手法：変異体の取得

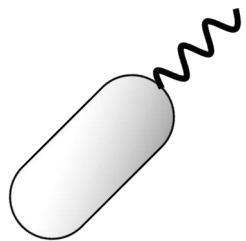
生命現象を分子レベルで理解したい：「分かった」と言えるには？

現象に関わる遺伝子・タンパク質は何か？

遺伝子の同定、クローニング、塩基配列決定
タンパク質の発現(時期・量・位置)

遺伝子・タンパク質の働きは？

タンパク質の機能残基、立体構造、発現の制御機構
タンパク質の相互作用する相手、ネットワーク



細菌はどうやって泳ぐのか？



「べん毛」という装置はどんな素子で出来ているのか？

各素子の役割は？

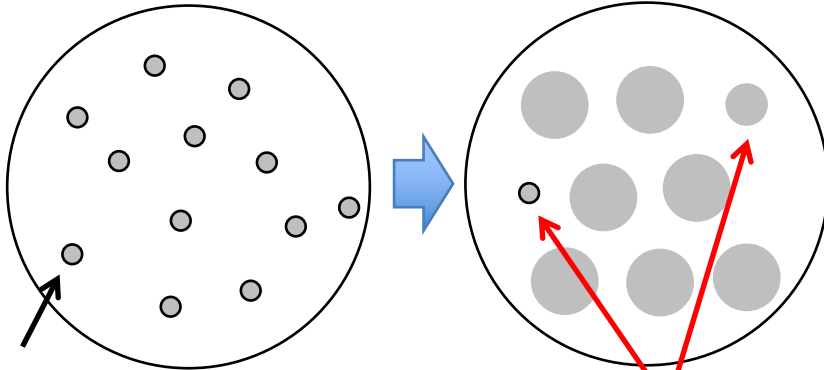


素子(部品)は、壊れると機能が推測できる **変異体の単離がスタート**

細菌べん毛の変異体

変異処理した菌を
堅いプレートにまく

コロニーをひとつずつ
柔らかいプレートに植える



1つの細胞由来の集落
コロニーという

運動能欠損株

mutagenesis

細胞に変異源 (UVや化学試薬)
を与えて変異を誘発する



処理した細胞を一旦プレートの上で
培養する。このとき一つ一つの集落
がひとつの細胞由来になる



screening

柔らかい寒天培地の上にコロニーを
接種する。運動能をもつ株は広がる
ことができる (左図)

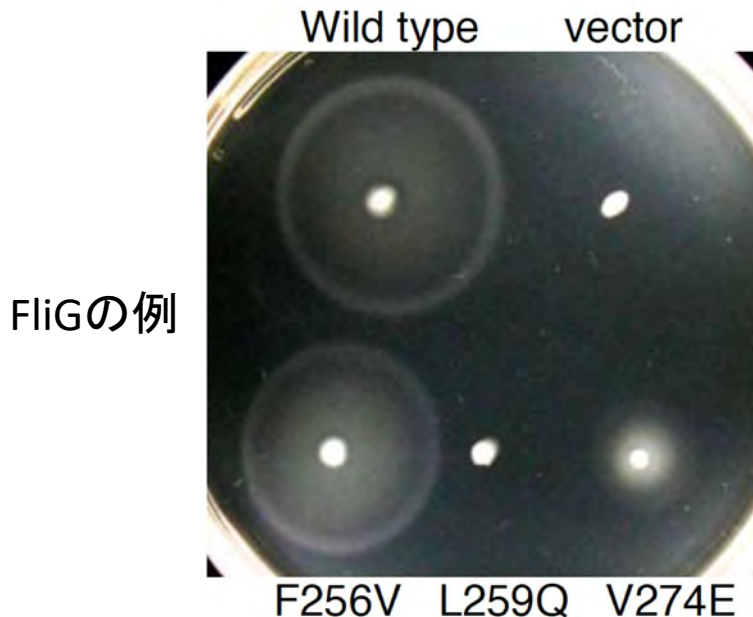
characterization



identification

変異遺伝子とその変異アミノ酸を
同定する

べん毛の機能に関する遺伝子が
同定できる



FliGの例

mutagenesis UV, mutagen (EMS), transposon

↓
selection (screening)

