

大腸菌ラクトースオペロンの発現調節

〔目的〕ラクトースオペロンの発現を誘導する物質、IPTG と、ラクトースオペロンの発現によって作られるラクトース分解酵素の作用を受けて青色に発色する物質、X-gal を利用すると、ラクトースオペロンの発現をコロニーの色で確認することができる。簡単に細菌の培養が可能なシート培地「サニ太くん」を使って、大腸菌のラクトースオペロンの発現調節を確認し、そのしくみを理解する。

〔準備〕サニ太くん：X-gal シート（TTC 添加） シート下部に lac- と表示 4 枚
 X-gal + IPTG シート（TTC 添加） 下部に lac+ と表示 2 枚
 滅菌 PBS（15mL チューブ入り） 5 %ラクトース水溶液（赤マイクロチューブ入り）
 1.5mL 白マイクロチューブ 10 本 マイクロチューブ立て 試験管立て
 滅菌スポイト 2 本 スポイト立て容器 70 %エタノールスプレー プラスチック容器
 ペーパータオル 油性ペン（黒） 菌付着物回収ビーカー 手袋 マスク
 （クラスに 1 セット）大腸菌 K12 株培養シート 滅菌つまようじ 滅菌 PBS（9mL）

〔実験〕①実験操作に入る前に

1. 手は薬用石鹸できれいに洗う。実験台の上を整理整頓し、70 %エタノールを吹き付けて消毒する。
2. マスクをつけ、手袋をはめる。手袋の手にもエタノールを吹き付けて消毒する。
 注：手袋の手で不用意に顔や髪を触ってはいけない。移動は静かに行うようにする。
3. マイクロチューブのフタに油性ペンでラベルを記入する。
 「0」「1」「2」「3」「3X」「4X」「3I」「4I」「3ラ」「4ラ」
4. サニ太くんの上部にも右表で確認しながら油性ペンで班番号とラベルを記入する。
5. スポイトの 1.0mL および 0.1mL の目盛り位置を確認しておく。油性マジックで印をつけ、2 本（PBS 用・ラクトース溶液用）の見分けがつくようにしておく。

②大腸菌の希釈

6. マイクロチューブ「1」「2」「3」「3X」「4X」「3I」「4I」「3ラ」「4ラ」それぞれに、PBS 用スポイトを使って、滅菌 PBS を 1.0mL ずつ入れる。
7. 別の（ラクトース用の）スポイトで「3ラ」「4ラ」のマイクロチューブから PBS を 0.1mL ずつ吸い取って捨て、ラクトース水溶液をそれぞれ 0.1mL ずつ加える。
8. クラス代表者が釣菌を行う。サニ太くんのコロニーにつまようじの先を刺し、9mL の滅菌 PBS の中につまようじの先を入れて振る。これが元の大腸菌懸濁液になる。
9. 各班代表者が元の懸濁液を各班のマイクロチューブ「0」にマイクロチューブの目盛りで約 0.5mL 取る（教卓のパスツールピペットを使用）。
10. 「0」のチューブから PBS 用スポイトで菌の懸濁液を 0.1mL 取り、「1」のチューブに入れ、ピペッティングする。→ 10 倍希釈 さらに、同じスポイトで「1」のチューブから 0.1mL 取り、「1」のチューブに入れ、ピペッティングする。→ 10²(100) 倍希釈
11. 同じスポイトで「2」のチューブから 0.1mL ずつ取り「3」「3X」「3I」「3ラ」の順に加える。→ 10³(1000) 倍希釈
12. 同じスポイトで「3」のチューブから「4X」「4I」「4ラ」に、それぞれ 0.1mL ずつ取って加える。→ 10⁴(10000) 倍希釈

③菌の培養

13. シートの透明カバーを上部ラベルの手前まではがし、スポイトを使って培地の中心部にマイクロチューブの中身を全て滴下する。滴下後はすみやかにシートのカバーを閉じる。縁にしわができたときには、シートとカバーの接着面をペーパータオルでこするように押さえると良い。培地の面を押さえつけないこと。使用するスポイトとマイクロチューブの試料とサニ太くんの組み合わせに十分注意する。

マイクロチューブ	「3X」	「3I」	「4X」	「4I」	「4ラ」	「3ラ」
スポイト	PBS 用				ラクトース用	
サニ太くん	lac-	lac+	lac-	lac+	lac-	lac-

14. 組・班名のラベルを貼ったプラスチック容器に入れ、35℃で 24 時間培養する。
15. 菌の付着したスポイト、マイクロチューブは回収ビーカーに入れる。ペーパータオル、手袋、マスクは、すべてポリ袋に入れて封をし、教卓のトレーに提出する。実験台は片付けた後、70 %エタノールを吹き付けて消毒する。事後の手洗いを十分に行うこと。

〔結果の予想〕

	「3X」	「4X」	「3ラ」	「4ラ」	「3I」	「4I」
コロニーの色						

〔記録と考察〕10³(1000) 倍 / 10⁴(10000) 倍希釈（丸で囲む）状態のよい方を記録する

X-gal 培地	X-gal 培地ラクトース添加	X-gal + IPTG 培地
<div style="border: 1px solid black; height: 150px;"></div>	<div style="border: 1px solid black; height: 150px;"></div>	<div style="border: 1px solid black; height: 150px;"></div>

各シートのコロニーの発色について、ラクトースオペロンの発現と結びつけて説明せよ。

--	--	--

〔感想〕

月	日	限	年	組	番	班		
---	---	---	---	---	---	---	--	--

TTC (2,3,5-Triphenyltetrazolium chloride トリフェニルテトラゾリウムクロライド) は水素で還元されて、赤色の TPF (トリフェニルホルマザン) となる。培地に TTC を添加しておく、細菌の持つ脱水素酵素のはたらきにより NAD や FAD に結合した水素が生じ、これによって TTC が還元されるため、細菌のコロニーが赤色に発色する。

β-ガラクトシダーゼ は二糖類であるラクトースをグルコースとガラクトースに加水分解する反応を触媒する酵素で、ラクトースオペロンを構成する構造遺伝子のひとつ、lacZ 遺伝子によってコードされている。

X-gal (5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl-β-D-Galactoside 5-ブロモ-4-クロロ-3-インドリル-β-D-ガラクトピラノシド) は、β-ガラクトシダーゼの基質となって、加水分解される。分解されると無色から青色に発色するため、β-ガラクトシダーゼを作っている大腸菌のコロニーは青色になる。

IPTG (Isopropyl-β-D-1-thiogalactopyranoside イソプロピル-β-チオガラクトピラノシド) は、ラクトースに似た物質で、リプレッサーと結合して、リプレッサーがオペレーターに結合するのを妨げる。また、ラクトース分解酵素 (β-ガラクトシダーゼ) によって分解されないため、ラクトースよりも強力にラクトースオペロンの発現を誘導する。

コロニー 1個の細菌は目に見えないが、培地の上で分裂を繰り返して何万個にも増えるとコロニーと呼ばれる塊として見えるようになる。1個のコロニーは、1個の細胞が増えて出来上がった全て同じ遺伝子を持った集団 (クローン) である。

大腸菌 K12 株 (Escherichia coli K12) 非病原性大腸菌の1つの系統。ゲノムが解読され、詳しい染色体地図が明らかにされている。培養が簡単で、世代時間が短く、組換え DNA 実験の宿主として、広く使用されている。

シート培地「サニ太くん」「JNC 株式会社」が製造する、食品・環境中の微生物検査用シート状培地。薄い不織布を貼り付けた培地フィルムを防水シートと透明シートで挟んであり、一般生菌用、大腸菌群用、サルモネラ菌用など、いろいろな種類がある。

本実験で使うシートは、TTC が含まれている一般生菌用のシートをベースに、ラクトースオペロンの ON / OFF を観察できるように特別に作っていただいたもので、

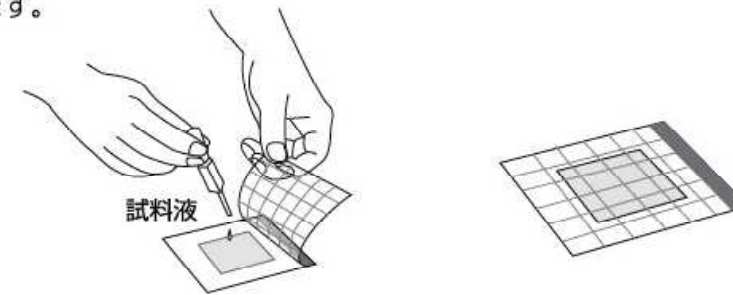
① X-gal を添加したシート ② X-gal と IPTG を添加したシート の2種類である。

