

Calothrix sp. PCC7716の宿主-ベクター系の開発

日大生産工 ○片山 光徳

1 まえがき

*Calothrix*属は一端が先細りになる糸状の群体（糸状体）を形成するシアノバクテリアの仲間である（図1A）。私は *Calothrix*を含む数属のシアノバクテリアが光の方へ屈曲しながら成長する光屈性¹⁾の能力を有することを見いだしたが（図1B），原核生物における光屈性の観察例はほとんどなく，これまでの報告はシアノバクテリアからのみである²⁾。

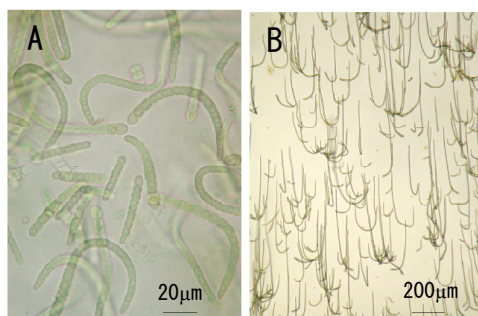


図1 *Calothrix* sp. PCC7716の顕微鏡写真。A個々の糸状体の拡大図。B 写真上方からの光に応答して光屈性を示している糸状体。

*Calothrix*の光屈性は青色光および緑色光で誘導されるが，光情報伝達に関わる分子の実体は不明である。私は最近*Calothrix*属のシアノバクテリア*Calothrix* sp. PCC7716（以下*Calothrix* 7716と略記）のドラフトゲノム配列を解析し，光屈性の光受容体として働いていると予想される青色光および緑色光受容体候補を複数見いだした。本報告では，これらのゲノム情報にもとづいて分子遺伝学的な解析方法を用い，*Calothrix* 7716の光屈性の機構を解明するため，シアノバクテリアと大腸菌のシャトルベクターを用いた宿主-ベクター系を作製したので，その概要について報告する。

2 実験方法

Calothrix sp. PCC7716よりアルカリ法を用いて内在性のプラスミドを多く含むDNAを抽出した。このDNAにin vitro トランスポゾン挿入キットEZ::Tn™ <R6Kγ ori/KAN-2> Insertion Kit（Epicentre社）を用いて，カナマイシン耐性遺伝子と大腸菌の複製領域を含むトランスポゾンの挿入反応を行った。反応液を用いて大腸菌TransforMax™ EC100D™ pir-116を形質転換した。得られたプラスミドをエレクトロポレーションにより*Calothrix* 7716に導入して形質転換能力の有無を検討するとともに，サブクロニングによって*Calothrix* 7716での複製に必用な最小領域の特定を行った。

3. 実験結果と検討

Calothrix 7716の内在性のプラスミドp7716a(14838bp)上に2箇所トランスポゾンが挿入されたプラスミドEZTN#6が得られた（図2）。EZTN#6をエレクトロポレーションにより*Calothrix*7716に導入したところ，カナマイシン耐性の形質転換体を得られ，形質転換体では本プラスミドが保持されることが分かった（表1）。

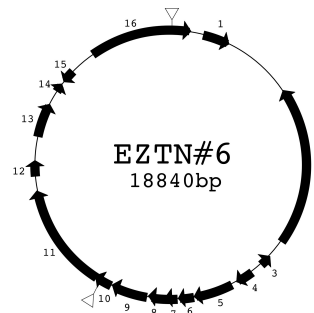


図2 プラスミドEZTN#6 p7716a上に存在するオープンリーディングフレームを矢印で，挿入されたトランスポゾンを三角形で示した。

Development of a Host-Vector System for Cyanobacterium *Calothrix* sp. PCC7716
Mitsunori KATAYAMA

表1 各種プラスミドによる*Calothrix* 7716の形質転換の結果。形質転換体はPCRにより細胞内にプラスミドが検出されたものをさしている。pACYA184MTはAvaIメチラーゼ遺伝子およびFspIメチラーゼ遺伝子を含むプラスミドである。