どんな変異体を、どうやって単離するのか？

↓
characterization

単離した変異体の特徴付け

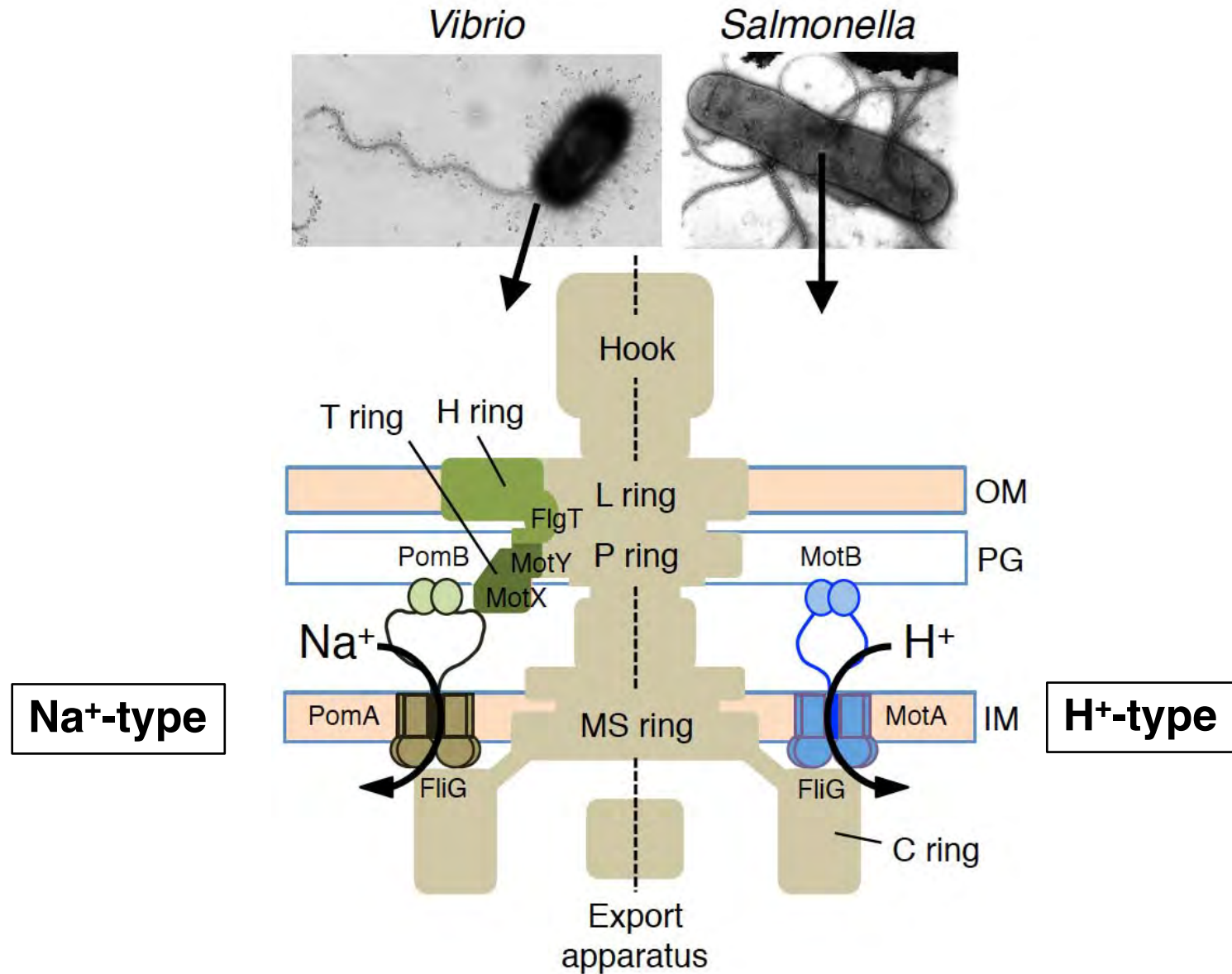
↓
cloning

変異部位の同定、遺伝子のクローン化

↓
sequencing

↓
expression

Na⁺駆動型べん毛モーター固定子



遺伝子 *pomA*, *pomB* はどのようにしてクローン化されたのか？

べん毛モーター固定子の変異体とは？

親株(運動能野生型:VIO5株)の細胞
に変異源(UVや化学試薬)を与えて
変異を誘発する

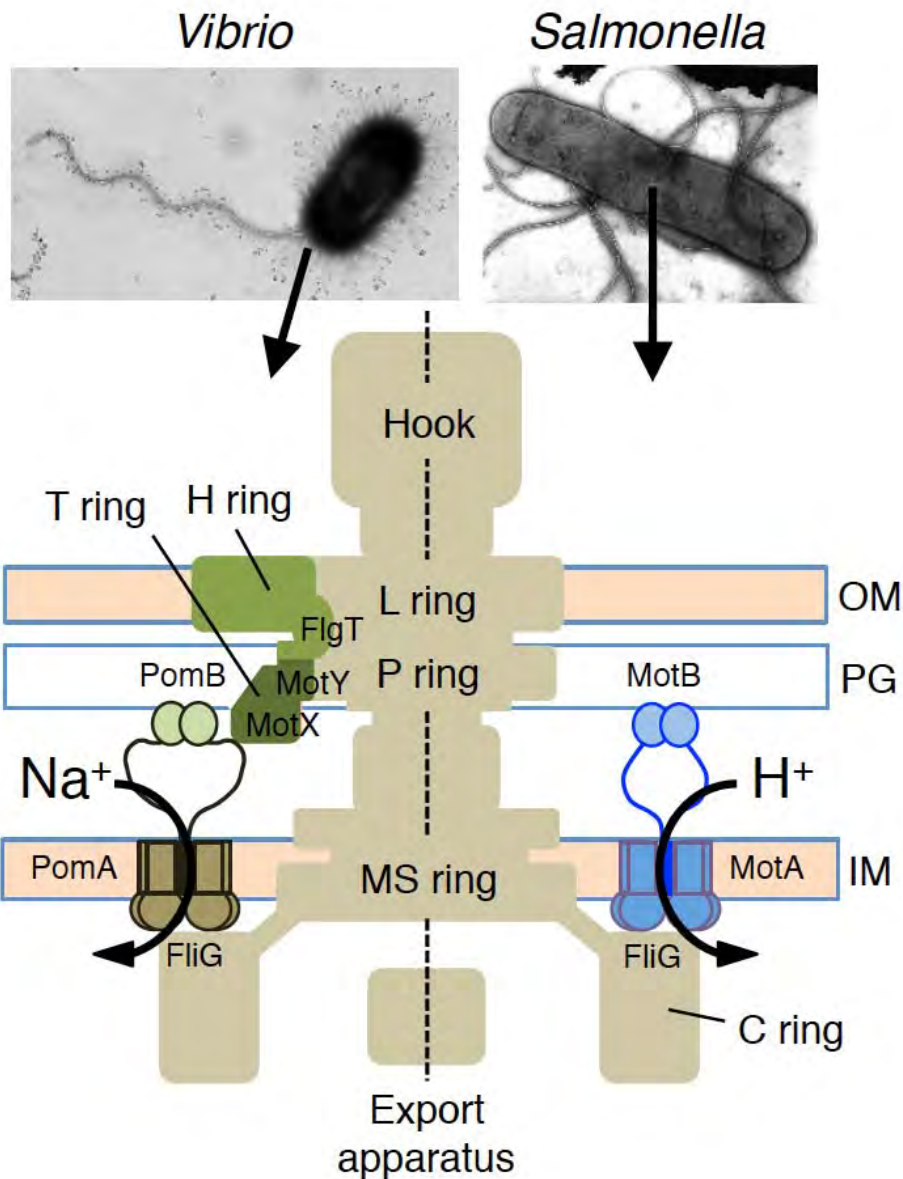


柔らかい寒天プレートに接種し
