## 練 習 問 題

### 用語

**問 1**

次のa～gの用語に最もよく合致するものを，下の1～7から選びなさい。

**a**　形質転換
**b**　接合
**c**　形質導入
**d**　溶菌サイクル
**e**　溶原化
**f**　エピソーム
**g**　栄養要求株

**1**　増殖のために培地に栄養の添加が必要である。
**2**　ファージ粒子を介した細菌間のDNAの導入
**3**　染色体に挿入できる小さな環状DNA
**4**　裸のDNAの導入
**5**　直接の接触を必要とするDNAの導入
**6**　ファージDNAの染色体への挿入
**7**　ファージの感染後，細胞は溶けて新しいファージ粒子が遊離される。

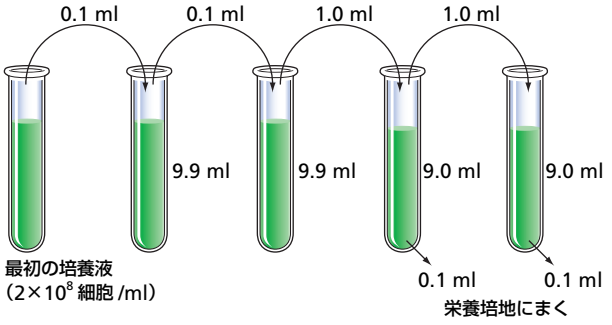
### 15.1

**問 2**

大腸菌は単細胞の桿状をした細菌で，約2 μmの長さと0.8 μmの幅をもち，単一の5.6 Mbの環状DNA分子をゲノムとしてもっている。古細菌のメタン細菌（*Methanosarcina acetivorans*）も単細胞で，直径3 μmの球状（球菌），5.7 Mbの環状ゲノムをもっている。単細胞の真核生物である酵母（*Saccharomyces cerevisiae*）は，おおよそ球状で直径は5～10 μmである。1倍体のゲノムは12 Mbで，16本の直鎖状染色体に分かれている。このような記述をもとに新しい未同定の微生物が，細菌，古細菌，真核生物かをどのように判定できるか？

**問 3**

1 mlあたり$2 \times 10^8$の濃度で細胞がいる大腸菌の溶液を，次の図に示すように順次希釈し，最後の2つの試験管から0.1 mlの溶液をとり，それぞれ栄養寒天培地にまいた。2つの寒天培地には，いくつのコロニーが生えてくるか？




### 15.2

**問 4**

大腸菌の全ゲノムの塩基配列（およそ5 Mb）がわかっているので，数ベースの塩基配列を決め，ゲノム情報のデータと照合すると，クローニングしたDNA断片がゲノムのどこから由来したかを正確に決めることができる。

**a**　1つの断片がどこからきたかを正確に決めるためには，いくつのヌクレオチド配列の情報が必要か？
**b**　大腸菌の細胞からタンパクを精製したとき，どの遺伝子がそのタンパクをコードしているかを知るには，タンパクのおよそいくつのアミノ酸を決めればよいか？

**問 5**

$Lac^-$，$Met^-$の大腸菌の培養液から，a　$Lac^+$細胞を選択する，b　$Lac^+$細胞をスクリーニングする，c　$Met^+$細胞を選択する場合の培地を，次のi～ivからそれぞれ選びなさい。

**i**　最少培地 + グルコース + メチオニン
**ii**　最少培地 + グルコース（メチオニンはない）
**iii**　栄養培地 + X-Gal
**iv**　最少培地 + ラクトース + メチオニン

**問 6**

リネゾリドは新しい種類の抗生物質で，数種の細菌でリボソームの50Sサブユニットに結合し，50Sサブユニットが翻訳開始複合体の形成に関与する活性を阻害している。医師は，この抗生物質に特にペニシリン耐性の肺炎双球菌（*Streptococcus pneumoniae*）が起こす肺炎の治療について関心をもっている。肺炎双球菌がリネゾリドに対して耐性となる仕組みを研究するためには，まずリネゾリド耐性の変異株を同定したい。次に，これらの1つの株を出発材料にして，もはやリネゾリドに耐性を失った変異株を同定したい。