使用DNA	宿主株	DNA濃度	導入条件	形質転換体 ^{+/} / 調査したKmR株
EZTN#2/pACYC184MT ⁺	7716#6 ⁺	80μg/ml	8kV, 13.8ms	0/9
EZTN#4/pACYC184MT ⁺	7716#6 ⁺	80μg/ml	8kV, 13.8ms	9/9
EZTN#6/pACYC184MT ⁺	7716#6 ⁺	80μg/ml	8kV, 13.8ms	10/16
EZTN#2/pACYC184MT ⁺	7716#6 ⁺	—	8kV, 13.8ms	0/2
EZTN#4/pACYC184MT ⁺	7716#6 ⁺	—	8kV, 13.8ms	1/2
EZTN#6/pACYC184MT ⁺	7716#6 ⁺	—	8kV, 13.8ms	6/6
EZTN#4	7716野生株	18μg/ml	10kV, 13.8ms	0/16
EZTN#4/pACYC184MT ⁺	7716野生株	40μg/ml	10kV, 13.8ms	1/16
EZTN#4/pACYC184MT ⁺	7716野生株	40μg/ml	10kV, 13.8ms	6/23
EZTN#4NX-EB/pACYC18	7716#6 ⁺	8μg/ml	10kV, 13.8ms	0/11
EZTN#4NX/pACYC184MT	7716#6 ⁺	16μg/ml	10kV, 14.5ms	10/10
EZTN#4/pACYC184MT ⁺	7716-C18 ⁺	16μg/ml	8kV, 13.8ms	6/24
EZTN#4/pACYC184MT ⁺	7716-C19 ⁺	16μg/ml	8kV, 13.8ms	6/12

p7716a上の種々の部分配列を含むプラスミドを作製し（図3），*Calothrix* 7716へと導入した結果，5873bpの領域が*Calothrix* 7716での複製に必需であることが分かった（図3，表1）。ここにはP4ファミリーファージ/プラスミドプライマーゼに類似した遺伝子，および2つの機能未知の遺伝子が含まれていた。

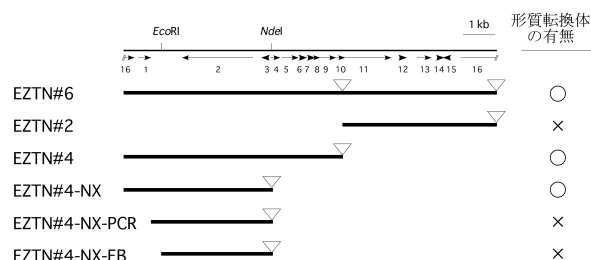


図3 サブクローニングによるp7716a上の複製に必需な領域の特定。三角形はトランスポゾンを示している。形質転換体はPCRにより細胞内にプラスミドが検出された株を指す。

EZTN#4-NXを導入した形質転換体からは元のプラスミドp7716aが失われており，p7716a上の多くのオープンリーディングフレームは*Calothrix* 7716の生存に必須ではないことが分かった。また，高い形質転換効率を得るためには，導入するプラスミドをあらかじめ近縁のシアノバクテリア由来のAvaIメチラーゼおよびFspIメチラーゼ

遺伝子を含むプラスミド（pACYC184MT）と大腸菌内で共存させる必要があったことから（表1），*Calothrix* 7716には外来DNAの導入の際に障害となる制限酵素を有することが示唆された。

4. まとめ

Calothrix 7716と大腸菌の複製に必需な領域を含むシャトルベクターをEZTN#4-NXを作製し，*Calothrix* 7716の宿主-ベクター系を確立した。これにより*Calothrix*属シアノバクテリアの遺伝子操作が初めて可能となった。本結果はゲノム情報を用いた分子遺伝学的な解析によりシアノバクテリアの光屈性研究に役立つだけではなく，*Calothrix*属のシアノバクテリアを用いた有用物質生産にも利用できるものと期待される。

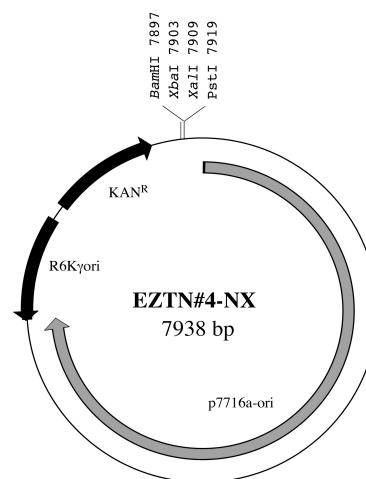


図4 *Calothrix*7716と大腸菌のシャトルベクターEZTN#4-NX。p7716a-oriとR6Kgyoriはそれぞれ*Calothrix*と大腸菌内での複製に必需な領域を示している。

「参考文献」

- 1) 動く植物 山村庄亮／長谷川宏司 編著 大学教育出版
- 2) Phototaxis, phototropism, and photosynthesis in purple bacteria and blue-green algae, Adriaan Manten, 1948 (Doctoral thesis, Utrecht)