運動能が全くないものを選抜

- べん毛が生えていない
- べん毛は生えているが泳がない



VIO586株の取得
(固定子欠損変異体の候補株)



変異体形質の相補

変異体形質の解釈

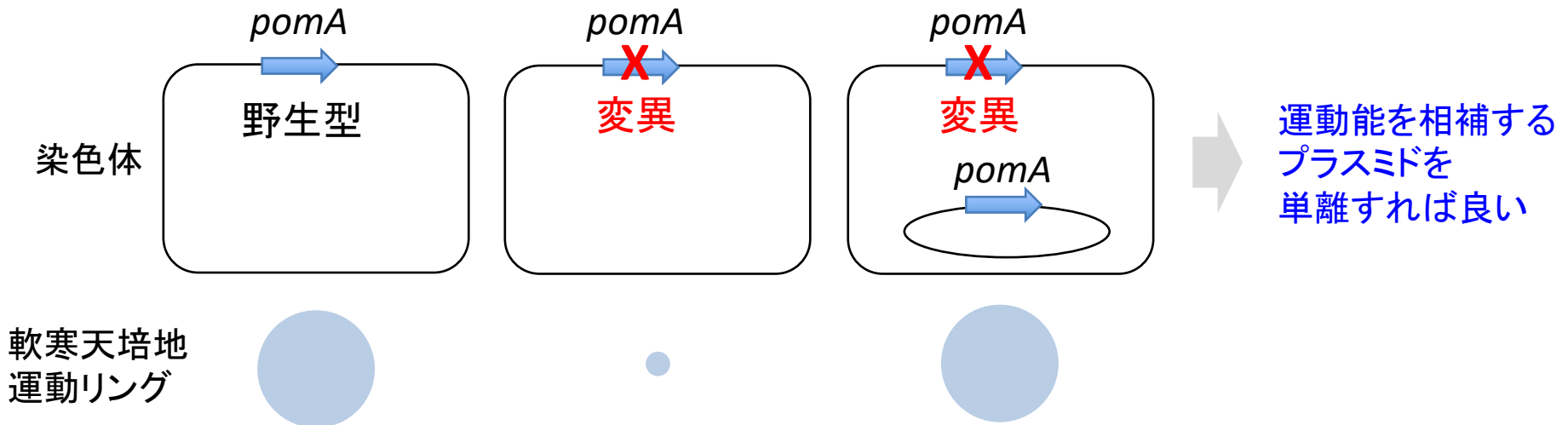
モータータンパク質が故障したために、べん毛は形成するが回転できない



モータータンパク質をコードする遺伝子に欠損(変異)が生じ、故障したタンパク質がつくられてしまった、あるいはタンパク質そのものが作られなかった



変異株に、プラスミドにコードされた正常な遺伝子を導入し発現させれば、正常なタンパク質が作られてモーターは回転するようになるのでは？(相補する、という)

