バクテリアにおける遺伝子破壊株の作製方法

—目的に合ったオーダーメイドの株を作る—

山田 雅巳*

国立医薬品食品衛生研究所変異遺伝部 〒158-8501 東京都世田谷区上用賀 1-18-1

Technical report for construction of bacterial disruptants

Masami Yamada

Division of Genetics and Mutagenesis, National Institute of Health Sciences
1-18-1, Kamiyoga, Setagaya-ku, Tokyo 158-8501, Japan

Summary

Gene disruption methods are useful to construct bacteria lacking a specific gene especially when a gene's function is unknown. In the 1980s, complementation techniques were used as the first step in cloning a gene. With the advances made through genome projects, gene identification and cloning have allowed easier construction of deficient bacterial strains with cloned genes. In this report, I describe three methods of disrupting specific genes on chromosomes in a strain of interest, namely linear transformation, preligation and the 'one-step' method. Moreover, several genetic techniques which are necessary for conducting these methods are also reviewed.

Keywords: gene disruption, strain construction, recombination

緒 言

7～8年前のことになるが、学生に「PCRがなかったころはどうやって遺伝子をクローニングしていたのか？」と質問されたことがある。彼は「湯浴を3つ並べて手作業でチューブを移動させる」という状況を考えていて、それはどうも非現実的なので、昔のことを知っていそうな人に本当のことをきいてみようと思ったらしい。彼のような、PCRで遺伝子をクローニングする手法しか知らない学生が少なくない昨今、概念が異なるそれ以前のクローニングの手法というのは「古典的」といってもいいかもしれない。DNAの配列がわかってしまった今では、機能しているかどうか分からない遺伝子がPCRで手に入る。他種との相同性から機能が「推測」されるが、相同性がなければPCRで増やして手に入れた遺伝子から mutant を作って表現型を知ることになる。いわずもがなであるが、古典的手法はこの逆で、まず、

表現型が変わった mutant が発見され、それから遺伝子ライブラリーを mutant に入れて表現型が相補されたクローンが手に入るという手順である。前者の方が仕事の進展が早いのはいうまでもない。しかしながら、手に入れた遺伝子から mutant を作る手法は意外に知られていない。近頃は基礎的な手法（ピペットマンの使い方まで）を懇切丁寧に解説した本がどんどん出ていて学生さんも戸惑わずに実験ができるようだが、そのような本にはPCRやBIAcoreは載っていても、後述するP1トランスダクションの方法などには触れていないものが多い。Mutantを作る方法は、目新しく映るかもしれないが、古典的な手法でクローニングを行っていた頃には誰もが日常的に使っていた手法ばかりである。本稿ではバクテリアでの遺伝子破壊法を紹介し、それに付随する遺伝学的手法もあわせて解説する。

遺伝子破壊法

まず初めに、遺伝学的解析に汎用されている大腸菌やその近縁種（ネズミチフス菌）における遺伝子破壊の方法を古い方から3種類紹介する。

* E-mail: myamada@nihs.go.jp

受付：2003年7月2日 受理：2003年7月7日

© 日本環境変異原学会

Fig. 1

(1) Linear transformation (Winans et al., 1985)

細菌における形質転換* (後述) といえは通常、プラスミドを菌に入れてプラスミド上の遺伝子が発現することにより、菌が新しい形質を獲得することを指す。プラスミドは環状であり、導入されると菌体内で染色体DNAとは別に(種類によっては染色体DNAの複製と連動して)増幅する。ここで紹介する方法は、プラスミドを線状にして菌体導入するのでlinear transformationと呼ばれている。

まず目的の遺伝子をクローニングしたプラスミド上で薬剤耐性遺伝子と目的の遺伝子とを置換する (Fig. 1 ())。次に、このプラスミドを制限酵素処理で線状にする (Fig. 1 ())。薬剤耐性遺伝子が中央部にあり、その両側に大腸菌のDNAがある程度の長さ (500 bpはあった方がいい) 存在するというのが最低限の条件である (Fig. 1 (iv))。プラスミドの部分は必要ないがあっても問題にならないことが多いので、制限酵素のサイトの都合で含めるかどうかを決める。環状のときと同じ処理を

して *recD* 株に導入する (Fig. 1 ①(a))。薬剤を含む寒天培地に播いて出てきたコロニーが「当たり」の候補である。念のため、一度新しい寒天培地の上で広げて単一のコロニーを作らせて使うこともある。そこから染色体DNAを調製して、サザンブロット解析をすれば目的の遺伝子が破壊されたクローンを取ることができる。

