

新生児髄膜炎由来大腸菌が保有する機能未知遺伝子のクローニング

◎西村穂香、糸田恵里¹⁾、深谷奈未¹⁾、梅田沙希¹⁾、中山 章文¹⁾
岐阜医療科学大学¹⁾

【目的】大腸菌による腸管外感染症において、新生児髄膜炎は敗血症と並ぶ重要な感染症である。我々はこれまで新生児髄膜炎由来大腸菌ゲノムについて次世代型シーケンサーによる全塩基配列の分析と大腸菌 K-12 株のゲノム塩基配列に対する遺伝子マッピング解析、遺伝子データベースに対する相同性検索と血液由来大腸菌株、尿由来大腸菌株、健康者便由来大腸菌株における遺伝子の保有状況の検討において、研究対象とした新生児髄膜炎由来大腸菌株に特有と思われる機能が未知な 6 種類の遺伝子(abx 52009、abx 52010、abx 52011、abx 52015、abx 52016、afh37373)を見出した。そこで、今回の研究ではこれら 6 種類の遺伝子の機能解明を進めるために、発現ベクターに目的遺伝子を組み込んだプラスミドを保有する組換え体の作成を試みた。

【方法と結果】6 種類の機能未知遺伝子のそれぞれについて、目的遺伝子の全長を増幅し且つ、プラスミドベクターのクローニングサイトの 15 塩基に相同的な配列を 5' 末端側に有するプライマーを設計し、DNA 合成過程において高い正確性を有する PrimeSTAR GXL DNA Polymerase を用いた PCR 法を実施した。PCR 法によって得られた増幅産物の相同組換えを原理とする In-Fusion 法によって発現ベクター pCold I に組込み、大腸菌 BL-21 株に対して形質転換した。アンピシリンを含む LB 寒天

培地に発育したコロニーを pCold I のシーケンス用プライマーを用いた PCR 法によって組換えプラスミドを保有する大腸菌株をスクリーニングした。保有を認めた大腸菌株より組換えプラスミドを精製してインサートの塩基配列を forward と reverse についてシーケンスして二重に調べた。その結果、6 種類全ての遺伝子について目的とする塩基配列が挿入されており、機能解析を目的とした発現実験を進めるための組換え体を作成できたことが確認された。

連絡先：中山章文 岐阜医療科学大学 (0575-22-9401)