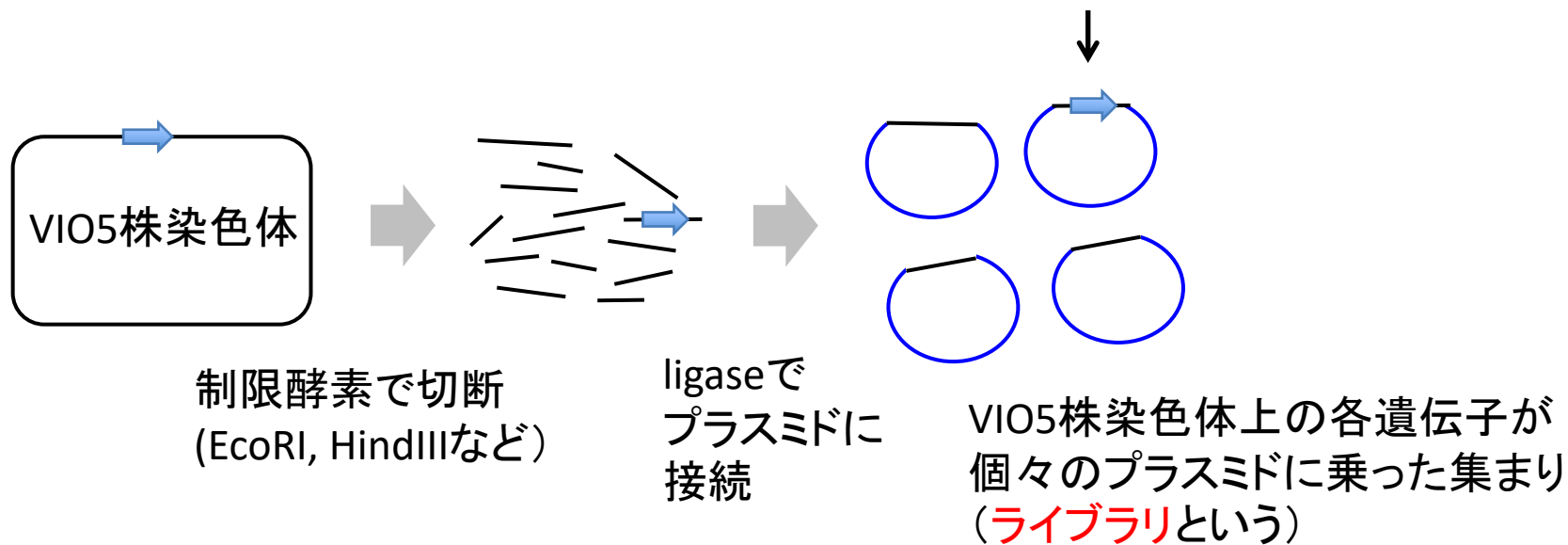


遺伝子ライブラリーの作成

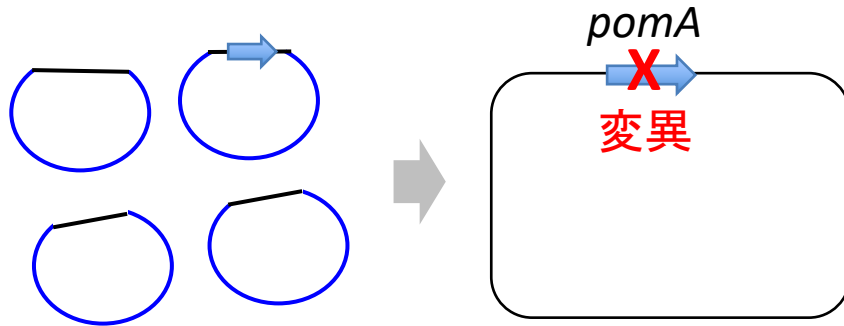
VIO586株の運動能を相補する遺伝子をもつプラスミドをどうやって単離するか？

親株VIO5の染色体には、故障していない遺伝子があるはず

- ➡ 親株VIO5の染色体を小さく切断し、それぞれプラスミドに組み込む
あるプラスミドには、**変異のない元の遺伝子**が組み込まれている



運動能欠損変異を相補するプラスミドの単離

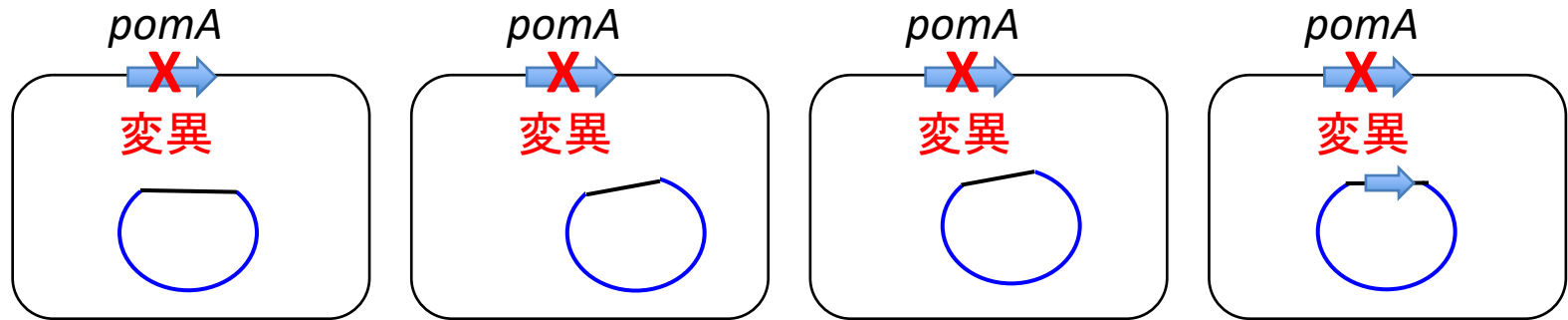