**a**　リネゾリド耐性の肺炎双球菌の変異株と，そこからリネゾリド感受性に転じた変異株を見つけ出す手法の概略を述べなさい。ただし，それぞれの場合で，直接的な選択，

スクリーニングの方法，レプリカ法，変異株の濃縮法，変異原による処理，肉眼で観察できる試験などが考えられる。

**b** 同定した2種類の表現型を引き起こしている変異について示しなさい。また，細菌細胞内では，どのような種類の反応が変異によって変化したのか，この2つの変異を機能喪失あるいは機能獲得として分類できるかについて書きなさい。

### 問7

IS因子の数は，実験用の大腸菌の株によって異なっている。IS1の中には制限酵素，*Eco*RIによる認識部位はない。2つの大腸菌のB株とK株にあるIS因子の数を決めることができるか？

### 問8

一般に大腸菌の株には，1細胞あたり1コピーのFプラスミドが存在している。コピー数が細胞あたり3～4個に増えた変異株を単離したらしい（コピー数は，ハイブリッド形成実験によって決めることができる）。どのようにしたらコピー数の変化は，Fプラスミドに起きた変異によるのものか，あるいは染色体遺伝子の変異なのかという可能性を見分けることができるか？

### 問9

毒素をコードしている遺伝子は，しばしばプラスミドがもっている。最近，通常は非病原性なのに毒素をつくっている菌が流行し始めた。この新しい病原菌株からプラスミドDNAを単離し，染色体DNAと分離した。プラスミドDNAに毒素をコードしている遺伝子があるかどうかを決めるには，全プラスミドの塩基配列を決定し，他の既知の毒素遺伝子と似通った配列があるか調べなければならない。DNAの塩基配列の解析をしないでも，毒素の遺伝子がプラスミドDNAにあるかどうかを決める簡単な方法がある。この簡単な方法についての実験法を書きなさい。

## 15.3

### 問10

**a** 近接して連鎖した遺伝子*ptsI*と*purC*の遺伝地図をつくるのにF因子が45分近くに挿入され，導入の方向が染色体の“番地”としては，分の数値が上昇する方向のものを選んだ。図15.16（p.493）を手引きにして，組換えの解析のために接合体を選択するのに都合のよいマーカーを書きなさい。

**b** aで答えたHfr株で，$TyrA^+$，$PtsI^+$，$PurC^+$のものと$F^-$株で，3つの形質がすべてマイナスのものの交配を行って，$TyrA^+$の接合体を選択した。接合体として次のような組合せのものが得られる頻度を書きなさい。

**i** $TyrA^+$，$PtsI^+$，$PurC^+$
**ii** $TyrA^+$，$PtsI^+$，$PurC^-$
**iii** $TyrA^+$，$PtsI^-$，$PurC^+$
**iv** $TyrA^+$，$PtsI^-$，$PurC^-$

### 問11

**a** Hfr株で$Pyr^+$，$Met^+$，$Xyl^+$，$Tyr^+$，$Arg^+$，$His^+$，$Mal^+$，$Str^S$を使って，接合中断実験を行うことにした。この交配の相手としてしかるべき細菌の株を書きなさい。

**b** Hfr × $F^-$の交配で，*pyrE*遺伝子は5分で受容菌に導入されるが，この時点では$Met^+$，$Xyl^+$，$Tyr^+$，$Arg^+$，$His^+$，$Mal^+$になった接合体はなかった。交配はさらに30分間進行させ，$Pyr^+$接合体を選択した。$Pyr^+$細胞のうち，32％は$Met^+$，94％は$Xyl^+$，7％は$Tyr^+$，59％は$Arg^+$，$His^+$はなく，71％は$Mal^+$であった。これらの遺伝子はどういう順序にあると結論できるか？