この方法の欠点は、*recD* 株 (もしくは *recBCsbcB* 株) で遺伝子破壊をする必要があるため、ほとんどの場合、遺伝的背景をそろえるために自分が用いている基本の株に P1 transduction* (後述) で移す必要があることである (Fig. 1 ①(c))。P1 ファージは大腸菌に感染するファージである。大腸菌の近縁種であるネズミチフス菌には、P22 ファージを用いる。ただし、Ames 試験に汎用されている株は化学物質の透過性を高めるために、菌体の外膜表面が削られた変異体 (*rfa*) であるため、P22 ファージが吸着できない (受容体がないから)。そこで、考えられた方法が次の preligation 法である。

(2) Preligation 法 (Yamada et al., 1995)

この名前は「細胞に導入する前 (pre) に ligation をする」ことに由来する。論文にするとときに名前を付けたが、特別な方法ではない。標的遺伝子を含む断片をベクターにつないで薬剤耐性遺伝子とプラスミド上で置き換えるまでは linear transformation と同じである。宿主を選ばず直接遺伝子を破壊するのが目的であるから、どの株に入れても *recD* の株に入れたときのように、プラスミドとしては増殖できず exonuclease (DNA を末端から分解する) には削られない状態にすればよいわけである。DNA をプラスミドとして複製させないために linear transformation では複製起点を除き線状にしたが、通常の株ではそれは exonuclease に攻撃されてしまう。それを避けるために環状 (末端がない) にすればよいことになる。複製起点を除くとき、できればベクターの薬剤耐性因子が壊れるように制限酵素のサイトを選ぶ方がよいだろう。必要な断片を単離精製してから (Fig. 1 ()) ライゲーションし (Fig. 1 ②(a))、菌体導入して選択培地に播く。複製起点がないので、プラスミドのように増幅して次世代に伝達されることがない。ライゲーションされた DNA が菌体内に入っても、菌が薬剤で死ぬ前に組換えが起こらないとコロニー形成には至らない。したがって、できるだけ数多くの菌体導入する必要がある。筆者らは electroporation* (後述) を使っている (Fig. 1 ②(b))。ライゲーションミックスには電解質が含まれているので、導入前にはエタノール沈殿など精製の操作が必要となる。また、この方法では DNA 断片が環状になっているので、目的の遺伝子の上流側もしくは下流側で相同的組換えが1度起こっただけで染色体の中に DNA が挿入されてしまう。その場合でも薬剤耐性になっているので選択培地で生えてくるが、置き換わっていないので目的の遺伝子は壊れずに残っている。置き換

Fig. 2

わったものはPCRやサザンブロット解析で容易に識別できる。当たりが取れる確率はcase by caseで、高ければ50%くらいの確率だが低いときは2~3%である (Fig. 1②(c)).

(3) One-step inactivation method (Datsenko and Wanner, 2000)

この方法は目的の遺伝子をクローニングする必要がない。遺伝子は目的の株で直接壊すことができ、マーカーである薬剤耐性遺伝子を後で抜くことができるという大きなメリットがある。λファージのRed recombinaseのオペロンをarabinoseのプロモーターの下流につないだプラスミドを導入することで、線状のDNAが削られることなく組換えが起こるような状態にする (Fig. 2①)。このプラスミドの複製起点 (*ori*) は温度感受性なので、目的の遺伝子が破壊された後に菌株からプラスミドを抜く (cureする) ことができる (Fig. 2⑤)。FLP組換え酵素の認識部位であるFRT (FLP Recognition Target) を両端に持つ薬剤耐性遺伝子 (ここではクロラムフェニコールやカナマイシンに耐性の遺伝子) をクローニング

したプラスミドをPCRの鋳型として作製しておく (Fig. 2②)。目的の遺伝子のflanking領域と相同性を持つ36~50ヌクレオチドの配列に、鋳型を増幅するために必要な20ヌクレオチドの配列を続けて長いプライマーを作製する。PCR産物のDNA断片を精製して目的の株 (Red recombinaseが乗ったプラスミドを保持) に導入し (Fig. 2③)、選抜用の薬剤とarabinoseが入ったプレートに播く。このとき、薬剤のみが入ったプレートにはコロニーが出ないことが確認されており、Red recombinaseがなければ線状DNAが菌体内で分解されていることが予想できる。PCRで遺伝子破壊が薬剤耐性遺伝子と置き換わっていることが確認できたら (Fig. 2④)、菌株を43℃で培養してλ Red recombinaseをコードするプラスミドをcureする (Fig. 2⑤)。その後、薬剤耐性マーカーを抜く必要があればFLP酵素をコードしたhelper plasmidを導入する (Fig. 2⑥)。FLP酵素は高温で発現するようになっており、薬剤マーカー遺伝子の両側にあるFRT部位で組換えを起こす。また、このhelper plasmidの*ori*も温度感受性になっているので、43℃で培養することで組換えによる挟まれた薬剤耐性遺伝子の脱落とプラスミドのcureが同時に行える (Fig. 2⑦)。最後にPCRで確かに遺伝子が欠失していることを確認する必要があるだろう。Geneticsの知識を駆使した方法である。P1 transductionで移し変えるステップが省略でき、遺伝子をクローニングするステップとプラスミド上で薬剤耐性遺伝子と置き換えるステップが1回のPCRで済むことから“**One-step**”と名付けたと思われるが、その代わりに別にプラスミドの出し入れを行う必要がある (Fig. 2①⑤⑥⑦)、実際はいくつものステップを経る方法だ。使用するプラスミドはどの遺伝子を壊すにも共通に使える、薬剤耐性マーカーも抜くことができることからよくできた方法といえるだろう。関連する遺伝子をいくつも壊したいときは、double mutant, triple mutantを作ることになり、結果として薬剤マーカーだらけの株ができ、新しい遺伝形質をP1 transductionで入れたくても使えるマーカーがないなどの不便が生じることもある (これは筆者が直面した切実な問題である)。薬剤マーカーは遺伝子が破壊できた株の選抜には必要であるが、欠失は復帰することはないので、できてしまえばマーカーは必要ない (もちろん、あればP1 transductionで移すことができるというメリットがある)。したがって、後でマーカーを抜くことができるこの方法のメリットは大きいだろう。

Wannerらは論文のdiscussionで、multiple mutantを作る際には、1つの株で次々と壊すよりも、Red recombinaseのプラスミドを入れた野生株において1つの遺伝子を壊して、薬剤耐性マーカーはそのままにしてP1で移し、移してから薬剤耐性マーカーを抜くというステップを繰り返す方法を薦めている。その理由は、遺伝子破

壊に使う相同配列の長さが非常に短いことと、同じ方法を繰り返すので、前の組換えの結果の影響を受けて目的以外の場所で組換えを起こす可能性が考えられるからということである。しかし、P1 transductionにも前述のような問題点があることから、全部この方法を使うのではなく、必要に応じて使い分けるのが最良の方法ではないかと思う。

菌株作製に必要な付属的な手技のまとめ

紹介した遺伝子破壊の方法を実行するためには以下の手法の理解が不可欠である。

(1) 染色体DNAの調製

破壊株の確認のためのサザンハイブリダイゼーションを行うときには染色体DNAを調製する必要がある。またPCRはコロニーから直接行うこともできるが、染色体DNAを用いる方がより正確に行える。ここでは、筆者が大腸菌、ネズミチフス菌で用いている方法(Ausubel et al., 1988)を述べる。

一夜培養液2 mLを集菌し、600 μ LのTE溶液(0.5% SDS, 100 μ g/ μ L-proteinase K)に懸濁して37℃で1時間処理する。濁っていた液はこの時点で粘張性のある透明の液になっている。5M NaClを100 μ L加えてよく混ぜた後、80 μ LのCTAB (hexadecyltrimethyl ammonium bromide) 溶液(10% CTAB in 0.7 M NaCl)を加えてさらに転倒混和し65℃で10分処理する。その後クロロホルムを加えてよく混ぜ(よく混ぜないと分離が悪い)、遠心分離した上清をフェノール/クロロホルムで精製して、遠心上清に2-プロパノールを0.6容量加えると染色体DNAが沈殿してくる。乾燥させたDNAは100~200 μ LのTEに溶かして冷凍保存する。染色体DNAは非常に長いもので、無傷の状態で取ることは難しいが、それでもできるだけ切れていない状態で調製するのが望