ポイント

一つの細胞にはひとつのプラスミドしか導入することができない
(不和合性という)

遺伝子ライブラリを
VIO586株へ導入する

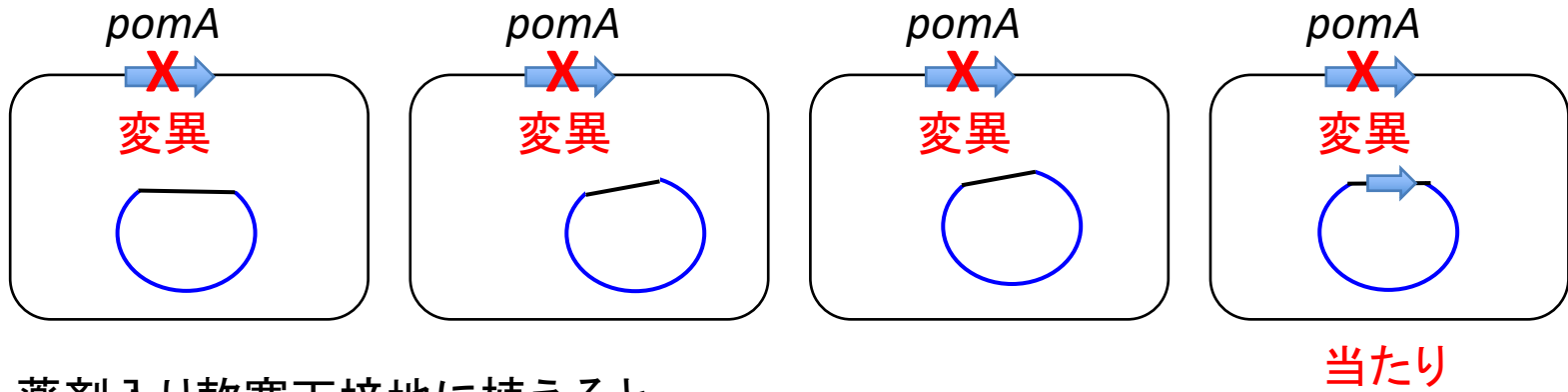
プラスミドには薬剤耐性遺伝子が乗っているのので、薬剤入り培地で生える細胞はプラスミドを持っていることになる。



当たり

どうやってこの細胞だけを選び出す？
(単離する、という)

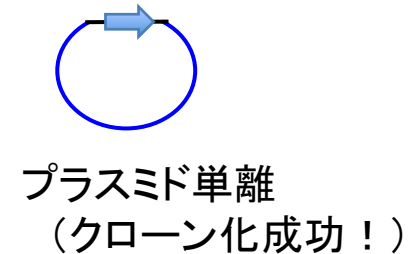
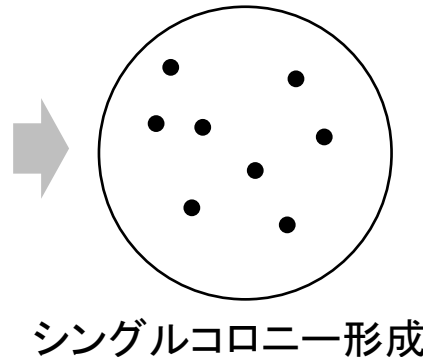
運動能欠損変異を相補するプラスミドの単離