### 問12

次のような遺伝子型の株がある。

Hfr *cys*$^-$ *trp*$^+$ *man*$^+$ *his*$^+$ *tyr*$^+$ *thr*$^+$ *str*$^s$
$F^-$ *cys*$^+$ *trp*$^-$ *man*$^-$ *his*$^-$ *tyr*$^-$ *thr*$^-$ *str*$^r$

これらの変更は，下のような表現型を示す。

$Cys^-$　：システインを合成できない
$Str^S$　：ストレプトマイシン感受性
$Trp^-$　：トリプトファンを合成できない
$Man^-$：マンノースという糖を利用できない
$His^-$　：ヒスチジンを合成できない
$Tyr^-$　：チロシンを合成できない
$Thr^-$　：スレオニンを合成できない
$Str^r$　：ストレプトマイシン耐性

**a** Hfr株を増殖させるのに最も簡単な最少培地はどんなものか？$F^-$株はどうか？

**b** 2つの株を混合し，2つの実験を行った。
実験1：試料をとって希釈し，ヒスチジン，チロシン，スレオニン，ストレプトマイシン，グルコースを添加した最少培地にまいた。
実験2：同様な実験を行ったが，希釈する前に交配中の混合液をミキサーで処理をした。
実験2では8分後までコロニーを検出できなかった。実験1では早い時間にいくつかのコロニーが得られた。どうして2つの実験では結果が異なるのだろうか？

**c** 実験2で$Man^+$の接合体を選択するのにどんな培地がよ

いか。

**d**　次の表は，bにおける実験2のデータを示している。

| マーカー | 最初に組換え体が現れる時間（分） |
|---|---|
| $Man^+$ | 15.5 |
| $His^+$ | 24 |
| $Thr^+$ | 16 |
| $Tyr^+$ | 16 |

Hfrの導入起点と遺伝子の地図をつくりなさい。

**e**　あいまいさを避けるために，次のような交配を行った。

交配3　Hfr $man^+\ thr^-\ tyr^+ \times F^-\ man^-\ thr^+\ tyr^-$
交配4　Hfr $man^+\ thr^+\ tyr^- \times F^-\ man^-\ thr^-\ tyr^+$

いくつの野生株の組換え体ができるかを調べたところ，交配3のほうが交配4よりもはるかに多かった。これら3つの遺伝子の順序を示しなさい。

## 問13

普遍形質導入にも特殊形質導入にも両方にバクテリオファージが使われる。これらの2つの形質導入の違いは何であるか？

## 問14

遺伝子型が*ilv*$^+$，*bgl*$^+$，*mtl*$^+$のHfr株と*ilv*$^-$，*bgl*$^-$，*mtl*$^-$のF$^-$株で交配を行い，*ilv*遺伝子は*bgl*遺伝子や*mtl*遺伝子よりもあとで導入されることがわかっていた。*ilv*に対して*bgl*と*mtl*の順序を決めるために，Ilv$^+$接合体を選択し，そのコロニーをBglとMtlの表現型についてスクリーニングした。次のデータにもとづくと，3つの遺伝子の順序はどうなるか？

| 接合体の種類 | 接合体の数 |
|---|---|
| $Ilv^+\ Mtl^+\ Bgl^+$ | 220 |
| $Ilv^+\ Mtl^-\ Bgl^-$ | 60 |
| $Ilv^+\ Mtl^+\ Bgl^-$ | 0 |
| $Ilv^+\ Mtl^-\ Bgl^+$ | 18 |

## 問15

新しい細菌の2つの単離した株（1つはアンピシリン耐性，もう1つはアンピシリンに感受性）で，アンピシリン耐性をコードする遺伝子は感受性菌に導入されることがわかった。遺伝子の導入が形質導入によるのか，形質転換によるのかを調べるために，細菌を混合した培養液をDNaseで処理した。どうしてこの処理が2つの遺伝子導入の様式を区別できるのだろうか？ 遺伝子の導入が形質転換であった場合と形質導入であった場合の結果を予測しなさい。

## 問16

独立栄養（栄養要求となる変異をもっていない）で$Str^S$のF$^+$株から出発して，いくつかのHfr株を独立に単離した。これらのHfr株はF$^-$株（$Str^r$，$Arg^-$，$Cys^-$，$His^-$，$Ilv^-$，$Lys^-$，$Met^-$，$Nic^-$，$Pab^-$，$Pyr^-$，$Trp^-$）と交配した。接合中断実験から，Hfr株は野生株の対立遺伝子を時間に応じて，次の表に示す順序で導入した。導入された遺伝子で（　）で示したものは，互いに導入の順序が区別できなかった。

| Hfr株 | 導入の順序 → |
|---|---|
| HfrA | *pab ilv met arg nic (trp pyr cys) his lys* |
| HfrB | *(trp pyr cys) nic arg met ilv pab lys his* |
| HfrC | *his lys pab ilv met arg nic (trp pyr cys)* |
| HfrD | *arg met ilv pab lys his (trp pyr cys) nic* |
| HfrE | *his (trp pyr cys) nic arg met ilv pab lys* |

**a**　このデータから，これらの遺伝子の相対的な位置を示した遺伝地図をつくりなさい。また，挿入されたFプラスミドの位置と方向を示す矢印を使って，それぞれのHfr株に示しなさい。

**b**　*trp*，*pyr*，*cys*遺伝子の相対的な順序と距離を決めるためにHfrBとF$^-$株を，*nic*マーカーが導入されるまでかなり長い時間交配してから，Trp$^+$組換え体を選択した。Trp$^+$組換え体から非選択遺伝子の*pyr*と*cys*を調べ，次の結果を得た。

| 組換え体の数 | Trp | Pyr | Cys |
|---|---|---|---|
| 790 | ＋ | ＋ | ＋ |
| 145 | ＋ | ＋ | − |
| 60 | ＋ | − | ＋ |
| 5 | ＋ | − | − |

*trp*，*pyr*，*cys*遺伝子のそれぞれの相対的な遺伝地図をつくりなさい（このデータを使っては*nic*や*his*遺伝子との相対的な順序を決めることができないことに注意しなさい）。また，隣接した遺伝子間の遺伝地図上の距離を2つの間の乗換えの頻度として示しなさい。

**c**　*trp*，*pyr*，*cys*領域の遺伝子の詳細な研究には，3つの遺伝子をもっているF′プラスミドが必要となるだろう。前で示したどのHfr株が，そのようなF′プラスミドを単離するのに使えるだろうか？

## 問17

アルギニンの生合成の遺伝子の1つに，3つの独立した変異をつくった*arg*遺伝子の3つの変異（*arg101*，*arg102*，*arg103*）の遺伝地図上の位置を知るために，次のようなHfr × F$^-$の接合を行い，Lac$^+$を選択し，その後でArgの表現型をスクリーニングした。

| 交配 | Hfr（*lac*$^+$） | F$^-$（*lac*$^-$） | Arg$^+$であり Lac$^+$の割合（%） |
|---|---|---|---|
| A | *arg101*$^-$, *arg102*$^+$ | *arg101*$^+$, *arg102*$^-$ | 0.50 |
| B | *arg101*$^+$, *arg102*$^-$ | *arg101*$^-$, *arg102*$^+$ | 0.02 |
| C | *arg101*$^+$, *arg103*$^-$ | *arg101*$^-$, *arg103*$^+$ | 0.50 |
| D | *arg101*$^-$, *arg103*$^+$ | *arg101*$^+$, *arg103*$^-$ | 0.04 |
| E | *arg102*$^+$, *arg103*$^-$ | *arg102*$^-$, *arg103*$^+$ | 0.50 |
| F | *arg102*$^-$, *arg103*$^+$ | *arg102*$^+$, *arg103*$^-$ | 0.06 |

3つの*arg*変異の遺伝地図をつくりなさい。また，*lac*遺伝子に対する相対的な3つの変異の部位の順序を示しなさい。

### 問18

寒天培地上の小さな区画で，2種類の細胞を混ぜてから選択培地にレプリカする方法でHfrとF$^-$の株の交配を行うことができる。この方法は何百という異なる株の組換え欠損株*recA*$^-$をスクリーニングするのに使われた。どうしてこの方法がRecA機能の試験に使えるのか？ このプロトコールを使って，F$^-$株あるいはHfr株の*recA*$^-$変異をスクリーンできるだろうか？

### 問19

大腸菌でマルトース遺伝子（*mal*$^+$）を含むF′が発見された。

**a**　大腸菌のF$^+$株から出発して，この因子がつくり出されるのに起きた大腸菌染色体の反応を図示しなさい。

**b**　F′ *mal*$^+$因子をF$^-$ *mal*$^-$株に導入した。生じた細胞の大部分は，この因子を他のF$^-$株に導入することができた。しかし，ときどき，マルトース遺伝子から始まり，大腸菌の染色体全体を導入するものが現れた。このような株が生じたときに起こったと考えられる染色体の反応を図示しなさい。

### 問20

大腸菌で，完全に独立栄養株でストレプトマイシン感受性（野生株）のF$^+$株に由来した2つのHfr株（HfrA，HfrB）がある。別の実験では，F$^-$受容菌（Rcp）としてストレプトマイシン耐性で，グリシン（Gly$^-$），リシン（Lys$^-$），ニコチン酸（Nic$^-$），フェニルアラニン（Phe$^-$），チロシン（Tyr$^-$），ウラシル（Ura$^-$）の栄養要求株を上の2つのHfr株と交配した。接合中断実験のプロトコールにより，ストレプトマイシン耐性の受容菌に最も早い時間にマーカーが交配後に導入される時間は，次のようになった。

| | Gly$^+$ | Lys$^+$ | Nic$^+$ | Phe$^+$ | Tyr$^+$ | Ura$^+$ |
|---|---|---|---|---|---|---|
| HfrA × Rcp | 3 | * | 8 | 3 | 3 | 3 |
| HfrB × Rcp | 8 | 3 | 13 | 8 | 8 | 8 |

（*はLys$^+$細胞が60分実験を続けても回収できなかったことを示している）

**a**　これらのデータから得られる最良の遺伝地図をつくり，遺伝子の相対的な位置と，HfrH株とHfrB株の導入起点を示しなさい。可能ならば遺伝子間の距離も示しなさい。

**b**　この遺伝地図のあいまいさをなくすために，ファージP1による普遍形質導入を使い，遺伝子の同時形質導入を調べた。ファージP1はHfrB株で生やし，その溶菌液をRcp株に感染させた。1,000個のPhe$^+$コロニーを選択し，非選択マーカーをスクリーニングしたところ，次の結果を得た。

| | 表現型 | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| 形質導入体の数 | Gly | Lys | Nic | Phe | Tyr | Ura |
| 600 | − | − | − | + | − | − |
| 300 | − | − | − | + | − | − |
| 100 | − | − | − | + | + | + |

前述の同時形質導入のデータを使って，最良の遺伝子の順序を示しなさい。

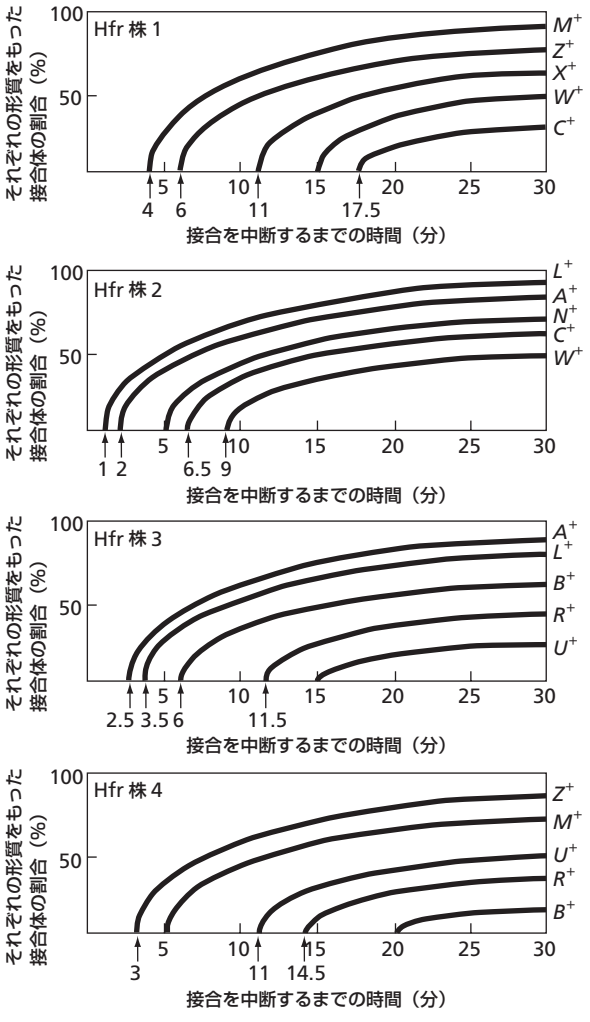
**c**　少なくとも他のいくつかの遺伝子と*gly*遺伝子の相対的な遺伝地図の位置を普遍形質導入により決めようと考えた。実験がうまくいく可能性を増すには，前で示した同時形質導入実験をどのように変更すればよいだろうか？ 使用する培地の組成を述べなさい。

### 問21

大腸菌の4つのストレプトマイシン感受性で独立栄養のHfr株と，いくつかの栄養要求遺伝子をもった（アルファベットの文字で示してある）ストレプトマイシン耐性のF$^-$株を交配した。接合はさまざまな間隔で中断し，細胞をストレプトマイシンと個々の栄養素を補充した最少培地を含む寒天培地にまき，遺伝子の導入を調べた。この結果は，次のグラフに示してある。

**a**　これらのデータによく一致した大腸菌の遺伝地図を描きなさい。また，遺伝子間の距離と4つのHfr株の導入起点を示す矢印の方向を使って示しなさい。

**b**　もし，F′（*N*$^+$）プラスミドをつくり，相補性試験を行いたい。どのようにすれば，そのためのプラスミドを得られるか。グラフにある4つの株のどれを使えばよいかを示し，F′（*N*$^+$）プラスミドを単離するまでの手順を簡潔に書きなさい（ヒント：N遺伝子が導入される時間がHfr株とF′（*N*$^+$）株でどのように異なるかを考えなさい）。




## 15.4

### 問22

1995年にインフルエンザ菌（*H. influenzae*）のゲノムのDNA塩基配列の決定は完了した。非病原性のインフルエンザ菌*Rd*のDNAと病原性の*b*株のDNAを比べると，細菌が宿主細胞に付着するためのフィンブリエという襞のある突起をコードする遺伝子クラスター（*purE*と*pepN*遺伝子の間に位置している）中の8つの遺伝子が非病原性の細菌では完全に欠如していた。非病原性と病原性の株から得たDNAを使い，*purE*と*pepN*との同時形質転換を行うとどのような結果となるか？

### 問23

**a**　次のような技術的な情報を決められた順に適用すると，どのようにして大腸菌の細胞の中で直接βガラクトシダーゼと結合するタンパクをコードする遺伝子が同定できるか。(1) βガラクトシダーゼタンパクはAPTGアガロースと呼ばれる樹脂に非常に強く結合する。(2) タンパク中の20アミノ酸は大きく分子量を変化させる。(3) トリプシンという酵素は3～40アミノ酸の範囲になる長さの小さなペプチドをタンパクから切り出す。酵素は予想ができ，再現性の高い切断を行う（リシンとアルギニンの直後で切断する）。(4) 質量分析器を使った最新の技術で，ペプチドの分子量は0.01％の誤差程度の正確さで測定できる。質量分析器は複雑な大量のペプチドの混合物の分子量を同時に決めることができる。(5) 大腸菌ゲノムの全DNA配列は決定されている。

**b**　aで記述した手法をより一般化し，大腸菌のほかの特定のタンパクに結合するタンパクをコードする遺伝子を同定する方法を述べなさい（ヒント：βガラクトシダーゼがAPTGアガロースに結合するということをこの問題にも使うとよい）。

### 問24

大腸菌で膜にタンパクを埋め込む活性に影響する新しい温度感受性変異を単離した。非許容温度では，細胞は増殖することができず，コロニーを形成できない。

**a**　一連のHfr株で，導入起点が染色体上に5分間隔で位置し，最初の5分で導入されるマーカーとしてTn10の挿入をもっているものを使い，新しい変異の位置をどのように素早く狭めることができるか？ また，何回の交配をしなければならないか？

**b**　もしHfrのセットが得られなければ，プラスミドのセット（平均の長さは20 kb）を使い，形質転換により変異の位置を決めることができる。ゲノム全体をちょうど覆いつくすのにいったいいくつのプラスミドを形質転換しなければならないか？ ただし，プラスミドはそれぞれ1 kbの重複があると仮定しなさい。

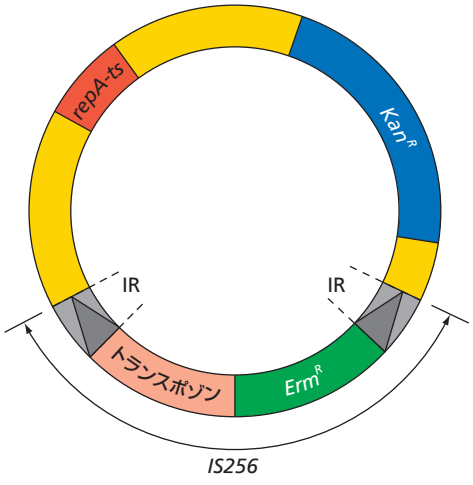
### 問25

細菌の株が，新たに病原性の遺伝子を獲得した例を少なくとも2つ書きなさい。両方の生物と遺伝子の導入の様式を述べなさい。

### 問26

*Streptococcus parasanguis*は，歯に付着し，歯垢の形成を引き起こす細菌種である。歯垢を除く方法を研究するために，図に示すようなプラスミドを構築し，*S. parasanguis*に変異をつくろうとした。このプラスミドの主要な性質として，*repA-ts*（温度感受性の複製起点），$Kan^R$（抗生物質カナマイシン耐性の遺伝子），そしてトランスポゾン*IS256*をもっている。このトランスポゾンには，抗生物質エリスロマイシン耐性の遺伝子$Erm^R$をもっており，トランスポゾンの逆方向繰り返し配列（IR）の間にあるすべてのDNAを移動させる酵素トランスポザーゼをコードする遺伝子のおかげで，*S.*

*parasanguis*の中で転移を起こすことができる。




**a**　このプラスミドをどのようにして変異原として使用するのか？ どのようにトランスポゾンを細菌に導入し，どのように*IS256*が*S. parasanguis*の遺伝子に新たに挿入された株を同定するのか？ また，なぜプラスミドが2つの異なる抗生物質耐性の遺伝子を備えており，また複製起点が温度感受性であるかを説明しなさい。

**b**　なぜこのプラスミドを変異原として使うのだろうか？

### 問27

ゲノムの塩基配列から病原性をもった細菌によっては，毒性をもった遺伝子の隣りにバクテリオファージの遺伝子があることが示されている。どうしてこのことが遺伝子の水平伝達を示しているか？ そして，導入の仕組みどんなものだったのだろうか？