

10. 大腸菌の <i>lac</i> プロモーターを用いたスイサイド遺伝子のスクリーニング							
要約 発現すると微生物自らを死に至らしめる <u>スイサイド遺伝子のクローニング</u> を試み、大腸菌と放線菌の染色体 DNA から7個の遺伝子をスクリーニングした。これらの遺伝子は外部からのシグナルによる <u>大量発現</u> で宿主微生物の <u>生育を阻害</u> した。							
農環研 環境生物部 微生物管理科 土壤微生物利用研究室						連絡先	0298-38-8256
部会名	農業生態	専門	バイテク, 土壌	対象		分類	研究

[背景・ねらい]

今日、人為的に遺伝子を改変した組換え微生物の野外環境下での利用が検討されるようになり、組換え微生物の安全性をより高める手段の一つとしてスイサイド遺伝子が期待されている。組換え微生物が野外で目的達成後、あらかじめ導入しておいたスイサイド遺伝子の発現によって死滅すれば、環境への影響を最小限に抑えることができる。本研究では、大腸菌の系を用いてスイサイド遺伝子のスクリーニングを行なう。

[成果の内容・特徴]

- ① 大腸菌のプラスミド pUC 18 の *lac* プロモーターの下流に大腸菌及び放線菌の染色体 DNA 断片をショットガンクローニングし、得られた形質転換体を IPTG (イソプロピル-β-D-チオガラクトピラノシド) 存在下、すなわちクローニングされている遺伝子が大量に発現する条件下で培養した場合に、コロニーの形成が認められないクローンを選抜した。
- ② 放線菌及び大腸菌の染色体 DNA を用いて得られたそれぞれ1万個(計2万個)の形質転換体を用いて、放線菌 DNA から4個(S6, S74, S127, S401)、大腸菌 DNA から3個(E7, E16, E319)のスイサイド遺伝子クローンをスクリーニングした。
- ③ クローン化された断片には、同じ制限酵素切断パターンを示すものではなく、これらは全て独立のクローンであった(図1)。E7、及びE319については、DNAの塩基配列を決定し、これまでにその塩基配列が報告されていない遺伝子であることが明らかとなった。
- ④ IPTGの添加によりスイサイド遺伝子を発現させた場合の生育に及ぼす影響を液体培養で検討した結果、(1)宿主の生育を停止させるが生菌数は減少させない(S74, E319)、(2)宿主の生菌数を減少させる(S6, S401, E16)、(3)宿主の生菌数を一時的に減少させる(S127, E7)など、クローンによって宿主の生育に異なる影響を与えた(図2)。

[成果の活用面・留意点]

得られたスイサイド遺伝子は種々の細菌のスイサイドシステムに活用できるが、それぞれの宿主で、これらスイサイド遺伝子と連結する適当な誘導性プロモーターを検討する必要がある。

〔具体的データ〕

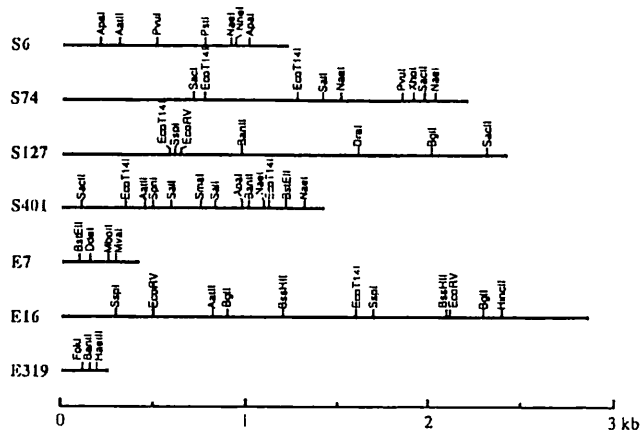


図 1 スイサイド遺伝子の制限酵素地図

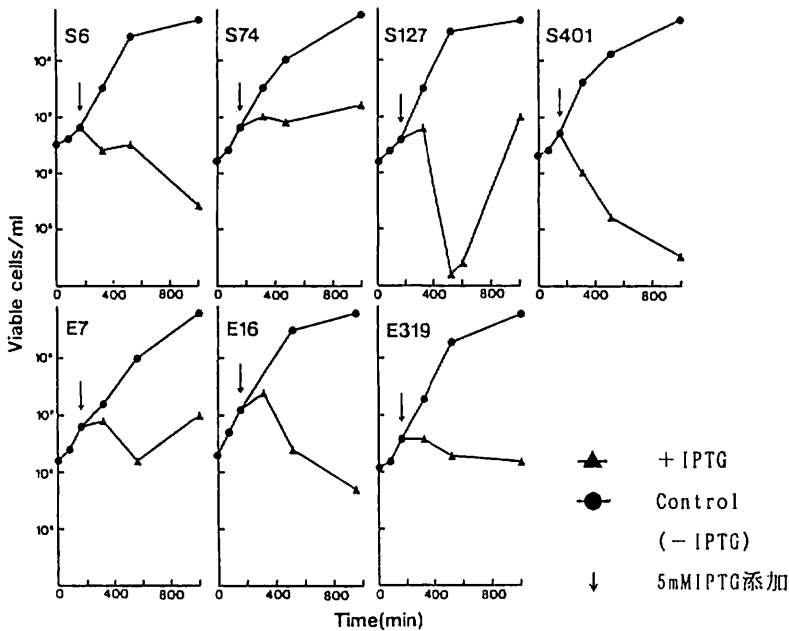


図 2 各種スイサイド遺伝子クローンの成育に及ぼす IPTG 添加の影響

〔その他〕

研究課題名：土壌微生物におけるスイサイド遺伝子の開発

予算区分：バイテク（アセスメント）

研究期間：平成4年度（平成2～4年）

研究担当者：藤井 毅，宮下清貴，木村龍介

発表論文等：放線菌及び大腸菌の染色体 DNA を用いた大腸菌生育阻害遺伝子のショットガンクローニング，日本農芸化学会誌，67 巻 3 号，p. 397 1993