薬剤入り軟寒天培地に植えると。。



このように
広がってくる



ポイント

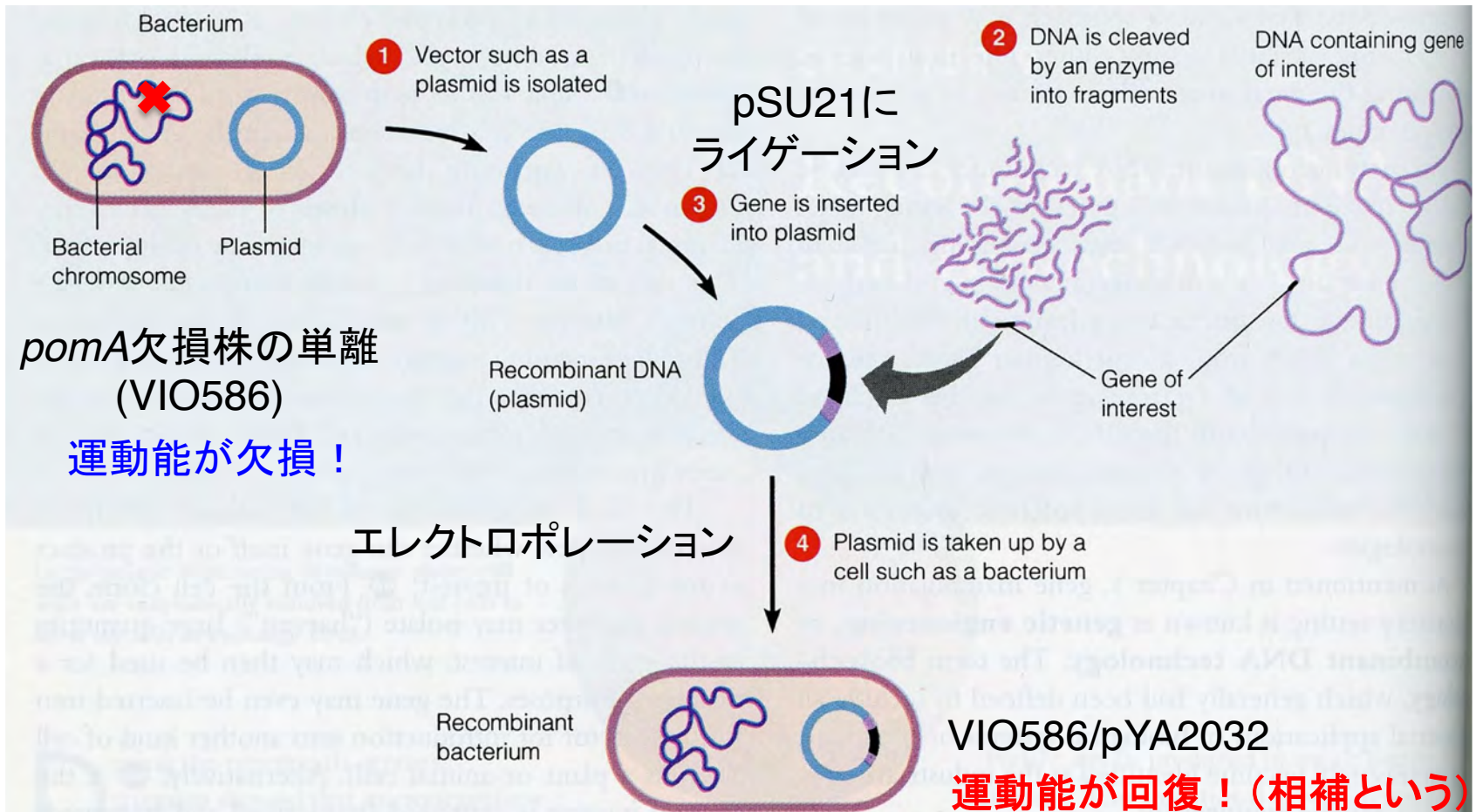
1つの細胞が分裂を繰り返し集落(コロニー)を形成する。つまり各シングルコロニーは1つの細胞に由来する遺伝的に同一の集団(クローンという)である。シングルコロニーに含まれるプラスミドは同一であり、このコロニー1個から培養を行いプラスミドを単離すれば、目的の遺伝子をもつプラスミドのクローンを得られる。