どちらのシートにも TTC が含まれているため、菌が生育してコロニーを作れば、菌の呼吸によって赤色の発色は起こる。これに、X-gal の分解による青色の発色が加わると、コロニーが青紫色～青色になる。

以下の使い方を正しく守って使うこと。

サニ太くんのカバーを開け、不織布部分の中心部に試料液1.0mLを加えます。

カバーを再び閉じます。



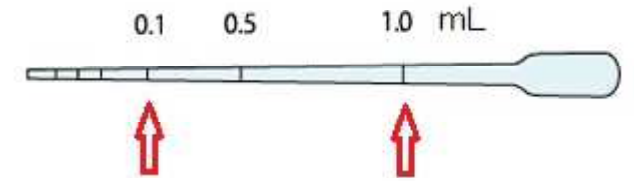
- ・カバーの内面や不織布面に手を触れない。
- ・カバーを開けている時間はできるだけ短くする。
- ・カバーとシートの間には大きな隙間ができないように、不織布面を押しさえつけないようにカバーを閉じる。

使用済シートは菌を培養したものなので、他の物との接触を避け、加熱殺菌して廃棄する。

スポイトの扱いについて

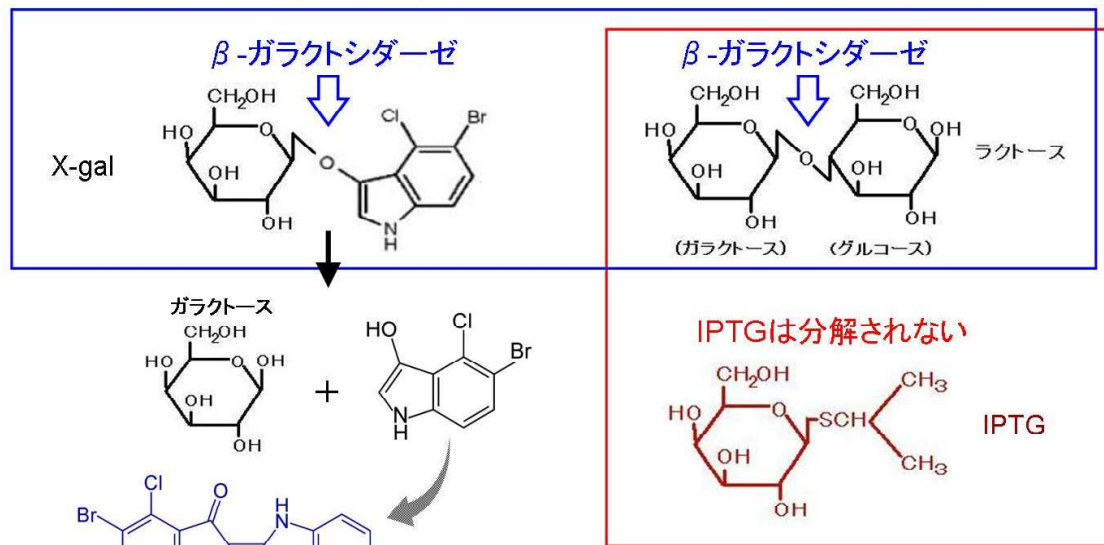
1.0mL ポリスポイトの容量や目盛りは、マイクロピペットのように正確ではないが、本実験では、毎回のスポイトの操作を同じように行うように努めることで、希釈のばらつきを防ぐことができる。

あらかじめ、目盛りの位置を確認し、PBS を吸い取って見て、乳豆部をコントロールする練習をしておくといよい。



使用後のスポイトは塩素系漂白剤の液に浸して殺菌後に廃棄する。

ラクトース分解酵素(β-ガラクトシダーゼ)によって分解される



X-galが分解されると青い色素ができる

ラクトースオペロンのリプレッサーに結合して、リプレッサーがDNAに結合できないようにする

→ラクトースオペロンがONになりβ-ガラクトシダーゼが作られる