ましいので、混ぜるときはプラスミドを調製するときほど力を加えることは避けるようにする。

(2) PCR法

本稿の中で触れる手法・原理の中で最も新しいものであるが、最も使われている方法だと思うので、ここで詳細を解説することは避ける。PCRの機械と、マイクロチューブと、鋳型になるDNAと、PCR用のキットと、プライマーがあればすぐにでもできる。プライマーの長さやGC含量により反応温度が変わること、増幅する断片(産物)の長さにより反応時間が変わることなどを考慮すれば、後は経験も重要な因子となる。

(3) プラスミドの調製(Feliciello and Chinali, 1993)

DNA配列が既にわかっている遺伝子のクローニングを行う場合、PCR法だけで遺伝子は取れてくるが、断片のまま保存しておくよりは、ベクターにつないで保存する方が、その後の操作のためには何かと便利である。遺伝子破壊法のためのみならず、プラスミドの調製は避けては通れない手法であろう。今はキットを用いて調製するのが一般的になっているので、実際の操作はキットに付いているマニュアルに添って行えばいい。ここでは原理について触れておく。

プラスミドはプラスミドを保持した菌株の一夜培養液から調製する。形質転換に用いる培養液のように培養時間が短い(2~3時間)ものから調製すると収量が悪い。とにかく取ればよい場合は、朝コロニーを植えて、夕方調製することもある。コロニーをプレート上にたくさん出してそれをかきとったものを用いてもよい。プレート1枚は30 mL程度の培地からできていることから、コロニーには思ったより多く菌体が含まれているので注意する必要がある。通常、1.5~2 mLの培養液(つまりプラスチックチューブ1本分)を用いる。遠心分離により集菌して培地を除いた後、SDS(1%)を含むアルカリ

【ミニ知識】制限・修飾について：バクテリアは単細胞生物で細胞が1単位、それがむき出しで環境中に存在することから、化学物質のみならずDNAも菌体内に侵入してくる可能性がある。DNAは塩基の並びは違っても基本的な構造は哺乳類でも大腸菌でも大差がなく、同じ塩基配列であれば組換えも起こる。そこで、自身のDNAであるという目印を付けるメカニズムがある。それを「修飾」という。大腸菌の場合はある特定の配列の中のある塩基をメチル化することが目印となっている。そしてその目印がないDNAはエンドヌクレアーゼで分解するというシステムを取る。それを「制限」という。遺伝子工学に欠かせない制限酵素はバクテリアが自身のゲノムの安定性保持のために持っているシステムの一つである。たとえば大腸菌で調製したプラスミドDNAをネズミチフス菌に入れると分解されてしまうということが起こる。また、修飾の機構が欠損している株というのがあり、そういう大腸菌で増やしたプラスミドDNAを別の大腸菌に入れると、やはり分解されてしまうので気を付けなければいけない。逆に制限のシステムだけを欠損した株では、他種のDNAが分解されずに増幅するのでその欠損株の種の修飾がされる。たとえば、大腸菌のプラスミドを制限欠損のネズミチフス菌で増やすと、それは他のネズミチフス菌でも通常どおり増幅することができるようになる。

(0.2 N NaOH) の溶液で水中5分間だけ処理する。SDSにより菌を溶かすとともに、アルカリによりDNAを変性 (denature) させる操作である。菌体内には染色体DNAとプラスミドDNAが共存するが、プラスミドは covalent closed circular (ccc) の状態にあるため、5分間では変性の度合いが少なく、その後酸性の溶液を添加して15分以上水中におく (中和する) ことにより回復する (re-natured)。このとき、蛋白質や脂質、変性した染色体DNAなどが白い塊になるので再度遠心分離し、上清をフェノール/クロロホルム (1:1) 液で処理した後、エタノールで沈殿してくるのがプラスミドDNAである。最後は遠心分離でこの沈殿を集め、乾燥させた後、TEバッファー (10 mM Tris/HCl [pH 8.0], 1 mM EDTA) に0.1~0.5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 程度の濃度になるよう溶解する。

用いる溶液はどれも実験室にある簡単な試薬で調製でき、最初の集菌から最後のTEバッファー溶解まで2時間程度の操作であるが、キットを用いれば1時間足らずで20~30個くらいの処理が可能になっている。キットでは、re-natureまでの原理は同じで、その後の精製がカラムをかける操作になっている。つまり、フェノール/クロロホルムで不純物を除く代わりに、プラスミドをカラムに吸着させ、不純物を洗い流した後、吸着したプラスミドDNAを溶出させるものである。

(4) 形質転換 (transformation)

ここでいう形質転換とは細菌がプラスミドDNAなどを菌体内に取り込むことで、プラスミド上に乗っている新たな遺伝形質を獲得することを指す。 β -ラクタマーゼ (β -ラクタム環を開環する酵素; アンピシリンなどの β -ラクタム環を持つ抗生物質はこの酵素により不活化する) をコードしているプラスミド pKM101 を TA1535 に導入すると、TA1535 はアンピシリン感受性からアンピシリン耐性へと形質が転換するのである。操作としては菌にDNAを導入するので、そのことを指して transformation と呼ぶこともあるが、あくまでも形質転換するのは菌なので、「DNAを菌に transform する」のではなく、「DNAで菌を transform する」ことになる。プラスミドは菌の中で増やすので、形質転換はプラスミドの調製とともに、基本中の基本といえる。

) chemical transformation (Cohen et al., 1972)

古典的な方法であるが、コストも低く簡単で確実なので今も使われている方法である。菌の一夜培養液を100倍希釈して、対数増殖期になるまで振とう培養し (通常37℃で2時間)、氷冷して100 mM CaCl_2 で処理すると、膜がcompetentな状態になるため、それに導入したいDNAを混ぜて水中におき、その後高温 (42℃) で短時間 (2~3分) 処理して再び水中に戻すと、DNAが菌体内に取り込まれる。Competent cells は市販されており (冷凍されている)、融かしてDNAと混ぜるところから

始めるようになっていて重宝する。ただし、構築したプラスミドを増やしたいだけのときなど宿主を選ばないときはよいが、そうでない場合は自分の必要な菌が市販されている可能性は低いので、自分で菌の培養液から調製しなければならない。自分で作製した遺伝子破壊株はこれに当たるだろう。

) electroporation (Taketo, 1989)

Chemical transformationと同じく、対数増殖期にある菌を用いる。集菌して水で洗って電解質をできるだけ取り除き、DNAと混ぜて高電圧をかけると、膜に一時的に穴があくためDNAが取り込まれるというもの。Electroporation用の装置とキュベット (1個700円くらい、disposable) が必要であるが、菌の調製はO.D. 0.7くらいまで増殖した培養液を集菌し、滅菌蒸留水と滅菌した10%グリセロール溶液で菌体を洗って (懸濁して遠心分離する)、500倍くらいに濃縮したものを50~60 μL ずつ小分けにして使う。-80℃で保存可能であり、菌株によっては凍結品が市販されている。DNAが導入される効率が非常によい。

【ミニ知識】 バクテリオファージ: DNAが蛋白質でできた殻の中に詰め込まれている。それぞれ特定の宿主菌に感染して、殻の中のDNAだけを菌体内に注入し、ファージDNAが菌の複製装置により菌体内で複製される。同時に殻の蛋白質も合成されて、その中に複製したDNAが詰め込まれ、子ファージがたくさんできる。子ファージは菌体内に数十個増えたところで、溶菌させて外に放出され、新たな宿主に感染するというサイクルを繰り返す。

(5) ファージを用いた形質導入法 (P1 transduction) (Miller, 1992)

P1ファージを使って、ある菌株から他の菌株へ遺伝形質を移すことを形質導入 (transduction) という。目的の遺伝形質を持った株を見つけただけでは、すぐに自分の実験系に組み込むことができるとは限らない。遺伝的背景をそろえるために使うのがP1ファージ (大腸菌の場合) とP22ファージ (ネズミチフス菌の場合) である。

A株からB株に、ある遺伝形質を移したいときに、A株 (donor) にP1 $_{\text{vir}}$ ファージの溶菌液をかけて感染させ、A株でP1 $_{\text{vir}}$ ファージを増やす (液体培養)。A株の中で増えたP1 $_{\text{vir}}$ ファージは菌を溶かして培養液中に放出されるので、再び溶菌液ができる。これをB株 (recipient) にかけて、目的の遺伝形質がB株に移ったtransductantsのみがコロニーを形成するような選択培地

に播く。P1virファージは他のバクテリオファージと同様に、感染するとファージ粒子の中のDNAだけが菌体内に注入される。感染後はendonucleaseを発現して宿主の菌の染色体DNAを断片化する。ファージのDNAは菌体内で合成されて、concatemerという一つの単位になる配列（P1virファージのDNA）が繰り返しつながった形を取り、ファージの殻ができた後に、殻の中に端からその単位ごとに詰め込まれていく。その際、ファージ由来のDNAと、断片化した宿主菌の染色体DNAとの区別はされず、100 kbという長さだけを認識して詰めるため、大腸菌のDNAだけが入ったファージ粒子というのができてくる（約0.1-1%）。このファージには感染力はあるが増殖力がないので、次に感染したときにはファージとして増えることはなく、ただ、A株由来のDNA断片が注入されたB株の中でひらひらしていることになり、それが低い確率であるがB株の染色体DNAと相同組換えを起こすことで、A株の遺伝形質がB株の染色体上に移るとというのが形質導入の原理である。

P1virファージで一度に移すことのできる染色体DNAの長さは約100 kbなので、移したい遺伝形質の周辺の遺伝子もA株からB株に移ることになる。どの範囲が移るのかは、どこで組換えが起こるかによる。出てきたコロニーの個々の染色体が持つA株由来のDNAは、この組換えの位置により少しずつ違うことになる。カナマイシン耐性遺伝子で破壊した遺伝子をP1 transductionで移す場合、選択培地にカナマイシンを入れることで移ったことが確認できるが、このようなマーカーがないときは、周辺の遺伝子も一緒に移る（cotransduction）というこの性質を利用する。たとえば、移したい遺伝形質の近くにヒスチジン合成系の遺伝子（*hisG*）があって、B株が*hisG*⁻の株であれば、選択培地にヒスチジンを含まない最小培地を用いることで、His⁺となったtransductantsを得るというような方法を取るわけである（このとき*hisG*をマーカーと呼ぶ）。また、移したい遺伝形質の周辺に、移って欲しくない遺伝形質がある場合は、trans-

ductantsについて、移っていないことの確認をするというようなことも必要になる。何をマーカーにするかをよく考えてdonorとrecipientを選ばねばならない。

おわりに

目的に合った菌株が、発表されている論文で使われていて、それをもらって実験できればベストである。しかし、その株が分けてもらえなかったり、また、すぐには使えない状態であったりということもしばしばである。そんなとき遺伝学的手法を駆使して自分で菌株が作れたら、「痒いところに手が届く」わけである。本稿で触れた手法は、単独で理解するよりも、それぞれの手法の意味を理解しつつ相互の関連も知って使われると、より有効なのではないかと考え、蛇足になるかもしれない内容も意図的に盛り込んだ。それぞれの操作に特別な技術や熟練が必要な手法はない。ただ、よく考えてストラテジーを練っておく必要がある。ストラテジーがまちがっていなければ目的の株は必ずできてくる。

参考文献

- Ausubel, F.M., R. Brent, R.E. Kingston, D.D. Moore, J.G. Seidman, J.A. Smith and K. Struhl (1988) Preparation of Genomic DNA from Bacteria, Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, Inc., New York, pp. 241-245.
- Cohen, S.N., A.C. Chang and L. Hsu (1972) Nonchromosomal antibiotic resistance in bacteria: genetic transformation of *Escherichia coli* by R-factor DNA, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 69, 2110-2114.
- Datsenko, K.A. and B.L. Wanner (2000) One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 97, 6640-6645.
- Feliciello, I. and G. Chinali (1993) A modified alkaline lysis method for the preparation of highly purified plasmid DNA from *Escherichia coli*, Anal. Biochem., 212, 394-401.
- Miller, J.H. (1992) P1 transduction in Experiments 19-20 In: A short course in bacterial genetics; laboratory manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, pp. 263-305.
- Taketo, A. (1989) Properties of electroporation-mediated DNA transfer in *Escherichia coli*, J. Biochem. (Tokyo), 105, 813-817.
- Winans, S.C., S.J. Elledge, J.H. Krueger and G.C. Walker (1985) Site-directed insertion and deletion mutagenesis with cloned fragments in *Escherichia coli*, J. Bacteriol., 161, 1219-1221.
- Yamada, M., B. Sedgwick, T. Sofuni and T. Nohmi (1995) Construction and characterization of mutants of *Salmonella typhimurium* deficient in DNA repair of O⁶-methylguanine, J. Bacteriol., 177, 1511-1519.

【ミニ知識】 Genotype の書き方：論文や本に載っている菌株のリストにかかれてある遺伝形質 (genotype) は、多くの場合マイナスであることがわかっているものについてだけが書かれていて、そこに書かれていないからプラスであるとは限らないので注意を要する。Genotype に書かれていなくてプラスであると判断してよいのは、アミノ酸要求性くらいだと思っておいたほうがよい。なお genotype はイタリックで書くという決まりがあることは知っておきたい。