クローン化の道筋

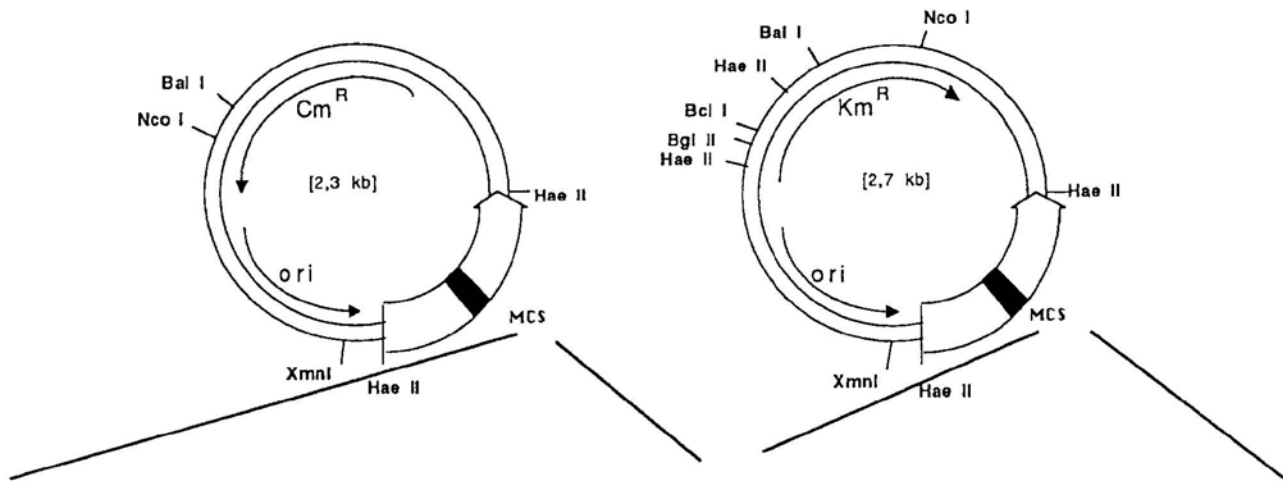
野生型 VIO5

↓ EMS mutagenesis

さまざまな染色体のDNA断片が含まれる
(ショットガンクローニング)



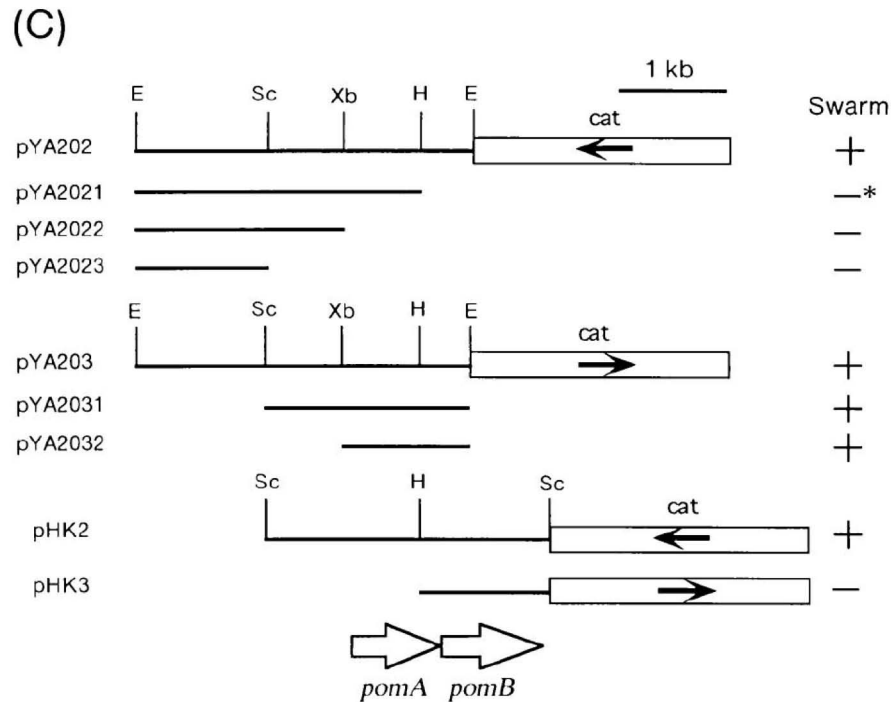
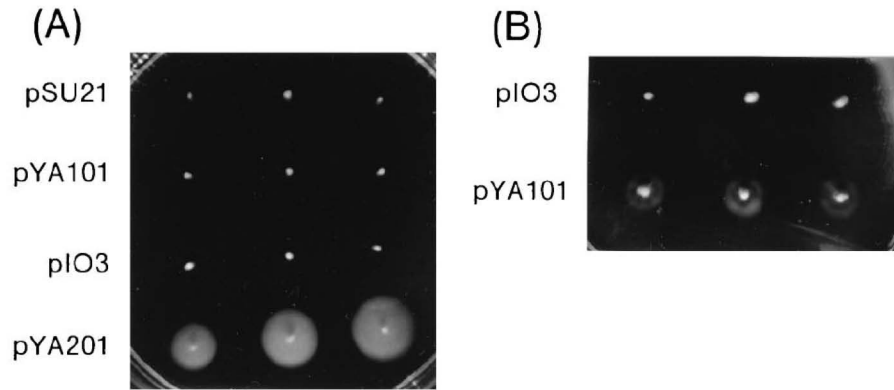
クローニングベクター：pSU21



pSU 8	<p style="text-align: center;"> Ava I Sal I Xma I Acc I Sma I Hinc II Hind III </p> <p> ATGACCATGATTACG <u>AATTC</u> CGG <u>GGATCC</u> GTC GAC <u>CTG CAG</u> CCA AGCTTG GCACT </p> <p style="text-align: center;"> Eco R I Bam H I Pst I </p>	pSU 36
pSU 9	<p style="text-align: center;"> Hind III Sal I Ava I Acc I Xma I Hinc II Sma I Pst I Bam H I Eco R I </p> <p> ATGACCATGATTACGCC <u>AGCTTG</u> GCT GCA GGT CGA CCG ATC CCC GGG AATTC A CTG GC </p>	pSU 37
pSU 18	<p style="text-align: center;"> Eco R I Kpn I Bam H I Sal I Sac I Xba I Hinc II Acc I Sma I Xma I Pst I Sph I Ava I </p> <p> ATGACCATGATTACGAA <u>TTC</u> GAG CTC GGT ACC CCG GGA TCC TCT AGA GTC GAC CTG CAG GCA TGC AAG CTT GGC ACT </p>	pSU 38
pSU 19	<p style="text-align: center;"> Hind III Pat I Xba I Ava I Sph I Hinc II Bam H I Xma I Hinc II Acc I Kpn I Sma I Sal I </p> <p> ATGACCATGATTACGCC <u>AAGCTT</u> GCA TGC CTG CAG GTC GAC TCT AGA GGA TCC CCG GTACC GAG CTC AATTC ACT GGC </p>	pSU 39
pSU 20	<p style="text-align: center;"> Hind III Xho I Xba I Cla I Sac I Sph I Hinc II Bam H I Kpn I Eco R I Hinc II Acc I Sal I </p> <p> ATGACCATGATTACGCCA <u>AGCTTG</u> CAT GCC CCT CGA GGG GTC GAC TCT AGA <u>GGATCC</u> CCC ATC GAT GGG GTA CCG AGC TCG <u>AATTC</u> </p>	pSU 40
pSU 21	<p style="text-align: center;"> Hind III Cla I Xba I Xho I Sac I Sph I Hinc II Bam H I Kpn I Eco R I Hinc II Acc I Sal I </p> <p> ATGACCATGATTACGCCA <u>AGCTTG</u> CAT GCC CAT CGA TGG GTC GAC TCT AGA <u>GGATCC</u> CCC CTC GAG GGG GTA CCG AGC TCG <u>AATTC</u> </p>	pSU 41



pSU21にクローン化された*pomA*



VIO5の染色体を断片化
(Hind III と Eco RI)



VIO586の運動能を相補したプラスミド

Hind III : pYA101

Eco RI : pYA201



制限酵素マップを作成



最小断片をもつpYA2032の
挿入配列をシーケンス(*pomA*)



ホモロジーサーチで、後ろに
motB に似た配列が!



最初にpYA101で単離していた
DNAに戻って、Sac I断片部分を
シーケンス、*pomB*を発見

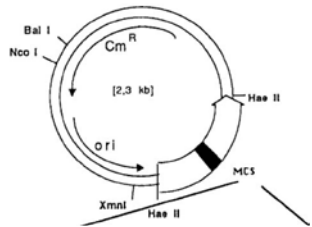
細菌細胞を研究に用いる場合、どの状態の細胞を実験に用いるのが良いだろうか？ log phase (early, mid, late), stationary phase, lag phaseから選べ。

- 1) 形質転換用コンピテントセル作成 **early log**
- 2) タンパク質の大量発現 **mid log**
- 3) 細菌細胞の運動能 **late log**

プラスミドベクターpSU21のEco RIサイトに、ビブリオ菌VIO5株の染色体をEco RIで切断して得たDNA断片をクローニングしたい。

プラスミドpSU21はクロラムフェニコール耐性遺伝子(*cat*)をコードしている。極べん毛回転能を欠損したビブリオ菌VIO586に作成したプラスミドを導入した。回転能を回復(相補)した株は、どのような条件で選抜すればよいか？

<参考>



回転能が回復するには、マルチクローニングサイトにVIO586で欠損している遺伝子の、野生型が組み込まれたプラスミドを形質転換し、選抜する必要がある。
クロラムフェニコールを含む硬いプレートで形成されたシングルコロニーを一つずつ柔らかい寒天プレートに植菌し、広がるものを選抜する。

マルチクローニングサイト(MCS)にEco RIサイトがある

学籍番号:

名前: