

カルバゾール分解プラスミド pCAR1 上にコードされる  
核様体タンパク質の機能解析

東京大学大学院農学生命科学研究科

応用生命工学専攻

平成 20 年度博士課程進学

氏 名 武田 俊春

指導教員 山根 久和

# 目次

## 略語表

iv

## 第 1 章 序論

1

## 第 2 章 核様体タンパク質遺伝子を保持するプラスミドとその特徴

2-1	緒言	9
2-2	材料および方法	
2-2-1	プラスミドデータベースの取得	10
2-2-2	由来の生物種に基づく分類	10
2-2-3	Local BLAST 解析	10
2-2-4	Genomic BLAST 解析	11
2-2-5	Relaxase 配列に基づく分類	11
2-3	結果	
2-3-1	由来の生物種に基づくプラスミド分類	12
2-3-2	核様体タンパク質遺伝子を含むプラスミドの抽出	12
2-3-3	プラスミド上、染色体上における出現頻度比較	21
2-3-4	H-NS ホモログ遺伝子と Hha ホモログ遺伝子の関係	21
2-3-5	プラスミドのサイズとの関係	21
2-3-6	プラスミドの G+C 含量との関係	24
2-3-7	プラスミドの伝達性との関係	24
2-4	考察	32

## 第 3 章 核様体タンパク質 Pnd、Phu の発現解析

3-1	緒言	34
3-2	材料および方法	
3-2-1	使用菌株、プラスミド、および培養条件	35
3-2-2	試薬および酵素	35
3-2-3	DNA および RNA の取り扱い	35
3-2-4	アガロースゲル電気泳動とゲルからの DNA の回収	35
3-2-5	プラスミドの構築	36
3-2-6	プラスミドの接合伝達実験	39
3-2-7	エレクトロポレーション	39
3-2-8	SDS-PAGE および Tricine-SDS-PAGE	40
3-2-9	ウェスタンブロッティング	40
3-2-10	定量 RT-PCR 解析	41
3-2-11	プライマー伸長解析	41
3-2-12	His タグ融合 Phu、Pnd 発現株の作製	42

3-2-13	Phu、Pnd の経時的発現プロファイル解析	44
3-2-14	His タグ融合 Phu、Pnd の発現条件検討	45
3-2-15	His タグ融合 Phu、Pnd の精製	46
3-2-16	ゲルろ過クロマトグラフィーによる分子量の推定	47
3-2-17	クロスリンク解析	48
3-3	結果	
3-3-1	<i>phu</i> および <i>pnd</i> の転写プロファイルの解析	49
3-3-2	<i>phu</i> および <i>pnd</i> の転写開始点の同定	49
3-3-3	His タグ融合 Phu、Pnd 発現株の作製	49
3-3-4	Phu および Pnd の発現プロファイル解析	52
3-3-5	His タグ融合 Phu、Pnd の発現系構築	54
3-3-6	His タグ融合 Phu、Pnd の精製	54
3-3-7	Phu、Pnd の分子量の推定	60
3-3-8	クロスリンク法による Phu、Pnd の多量体形成能解析	60
3-4	考察	63

## 第4章 Pmr、Pnd、Phu の除去が宿主に与える影響の解析

4-1	緒言	66
4-2	材料および方法	
4-2-1	使用菌株、プラスミド、および培養条件	67
4-2-2	DNA および RNA を用いた実験	67
4-2-3	プラスミドの構築	67
4-2-4	破壊株および相補株の作製	70
4-2-5	サザンハイブリダイゼーション	73
4-2-6	コロニーハイブリダイゼーション	75
4-2-7	継代培養時の pCAR1 保持率測定試験	76
4-2-8	運動性試験	77
4-2-9	Phenotype MicroArray	78
4-2-10	高密度タイリングアレイによる RNA マッピング	84
4-3	結果	
4-3-1	単独破壊株の作製	86
4-3-2	単独破壊株と野生株の生育比較	86
4-3-3	単独破壊株と野生株の運動性比較	86
4-3-4	単独破壊株と野生株の pCAR1 保持率比較	93
4-3-5	二重破壊株の作製	93
4-3-6	二重破壊株と野生株の生育比較	93
4-3-7	二重破壊株と野生株の pCAR1 保持率比較	96
4-3-8	相補株の作製	100
4-3-9	相補株の pCAR1 保持率測定	100
4-3-10	Phenotype MicroArray による表現型の網羅的解析	103
4-3-11	RNA マッピングによるレギュロンの網羅的抽出	110
4-4	考察	112

第5章	総括と展望	130
参考文献		133
補章		
・ Phenotype MicroArray データ		142
・ RNA マッピングデータ		149
謝辞		169
補追		
・ 博士論文の内容の要旨		170
・ Published paper [Takeda et al., 2011]		174



## 略語表

Ap	ampicillin
BSA	bovine serum albumin
CAR	carbazole
Cm	chloramphenicol
Da	dalton
DMA	dimethyl adipimidate 2HCl
DMS	dimethyl suberimidate 2HCl
EDC	1-ethyl-3-[3-dimethylaminopropyl] carbodiimide hydrochloride
Fis	factor for inversion stimulation
FPLC	fast protein liquid chromatography
FRT	Flp recombinase target
Gm	gentamicin
h	hour(s)
H-NS	histone-like nucleoid structuring protein
His	histidine
HU	histone-like protein from <i>Escherichia coli</i> strain U93
IHF	integration host factor
IPTG	isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranoside
Km	kanamycin
Lrp	leucine-responsive regulatory protein
min	minute(s)
MvaT	transcriptional activator of the <i>mvaAB</i> operon
MW	molecular weight
NAPs	nucleoid-associated proteins
OD	optical density
ORF	open reading frame
PCR	polymerase chain reaction
Phu	plasmid-encoded HU-like protein
Pmr	plasmid-encoded MvaT-like regulator
Pnd	plasmid-encoded NdpA-like protein
rpm	round per minute
RT	reverse transcription
sec	second(s)
SUC	succinate

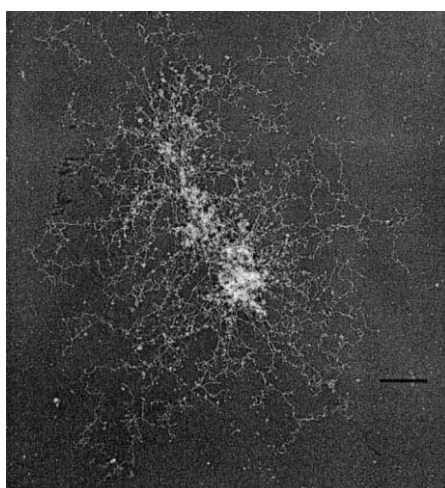
# 第1章

## 序論

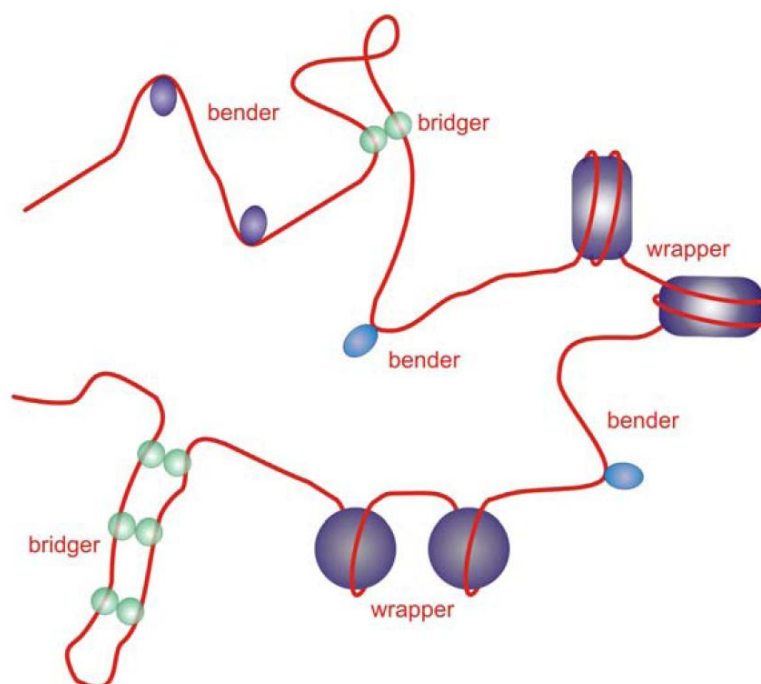
細菌の DNA は、正確に複製・分配され生育環境に応じた転写制御が行われるために、細胞内で機能的でコンパクトに折りたたまれた“核様体”と呼ばれる構造体を形成し存在している。核様体は“トポロジカルに独立したループ状のドメイン (topological domain)”の集合体としての構造をとり、対数増殖期の*大腸菌*から抽出した核様体は平均 11 kb の topological domain 400 個から構成され、停止期では topological domain のサイズが倍になることが知られている [Postow et al., 2004] (Fig. 1-1)。また、核様体構造は遺伝子の転写制御機構と密接にかかわっており、例えば*大腸菌*では対数増殖期には DNA がコンパクトに密集し RNA polymerase による転写が盛んに行われる transcription factories が見出され、停止期には DNA が細胞内に広く分散しそのような現象は観察されなくなる [Jin and Cabrera, 2006]。核様体構造の形成には DNA の超らせん化 [Postow et al., 2004; Luijsterburg et al., 2008]や分子クラウディング効果 [Zimmerman, 1993; Hancock, 2004a, 2004b, 2007]が寄与すると共に、近年の研究により、核様体タンパク質(NAPs, nucleoid-associated proteins)が重要な役割を担っていることが明らかとなりつつある。NAPs は 1970 年代以降に*大腸菌*を中心に次々と発見された DNA 結合タンパク質であり、細菌細胞内に多数存在し核様体構造の維持に重要な役割を果たすこと、DNA の構造を変化させることで様々な遺伝子の転写に影響を与えることが明らかとなってきた [Dorman, 2009; Dillon and Dorman, 2010]。NAPs の DNA との結合様式は DNA を折り曲げる bending、離れた二本鎖 DNA を架橋し凝縮させる bridging、真核細胞におけるヒストンのようにタンパク質の周りに DNA を巻きつけることで高度にコンパクト化する wrapping の大きく 3 つに分類される [Luijsterburg et al., 2006, 2008] (Fig. 1-2)。現在までに多数の NAPs が発見されており、グラム陰性細菌において研究が進んでいる主な NAPs について以下に述べる。

- ・ Fis (factor for inversion stimulation)

対数増殖期初期に一過的に発現し、定常期にはほとんど消失する約 11 kDa のタンパク質である [Azam et al., 1999a]。*大腸菌*や *Pseudomonas putida* ではコードする遺伝子が染色体上に 1 つ存在する。ホモダイマーを形成し、AT-rich な 17 bp の配列を特異的に認識して bending および bridging により DNA と結合する [Skoko et al., 2006; Cho et al., 2008b]。DNA recombinase や tRNA、rRNA などの転写を促進する [Johnson et al., 1987; Ball et al., 1992]ほか、バイオフィルム形成 [Sheikh et al., 2001]や DNA の複製への関与も示されている [Gille et al., 1991; Filutowicz et al., 1992]。また、topoisomerase の転写を制御することで DNA の超らせん構造を調節することも知られ [Dorman, 2009]、生育段階ごとに様々な遺伝子の転写を制御する global regulator として働くことがトランスクリプトーム解析により明らかとなっている [Bradley et al., 2007]。他の NAPs とも協調的に作用し、Fis の転写には integration host factor (IHF、後述)



**Figure 1-1. 大腸菌の核様体の topological domain 構造 [Postow et al., 2004]**  
 対数増殖期の大腸菌から抽出した核様体を電子顕微鏡で観察した様子を示す。



**Figure 1-2. 核様体タンパク質と DNA の結合様式 [Luijsterburg et al., 2008]**  
 赤線は DNA を表す。緑色の丸 (bridger)は bridging により DNA と結合する核様体タンパク質を、青色の楕円 (bender)は bending により DNA と結合する核様体タンパク質を、紫色の円および楕円 (wrapper)は wrapping により DNA と結合する核様体タンパク質を表す。

がアクチベーターとして関与すること [Nasser et al., 2002]、Fis が histone-like nucleoid structuring protein (H-NS、下記参照)による遺伝子転写抑制を阻害することが示されている [Dame et al., 2002a]。

- H-NS (histone-like nucleoid structuring protein)

約 15 kDa のタンパク質であり、ダイマー・オリゴマーを形成する。N 末端側にタンパク質間相互作用ドメインを、C 末端側に DNA 結合ドメインを有し、それらが flexible linker と呼ばれる不定型の領域で繋がれた構造を持つ [Dorman, 2004; Luijsterburg et al., 2006]。AT-rich な領域、特に推定コンセンサス配列である TCGATAAATT 配列にまず結合し、そこを核として bridging により周囲の DNA 領域に広がるように結合していく結合モデルが提唱されている [Lang et al., 2007]。また核様体の topological domain 構造を形成する主要なタンパク質であることがトランスポゾン挿入変異法や ChIP-on-chip 解析により明らかとなった [Hardy and Cozzarelli, 2005; Noom et al., 2007]。核様体構造の維持に重要な役割を果たすことから多数の遺伝子の転写制御に関わることが予想され、大腸菌や *Salmonella* 属細菌において RNA マッピング法や ChIP-on-chip 法によりレギュロン及び結合位置の網羅的解析が行われた。その結果、H-NS は多数の遺伝子の転写制御に関わる global regulator であり主に repressor として働くこと、遺伝子のプロモーター領域や外来遺伝子領域に特に結合することが示された [Grainger et al., 2006; Lucchini et al., 2006; Müller et al., 2006; Navarre et al., 2006; Oshima et al., 2006]。H-NS は遺伝子のプロモーター領域に bridging により結合することで RNA polymerase の結合を阻害する、あるいは RNA polymerase によって形成された open complex をトラップすることにより repressor として働くのだと考えられている [Dame et al., 2002a; Shin et al., 2005; Grainger and Busby, 2008]。

- HU (histone-like protein from *Escherichia coli* strain U93)

約 9 kDa のタンパク質であり、大腸菌では 2 つ、*P. putida* では 3 つのホモログが染色体上にコードされている。これらはホモダイマー・ヘテロダイマーを形成し、その存在比率が生育段階ごとに変化すること [Claret and Rouviere-Yaniv, 1997]、ホモダイマー・ヘテロダイマーで機能が異なることが示されている。N 末端側にタンパク質間相互作用ドメインを、C 末端側に DNA 結合ドメインを有し、ダイマー化することで DNA 結合能を発揮する [Swinger et al., 2003; Swinger and Rice, 2004, 2007; Luijsterburg et al., 2006]。DNA との結合様式は配列非特異的であるが、十字型 DNA や nick、gap 領域などの湾曲した領域に好んで結合し、相同性組み換えや DNA 修復に関わる [Castaing et al., 1995; Azam and Ishihama, 1999b; Pinson et al., 1999; Chodavarapu et al., 2008]。原子間力顕微鏡を用いた解析により、溶液中に低濃度で存在する場合には DNA と bending により結合し、高濃度で存在する場合には DNA を周りに巻きつけて強固に固定したフィラメント構造を形成することが明らかとなっている [van Noort et al., 2004]。また、各ホモログを単独で破壊した際には細菌の表現型に変化は認められないが、二重に破壊することで菌体が filamentous になり無核細胞が増加する [Huisman et al., 1989]、

cold shock や heat shock 感受性になる [Wada et al., 1988]、UV や  $\gamma$  線感受性になる [Boubrik and Rouviere-Yaniv, 1995; Li and Waters, 1998] など様々な表現型の変化を示すことが知られている。さらに、HU の global な転写制御メカニズムについては依然として不明な点が多いが、大腸菌におけるトランスクリプトーム解析により SOS 応答や酸化ストレス、浸透圧、嫌気代謝関連遺伝子の制御に関わることが明らかとなっている [Oberto et al., 2009]。他の NAPs との関わりとしては、H-NS と DNA の複合体形成を阻害し、H-NS による遺伝子の転写抑制を制御する例も知られている [Dame et al., 2002b]。

- IHF (integration host factor)

約 11 kDa のタンパク質であり、HU とアミノ酸レベルで高い相同性を示すが、特異的配列を認識して bending により DNA と結合するという HU とは異なる特徴を有する [Swinger and Rice, 2004; Aeling et al., 2006]。IHF $\alpha$ 、IHF $\beta$  の 2 つのサブユニットからなり、いずれも定常期初期に発現量が上昇するが、それぞれ異なる転写制御を受けている [Ditto et al., 1994]。これまでヘテロダイマーを形成して DNA の複製や相同性組換えに関与する遺伝子の転写を制御することが知られていたが [Friedman, 1988]、近年ホモダイマーを形成して機能することも明らかとなった [Werner et al., 1994; Zulianello et al., 1994; Zablewska and Kur, 1995]。またトランスクリプトーム解析から様々な遺伝子の転写制御に関わることが報告された [Mangan et al., 2006]。Leucine-responsive regulatory protein (Lrp、下記参照) と協調的に転写制御を行うことも知られている [Marshall et al., 1999]。

- Lrp (leucine-responsive regulatory protein)

約 18 kDa のタンパク質であり、N 末端側に DNA 結合ドメインを、C 末端側にタンパク質間相互作用ドメインを有する。溶液中で主にオクタマーを形成するが、ダイマーやヘキサデカマーとしても存在する [de los Rios and Perona, 2007]。特異的配列を認識して bridging および wrapping により DNA と結合する [Wang and Calvo, 1993; Cui et al., 1995; Luijsterburg et al., 2006]。栄養飢餓や浸透圧ストレス等に応答し、主に代謝系遺伝子の発現を制御することが明らかとなっている [Hung et al., 2002; Tani et al., 2002; Cho et al., 2008a]。

- MvaT (transcriptional activator of the *mvaAB* operon)

MvaT は初めに *Pseudomonas mevalonii* においてメバロン酸代謝オペロン *mvaAB* の転写制御因子として単離された [Rosenthal and Rodwell, 1998]。その後 *Pseudomonas* 属細菌を中心にそのホモログが多数見つかり、[Diggle et al., 2002; Tendeng et al., 2003; Rescalli et al., 2004]、ゲノムが解読された *Pseudomonas* 属細菌全てに少なくとも一つ、多くの場合は二つの MvaT ホモログが見出されている。MvaT はアミノ酸配列レベルでの相同性はないものの、大腸菌における H-NS 欠損を相補出来たことから、*Pseudomonas* 属細菌において H-NS が大腸菌で果たす役割を演じる H-NS の機能的ホモログ(H-NS 様因子)であることが示された [Tendeng et al., 2003]。MvaT ファミリータンパク質は N 末端側に二量体化に関する coiled-coil ドメイン、

C 末端側に helix-turn-helix という DNA 結合ドメインを有する。また、H-NS と同様にホモオリゴマー・ヘテロオリゴマーを形成し、特に AT-rich な DNA 領域に結合することが示されている [Rosenthal and Rodwell, 1998; Vallet-Gely et al., 2005; Castang et al., 2008]。 *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 株における 2 つの MvaT ホモログ (MvaT、MvaU) はバイオフィーム形成や鞭毛合成に関与する複数の遺伝子の発現を制御することが示されている [Diggle et al., 2002; Vallet et al., 2004; Westfall et al., 2004]。 *P. putida* KT2440 株では 5 つの MvaT ホモログのうち、TurA がトルエン分解プラスミド pWW0 上のトルエン分解遺伝子群を制御すること、別の MvaT ホモログである TurB とヘテロダイマーを形成することが示されている [Rescalli et al., 2004]。 *Pseudomonas fluorescens* では 2 つの MvaT ホモログが細胞外分泌物合成遺伝子群の発現を抑制することが知られている [Baehler et al., 2006]。

以上で述べたように、各 NAPs はいずれも核様体の維持および global な転写制御に関わっており、菌体が生育する上で重要な役割を担っている。ところで、これらの性質はいずれも染色体上にコードされる NAPs についての研究から明らかとなったものだが、近年の研究において、可動性遺伝因子であるプラスミド上にこれら NAPs 遺伝子が存在する例が報告された。

*Shigella flexneri* 2a strain 2457T 由来の自己伝達性高分子質量 IncHI1 群プラスミド pSf-R27 は H-NS 様因子 Sfh をコードする遺伝子を持っている。Sfh は H-NS 機能を相補できること、H-NS と同様に湾曲した AT-rich 領域に結合することが示されていた [Beloin et al., 2003; Deighan et al., 2003]。H-NS が global regulator として働くことを考慮すると、pSf-R27 を保持することで菌体内の H-NS 様因子の数が増え、宿主の転写ネットワークに大きな影響を与えることが予想された。そこで *Salmonella enterica* serovar Typhimurium SL1344 (以下 SL1344 と表記) と SL1344 (pSf-R27) および SL1344 (pSf-R27Δsfh) のトランスクリプトーム比較が行われ、pSf-R27Δsfh を保持する場合は pSf-R27 を保持する場合よりも多くの遺伝子の転写変動がみられること、H-NS 破壊株に近い phenotype を示すことが明らかとなった [Doyle et al., 2007]。この現象は AT-rich な pSf-R27 および pSf-R27Δsfh を保持することで宿主染色体由来の H-NS の多くがプラスミドに結合して“奪われ”、染色体上に結合する H-NS の量が減少したことで宿主の転写ネットワークが乱れた結果だと推測された (pSf-R27 上には 100 箇所以上の H-NS 結合サイトが存在する [Lang et al., 2007])。すなわち、Sfh は H-NS と同様に AT-rich な領域に結合することで染色体上に結合する H-NS の不足を補い、プラスミドを保持することにより宿主に生じる負荷を軽減する“stealth”機能を有することが提唱された [Navarre et al., 2007; Dillon et al., 2010]。Sfh 以外には、*Salmonella enterica* serovar Typhi 由来の R27 (IncHI1) [Forns et al., 2005] および pHCM1 (IncHI1) [Wain et al., 2003]、*Proteus morganii* 由来の R446 (IncM) [Tietze and Tschäpe, 1994] 上などに H-NS 様因子がコードされている。これらは全て抗生物質耐性プラスミドであり、NAPs 遺伝子がコードされる意味に興味を持たれる。

一般的に、遺伝因子の水平伝播は細菌の進化の上で重要な役割を果たしていると考えられる。例えば、抗生物質耐性遺伝子をコードするプラスミドが細菌間で水平伝播することにより生じる薬剤耐性菌の蔓延 [Carattoli, 2003]や、病原性遺伝子を含む *pathogenicity island* が伝播することで生じる病原菌の蔓延 [Juhas et al., 2009]などは典型的な例である。宿主がこれら遺伝因子を獲得すると特定の環境下で生存に有利となるが、一方で既存の転写ネットワークにどのように取り込むかが問題となり、そのメカニズムには依然として不明な点が多い。そうした中、上記のように“stealth”機能を有するタンパク質は宿主が新規遺伝因子を既存の転写ネットワークへ組み込むのを助ける働きを行うと考えられる。このように、プラスミド上にコードされる NAPs の機能を理解することは、プラスミドの振る舞いや役割を理解する上でも、また細菌の進化を考える上でも、非常に重要である。

私の所属する研究グループでは、原油中に含まれる含窒素芳香族化合物カルバゾールの分解遺伝子を有するプラスミド pCAR1 について研究を行ってきた。pCAR1 は 1993 年に都市下水処理場から単離されたグラム陰性細菌 *Pseudomonas resinovorans* CA10 株から見出されたプラスミドであり [Ouchiya et al., 1993; Nojiri et al., 2001]、2003 年に全塩基配列が決定された [Maeda et al., 2003; Takahashi et al., 2009a] (Fig. 1-3)。pCAR1 上にはカルバゾール分解に関わる *car*、*ant* 遺伝子群の他に、プラスミドの接合伝達に関与する *tra*、*trh* 遺伝子群、プラスミドの複製に関与する *repA*、細胞分裂の際にプラスミドの能動的な分配に関与する *par* 遺伝子群などが見出され、自己伝達性のプラスミドであり不和合性群 IncP-7 に属することが明らかとなった [Shintani et al., 2006]。また pCAR1 上に存在する ORF70 は *P. aeruginosa* PAO1 株の MvaT とアミノ酸レベルで 60%の相同性を示すことから、Pmr (plasmid-encoded MvaT-like regulator) と命名された。プラスミド上の遺伝子の発現には宿主染色体由来の因子が必須であるが [Ramos et al., 1997]、同時にプラスミド上にコードされる NAPs は宿主染色体・プラスミド双方に含まれる多数の遺伝子の発現に影響を与えることが予想される。すなわち、宿主染色体由来、プラスミド由来の因子が協調的に作用しあうことでプラスミドを保持することに起因する形質が発現することとなるため、pCAR1 を保持することにより発現する形質は宿主によって変わる可能性が考えられた。そこで私の所属する研究グループは pCAR1 をゲノム情報が既知のモデル土壌細菌 *P. putida* KT2440 株、*P. aeruginosa* PAO1 株、*P. fluorescens* Pf0-1 株に保持させ、pCAR1 の有無によるトランスクリプトームの変化を比較した [Miyakoshi et al., 2007; Shintani et al., 2010]。その結果、KT2440 株では pCAR1 の保持により鉄取り込みに関する遺伝子や、chloramphenicol をはじめとする様々な薬剤に対する耐性に関与する *mexEF-oprN* オペロンの転写量が増加することが明らかとなった [Shintani et al., 2010]。また KT2440 株染色体上には 5 つの MvaT ファミリータンパク質 (TurA、TurB、TurC、TurD、TurE)がコードされており、pCAR1 由来の Pmr がこれら染色体由来のタンパク質と相互作用しながら転写制御を行う可能性が推測された。そこで pCAR1 を保持する *P. putida* KT2440 を対象とし、Pmr について高密度タイリングアレイを用いた RNA マッピングによるレギュロンの抽出、ChAP-chip 法による結合位置の網羅的検出が行われ、染色体・プラスミド双方に含まれる多数の遺伝子の

転写制御に関わること、染色体上にコードされる TurA、TurB と相互作用することが示された [Yun and Suzuki et al., 2010]。

以上で述べたように、pCAR1 上にコードされる Pmr はプラスミド機能の発現の上で重要な役割を担うことが強く示唆された。ところで、pCAR1 上には NAPs をコードする遺伝子が *pmr* 以外にも 2 つ (ORF93、ORF95a) 存在しており、これら 2 つがコードするタンパク質も Pmr と同様に宿主およびプラスミドの形質を左右する鍵因子である可能性が考えられ、その機能に興味を持たれた。ORF93 は *P. fluorescens* SBW25 株の NdpA とアミノ酸レベルで 88% の相同性を示すことから、Pnd (plasmid-encoded NdpA-like protein) と命名した。NdpA はグラム陰性細菌に広く保存される NAPs であるが、研究例はほとんど無く機能が不明なタンパク質である [Murphy et al., 1999; Tett et al., 2007]。同様に、ORF95a は *P. putida* KT2440 株の HU ホモログ HupB とアミノ酸レベルで 45% の相同性を示すことから、Phu (plasmid-encoded HU-like protein) と命名した。HU は主に大腸菌において研究が行われてきたが、プラスミド上にコードされる HU の機能を解析した研究例は本研究開始当初まで存在しなかった。そこで本博士論文研究では、まず NAPs 遺伝子とプラスミドの関連性について客観的な考察を行うため、NAPs 遺伝子がプラスミド上にどれほど存在しているのか、また NAPs 遺伝子を有するプラスミドに特徴はあるのかを調べた (第 2 章)。その後、pCAR1 上にコードされる Pnd および Phu の発現様式や性状について解析を行うとともに (第 3 章)、pCAR1 上の 3 つの NAPs の破壊が宿主に与える影響や、各々のレギュロンを網羅的に解析することで、各 NAPs の機能について考察した (第 4 章)。





## 第2章

### 核様体タンパク質遺伝子を保持するプラスミドの分布とその特徴

#### 2-1. 緒言

細菌は外部から naked DNA を直接取り込む形質転換、バクテリオファージを介して異種細胞由来 DNA を取り込む形質導入、プラスミドやゲノミックアイランドが細菌間で異動する接合といった、種々の遺伝子水平伝播現象によって新たな遺伝子を獲得する [Frost et al., 2005]。水平伝播によって獲得した遺伝子は、例えば抗生物質耐性能や難分解性物質分解能といった有用な形質を宿主に付与し、選択的な環境下での適合度を増加させる。しかしながら、それら遺伝子が機能を発揮するためには宿主細菌の既存の転写ネットワークに適切に組み込まれる必要があり、そのメカニズムには依然として不明な点が多い。そうした中、最近になって、プラスミド上にコードされる核様体タンパク質が染色体・プラスミド双方に含まれる多数の遺伝子の転写を制御し、新規遺伝子を保持することによる宿主細菌の負荷を軽減する機能を有する、という研究例が報告された [Doyle et al., 2007; Yun and Suzuki et al., 2010]。このことから可動性遺伝因子であるプラスミドの振る舞いや役割と、プラスミド上に核様体タンパク質がコードされることの間に関連性があるか否かについて興味を持たれたが、本研究開始当初までに行われた研究は特定のプラスミド上にコードされる特定の核様体タンパク質の機能を追究するものに限られており、客観的な考察を行うには不十分であった。

そこで本章では、全塩基配列情報が明らかとなっているプラスミドの配列情報を集めたデータベースを取得し、核様体タンパク質遺伝子を保持するプラスミドを網羅的に抽出すると共に、それらのサイズ、G+C 含量、接合伝達性等の特徴について考察を行った。

## 2-2. 材料および方法

### 2-2-1. プラスミドデータベースの取得

2010 年 4 月の時点で NCBI (National Center for Biotechnology Information; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)のプラスミドデータベースには全塩基配列が解読済みのプラスミドが 2,278 個登録されており (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/>)、その配列情報を取得した (<ftp://ftp.ncbi.nih.gov/genomes/Plasmids/>)。この中には名前と長さがともに一致するプラスミドが 17 組含まれており、これらを重複として除いた。さらに pCAR1 と pCAR1.2 は実質的に同じプラスミドとみなせるため [Maeda et al., 2003; Takahashi et al., 2009a]、pCAR1.2 も重複として除き、残る 2,260 個のプラスミド配列を解析に用いた。

### 2-2-2. 由来の生物種に基づく分類

2-2-1 で取得したデータベース中にどのようなプラスミドが含まれているのかを明らかにするため、2,260 個のプラスミドを GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>)に記載された source organism に基づき 6 つのグループ (Gram-negative、Gram-positive、archaeal、eukaryotic、viral、および unclassified plasmid) に分類した。

### 2-2-3. Local BLAST 解析

核様体タンパク質遺伝子を保持するプラスミドの抽出は local TBLASTN 解析 (ver. 2.2.24, <ftp://ftp.ncbi.nlm.nih.gov/blast/executables/blast+/LATEST/>)により行った。2-2-1 で取得したプラスミドデータベースに対し、クエリとして用いた核様体タンパク質の名前、由来の菌株、accession number を以下に示す。

核様体タンパク質名	由来の菌株名	DDBJ/EMBL/GenBank accession number
Fis	<i>E. coli</i> K-12 W3110	AP_003801
H-NS	<i>E. coli</i> K-12 W3110	AP_001863
Hha	<i>E. coli</i> K-12 W3110	AP_001109
HU $\alpha$	<i>E. coli</i> K-12 W3110	AP_003818
HU $\beta$	<i>E. coli</i> K-12 W3110	AP_001090
IHF $\alpha$	<i>E. coli</i> K-12 W3110	AP_002332
IHF $\beta$	<i>E. coli</i> K-12 W3110	AP_001542
Lrp	<i>E. coli</i> K-12 W3110	AP_001519
NdpA	<i>E. coli</i> K-12 W3110	P33920
MvaT	<i>P. aeruginosa</i> PAO1	AAP33788

Blast 検索の条件は identity が 30%以上、query coverage が 70%以上とし、それ以外は default の設定で行った。同一の ORF が複数の核様体タンパク質に対して相同性があると抽出された場合には、e-value 値が最も高いものを採用した。

#### 2-2-4. Genomic BLAST 解析

細菌の染色体上に存在する核様体タンパク質遺伝子の抽出には genomic BLAST ([http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sutils/genom\\_table.cgi](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sutils/genom_table.cgi))を利用した。2-2-3 で列挙した核様体タンパク質のうち Hha を除く 9 つのアミノ酸配列をクエリとして TBLASTN 解析を行い、588 個の proteobacterial genome 中に含まれる核様体タンパク質遺伝子を抽出した。Blast 検索の条件は identity が 30%以上、query coverage が 70%以上とし、それ以外は default の設定で行った。また、全塩基配列が解読済みの細菌の配列情報を NCBI から取得し (<ftp://ftp.ncbi.nih.gov/genomes/Bacteria/>)、サイズの解析に用いた。

#### 2-2-5. Relaxase 配列に基づく分類

Relaxase はプラスミドの伝達に必須のタンパク質であり、その配列に基づき伝達性プラスミドを 6 つのファミリー (MOB<sub>C</sub>、MOB<sub>F</sub>、MOB<sub>H</sub>、MOB<sub>P</sub>、MOB<sub>Q</sub>、および MOB<sub>V</sub>)に分類する分類法が Garcillán-Barcia らにより提唱されている [Garcillán-Barcia et al., 2009]。核様体タンパク質遺伝子の有無とプラスミドの伝達性との間に関連性があるか否かを考察するため、2-2-2 で分類した Gram-negative グループのプラスミドをさらに relaxase 配列に基づき分類した。Relaxase の有無は local TBLASTN 解析により判定し、クエリには Garcillán-Barcia らが用いたのと同じ relaxase のアミノ酸配列を利用した。Blast 検索の条件は identity が 30%以上、query coverage が 70%以上とし、それ以外は default の設定で行った。クエリとして用いた relaxase の名前、長さ、accession number、分類されるファミリーを以下に示す。

Relaxase の名前	クエリとして用いた長さ(aa)	DDBJ/EMBL/GenBank accession number	分類されるファミリー
MobC_CloDF13	243	CAB62410	MOB <sub>C</sub>
TrwC_R388	N 末端側 300	CAA44853	MOB <sub>F</sub>
TraI_R27	N 末端側 300	NP_058333	MOB <sub>H</sub>
TraI_RP4	N 末端側 300	YP_001687708	MOB <sub>P</sub>
MobA_RSF1010	N 末端側 300	NP_044304	MOB <sub>Q</sub>
MobM_pMV158	N 末端側 300	AAA25387	MOB <sub>V</sub>

## 2-3. 結果

### 2-3-1. 由来の生物種に基づくプラスミド分類

2010 年 4 月時点で NCBI に登録されていた全塩基配列が解読済みの全 2,260 個のプラスミドについて、塩基配列情報を取得した。このデータベース中に含まれるプラスミドを由来の生物種ごとに分類した結果、1,382 個の Gram-negative plasmid、725 個の Gram-positive plasmid、81 個の archaeal plasmid、43 個の eukaryotic plasmid、1 個の viral plasmid、および 28 個の unclassified plasmid を含んでいた。

### 2-3-2. 核様体タンパク質遺伝子を含むプラスミドの抽出

全 2,260 個のプラスミドのうち核様体タンパク質遺伝子を含むプラスミドの個数を local TBLASTN 解析により調べた。その結果、全体の約 7%にあたる 155 個のプラスミドが核様体タンパク質遺伝子を有することが明らかとなった。このうち 75%(116 個)は 1 つ、残りの 25%(39 個)は 2 つ以上の核様体タンパク質遺伝子を有していた。各核様体タンパク質遺伝子を含むプラスミドの個数を Table 2-1 に、一覧を Table 2-2～2-6 に示した。

Table 2-1. 各核様体タンパク質遺伝子を有するプラスミドの個数

核様体タンパク質名	Gram-negative plasmid の個数	Gram-positive plasmid の個数	その他 plasmid の個数	合計	Plasmid の一覧
Fis	0	0	0	0	
H-NS	22	0	0	22	Table 2-2
HU	51	15	0	66	Table 2-3
IHF	25	2	0	27	Table 2-4
Lrp	46	1	1	48	Table 2-5
MvaT	3	0	0	3	Table 2-6
NdpA	3	0	0	3	Table 2-6

各核様体タンパク質遺伝子を保持するプラスミドの個数を分類ごとに示した。

抽出されたプラスミドの中には核様体タンパク質遺伝子を保持することが既に知られているプラスミドが含まれていた。一例として、H-NS ホモログをコードする R27 [Sherburne et al., 2000]および pHCM1 [Wain et al., 2003]、HU、NdpA ホモログをコードする pQBR103 [Tett et al., 2007]、MvaT、HU、NdpA ホモログをコードする pCAR1 [Maeda et al., 2003; Takahashi et al., 2009a]などが挙げられる。この結果は本 blast 検索の妥当性を示すものである。また、155 個のうち大部分を占める 136 個(88%)のプラスミドは Gram-negative plasmid に分類された。これはクエリとして用いた核様体タンパク質がいずれもグラム陰性細菌由来のものであることを考慮すると、妥当な結果である。そのため、これ以降の解析は 1,382 個の Gram-negative plasmid とそのうちの核様体タンパク質遺伝子を保持する 136 個の plasmid を対象に行った。

Table 2-2. H-NSホモログ遺伝子を有するプラスミド一覧

Plasmid name	Accession No	Source organism	Length (nt)	G+C content (%)	Identity (%)	Query coverage (%)	Subject start	Subject end	Classification	MOB family
1										
pAsa5	NC_013972	<i>Erwinia amylovora</i> ATCC 49946	28,243	50	66	99	3,129	2,728	—	
	NC_009350	<i>Aeromonas salmonicida</i> subsp. <i>salmonicida</i> A449	155,098	54	46	99	941	534	—	MOB <sub>F</sub>
pAsa15	NC_009352	<i>Aeromonas salmonicida</i> subsp. <i>salmonicida</i>	18,536	54	46	99	16,890	16,483	—	
pEA29	NC_013957	<i>Erwinia amylovora</i> CFBP1430	28,259	50	66	99	12,285	12,692	—	
pEA29	NC_005706	<i>Erwinia amylovora</i>	28,185	50	64	99	3,129	2,728	—	
pEC-IMP	NC_012555	<i>Enterobacter cloacae</i>	318,782	48	64	99	2,991	2,590	—	
pEC-IMPQ	NC_012556	<i>Enterobacter cloacae</i>	324,503	48	64	99	109,370	108,969	—	MOB <sub>H</sub>
pEJ30	NC_004834	<i>Erwinia</i> sp. Ejp 556	29,593	50	66	99	109,370	108,969	—	MOB <sub>H</sub>
pEP36	NC_013263	<i>Erwinia pyrifoliae</i> Ep1/96	35,909	50	66	99	4,651	4,250	—	
pEP36	NC_004445	<i>Erwinia pyrifoliae</i> Ep1/96	35,904	50	64	98	25,040	25,441	—	
pET45	NC_010699	<i>Erwinia tasmaniensis</i> Et1/99	44,694	51	52	93	4,675	4,280	—	
pET49	NC_010697	<i>Erwinia tasmaniensis</i> Et1/99	48,751	44	36	94	37,435	37,809	—	MOB <sub>F</sub>
pHCM1	NC_003384	<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar Typhi str. CT18	218,160	48	61	99	30,821	31,204	—	
pK2044	NC_006625	<i>Klebsiella pneumoniae</i> NTUH-K2044	224,152	50	67	99	131,861	131,460	—	MOB <sub>H</sub>
plasmid_153kb	NC_009705	<i>Yersinia pseudotuberculosis</i> IP 31758	153,140	40	44	100	35,717	36,112	—	
pLVPK	NC_005249	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	219,385	50	67	99	139,846	140,265	—	
pMAK1	NC_009981	<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar Choleraesuis	208,409	47	61	99	114,397	114,792	—	
pO111_1	NC_013365	<i>Escherichia coli</i> O111:H- str. 11128	204,604	47	61	99	60,046	59,645	—	MOB <sub>H</sub>
pSG1	NC_007713	<i>Sodalis glossinidius</i> str. 'morsitans'	83,306	49	43	97	80,175	79,774	—	MOB <sub>H</sub>
R27	NC_002305	<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar Typhi	180,461	46	61	99	2,533	2,922	—	
R478	NC_005211	<i>Serratia marcescens</i>	274,762	46	64	99	148,225	148,626	—	MOB <sub>H</sub>
unnamed	NC_011148	<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar Agona str. SL483	37,978	41	43	95	111,747	111,346	—	MOB <sub>H</sub>
							7,671	7,288	—	

Local TBLASTN解析の結果抽出された、H-NSホモログ遺伝子を有するプラスミドの一覧を示す。

(NCBI未登録であるが、上記以外にもH-NSホモログ遺伝子を有するプラスミドとしてpsf-R27が挙げられる [Wei et al., 2003]。)  
G+C contentはプラスミドの平均G+C含量を、IdentityはH-NSとの相同性を、ClassificationのーはGram-negative plasmidであることを示す。

Table 2-3. HUホモログ遺伝子を有するプラスミド一覧

Plasmid name	Accession No	Source organism	Length (nt)	G+C content (%)	Identity (%)	Query coverage (%)	Subject start	Subject end	Classification	MOB family
1	NC_006823	<i>Aromatoleum aromaticum</i> EbN1	207,355	58	55	99	186,175	185,909	—	—
1	NC_007949	<i>Polaromonas</i> sp. JS666	360,405	57	52	99	61,052	60,786	—	MOB <sub>H</sub>
1	NC_008010	<i>Deinococcus geothermalis</i> DSM 11300	574,127	66	38	97	550,805	550,545	+	+
1	NC_008503	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> SK11	14,041	34	37	94	9,732	10,007	+	MOB <sub>P</sub>
1	NC_008242	<i>Chelaivorans</i> sp. BNC1	343,931	62	41	94	133,932	133,678	—	MOB <sub>O</sub>
2	NC_012529	<i>Deinococcus deserti</i> VCD115	314,317	64	38	93	269,648	269,899	+	+
3	NC_012528	<i>Deinococcus deserti</i> VCD115	396,459	61	40	96	8,700	8,957	+	+
megaplasmid	NC_007974	<i>Cupriavidus metallidurans</i> CH34	2,580,084	64	51	99	1,393,415	1,393,149	—	MOB <sub>V</sub>
megaplasmid	NC_005863	<i>Desulfovibrio vulgaris</i> str. Hildenborough	202,301	66	31	98	5,502	5,765	—	—
megaplasmid pDF308	NC_013940	<i>Deferribacter desulfuricans</i> SSM1	308,544	24	41	100	253,817	253,548	—	—
megaplasmid pHG1	NC_005241	<i>Ralstonia eutropha</i> H16	452,156	62	48	99	343,060	342,791	—	—
p49879.1	NC_006907	<i>Leptospirillum ferrooxidans</i>	28,878	58	47	99	3,281	3,015	—	MOB <sub>O</sub>
p49879.2	NC_006909	<i>Leptospirillum ferrooxidans</i>	28,012	55	48	99	15,858	15,592	—	MOB <sub>O</sub>
pAH187_270	NC_011655	<i>Bacillus cereus</i> AH187	270,082	34	59	100	113,139	112,870	+	+
pAH820_272	NC_011777	<i>Bacillus cereus</i> AH820	272,145	34	58	100	153,060	152,791	+	+
pAM04528	NC_012693	<i>Salmonella enterica</i>	158,213	52	57	99	14,067	14,333	—	MOB <sub>H</sub>
pAOVO01	NC_008765	<i>Acidovorax</i> sp. JS42	72,689	62	46	100	65,140	64,871	—	MOB <sub>F</sub>
pAPA01-011	NC_013210	<i>Acetobacter pasteurianus</i> IFO 3283-01	191,799	53	47	100	154,736	154,467	—	—
pAR060302	NC_012692	<i>Escherichia coli</i>	166,530	53	46	99	38,442	38,708	—	—
pAsa4	NC_009349	<i>Aeromonas salmonicida</i> subsp. <i>salmonicida</i> A449	166,749	53	57	99	15,755	16,021	—	MOB <sub>H</sub>
pAIS4c	NC_011984	<i>Agrobacterium vitis</i> S4	211,620	59	60	99	26,844	26,578	—	MOB <sub>H</sub>
pAIS4e	NC_011981	<i>Agrobacterium vitis</i> S4	631,775	57	41	94	141,245	140,991	—	MOB <sub>O</sub>
pBc-239	NC_011973	<i>Bacillus cereus</i> Q1	239,246	33	52	100	40,476	40,222	—	MOB <sub>O</sub>
pBF9343	NC_006873	<i>Bacteroides fragilis</i> NCTC 9343	36,560	32	35	92	191,895	192,164	+	+
pBPHY01	NC_010625	<i>Burkholderia phymatum</i> STM815	1,904,893	62	43	99	826,527	826,252	—	MOB <sub>P</sub>
pBPHY02	NC_010627	<i>Burkholderia phymatum</i> STM815	595,108	59	45	99	98,625	98,359	—	—
pBtoxis	NC_010076	<i>Bacillus thuringiensis</i> serovar israelensis	127,923	32	52	99	77,382	77,648	+	+
pBWB401	NC_010180	<i>Bacillus weihenstephanensis</i> KBAB4	417,054	34	59	100	338,347	338,078	+	+
pCAR1	NC_004444	<i>Pseudomonas resinovorans</i> CA10	199,035	56	42	99	97,809	98,075	—	MOB <sub>H</sub>
pCAUL01	NC_010335	<i>Caulobacter</i> sp. K31	233,649	67	44	99	97,598	97,329	—	MOB <sub>O</sub>
pCER270	NC_010924	<i>Bacillus cereus</i>	270,082	34	59	100	169,548	169,279	+	+
pDBORO	NC_009137	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> bv. diacetylactis	16,404	35	37	94	16,387	16,112	+	+
pDVUL01	NC_008741	<i>Desulfovibrio vulgaris</i> DP4	198,504	66	31	98	198,317	198,054	—	—
peH4H	NC_012690	<i>Escherichia coli</i>	148,105	53	57	99	14,067	14,333	—	MOB <sub>H</sub>
pG9842_209	NC_011775	<i>Bacillus cereus</i> G9842	209,488	30	60	100	88,828	88,559	+	+
pH308197_258	NC_011339	<i>Bacillus cereus</i> H3081.97	258,484	34	59	100	83,033	83,302	+	+
pHD5AT	NC_012752	<i>Candidatus Hamiltella defensa</i> 5AT ( <i>Acyrtosiphon pisum</i> )	59,032	45	45	99	14,981	15,247	—	MOB <sub>P</sub>
pIP1202	NC_009141	<i>Yersinia pestis</i> bv. <i>Orientalis</i> str. IP275	182,913	53	57	99	14,067	14,333	—	MOB <sub>H</sub>
plasmid 2	NC_007972	<i>Cupriavidus metallidurans</i> CH34	171,459	61	46	99	125,530	125,261	—	—
pMO128	NC_006525	<i>Cupriavidus metallidurans</i> CH34	171,461	61	46	99	51,529	51,798	—	—

Table 2-3. 続き

Plasmid name	Accession No	Source organism	Length (nt)	G+C content (%)	Identity (%)	Query coverage (%)	Subject start	Subject end	Classification	MOB family
pMPI18	NC_007930	<i>Lactobacillus salivarius</i> UCC118	242,436	32	54	99	56,763	56,497	+	MOB <sub>V</sub>
pNPUN02	NC_010632	<i>Nostoc punctiforme</i> PCC 73102	254,918	41	44	99	74,804	74,538	—	MOB <sub>V</sub>
pOANT02	NC_009670	<i>Ochrobactrum anthropi</i> ATCC 49188	101,491	59	49	94	32,700	32,446	—	—
pP91278	NC_008613	<i>Photobacterium damsela</i> subsp. <i>piscicida</i>	131,520	52	57	99	125,918	126,184	—	MOB <sub>H</sub>
pP99-018	NC_008612	<i>Photobacterium damsela</i> subsp. <i>piscicida</i>	150,157	51	57	99	133,314	133,580	—	MOB <sub>H</sub>
pPER272	NC_010921	<i>Bacillus cereus</i>	272,145	34	58	100	153,060	152,791	+	—
pPMA4326A	NC_005918	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>maculicola</i>	46,697	55	42	99	1,520	1,786	—	—
pPMA4326B	NC_005919	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>maculicola</i>	40,110	55	45	99	1,457	1,723	—	—
pQBR103	NC_009444	<i>Pseudomonas fluorescens</i> SBW25	425,094	53	51	99	182,862	183,128	—	—
pR132503	NC_012853	<i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. <i>trifolii</i> WSM1325	516,088	59	47	94	300,662	300,916	—	MOB <sub>O</sub>
pRA1	NC_012885	<i>Aeromonas hydrophila</i>	143,963	51	58	99	15,573	15,839	—	MOB <sub>H</sub>
pRALTA	NC_010529	<i>Cupriavidus taiwanensis</i>	557,200	60	46	98	153,542	153,276	—	—
pREB1	NC_009926	<i>Acaryochloris marina</i> MBIC11017	374,161	47	46	100	339,743	340,012	—	MOB <sub>F</sub>
pREB2	NC_009927	<i>Acaryochloris marina</i> MBIC11017	356,087	45	48	100	57,583	57,852	—	MOB <sub>F</sub>
pREB3	NC_009928	<i>Acaryochloris marina</i> MBIC11017	273,121	45	46	100	234,682	234,951	—	MOB <sub>F</sub>
pRL7	NC_008382	<i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. <i>viciae</i> 3841	151,564	58	48	94	20,484	20,230	—	MOB <sub>O</sub>
pRLG203	NC_011370	<i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. <i>trifolii</i> WSM2304	308,747	58	49	94	141,121	140,867	—	—
pRp12D01	NC_012855	<i>Ralstonia pickettii</i> 12D	389,779	58	37	99	321,346	321,080	—	MOB <sub>H</sub>
pSG2	NC_007184	<i>Sodalis glossinidius</i>	27,240	45	45	86	10,072	9,845	—	—
pSG3	NC_007186	<i>Sodalis glossinidius</i>	19,201	51	51	100	13,812	13,543	—	—
pSN254	NC_009140	<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar <i>Newport</i> str. SL254	176,473	53	57	99	14,067	14,333	—	MOB <sub>H</sub>
pTiS4	NC_011982	<i>Agrobacterium vitis</i> S4	258,824	57	41	94	27,356	27,102	—	MOB <sub>O</sub>
pTi-SAKURA	NC_002147	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	206,479	56	44	94	83,408	83,154	—	—
pVSAL840	NC_011311	<i>Ativibrio salmonicida</i> LFI1238	83,540	40	60	99	95,763	95,509	—	MOB <sub>O</sub>
pYRI	NC_009139	<i>Yersinia ruckeri</i>	158,038	51	58	99	31,361	31,627	—	MOB <sub>F</sub>
Ti	NC_003065	<i>Agrobacterium tumefaciens</i> str. C58	214,233	57	44	94	15,070	15,336	—	MOB <sub>H</sub>
							139,735	139,481	—	MOB <sub>O</sub>

Local TBLASTN解析の結果抽出された、HUホモログ遺伝子を有するプラスミドの一覧を示す。  
G+C contentはプラスミドの平均G+C含量を、IdentityはHUとの相同性を示す。  
ClassificationのーはGram-negative、+はGram-positive plasmidであることを示す。



Table 2-4. IHFホモログ遺伝子を有するプラスミド一覧

Plasmid name	Accession No	Source organism	Length (nt)	G+C content (%)	Identity (%)	Query coverage (%)	Subject start	Subject end	Classification	MOB family
At	NC_003064	<i>Agrobacterium tumefaciens</i> str. C58	542,868	57	36	82	112,654	112,412	—	MOB <sub>Q</sub>
megaplasmid	NC_012811	<i>Methylobacterium extorquens</i> AM1	1,261,460	68	33	94	720,582	720,860	—	—
p2META1	NC_012809	<i>Methylobacterium extorquens</i> AM1	37,858	65	44	95	28,369	28,635	—	MOB <sub>Q</sub>
pAACI01	NC_013206	<i>Alicyclobacillus acidocaldarius</i> subsp. <i>acidocaldarius</i> DSM 446	91,726	54	43	80	62,668	62,432	+	+
pACHL01	NC_011879	<i>Arthrobacter chlorophenolicus</i> A6	426,858	64	32	92	408,818	408,546	+	+
pALVIN02	NC_013862	<i>Allochromatium vinosum</i> DSM 180	39,929	53	60	98	10,902	10,627	—	—
pAph01	NC_013193	<i>Candidatus Accumulibacter phosphatis</i> clade IIA str. UW-1	167,595	62	56	95	144,197	144,463	—	MOB <sub>P</sub>
pAph03	NC_013191	<i>Candidatus Accumulibacter phosphatis</i> clade IIA str. UW-1	37,695	59	58	97	5,412	5,140	—	—
pAtK84b	NC_011990	<i>Agrobacterium radiobacter</i> K84	184,668	59	38	86	54,109	53,855	—	MOB <sub>Q</sub>
pAtK84c	NC_011987	<i>Agrobacterium radiobacter</i> K84	388,169	57	43	93	340,807	340,532	—	—
pAtS4b	NC_011991	<i>Agrobacterium vitis</i> S4	130,435	56	46	93	10,327	10,052	—	MOB <sub>Q</sub>
pBBta01	NC_009475	<i>Bradyrhizobium</i> sp. BTAi1	228,826	61	47	97	44,880	45,152	—	—
pBFY46	NC_006297	<i>Bacteroides fragilis</i> YCH46	33,716	34	39	86	6,642	6,388	—	—
pBIND01	NC_010580	<i>Beijerinckia indica</i> subsp. <i>indica</i> ATCC 9039	181,736	56	36	77	25,098	25,343	—	MOB <sub>P</sub>
pCHO1	NC_014007	<i>Sphingobium japonicum</i> UT26S	190,974	63	36	90	179,816	179,601	—	MOB <sub>F</sub>
pGLOV01	NC_010815	<i>Geobacter lovleyi</i> SZ	77,113	53	38	92	63,111	63,377	—	—
pM44601	NC_010373	<i>Methylobacterium</i> sp. 4-46	57,951	65	35	97	41,196	41,468	—	—
pMPOP01	NC_010727	<i>Methylobacterium populi</i> BJ001	25,164	65	49	93	7,806	7,534	—	—
pMRAD03	NC_010514	<i>Methylobacterium radiotolerans</i> JCM 2831	42,985	63	38	94	10,635	10,375	—	MOB <sub>F</sub>
pMRAD04	NC_010517	<i>Methylobacterium radiotolerans</i> JCM 2831	37,743	64	38	94	26,778	26,515	—	—
pPRO1	NC_008607	<i>Pelobacter propionicus</i> DSM 2379	202,397	48	41	94	10,763	10,500	—	—
pRSPA01	NC_009429	<i>Rhodobacter sphaeroides</i> ATCC 17025	877,879	68	49	97	129,679	129,957	—	—
pSWIT01	NC_009507	<i>Sphingomonas wittichii</i> RW1	310,228	64	40	95	783,519	783,791	—	MOB <sub>F</sub>
pTcM1	NC_010600	<i>Acidithiobacillus caldus</i>	65,158	57	36	92	106,554	106,820	—	—
pXCV183	NC_007507	<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>vesicatoria</i> str. 85-10	182,572	60	56	89	35,341	35,069	—	MOB <sub>P</sub> , MOB <sub>Q</sub>
Ti	NC_002377	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	194,140	55	33	95	25,186	25,449	—	—
Ti plasmid pTiBo542	NC_010929	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	244,978	55	43	97	138,753	138,490	—	MOB <sub>Q</sub>
					36	86	180,164	180,436	—	MOB <sub>Q</sub>
					45	98	209,743	209,489	—	MOB <sub>Q</sub>
							187,204	187,479	—	

Local TBLASTN解析の結果抽出された、IHFホモログ遺伝子を有するプラスミドの一覧を示す。

G+C contentはプラスミドの平均G+C含量を、IdentityはIHFとの相同性を示す。

Classificationの—はGram-negative、+はGram-positive plasmidであることを示す。

Table 2-5. Lrpホモログ遺伝子を有するプラスミド一覧

Plasmid name	Accession No	Source organism	Length (nt)	G+C content (%)	Identity (%)	Query coverage (%)	Subject start	Subject end	Classification	MOB family
1	NC_008688	<i>Paracoccus denitrificans</i> PD1222	653,815	67	41	92	252,075	251,623	—	—
A	NC_009007	<i>Rhodobacter sphaeroides</i> 2.4.1	114,045	69	39	93	30,241	29,789	—	MOB <sub>F</sub>
B	NC_007488	<i>Rhodobacter sphaeroides</i> 2.4.1	114,178	70	43	96	81,861	81,385	—	—
bglu_lp	NC_012723	<i>Burkholderia glumae</i> BGRI	133,591	61	36	90	124,017	123,577	—	—
mega plasmid	NC_008043	<i>Ruegeria</i> sp. TM1040	821,788	59	41	84	143,820	144,233	—	—
					41	91	687,257	687,706	—	—
megaplasmid	NC_007974	<i>Cupriavidus metallidurans</i> CH34	2,580,084	64	36	91	734,136	733,690	—	MOB <sub>V</sub>
					44	88	1,171,245	1,170,814	—	—
					40	91	1,169,702	1,169,256	—	—
megaplasmid	NC_006569	<i>Ruegeria pomeroyi</i> DSS-3	491,611	63	36	88	356,303	355,869	—	MOB <sub>C</sub>
megaplasmid	NC_007336	<i>Ralstonia eutropha</i> JMP134	634,917	61	35	93	377,503	377,045	—	—
p42e	NC_007765	<i>Rhizobium etli</i> CFN 42	505,334	62	34	71	255,037	255,384	—	—
p42f	NC_007766	<i>Rhizobium etli</i> CFN 42	642,517	61	45	88	436,907	437,341	—	—
					43	91	406,350	405,901	—	—
					41	85	491,383	491,799	—	—
					39	95	210,634	211,098	—	—
					39	96	199,426	199,899	—	—
pAB510a	NC_013855	<i>Azospirillum</i> sp. B510	1,455,109	68	57	88	274,908	275,342	—	—
					44	95	979,549	980,013	—	—
					32	94	1,180,335	1,179,874	—	—
pAB510b	NC_013856	<i>Azospirillum</i> sp. B510	723,779	67	44	84	471,830	472,243	—	—
					32	94	318,139	318,600	—	—
pAB510c	NC_013857	<i>Azospirillum</i> sp. B510	681,723	67	45	85	408,064	407,645	—	—
					34	91	36,385	36,834	—	—
pAB510d	NC_013858	<i>Azospirillum</i> sp. B510	628,837	68	44	79	472,768	472,379	—	—
					40	90	323,184	322,741	—	—
					37	87	281,438	281,866	—	—
pAtS4e	NC_011981	<i>Agrobacterium vitis</i> S4	631,775	57	30	85	619,027	618,623	—	MOB <sub>O</sub>
					30	87	460,443	460,871	—	—
pBPHY01	NC_010625	<i>Burkholderia phymatum</i> STM815	1,904,893	62	34	74	425,247	424,888	—	—
pBPHY02	NC_010627	<i>Burkholderia phymatum</i> STM815	595,108	59	46	85	1,153,608	1,154,027	—	—
					41	91	271,795	271,346	—	—

Table 2-5. 続き

Plasmid name	Accession No	Source organism	Length (nt)	G+C content (%)	Identity (%)	Query coverage (%)	Subject start	Subject end	Classification	MOB family
pC	NC_010997	<i>Rhizobium etli</i> CIAT 652	1,091,523	61	46	88	617,696	618,130	—	MOB <sub>Q</sub>
					42	90	609,059	608,619		
					39	95	417,738	418,202		
					42	79	714,804	715,193		
					39	93	406,570	407,025		
pCAUL01	NC_010335	<i>Caulobacter</i> sp. K31	233,649	67	34	89	182,479	182,042	—	MOB <sub>O</sub>
pEST4011	NC_005793	<i>Achromobacter denitrificans</i>	76,958	62	58	88	41,224	40,793	—	MOB <sub>P</sub>
					58	88	34,233	33,802		
pGMI1000MP	NC_003296	<i>Ralstonia solanacearum</i> GMI1000	2,094,509	67	43	98	1,737,958	1,738,437	—	
					46	93	822,030	821,572		
pHV4	NC_013966	<i>Haloferax volcanii</i> DS2	635,786	62	33	71	401,763	401,410	Archaea	
pJJB1	NC_013666	<i>Burkholderia cepacia</i>	99,448	63	58	88	74,907	75,338	—	MOB <sub>P</sub>
pK2044	NC_006625	<i>Klebsiella pneumoniae</i> NTUH-K2044	224,152	50	33	90	194,643	195,086	—	
pLVPK	NC_005249	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	219,385	50	33	90	46,236	46,679	—	
pMLa	NC_002679	<i>Mesorhizobium loti</i> MAFF303099	351,911	59	32	93	185,603	185,148	—	
					30	89	207,314	206,877		
pMLb	NC_002682	<i>Mesorhizobium loti</i> MAFF303099	208,315	60	37	93	24,632	24,177	—	
pNGR234a	NC_000914	<i>Rhizobium</i> sp. NGR234	536,165	58	41	70	197,189	196,845	—	MOB <sub>O</sub>
					30	89	188,867	188,430		
pNGR234b	NC_012586	<i>Rhizobium</i> sp. NGR234	2,430,033	62	46	90	656,547	656,107	—	MOB <sub>O</sub>
					45	85	667,494	667,913		
					43	90	1,038,020	1,038,463		
					44	85	682,796	683,215		
					38	96	2,400,849	2,401,319		
					44	79	709,104	708,715		
					41	89	28,336	28,761		
					33	89	1,108,900	1,109,337		
					36	90	703,213	702,764		
					32	77	1,112,953	1,112,582		
pPNAP04	NC_008760	<i>Polaromonas naphthalenivorans</i> CJ2	143,747	59	35	90	142,511	142,068	—	
pR132501	NC_012848	<i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. trifolii WSM1325	828,924	60	47	88	234,905	234,471	—	MOB <sub>O</sub>
					44	86	386,338	386,760		
					39	93	645,542	645,087		
					42	79	147,165	146,776		
pRALTA	NC_010529	<i>Cupriavidus taiwanensis</i>	557,200	60	38	91	465,839	465,393	—	
pRHL1	NC_008269	<i>Rhodococcus jostii</i> RHA1	1,123,075	65	36	91	854,207	854,656	+	
					33	84	783,666	783,253		

Table 2-5. 続き

Plasmid name	Accession No	Source organism	Length (nt)	G+C content (%)	Identity (%)	Query coverage (%)	Subject start	Subject end	Classification	MOB family
pRL12	NC_008378	<i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. viciae 3841	870,021	61	46	88	599,116	598,682	—	MOB <sub>Q</sub>
					43	88	658,287	658,718		
					39	93	45,601	45,146		
					42	79	450,080	449,691		
pRL8	NC_008383	<i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. viciae 3841	147,463	59	33	87	70,763	70,344	—	MOB <sub>Q</sub>
pRLG201	NC_011368	<i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. trifolii WSM2304	1,266,105	60	45	89	917,573	917,136	—	MOB <sub>Q</sub>
					44	85	41,998	42,417		
					44	79	473,039	472,650		
					40	93	1,162,146	1,161,691		
					40	93	1,150,939	1,150,484		
					32	88	707,587	707,162		
pRSKD131A	NC_011962	<i>Rhodobacter sphaeroides</i> KDI31	157,345	70	42	96	148,295	147,819	—	
pRSKD131B	NC_011960	<i>Rhodobacter sphaeroides</i> KDI31	103,355	70	39	93	98,400	97,948	—	
pRSPA01	NC_009429	<i>Rhodobacter sphaeroides</i> ATCC 17025	877,879	68	40	90	31,309	30,866	—	
					39	88	659,383	658,952		
pRSPH01	NC_009040	<i>Rhodobacter sphaeroides</i> ATCC 17029	122,606	70	39	93	118,088	118,540	—	
pSMED01	NC_009620	<i>Sinorhizobium medicae</i> WSM419	1,570,951	61	40	77	143,180	143,557	—	MOB <sub>Q</sub>
					34	89	574,284	573,847		
pSMED02	NC_009621	<i>Sinorhizobium medicae</i> WSM419	1,245,408	60	42	91	556,486	556,932	—	MOB <sub>Q</sub>
					40	91	842,324	842,758		
					31	87	22,345	21,917		
pSMED03	NC_009622	<i>Sinorhizobium medicae</i> WSM419	219,313	60	46	95	105,044	105,508	—	
pSmeSM11a	NC_013545	<i>Sinorhizobium meliloti</i>	144,170	60	46	96	70,449	70,922	—	MOB <sub>Q</sub>
pSymA	NC_003037	<i>Sinorhizobium meliloti</i> 1021	1,354,226	60	43	89	1,060,699	1,060,262	—	MOB <sub>Q</sub>
pSymB	NC_003078	<i>Sinorhizobium meliloti</i> 1021	1,683,333	62	38	90	440,778	440,335	—	MOB <sub>Q</sub>
					36	89	29,555	29,992		
pTiS4	NC_011982	<i>Agrobacterium vitis</i> S4	258,824	57	42	79	96,920	97,309	—	MOB <sub>Q</sub>
unnamed	NC_011961	<i>Thermomicrobium roseum</i> DSM 5159	917,738	66	30	85	736,739	737,146	—	MOB <sub>P</sub>

Local TBLASTN解析の結果抽出された、Lrpホモログ遺伝子を有するプラスミドの一覧を示す。

G+C contentはプラスミドの平均G+C含量を、IdentityはLrpとの相同性を示す。

Classificationの－はGram-negative、＋はGram-positive plasmidであることを示す。

Table 2-6. MvaTホモログ遺伝子およびNdpAホモログ遺伝子を有するプラスミド一覧

Plasmid name	Accession No	Source organism	Length (nt)	G+C content (%)	Identity (%)	Query coverage (%)	Subject start	Subject end	Classification	MOB family
<b>MvaT</b>										
pCAR1	NC_004444	<i>Pseudomonas resinovorans</i> CA10	199,035	56	61	98	77,640	77,993	—	MOB <sub>H</sub>
pQBR103	NC_009444	<i>Pseudomonas fluorescens</i> SBW25	425,094	53	61	96	98,076	97,717	—	—
pWW53	NC_008275	<i>Pseudomonas putida</i> MT53	107,929	57	61	98	8,415	8,768	—	—
<b>NdpA</b>										
p0908	NC_010113	<i>Vibrio</i> sp. 0908	81,413	49	51	99	79,731	78,736	—	—
pCAR1	NC_004444	<i>Pseudomonas resinovorans</i> CA10	199,035	56	36	98	95,390	94,395	—	MOB <sub>H</sub>
pQBR103	NC_009444	<i>Pseudomonas fluorescens</i> SBW25	425,094	53	31	99	161,413	160,400	—	—

Local TBLASTN解析の結果抽出された、MvaTホモログ遺伝子およびNdpAホモログ遺伝子を有するプラスミドの一覧を示す。  
G+C contentはプラスミドの平均G+C含量を、IdentityはMvaTおよびNdpAとの相同性を示す。  
ClassificationのーはGram-negative plasmidであることを示す。

### 2-3-3. プラスミド上、染色体上における出現頻度比較

2-3-2 で抽出した 136 個のプラスミド上には 210 個の核様体タンパク質遺伝子が存在していた。これらプラスミドの平均サイズが 364 kb であることから、核様体タンパク質遺伝子はプラスミド上においては約 236 kb あたりに 1 つ存在していることが明らかとなった。一方、Genomic blast 解析の結果、全塩基配列が解読済みの 588 個の proteobacterial genome からは 1,054 個の核様体タンパク質遺伝子(100 個の Fis、125 個の H-NS、236 個の HU、247 個の IHF、127 個の Lrp、119 個の MvaT、および 100 個の NdpA)が抽出された。全塩基配列が解読済みの細菌の染色体の平均サイズは 3.25 Mb であることから、核様体タンパク質遺伝子は細菌染色体上において約 1.8 Mb あたりに 1 つ存在することになる。以上の解析から、プラスミド上には染色体上よりも高頻度に核様体タンパク質遺伝子が存在することが明らかとなった。

### 2-3-4. H-NS ホモログ遺伝子と Hha ホモログ遺伝子の関係

プラスミド上にコードされる核様体タンパク質のうち、特に研究が進められているものは H-NS ホモログ Sfh である [Dillon et al., 2010]。また、Hha 様タンパク質は DNA 結合能を持たないものの、H-NS の多量体形成ドメインと結合することで H-NS の遺伝子転写制御機能を調節することが知られている [Madrid et al., 2007]。そのため、プラスミド上において H-NS ホモログ遺伝子と Hha ホモログ遺伝子の分布に相関があるかに興味を持たれた。TBLASTN 解析の結果抽出された Hha ホモログ遺伝子を有するプラスミドの一覧を Table 2-7 に示す。1,382 個のプラスミドのうち Hha ホモログ遺伝子を有するものは 65 個(5%)であるのに対し、H-NS ホモログ遺伝子を有する 22 個のプラスミドの中では 12 個(55%)ものプラスミドが Hha 遺伝子を有することが明らかとなった。このことから、H-NS の有無と Hha の有無の間には強い相関があることが示唆された。

### 2-3-5. プラスミドのサイズとの関係

核様体タンパク質遺伝子を有するプラスミドの大きさについて解析を行った。1,382 個の Gram-negative plasmid をその大きさに従って small plasmid (< 10 kb)、intermediate plasmid (10~100 kb)、large plasmid (100 kb~1 Mb)、mega plasmid (> 1 Mb)に分類したところ、415 個の small plasmid のうち 0 個、686 個の intermediate plasmid のうち 34 個(5%)、269 個の large plasmid のうち 90 個(33%)、12 個の mega plasmid のうち 12 個(100%)のプラスミドが核様体タンパク質遺伝子を有していた(Fig. 2-1A)。核様体タンパク質遺伝子を有する 136 個のプラスミドの平均サイズは 364 kb であり、1,382 個のプラスミドの平均サイズ(83 kb)よりも大きかった。加えて、核様体タンパク質遺伝子を 2 つ以上有するプラスミドの平均サイズは 790 kb であり、1 つのみ有するプラスミドの平均サイズ(199 kb)よりも大きかった。以上より、サイズが大きなプラスミドほど核様体タンパク質遺伝子を有する傾向があることが明らかとなった。

次に、各核様体タンパク質遺伝子を有するプラスミドのサイズをそれぞれ比較した(Fig. 2-1B)。その結果、HU、IHF、MvaT、および NdpA ホモログ遺伝子を有するプラスミドの平均サイズがそれぞれ 301 kb、230 kb、244 kb、および 235 kb であるのに対し、H-NS ホモログ

Table 2-7. Hhaホモログ遺伝子を有するプラスミド一覧

Plasmid name	Accession No	Source organism	Length (nt)	G+C content (%)	NAP gene homolog	Identity (%)	Query coverage (%)	Subject start	Subject end	MOB family
55989p	NC_011752	<i>Escherichia coli</i> 55989	72,482	46		53	92	10,025	9,828	MOB <sub>Fi</sub>
NR1	NC_009133	<i>Escherichia coli</i>	94,289	52		53	92	87,193	87,390	MOB <sub>Fi</sub>
p1658/97	NC_004998	<i>Escherichia coli</i>	125,491	51		55	92	36,419	36,616	MOB <sub>Fi</sub>
p1ESCUM	NC_011749	<i>Escherichia coli</i> UMN026	122,301	50		53	92	53,508	53,311	MOB <sub>Fi</sub>
p2ESCUM	NC_011739	<i>Escherichia coli</i> UMN026	33,809	42		62	90	7,682	7,488	MOB <sub>O</sub>
p53638_226	NC_010719	<i>Escherichia coli</i> 53638	225,683	48		55	92	67,615	67,418	MOB <sub>Fi</sub>
pAPEC-O1-R	NC_009838	<i>Escherichia coli</i> APEC O1	241,387	46		50	92	61,389	61,586	MOB <sub>Hi</sub>
pAPEC-O2-ColV	NC_007675	<i>Escherichia coli</i>	184,501	49		55	92	3,882	3,685	MOB <sub>Fi</sub>
pAPEC-O2-R	NC_006671	<i>Escherichia coli</i>	101,375	53		53	92	4,856	4,659	MOB <sub>Fi</sub>
pBS512_211	NC_010660	<i>Shigella boydii</i> CDC 3083-94	210,919	46		55	89	190,719	190,910	MOB <sub>Fi</sub>
pBS512_33	NC_010657	<i>Shigella boydii</i> CDC 3083-94	33,103	41		62	90	2,894	3,088	
pC15-1a	NC_005327	<i>Escherichia coli</i>	92,353	53		53	92	87,490	87,687	MOB <sub>Fi</sub>
pCP301	NC_004851	<i>Shigella flexneri</i> 2a str. 301	221,618	46		55	92	207,828	208,025	MOB <sub>Fi</sub>
pCROD1	NC_013717	<i>Citrobacter rodentium</i> ICC168	54,449	47		56	92	53,220	53,417	
pCROD2	NC_013718	<i>Citrobacter rodentium</i> ICC168	39,265	42		62	90	15,526	15,332	
pCT02021853_74	NC_011204	<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar Dublin str. CT_02021853	74,551	49		62	90	48,482	48,288	MOB <sub>O</sub>
pCTX-M3	NC_004464	<i>Citrobacter freundii</i>	89,468	51		38	71	26,136	26,294	MOB <sub>P</sub>
pCTXM360	NC_011641	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	89,468	51		31	96	40,648	40,439	MOB <sub>P</sub>
pCVM29188_146	NC_011076	<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar Kentucky str. CVM29188	68,018	51		38	71	64,551	64,709	MOB <sub>P</sub>
pEC14_114	NC_013175	<i>Escherichia coli</i>	114,222	51		53	92	10,927	10,718	MOB <sub>Fi</sub>
pEC-IMP	NC_012555	<i>Enterobacter cloacae</i>	318,782	48	H-NS	50	92	113,985	114,182	MOB <sub>Fi</sub>
pEC-IMPQ	NC_012556	<i>Enterobacter cloacae</i>	324,503	48	H-NS	50	92	60,491	60,688	MOB <sub>Hi</sub>
pEG356	NC_013727	<i>Shigella sonnei</i>	70,275	52		53	92	69,444	69,641	MOB <sub>Fi</sub>
pEK499	NC_013122	<i>Escherichia coli</i>	117,536	53		53	92	41,985	42,182	
pEK516	NC_013121	<i>Escherichia coli</i>	64,471	53		53	92	31,410	31,213	
pEL60	NC_005246	<i>Erwinia amylovora</i>	60,145	51		38	71	23,187	23,345	MOB <sub>P</sub>
pEntH10407	NC_013507	<i>Escherichia coli</i> ETEC H10407	60,145	51		31	96	37,863	37,654	
pHCM1	NC_003384	<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar Typhi str. CT18	67,094	51		55	78	43,421	43,254	MOB <sub>Fi</sub>
pK2044	NC_006625	<i>Klebsiella pneumoniae</i> NTUH-K2044	218,160	48	H-NS	47	100	105,911	106,117	MOB <sub>Hi</sub>
pK29	NC_010870	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	224,152	50	H-NS, Lrp	45	85	143,331	143,528	
pKF3-70	NC_013542	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	269,674	46		50	92	59,322	59,519	MOB <sub>Hi</sub>
pKF3-94	NC_013950	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	70,057	52		53	92	15,967	15,770	MOB <sub>Fi</sub>
pKP187	NC_011282	<i>Klebsiella pneumoniae</i> 342	94,219	52		58	96	9,596	9,390	MOB <sub>Fi</sub>
pKPN3	NC_009649	<i>Klebsiella pneumoniae</i> subsp. <i>pneumoniae</i> MGH 78578	187,922	47		64	96	110,083	109,877	
plasmid_153kb	NC_009705	<i>Yersinia pseudotuberculosis</i> IP 31758	187,922	52		42	89	1,550	1,344	MOB <sub>Fi</sub>
pLVPK	NC_005249	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	175,879	40	H-NS	59	97	56,930	56,721	
			153,140	40		69	93	63,342	63,542	
			153,140	50	H-NS, Lrp	56	92	49,734	49,931	
			219,385	50		61	97	148,056	147,847	
			219,385			45	85	214,828	215,025	

Table 2-7. 続き

Plasmid name	Accession No	Source organism	Length (nt)	G+C content (%)	NAP gene homolog	Identity (%)	Query coverage (%)	Subject start	Subject end	MOB family
pMAK1	NC_009981	<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar Choleraesuis	208,409	47	H-NS	47	100	49,208	49,414	MOB <sub>H</sub>
pMAS2027	NC_013503	<i>Escherichia coli</i>	42,644	43		62	90	19,685	19,491	MOB <sub>Q</sub>
pO103	NC_013354	<i>Escherichia coli</i> O103:H2 str. 12009	75,546	49		55	92	51,727	51,924	MOB <sub>F</sub>
pO111_1	NC_013365	<i>Escherichia coli</i> O111:H- str. 11128	204,604	47	H-NS	47	100	66,925	67,131	MOB <sub>H</sub>
pO111_3	NC_013366	<i>Escherichia coli</i> O111:H- str. 11128	77,690	50		55	92	11,975	12,172	MOB <sub>F</sub>
pO157	NC_013010	<i>Escherichia coli</i> O157:H7 str. TW14359	94,601	48		55	92	70,792	70,989	
pO157	NC_011350	<i>Escherichia coli</i> O157:H7 str. EC4115	94,644	48		55	92	54,735	54,932	
pO157	NC_007414	<i>Escherichia coli</i> O157:H7 EDL933	92,077	48		55	92	1,667	1,864	
pO157	NC_002128	<i>Escherichia coli</i> O157:H7 str. Sakai	92,721	48		55	92	71,183	71,380	
pO261	NC_011812	<i>Escherichia coli</i>	72,946	51		53	92	66,608	66,805	MOB <sub>F</sub>
pO86A1	NC_008460	<i>Escherichia coli</i>	120,730	49		55	92	101,598	101,795	MOB <sub>F</sub>
pOLA52	NC_010378	<i>Escherichia coli</i>	51,602	46		62	90	12,114	11,920	MOB <sub>Q</sub>
pOU1114	NC_010421	<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar Dublin	34,595	41		62	90	5,446	5,252	MOB <sub>Q</sub>
pOU1115	NC_010422	<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar Dublin	74,589	49		62	90	37,246	37,052	MOB <sub>Q</sub>
pSB4_227	NC_007608	<i>Shigella boydii</i> Sb227	126,697	47		55	92	110,688	110,885	MOB <sub>F</sub>
pSE11-1	NC_011419	<i>Escherichia coli</i> SE11	100,021	50		56	92	58,407	58,210	MOB <sub>P</sub>
pSE34	NC_010860	<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar Enteritidis	32,950	41		62	90	21,875	22,069	MOB <sub>Q</sub>
pSFO157	NC_009602	<i>Escherichia coli</i>	121,239	50		52	75	1,709	1,870	MOB <sub>F</sub>
pSG1	NC_007713	<i>Sodalis glossinidius</i> str. 'morsitans'	83,306	49	H-NS	48	92	2,294	2,491	
pSG1	NC_007182	<i>Sodalis glossinidius</i>	81,553	49		48	92	56,217	56,414	
pSMS35_130	NC_010488	<i>Escherichia coli</i> SMS-3-5	130,440	51		55	92	3,364	3,167	MOB <sub>F</sub>
pSS_046	NC_007385	<i>Shigella sonnei</i> Ss046	214,396	45		55	92	178,363	178,560	MOB <sub>F</sub>
pUTI89	NC_007941	<i>Escherichia coli</i> UTI89	114,230	51		53	92	113,993	114,190	MOB <sub>F</sub>
pWRS01	NC_002698	<i>Shigella flexneri</i>	221,851	46		55	92	207,534	207,731	MOB <sub>F</sub>
R100	NC_002134	<i>Shigella flexneri</i> 2b str. 222	94,281	52		53	92	87,185	87,382	MOB <sub>F</sub>
R27	NC_002305	<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar Typhi	180,461	46	H-NS	47	100	159,402	159,196	MOB <sub>H</sub>
R478	NC_005211	<i>Serratia marcescens</i>	274,762	46	H-NS	50	92	59,426	59,623	MOB <sub>H</sub>
R721	NC_002525	<i>Escherichia coli</i>	75,582	43		66	90	35,285	35,091	
unnamed	NC_011148	<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar Agona str. SL483	37,978	41	H-NS	42	93	1,363	1,163	

Local TBLASTN解析の結果抽出された、Hhaホモログ遺伝子を有するプラスミドの一覧を示す。  
G+C contentはプラスミドの平均G+C含量を、IdentityはHhaとの相同性を示す。



遺伝子を有するプラスミドの平均サイズは 132 kb と比較的小さく、一方で Lrp ホモログ遺伝子を有するものの平均サイズは 725 kb と大きいことが明らかとなった。

#### 2-3-6. プラスミドの G+C 含量との関係

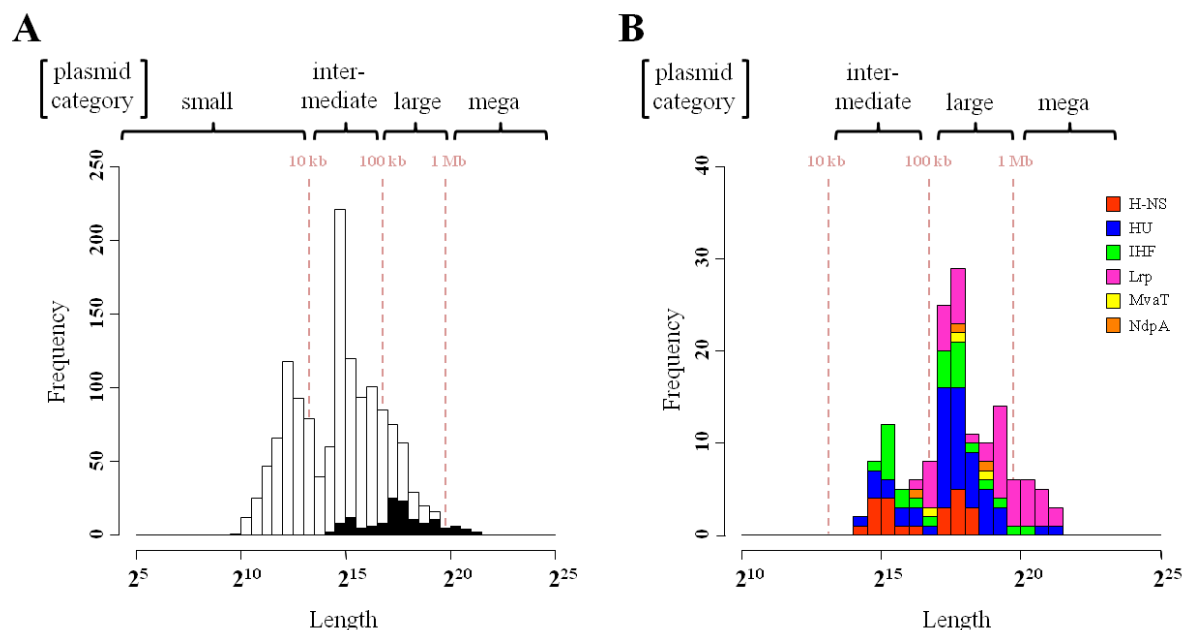
核様体タンパク質遺伝子を有するプラスミドの G+C 含量について解析を行った。核様体タンパク質遺伝子を含む 136 個のプラスミドの平均 G+C 含量は 56.4% であり、全 1,382 個のプラスミドの平均 G+C 含量(44.8%)よりも高いことが明らかとなった(Fig. 2-2A)。Large plasmid と mega plasmid の平均 G+C 含量がそれぞれ 55.0%、62.9% であり、small plasmid と intermediate plasmid の平均 G+C 含量(それぞれ 44.8%、40.4%)よりも高かったことから、この事実はサイズの大きなプラスミドほど核様体タンパク質遺伝子を有する傾向があるという 2-3-5 の結果と高い相関を示した。

次に、各核様体タンパク質遺伝子を有するプラスミドの G+C 含量をそれぞれ比較した(Fig. 2-2B)。その結果、HU、IHF、Lrp、MvaT、および NdpA ホモログ遺伝子を有するプラスミドの平均 G+C 含量がそれぞれ 54.2%、58.7%、62.3%、55.6%、および 52.9% と高いのに対し、H-NS ホモログ遺伝子を有するプラスミドの平均 G+C 含量は 48.3% と低いことが明らかとなった。

#### 2-3-7. プラスミドの伝達性との関係

核様体タンパク質遺伝子の有無とプラスミドの伝達性との間に関連があるのか解析を行った。Garcillán-Barcia らの方法(2009)に基づき、relaxase 遺伝子を有するプラスミドを 1,382 個中 409 個(30%)抽出した。この中には核様体タンパク質遺伝子を有するプラスミドが 71 個(409 個中 71 個 [17%])含まれていた。すなわち、核様体タンパク質遺伝子を有するプラスミドは持たないプラスミドよりも高頻度で(136 個中 71 個 [52%]) relaxase 遺伝子を保持することが明らかとなった。Relaxase を有する 409 個のプラスミドの平均サイズ(145 kb)が全 1,382 個のプラスミドの平均サイズ(83 kb)よりも大きかったことから、この事実もまたサイズの大きなプラスミドほど核様体タンパク質遺伝子を有する傾向があるという 2-3-5 の結果と高い相関を示した。

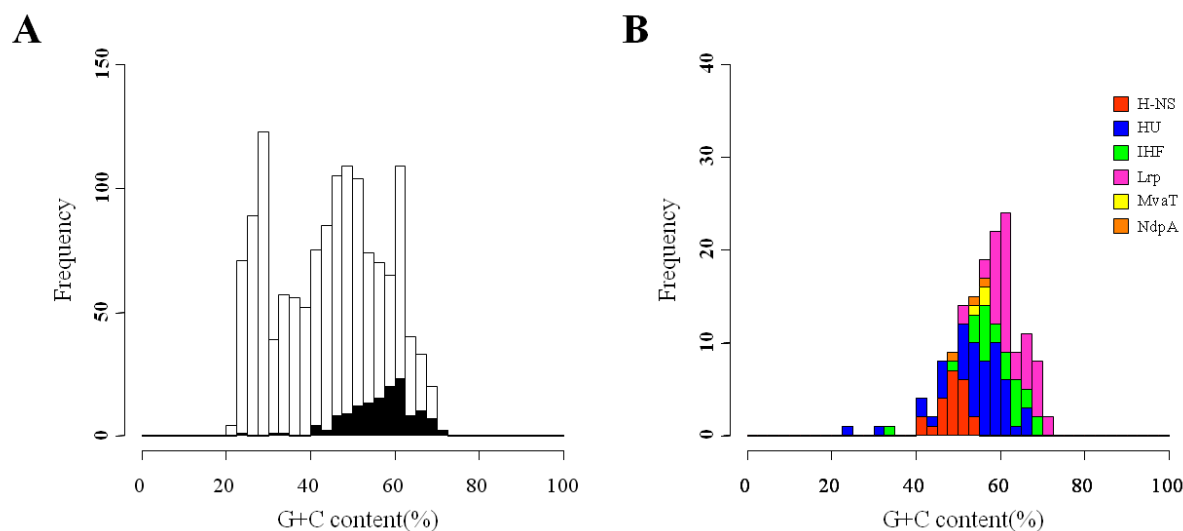
各 MOB ファミリーに分類されるプラスミドの個数、平均サイズ、平均 G+C 含量、および核様体タンパク質遺伝子を有するものの個数と割合を Table 2-8 に示す。MOB<sub>H</sub>、MOB<sub>Q</sub> ファミリーに分類されるプラスミドのうち核様体タンパク質遺伝子を有するものの割合はそれぞれ 69%、23% であり、他のファミリーより高いことが明らかとなった。MOB<sub>H</sub>、MOB<sub>Q</sub> ファミリーに含まれるプラスミドの一覧を Table 2-9, 2-10 に示す。この結果は MOB<sub>H</sub>、MOB<sub>Q</sub> ファミリーに分類されるプラスミドの平均サイズが他のファミリーより大きいこととも一致する。一方、各ファミリーに含まれるプラスミドの平均 G+C 含量と核様体タンパク質遺伝子の有無の間には関連性は見出せなかった。



**Figure 2-1. 核様体タンパク質遺伝子の有無に基づく Gram-negative plasmid のサイズ比較**

(A) 核様体タンパク質遺伝子を持つ以上有する 136 個のプラスミド、および持たない 1,246 個のプラスミドのサイズをそれぞれ黒色、白色で色分けして示した。

(B) H-NS、HU、IHF、Lrp、MvaT、および NdpA ホモログ遺伝子を有するプラスミドのサイズをそれぞれ赤色、青色、緑色、桃色、黄色、橙色で色分けして示した。



**Figure 2-2. 核様体タンパク質遺伝子の有無に基づく Gram-negative plasmid の G+C 含量比較**

(A) 核様体タンパク質遺伝子を持つ以上有する 136 個のプラスミド、および持たない 1,246 個のプラスミドの GC 含量をそれぞれ黒色、白色で色分けして示した。

(B) H-NS、HU、IHF、Lrp、MvaT、および NdpA ホモログ遺伝子を有するプラスミドのサイズをそれぞれ赤色、青色、緑色、桃色、黄色、橙色で色分けして示した。

Table 2-8. 各 MOB ファミリーに分類される Gram-negative plasmid の個数と特徴

	分類されたプラスミド の個数	核様体タンパク質遺伝子を有する プラスミドの個数と割合	平均 サイズ(kb)	平均 G+C 含量(%)
MOB <sub>C</sub>	13	1 (8%)	78	52
MOB <sub>F</sub>	128	11 (9%)	117	52
MOB <sub>H</sub>	29	20 (69%)	220	51
MOB <sub>P</sub>	86	8 (9%)	87	53
MOB <sub>Q</sub>	131	30 (23%)	198	54
MOB <sub>V</sub>	26	2 (8%)	149	46

Garcillán-Barcia らの方法(2009)に基づき Gram-negative plasmid を各 MOB ファミリーに分類した。各ファミリーに分類されたプラスミドの個数および特徴を示した。

Table 2-9. MOB<sub>H</sub>ファミリーに含まれるGram-negative plasmid一覧

Plasmid name	Accession No	Source organism	Length (nt)	G+C content (%)	NAP gene homolog	Identity (%)	Query coverage (%)	Subject start	Subject end
1	NC_007949	<i>Polaromonas</i> sp. JS666	360,405	57	HU	52	99	61,052	60,786
1	NC_008573	<i>Shewanella</i> sp. ANA-3	278,942	46					
2	NC_007950	<i>Polaromonas</i> sp. JS666	338,007	60					
ICEhin1056	NC_011409	<i>Haemophilus influenzae</i>	59,393	39					
pAM04528	NC_012693	<i>Salmonella enterica</i>	158,213	52	HU	57	99	14,067	14,333
pAPEC-O1-R	NC_009838	<i>Escherichia coli</i> APEC O1	241,387	46					
pAR060302	NC_012692	<i>Escherichia coli</i>	166,530	53	HU	57	99	15,755	16,021
pAsa4	NC_009349	<i>Aeromonas salmonicida</i> subsp. <i>salmonicida</i> A449	166,749	53	HU	60	99	26,844	26,578
pCAR1	NC_004444	<i>Pseudomonas resinovorans</i> CA10	199,035	56	MvaT	61	98	77,640	77,993
					NdpA	36	98	95,390	94,395
					HU	42	99	97,809	98,075
pEC-IMP	NC_012555	<i>Enterobacter cloacae</i>	318,782	48	H-NS	64	99	109,370	108,969
pEC-IMPQ	NC_012556	<i>Enterobacter cloacae</i>	324,503	48	H-NS	64	99	109,370	108,969
peH4H	NC_012690	<i>Escherichia coli</i>	148,105	53	HU	57	99	14,067	14,333
pHCM1	NC_003384	<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar Typhi str. CT18	218,160	48	H-NS	61	99	131,861	131,460
pIP1202	NC_009141	<i>Yersinia pestis</i> bv. Orientalis str. IP275	182,913	53	HU	57	99	14,067	14,333
pK29	NC_010870	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	269,674	46					
plasmidI	NC_007901	<i>Rhodoferrax ferrireducens</i> T118	257,447	54					
pMAK1	NC_009981	<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar Choleraesuis	208,409	47	H-NS	61	99	60,046	59,645
pMAQU02	NC_008739	<i>Marinobacter aquaeolei</i> VT8	213,290	53					
pO111_1	NC_013365	<i>Escherichia coli</i> O111:H- str. 11128	204,604	47	H-NS	61	99	80,175	79,774
pP91278	NC_008613	<i>Photobacterium damsela</i> subsp. <i>piscicida</i>	131,520	52	HU	57	99	125,918	126,184
pP99-018	NC_008612	<i>Photobacterium damsela</i> subsp. <i>piscicida</i>	150,157	51	HU	57	99	133,314	133,580
pRA1	NC_012885	<i>Aeromonas hydrophila</i>	143,963	51	HU	58	99	15,573	15,839
pRp12D01	NC_012855	<i>Ralstonia pickettii</i> 12D	389,779	58	HU	37	99	321,346	321,080
pSN254	NC_009140	<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar Newport str. SL254	176,473	53	HU	57	99	14,067	14,333
pTK9001	NC_013930	<i>Thioalkalivibrio</i> sp. K90mix	240,256	62					
pYR1	NC_009139	<i>Yersinia ruckeri</i>	158,038	51	HU	57	99	15,070	15,336
R27	NC_002305	<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar Typhi	180,461	46	H-NS	61	99	148,225	148,626
R478	NC_005211	<i>Serratia marcescens</i>	274,762	46	H-NS	64	99	111,747	111,346
Rts1	NC_003905	<i>Proteus vulgaris</i>	217,182	46					

Local TBLASTN解析の結果抽出された、MOB<sub>H</sub>ファミリーに含まれるGram-negative plasmidの一覧を示す。  
G+C contentはプラスミドの平均G+C含量を、Identityは各核様体タンパク質との相同性を示す。

Table 2-10. MOB<sub>Q</sub>ファミリーに含まれるGram-negative plasmid一覧

Plasmid name	Accession No	Source organism	Length (nt)	G+C content (%)	NAP gene homolog	Identity (%)	Query coverage (%)	Subject start	Subject end
1	NC_008242	<i>Chelativorans</i> sp. BNC1	343,931	62	HU	41	94	133,932	133,678
3	NC_007617	<i>Nitrosospira multiformis</i> ATCC 25196	14,159	50					
3	NC_007961	<i>Nitrobacter hamburgensis</i> X14	121,408	62					
At	NC_003064	<i>Agrobacterium tumefaciens</i> str. C58	542,868	57	IHF	36	82	112,654	112,412
C	NC_010542	<i>Cyanotheca</i> sp. ATCC 51142	14,685	38					
ColE9-J	NC_011977	<i>Escherichia coli</i>	7,577	50					
DN1	NC_002636	<i>Dichelobacter nodosus</i>	5,112	62					
F plasmid	NC_008036	<i>Sphingopyxis alaskensis</i> RB2256	28,543	60					
p11745	NC_013546	<i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i>	5,486	38					
p12494	NC_010889	<i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i>	14,393	33					
pLABAYE	NC_010401	<i>Acinetobacter baumannii</i> AYE	5,644	35					
pIMETA1	NC_012807	<i>Methylobacterium extorquens</i> AM1	44,195	68					
pIMETDI	NC_012987	<i>Methylobacterium extorquens</i> DM4	141,504	65					
p2007057	NC_011897	<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar Bovismorbificans	4,270	47					
p2ABSDF	NC_010396	<i>Acinetobacter baumannii</i> SDF	25,014	35					
p2ESCU1	NC_011739	<i>Escherichia coli</i> UMN026	33,809	42					
p2META1	NC_012809	<i>Methylobacterium extorquens</i> AM1	37,858	65	IHF	44	95	28,369	28,635
p3ABSDF	NC_010398	<i>Acinetobacter baumannii</i> SDF	24,922	34					
p42a	NC_007762	<i>Rhizobium etli</i> CFN 42	194,229	58					
p49879.1	NC_006907	<i>Leptospirillum ferrooxidans</i>	28,878	58	HU	47	99	3,281	3,015
p49879.2	NC_006909	<i>Leptospirillum ferrooxidans</i>	28,012	55	HU	48	99	15,858	15,592
pAb5S9	NC_009476	<i>Aeromonas bestiarum</i>	24,716	54					
pACRY07	NC_009473	<i>Acidiphilium cryptum</i> JF-5	5,629	58					
pAgK84	NC_011994	<i>Agrobacterium radiobacter</i> K84	44,420	54					
pAM5	NC_008691	<i>Acidiphilium multivorum</i>	5,161	58					
pAMI2	NC_010847	<i>Paracoccus aminophilus</i>	18,563	62					
pAMI3	NC_013513	<i>Paracoccus aminophilus</i>	5,575	61					
pAPA01-030	NC_013212	<i>Acetobacter pasteurianus</i> IFO 3283-01	49,961	54					
pAPA01-040	NC_013213	<i>Acetobacter pasteurianus</i> IFO 3283-01	3,204	54					
pAtK84b	NC_011990	<i>Agrobacterium radiobacter</i> K84	184,668	59	IHF	38	86	54,109	53,855
pAtS4b	NC_011991	<i>Agrobacterium vitis</i> S4	130,435	56	IHF	47	97	44,880	45,152
pAtS4c	NC_011984	<i>Agrobacterium vitis</i> S4	211,620	59	HU	45	94	141,245	140,991
pAtS4e	NC_011981	<i>Agrobacterium vitis</i> S4	631,775	57	HU	41	94	40,476	40,222
					Lrp	30	87	460,443	460,871
					Lrp	34	74	425,247	424,888
pAV2	NC_010310	<i>Acinetobacter venetianus</i>	15,135	36					
pB	NC_010996	<i>Rhizobium etli</i> CIAT 652	429,111	58					
pBGR3	NC_012847	<i>Bartonella grahamii</i> as4aup	28,192	36					
pBS512_5	NC_010659	<i>Shigella boydii</i> CDC 3083-94	5,114	46					
pC	NC_010997	<i>Rhizobium etli</i> CIAT 652	1,091,523	61	Lrp	46	88	617,696	618,130
					Lrp	42	90	609,059	608,619
					Lrp	39	95	417,738	418,202
					Lrp	42	79	714,804	715,193
					Lrp	39	93	406,570	407,025

Table 2-10. 続き

Plasmid name	Accession No	Source organism	Length (nt)	G+C content (%)	NAP gene homolog	Identity (%)	Query coverage (%)	Subject start	Subject end
pCAUL01	NC_010335	<i>Caulobacter</i> sp. K31	233,649	67	HU	44	99	97,598	97,329
pCAUL02	NC_010333	<i>Caulobacter</i> sp. K31	177,878	64	Lrp	34	89	182,479	182,042
pCCK1900	NC_011378	<i>Pasteurella multocida</i>	10,226	61					
pCCK381	NC_006994	<i>Pasteurella multocida</i>	10,874	61					
pCFPG4	NC_011563	<i>Candidatus Azobacteroides pseudotriconymphae</i> genomovar. CFP2	4,149	44					
pCHE-A	NC_012006	<i>Enterobacter cloacae</i>	7,560	60					
pColE8	NC_012882	<i>Escherichia coli</i>	6,751	51					
pCROD3	NC_013719	<i>Citrobacter rodentium</i> JCC168	3,910	51					
pCT02021853_74	NC_011204	<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar Dublin str. CT_02021853	74,551	49					
pCVM19633_4	NC_011093	<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar Schwarzengrund str. CVM19633	4,585	48					
pDSH01	NC_009955	<i>Dinoroseobacter shibae</i> DFL 12	190,506	60					
pET09	NC_010695	<i>Erwinia tasmaniensis</i> Etl/99	9,299	47					
pGDIA01	NC_011367	<i>Glucoacetobacter diazotrophicus</i> PAI 5	27,455	59					
pGOX3	NC_006674	<i>Gluconobacter oxydans</i> 621H	14,547	56					
pHCG3	NC_005873	<i>Oligotropha carboxidovorans</i> OM5	133,058	61					
pHRM2a	NC_012109	<i>Desulfobacterium autotrophicum</i> HRM2	68,709	42					
pIGIC156	NC_009781	<i>Escherichia coli</i>	5,146	47					
pIGMS5	NC_010883	<i>Escherichia coli</i>	6,750	51					
pIGWZ12	NC_010885	<i>Escherichia coli</i>	4,072	50					
pISP3	NC_013970	<i>Sphingomonas</i> sp. MM-1	43,398	63					
pJD4	NC_002098	<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	7,426	38					
plasmid1	NC_007801	<i>Jannaschia</i> sp. CCS1	86,072	58					
pLD-TEX-KL	NC_009966	<i>Fluoribacter dumoffii</i>	66,512	39					
pMAC	NC_006877	<i>Acinetobacter baumannii</i>	9,540	35					
pMAS2027	NC_013503	<i>Escherichia coli</i>	42,644	43					
pMbo4.6	NC_013500	<i>Moraxella bovis</i>	4,658	39					
pMCHL01	NC_011758	<i>Methylobacterium chloromethanicum</i> CM4	380,207	66					
pMG160	NC_004527	<i>Rhodobacter blasticus</i>	3,431	67					
pMG828-2	NC_008487	<i>Escherichia coli</i>	4,091	50					
pMG828-4	NC_008489	<i>Escherichia coli</i>	7,462	48					
pMMCU1	NC_013056	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	8,771	35					
pMMCU2	NC_013506	<i>Acinetobacter baumannii</i>	10,270	36					
pMRAD01	NC_010510	<i>Methylobacterium radiotolerans</i> JCM 2831	586,164	70					
pMS260	NC_005312	<i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i>	8,124	61					
pNGR234a	NC_000914	<i>Rhizobium</i> sp. NGR234	536,165	59	Lrp	41	70	197,189	196,845
					Lrp	30	89	188,867	188,430
pNGR234b	NC_012586	<i>Rhizobium</i> sp. NGR234	2,430,033	62	Lrp	46	90	656,547	656,107
					Lrp	45	85	667,494	667,913
					Lrp	43	90	1,038,020	1,038,463
					Lrp	44	85	682,796	683,215
					Lrp	38	96	2,400,849	2,401,319
					Lrp	44	79	709,104	708,715
					Lrp	41	89	28,336	28,761
					Lrp	33	89	1,108,900	1,109,337
					Lrp	36	90	703,213	702,764
					Lrp	32	77	1,112,953	1,112,582

Table 2-10. 続き

Plasmid name	Accession No	Source organism	Length (nt)	G+C content (%)	NAP gene homolog	Identity (%)	Query coverage (%)	Subject start	Subject end
pNL2	NC_009427	<i>Novosphingobium aromaticivorans</i> DSM 12444	487,268	66					
pO111_4	NC_013367	<i>Escherichia coli</i> O111:H- str. 11128	8,140	50					
pO26-S4	NC_011228	<i>Escherichia coli</i>	6,758	51					
pOLA52	NC_010378	<i>Escherichia coli</i>	51,602	46					
pOU1114	NC_010421	<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar Dublin	34,595	42					
pOU1115	NC_010422	<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar Dublin	74,589	49					
pP	NC_003455	<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar Enteritidis	4,301	50					
pP742405	NC_011733	<i>Cyanotheca</i> sp. PCC 7424	18,083	38					
pP742406	NC_011734	<i>Cyanotheca</i> sp. PCC 7424	15,219	40					
pPMA4326C	NC_005921	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>maculicola</i>	8,244	53					
pPNAP07	NC_008763	<i>Polaromonas naphthalenivorans</i> CJ2	9,898	57					
pPRO2	NC_008608	<i>Pelobacter propionicus</i> DSM 2379	30,722	56					
pPT1	NC_002143	<i>Comamonas testosteroni</i>	15,398	56					
pR132501	NC_012848	<i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. <i>trifolii</i> WSM1325	828,924	60	Lrp	47	88	234,905	234,471
					Lrp	44	86	386,338	386,760
					Lrp	39	93	645,542	645,087
					Lrp	42	79	147,165	146,776
					HU	47	94	300,662	300,916
pR132502	NC_012858	<i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. <i>trifolii</i> WSM1325	660,973	61					
pR132503	NC_012853	<i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. <i>trifolii</i> WSM1325	516,088	59					
pR132504	NC_012852	<i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. <i>trifolii</i> WSM1325	350,312	61					
pR132505	NC_012854	<i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. <i>trifolii</i> WSM1325	294,782	60					
pRF	NC_007110	<i>Rickettsia felis</i> URRWXC2	62,829	34					
pRfdelta	NC_007111	<i>Rickettsia felis</i> URRWXC2	39,263	33					
pRi1724	NC_002575	<i>Agrobacterium rhizogenes</i>	217,594	57					
pRi2659	NC_010841	<i>Agrobacterium rhizogenes</i>	185,462	58					
pRL10	NC_008381	<i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. <i>viciae</i> 3841	488,135	60					
pRL11	NC_008384	<i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. <i>viciae</i> 3841	684,202	61					
pRL12	NC_008378	<i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. <i>viciae</i> 3841	870,021	61	Lrp	46	88	599,116	598,682
					Lrp	43	88	658,287	658,718
					Lrp	39	93	45,601	45,146
					Lrp	42	79	450,080	449,691
pRL7	NC_008382	<i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. <i>viciae</i> 3841	151,564	58	HU	48	94	20,484	20,230
pRL8	NC_008383	<i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. <i>viciae</i> 3841	147,463	59	Lrp	33	87	70,763	70,344
pRLG201	NC_011368	<i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. <i>trifolii</i> WSM2304	1,266,105	60	Lrp	45	89	917,573	917,136
					Lrp	44	85	41,998	42,417
					Lrp	44	79	473,039	472,650
					Lrp	40	93	1,162,146	1,161,691
					Lrp	40	93	1,150,939	1,150,484
					Lrp	32	88	707,587	707,162
pRM	NC_010927	<i>Rickettsia monacensis</i>	23,486	32					
pSC101	NC_002056	<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar Typhimurium	9,263	51					
pSE11-6	NC_011411	<i>Escherichia coli</i> SE11	4,082	49					
pSE34	NC_010860	<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar Enteritidis	32,950	41					

Table 2-10. 続き

Plasmid name	Accession No	Source organism	Length (nt)	G+C content (%)	NAP gene homolog	Identity (%)	Query coverage (%)	Subject start	Subject end
pSMED01	NC_009620	<i>Sinorhizobium medicae</i> WSM419	1,570,951	62	Lrp	40	77	143,180	143,557
pSMED02	NC_009621	<i>Sinorhizobium medicae</i> WSM419	1,245,408	60	Lrp	34	89	574,284	573,847
pSmeSM11a	NC_013545	<i>Sinorhizobium meliloti</i>	144,170	60	Lrp	40	91	556,486	556,932
pSmeSM11b	NC_010865	<i>Sinorhizobium meliloti</i> SM11	181,251	59	Lrp	40	91	842,324	842,758
pSMS35_4	NC_010486	<i>Escherichia coli</i> SMS-3-5	4,074	50	Lrp	31	87	22,345	21,917
pSx-Qyy	NC_006826	<i>Sphingobium xenophagum</i>	5,683	56	Lrp	46	96	70,449	70,922
pSymA	NC_003037	<i>Sinorhizobium meliloti</i> 1021	1,354,226	60	Lrp	43	89	1,060,699	1,060,262
pSymB	NC_003078	<i>Sinorhizobium meliloti</i> 1021	1,683,333	62	Lrp	38	90	440,778	440,335
pTB3	NC_008388	<i>Roseobacter denitrificans</i> OCh 114	16,575	55	Lrp	36	89	29,555	29,992
pTcm1	NC_010600	<i>Acidithiobacillus caldus</i>	65,158	57	IHF	56	89	25,186	25,449
pTiS4	NC_011982	<i>Agrobacterium vitis</i> S4	258,824	57	HU	41	94	27,356	27,102
pTi-SAKURA	NC_002147	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	206,479	56	HU	40	94	83,408	83,154
pUT1	NC_014005	<i>Sphingobium japonicum</i> UT26S	31,776	64	Lrp	42	79	96,920	97,309
pUT2	NC_014009	<i>Sphingobium japonicum</i> UT26S	5,398	61	HU	44	94	95,763	95,509
pXAUT01	NC_009717	<i>Xanthobacter autotrophicus</i> Py2	316,164	65					
pXCV19	NC_007505	<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>vesicatoria</i> str. 85-10	19,146	60					
pXF51	NC_002490	<i>Xylella fastidiosa</i> 9a5c	51,158	50					
pYAN-1	NC_008246	<i>Sphingobium yanoikuyae</i>	5,182	62					
pYAN-2	NC_008247	<i>Sphingobium yanoikuyae</i>	4,924	64					
RSF1010	NC_001740	<i>Escherichia coli</i>	8,684	61					
symbiotic plasmid p42d	NC_004041	<i>Rhizobium etli</i> CFN 42	371,254	58					
Ti	NC_002377	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	194,140	55	IHF	43	97	180,164	180,436
Ti	NC_003065	<i>Agrobacterium tumefaciens</i> str. C58	214,233	57	HU	44	94	139,735	139,481
Ti plasmid pTiBo542	NC_010929	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	244,978	55	IHF	36	86	209,743	209,489
unnamed	NC_011143	<i>Phenyllobacterium zucineum</i> HLK1	382,976	69	IHF	45	98	187,204	187,479

Local TBLASTN解析の結果抽出された、MOB<sub>Q</sub>ファミリーに含まれるGram-negative plasmidの一覧を示す。  
G+C contentはプラスミドの平均G+C含量を、Identityは各核様体タンパク質との相同性を示す。



## 2-4. 考察

本章では、核様体タンパク質がプラスミド上にどれほどコードされているのかを網羅的に明らかにするとともに、プラスミド機能との関連性の有無を議論するため、全塩基配列が解読済みのプラスミド配列情報データベースを NCBI から取得した後、大腸菌でよく研究されている核様体タンパク質である Fis、H-NS、HU、IHF、Lrp、および研究例のまだ少ない核様体タンパク質である MvaT、NdpA をクエリとして用い、各々をコードする遺伝子を保持するプラスミドを抽出した。また、それらのサイズや G+C 含量、接合伝達性などの特徴について解析を行った。

Local TBLASTN 解析の結果、グラム陰性細菌由来の 1,382 個のプラスミドのうち 136 個のプラスミド上に計 210 個の核様体タンパク質遺伝子が見出された。また、核様体タンパク質遺伝子を 2 つ以上保持するプラスミド、1 つのみ保持するプラスミドの平均サイズはそれぞれ 790 kb、199 kb であり、1,382 個のプラスミドの平均サイズ (83 kb) よりも大きかった。サイズの大きなプラスミドほど、宿主細菌の転写ネットワークを乱し適合度を低下させるような遺伝子を有する可能性が高くなると考えられる。加えて、宿主細菌由来の核様体タンパク質の多くがプラスミド上に結合することにより、宿主染色体上に結合する量が不足して転写ネットワークが乱れ、宿主にとって負荷となることが予想される [Majdalani et al., 2005]。これに対し、近年ではプラスミド由来の核様体タンパク質が宿主染色体由来の核様体タンパク質の不足を補い、プラスミド・染色体双方に含まれる遺伝子の転写制御を行うと考えられる例が報告されている [Doyle et al., 2007; Dillon et al., 2010; Yun and Suzuki et al., 2010]。以上を考慮すると、サイズの大きなプラスミドは宿主への負荷を軽減するために核様体タンパク質を保持する方が都合がよいという可能性が考えられた。染色体上と比較してプラスミド上の方が核様体タンパク質遺伝子の存在頻度が高いという事実も、この仮説を支持している。核様体タンパク質遺伝子を保持するサイズの大きなプラスミドは多くの場合宿主細菌にとってより有益となるため、環境中で残存しやすく、割合が多くなるのであろう。

上記 136 個のプラスミドの中でも、H-NS ホモログ遺伝子を有するプラスミドの平均サイズは 132 kb と比較的小さかった。H-NS は溶液中で多量体を形成し、特に AT-rich な領域に結合して DNA を架橋する [Dame et al., 2006]。この DNA との結合様式が、比較的小さなプラスミド上での遺伝子転写制御を行うのに重要なかもしれない。一方で、Lrp ホモログ遺伝子を有するプラスミドの平均サイズは 725 kb と大きかった。Lrp は溶液中で二量体や八量体、十六量体を形成し、DNA を自身に巻きつけるようにして小さく折りたたむことが知られており [de los Rios and Perona, 2007]、この結合様式が特に大きなプラスミドの構造維持に寄与している可能性がある。

続いて、核様体タンパク質遺伝子を保持するプラスミドは G+C 含量が高い傾向が見出された。この傾向は、サイズの大きなプラスミドほど G+C 含量が高いという事実と相関すると考えられるが、そもそもサイズの大きなプラスミドの方が G+C 含量が高い理由について、

現在まで明確な知見は得られていない。プラスミドのサイズが小さくなると G+C 含量が低くなるメカニズムが菌体に備わっているのか、それらに核様体タンパク質が関わっているのかなど、興味は尽きず、今後さらなる研究が期待される。

また、H-NS ホモログ遺伝子を有するプラスミドは G+C 含量が低いことが明らかとなった。H-NS は AT-rich な領域に好んで結合するため [Lang et al., 2007]、比較的サイズが大きく G+C 含量が低いプラスミドが宿主細胞内に入ると、染色体由来の各種核様体タンパク質のうち特に H-NS がプラスミドに多く結合して「奪われ」、宿主の既存の転写ネットワークが乱れる [Doyle et al., 2007]。そのため、G+C 含量の低いプラスミドは宿主への負荷を軽減するために自ら H-NS を供給する方が有利であり、H-NS ホモログ遺伝子を保持しているのだと考えられる。

さらに、relaxase 配列の有無に基づいてプラスミドの伝達性と核様体タンパク質遺伝子の有無について調べたところ、核様体タンパク質遺伝子を有するプラスミドの方が relaxase 遺伝子を保持する傾向があることが明らかとなった。この事実は relaxase を有するプラスミドの方がサイズが大きいことと関連があると考えられるが、核様体タンパク質が多数の遺伝子の転写を制御する global regulator として働くことを考慮すると、核様体タンパク質はプラスミドの接合伝達にも関与していると推測される。実際、自己伝達性プラスミドを多く含む MOB<sub>H</sub>、MOB<sub>Q</sub> ファミリーに分類されたプラスミドの多くは核様体タンパク質を保持しており、特にそれらの中に多く含まれる H-NS、HU、Lrp ホモログ遺伝子はプラスミドの伝達に関与している可能性があり今後の解析が期待される。

以上の考察は主にプラスミド上にコードされる核様体タンパク質単独での機能に着目して行ったが、実際には細菌がプラスミドを保持すると、既存の複数の核様体タンパク質にプラスミド由来の核様体タンパク質が加わる状態となる。これらタンパク質は相互作用することで協調的に機能し、転写ネットワークを制御することになる [Deighan et al., 2003]。そのため、今後は核様体タンパク質間の相互作用メカニズムについてより詳細な研究が行われることが期待される。例えば、各核様体タンパク質の細菌染色体上における分布の特徴と、それら遺伝子を保持するプラスミドの宿主域の間に相関があるかどうか興味を持たれる。また、各タンパク質についてプラスミド上、染色体上の結合位置を網羅的に検出し比較を行うことで、染色体・プラスミドの G+C 含量と核様体タンパク質遺伝子の分布の関係について有用な知見が得られるものと考えられる。そうした情報を得ることによって、細菌が水平伝播を介して遺伝子を獲得するメカニズムについてより理解が深まるであろう。

(本章の内容は 2011 年に学術雑誌 International Journal of Evolutionary Biology にて発表した [Takeda et al., 2011])

## 第3章

### 核様体タンパク質 Pnd、Phu の発現解析

#### 3-1. 緒言

カルバゾール分解プラスミド pCAR1 上には核様体タンパク質(NAPs)をコードする遺伝子が 3 つ存在する (ORF70 [Pmr, plasmid-encoded MvaT-like regulator]、ORF93 [Pnd, plasmid-encoded NdpA-like protein]、ORF95a [Phu, plasmid-encoded HU-like protein])。私の所属する研究グループではこれまでに、Pmr について高密度タイリングアレイを用いた RNA マッピングによるレギュロンの抽出、ChAP-chip 法による結合位置の網羅的な検出を行い、Pmr が染色体上・プラスミド上の多数の遺伝子の転写制御に関わることを示してきた [Yun and Suzuki et al., 2010]。このことから、pCAR1 上の残り 2 種の NAPs もプラスミド機能の発現において重要な役割を担っている可能性が推測され、その機能に興味を持たれた。プラスミド上にコードされる NdpA および HU の機能を詳細に解析した研究は本研究開始当初も、また現在でも報告されておらず、Pnd および Phu の解析を行うことで NAPs の機能そのものに加えて、プラスミドの機能発現に関する有用な新知見が得られるものと期待された。

そこで本章では、まず各 NAPs の転写・発現様式を明らかにするため、pCAR1 をモデル土壌細菌である *P. putida* KT2440 株に保持させ、各 NAPs の菌体内での転写・発現解析を行った。また、大腸菌での発現系を構築し、その性状についても解析を行った。

## 3-2. 材料および方法

### 3-2-1. 使用菌株、プラスミド、および培養条件

本章で使用した菌株およびプラスミドを Table M3-1 に示す。各株の培養には LB 培地 [Sambrook and Russell, 2001]あるいは終濃度 0.1% (w/v)の carbazole (CAR)または succinate を含む NMM4 培地 (2.2 g/l Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.8 g/l KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 3.0 g/l NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>, 0.2 g/l MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 0.01 g/l FeCl<sub>3</sub>·6H<sub>2</sub>O, 0.01 g/l CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O)を用いた。培地のスケールが 5 ml (試験管)の場合は 300 rpm で、100 ml (500 ml へそ付き三角フラスコ)の場合は 120 rpm で振とうすることで培養を行った。選択培地には ampicillin (Ap) 50 µg/ml, chloramphenicol (Cm) 30 µg/ml, gentamicin (Gm) 120 µg/ml, kanamycin (Km) 50 µg/ml, sucrose 10% (w/v), および X-gal 20 µg/ml を必要に応じて添加した。Isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside (IPTG)の添加量は、各実験内容を詳しく記述する箇所で記述した。また平板培地には細菌培養用の寒天を終濃度 1.6% (w/v)となるように加えた。

### 3-2-2. 試薬および酵素

本研究で使用した試薬の調製法は新細胞工学実験プロトコール [東京大学医科学研究所制癌研究部編, 第 1 版, 1993]、およびクローニングとシーケンス [杉浦昌弘編, 1989]に従った。制限酵素およびその他の酵素類は、タカラバイオ株式会社 (Takara)、東洋紡績株式会社 (Toyobo)、ロシュ・ダイアグノスティクス株式会社 (Roche)のいずれかのものを購入し、説明書の指示に従って用いた。ベクターと DNA 断片の連結には Ligation High (Toyobo)を添付のプロトコールに従って用いた。

### 3-2-3. DNA および RNA の取り扱い

*E. coli* の形質転換、プラスミドの調製、制限酵素処理等の DNA 操作は標準的な方法 [Sambrook and Russell, 2001]に従って行った。菌体からの total DNA の調製は Current Protocols in Molecular Biology [Ausubel et al., 1990]に従って行った。

菌体からの total RNA の調製は RNeasy Protect Bacteria Reagent (Qiagen)および NucleoSpin RNA II (Macherey-Nagel)を用いて行い、操作は添付のプロトコールに従った。抽出後の RNA サンプル中に含まれる DNA は RQ1 RNase-Free DNase (Promega)を用いて分解した。

### 3-2-4. アガロースゲル電気泳動とゲルからの DNA の回収

電気泳動用アガロースゲルは、アガロース ME (ナカライテスク)あるいはアガロース X (Wako)を Tris-acetate-EDTA (TAE) buffer に溶解させて作製した。電気泳動は Mupid-2X (ADVANCE)を用いて行った。マーカーとしては Marker 5 および Marker 6 (ニッポンジーン)を用いた。

アガロースゲルからの DNA の回収には Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega)を用い、操作手順は添付のプロトコールに従った。

### 3-2-5. プラスミドの構築

本章で使用したオリゴヌクレオチドを Table M3-2 に示す。各オリゴヌクレオチドの合成はシグマ アルドリッチ ジャパン (Sigma)およびエムエステクノシステムズに依頼した。

#### <プライマー伸長解析用>

*pnd* の転写開始点をプライマー伸長法によって決定するにあたり、*pnd* の mRNA 量を増加させた KT2440(pCAR1)株の作製を行った。*pnd* を含む 5.6 kb の *Bam*HI-*Eco*RI 断片を pUC4 (pCAR1 上の 93,142~98,682 bp の領域を含む)から切り出し、pBBR1MCS-2 ベクターに連結することによりプラスミド pBBRC4 を作製した。pBBRC4 はエレクトロポレーション法により KT2440(pCAR1)株に導入した。

#### <His タグ融合 Phu、Pnd 発現 KT2440(pCAR1)株作製用>

Phu、Pnd の菌体内における発現プロファイルを解析するため、C 末端側 His タグ(6 個)融合 Phu を発現する KT2440(pCAR1phuHis)株、C 末端側 His タグ(6 個)融合 Pnd を発現する KT2440(pCAR1pndHis)株の作製を行った。作製方法は Choi and Schweizer の方法(2005)になった。使用したプラスミドの作製方法を以下に示す。まず *phu\_His\_F* および *phu\_His\_R2* プライマーを用い、pUC4 を鋳型として PCR により His タグ融合 *phu* 断片を増幅した。同様に *phu\_del\_down\_F2* および *phu\_del\_down\_R* プライマーを用いて *phu* 下流域断片を増幅した。さらに Gm-F および Gm-R プライマーを用い、pPS856 を鋳型として FRT 配列(Flp recombinase target site)を含む Gm cassette 断片を増幅した。これら 3 つの DNA 断片を混合し、overlap extension PCR を行うことで連結断片を増幅した。この断片を pT7Blue T-vector に連結してシーケンスを確認した後、pK19mobsacB ベクターに組み込むことで pK19mobsacBphuHis を作製した。pK19mobsacBpndHis についても同様に作製した。なお、株の選抜の際に利用した Gm cassette は FRT 配列に挟まれており、最終的に Flp recombinase を利用して除去した [Schweizer, 2003]。この際、pFLP2 は Ap 耐性であり、そのままでは Ap 耐性を有する KT2440(pCAR1)株には利用できないため、pTKm から Km cassette を含む *Eco*RI 断片を切断し pFLP2 の *Sca*I サイトに導入することで pFLP2Km を作製し、使用した。

#### <タンパク質発現用>

Phu および Pnd の精製酵素を調製するため、大腸菌体内での大量発現系を構築した。Phu および Pnd の、His タグ切断配列(Factor Xa)を含む N 末端側 His タグ(6 個)融合タンパク質(以下それぞれ N-his-Xa-Phu、N-his-Xa-Pnd と表記)、N 末端側 His タグ(6 個)融合タンパク質(N-his-Phu、N-his-Pnd)、C 末端側 His タグ(6 個)融合タンパク質(C-his-Phu、C-his-Pnd)発現用ベクターを構築した。Table M3-2 に示すプライマーを用い、pUC4 を鋳型として PCR により目的遺伝子を含む DNA 断片を調製した。pT7Blue T-vector に連結してシーケンスを確認した後、pCold I、pCold II、および pET-26b(+)ベクターに組み込むことで pCold I phu、pCold I pnd、pCold II phu、pCold II pnd、pETphu、pETpnd を作製した。

Table M3-1. 本章で用いた菌株およびプラスミド

Strain or plasmid	Relevant characteristics	Source or reference
<b>Bacterial strains</b>		
<i>Escherichia coli</i>		
BL21(DE3)	F <sup>-</sup> <i>dcm ompT hsdS</i> (r <sub>B</sub> <sup>-</sup> m <sub>B</sub> <sup>-</sup> ) <i>gal λ</i> (DE3)	Novagen
DH5α	F <sup>-</sup> Φ80 <i>dlac</i> ZΔM15 Δ( <i>lacZYA-argF</i> ) <i>U169 endA1 recA1 hsdR17</i> (r <sub>K</sub> <sup>-</sup> m <sub>K</sub> <sup>+</sup> ) <i>deoR thi-1 supE44 gyrA96 relA1 λ<sup>-</sup> phoA</i>	Toyobo
S17-1λ <i>pir</i>	Tm <sup>r</sup> Sm <sup>r</sup> <i>recA thi pro ΔhsdR M<sup>+</sup></i> RP4-2-Tc::Mu-Km::Tn7λ <i>pir</i>	Simon et al., 1986
<i>Pseudomonas putida</i>		
KT2440	Naturally Cm <sup>r</sup>	Bagdasarian et al., 1981
KT2440(pCAR1)	KT2440 harboring pCAR1	Shintani et al., 2006
KT2440(pCAR1phuHis)	KT2440(pCAR1) carrying gene encoding His-tagged Phu	This study
KT2440(pCAR1pndHis)	KT2440(pCAR1) carrying gene encoding His-tagged Pnd	This study
<b>Plasmids</b>		
pBBR1MCS-2	Km <sup>r</sup> , <i>lac</i> promoter	Kovach et al., 1995
pBBRC4	pBBR1MCS-2, 5.6-kb <i>Bam</i> HI- <i>Eco</i> RI fragment of pUC4 containing <i>pnd</i>	This study
pBluescriptII SK(-)	Ap <sup>r</sup> , <i>lac</i> Z, pMB9 replicon	Stratagene
pCold I	Ap <sup>r</sup> , <i>csp</i> A promoter, <i>lacI</i> , Factor Xa cleavage site	Takara
pCold I phu	pCold I, <i>Nde</i> I- <i>Xba</i> I fragment containing <i>phu</i>	This study
pCold I pnd	pCold I, <i>Nde</i> I- <i>Xba</i> I fragment containing <i>pnd</i>	This study
pCold II	Ap <sup>r</sup> , <i>csp</i> A promoter, <i>lacI</i>	Takara
pCold II phu	pCold II, <i>Nde</i> I- <i>Xba</i> I fragment containing <i>phu</i>	This study
pCold II pnd	pCold II, <i>Nde</i> I- <i>Xba</i> I fragment containing <i>phu</i>	This study
pET-26b(+)	Km <sup>r</sup> , T7 promoter, <i>lacI</i> , pBR322 replicon	Novagen
pETphu	pET-26b(+), <i>Nde</i> I- <i>Xho</i> I fragment containing <i>phu</i>	This study
pETpnd	pET-26b(+), <i>Nde</i> I- <i>Xho</i> I fragment containing <i>pnd</i>	This study
pFLP2	Ap <sup>r</sup> , <i>ori1600 oriT</i> (RP4), FLP recombinase expression vector	Hoang et al., 1998
pFLP2Km	pFLP2, Km <sup>r</sup> gene cassette inserted into its <i>Sca</i> I site	This study
pK19mobsacB	Km <sup>r</sup> , <i>oriT</i> (RP4), <i>sacB</i> , <i>lac</i> Zα, pMB1 replicon	Schäfer et al., 1994
pK19mobsacBphuHis	pK19mobsacB containing gene encoding Phu with 6×His at its C-terminal end with Gm <sup>r</sup> gene cassette and FRT site at its 3'-terminal end	This study
pK19mobsacBpndHis	pK19mobsacB containing gene encoding Pnd with 6×His at its C-terminal end with Gm <sup>r</sup> gene cassette and FRT site at its 3'-terminal end	This study
pPS856	Ap <sup>r</sup> , Gm <sup>r</sup> , FRT sites	Hoang et al., 1998
pT7Blue T-vector	Ap <sup>r</sup> , <i>lac</i> Zα, T7 promoter, fl origin, pUC/M13 priming sites	Novagen
pTKm	pT7Blue T-vector, Km <sup>r</sup> gene cassette	Yoshida et al., 2003
pUC18	Ap <sup>r</sup> , <i>lac</i> Zα, pMB9 replicon	Takara
pUC4	pUC18 containing 93,142-98,682 region of pCAR1	This study

Table M3-2. 本章で用いたプライマー

プライマー	塩基配列 (5'から3')	参考文献
<b>定量RT-PCR</b>		
phu_qRT_F	TCGTGGGCTTTGGTACTTTC	This study
phu_qRT_R	GGTGAACCTTTGGCTTGATCG	This study
pnd_qRT_F	TGGCAGAACAACAAGCAGTC	This study
pnd_qRT_R	GTCTACACCCTCCTGGCAAC	This study
univ16S-F	ACACGGTCCAGACTCCTACG	Miyakoshi et al., 2007
univ16S-R	TACTGCCCTTCCTCCCAACT	Miyakoshi et al., 2007
<b>プライマー伸長解析</b>		
phu_173R	CGCTCGGCCTGCTTGGTTGA	This study
pnd_21R	GATGATGTGACGTATTGGCA	This study
pnd_97R	GCGACGCGCCCAACTCTGTA	This study
pnd_187R	CGCCTGACTCCCCGTGGAAG	This study
<b>Hisタグ融合株の作製</b>		
Gm-F	CGAATTAGCTTCAAAAGCGCTCTGA	Choi and Schweizer, 2005
Gm-R	CGAATTGGGGATCTTGAAGTTTCCT	Choi and Schweizer, 2005
phu_del_down_F2	<u>AGGAAC</u> <u>TTCAAGAT</u> <u>CCCCAATTCG</u> GCCCCCTCCAGCCGCCCGA	This study
phu_del_down_R	<u>AAGCTT</u> GCGATGAGAAGGGCAAATAG	This study
phu_His_F	<u>GGATCC</u> GCTTTCAGCTGGGACTCAAC	This study
phu_His_R2	<u>TCAGAGCGCTTTTGAAGCTAATTCG</u> TTAGTGATGGTGATGGTGATG CTGGTTGACGCGTTCCTTGA	This study
pnd_del_down_F	<u>AGGAAC</u> <u>TTCAAGAT</u> <u>CCCCAATTCG</u> AAAAATGCCCGTCCATCTC	This study
pnd_del_down_R	<u>AAGCTT</u> GGATCAATTCCAGCCTCAAA	This study
pnd_His_F	<u>GGATCC</u> CAAGGCATTCAAGTGATTTTCG	This study
pnd_His_R2	<u>TCAGAGCGCTTTTGAAGCTAATTCG</u> TTAGTGATGGTGATGGTGATG GCCGCGCTTGAGTTGATCAC	This study
<b>発現ベクター構築</b>		
phu_C_His_F	<u>CATATGA</u> ATCGTCAAGAACT	This study
phu_C_His_R	<u>CTCGAG</u> CTGGTTGACGCGTTC	This study
phu_N_His_R	<u>TCTAGAT</u> TACTGGTTGACGCG	This study
pnd_C_His_F	<u>CATATG</u> CCAATACGTCACAT	This study
pnd_C_His_R	<u>CTCGAG</u> GCCGCGCTTGAGTTG	This study
pnd_N_His_R	<u>TCTAGAT</u> TAGCCGCGCTTGAG	This study

下線、太字はそれぞれ、制限酵素サイト、Hisタグ配列を示す。

赤字、青字はそれぞれ、Gm-Fプライマーとの相同配列、Gm-Rプライマーとの相同配列を示す。

### 3-2-6. プラスミドの接合伝達実験

プラスミドの接合伝達による *Pseudomonas* 属細菌の形質転換は、LB 培地上に 0.45  $\mu\text{m}$  孔、25~50 mm 径の cellulose membrane filter (ADVANTEC)を置き、その上で供与菌と受容菌の菌体懸濁液を混合することで行った。

- ① 供与菌および受容菌を 5 ml の LB 培地 (試験管)で定常期まで培養した。
- ② それぞれの培養液から 1 ml ずつを集菌し (13,000 rpm, 1 min)、750  $\mu\text{l}$  の LB 培地で洗菌し、再度集菌した。
- ③ 150  $\mu\text{l}$  の LB 培地に懸濁して供与菌と受容菌を良く混合し、LB 培地上に置いた cellulose membrane filter に懸濁液をのせた。
- ④ 30°C で 15 h 静置した後、フィルターごと滅菌済み 15 ml 容チューブに移し、1 ml の CF buffer (2.2 g/l  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 0.8 g/l  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 3.0 g/l  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ )に懸濁して選択培地に spread した。

### 3-2-7. エレクトロポレーション

エレクトロポレーションによる *Pseudomonas* 属細菌の形質転換は、Molecular Cloning [Sambrook and Russell, 2001]の方法を一部改変して行った。

- ① 各菌株を 5 ml の LB 培地 (試験管)で定常期まで培養した。
- ② 培養液を氷上で 10 min 以上静置した後、50  $\mu\text{l}$  ずつ分注して集菌した (12,000 rpm, 5 min, 4°C)。これ以降の操作は全て氷上で行った。
- ③ 上清を除いた後、100  $\mu\text{l}$  の滅菌蒸留水を加え、菌体を緩やかに懸濁し、集菌した (12,000 rpm, 5 min, 4°C)。
- ④ 上清を除き、100  $\mu\text{l}$  の 10%グリセロールで菌体を緩やかに懸濁し、集菌した (12,000 rpm, 5 min, 4°C)。
- ⑤ 上清を除き、再度 100  $\mu\text{l}$  の 10%グリセロールに懸濁したものをコンピテントセルとして用いた。

エレクトロポレーションは、GENE PULSER II (BIO-RAD)を用い 25  $\mu\text{F}$ , 200  $\Omega$ , 1.9 kV の条件で行った。キューベットには BIO-RAD 社の 1 cm ギャップのものを用了。



### 3-2-8. SDS-PAGE および Tricine-SDS-PAGE

Glycine バッファーを用いた通常の SDS-PAGE は Laemmli の方法(1970)、Tricine-SDS-PAGE は Schagger の方法(2006)に従い、Mini-PROTEAN 3 Cell (BIO-RAD)を用いて行った。Pnd はアクリルアミド濃度 8%あるいは 12%の SDS-PAGE、Phu は 15%の SDS-PAGE あるいは 16%の Tricine-SDS-PAGE に供し、検出を行った。マーカーとしては Precision Plus Protein Dual Color Standards (BIO-RAD)および XL-ladder Low (APRO)を用いた。ゲルの染色には SimplyBlue SafeStain (Invitrogen)を添付のプロトコールに従って用いた。

### 3-2-9. ウェスタンブロッティング

ゲルからメンブレンへのタンパク質のブロッティングはセミドライ式あるいはタンク式のブロッティング装置を用いて行った。

#### <セミドライ式>

iBlot Gel Transfer System および iBlot Gel Transfer stacks PVDF Regular (Invitrogen)を用いた。Pnd および RNA polymerase  $\alpha$  subunit の検出の際には 20 V, 7 min、Phu の検出の際には 15 V, 6 min の条件でブロッティングを行った。

#### <タンク式>

ミニトランスブロットセルおよび Sequi-Blot PVDF membrane (BIO-RAD)を用いた。Blotting buffer (12 g/l Tris, 14.4 g/l glycine, 200 ml/l methanol)を用い、Pnd の検出の際には 35 V, 120 min、Phu の検出の際には 15 V, 120 min の条件でブロッティングを行った。

メンブレンの洗浄は T-PBS buffer (8 g/l NaCl, 2.9 g/l  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ , 0.2 g/l KCl, 0.2 g/l  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 1 ml/l Tween 20)により行い、ブロッキング試薬には ECL Blocking Agent (GE Healthcare)を 5%濃度で、一次抗体には Anti-His Antibody (GE Healthcare)を 5,000 倍希釈あるいは Anti-RNA polymerase  $\alpha$  subunit (NeoClone)を 20,000 倍希釈で、二次抗体には ECL Peroxidase-labeled anti-mouse antibody (GE Healthcare)を 20,000 倍希釈で用いた。抗体反応液は Can Get Signal (Toyobo)を、検出試薬は Immobilon Western Chemiluminescent HRP Substrate (Millipore)を添付のプロトコールに従って用い、バイオイメージングアナライザーLAS1000 plus (FUJIFILM)により検出を行った。

### 3-2-10. 定量 RT-PCR 解析

KT2440(pCAR1)株内における *phu* および *pnd* の経時的な転写プロファイルを定量 RT-PCR により解析した。KT2440(pCAR1)株を、終濃度 0.1% (w/v) の succinate を炭素源として含む 100 ml の NMM4 液体培地に初期 OD<sub>600</sub> が 0.05 となるように植菌した。30°C, 120 rpm で培養し、培養開始後 2, 4, 6, 8, 10 h の時点で集菌した菌体から total RNA を抽出した。1 µg の total RNA と 250 ng の 6 塩基長の Random primer (Invitrogen) を計 11 µl となるように混合し、70°C で 10 min 変性させた後、25°C で 10 min インキュベートした。200 U の逆転写酵素 SuperScript II Reverse Transcriptase (Invitrogen) 、40 U の RNase 阻害剤 RNaseOUT (Invitrogen) および推奨されるバッファーを混合し、合計 20 µl となるようにした。25°C で 10 min インキュベート後、37°C、60 min さらに 42°C、60 min インキュベートして逆転写反応を行った。さらに反応液を 70°C、10 min 熱することで逆転写酵素を失活させた。反応液に 6.67 µl の 1 N NaOH を加えて 65°C、30 min 熱することで RNA を分解し、その後 6.67 µl の 1 N HCl を加えることで反応液を中和した。

cDNA の定量は ABI 7300 Real-Time PCR system (Applied Biosystems) を用いて行った。増幅酵素および検出試薬には Power SYBR green PCR master mix (Applied Biosystems) を使用した。増幅断片はすべて 100 bp から 150 bp となるように設計し、同じプライマーでの PCR 産物を pT7Blue T-vector (Novagen) にクローニングしたプラスミドを 1 nM から 100 aM に 10 倍ずつ段階希釈したものを検量線の作成に用いた。*phu*、*pnd* の mRNA 量は 16S rRNA 遺伝子の mRNA 量を基準として比較した。反応系は 20 µl で、10 µl の Power SYBR green PCR master mix、終濃度 200 nM のプライマーセット、1 ng 相当の cDNA を含むように調製した。95°C で 10 min 加熱し酵素を活性化させた後、[95°C (5 sec), 60°C (10 sec), 72°C (35 sec)]×40 サイクルの反応を行った。実験は 3 連で行い、増幅産物の単一性は融解曲線解析によって確認した。

### 3-2-11. プライマー伸長解析

*phu* および *pnd* の転写開始点を決定するため、プライマー伸長解析を行った。KT2440(pCAR1)株およびプラスミド pBBRC4 を保持した KT2440(pCAR1)(pBBRC4)株を 3-2-8 と同様に培養し、培養開始後 4 h で集菌した菌体から total RNA を抽出した。エムエステクノシステムズから購入した IRD800 で標識した各遺伝子特異的プライマー 2 pmol を用い、各株の total RNA 10 µg を鋳型として 200 U の逆転写酵素 SuperScript III Reverse Transcriptase (Invitrogen) を用いて推奨される条件の下 20 µl の反応液を調製し、55°C で 60 min 逆転写反応を行った後、70°C で 15 min インキュベートして反応を止めた。反応産物はフェノール・クロロホルム抽出とエタノール沈殿により精製し、2 µl の H<sub>2</sub>O および 1 µl の IR<sup>2</sup> stop solution (Li-Cor) に溶解した。その溶液を 95°C で 2 min 変性させた後、同じプライマーを用いて作製したシーケン斯拉ダーと共に DNA シーケンシングシステム LIC4200L(S)-2G (Li-Cor) を用いた電気泳動に供した。シーケンズ反応試薬には Thermo Sequence™ Cycle Sequencing Kit (Amersham) を使用した。

### 3-2-12. His タグ融合 Phu、Pnd 発現株の作製

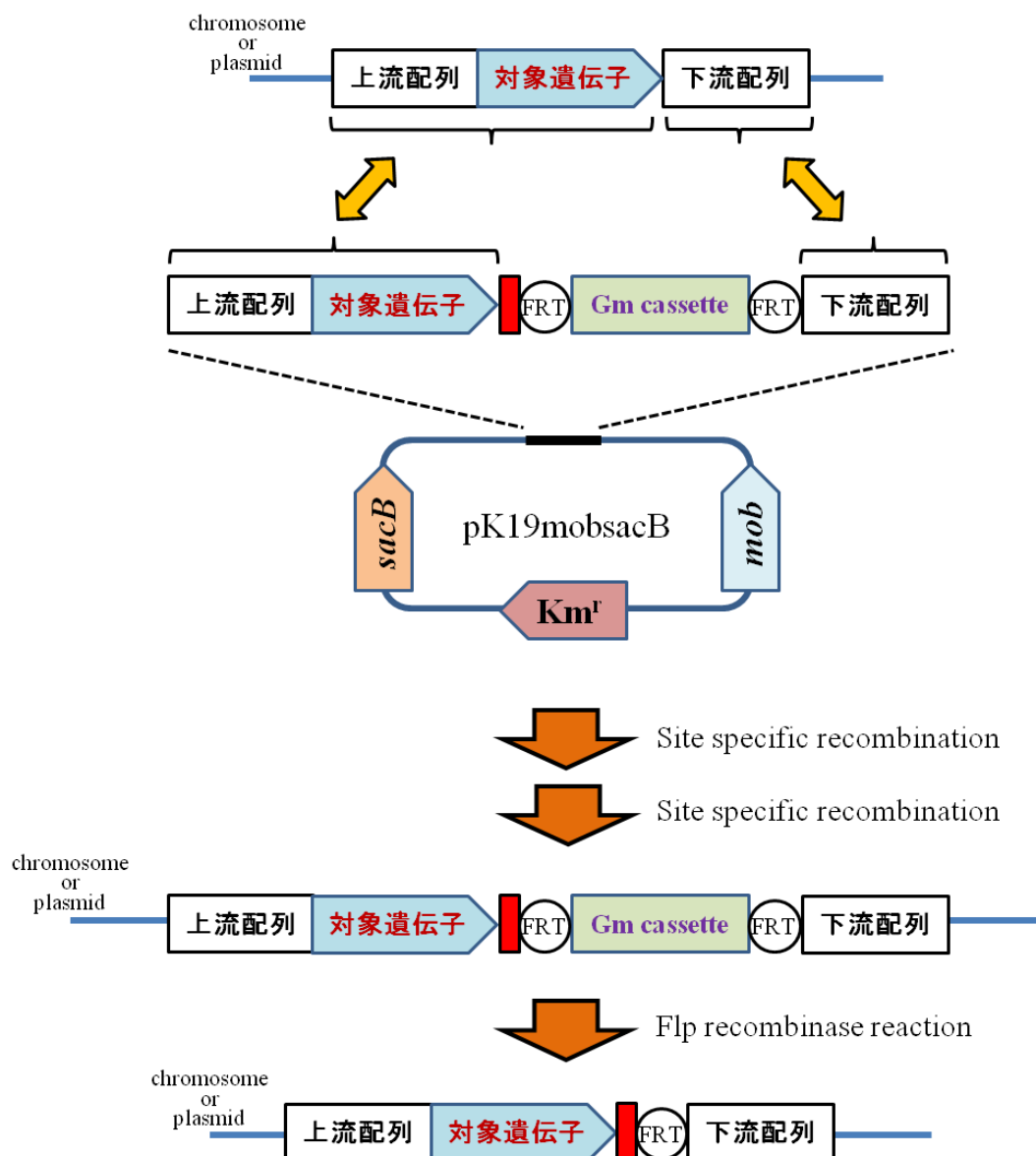
KT2440(pCAR1)株内における Phu および Pnd の経時的な発現プロファイルを解析するため、C 末端側 His タグ融合 Phu を発現する KT2440(pCAR1phuHis)株、C 末端側 His タグ融合 Pnd を発現する KT2440(pCAR1pndHis)株をそれぞれ作製した。作製法は Choi らの方法 [Choi and Schweizer, 2005]にならった。概略を Fig. M3-1 に示す。相同性組換えを利用して *phu* を *phuHis* に、*pnd* を *pndHis* に置換した後、選抜に利用した Gm cassette を pFLP2Km 由来の Flp recombinase を用いて除去することで作製した。

#### <Gm cassette を有する His タグ融合 NAPs 発現株の作製>

- ① *E. coli* S17-1 $\lambda$ pir 株に pK19mobsacBphuHis および pK19mobsacBpndHis を導入し、KT2440(pCAR1)株に接合伝達させた。
- ② Gm, Km, Cm を含む LB 培地に塗布し、相同性組換えが 1 回行われベクター部分が pCAR1 上に組み込まれた single crossover 株を取得した。
- ③ ベクター由来の *sacB* による sucrose 感受性を示すことを確認後、Gm を含む LB 液体培地で培養した。
- ④ Gm, 10% sucrose を含む LB 培地に塗布し、相同性組換えが 2 回行われベクター部分が pCAR1 上から抜けた double crossover 株を取得した。
- ⑤ Total DNA を抽出し、目的の株であることを PCR により確認した。

#### <His タグ融合 NAPs 発現株からの Gm cassette の除去>

- ① エレクトロポレーション法により、上記 His タグ融合 NAPs 発現株に pFLP2Km を導入し、Km を含む LB 培地上に塗布した。
- ② Gm 感受性を示すことを確認後、LB 液体培地で培養した。
- ③ 10% sucrose を含む LB 培地に塗布し、pFLP2Km を脱落し sucrose 非感受性となった株を取得した。
- ④ Km 感受性を示すことを確認後、total DNA を抽出し、目的の株であることを PCR により確認した。



**Figure M3-1.** 相同性組換えを利用した対象遺伝子への His タグ配列付加方法の概略図

赤色の四角は His タグ配列を示す。

pK19mobsacB 上に組み込まれた「上流配列＋対象遺伝子」領域および「下流配列」領域それぞれで相同性組換えが生じることにより、対象遺伝子が「対象遺伝子＋His タグ配列＋Gm cassette」に置き換わる。

Gm cassette は FRT 配列に挟まれており、Flp recombinase を用いることで除去される。

### 3-2-13. Phu、Pnd の経時的発現プロファイル解析

3-2-12 で作製した各 His タグ融合タンパク質発現株を LB 培地および終濃度 0.1% (w/v) の succinate を炭素源として含む NMM4 培地で培養し、経時的に集菌してタンパク質を抽出し Anti-His Antibody を用いたウェスタンブロットリング解析に供することで菌体内での Phu、Pnd の発現プロファイルを調べた。

#### <超音波破碎によるタンパク質抽出>

KT2440(pCAR1)株および各 His タグ融合タンパク質発現株を 5 ml の LB 培地で 30°C、14 h 培養し、集菌した。PBS buffer (8 g/l NaCl, 2.9 g/l Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·12H<sub>2</sub>O, 0.2 g/l KCl, 0.2 g/l KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) で洗菌し、再度 PBS buffer で懸濁した後、超音波破碎を行った。15,000 rpm, 4°C, 15 min 遠心し、上清を可溶性画分、ペレットを不溶性画分とした。

タンパク質の定量は protein assay kit (BIO-RAD)を用い、bovine serum albumin (BSA)を標準タンパク質としてスタンダードアッセイ法により行った [Bradford, 1976]。可溶性画分のタンパク質 25 µg を SDS-PAGE およびタンク式のウェスタンブロットリングに供し、Phu、Pnd の発現を解析した。

#### <界面活性剤によるタンパク質抽出>

各 His タグ融合タンパク質発現株を終濃度 0.1% (w/v) の succinate を炭素源として含む 100 ml の NMM4 培地に初期 OD<sub>600</sub> が 0.05 となるように植菌し、30°C、120 rpm で培養した。培養開始後 2, 4, 6, 8, 10 h の各時点で菌体を集菌した。非イオン性界面活性剤を含むタンパク質抽出試薬 B-per II Bacterial Protein Extraction Reagent (Thermo Scientific)を用い、添付のプロトコールに従ってタンパク質を抽出した。

タンパク質の定量は BCA Protein Assay Kit (Pierce)を用い、説明書の指示に従って行った。可溶性画分のタンパク質 45 µg を SDS-PAGE およびタンク式のウェスタンブロットリングに供し、Phu、Pnd の発現を解析した。

#### <Whole-cell タンパク質溶液の調製>

各 His タグ融合タンパク質発現株を終濃度 0.1% (w/v) の succinate を炭素源として含む 100 ml の NMM4 培地に初期 OD<sub>600</sub> が 0.05 となるように植菌し、30°C、120 rpm で培養した。培養開始後 2, 4, 6, 8, 10 h の各時点で OD<sub>600</sub> が 2.0 となるように菌体を集菌した。30 µl の 2×SDS sample buffer (200 ml/l 0.5 M Tris-HCl [pH 6.8], 40 g/l SDS, 200 ml/l glycerol, 20 ml/l 2-mercaptoethanol, 10 mg/l Bromophenol blue)および 30 µl の PBS buffer を加えて 100°C、15 min インキュベートし、氷上で 5 min 以上静置することで whole-cell のタンパク質溶液を調製した。

各タンパク質溶液 20 µl を SDS-PAGE およびタンク式のウェスタンブロットリングに供し、Phu、Pnd の発現を解析した。各溶液中に含まれるタンパク質量は、Anti-RNA polymerase α subunit 抗体を用いて RNA polymerase を検出することで比較した。3 µl の各溶液を SDS-PAGE およびセミドライ式のウェスタンブロットリングに供し、RNA polymerase を検出した。

### 3-2-14. His タグ融合 Phu、Pnd の大腸菌を用いた大量発現条件の検討

His タグ融合 Phu、Pnd の精製タンパク質を大腸菌を用いて大量に調製するため、発現条件検討を行った。

#### <pCold ベクターを用いた発現条件検討>

- ① 作製した His タグ融合 Phu、Pnd 発現用プラスミド pCold I phu、pCold I pnd、pCold II phu、pCold II pnd で *E. coli* BL21(DE3)株を形質転換し、各々についてグリセロールストックを作製した。
- ② グリセロールストック 30  $\mu$ l を終濃度 10 mM の glucose を含む 5 ml の LB 培地+Ap に加え、37°C で 14 h 培養した。
- ③ ②の培養液 50  $\mu$ l を新しい 5 ml の LB 培地+Ap に加え、OD<sub>600</sub>が 0.25 程度になるまで 37°C で培養した後、15°C で 30 min インキュベートした。
- ④ ③の培養液に IPTG を終濃度 0.1 もしくは 0.5 mM になるように添加した後、15°C, 200 rpm, 24 h 培養した。
- ⑤ 集菌後、PBS buffer に懸濁し、超音波破碎によりタンパク質を抽出した。
- ⑥ SDS-PAGE あるいは Tricine-SDS-PAGE により目的タンパク質の発現を確認した。

#### <pET-26b(+)ベクターを用いた発現条件検討>

- ① 作製した His タグ融合 Phu、Pnd 発現用プラスミド pETphu、pETpnd で *E. coli* BL21(DE3)株を形質転換し、各々についてグリセロールストックを作製した。
- ② グリセロールストック 30  $\mu$ l を終濃度 10 mM の glucose を含む 5 ml の LB 培地+Km に加え、37°C で 14 h 培養した。
- ③ ②の培養液 50  $\mu$ l を新しい 5 ml の LB 培地+Km に加え、OD<sub>600</sub>が 0.5 程度になるまで 37°C で培養した。
- ④ ③の培養液に IPTG を終濃度 0.1 もしくは 0.5 mM になるように添加した後、25、30、もしくは 37°C で 15 h 培養した。
- ⑤ 集菌後、PBS buffer に懸濁し、超音波破碎によりタンパク質を抽出した。
- ⑥ SDS-PAGE あるいは Tricine-SDS-PAGE により目的タンパク質の発現を確認した。

### 3-2-15. His タグ融合 Phu、Pnd の精製

<精製用タンパク質を含む粗酵素抽出液の大量調製>

目的タンパク質の本培養の温度、添加した IPTG 濃度、IPTG 添加時の OD<sub>600</sub> などを以下に示す。宿主はいずれも *E. coli* BL21(DE3)を用いた。

ベクター名	タンパク質名	本培養の温度(°C)	IPTG 添加時の OD <sub>600</sub>	添加した IPTG の終濃度(mM)	IPTG 添加後の培養時間(h)
pCold I phu	N-his-Xa-Phu	15	0.4	0.1	24
pCold II phu	N-his-Phu	15	0.4	0.1	24
pETphu	C-his-Phu	25	0.5	0.1	15
pCold I pnd	N-his-Xa-Pnd	15	0.4	0.1	24
pCold II pnd	N-his-Pnd	15	0.4	0.1	24
pETpnd	C-his-Pnd	25	0.5	0.1	15

- ① 各発現ベクターを保持する BL21(DE3)株を **3-2-14** と同様に前培養し、培養液 1 ml を新しい 100 ml の LB 培地に加え、上記条件で培養した。
- ② 培養液を 5,000×g、4°C、10 min 遠心して集菌し、Buffer A (20 mM Tris-HCl [pH 7.5]、0.5 M NaCl、10% glycerol)で 2 回洗菌後、25 ml の Buffer A に懸濁した。
- ③ 超音波破碎した後、25,000 rpm、4°C、1 h 以上遠心した。
- ④ 上清を孔径 0.45 μm のフィルターでろ過した。

タンパク質の精製操作は4°Cで行い、fast protein liquid chromatography (FPLC)には ÄKTA (GE Healthcare)を用いた。タンパク質のモニタリングは波長 280 nm の吸光度で行った。

<Metal chelation chromatography>

本研究で精製したタンパク質はすべて His タグ融合タンパク質である。それぞれのタンパク質における metal chelation chromatography の溶出条件を次に記した。各 imidazole 濃度の溶出液は 25 mM で 10 ml、500 mM で 15 ml、それ以外でそれぞれ 25 ml ずつとした。

タンパク質名	Imidazole 濃度のステップワイズグラジエント(mM)				
N-his-Phu、C-his-Phu	25	75	125	475	500
N-his-Pnd、C-his-Pnd	25	62.5	125	475	500

#### 試薬

- Buffer A (20 mM Tris-HCl [pH 7.5]、0.5 M NaCl、10% glycerol)
- Buffer B (20 mM Tris-HCl [pH 7.5]、0.5 M NaCl、10% glycerol、0.5 M imidazole)
- 0.1 M NiSO<sub>4</sub>

## 操作

- ① HiTrap Chelating HP (column volume 5 ml; GE Healthcare)に 26 ml の H<sub>2</sub>O を流速 2 ml/min で流し洗浄した。
- ② 0.1 M NiSO<sub>4</sub> を流速 0.5 ml/min で 3 ml 流し、カラムに Ni<sup>2+</sup>をチャージさせた。
- ③ 26 ml の H<sub>2</sub>O を流速 2 ml/min で流し洗浄した。
- ④ Buffer A を流速 2 ml/min で 26 ml 流し、カラムを平衡化した。
- ⑤ サンプルを 1 ml/min でアプライした。
- ⑥ 流速 2 ml/min で上記溶出条件にて溶出させ、目的のタンパク質が含まれるフラクションを回収した。各フラクションは 5 ml とした。

## <タンパク質溶液の濃縮>

Phu、Pnd を含むタンパク質溶液の濃縮にはそれぞれ限外ろ過フィルターAmicon Ultra-15 3K、Amicon Ultra-15 10K (Millipore)を用いた。遠心は 4,000×g、4°C で行った。

## <ゲルろ過クロマトグラフィー>

ゲルろ過用カラムとしては、Phu の精製の際には HiLoad 26/60 Superdex 75 pg (column volume 320 ml; GE Healthcare)を、Pnd の精製の際には HiLoad 26/60 Superdex 200 pg (column volume 320 ml; GE Healthcare)を用いた。ゲルろ過 buffer の組成は 20 mM Tris-HCl [pH 7.5]、0.2 M NaCl、10% glycerol とした。カラムを流速 0.5 ml/min で 2 h 以上洗浄した後、サンプルをアプライして流速 0.5 ml/min で溶出させ、目的のタンパク質が含まれるフラクションを回収した。各フラクションは 3 ml とした。

## 3-2-16. ゲルろ過クロマトグラフィーによる分子量の推定

精製した His タグ融合 Phu、Pnd の分子量の推定はそれぞれ Superdex 75、Superdex 200 を用いたゲルろ過クロマトグラフィーで行った。分子量マーカーとしてはそれぞれ Gel Filtration Calibration Kit LMW、Gel Filtration Calibration Kit HMW (GE Healthcare)を添付のプロトコールに従って用いた。カラム内部の体積（担体の体積＋排除体積）を  $V_t$  とし、Blue Dextran は担体と一切相互作用しないと仮定して溶出に要した体積を排除体積  $V_0$  とした。タンパク質の溶出に要した体積を  $V_e$  とし、まずは各々のマーカー分子の分配係数  $K_{av}$  を次式で算出した。

$$K_{av} = (V_e - V_0) / (V_t - V_0)$$

各タンパク質の  $K_{av}$  に対し、各々のマーカーの分子量の対数値 ( $\log_{10}MW$ ) を算出し、それぞれを x、y 軸にプロットすることで検量線を作成した。精製した目的タンパク質の  $K_{av}$  を同時に求め、検量線上の位置から推定分子量を算出した。



### 3-2-17. クロスリンク解析

Phu、Pnd が溶液中において何量体を形成しているのかを明らかにするため、タンパク質間クロスリンク解析を行った。クロスリンク解析では溶液中で相互作用しているタンパク質同士を化学的に架橋した後に SDS-PAGE に供することで、分子量そのままの状態でバンドとして検出することができる。架橋剤として dimethyl suberimidate 2HCl (DMS; Sigma)、および dimethyl adipimidate 2HCl (DMA; Thermo Scientific)を用いる場合は Ueguchi らの方法(1997)を参照した。1-Ethyl-3-[3-dimethylaminopropyl] carbodiimide hydrochloride (EDC; Thermo Scientific)を用いる場合は Thermo Scientific 社の推奨プロトコールに従った。

#### <DMS、DMA を用いたクロスリンク解析>

##### 試薬

- DMS, DMA cross-linking buffer

1 ml 2 M triethanolamine-HCl (pH 8.5)

29 mg NaCl

1.5 mg dithiothreitol

使用直前に 1 ml の H<sub>2</sub>O と混合し、使用した。

##### 操作

- ① DMS または DMA を目的の濃度となるように 46.8  $\mu$ l の DMS, DMA cross-linking buffer に溶解させた。
- ② ①の溶液に 2.5  $\mu$ g/ $\mu$ l の精製タンパク質溶液を 3.2  $\mu$ l 混合した。
- ③ 室温でインキュベートを行い、50  $\mu$ l の 2 $\times$ SDS sample buffer を加え 100°C、10 min 加熱することで反応を停止させた。
- ④ SDS-PAGE あるいは Tricine-SDS-PAGE によって検出した。

#### <EDC を用いたクロスリンク解析>

##### 試薬

- EDC cross-linking buffer

2.1 g MES

2.9 g NaCl

40 ml の H<sub>2</sub>O に溶解させ、1 N NaOH で pH 6.0 に合わせて 100 ml に fill-up した。

##### 操作

- ① EDC を目的の濃度となるように 46.8  $\mu$ l の EDC cross-linking buffer に溶解させた。
- ② ①の溶液に 2.5  $\mu$ g/ $\mu$ l の精製タンパク質溶液を 3.2  $\mu$ l 混合した。
- ③ 室温でインキュベートを行い、50  $\mu$ l の 2 $\times$ SDS sample buffer を加え 100°C、10 min 加熱することで反応を停止させた。
- ④ SDS-PAGE あるいは Tricine-SDS-PAGE によって検出した。

### 3-3. 結果

#### 3-3-1. *phu* および *pnd* の転写プロファイルの解析

*P. putida* KT2440(pCAR1)株を succinate を唯一の炭素源とする無機液体培地で培養し、培養開始後 2, 4, 6, 8, 10 h の時点で集菌した菌体から抽出した RNA を鋳型として *phu* および *pnd* の転写量を定量 RT-PCR により解析した。その結果、*phu*、*pnd* いずれも対数増殖期において停止期より転写量が高い傾向があるものの、ほぼ構成的に転写されることが明らかとなった (Fig. 3-1)。

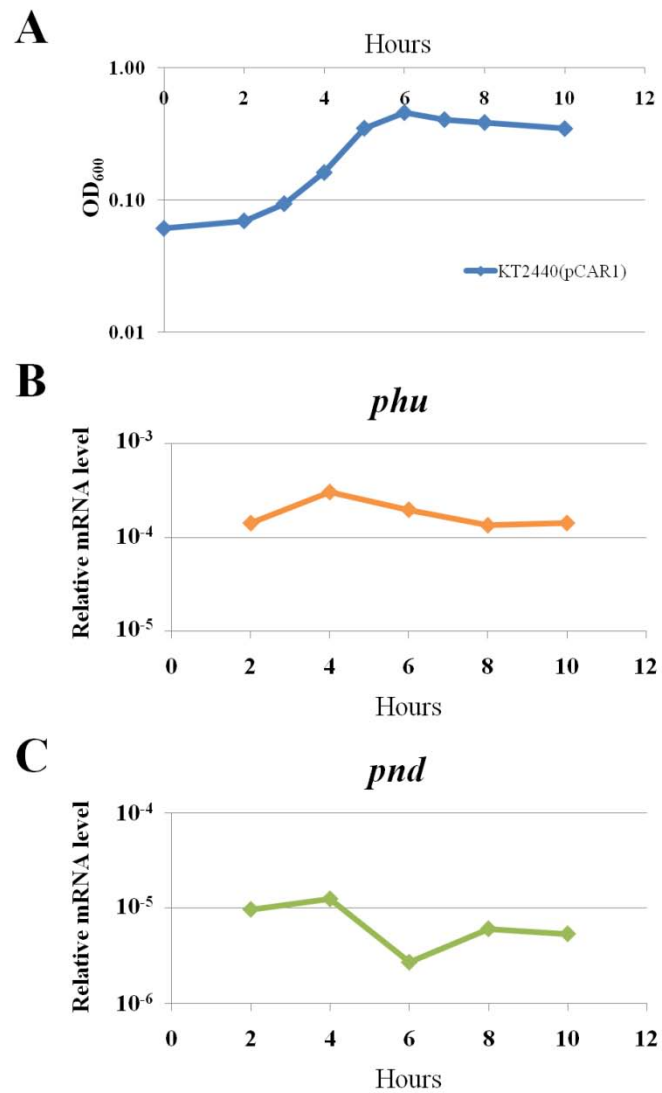
#### 3-3-2. *phu* および *pnd* の転写開始点の同定

培養における各生育段階を通してほぼ構成的に転写される *phu*、*pnd* の転写開始点を同定するため、プライマー伸長解析を行った。*phu* の内部配列に相補的なプライマー *phu*\_173R を用いたところ、*phu* 翻訳開始点の 70 塩基上流にプライマー伸長産物が検出された (Fig. 3-2A)。その 5' 上流域には、プロモーターと考えられる -35 および -10 配列 5'-TTCGGG-N<sub>16</sub>-GATTAT-3' が見出された (Fig. 3-2B)。その塩基配列や転写開始点との位置関係が *Pseudomonas* 属細菌における  $\sigma^{70}$  因子依存性プロモーター [Domínguez-Cuevas and Marqués, 2004] に類似することから、このプロモーターは  $\sigma^{70}$  因子依存性プロモーターであると考えられた。

一方、*pnd* の内部配列に特異的なプライマー *pnd*\_21R、*pnd*\_97R、*pnd*\_187R を用いた場合にはプライマー伸長産物は検出されなかった。そこで KT2440(pCAR1)株に pBBRC4 を導入することで *pnd* の mRNA 量を増加させ、同様にプライマー伸長解析を行ったが、伸長産物の検出には至っていない。

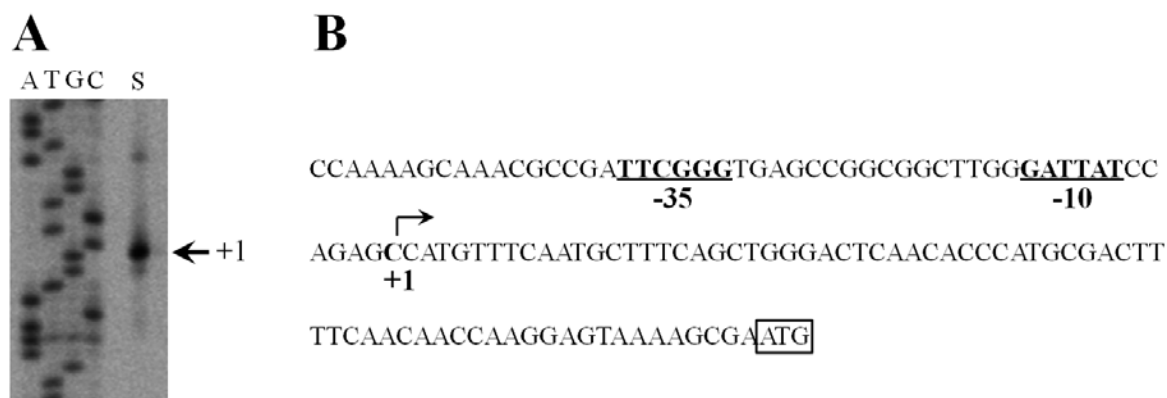
#### 3-3-3. His タグ融合 Phu、Pnd 発現株の作製

Phu および Pnd のタンパク質としての発現プロファイル解析を行うため、C 末端側 His タグ融合 Phu を発現する KT2440(pCAR1phuHis)株、C 末端側 His タグ融合 Pnd を発現する KT2440(pCAR1pndHis)株を作製した。2 回の相同性組換えの結果、Gm 耐性、Km 感受性、および sucrose 非感受性を示した株から total DNA を抽出し、*phu*\_His\_F プライマーと *phu*\_del\_down\_R プライマー、*pnd*\_His\_F プライマーと *pnd*\_del\_down\_R プライマーを用いた PCR により *phu* および *pnd* の下流域への Gm cassette の挿入を確認した (Fig. 3-3)。これらの株に pFLP2Km を導入した後、Gm と Km の両方に感受性を示した株から total DNA を抽出し、同じプライマーセットを用いた PCR により Gm cassette の除去を確認した (Fig. 3-3)。



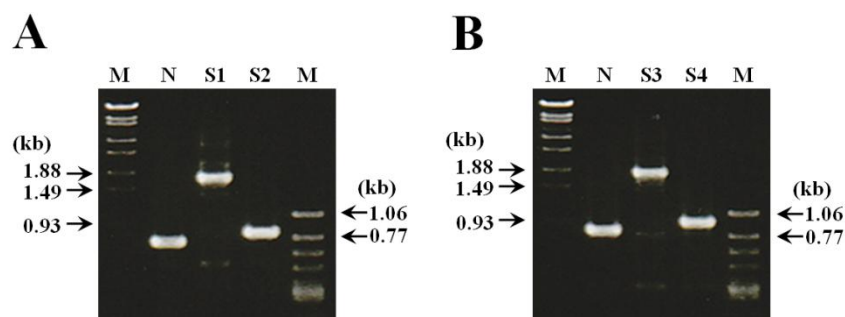
**Figure 3-1. *phn* および *pnd* の転写プロファイル**

(A) KT2440(pCAR1)株を succinate を唯一の炭素源とする無機液体培地で培養した際の生育曲線。菌体量は OD<sub>600</sub> を測定することで求めた。(B) *phn* (C) *pnd* の経時的転写プロファイル。いずれも 16S rRNA 遺伝子の転写量を基準として求めた。



**Figure 3-2. *pho* のプライマー伸長解析**

(A) *pho* の転写開始点の同定。レーン S はサンプルを表す。左にラダーの泳動パターンを示す。  
(B) *pho* の 5' 上流領域の塩基配列。翻訳開始点を四角で囲み、推定される -35、-10 配列を下線で示す。



**Figure 3-3. PCR による *pho* および *pnd* への His タグ配列付加の確認**

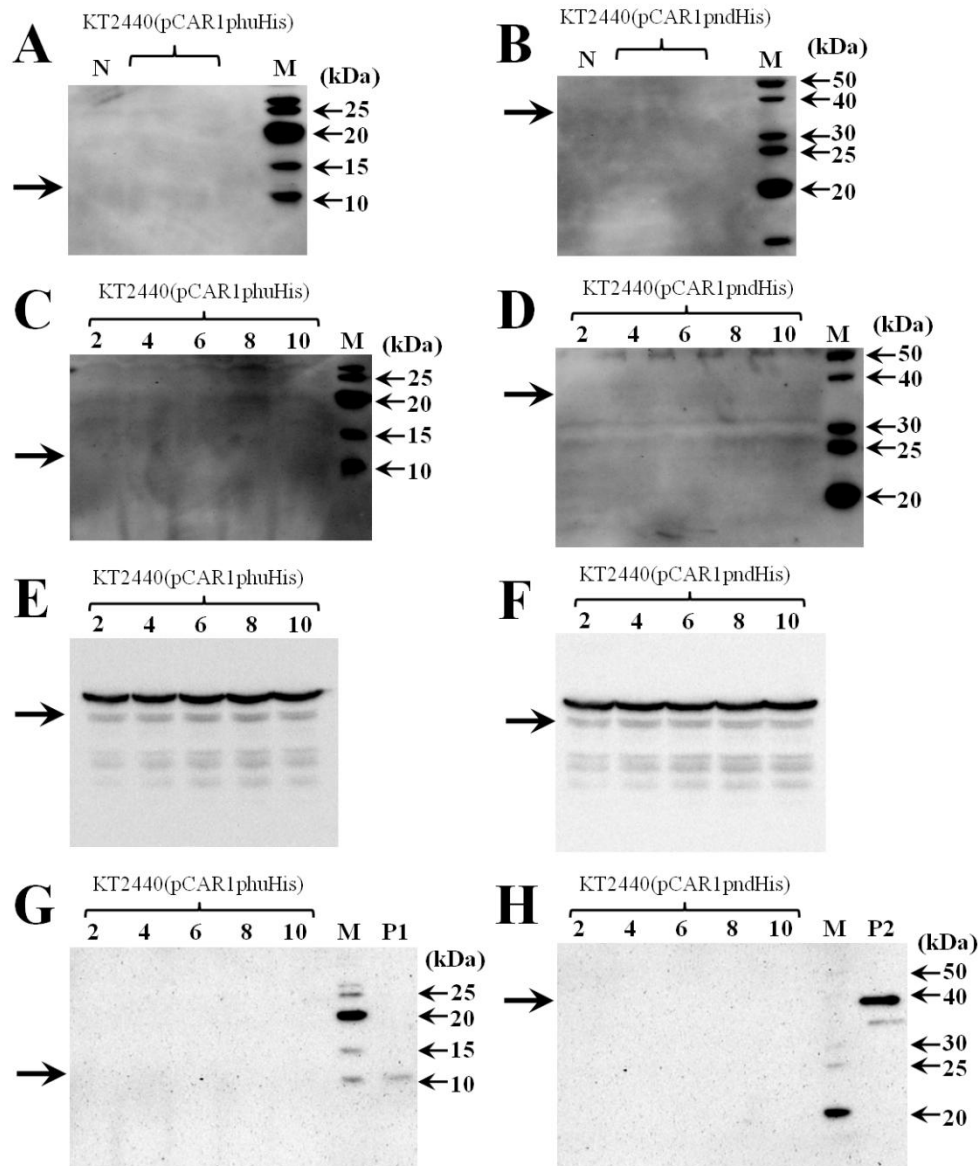
M は marker、N は KT2440(pCAR1) 株の total DNA を表す。(A) *pho* への His タグ配列付加の確認。S1 は KT2440(pCAR1phoHis::Gm<sup>r</sup>) 株、S2 は KT2440(pCAR1phoHis) 株の total DNA を表す。pho\_His\_F プライマーと pho\_del\_down\_R プライマーを用いた PCR により、intact な *pho*、*pho*+His タグ配列+Gm cassette、*pho* + His タグ配列はそれぞれ 738 bp、1,791 bp、823 bp の断片が増幅される。(B) *pnd* への His タグ配列付加の確認。S3 は KT2440(pCAR1pndHis::Gm<sup>r</sup>) 株、S4 は KT2440(pCAR1pndHis) 株の total DNA を表す。pnd\_His\_F プライマーと pnd\_del\_down\_R プライマーを用いた PCR により、intact な *pnd*、*pnd*+His タグ配列+Gm cassette、*pnd* + His タグ配列はそれぞれ 842 bp、1,895 bp、927 bp の断片が増幅される。

### 3-3-4. Phu および Pnd のタンパク質としての発現プロファイル解析

作製した KT2440(pCAR1phuHis)株および KT2440(pCAR1pndHis)株からタンパク質を抽出し、Anti-His Antibody を用いたウェスタンブロッティングに供することで Phu および Pnd の発現プロファイルを解析した。

まず各株を LB 培地で定常期まで培養し、集菌した菌体から超音波破碎により可溶性タンパク質を抽出し、25  $\mu$ g をウェスタンブロッティング解析に供した。その結果、推定分子量が約 10 kDa の Phu および約 38 kDa の Pnd いずれも発現を確認できなかった (Fig. 3-4A, B)。このことから、Phu および Pnd は定常期における発現量が少ないことが明らかとなった。

次に各株を succinate を唯一の炭素源とする無機液体培地で培養し、培養開始後 2, 4, 6, 8, 10 h の各時点で集菌した菌体から B-per II Bacterial Protein Extraction Reagent を用いて可溶性タンパク質を抽出し、45  $\mu$ g をウェスタンブロッティング解析に供したが、Phu、Pnd いずれの発現も確認できなかった (Fig. 3-4C, D)。そこで各タンパク質が可溶性画分に抽出されていない可能性を考慮し、各時点で集菌した菌体全量を SDS sample buffer と混合することで whole-cell のタンパク質溶液を調製した。各サンプル中に含まれるタンパク質量が等しいことは、Anti-RNA polymerase  $\alpha$  subunit 抗体を用いたウェスタンブロッティングにより確認した (Fig. 3-4E, F)。各サンプルをポジティブコントロールとなる 50 ng の精製 N-his-Phu、N-his-Pnd とともにウェスタンブロッティング解析に供した結果、どの経時点のサンプルにおいても Phu、Pnd の発現は認められなかった (Fig. 3-4G, H)。以上より、本実験に供した可溶性タンパク質 1  $\mu$ g 中には Phu および Pnd は少なくとも 1.1 ng 以下の極少量しか含まれていないことが明らかとなった。



**Figure 3-4. ウェスタンブロッティングによる Phu および Pnd の発現解析**

M は marker、矢印は目的タンパク質が検出される位置、2、4、6、8、10 は各培養時間、N は KT2440(pCAR1)株由来のサンプル、P1 は精製 N-his-Phu、P2 は精製 N-his-Pnd を表す。

(A), (B) LB 培地で定常期まで培養した各株から抽出した可溶性タンパク質を 25  $\mu$ g ずつアプライし、Anti-His Antibody を用いて Phu および Pnd の検出を行った。

(C), (D) Succinate を炭素源とする無機培地で培養した各株から抽出した可溶性タンパク質を 45  $\mu$ g ずつアプライし、Anti-His Antibody を用いて Phu および Pnd の検出を行った。

(E), (F) Succinate を炭素源とする無機培地で培養した各株から調製した whole-cell タンパク質溶液を 3  $\mu$ l ずつアプライし、Anti-RNA polymerase  $\alpha$  subunit 抗体を用いて RNA polymerase の検出を行った。

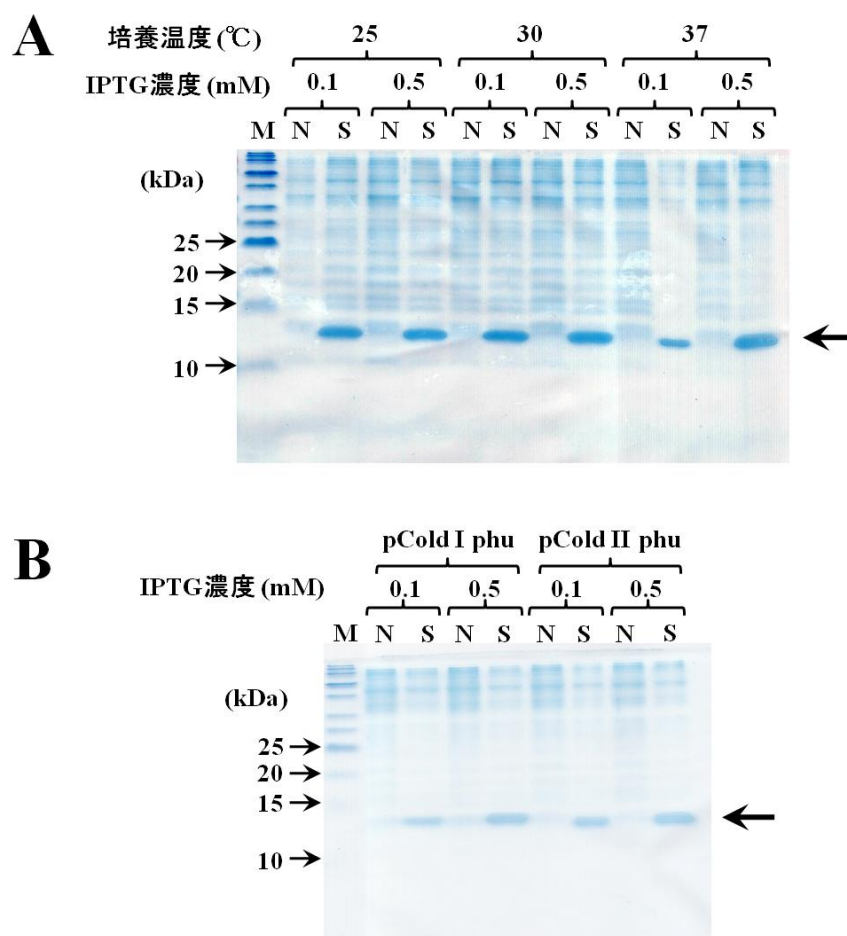
(G), (H) Succinate を炭素源とする無機培地で培養した各株から調製した whole-cell タンパク質溶液を 20  $\mu$ l ずつアプライし、Anti-His Antibody を用いて Phu および Pnd の検出を行った。

### 3-3-5. His タグ融合 Phu、Pnd の大腸菌を用いた発現系の構築

Phu および Pnd の性状を明らかにするため、各タンパク質の大量発現系の構築を行った。N 末端側に His タグを付加したタンパク質を発現するよう、pCold ベクターを基本構造とする発現用プラスミド pCold I phu、pCold I pnd、pCold II phu、pCold II pnd を作製した。また、C 末端側に His タグを付加したタンパク質を発現するよう、pET-26b(+)を基本構造とする発現用プラスミド pETphu、pETpnd を作製した。これら発現用プラスミドを保持する大腸菌 BL21(DE3) 株について目的タンパク質の発現条件を検討するため、添加する IPTG 濃度を 0.1、0.5 mM の 2 通り、加えて pET-26b(+)ベースのプラスミドについては培養温度を 25、30、37°C の 3 通りの条件で検討した。Phu について各条件での粗酵素抽出液を Tricine-SDS-PAGE に供した結果を Fig. 3-5 に、Pnd について SDS-PAGE に供した結果を Fig. 3-6 に示した。いずれも pCold ベースのプラスミドの場合は IPTG 濃度 0.1 mM、pET-26b(+)ベースのプラスミドの場合は IPTG 濃度 0.1 mM かつ培養温度 25°C で良好な発現が観察されたので、今後これらの条件で大量培養・精製を行うこととした。

### 3-3-6. His タグ融合 Phu、Pnd の精製

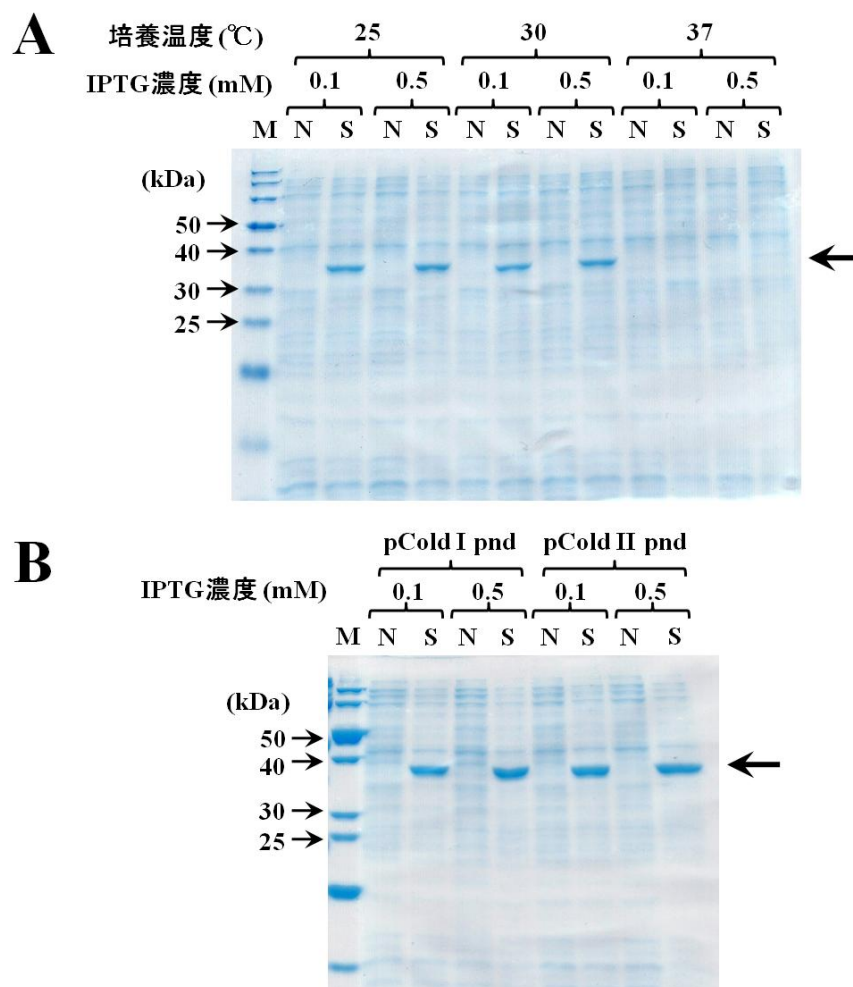
3-3-5 の発現条件検討の結果において目的タンパク質の発現量が多かった pCold II phu、pCold II pnd を用い、大腸菌に His タグ融合 Phu、Pnd を大量に発現させて精製を行った。His タグ融合 Phu、Pnd を含む粗酵素抽出液を調製し、まず His タグを利用した metal chelation chromatography によってアフィニティー精製を行った。HiTrap カラムに吸着させた各タンパク質の溶出プロファイルを図 3-7 に示す。各フラクション中に含まれるタンパク質は Tricine-SDS-PAGE および SDS-PAGE により確認した。目的タンパク質を含むフラクション(いずれもフラクション 9~12)を回収し、限外ろ過フィルターを用いて遠心濃縮した後、ゲルろ過クロマトグラフィーによる精製に供した。ゲルろ過クロマトグラフィーの溶出プロファイルを Fig. 3-8 に示す。目的タンパク質を含むフラクションを回収後、上と同様に濃縮した。各精製段階のサンプルを Tricine-SDS-PAGE および SDS-PAGE に供した結果を図 3-9 に示す。Phu、Pnd いずれもゲルろ過クロマトグラフィーまで行うことでほぼ単一のバンドになる程度に精製されていることが示された。



**Figure 3-5. Phu の大腸菌を用いた発現条件検討**

M は marker、N はネガティブコントロールの pET-26b(+), pCold I および pCold II を保持する BL21(DE3)株の可溶性画分、S は各 Phu 発現プラスミドを保持する BL21(DE3)株の可溶性画分、矢印は目的タンパク質のバンドの位置を表す。泳動に供したタンパク質は全て 2  $\mu$ g とした。(A) pETphu を保持させた BL21(DE3)株の粗酵素抽出液の Tricine-SDS-PAGE の結果。(B) pCold I phu および pCold II phu を保持させた BL21(DE3)株の粗酵素抽出液の Tricine-SDS-PAGE の結果。

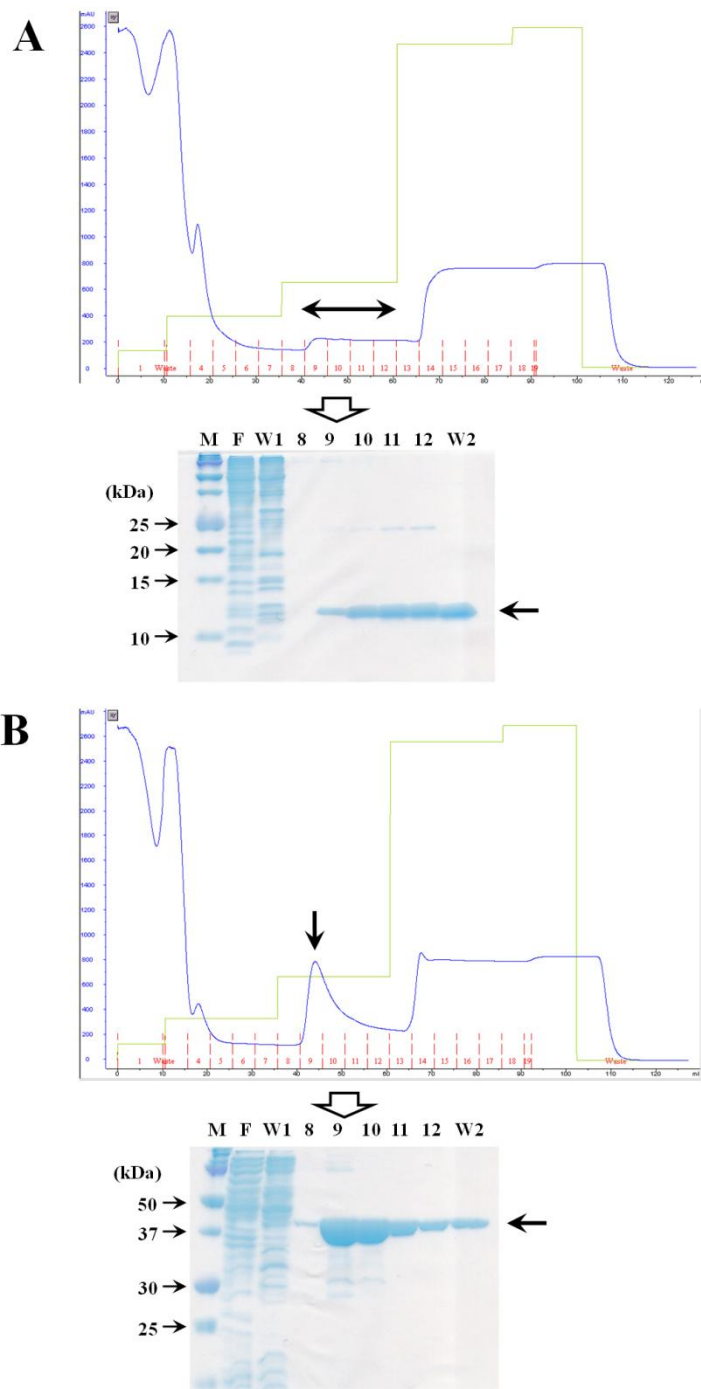




**Figure 3-6. Pnd の大腸菌を用いた発現条件検討**

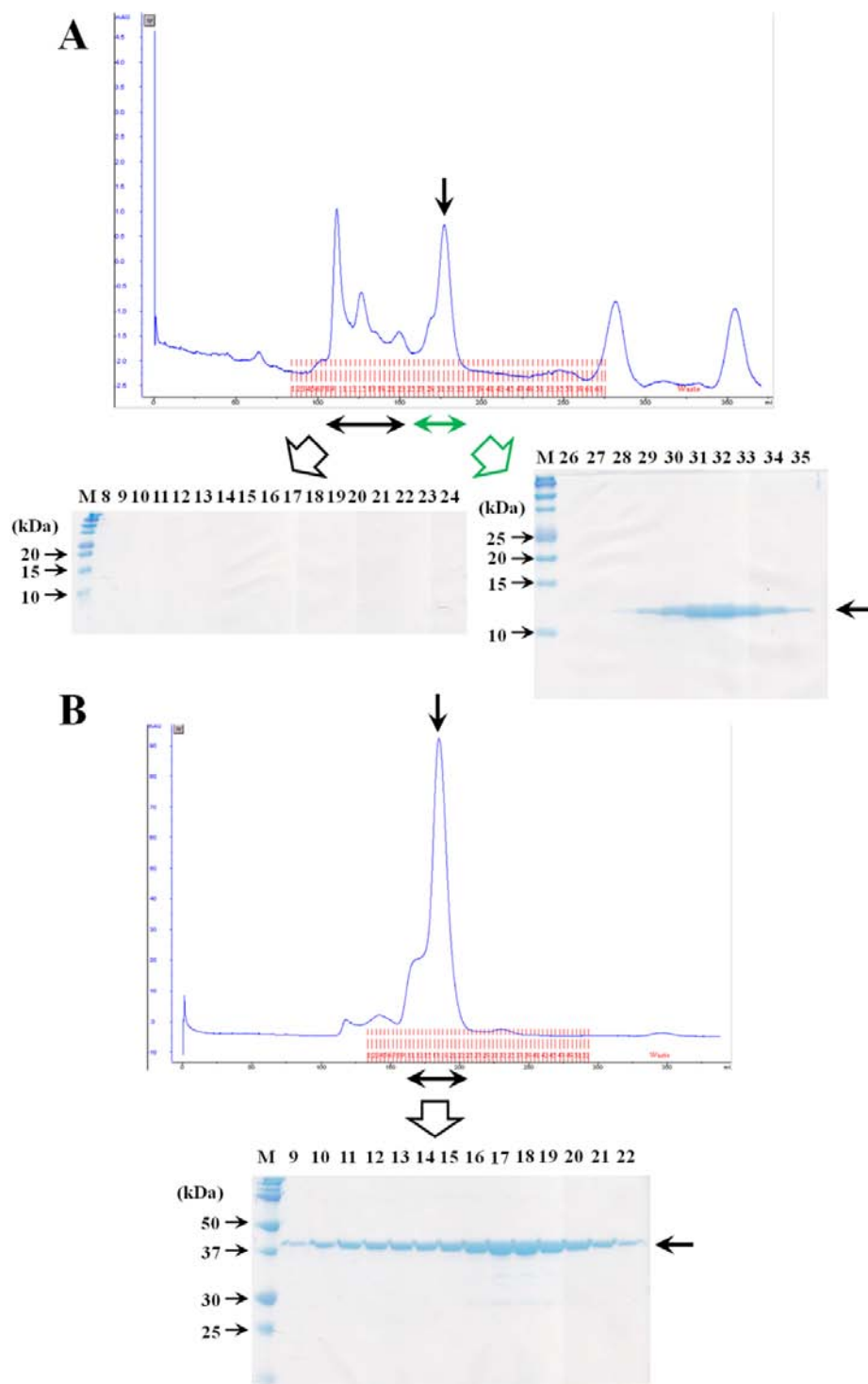
M は marker、N はネガティブコントロールの pET-26b(+), pCold I および pCold II を保持する BL21(DE3)株の可溶性画分、S は各 Pnd 発現プラスミドを保持する BL21(DE3)株の可溶性画分、矢印は目的タンパク質のバンドの位置を表す。泳動に供したタンパク質は全て 2  $\mu$ g とした。

(A) pETpnd を保持させた BL21(DE3)株の粗酵素抽出液の SDS-PAGE の結果。(B) pCold I pnd および pCold II pnd を保持させた BL21(DE3)株の粗酵素抽出液の SDS-PAGE の結果。



**Figure 3-7. His タグ融合 Phu (A)、Pnd (B)のアフィニティークロマトグラフィーの溶出プロファイルおよび精製度確認**

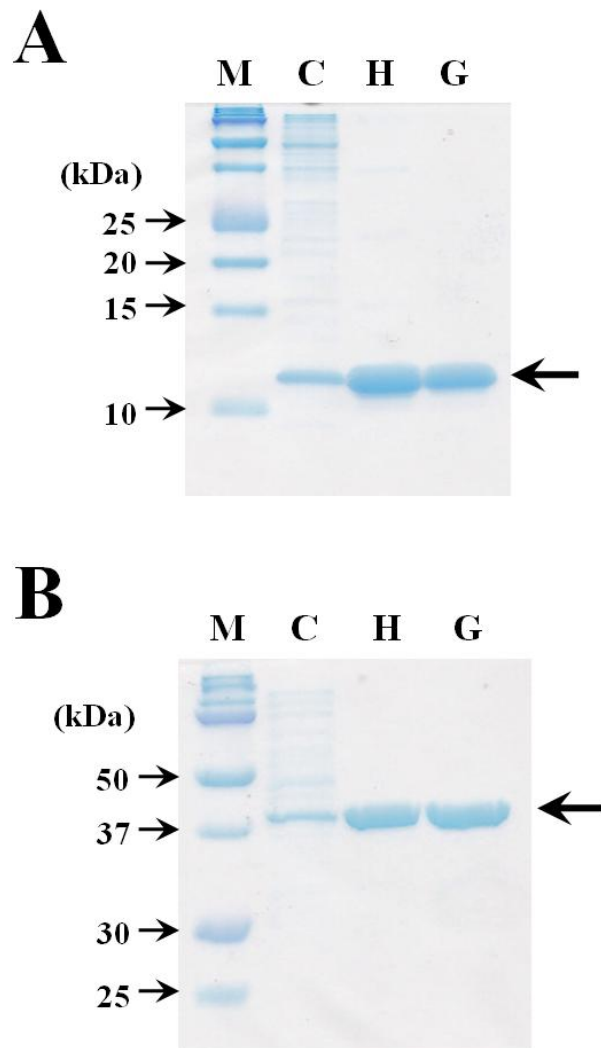
目的タンパク質のピークは矢印で示した。青線はタンパク質由来の波長 280 nm の吸光度、緑線は buffer B (500 mM imidazole を含む)の割合、赤線と赤数字はフラクションを表す。各フラクションの溶液はそれぞれ 5  $\mu$ l ずつ Tricine-SDS-PAGE および SDS-PAGE に供し、精製度を確認した。M は marker、8~12 は各フラクション、F はフラクション 1、W1 はフラクション 3~7、W2 はフラクション 13~17 のサンプルを示す。



**Figure 3-8. His タグ融合 Phu (A)、Pnd (B)のゲルろ過クロマトグラフィーの溶出プロファイルおよび精製度確認**

目的タンパク質のピークは矢印で示した。青線はタンパク質由来の波長 280 nm の吸光度、赤線と赤数字はフラクションを表す。各フラクションの溶液はそれぞれ 7.5  $\mu$ l ずつ

Tricine-SDS-PAGE および SDS-PAGE に供し、精製度を確認した。M は marker、数字は各フラクションのサンプルを示す。



**Figure 3-9. His タグ融合 Phu (A)、Pnd (B)の精製状態の確認**

M は marker、C、H、G はそれぞれ粗酵素抽出液、HiTrap カラムによるアフィニティー精製後、ゲルろ過クロマトグラフィーによる精製後のサンプルを示す。目的タンパク質のピークは矢印で示した。泳動に供したタンパク質は全て 2  $\mu$ g とした。

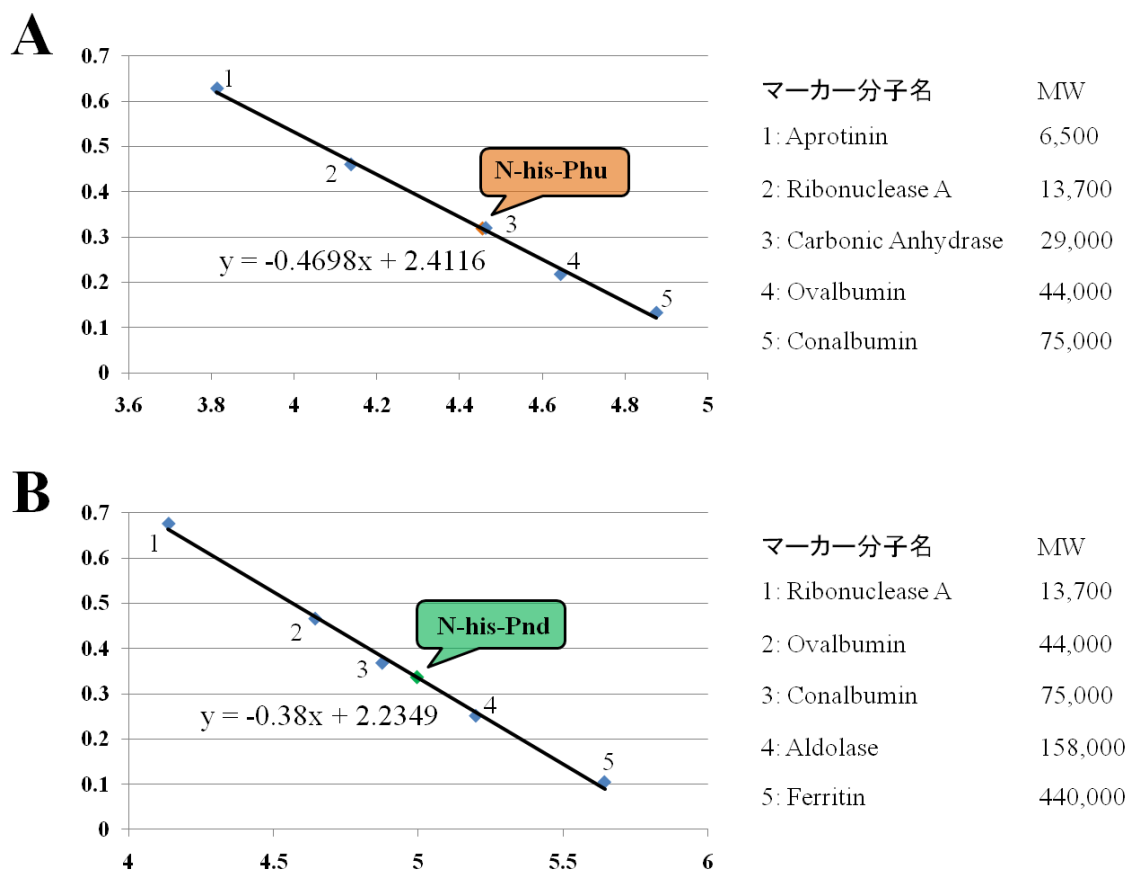
### 3-3-7. Phu、Pnd の分子量の推定

Phu および Pnd が溶液中で何量体として存在しているのかを明らかにするため、ゲルろ過クロマトグラフィーによる分子量の推定を行った。Phu の分子量の推定には Aprotinin (MW: 6,500)、Ribonuclease A (MW: 13,700)、Carbonic Anhydrase (MW: 29,000)、Ovalbumin (MW: 44,000)、Conalbumin (MW: 75,000)、Blue Dextran 2000 (MW: 2,000,000)を (Fig. 3-10A)、Pnd の分子量の推定には Ribonuclease A (MW: 13,700)、Ovalbumin (MW: 44,000)、Conalbumin (MW: 75,000)、Aldolase (MW: 158,000)、Ferritin (MW: 440,000)、Blue Dextran 2000 (MW: 2,000,000)をマーカー分子として用いて検量線を作成した (Fig. 3-10B)。その結果、N-his-Phu および N-his-Pnd はそれぞれ 28.6、99.2 kDa と推定された。N-his-Phu、N-his-Pnd の monomer としての分子量はそれぞれ約 10、約 38 kDa と推定されることから、Phu、Pnd いずれも溶液中では二量体または三量体として存在していることが予想された。

### 3-3-8. クロスリンク法による Phu、Pnd の多量体形成能の解析

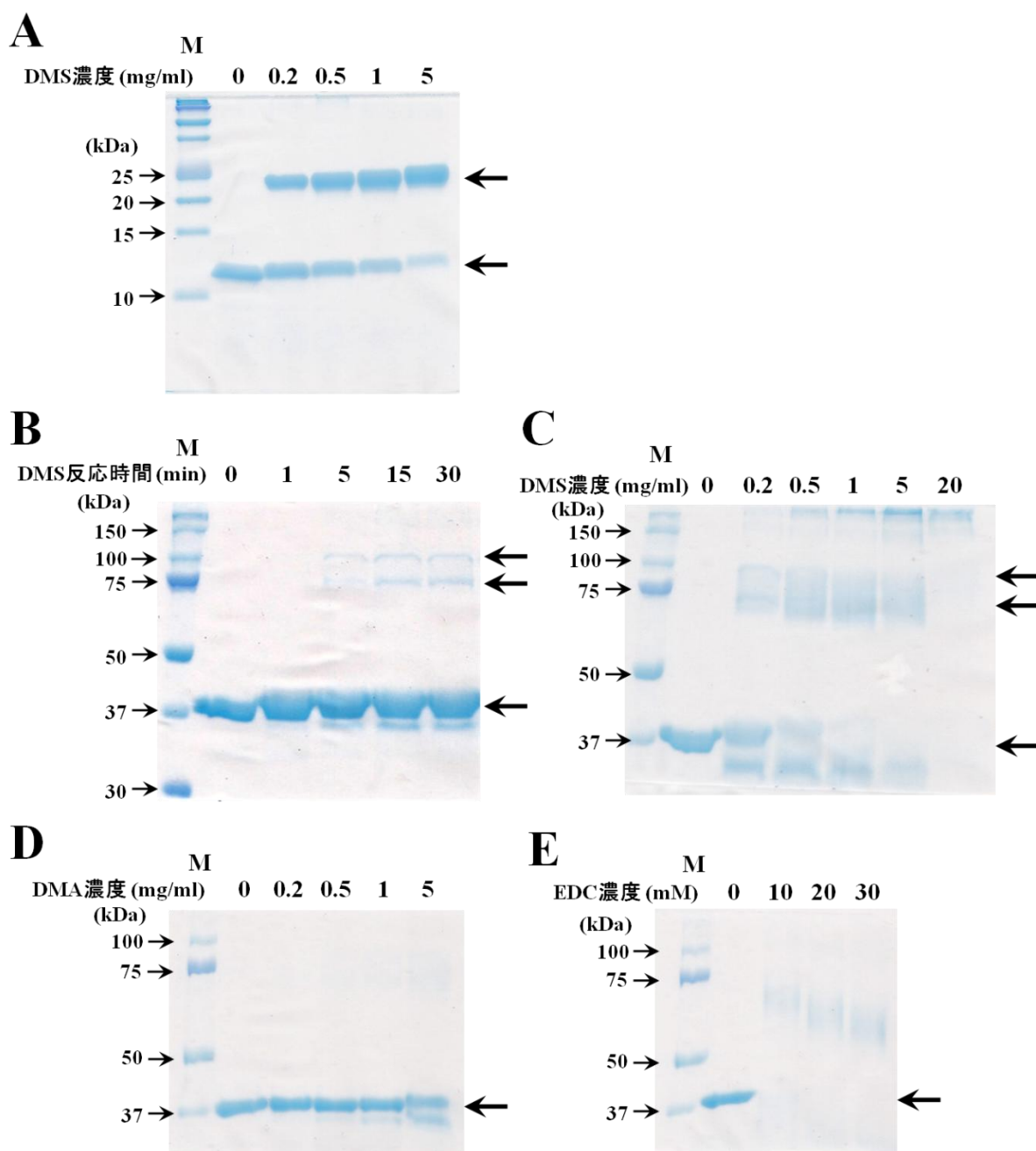
Phu および Pnd の溶液中での存在状態をクロスリンク法により解析した。まず精製 N-his-Phu 溶液にリジン残基を架橋する架橋剤 DMS を終濃度 0、0.2、0.5、1、5 mg/ml となるように加え、室温で 60 min インキュベートした後 Tricine-SDS-PAGE に供したところ、DMS 濃度依存的に単量体のバンドが消失し、二量体と推測されるバンドが多く検出された (Fig. 3-11A)。この結果と 3-3-7 の分子量推定の結果から、Phu は溶液中で二量体として存在することが明らかとなった。

次に精製 N-his-Pnd 溶液に DMS を終濃度 0.5 mg/ml となるように加え、室温で 0、1、5、15、30 min インキュベートした後 SDS-PAGE に供したところ、インキュベート時間依存的に二量体および三量体と推測されるバンドがわずかに検出された (Fig. 3-11B)。しかし DMS を終濃度 0~20 mg/ml とより高い濃度で加え、かつインキュベート時間を室温で 60 min と長くしてクロスリンクを行ったところ、高分子量領域に多量体化した Pnd と思しきバンドは見出されたものの、バンドがスメアーとなり何量体として存在するのか特定するには至らなかった (Fig. 3-11C)。そこで架橋剤の種類を変更することで明確なバンドが検出できる可能性を考慮し、スぺーサーの長さが DMS より短い DMA を架橋剤として終濃度 0、0.2、0.5、1、5 mg/ml となるように加え、室温で 60 min インキュベートすることでクロスリンクを試みたが、多量体のバンドは見出せなかった (Fig. 3-11D)。他にもタンパク質のアミノ基とカルボキシル基を架橋する架橋剤である EDC を終濃度 0、10、20、30 mM となるように加え、室温で 60 min インキュベートした後 SDS-PAGE に供したが、多量体のバンドは検出されなかった (Fig. 3-11E)。いずれの架橋剤も Pnd との相性が悪いのか明瞭な結果を得るには至っていないが、3-3-7 の分子量推定の結果を考慮すると、Pnd は溶液中では少なくとも二量体以上の多量体を形成している可能性が高いと考えられた。



**Figure 3-10. ゲルろ過クロマトグラフィーによる分子量の推定**

横軸は  $\log_{10}(\text{MW})$ 、縦軸は分配係数( $K_{av}$ )を示す。各検量線の数式も示した。精製 N-his-Phu は (A)、N-his-Pnd は(B)の検量線を用いて分子量を推定した。



**Figure 3-11. クロスリンク法による多量体形成能の解析**

目的のタンパク質のバンドを矢印で示した。Mはmarkerを表し、泳動に供したタンパク質は全て2  $\mu$ gとした。(A) DMSを用いた精製 N-his-Phu のクロスリンク。DMS 濃度依存的に単量体の Phu のバンドが消失し、二量体化した Phu と推定されるバンドの割合が増加した。(B), (C) DMS を用いた精製 N-his-Pnd のクロスリンク。DMS の反応時間・濃度依存的に多量体化した Pnd と思きバンドが見出されたが、何量体として存在するのか確定するには至らなかった。(D) DMA を用いた精製 N-his-Pnd のクロスリンク。多量体化した Pnd と推定されるバンドは検出されなかった。(E) EDC を用いた精製 N-his-Pnd のクロスリンク。EDC を加えることで Pnd のバンドが消失した。

### 3-4. 考察

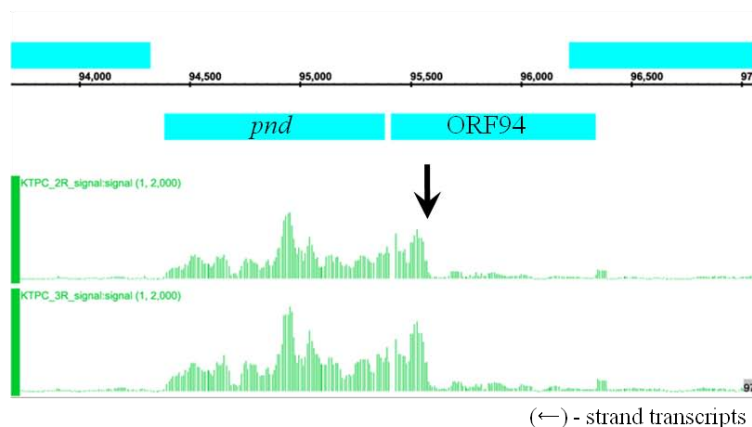
本章では、カルバゾール分解プラスミド pCAR1 上にコードされる核様体タンパク質 Phu、Pnd の転写・発現様式、およびその性状を明らかにするため、pCAR1 を保持する *P. putida* KT2440 株を用いて転写レベルの解析を行うとともに、His タグ融合 Phu、Pnd 発現株を作製し翻訳レベルの解析を行った。また、各 His タグ融合タンパク質の大腸菌での発現系を構築し、溶液中での多量体形成能の解析を行った。

*phu* および *pnd* はいずれもコハク酸を炭素源とする無機液体培地において中期対数増殖期に転写量が増大するものの、各生育段階を通してほぼ構成的に転写されることが示された。この *phu* の転写プロファイルは、大腸菌における HU をコードする遺伝子 *hupA*、*hupB* の転写プロファイル [Claret and Rouviere-Yaniv, 1997] と一致している。また *phu* の転写開始点上流には、一致度は低いものの  $\sigma^{70}$  因子依存性プロモーター配列が見出された。大腸菌において *hupA*、*hupB* の転写開始点上流にも  $\sigma^{70}$  因子依存性プロモーター配列が存在する [Kohno et al., 1990; Claret and Rouviere-Yaniv, 1996] ことから、これらの結果は Phu が HU 様タンパク質であることを支持するものである。またプライマー伸長解析では *pnd* の転写開始点の決定には至っていないが、高密度タイリングアレイを用いた KT2440(pCAR1) 株の RNA マッピング解析の結果 [本博士論文第 4 章] から、*pnd* の転写開始点は pCAR1 上の 95,560 付近であると推測された (Fig. D3-1A)。実際、pCAR1 上の 95,570~95,575、95,593~95,598 領域には *Pseudomonas* 属細菌における  $\sigma^{70}$  因子依存性プロモーター [Domínguez-Cuevas and Marqués, 2004] と相同性は低いものの類似する配列 (5'-CTCAAA-N<sub>17</sub>-CTTCAT-3') が存在しており、これが *pnd* のプロモーター配列である可能性がある (Fig. D3-1B)。今後はプライマー伸長解析に用いるプライマーや培養条件の検討を行うとともに、この遺伝子領域を用いたレポーター解析を行い、*pnd* の転写開始点・プロモーター配列を明らかにしたい。また、プライマー伸長法に代えて 5'RACE 法や S1 マッピング法により転写開始点の同定を試みることも有効かもしれない。

次に、His タグ融合 Phu、Pnd 発現株を LB 培地およびコハク酸を炭素源とする無機液体培地で培養し、タンパク質を抽出したが、いずれも His タグ融合タンパク質の検出には至らなかった。同様の方法によって pCAR1 上にコードされる核様体タンパク質 Pmr の発現は検出されている [Yun and Suzuki et al., 2010] (Fig. D3-2) ことから、菌体内において Phu、Pnd の発現量は Pmr よりも少ないことが示された。一方、高密度タイリングアレイを用いた KT2440(pCAR1) 株の RNA マッピング解析の結果 [本博士論文第 4 章] では、*phu* および *pnd* のシグナル値はそれぞれ *pmr* と同程度、*pmr* の 4 分の 1 程度であり、有意な値を示した。そのため増幅効率の違いを考慮する必要はあるものの、Phu および Pnd も少なからず発現していると考えられ、ウェスタンブロッティングの際に用いる検出試薬をより高感度のものに変更し検出感度を上げることで各タンパク質の検出が可能になるものと期待される。また、各タンパク質は C 末端側に His タグを付加したことで不安定化し、菌体内で正しくフォールディングが行われずに分解されている可能性も考えられる。そこで N 末端側 His タグ融合 Phu、Pnd 発現株を



A

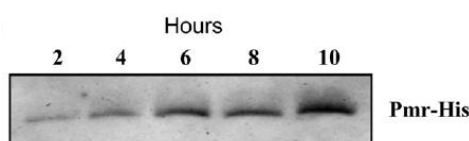


B

(95610) ↓ GCGCTGCCGCCT CTCAAA ACTGGGGCACACCAACAC CTTCAT GGTGTTTCGAT ↓ (95560)  
 -35? -10? +1?

**Figure D3-1. *pnd* の推定転写開始点および推定プロモーター配列**

(A) RNA マッピングによる *pnd* の転写解析。Succinate を炭素源とする無機液体培地で対数増殖期まで培養した KT2440(pCAR1)株から調製した 2 連のサンプルを RNA マッピング解析に供した結果を示す(4-2-10, 4-3-11 参照)。x 軸は pCAR1 上の領域を、y 軸は各プローブの示したシグナル値の大きさを、青四角はアノテーションされた各 ORF を、矢印は *pnd* の推定転写開始点 (pCAR1 上の 95,560 付近)を表す。(B) *pnd* の推定プロモーター配列。推定される-35、-10 配列を下線で示す。



**Figure D3-2. Pmr の発現プロファイル [Yun and Suzuki et al., 2010]**

2、4、6、8、10 は各培養時間のサンプルを表す。C 末端側 His タグ融合 Pmr を発現する KT2440(pCAR1pmrHis)株を succinate を炭素源とする無機液体培地で培養し、各経時点で集菌した菌体から抽出した可溶性タンパク質を 45 μg ずつ Anti-His Antibody を用いたウェスタンブロッティング解析に供することで Pmr の検出を行った。

作製し実験に供する、あるいは各タンパク質に特異的な抗体を作製し、KT2440(pCAR1)株からタンパク質を抽出して各 NAPs の発現プロファイルを調べるなどの必要があるかもしれない。

さらに、His タグ融合 Phu、Pnd の大腸菌での発現・精製系を構築した。ゲルろ過クロマトグラフィーおよびクロスリンク法により、Phu は溶液中で二量体を形成していることが明らかとなった。この結果は、大腸菌における HU および *Pseudomonas* 属細菌における HU ホモログ HupB が溶液中で二量体を形成する [Claret and Rouviere-Yaniv, 1997; Bartels et al., 2001] という知見と一致しており、Phu が HU 様タンパク質であることを裏付ける結果である。一方、Pnd については溶液中で多量体として存在することが強く示唆されたものの、クロスリンク法により明確なバンドが得られず、何量体かを特定するには至っていない。今後異なる架橋剤を用いてクロスリンク解析を行うことで、より明確な結果を得ることができるかもしれない。また、N 末端側に His タグを付加したことで構造および多量体形成能が不安定化している可能性も考えられるため、C 末端側に His タグを付加した C-his-Pnd や His タグを切断した Pnd を用いてクロスリンク解析を行うことで Pnd の多量体形成能を明らかに出来るものと期待される。

以上の解析から、Phu は以前に良く解析されている大腸菌染色体由来の HU と同様の機能・性質を有することが強く示唆された。HU は相同性組換えや DNA の複製・修復などに関与することが明らかとなっている [Fernandez et al., 1997; Chodavarapu et al., 2008]。これらの機能は HU の十字型 DNA や nick、gap 領域といった湾曲した構造に結合する性質に起因するものであり [Pinson et al., 1999]、Phu もこれらの配列への結合能を有するかに興味を持たれる。また、Phu と DNA の結合の有無を原子間力顕微鏡を用いて観察し、大腸菌由来の HU と DNA の結合の様子 [van Noort et al., 2004] と比較することで、Phu が HU と同様の機能を有するかをより明らかにすることができるであろう。さらに、プラスミド上にコードされる核様体タンパク質が宿主染色体由来の核様体タンパク質とヘテロダイマーを形成するという研究例が報告されており [Deighan et al., 2003]、pCAR1 上にコードされる Pmr も宿主染色体由来の MvaT タンパク質とヘテロオリゴマーを形成することが明らかとなっている [Yun and Suzuki et al., 2010]。大腸菌における 2 つの HU タンパク質 (HU $\alpha$  および HU $\beta$ ) が菌体内で主にヘテロダイマーの状態で存在している [Claret and Rouviere-Yaniv, 1997] ことも考慮すると、Phu は宿主である *P. putida* KT2440 株染色体由来の 3 つの HU 様タンパク質 (HupA、HupB、HupN) とヘテロダイマー・ヘテロオリゴマーを形成している可能性があり、これを明らかにすることは Phu の役割を解明する上で重要であると考えられる。Pnd についても原子間力顕微鏡を用いて DNA 結合能の有無を明らかにするなど、さらなる解析を行うことで、研究例が少なく機能未知なタンパク質である NdpA についての新規知見が得られ、核様体タンパク質研究の進展に寄与するものと期待される。

## 第4章

### pCAR1 由来 NAPs 遺伝子破壊が宿主に与える影響の解析

#### 4-1. 緒言

核様体タンパク質(NAPs)は染色体・プラスミド双方に含まれる多数の遺伝子の転写を制御する global regulator として働くことが知られている [Dillon and Dorman, 2010]。また、異なる種類の NAPs 同士が協調的に遺伝子の転写を制御する例が報告されているが [Falconi et al., 1996; Grainger et al., 2006]、依然として研究例は少なく、そのメカニズムには不明な点が多い。当研究室で精力的に研究が行われてきたカルバゾール分解プラスミド pCAR1 上には3種もの NAPs (Pmr、Pnd、Phu)がコードされており、プラスミド機能の発現の上で各 NAPs がそれぞれどのような役割を担っているのか、協調的な相互作用が存在するのかに興味を持たれた。

そこで本章では、前章に引き続き *P. putida* KT2440(pCAR1)株を用いて各 NAPs の機能解析を行った。各 NAPs をコードする遺伝子の単独破壊株および二重破壊株を作製し、様々な表現型を比較することで各 NAPs の除去が宿主に与える影響を調べた。さらに、各破壊株を高密度タイリングアレイを用いたトランスクリプトーム解析に供することで、各 NAPs のレギュロンの網羅的な抽出を行った。

## 4-2. 材料および方法

### 4-2-1. 使用菌株、プラスミド、および培養条件

本章で使用した菌株およびプラスミドを Table M4-1 に示す。培養条件は本論文第 3 章の材料および方法 3-2-1 に従って行った。

### 4-2-2. DNA および RNA を用いた実験

DNA および RNA を用いた基本的な実験は、本論文第 3 章の材料および方法 3-2-2～4、3-2-6～7 に従って行った。

### 4-2-3. プラスミドの構築

本章で使用したオリゴヌクレオチドを Table M4-2 に示す。各オリゴヌクレオチドの合成はシグマ アルドリッチ ジャパン (Sigma) に依頼した。

#### <破壊株作製用>

KT2440(pCAR1)株から *phu*、*pmr*、および *pnd* を除去する際に使用したプラスミド pK19mobsacBΔ*phu*、pK19mobsacBΔ*pmr*、pK19mobsacBΔ*pnd* は、本論文第 3 章の材料および方法 3-2-5 の pK19mobsacB*phu*His の構築法と同様の手順により作製した。一例として、pK19mobsacBΔ*phu* の場合は *phu\_del\_up\_F* プライマーと *phu\_del\_up\_R2* プライマー、Gm-F プライマーと Gm-R プライマー、*phu\_del\_down\_F2* プライマーと *phu\_del\_down\_R* プライマーを用いてそれぞれ *phu* 上流配列、Gm cassette、*phu* 下流配列を増幅し、overlap extension PCR により連結断片を増幅した後に pK19mobsacB に導入することで作製した。

#### <*pmr* 相補株作製用>

核様体タンパク質遺伝子を 2 つ除去した KT2440(pCAR1Δ*phu*Δ*pmr*)株および KT2440(pCAR1Δ*pmr*Δ*pnd*)株について、それぞれ pCAR1 上の ORF98-ORF99 遺伝子間領域に *pmr* の推定プロモーター配列からターミネーター配列までを含む 0.57 kb の遺伝子断片を挿入した KT2440(pCAR1\_TT001)株、KT2440(pCAR1\_TT002)株を作製した。使用したプラスミド pK19mobsacB*pmr* の作製方法を以下に示す。まず *pmr\_COMP\_F* および *pmr\_COMP\_R* プライマーを用い、pUB11 を鋳型として PCR により 0.57 kb の *pmr* cassette 断片を増幅した。同様に、pUC5 を鋳型として ORF98\_COMP\_up\_F および ORF98\_COMP\_up\_R プライマーを用いて ORF98 側領域を、ORF99\_COMP\_down\_F および ORF99\_COMP\_down\_R プライマーを用いて ORF99 側領域を増幅した。さらに pPS856 を鋳型として Gm-F-Sal1 および Gm-R-Pst1 プライマーを用いて FRT 配列を含む Gm cassette 断片を増幅した。これら 4 つの DNA 断片をそれぞれ pT7Blue T-vector に連結してシーケンスを確認した後、各断片の増幅に用いたプライマー由来の制限酵素を用いて切り出し、連結して pK19mobsacB ベクターに組み込んだ。

Table M4-1. 本章で用いた菌株およびプラスミド

Strain or plasmid	Relevant characteristics	Source or reference
<b>Bacterial strains</b>		
<i>Escherichia coli</i>		
DH5 $\alpha$	F $\Phi$ 80dlacZ $\Delta$ M15 $\Delta$ (lacZYA-argF)U169 <i>endA1 recA1 hsdR17</i> (r <sub>K</sub> <sup>-</sup> m <sub>K</sub> <sup>+</sup> ) <i>deoR thi-1 supE44 gyrA96 relA1 <math>\lambda</math> phoA</i>	Toyobo
S17- $\lambda$ pir	Tm <sup>r</sup> Sm <sup>r</sup> <i>recA thi pro <math>\Delta</math>hsdR M<sup>+</sup></i> RP4-2-Tc::Mu-Km::Tn7 $\lambda$ pir	Simon et al., 1986
<i>Pseudomonas putida</i>		
KT2440	Naturally Cm <sup>r</sup>	Bagdasarian et al., 1981
KT2440(pCAR1)	KT2440 harboring pCAR1	Shintani et al., 2006
KT2440(pCAR1 $\Delta$ phu)	KT2440(pCAR1) single-deletion mutant lacking <i>phu</i>	This study
KT2440(pCAR1 $\Delta$ pmr)	KT2440(pCAR1) single-deletion mutant lacking <i>pmr</i>	This study
KT2440(pCAR1 $\Delta$ pnd)	KT2440(pCAR1) single-deletion mutant lacking <i>pnd</i>	This study
KT2440(pCAR1 $\Delta$ phu $\Delta$ pmr)	KT2440(pCAR1) double-deletion mutant lacking <i>phu</i> and <i>pmr</i>	This study
KT2440(pCAR1 $\Delta$ phu $\Delta$ pnd)	KT2440(pCAR1) double-deletion mutant lacking <i>phu</i> and <i>pnd</i>	This study
KT2440(pCAR1 $\Delta$ pmr $\Delta$ pnd)	KT2440(pCAR1) double-deletion mutant lacking <i>pmr</i> and <i>pnd</i>	This study
KT2440(pCAR1_TT001)	KT2440(pCAR1 $\Delta$ phu $\Delta$ pmr) containing 0.57-kb <i>pmr</i> cassette inserted into 101,000-101,001 region of pCAR1	This study
KT2440(pCAR1_TT002)	KT2440(pCAR1 $\Delta$ pmr $\Delta$ pnd) containing 0.57-kb <i>pmr</i> cassette inserted into 101,000-101,001 region of pCAR1	This study
<b>Plasmids</b>		
pBluescriptII SK(-)	Ap <sup>r</sup> , <i>lac Z</i> , pMB9 replicon	Stratagene
pBCA731	Ap <sup>r</sup> , pBluescript II SK(-) with 7.5-kb <i>Eco RV</i> - <i>Cla I</i> insert of pCAR1	Nojiri et al., 2001
pFLP2	Ap <sup>r</sup> , <i>ori1600 oriT</i> (RP4), Fip recombinase expression vector	Hoang et al., 1998
pFLP2Km	pFLP2, Km <sup>r</sup> gene cassette inserted into its <i>Sca I</i> site	This study
pK19mobsacB	Km <sup>r</sup> , <i>oriT</i> (RP4), <i>sacB</i> , <i>lac Z<math>\alpha</math></i> , pMB1 replicon	Schäfer et al., 1994
pK19mobsacB $\Delta$ phu	pK19mobsacB containing 5' and 3' flanking regions of <i>phu</i> and Gm <sup>r</sup> gene cassette	This study
pK19mobsacB $\Delta$ pmr	pK19mobsacB containing 5' and 3' flanking regions of <i>pmr</i> and Gm <sup>r</sup> gene cassette	This study
pK19mobsacB $\Delta$ pnd	pK19mobsacB containing 5' and 3' flanking regions of <i>pnd</i> and Gm <sup>r</sup> gene cassette	This study
pK19mobsacBpmr	pK19mobsacB containing 100,550-101,000 and 101,001-101,382 regions of <i>pmr</i> and Gm <sup>r</sup> gene cassette	This study
pPS856	Ap <sup>r</sup> , Gm <sup>r</sup> , FRT sites	Hoang et al., 1998
pT7Blue T-vector	Ap <sup>r</sup> , <i>lac Z<math>\alpha</math></i> , T7 promoter, f1 origin, pUC/M13 priming sites	Novagen
pTORF23	pT7Blue with 1.0-kb PCR fragment containing antR	Miyakoshi et al., 2007
pT7_146	pT7Blue with 1.1-kb PCR fragment containing ORF146	徳丸、2010
pUC18	Ap <sup>r</sup> , <i>lac Z<math>\alpha</math></i> , pMB9 replicon	Takara
pUB11	pUC18 containing 75,211-80,781 region of pCAR1	This study
pUC4	pUC18 containing 93,142-98,682 region of pCAR1	This study
pUC5	pUC18 containing 97,635-101,938 region of pCAR1	This study
pUC19	Ap <sup>r</sup> , <i>lac Z<math>\alpha</math></i> , pMB9 replicon	Takara
pUCARori004	pUC19 Km <sup>r</sup> , containing 7-kb <i>Nhe I-Hin dIII</i> fragment of pCAR1	Shintani et al., 2006
pUC119	Ap <sup>r</sup> , <i>lac Z<math>\alpha</math></i> , pMB9 replicon	Takara
pUCA1	pUC119 with <i>Eco RI</i> insert of pCAR1	Sato et al., 1997

Table M4-2. 本章で用いたプライマー

プライマー	塩基配列 (5'から3')	参考文献
<b>破壊株の作製</b>		
Gm-F	CGAATTAGCTTCAAAAGCGCTCTGA	Choi and Schweizer, 2005
Gm-R	CGAATTGGGGATCTTGAAGTTCCT	Choi and Schweizer, 2005
phu_del_up_F	<u>GGATCCT</u> AGACGATCGACGCAAAGTG	This study
phu_del_up_R2	<b>TCAGAGCGCTTTTGAAGCTAATTCG</b> TCGCTTTTACTCCTTGGTTG	This study
phu_del_down_F2	<b>AGGAACTTCAAGATCCCCAATTCG</b> GCCCCCTCCAGCCGCCCGA	This study
phu_del_down_R	<u>AAGCTT</u> GCGATGAGAAGGGCAAATAG	This study
pmr_del_up_F	<u>GGATCC</u> AGGAATCACTGTTCGGCAAG	This study
pmr_del_up_R2	<b>TCAGAGCGCTTTTGAAGCTAATTCG</b> CTTGCTCCTTGGTCTGGGT	This study
pmr_del_down_F2	<b>AGGAACTTCAAGATCCCCAATTCG</b> GTTTGCCTACCGCGGATCT	This study
pmr_del_down_R	<u>AAGCTT</u> GTGAGCCAAGGCTTCTTCAG	This study
pnd_del_up_F	<u>GGATCCC</u> GAGTCCCAAACCGTAATA	This study
pnd_del_up_R	<b>TCAGAGCGCTTTTGAAGCTAATTCG</b> GAGCAAAGTCCTTGTAGTTT	This study
pnd_del_down_F	<b>AGGAACTTCAAGATCCCCAATTCG</b> AAAAATGCCCGTCCATCTC	This study
pnd_del_down_R	<u>AAGCTT</u> GGATCAATTCCAGCCTCAAA	This study
<b>相補株の作製</b>		
Gm-F-SalI	<u>GTCGAC</u> CGAATTAGCTTCAAAAGCGCTCTG	This study
Gm-R-PstI	<u>CTGCAG</u> CGAATTGGGGATCTTGAAGTTCCT	This study
ORF98_COMP_up_F	<u>GGATCC</u> ACCTGGGTACTGGCTCATTG	This study
ORF98_COMP_up_R	<u>CTGCAG</u> GCCCCGTTTCTACGCAGCT	This study
ORF99_COMP_down_F	<u>CCCGGG</u> CTGGTGGCACGCGTCGGCCG	This study
ORF99_COMP_down_R	<u>AAGCTT</u> CATATCGCATGGGATTTTCC	This study
pmr_COMP_F	<u>CCCGGG</u> CGCATTTCTGGCCTTCCGCCG	This study
pmr_COMP_R	<u>GTCGAC</u> CTCACAAAAAAGGCCGGGTT	This study
<b>サザン解析のプローブ作製</b>		
Gm-61F	GGCTCAAGTATGGGCATCAT	This study
Gm-449R	TCACCGTAATCTGCTTGCAC	This study
<b>pCAR1上の遺伝子確認</b>		
ORF11down-F	ACCCTGGGCAACTCACAGAT	Takahashi et al., 2009b
ORF39up-R	TGCCATCGATGATGTAGACG	Takahashi et al., 2009b
<b>16S rRNA遺伝子確認</b>		
27F	AGAGTTTGATC(A/C)TGGCTCAG	Heuer et al., 1997
1378R	CGGTGTGTACAAGGCCCGGGAACG	Heuer et al., 1997

下線は制限酵素サイトを示す。

赤字、青字はそれぞれ、Gm-Fプライマーとの相同配列、Gm-Rプライマーとの相同配列を示す。

#### 4-2-4. 破壊株および相補株の作製

*Pseudomonas* 属細菌からの遺伝子の除去および遺伝子の挿入は、本論文第 3 章の材料および方法 **3-2-12** と同様の操作により行った。

##### < 単独破壊株の作製 >

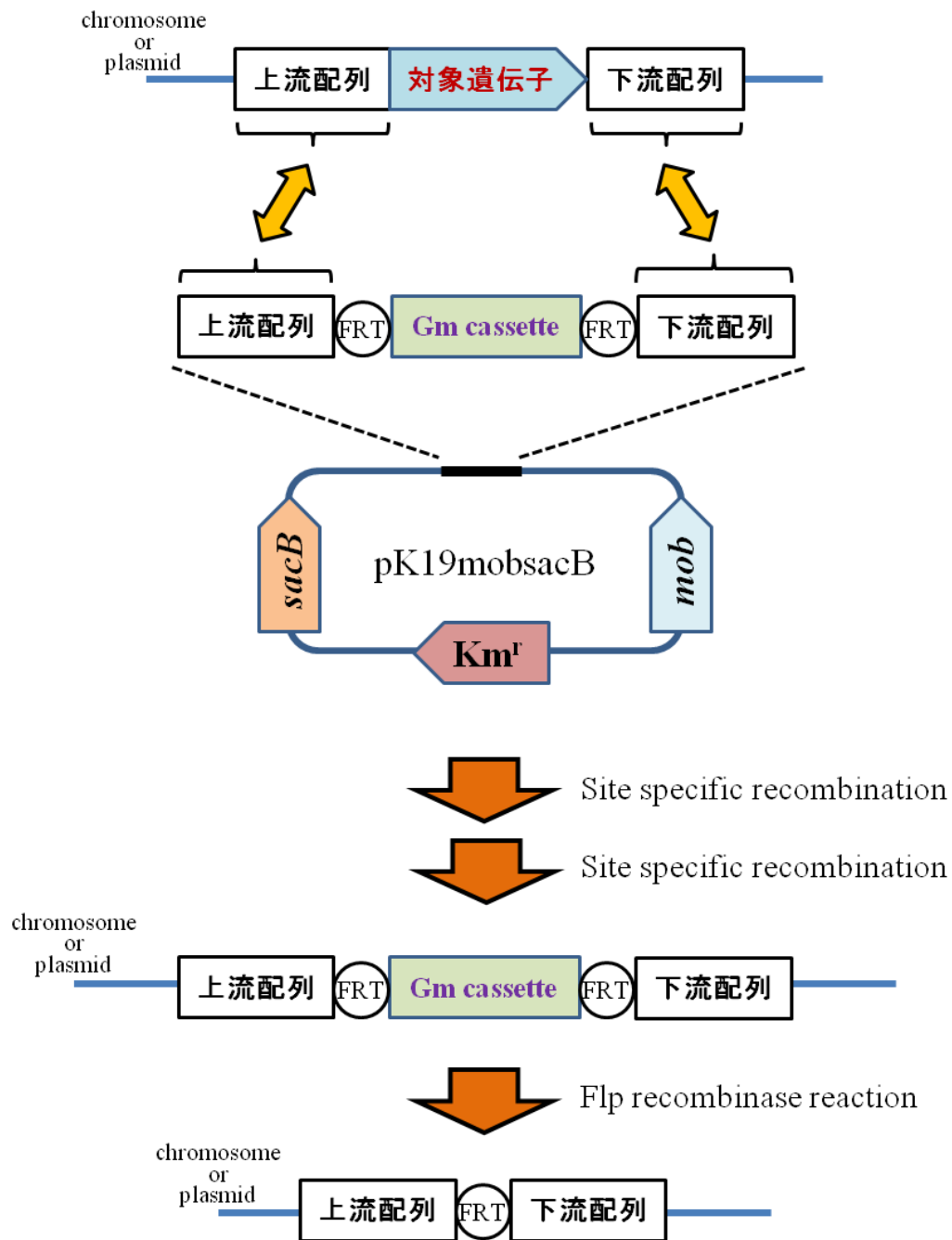
作製方法の概略を Fig. M4-1 に示す。 *P. putida* KT2440(pCAR1)株に **4-2-3** で作製したプラスミド (pK19mobsacBΔphu、pK19mobsacBΔpmr、pK19mobsacBΔpnd)を導入し、double crossover による遺伝子破壊後に Flp recombinase によって遺伝子破壊時の薬剤耐性マーカー遺伝子を除去するという方法で、*phu*、*pmr*、*pnd* をそれぞれ一つずつ除去した単独破壊株 KT2440(pCAR1Δphu)株、KT2440(pCAR1Δpmr) 株、および KT2440(pCAR1Δpnd)株を作製した。

##### < 二重破壊株の作製 >

作製した単独破壊株に対して再度遺伝子除去操作を行うことで、核様体タンパク質遺伝子が 2 つ除去された二重破壊株を作製した。具体的には、KT2440(pCAR1Δpmr) 株にプラスミド pK19mobsacBΔphu あるいは pK19mobsacBΔpnd を導入することで KT2440(pCAR1ΔphuΔpmr) 株 および KT2440(pCAR1ΔpmrΔpnd) 株 を、KT2440(pCAR1Δpnd) 株 に プラスミド pK19mobsacBΔphu を導入することで KT2440(pCAR1ΔphuΔpnd)株を作製した。

##### < 相補株の作製 >

作製方法の概略を Fig. M4-2 に示す。KT2440(pCAR1ΔphuΔpmr) 株 および KT2440(pCAR1ΔpmrΔpnd)株に **4-2-3** で作製したプラスミド pK19mobsacBpmr を導入し、double crossover による遺伝子挿入後に Flp recombinase によって薬剤耐性マーカー遺伝子を除去するという方法で、KT2440(pCAR1\_TT001)株および KT2440(pCAR1\_TT002)株を作製した。

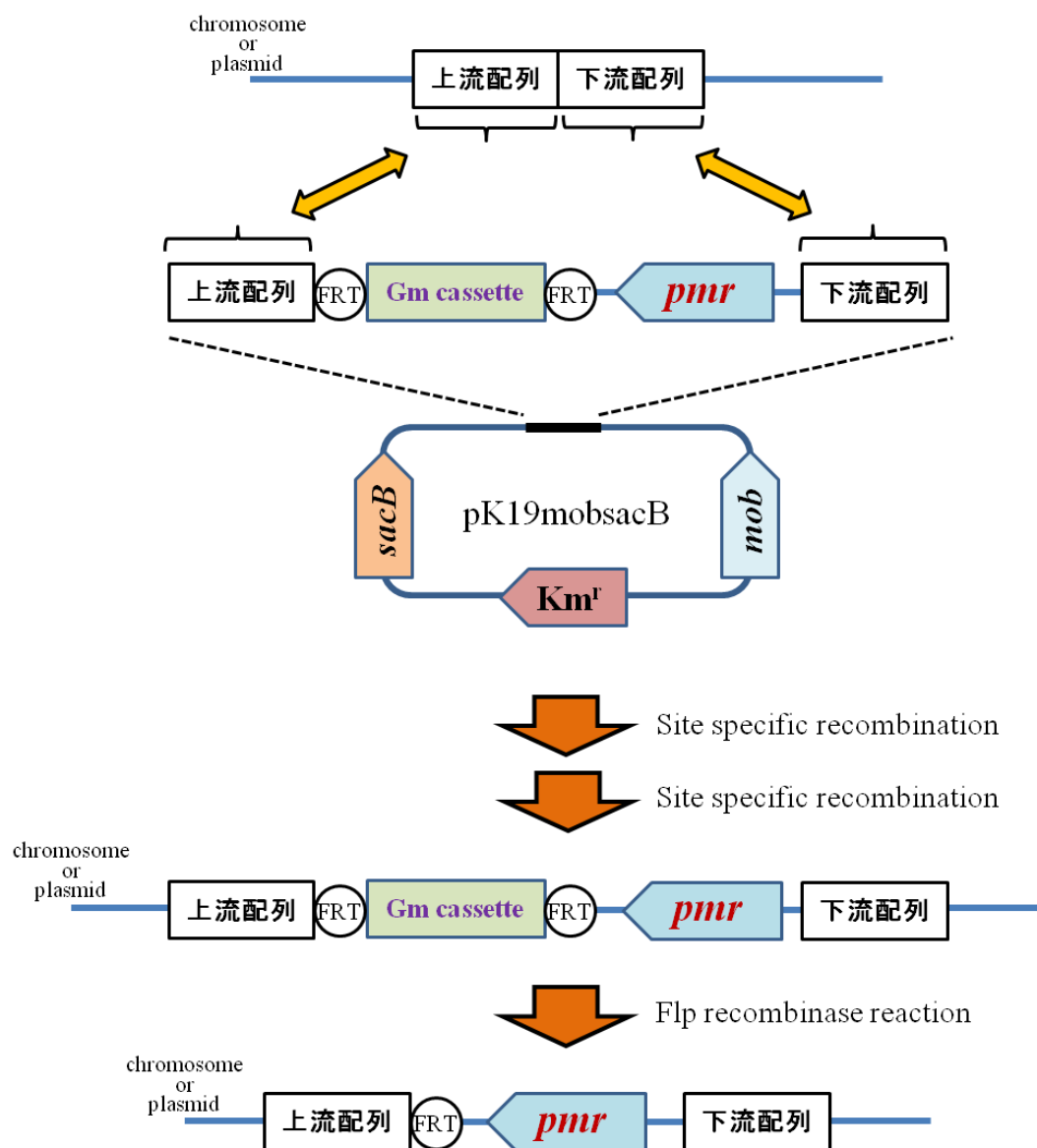


**Figure M4-1.** 相同性組換えを利用した対象遺伝子の除去方法の概略図

pK19mobsacB 上に組み込まれた「上流配列」領域および「下流配列」領域それぞれで相同性組換えが生じることにより、対象遺伝子が「Gm cassette」に置き換わる。

Gm cassette は FRT 配列に挟まれており、Flp recombinase を用いることで除去される。





**Figure M4-2.** 相同性組換えを利用した標的位置への *pmr* 挿入方法の概略図

pK19mobsacB 上に組み込まれた「上流配列」領域および「下流配列」領域それぞれで相同性組換えが生じることにより、標的位置に「*pmr*+*Gm* cassette」断片が挿入される。

*Gm* cassette は FRT 配列に挟まれており、Flp recombinase を用いることで除去される。

#### 4-2-5. サザンハイブリダイゼーション

サザンハイブリダイゼーションは DIG-High Prime および検出キット (Roche Diagnostics) を用い、そのプロトコールに従って行った。メンブレンには PALL BIODYNE B MEMBLANE (PALL) を用いた。

##### <プローブの作製>

本章では破壊株への Gm cassette の挿入を調べるためにサザンハイブリダイゼーション解析を行った。使用したプローブの作製方法を以下に示す。Gm-61F プライマー及び Gm-449R プライマーを用い、pPS856 を鋳型として PCR により Gm cassette の内部配列断片を増幅した。アガロースゲル電気泳動を行った後にゲルから抽出し、DIG-High Prime を用いてプローブ化し Gm プローブとした。

##### <ハイブリダイゼーション>

###### 試薬

- Denaturation buffer (0.5 M NaOH、1.5 M NaCl)
- Neutralization buffer (0.5 M Tris、3 M NaCl)  
HCl で pH 7.5 に調製後、オートクレーブした。
- Buffer 1 (0.1 M Maleic acid、0.15 M NaCl)  
NaOH で pH 7.5 に調製後、オートクレーブした。
- Blocking stock solution  
Blocking reagent を Buffer 1 で 10% (w/v) となるように熱を加えながら攪拌して溶解させた後、オートクレーブした。
- Buffer 2  
Blocking stock solution を Buffer 1 で 10 倍希釈したものを用時調製した。
- 20×SSC (3 M NaCl、0.3 M Na<sub>3</sub>・citrate・2H<sub>2</sub>O)  
1.5 L の H<sub>2</sub>O に溶解後、2 L に fill up した。
- Hybridization buffer (-20°C 保存)  
5×SSC、1% (w/v) Blocking stock solution  
0.1% (w/v) *N*-Laurorylsarcosine、0.2% (w/v) SDS
- Buffer 3 (0.1 M Tris、0.1 M NaCl)  
1 M の Tris-HCl 50 ml を 400 ml の H<sub>2</sub>O で希釈し、NaCl 2.93 g を溶かした後、1 N の NaOH を用いて pH 9.5 に調製した。500 ml に fill up し、filtration した。

## 操作

ゲルからメンブレンへの transfer については VacuGene XL Vacuum Blotting System (GE Healthcare)を用いて行い、操作手順はそのプロトコールに従った。

- ① Hybridization に供する DNA を各種制限酵素で切断し、アガロース電気泳動を行った。その後エチジウムブロマイドで染色し、UV 照射下で泳動状態を記録した。
- ② ゲルを VacuGene XL Vacuum Blotting System にセットし、0.2 N HCl をゲルの表面を覆うように加え、15 min、50 HPa の圧力で吸引した。
- ③ HCl を除いた後、Denaturation buffer を加えて同様に 15 min 吸引した。
- ④ 同様にして Neutralization buffer を加えて 15 min 吸引した後、ゲル高の 2 倍程度の位置まで 20×SSC buffer を加えて 60 min 吸引した。
- ⑤ メンブレンを取り出し、キムタオルで buffer を除去した後に UV を 5 min 照射した。
- ⑥ シールドパックに入れ、Hybridization buffer を加えて 68°C、1 h prehybridization を行った。
- ⑦ 1 ml あたり 1  $\mu$ l のプローブを加えた Hybridization buffer 15 ml と prehybridization buffer を交換し、68°C、8 h 以上インキュベートした。
- ⑧ メンブレンを終濃度 0.1% (w/v)の SDS を加えた 2×SSC 100 ml で 15 min 洗浄した(2回)。
- ⑨ 同様に 0.1% (w/v)の SDS を加えた 0.1×SSC 100 ml で 68°C、15 min 洗浄した(2回)。
- ⑩ 100 ml の Buffer 2 で 30 min 洗浄した。
- ⑪ 100 ml の Buffer 2 に抗体溶液を 20  $\mu$ l 加えた溶液で 30 min 振とうした。
- ⑫ 100 ml の Buffer 1 で 15 min 洗浄した(2回)。
- ⑬ 20 ml の Buffer 3 で 2 min 平衡化した。
- ⑭ 15 ml の Buffer 3 に発色溶液を 300  $\mu$ l 加えた溶液にメンブレンを浸し、10 min 以上静置して検出した。
- ⑮ 望ましいシグナルが得られたらメンブレンを取り出し、H<sub>2</sub>O で洗浄した。

#### 4-2-6. コロニーハイブリダイゼーション

試薬やメンブレンを含め、プロトコルは **4-2-5** に準拠した。以下には作製したプローブおよびコロニーハイブリダイゼーションに特有の操作を示す。

##### <プローブの作製>

本章では pCAR1 上の遺伝子の有無を調べるためにコロニーハイブリダイゼーション解析を行った。プローブ化した各 DNA 断片を以下に示す。いずれも制限酵素処理後の断片をアガロース電気泳動に供し、ゲルからの抽出溶液を DIG-High Prime を用いてプローブ化した。

- repA プローブ

pUCARori004 を *Hind*III および *Xba*I で切断し、*repA* を含む約 1.7 kb の断片を得た。

- antBC プローブ

pBCA731 を *Eco*RI および *Sph*I で切断し、*antB* および *antC* を含む約 1.1 kb の断片を得た。

- carAc プローブ

pUCA1 を *Bgl*II および *Xho*I で切断し、*carAc* を含む約 1 kb の断片を得た。

- antR プローブ

pTORF23 を *Bam*HI および *Eco*RI で切断し、*antR* を含む約 1 kb の断片を得た。

- ORF146 プローブ

pT7\_146 を *Bam*HI および *Xba*I で切断し、ORF146 を含む約 1.1 kb の断片を得た。

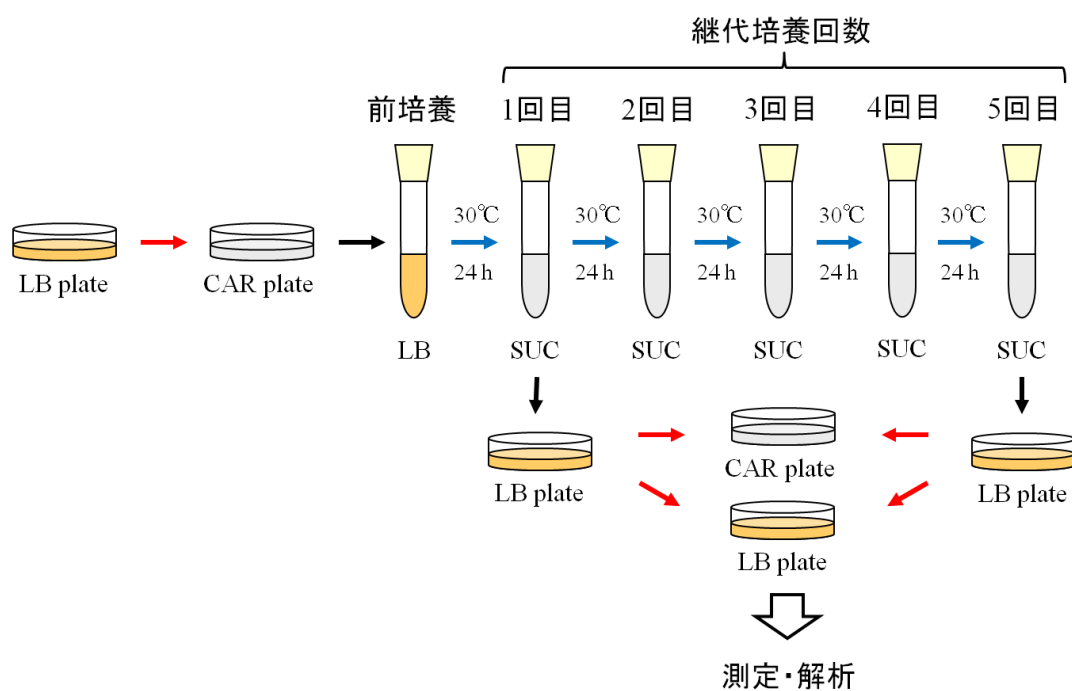
##### <ハイブリダイゼーション>

- ① メンブレンを培地の上に乗せて 3 min 静置し、静かにはがし取ってコロニーを付着させた。
- ② コロニーが付着した面を上にして 5 min 静置して乾燥させた。
- ③ 5 ml の Denaturation buffer の上にコロニーが付着した面が上になるようにしてメンブレンを浸し、5 min 静置した。
- ④ Denaturation buffer を除いた後、同様にして 5 ml の Neutralization buffer に 5 min 浸した。
- ⑤ コロニーが付着した面を上にしてキムタオル上に置き、10 min 乾燥させた。
- ⑥ 100 ml の 2×SSC を加え 5 min 静置した。
- ⑦ メンブレンをペーパータオル・アルミホイルの順に包んで 70°C、30 min 焼きつけた。
- ⑧ 100 ml の wash buffer (0.05 N NaOH、0.1% SDS) で 15 min 洗浄した。
- ⑨ UV を 5 min 照射した。
- ⑩ 以後は **4-2-5** の⑥以降と同じ操作を行った。

#### 4-2-7. 継代培養時の pCAR1 保持率測定試験

KT2440(pCAR1)株、単独破壊株、二重破壊株および相補株がそれぞれ pCAR1 を安定に保持するのか調べた。実験の概略を Fig. M4-3 に示す。

- ① 各株を滅菌つまようじを用いてカルバゾール (CAR) plate 上にパッチし、pCAR1 由来の CAR 資化能を有することを確認した。
- ② 5 ml の LB 培地に植菌し、30°C、24 h 培養した。
- ③ 培養液 10  $\mu$ l を 0.1% (w/v) の succinate (SUC) を唯一の炭素源とする 5 ml の NMM4 培地 (SUC 培地) に植菌し、30°C、24 h 培養した(これを継代培養 1 回目とした)。
- ④ 培養液 10  $\mu$ l を再度 5 ml の SUC 培地に植菌し、30°C、24 h 培養した。これを継代培養 5 回目まで繰り返した。
- ⑤ 継代培養 1 回目および 5 回目の培養液は LB plate に植菌し、30°C、24 h 培養した。
- ⑥ 生じたコロニーを滅菌つまようじを用いて 100 コロニーずつ CAR plate および LB plate にパッチした。
- ⑦ CAR plate 上で CAR 資化能を有するコロニーの割合を測定するとともに、LB plate 上のコロニーをコロニーハイブリダイゼーション解析に供し、pCAR1 上の遺伝子の有無を調べた。



**Figure M4-3. Succinate (SUC)を唯一の炭素源とする NMM4 培地での継代培養時の pCAR1 保持率測定試験**

CAR は carbazole、黒矢印は白金耳を用いた植菌、赤矢印は滅菌つまようじを用いたパッチによる植菌、青矢印は培養液を 10  $\mu$ l 植菌したことを表す。継代培養 1 回目および 5 回目の培養液をそれぞれ LB plate に塗布しコロニーを生じさせた後、CAR plate と LB plate にパッチし、CAR 資化能の有無の解析およびコロニーハイブリダイゼーション解析に供した。

#### 4-2-8. 運動性試験

KT2440 株、KT2440(pCAR1)株および単独破壊株について、それぞれ軟寒天培地上での運動性を比較した。

##### 試薬

以下に用いた各試薬の購入元を記す。特に記載しないものは関東化学から購入した。

- LB plate、1/3 LB plate  
Bacto Tryptone (BD, 211705)、Extract Yeast Dried (ナカライテスク, 15838-45)、  
精製寒天末 (ナカライテスク, 01162-15)
- SUC plate  
精製寒天末 (ナカライテスク, 01162-15)
- PG agar plate (組成 … 0.5% (w/v) Bacto Proteose peptone No.3、0.2% (w/v) glucose、Bacto agar)  
Bacto Proteose Peptone No.3 (BD, 211693)、Bacto agar (BD, 214010)

##### 操作

上述の試薬を用いて LB plate、1/3 LB plate、SUC plate および PG agar plate を作成した。各培地を MATRIX CellMate II (Gene Company)および Disposable Plastic Pipette を用いて 9.5 ml ずつアズノール滅菌シャーレ (AS ONE)に分注することで均一な厚さの plate を作成した。寒天の濃度は 0.3%あるいは 0.5%とした。各株について LB plate 上でコロニーを形成させたものを用意し、用時調製した各 plate の中心に滅菌つまようじを用いて 1 コロニーずつパッチし、逆さにしてサランラップで包み、30°C あるいは 25°C で 72 h 静置培養した。各々の条件で培養した各株について、独立した 5 つのコロニーの直径をデジタルノギスを用いて測定した。

#### 4-2-9. Phenotype MicroArray

KT2440(pCAR1)株、単独破壊株および二重破壊株について、Phenotype MicroArray (Biolog) を用いて表現型の網羅的な解析を行った。Biolog 社の Phenotype MicroArray では、1 well ごとに異なる培地が充填された 96 well plate で被験株を培養する。各 well には tetrazolium violet という色素が等量入っており、菌が呼吸して NADH が生成すると還元されて紫色を呈する。この色素量を経時的に測定することで菌体の呼吸量をモニタリングすることができる。すなわち本研究では、菌体の生育ではなく呼吸量の大小で表現型を評価している。Biolog 社が提供する微生物試験用の培地では、(C, N, P, および S 源のいずれかとして)利用できる基質、浸透圧耐性、pH 感受性、化学物質感受性などの表現型を評価することができる。本研究ではこのうち PM1 (C 源)、PM2A (C 源)、PM3B (N 源)、PM4A (P あるいは S 源)、PM9 (浸透圧耐性)、および PM10 (pH 感受性) plate を用いた。各 plate で評価する表現型を Table M4-3 に示す。方法は Biolog 社の推奨プロトコールに従い、PM3B および PM4A plate に添加する C 源としては 10×C 源 stock (200 mM sodium succinate、20 μM ferric citrate)を用いた。OmniLog plate reader を用いて 30°C、48 h 培養を行い、15 min ごとに色素量の測定を行った。実験は各株について 2 連で行った。得られたデータの解析には Biolog Kinetic and Parametric software (version 1.20.02)を用いた。PM1~4A plate においては比較する 2 株の面積値の差が 8,000 以上、PM9, 10 plate においては面積値の差が 4,000 以上であり、2 連の実験で再現性があるものを「2 株間で呼吸量に差がある」基質あるいは条件として抽出した。また PM1~4A plate で用いた各基質は Pathway Projector (<http://www.g-language.org/PathwayProjector/>) [Kono et al., 2009]を用いて KEGG Atlas の代謝マップ上にプロットした。

Table M4-3. Phenotype MicroArrayの各wellで評価する条件一覧

Well	Compound	KEGG ID	Well	Compound	KEGG ID
PM01 (C-source)			E12	Adenosine	C00212
A01	Negative Control		F01	Glycyl-L-Aspartic Acid	C02871
A02	L-Arabinose	C00259	F02	Citric Acid	C00158
A03	N-Acetyl-D-Glucosamine	C03000	F03	meso-Inositol	C00137
A04	D-Saccharic Acid	C00818	F04	D-Threonine	C00820
A05	Succinic Acid	C00042	F05	Fumaric Acid	C00122
A06	D-Galactose	C00124	F06	Bromo-Succinic Acid	
A07	L-Aspartic Acid	C00049	F07	Propionic Acid	C00163
A08	L-Proline	C00148	F08	Mucic Acid	C01807
A09	D-Alanine	C00133	F09	Glycolic Acid	C00160
A10	D-Trehalose	C01083	F10	Glyoxylic Acid	C00048
A11	D-Mannose	C00159	F11	D-Cellobiose	C00185
A12	Dulcitol	C01697	F12	Inosine	C00294
B01	D-Serine	C00740	G01	Glycyl-L-Glutamic Acid	
B02	D-Sorbitol	C00794	G02	Tricarballic Acid	
B03	Glycerol	C00116	G03	L-Serine	C00065
B04	L-Fucose	C01019	G04	L-Threonine	C00188
B05	D-Glucuronic Acid	C00191	G05	L-Alanine	C00041
B06	D-Gluconic Acid	C00257	G06	L-Alanyl-Glycine	
B07	D,L- $\alpha$ -Glycerol- Phosphate	C00093	G07	Acetoacetic Acid	C00164
B08	D-Xylose	C00181	G08	N-Acetyl- $\beta$ -D-Mannosamine	C00645
B09	L-Lactic Acid	C00186	G09	Mono Methyl Succinate	
B10	Formic Acid	C00058	G10	Methyl Pyruvate	
B11	D-Mannitol	C00392	G11	D-Malic Acid	C00497
B12	L-Glutamic Acid	C00025	G12	L-Malic Acid	C00149
C01	D-Glucose-6-Phosphate	C00092	H01	Glycyl-L-Proline	
C02	D-Galactonic Acid- $\gamma$ -Lactone	C03383	H02	p-Hydroxy-Phenylacetic Acid	C00642
C03	D,L-Malic Acid	C00497	H03	m-Hydroxy-Phenylacetic Acid	C05593
C04	D-Ribose	C00121	H04	Tyramine	C00483
C05	Tween 20	C11624	H05	D-Psicose	C06468
C06	L-Rhamnose	C00507	H06	L-Lyxose	C01508
C07	D-Fructose	C00095	H07	Glucuronamide	
C08	Acetic Acid	C00033	H08	Pyruvic Acid	C00022
C09	$\alpha$ -D-Glucose	C00031	H09	L-Galactonic Acid- $\gamma$ -Lactone	C01115
C10	Maltose	C00208	H10	D-Galacturonic Acid	C00333
C11	D-Melibiose	C05402	H11	$\beta$ -Phenylethylamine	C05332
C12	Thymidine	C00214	H12	Ethanolamine	C00189
D01	L-Asparagine	C00152	PM02A (C-source)		
D02	D-Aspartic Acid	C00402	A01	Negative Control	
D03	D-Glucosaminic Acid	C03752	A02	Chondroitin Sulfate C	C00635
D04	1,2-Propanediol	C00583	A03	$\alpha$ -Cyclodextrin	
D05	Tween 40		A04	$\beta$ -Cyclodextrin	
D06	$\alpha$ -Keto-Glutaric Acid	C00026	A05	$\gamma$ -Cyclodextrin	
D07	$\alpha$ -Keto-Butyric Acid	C00109	A06	Dextrin	C00721
D08	$\alpha$ -Methyl-D-Galactoside	C03619	A07	Gelatin	C01498
D09	$\alpha$ -D-Lactose	C00243	A08	Glycogen	C00182
D10	Lactulose	C07064	A09	Inulin	C00368
D11	Sucrose	C00089	A10	Laminarin	C00771
D12	Uridine	C00299	A11	Mannan	C00464
E01	L-Glutamine	C00064	A12	Pectin	C00714
E02	meso-Tartaric Acid	C00552	B01	N-Acetyl-D-Galactosamine	C01074
E03	D-Glucose-1-Phosphate	C00103	B02	N-Acetyl-Neuraminic Acid	C00270
E04	D-Fructose-6-Phosphate	C00085	B03	$\beta$ -D-Allose	C01487
E05	Tween 80	C11625	B04	Amygdalin	C08325
E06	$\alpha$ -Hydroxy Glutaric Acid- $\gamma$ -Lactone		B05	D-Arabinose	C00216
E07	$\alpha$ -Hydroxy-Butyric Acid	C05984	B06	D-Arabitol	C01904
E08	$\beta$ -Methyl-D-Glucoside		B07	L-Arabitol	C00532
E09	Adonitol	C00474	B08	Arbutin	C06186
E10	Maltotriose	C01835	B09	2-Deoxy-D-Ribose	C01801
E11	2'-Deoxy-Adenosine	C00559	B10	i-Erythritol	C00503



Table M4-3. 続き

Well	Compound	KEGG ID	Well	Compound	KEGG ID
PM02A (C-source)			G10	L-Leucine	C00123
B11	D-Fucose	C01018	G11	L-Lysine	C00047
B12	3-O-β-D-Galactopyranosyl-D-Arabinose		G12	L-Methionine	C00073
C01	Gentiobiose	C08240	H01	L-Ornithine	C00077
C02	L-Glucose		H02	L-Phenylalanine	C00079
C03	D-Lactitol		H03	L-Pyroglutamic Acid	C02238
C04	D-Melezitose	C08243	H04	L-Valine	C00183
C05	Maltitol	G00275	H05	D,L-Carnitine	C00487
C06	α-Methyl-D-Glucoside		H06	Sec-Butylamine	
C07	β-Methyl-D-Galactoside	C03619	H07	D,L-Octopamine	C04227
C08	3-O-Methyl-Glucose		H08	Putrescine	C00134
C09	β-Methyl-D-Glucuronic Acid	C08350	H09	Dihydroxy-Acetone	C00184
C10	α-Methyl-D-Mannoside		H10	2,3-Butanediol	C03044
C11	β-Methyl-D-Xyloside		H11	2,3-Butanone	C00741
C12	Palatinose	C01742	H12	3-Hydroxy-2-Butanone	C00466
D01	D-Raffinose	C00492	PM3B (N-source)		
D02	Salicin	C01451	A01	Negative Control	
D03	Sedoheptulosan		A02	Ammonia	C00014
D04	L-Sorbose	C00247	A03	Nitrite	C00088
D05	Stachyose	C01613	A04	Nitrate	C00244
D06	D-Tagatose	C00795	A05	Urea	C00086
D07	Turanose	G03588	A06	Biuret	C06555
D08	Xylitol	C00379	A07	L-Alanine	C00041
D09	N-Acetyl-D-Glucosaminitol		A08	L-Arginine	C00062
D10	γ-Amino-Butyric Acid	C00334	A09	L-Asparagine	C00152
D11	d-Amino-Valeric Acid	C00431	A10	L-Aspartic Acid	C00049
D12	Butyric Acid	C00246	A11	L-Cysteine	C00097
E01	Capric Acid	C01571	A12	L-Glutamic Acid	C00025
E02	Caproic Acid	C01585	B01	L-Glutamine	C00064
E03	Citraconic Acid	C02226	B02	Glycine	C00037
E04	D,L-Citramalic Acid	C00815	B03	L-Histidine	C00135
E05	D-Glucosamine	C00329	B04	L-Isoleucine	C00407
E06	2-Hydroxy-Benzoic Acid	C00805	B05	L-Leucine	C00123
E07	4-Hydroxy-Benzoic Acid	C00156	B06	L-Lysine	C00047
E08	β-Hydroxy-Butyric Acid	C01089	B07	L-Methionine	C00073
E09	γ-Hydroxy-Butyric Acid	C00989	B08	L-Phenylalanine	C00079
E10	α-Keto-Valeric Acid	C00567	B09	L-Proline	C00148
E11	Itaconic Acid	C00490	B10	L-Serine	C00065
E12	5-Keto-D-Gluconic Acid	C01062	B11	L-Threonine	C00188
F01	D-Lactic Acid Methyl Ester		B12	L-Tryptophan	C00078
F02	Malonic Acid	C00383	C01	L-Tyrosine	C00082
F03	Melibionic Acid		C02	L-Valine	C00183
F04	Oxalic Acid	C00209	C03	D-Alanine	C00133
F05	Oxalomalic Acid	C01990	C04	D-Asparagine	C01905
F06	Quinic Acid	C00296	C05	D-Aspartic Acid	C00402
F07	D-Ribono-1,4-Lactone		C06	D-Glutamic Acid	C00217
F08	Sebacic Acid	C08277	C07	D-Lysine	C00739
F09	Sorbic Acid		C08	D-Serine	C00740
F10	Succinamic Acid		C09	D-Valine	C06417
F11	D-Tartaric Acid	C02107	C10	L-Citrulline	C00327
F12	L-Tartaric Acid	C00898	C11	L-Homoserine	C00263
G01	Acetamide	C06244	C12	L-Ornithine	C00077
G02	L-Alaninamide		D01	N-Acetyl-D,L-Glutamic Acid	C00624
G03	N-Acetyl-L-Glutamic Acid	C00624	D02	N-Phthaloyl-L-Glutamic Acid	
G04	L-Arginine	C00062	D03	L-Pyroglutamic Acid	C02238
G05	Glycine	C00037	D04	Hydroxylamine	C00192
G06	L-Histidine	C00135	D05	Methylamine	C00218
G07	L-Homoserine	C00263	D06	N-Amylamine	
G08	4-Hydroxy-L-Proline (trans)	C01015	D07	N-Butylamine	
G09	L-Isoleucine	C00407	D08	Ethylamine	C00797

Table M4-3. 続き

Well	Compound	KEGG ID	Well	Compound	KEGG ID
PM3B (N-source)			A07	Hypophosphite	
D09	Ethanolamine	C00189	A08	Adenosine 2'-Monophosphate	C00946
D10	Ethylenediamine		A09	Adenosine 3'-Monophosphate	C01367
D11	Putrescine	C00134	A10	Adenosine 5'-Monophosphate	C00020
D12	Agmatine	C00179	A11	Adenosine 2',3'-Cyclic Monophosphate	
E01	Histamine	C00388	A12	Adenosine 3',5'-Cyclic Monophosphate	
E02	$\beta$ -Phenylethylamine	C05332	B01	Thiophosphate	
E03	Tyramine	C00483	B02	Dithiophosphate	
E04	Acetamide	C06244	B03	D,L- $\alpha$ -Glycerol Phosphate	C00093
E05	Formamide	C00488	B04	$\beta$ -Glycerol Phosphate	C00093
E06	Glucuronamide		B05	Carbamyl Phosphate	C00169
E07	D,L-Lactamide		B06	D-2-Phospho-Glyceric Acid	C00631
E08	D-Glucosamine	C00329	B07	D-3-Phospho-Glyceric Acid	C00197
E09	D-Galactosamine	C02262	B08	Guanosine 2'-Monophosphate	
E10	D-Mannosamine	C03570	B09	Guanosine 3'-Monophosphate	C06193
E11	N-Acetyl-D-Glucosamine	C03000	B10	Guanosine 5'-Monophosphate	C00144
E12	N-Acetyl-D-Galactosamine	C01074	B11	Guanosine 2',3'-Cyclic Monophosphate	
F01	N-Acetyl-D-Mannosamine	C00645	B12	Guanosine 3',5'-Cyclic Monophosphate	C00942
F02	Adenine	C00147	C01	Phosphoenol Pyruvate	C00074
F03	Adenosine	C00212	C02	Phospho-Glycolic Acid	C00988
F04	Cytidine	C00475	C03	D-Glucose-1-Phosphate	C00103
F05	Cytosine	C00380	C04	D-Glucose-6-Phosphate	C00092
F06	Guanine	C00242	C05	2-Deoxy-D-Glucose 6-Phosphate	C06369
F07	Guanosine	C00387	C06	D-Glucosamine-6-Phosphate	C00352
F08	Thymine	C00178	C07	6-Phospho-Gluconic Acid	
F09	Thymidine	C00214	C08	Cytidine 2'-Monophosphate	C03104
F10	Uracil	C00106	C09	Cytidine 3'-Monophosphate	C05822
F11	Uridine	C00299	C10	Cytidine 5'-Monophosphate	C00055
F12	Inosine	C00294	C11	Cytidine 2',3'-Cyclic Monophosphate	
G01	Xanthine	C00385	C12	Cytidine 3',5'-Cyclic Monophosphate	C00941
G02	Xanthosine	C01762	D01	D-Mannose-1-Phosphate	C00636
G03	Uric Acid	C00366	D02	D-Mannose-6-Phosphate	C00275
G04	Alloxan	C07599	D03	Cysteamine-S-Phosphate	
G05	Allantoin	C01551	D04	Phospho-L-Arginine	C05945
G06	Parabanic Acid		D05	O-Phospho-D-Serine	
G07	D,L- $\alpha$ -Amino-N-Butyric Acid	C02261	D06	O-Phospho-L-Serine	
G08	$\gamma$ -Amino-N-Butyric Acid	C00334	D07	O-Phospho-L-Threonine	
G09	$\epsilon$ -Amino-N-Caproic Acid	C02378	D08	Uridine 2'-Monophosphate	C03031
G10	D,L- $\alpha$ -Amino-Caprylic Acid		D09	Uridine 3'-Monophosphate	C01368
G11	d-Amino-N-Valeric Acid	C00431	D10	Uridine 5'-Monophosphate	C00105
G12	$\alpha$ -Amino-N-Valeric Acid	C01826	D11	Uridine 2',3'-Cyclic Monophosphate	C02355
H01	Ala-Asp	C02871	D12	Uridine 3',5'-Cyclic Monophosphate	
H02	Ala-Gln		E01	O-Phospho-D-Tyrosine	C06501
H03	Ala-Glu		E02	O-Phospho-L-Tyrosine	C06501
H04	Ala-Gly		E03	Phosphocreatine	C02305
H05	Ala-His		E04	Phosphoryl Choline	C00588
H06	Ala-Leu	C05035	E05	O-Phosphoryl-Ethanolamine	
H07	Ala-Thr		E06	Phosphono Acetic Acid	C05682
H08	Gly-Asn		E07	2-Aminoethyl Phosphonic Acid	C03557
H09	Gly-Gln		E08	Methylene Diphosphonic Acid	
H10	Gly-Glu		E09	Thymidine 3'-Monophosphate	
H11	Gly-Met		E10	Thymidine 5'-Monophosphate	C00364
H12	Met-Ala		E11	Inositol Hexaphosphate	C01204
PM4A (P-source)			E12	Thymidine 3',5'-Cyclic Monophosphate	
A01	Negative Control		PM4A (S-source)		
A02	Phosphate	C00009	F01	Negative Control	
A03	Pyrophosphate	C00013	F02	Sulfate	C00059
A04	Trimetaphosphate	C02466	F03	Thiosulfate	C00320
A05	Tripolyphosphate	C00536	F04	Tetrathionate	C02084
A06	Triethyl Phosphate		F05	Thiophosphate	

Table M4-3. 続き

Well	Compound	KEGG ID	Well	Compound	KEGG ID
PM4A (S-source)			C04	NaCl 6% + $\beta$ -Glutamic acid	
F06	Dithiophosphate		C05	NaCl 6% + $\gamma$ -Amino-n-butyric acid	
F07	L-Cysteine	C00097	C06	NaCl 6% + Glutathione	
F08	D-Cysteine	C00793	C07	NaCl 6% + Glycerol	
F09	L-Cysteinyl-Glycine		C08	NaCl 6% + Trehalose	
F10	L-Cysteic Acid	C00506	C09	NaCl 6% + Trimethylamine-N-oxide	
F11	Cysteamine	C01678	C10	NaCl 6% + Trimethylamine	
F12	L-Cysteine Sulfinic Acid	C00606	C11	NaCl 6% + Octopine	
G01	N-Acetyl-L-Cysteine	C06809	C12	NaCl 6% + Trigonelline	
G02	S-Methyl-L-Cysteine	C03540	D01	Potassium chloride 3%	
G03	Cystathionine	C00542	D02	Potassium chloride 4%	
G04	Lanthionine		D03	Potassium chloride 5%	
G05	Glutathione	C00051	D04	Potassium chloride 6%	
G06	D,L-Ethionine	C11227	D05	Sodium sulfate 2%	
G07	L-Methionine	C00073	D06	Sodium sulfate 3%	
G08	D-Methionine	C00855	D07	Sodium sulfate 4%	
G09	Glycyl-L-Methionine		D08	Sodium sulfate 5%	
G10	N-Acetyl-D,L-Methionine	C02712	D09	Ethylene glycol 5%	
G11	L-Methionine Sulfoxide	C02989	D10	Ethylene glycol 10%	
G12	L-Methionine Sulfone		D11	Ethylene glycol 15%	
H01	L-Djenkolic Acid	C08275	D12	Ethylene glycol 20%	
H02	Thiourea		E01	Sodium formate 1%	
H03	1-Thio- $\beta$ -D-Glucose		E02	Sodium formate 2%	
H04	D,L-Lipoamide	C00248	E03	Sodium formate 3%	
H05	Taurocholic Acid	C05122	E04	Sodium formate 4%	
H06	Taurine	C00245	E05	Sodium formate 5%	
H07	Hypotaurine	C00519	E06	Sodium formate 6%	
H08	p-Amino Benzene Sulfonic Acid	C06335	E07	Urea 2%	
H09	Butane Sulfonic Acid		E08	Urea 3%	
H10	2-Hydroxyethane Sulfonic Acid	C05123	E09	Urea 4%	
H11	Methane Sulfonic Acid	C11145	E10	Urea 5%	
H12	Tetramethylene Sulfone		E11	Urea 6%	
PM9 (Osmolyte)			E12	Urea 7%	
A01	NaCl 1%		F01	Sodium Lactate 1%	
A02	NaCl 2%		F02	Sodium Lactate 2%	
A03	NaCl 3%		F03	Sodium Lactate 3%	
A04	NaCl 4%		F04	Sodium Lactate 4%	
A05	NaCl 5%		F05	Sodium Lactate 5%	
A06	NaCl 5.5%		F06	Sodium Lactate 6%	
A07	NaCl 6%		F07	Sodium Lactate 7%	
A08	NaCl 6.5%		F08	Sodium Lactate 8%	
A09	NaCl 7%		F09	Sodium Lactate 9%	
A10	NaCl 8%		F10	Sodium Lactate 10%	
A11	NaCl 9%		F11	Sodium Lactate 11%	
A12	NaCl 10%		F12	Sodium Lactate 12%	
B01	NaCl 6%		G01	Sodium Phosphate pH 7 20 mM	
B02	NaCl 6% + Betaine		G02	Sodium Phosphate pH 7 50 mM	
B03	NaCl 6% + N-N Dimethyl glycine		G03	Sodium Phosphate pH 7 100 mM	
B04	NaCl 6% + Sarcosine		G04	Sodium Phosphate pH 7 200 mM	
B05	NaCl 6% + Dimethyl sulphonyl propionate		G05	Sodium Benzoate pH 5.2 20 mM	
B06	NaCl 6% + MOPS		G06	Sodium Benzoate pH 5.2 50 mM	
B07	NaCl 6% + Ectoine		G07	Sodium Benzoate pH 5.2 100 mM	
B08	NaCl 6% + Choline		G08	Sodium Benzoate pH 5.2 200 mM	
B09	NaCl 6% + Phosphoryl choline		G09	Ammonium sulfate pH 8 10 mM	
B10	NaCl 6% + Creatine		G10	Ammonium sulfate pH 8 20 mM	
B11	NaCl 6% + Creatinine		G11	Ammonium sulfate pH 8 50 mM	
B12	NaCl 6% + L-Carnitine		G12	Ammonium sulfate pH 8 100 mM	
C01	NaCl 6% + KCl		H01	Sodium Nitrate 10 mM	
C02	NaCl 6% + L-proline		H02	Sodium Nitrate 20 mM	
C03	NaCl 6% + N-Acethyl L-glutamine		H03	Sodium Nitrate 40 mM	

Table M4-3. 続き

Well	Compound	KEGG ID	Well	Compound	KEGG ID
PM9 (Osmolyte)			D08	pH 4.5 + 5-Hydroxylysine	
H04	Sodium Nitrate 60 mM		D09	pH 4.5 + 5-Hydroxytryptophan	
H05	Sodium Nitrate 80 mM		D10	pH 4.5 + D,L-Diamino pimelic acid	
H06	Sodium Nitrate 100 mM		D11	pH 4.5 + Trimethylamine-N-oxide	
H07	Sodium Nitrite 10 mM		D12	pH 4.5 + Urea	
H08	Sodium Nitrite 20 mM		E01	pH 9.5	
H09	Sodium Nitrite 40 mM		E02	pH 9.5 + L-Alanine	
H10	Sodium Nitrite 60 mM		E03	pH 9.5 + L-Arginine	
H11	Sodium Nitrite 80 mM		E04	pH 9.5 + L-Asparagine	
H12	Sodium Nitrite 100 mM		E05	pH 9.5 + L-Aspartic Acid	
PM10 (pH)			E06	pH 9.5 + L-Glutamic Acid	
A01	pH 3.5		E07	pH 9.5 + L-Glutamine	
A02	pH 4		E08	pH 9.5 + Glycine	
A03	pH 4.5		E09	pH 9.5 + L-Histidine	
A04	pH 5		E10	pH 9.5 + L-Isoleucine	
A05	pH 5.5		E11	pH 9.5 + L-Leucine	
A06	pH 6		E12	pH 9.5 + L-Lysine	
A07	pH 7		F01	pH 9.5 + L-Methionine	
A08	pH 8		F02	pH 9.5 + L-Phenylalanine	
A09	pH 8.5		F03	pH 9.5 + L-Proline	
A10	pH 9		F04	pH 9.5 + L-Serine	
A11	pH 9.5		F05	pH 9.5 + L-Threonine	
A12	pH 10		F06	pH 9.5 + L-Tryptophan	
B01	pH 4.5		F07	pH 9.5 + L-Tyrosine	
B02	pH 4.5 + L-Alanine		F08	pH 9.5 + L-Valine	
B03	pH 4.5 + L-Arginine		F09	pH 9.5 + Hydroxy-L-Proline	
B04	pH 4.5 + L-Asparagine		F10	pH 9.5 + L-Ornithine	
B05	pH 4.5 + L-Aspartic Acid		F11	pH 9.5 + L-Homoarginine	
B06	pH 4.5 + L-Glutamic Acid		F12	pH 9.5 + L-Homoserine	
B07	pH 4.5 + L-Glutamine		G01	pH 9.5 + Anthranilic acid	
B08	pH 4.5 + Glycine		G02	pH 9.5 + L-Norleucine	
B09	pH 4.5 + L-Histidine		G03	pH 9.5 + L-Norvaline	
B10	pH 4.5 + L-Isoleucine		G04	pH 9.5 + Agmatine	
B11	pH 4.5 + L-Leucine		G05	pH 9.5 + Cadaverine	
B12	pH 4.5 + L-Lysine		G06	pH 9.5 + Putrescine	
C01	pH 4.5 + L-Methionine		G07	pH 9.5 + Histamine	
C02	pH 4.5 + L-Phenylalanine		G08	pH 9.5 + Phenylethylamine	
C03	pH 4.5 + L-Proline		G09	pH 9.5 + Tyramine	
C04	pH 4.5 + L-Serine		G10	pH 9.5 + Creatine	
C05	pH 4.5 + L-Threonine		G11	pH 9.5 + Trimethylamine-N-oxide	
C06	pH 4.5 + L-Tryptophan		G12	pH 9.5 + Urea	
C07	pH 4.5 + L-Tyrosine		H01	X-Caprylate	
C08	pH 4.5 + L-Valine		H02	X- $\alpha$ -D-Glucoside	
C09	pH 4.5 + Hydroxy-L-Proline		H03	X- $\beta$ -D-Glucoside	
C10	pH 4.5 + L-Ornithine		H04	X- $\alpha$ -D-Galactoside	
C11	pH 4.5 + L-Homoarginine		H05	X- $\beta$ -D-Galactoside	
C12	pH 4.5 + L-Homoserine		H06	X- $\alpha$ -D-Glucuronide	
D01	pH 4.5 + Anthranilic acid		H07	X- $\beta$ -D-Glucuronide	
D02	pH 4.5 + L-Norleucine		H08	X- $\beta$ -D-Glucosaminide	
D03	pH 4.5 + L-Norvaline		H09	X- $\beta$ -D-Galactosaminide	
D04	pH 4.5 + $\alpha$ -Amino-Nbutyric acid		H10	X- $\alpha$ -D-Mannoside	
D05	pH 4.5 + p-Aminobenzoate		H11	X-PO <sub>4</sub>	
D06	pH 4.5 + L-Cysteic acid		H12	X-SO <sub>4</sub>	
D07	pH 4.5 + D-Lysine				

Phenotype MicroArrayの各plateについて、各wellで評価する表現型の一覧を示す。  
PM1～4A plateで評価する各基質のうちKEGGに登録されているものはIDを併記した。

#### 4-2-10. 高密度タイリングアレイによる RNA マッピング

核様体タンパク質の機能を遺伝子の転写レベルで網羅的に調べるため、KT2440(pCAR1)株、単独破壊株、二重破壊株をそれぞれ高密度タイリングアレイを用いた RNA マッピング解析に供し、トランスクリプトーム比較を行った。

##### <用いた DNA チップ>

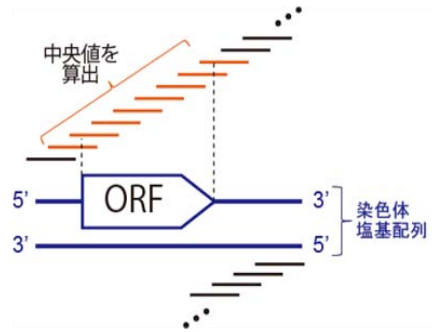
Affymetrix 社のカスタムタイリングアレイを、*P. putida* KT2440 株の染色体 DNA 配列と pCAR1 の DNA 配列を基に同社の CustomExpress Array Program によってそれぞれ設計し用いた。KT2440 株染色体のタイリングアレイについては、染色体 DNA の両鎖について 25 mer の DNA プローブが 1,110,578 本、11 塩基密度で敷き詰められている。pCAR1 のタイリングアレイについては、pCAR1 の DNA の両鎖について 25 mer の DNA プローブが 43,750 本、9 塩基密度で敷き詰められている。各プローブは perfect match (PM) と miss match (MM) で 1 組となっており、PM と MM のシグナルに有意に差が認められるとき“cDNA がハイブリしている”として検出する。

##### <サンプルの調製>

各株を 100 ml の LB 培地で 30°C、14 h 振とう培養した後、100 ml の SUC 培地に初期 OD<sub>600</sub> が 0.05 となるように植菌し、30°C で振とう培養した。4 h 後に OD<sub>600</sub> が 0.15 から 0.25 の間の対数増殖期中期に達した時点で集菌した菌体よりサンプルを調製した。各サンプルとも独立した 2 つのフラスコで培養した 2 連のサンプルを用意した。cDNA 合成・ラベリング・断片化およびハイブリダイゼーション・検出は Affymetrix 社の推奨条件に準じて行った。なお、cDNA 合成の際には、DNA の複製や転写を阻害する抗生物質 actinomycin D (以下 ActD) を逆転写反応液に加えることでアンチセンス側の非特異的なシグナルを抑制することができるという知見 [Perocchi et al., 2007]に基づき、逆転写反応液に終濃度 6 µg/ml の ActD を添加して逆転写反応を行った。

##### <検出後のデータ処理>

Affymetrix 社の Tiling Analysis Software Ver1.1.02 を用いて行い、1 連分のデータは前後 2 本のプローブと合わせた 3 本のプローブの中央値をそのプローブのシグナル値とした (ソフトウェアの設定で Bandwidth = 30 とした)。シグナル値が 1 のプローブ (1 はシグナル値の最小値でハイブリが認められないことを示す)を除いた全プローブの中央値が 100 となるように標準化した。また、データベースに登録されている最新のアノテーション情報を用い、各 ORF 内領域に敷き詰められているセンス側プローブのシグナル値の中央値を計算し、その ORF の転写量の代表値とした (Fig. M4-4)。



**Figure M4-4. 各 ORF の中央値の算出**

<2 倍以上転写変動した遺伝子の抽出>

2 株間で 2 倍以上転写変動した遺伝子を抽出する方法を以下に示す。株 A (2 連のサンプルをそれぞれ A1、A2 とする) と株 B (2 連のサンプルをそれぞれ B1、B2 とする) で比較を行う際には、まず A1 と B1 のデータセットに対して KT2440 株染色体上 5,398 個の ORF の転写量について fold change の値を算出する。求めた 5,398 個の fold change の値でヒストグラムを描き、ヒストグラムのピークを fold change の“基準値”とする。基準値よりも 2 倍以上高い fold change を示したものを“転写量が増加した”遺伝子、2 分の 1 以下の fold change を示したものを“転写量が減少した”遺伝子とする。これを 4 組のデータセット全てで行い、全ての組み合わせで転写量が増加した遺伝子、および転写量が減少した遺伝子を転写変動した遺伝子として抽出した。pCAR1 上の 192 個の ORF に対しても同様の抽出を行った。なお、シグナル値が 64 未満のものは 2 連間の再現性が低かったため“転写されていない”とみなした。

## 4-3. 結果

### 4-3-1. 単独破壊株の作製

Pmr、Pnd、および Phu の機能を明らかにするため、まず各タンパク質をコードする遺伝子 *pmr*、*pnd*、*phu* をそれぞれ除去した単独破壊株 KT2440(pCAR1Δ*pmr*)株、KT2440(pCAR1Δ*pnd*)株、KT2440(pCAR1Δ*phu*)株を作製した。2 回の相同性組換えの結果、Gm 耐性、Km 感受性、および sucrose 非感受性を示した株から total DNA を抽出した。Gm-F プライマーと Gm-R プライマーを用いた PCR により Gm cassette の存在を確認すると共に、*pmr\_del\_up\_F* プライマーと *pmr\_del\_down\_R* プライマー、*pnd\_del\_up\_F* プライマーと *pnd\_del\_down\_R* プライマー、*phu\_del\_up\_F* プライマーと *phu\_del\_down\_R* プライマーを用いた PCR により *pmr*、*pnd* および *phu* 遺伝子領域への Gm cassette の挿入を確認した (Fig. 4-1A)。また、Gm cassette が目的の位置に一つのみ挿入されていることを Gm プローブを用いたサザンブロットィングにより確認した (Fig. 4-1B)。これらの株に pFLP2Km を導入した後、Gm と Km の両方に感受性を示した株から total DNA を抽出し、同じプライマーセットを用いて PCR を行うことで Gm cassette の除去を確認した (Fig. 4-2)。

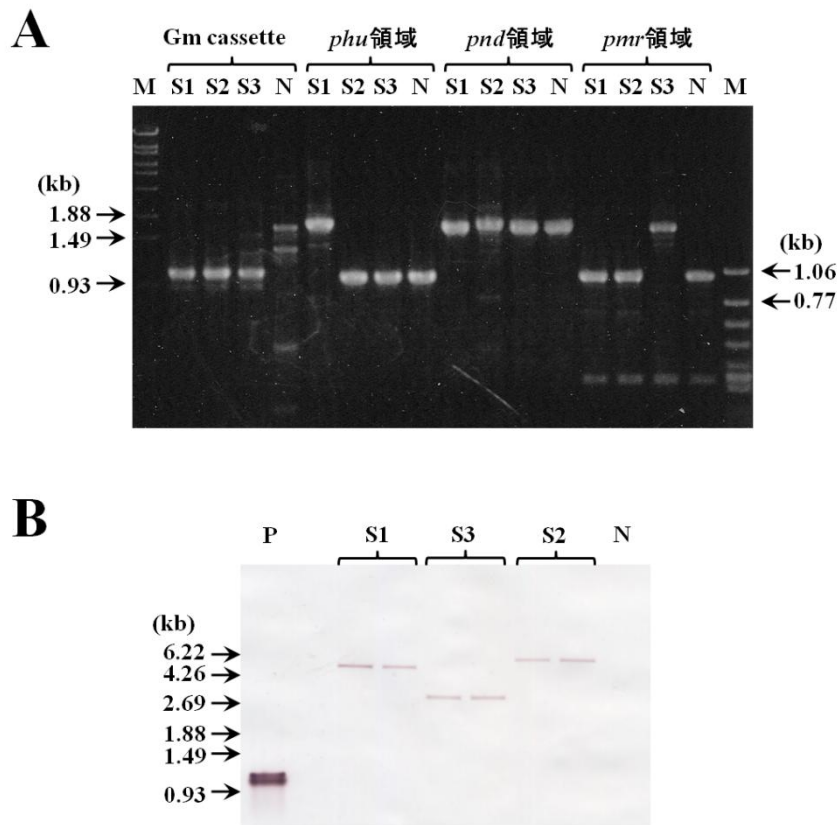
### 4-3-2. 単独破壊株と野生株の生育比較

まず初めに、得られた単独破壊株の生育を野生株である KT2440(pCAR1)株と比較した。各株を終濃度 0.1% (w/v) の succinate を炭素源とする NMM4 培地 (SUC 培地) で培養し、生育曲線を作成した (Fig. 4-3)。いずれの株も培養開始後 2~3 h で対数増殖期に、6 h で定常期に達し、生育に大きな差は認められなかった。

### 4-3-3. 単独破壊株と野生株の運動性比較

大腸菌においてプラスミドを保持することで運動性が低下するという報告がある [Yang et al., 2008]。また *Pseudomonas* 属細菌において H-NS 様因子である MvaT ホモログを過剰発現させると運動性が低下するという研究例がある [Tendeng et al., 2003]。以上の知見から、MvaT ホモログである Pmr をコードする pCAR1 を保持することで宿主の運動性が低下するかどうかに興味を持たれた。*P. putida* KT2440 株は通常の培養温度である 30°C では swarming しないが、18°C~28°C の PG agar plate 上では swarming するという報告がある [Matilla et al., 2007]。そこで KT2440 株および KT2440(pCAR1)株をそれぞれ LB plate、1/3 LB plate、SUC plate、および PG agar plate 上で 30°C あるいは 25°C、72 h 培養し、運動性を比較したところ、LB plate (0.3% および 0.5% agar)、1/3 LB plate (0.3% agar)、PG agar plate (0.3% agar) 上で KT2440(pCAR1)株は KT2440 株よりも運動性が低下することが明らかとなった (Fig. 4-4~6)。

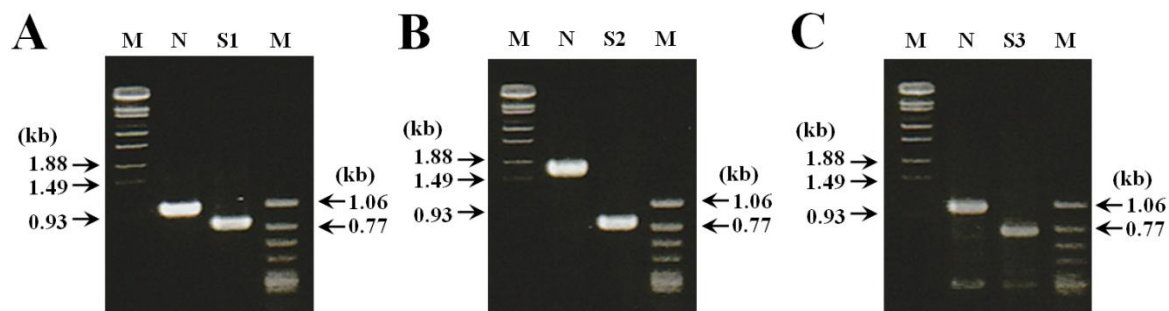
pCAR1 保持に伴うこれら運動性の低下が pCAR1 上にコードされる核様体タンパク質の機能に由来するものなのかどうかを明らかにするため、作製した単独破壊株の運動性を KT2440(pCAR1)株と比較した (Fig. 4-7)。その結果、いずれの株も運動性に大きな差は認められなかった。



**Figure 4-1. PCR およびサザンブロッティングによる *phu*、*pnd*、*pmr* 領域への Gm cassette 挿入の確認**

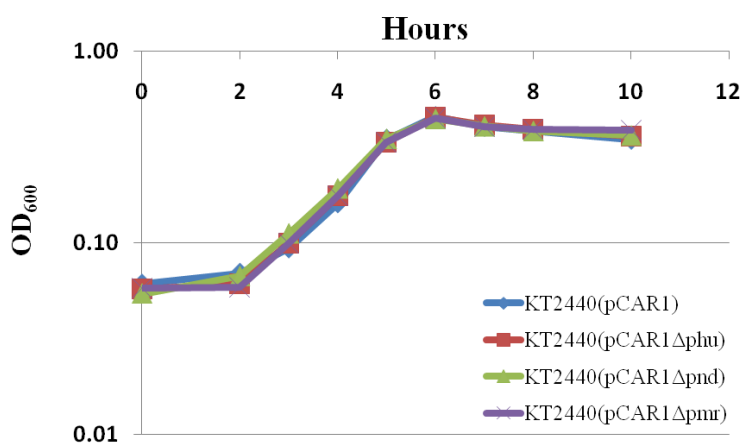
M は marker、P は 1,053 bp の Gm cassette 全長断片、N は KT2440(pCAR1)株、S1 は KT2440(pCAR1Δ*phu*::Gm<sup>r</sup>) 株、S2 は KT2440(pCAR1Δ*pnd*::Gm<sup>r</sup>) 株、S3 は KT2440(pCAR1Δ*pmr*::Gm<sup>r</sup>)株の total DNA を表す。(A) PCR による Gm cassette 挿入の確認。Gm cassette は 1,053 bp の断片が増幅される。また *phu*、*pnd* および *pmr* 遺伝子領域は野生株ではそれぞれ 1,005、1,720、1,014 bp の断片が増幅されるが、Gm cassette が挿入されると 1,782、1,771、1,707 bp の断片が増幅される。(B) サザンブロッティングによる Gm cassette 挿入の確認。*pmr*、*pnd* および *phu* 遺伝子領域に Gm cassette が挿入されると、total DNA を *Eco*RI と *Hind*III で double digest し Gm プローブを用いたサザンブロッティング解析に供することで、それぞれ 2,906、5,856、4,843 bp のバンドが検出される。各株の total DNA はそれぞれ 12μg ずつ使用した。





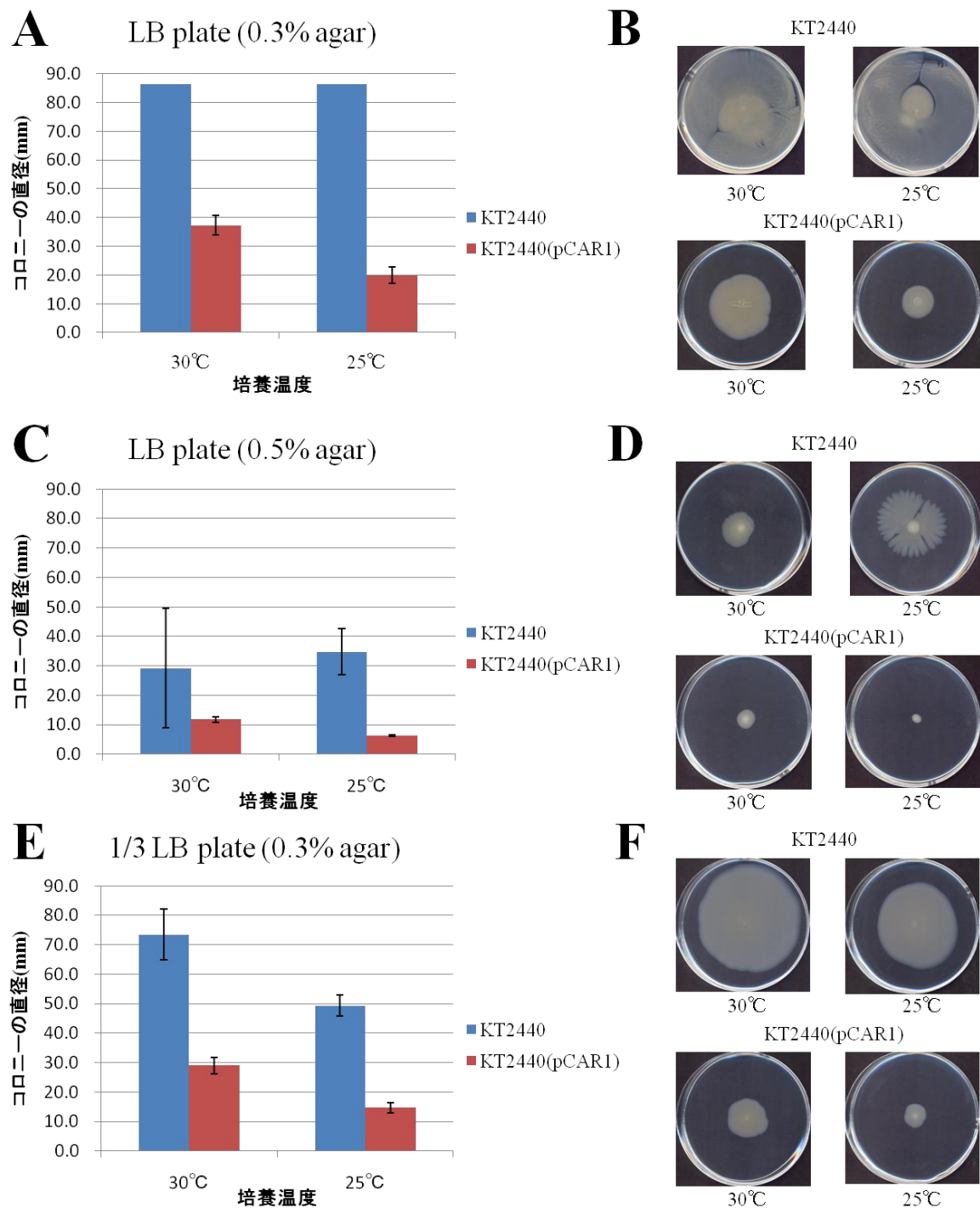
**Figure 4-2. PCR による *phn*、*pnd*、*pmr* の除去の確認**

M は marker、N は KT2440(pCAR1) 株、S1 は KT2440(pCAR1 $\Delta phn$ ) 株、S2 は KT2440(pCAR1 $\Delta pnd$ ) 株、S3 は KT2440(pCAR1 $\Delta pmr$ ) 株の total DNA を表す。(A) *phn* 除去の確認。野生株では 1,005 bp、 $\Delta phn$  株では 814 bp のバンドが検出される。(B) *pnd* 除去の確認。野生株では 1,720 bp、 $\Delta pnd$  株では 803 bp のバンドが検出される。(C) *pmr* 除去の確認。野生株では 1,014 bp、 $\Delta pmr$  株では 739 bp のバンドが検出される。



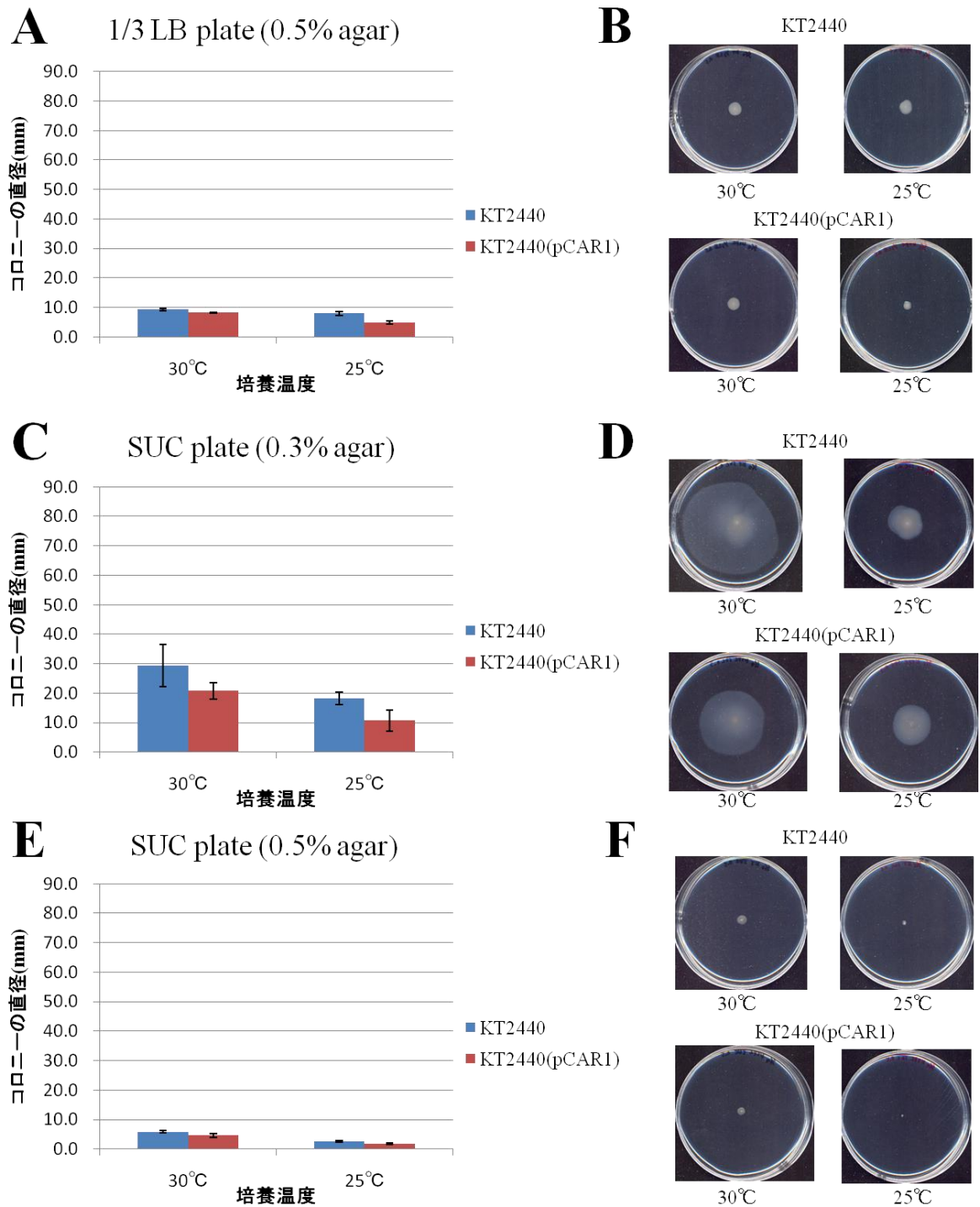
**Figure 4-3. SUC 培地における KT2440(pCAR1) 株と単独破壊株 3 株の生育曲線**

各株を SUC 培地で培養し、OD<sub>600</sub> を経時的に測定した。独立した 3 回の実験の平均値を示す。



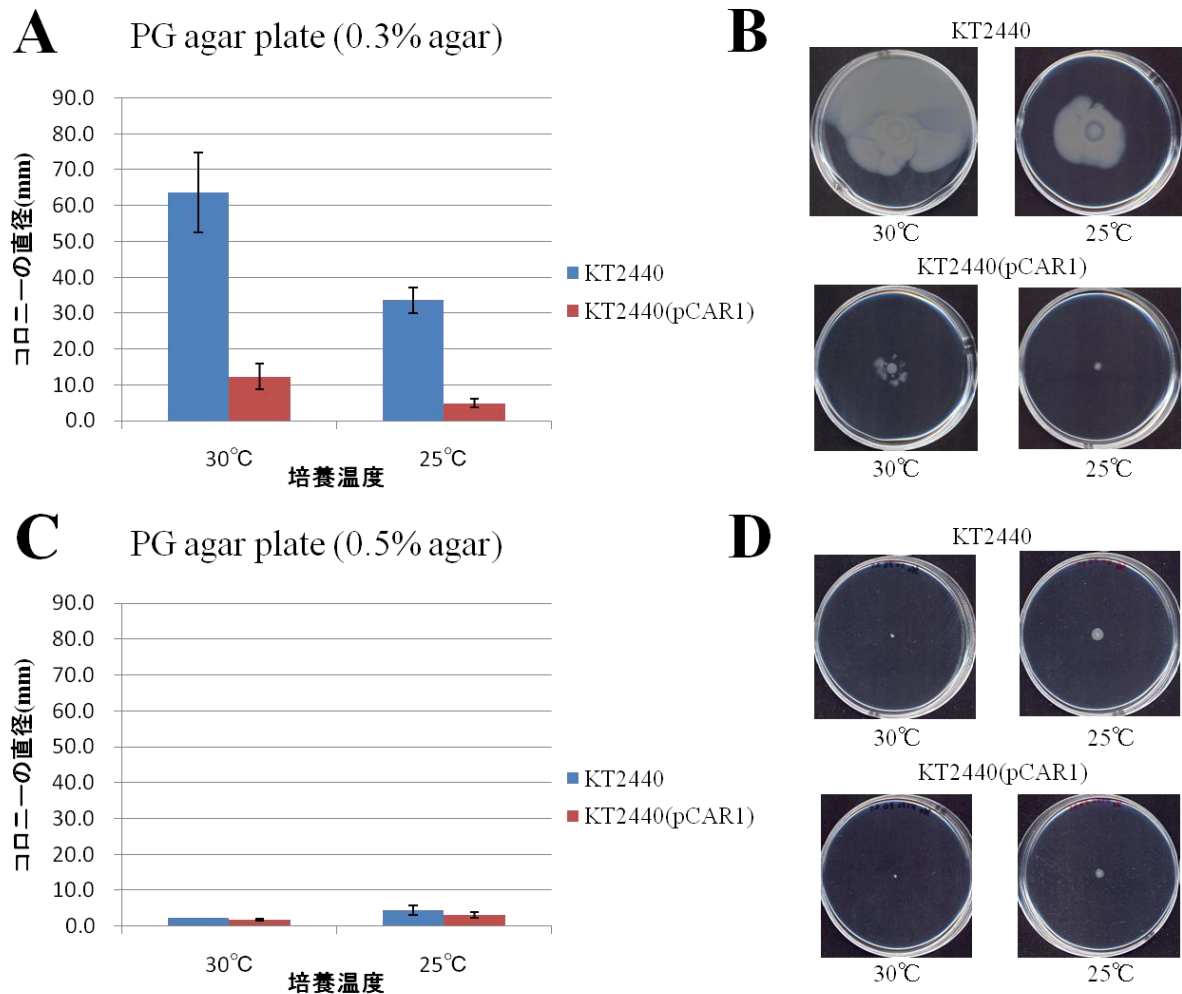
**Figure 4-4. KT2440 株および KT2440(pCAR1)株の運動性試験**

(A) LB plate (0.3% agar)上での運動性。(B) LB plate (0.3% agar)上で培養した各株のコロニーの一例。いずれの株も swimming 状の運動性を示した。(C) LB plate (0.5% agar)上での運動性。(D) LB plate (0.5% agar)上で培養した各株のコロニーの一例。KT2440 株は 25°C の培養条件下で swarming 状の運動性を示した。(E) 1/3 LB plate (0.3% agar)上での運動性。(F) 1/3 LB plate (0.3% agar)上で培養した各株のコロニーの一例。いずれの株も swimming 状の運動性を示した。



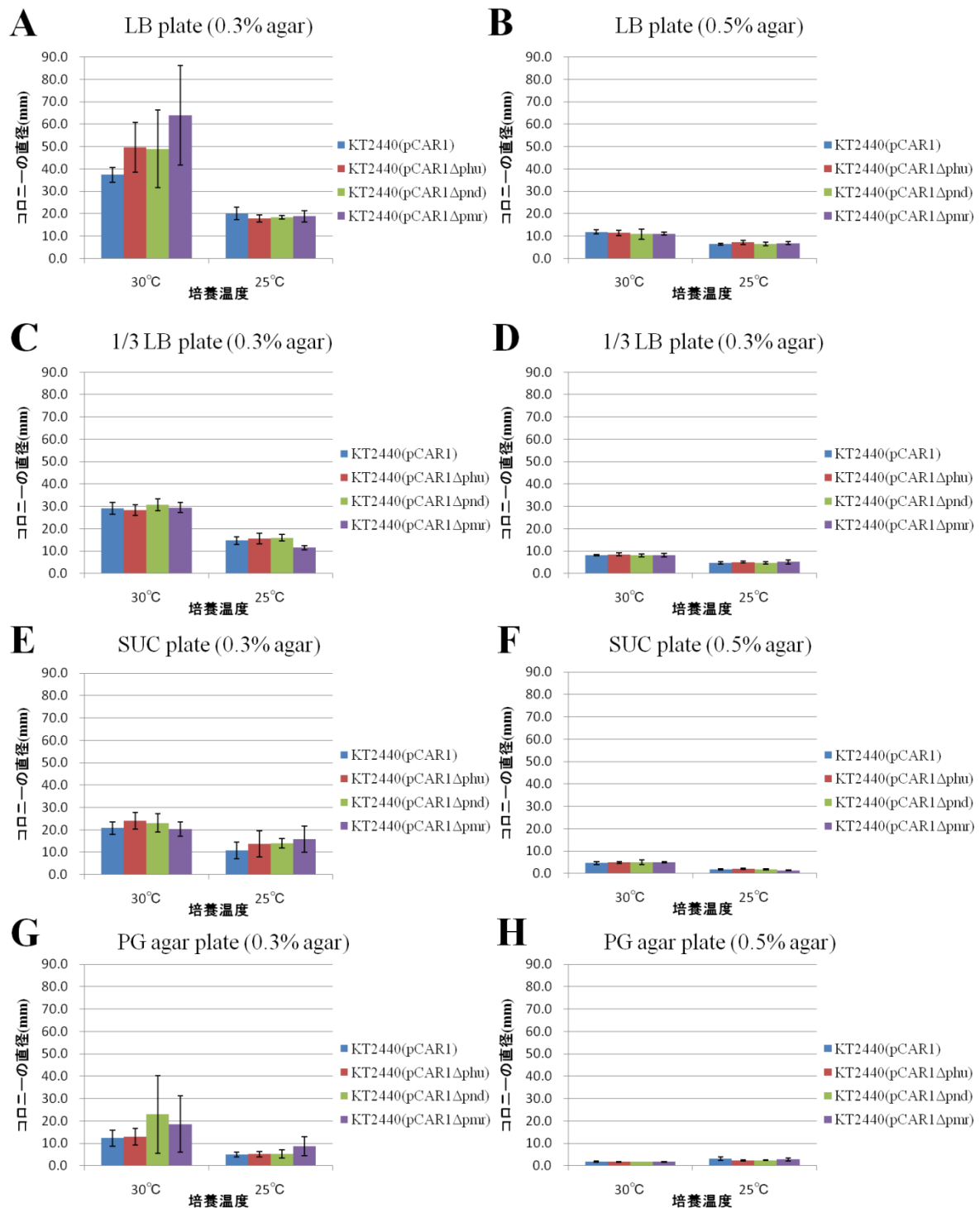
**Figure 4-5. KT2440 株および KT2440(pCAR1)株の運動性試験**

(A) 1/3 LB plate (0.5% agar)上での運動性。(B) 1/3 LB plate (0.5% agar)上で培養した各株のコロニーの一例。いずれの株も特に運動性を示さなかった。(C) SUC plate (0.3% agar)上での運動性。(D) SUC plate (0.3% agar)上で培養した各株のコロニーの一例。いずれの株も swimming 状の運動性を示した。(E) SUC plate (0.5% agar)上での運動性。(F) SUC plate (0.5% agar)上で培養した各株のコロニーの一例。いずれの株も特に運動性を示さなかった。



**Figure 4-6. KT2440 株および KT2440(pCAR1)株の運動性試験**

(A) PG agar plate (0.3% agar)上での運動性。(B) PG agar plate (0.3% agar)上で培養した各株のコロニーの一例。KT2440 株は swimming 状の運動性を示した。(C) PG agar plate (0.5% agar)上での運動性。(D) PG agar plate (0.5% agar)上で培養した各株のコロニーの一例。いずれの株も特に運動性を示さなかった。



**Figure 4-7. KT2440(pCAR1)株および単独破壊株の運動性試験**

(A) LB plate (0.3% agar) (B) LBplate (0.5% agar) (C) 1/3 LB plate (0.3% agar) (D) 1/3 LB plate (0.5% agar) (E) SUC plate (0.3% agar) (F) SUC plate (0.5% agar) (G) PG agar plate (0.3% agar) (H) PG agar plate (0.5% agar)上での運動性。

#### 4-3-4. 単独破壊株と野生株の pCAR1 保持率比較

本研究開始以前に、本研究とは異なる方法により *pmr* 破壊株が作製されており、その解析から *pmr* を破壊することにより pCAR1 上にコードされるプラスミドの分配に関する *parA*、*parB* の転写量が減少することが明らかになっていた [Yun and Suzuki et al., 2010]。このことから *pmr* 破壊株では SUC 液体培地での継代培養に伴って pCAR1 が脱落していく可能性が予想された。そこで本研究で作製した 3 種の単独破壊株においても pCAR1 が不安定化している可能性を考え、各株および KT2440(pCAR1)株を SUC 液体培地で継代培養し pCAR1 の保持率を比較した。4-2-7 の方法に従って継代培養を行い、継代 1 回目と 5 回目の各株をそれぞれ 100 コロニーずつ CAR plate にパッチすることで CAR 資化能の保持率を測定した。3 連の実験を行った結果、KT2440(pCAR1)株および 3 株の単独破壊株はいずれも CAR 資化能を安定に保持し、保持率に差は認められなかった (Fig. 4-8)。

#### 4-3-5. 二重破壊株の作製

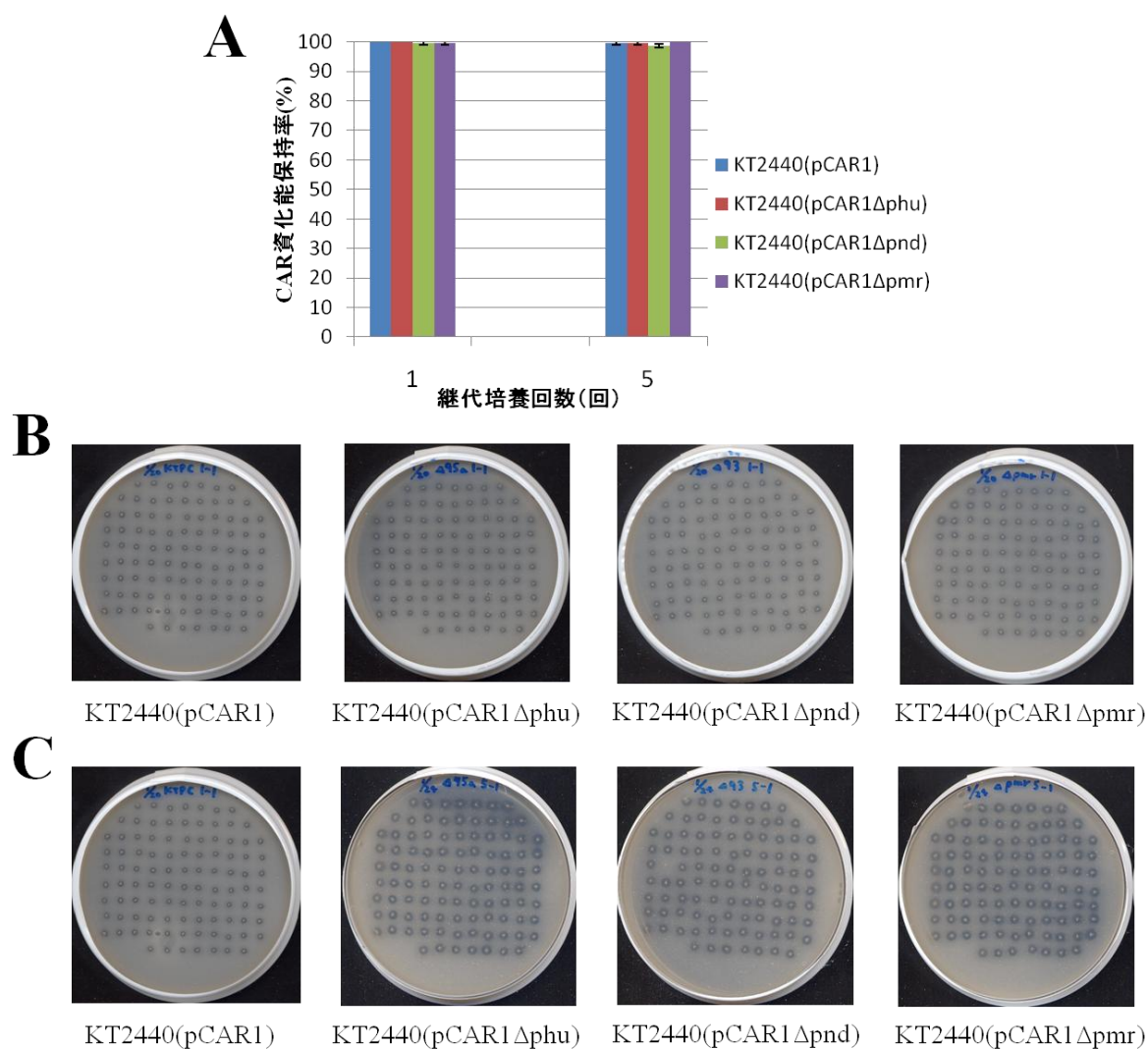
以上の実験からは単独破壊株と KT2440(pCAR1)株の表現型の差異は認められなかった。一方、核様体タンパク質は他の核様体タンパク質と協調的に作用しあいながら遺伝子の転写制御を行うことが知られており [Dillon and Dorman, 2010]、例えばある核様体タンパク質の欠失を他の核様体タンパク質が相補する例も報告されている [Deighan et al., 2003; Dillon et al., 2010]。そこで pCAR1 上にコードされる 3 種の核様体タンパク質も互いに協調的に作用し、互いの機能を相補している可能性が考えられた。その可能性を検討するため各核様体タンパク質遺伝子を 2 つずつ除去した二重破壊株 KT2440(pCAR1Δ*phu*Δ*pmr*)株、KT2440(pCAR1Δ*pmr*Δ*pnd*)株、および KT2440(pCAR1Δ*phu*Δ*pnd*)株を作製し、表現型に差が生じるかどうかを調べた。

2 回の相同性組換えの結果、Gm 耐性、Km 感受性、および sucrose 非感受性を示した株から total DNA を抽出した。pmr\_del\_up\_F プライマーと pmr\_del\_down\_R プライマー、pnd\_del\_up\_F プライマーと pnd\_del\_down\_R プライマー、phu\_del\_up\_F プライマーと phu\_del\_down\_R プライマーを用いた PCR により *pmr*、*pnd* および *phu* 遺伝子領域への Gm cassette の挿入を確認した (Fig. 4-9A)。これらの株に pFLP2Km を導入した後、Gm と Km の両方に感受性を示した株から total DNA を抽出し、同じプライマーセットを用いて PCR を行うことで Gm cassette の除去を確認した (Fig. 4-9B)。

#### 4-3-6. 二重破壊株と野生株の生育比較

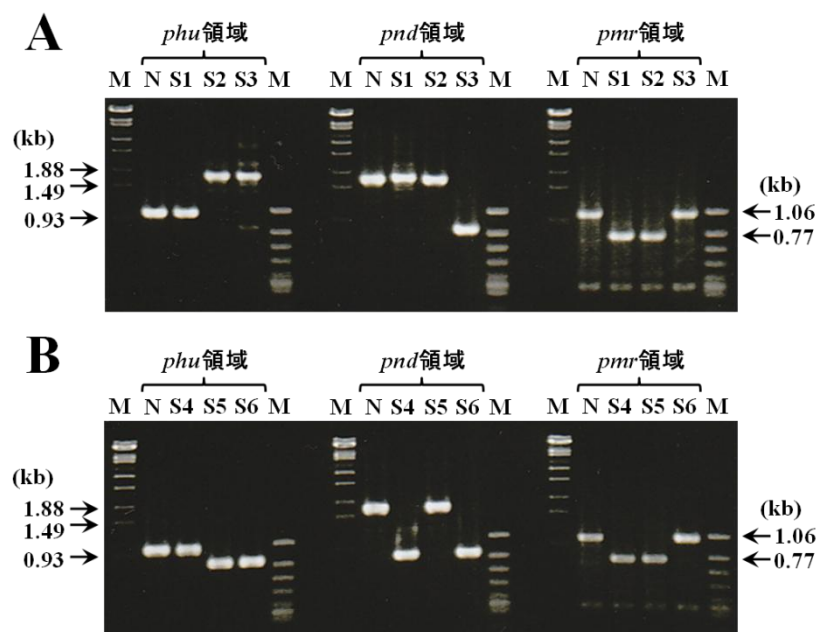
得られた二重破壊株の生育を野生株である KT2440(pCAR1)株と比較した。各株を SUC 培地で培養し、生育曲線を作成した (Fig. 4-10)。いずれの株も培養開始後 2~3 h で対数増殖期に、6 h で定常期に達し、生育に大きな差は認められなかった。





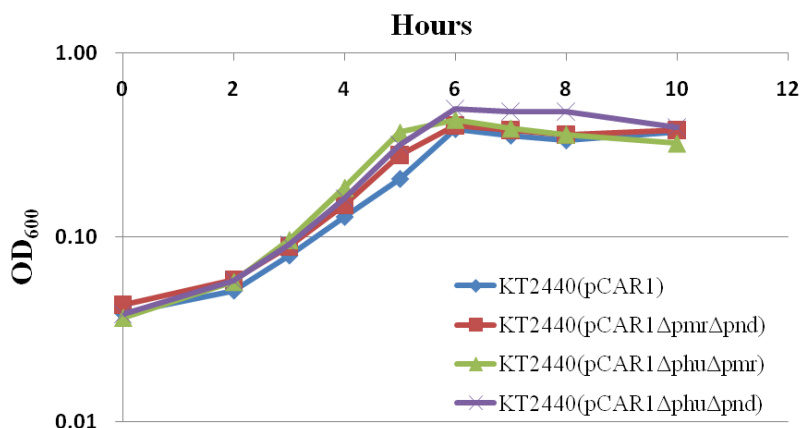
**Figure 4-8. KT2440(pCAR1)株および単独破壊株の SUC 液体培地での継代培養時の CAR 資化能保持率測定**

(A) 各株について 3 連の実験の平均値を示す。(B) 継代培養 1 回目の各株を 100 コロニーずつ CAR plate にパッチした様子を示す。CAR 資化能を有するコロニーは plate 上でクリアゾーンを形成する。(C) 継代培養 5 回目の各株を 100 コロニーずつ CAR plate にパッチした様子を示す。CAR 資化能を有するコロニーは plate 上でクリアゾーンを形成する。いずれの株も CAR 資化能を安定に保持していた。



**Figure 4-9. PCR による *phu*、*pnd*、*pmr* の除去の確認**

M は marker、N は KT2440(pCAR1)株の total DNA を表す。(A) PCR による Gm cassette 挿入二重破壊株の遺伝子確認。S1 は KT2440(pCAR1Δ*pmr*Δ*pnd*::Gm<sup>r</sup>)株、S2 は KT2440(pCAR1Δ*pmr*Δ*phu*::Gm<sup>r</sup>)株、S3 は KT2440(pCAR1Δ*pnd*Δ*phu*::Gm<sup>r</sup>)株の total DNA を表す。*phu*、*pnd* および *pmr* 遺伝子領域は野生株ではそれぞれ 1,005、1,720、1,014 bp の断片が増幅されるが、Gm cassette が挿入されると 1,782、1,771、1,707 bp の断片が増幅される。(B) Gm cassette 除去後の二重破壊株の PCR による遺伝子確認。S4 は KT2440(pCAR1Δ*pmr*Δ*pnd*)株、S5 は KT2440(pCAR1Δ*phu*Δ*pmr*)株、S6 は KT2440(pCAR1Δ*phu*Δ*pnd*)株の total DNA を表す。*phu*、*pnd* および *pmr* 遺伝子領域は野生株ではそれぞれ 1,005、1,720、1,014 bp の断片が増幅されるが、Gm cassette の除去後には 814、803、739 bp の断片が増幅される。



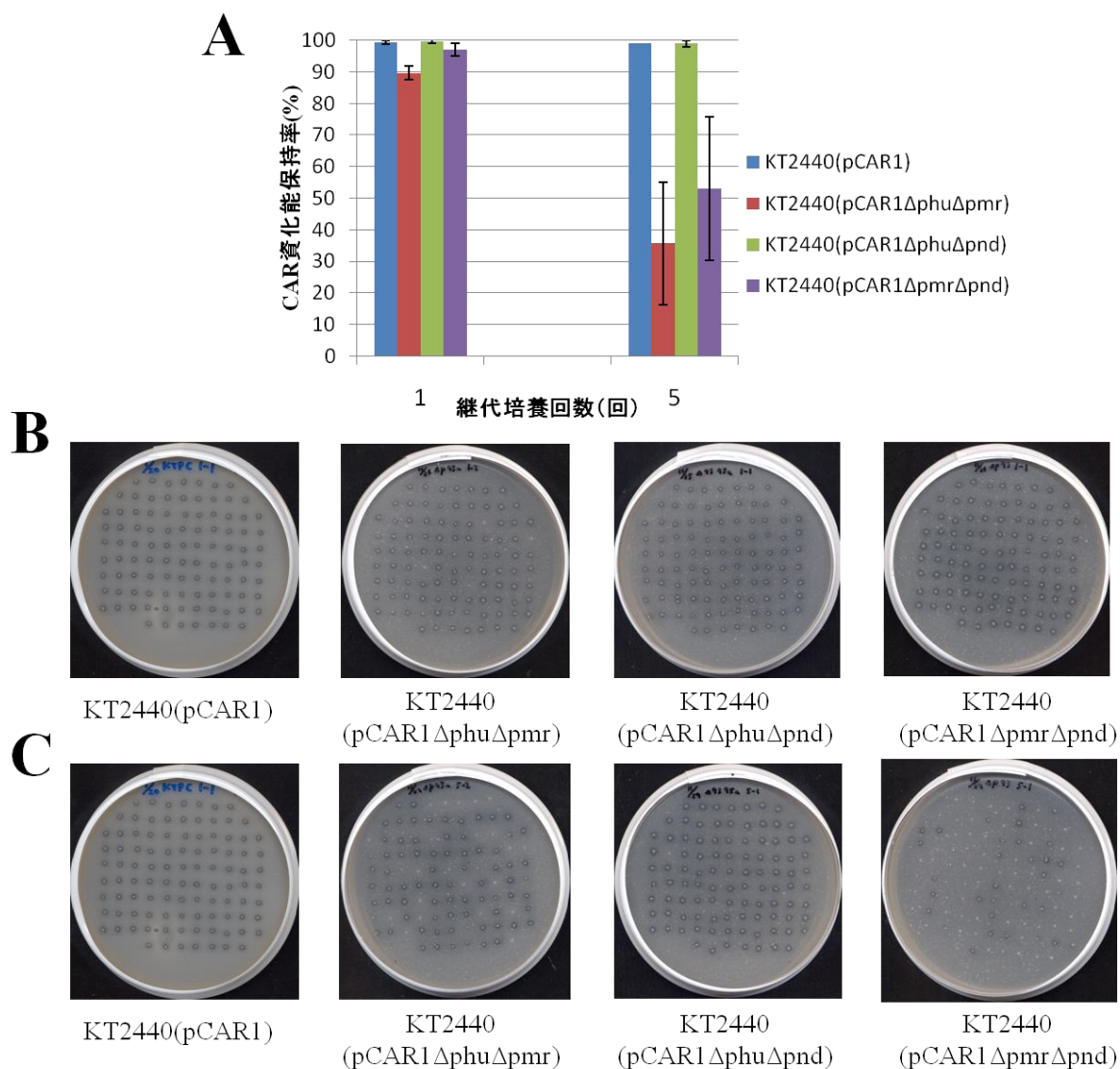
**Figure 4-10. SUC 培地における KT2440(pCAR1)株と二重破壊株 3 株の生育曲線**

各株を SUC 培地で培養し、OD<sub>600</sub> を経時的に測定した。独立した 3 回の実験の平均値を示す。



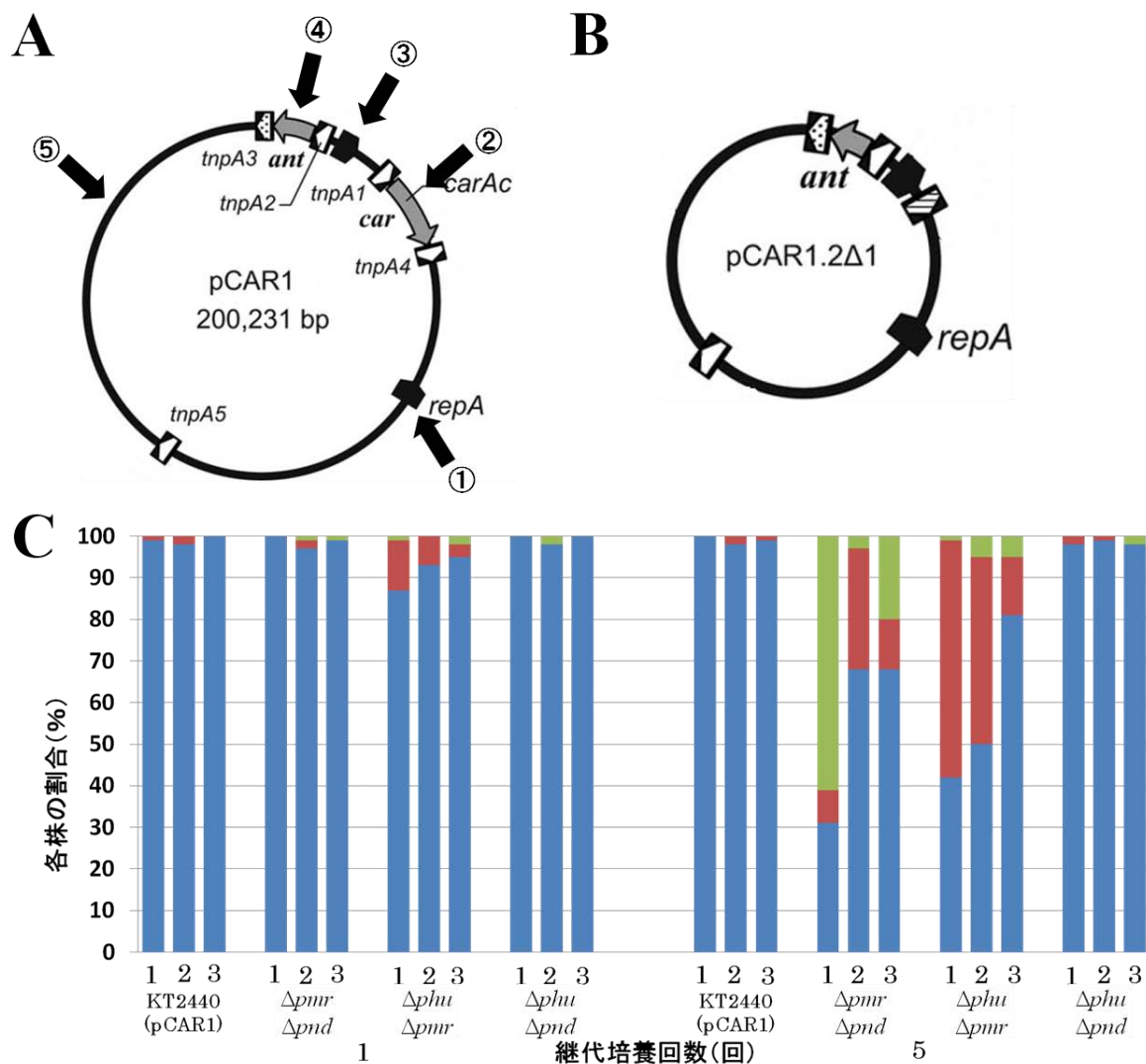
#### 4-3-7. 二重破壊株と野生株の pCAR1 保持率比較

作製した二重破壊株および KT2440(pCAR1)株を SUC 液体培地で継代培養し pCAR1 の保持率を比較した。4-2-7 の方法に従って継代培養を行い、継代 1 回目と 5 回目の各株をそれぞれ 100 コロニーずつ LB plate および CAR plate にパッチした。3 連で実験を行ったところ、KT2440(pCAR1 $\Delta$ phu $\Delta$ pmr)株および KT2440(pCAR1 $\Delta$ pmr $\Delta$ pnd)株は継代培養を経ることで CAR 資化能を欠落した株の割合が増加することが明らかとなった (Fig. 4-11)。pCAR1 は自身が保持する同じ向きの挿入配列 ISPre1 間での相同性組換えによって構造変化が生じうることが明らかとなっている [Takahashi et al., 2009b]。そのため、CAR 資化能を欠落した株において CAR 代謝に関わる pCAR1 上の *car* 遺伝子群が脱落するなど pCAR1 の構造変化が生じたのか、あるいは pCAR1 そのものを脱落したのかを明らかにするため、LB plate にパッチした株をコロニーハイブリダイゼーション解析に供し、*repA*、*antBC*、*carAc*、*antR* および ORF146 の有無を調べた (Fig. 4-12A)。解析の結果、全ての株は①全ての遺伝子を有する、②*carAc* のみ保持しない、③全ての遺伝子を保持しない、もののいずれかに分類された。②は pCAR1 が構造変化により pCAR1.2 $\Delta$ 1 へと変化したと考えられる株 (Fig. 4-12B)、③は pCAR1 そのものを脱落した株を表す。コロニーハイブリダイゼーション解析の結果を Fig. 4-12C に示す。すなわち、KT2440(pCAR1 $\Delta$ phu $\Delta$ pmr)株および KT2440(pCAR1 $\Delta$ pmr $\Delta$ pnd)株は KT2440(pCAR1)株と比較して、SUC 液体培地での継代培養に伴い pCAR1 の構造変化が生じやすい、あるいは pCAR1 そのものを脱落しやすいことが明らかとなった。一方、KT2440(pCAR1 $\Delta$ phu $\Delta$ pnd)株ではこれらの表現型は見出されなかった。各株において *car* 遺伝子群が相同性組換えにより脱落していることは、ORF11down-F プライマーおよび ORF39up-R プライマーを用いた PCR により増幅産物を検出すると共に (Fig. 4-13)、増幅産物の配列を確認することで確かめた (data not shown)。継代回数が増える毎に増幅産物のバンドが濃くなったことから、PCR の結果もコロニーハイブリダイゼーション解析の結果 (Fig. 4-12C)と合致した。



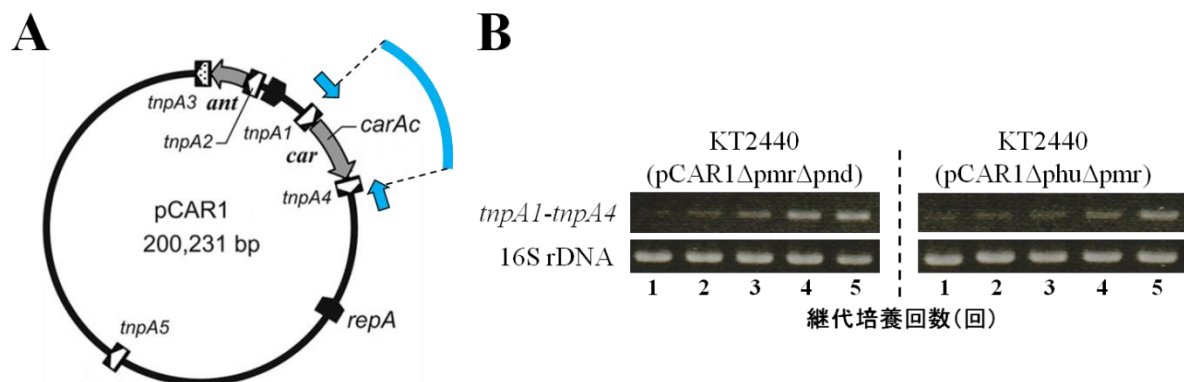
**Figure 4-11. KT2440(pCAR1)株および二重破壊株の SUC 液体培地での継代培養時の CAR 資化能保持率測定**

(A) 各株について 3 連の実験の平均値を示す。KT2440(pCAR1ΔphuΔpmr)株および KT2440(pCAR1ΔpmrΔpnd)株は継代培養を経ることで CAR 資化能を有する株の割合が減少した。(B) 継代培養 1 回目の各株を 100 コロニーずつ CAR plate にパッチした様子を示す。CAR 資化能を有するコロニーは plate 上でクリアゾーンを形成する。(C) 継代培養 5 回目の各株を 100 コロニーずつ CAR plate にパッチした様子を示す。CAR 資化能を有するコロニーは plate 上でクリアゾーンを形成する。KT2440(pCAR1ΔphuΔpmr)株、KT2440(pCAR1ΔpmrΔpnd)株はクリアゾーンを形成する株の割合が減少した。



**Figure 4-12. 二重破壊株の SUC 液体培地での継代培養に伴う pCAR1 構造変化**

(A) pCAR1 の構造の概略図。黒四角形は挿入配列 ISPre1 または ISPre2 を示す。内部の配列は転移酵素遺伝子(*tnpA1-A5*)を表し、*tnpA3* を含むものが ISPre2、残りは ISPre1 である。①～⑤はそれぞれコロニーハイブリダイゼーションに用いた *repA*、*carAc*、*antR*、*antBC*、ORF146 プロブの結合位置を示す。(B) pCAR1 上の ISPre1 間 (*tnpA1*、*tnpA4* 領域間)で相同性組換えが生じることにより *car* 遺伝子領域が脱落した pCAR1.2Δ1 の構造の概略図 [Takahashi et al., 2009b]。(C) コロニーハイブリダイゼーション解析の結果。実験は3連で行った。グラフ中の青棒は *repA*、*carAc* をいずれも有し、intact な pCAR1 を保持すると思われる株の割合を表す。赤棒は *repA* を有するが *carAc* は有さない、pCAR1.2Δ1 状のプラスミドを保持すると思われる株の割合を表す。緑棒は *repA*、*carAc* をいずれも保持せず、pCAR1 を脱落したと思われる株の割合を示す。KT2440(pCAR1ΔphuΔpmr)株および KT2440(pCAR1ΔpmrΔpnd)株は継代培養に伴い、赤棒および緑棒で表す株の割合が増加した。



**Figure 4-13. pCAR1 上で生じた相同性組換えの PCR による検出**

(A) 青矢印はそれぞれ ORF11down-F プライマー、ORF39up-R プライマーの結合箇所を表す。*tnpA1-tnpA4* 領域間で相同性組換えが生じ、*car* 遺伝子群 (青棒で示した領域) が脱落した場合のみ PCR により約 1.5 kb の増幅産物が得られる。(B) KT2440(pCAR1ΔpmrΔpnd)株および KT2440(pCAR1ΔphuΔpmr)株の PCR による相同性組換えの検出。いずれの株も継代培養を経るごとに *tnpA1-tnpA4* 領域間の PCR 産物の割合が増加する、すなわち構造変化を生じた pCAR1 を保持する株の割合が増加していることが確認された。各サンプル間の比較の際には、内部標準として 16S rRNA 遺伝子を 27F プライマー及び 1378R プライマーを用いた PCR により増幅し、産物の量が等しいことを確認した。

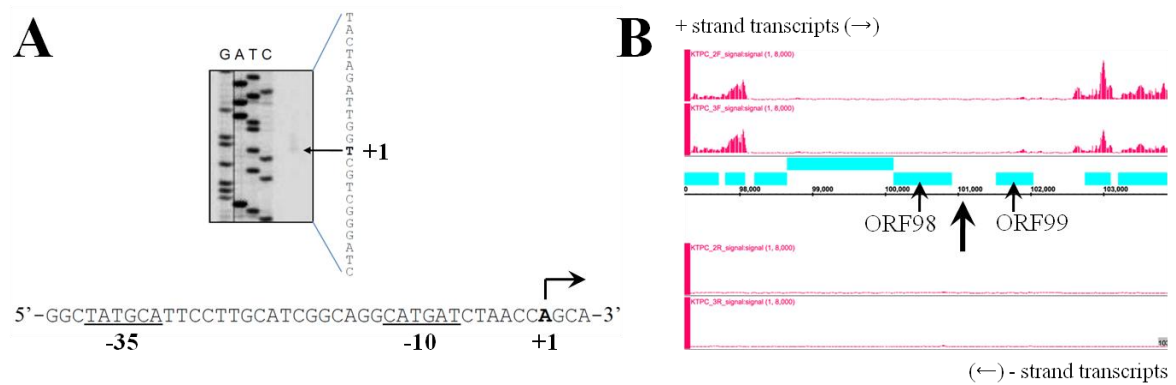
#### 4-3-8. 相補株の作製

4-3-7 で明らかとなった表現型が核様体タンパク質遺伝子を除去したために生じたことを裏付けるため、KT2440(pCAR1 $\Delta$ phu $\Delta$ pmr)株および KT2440(pCAR1 $\Delta$ pmr $\Delta$ pnd)株に核様体タンパク質遺伝子を相補し、4-3-7 の表現型が消失するかを調べた。相補株の作製方針を以下に示す。*pmr* の推定プロモーター配列 (Fig. 4-14A)からターミネーター配列までを含む約 0.57 kb の DNA 断片を、上流及び下流の ORF までの距離が長く、高密度タイリングアレイを用いた RNA マッピング解析により mRNA が転写されていないことが明らかとなった ORF98-99 遺伝子間領域 (Fig. 4-14B)に導入することで、*pmr* を他の遺伝子の転写を阻害することなく intact に近い状態で発現・相補させることとした。

2 回の相同性組換えの結果、Gm 耐性、Km 感受性、および sucrose 非感受性を示した株から total DNA を抽出した。ORF98\_COMP\_up\_F プライマーと ORF99\_COMP\_down\_R プライマーを用いた PCR により ORF98-99 遺伝子間領域への *pmr* および Gm cassette の挿入を確認した (Fig. 4-15)。これらの株に pFLP2Km を導入した後、Gm と Km の両方に感受性を示した株から total DNA を抽出し、同じプライマーセットを用いて PCR を行うことで Gm cassette の除去を確認した (Fig. 4-15)。

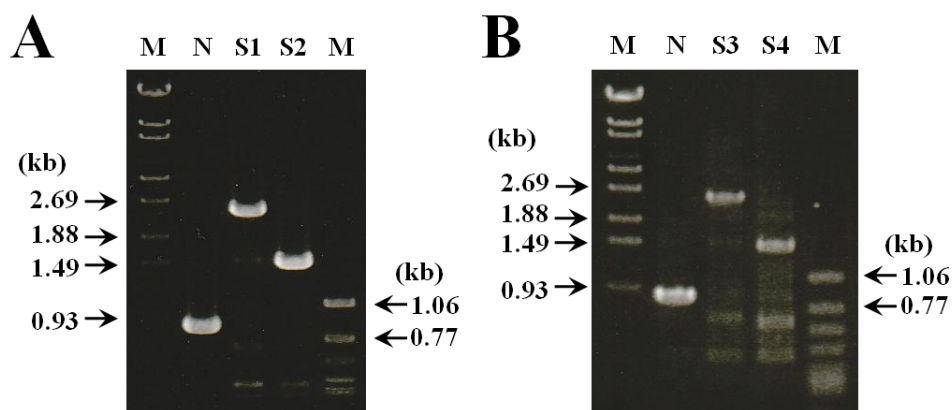
#### 4-3-9. 相補株の pCAR1 保持率測定

4-3-8 で作製した相補株 KT2440(pCAR1\_TT001)株および KT2440(pCAR1\_TT002)株を 4-2-7 の方法に従って SUC 液体培地で継代培養し、CAR 資化能を有する株の割合を測定した。結果を Fig. 4-16 に示す。いずれの相補株も CAR 資化能を安定に保持したことから、4-3-7 の表現型が pCAR1 上の 3 つの核様体タンパク質遺伝子のうち *pmr* を含む 2 つの除去により発現したことが裏付けられた。



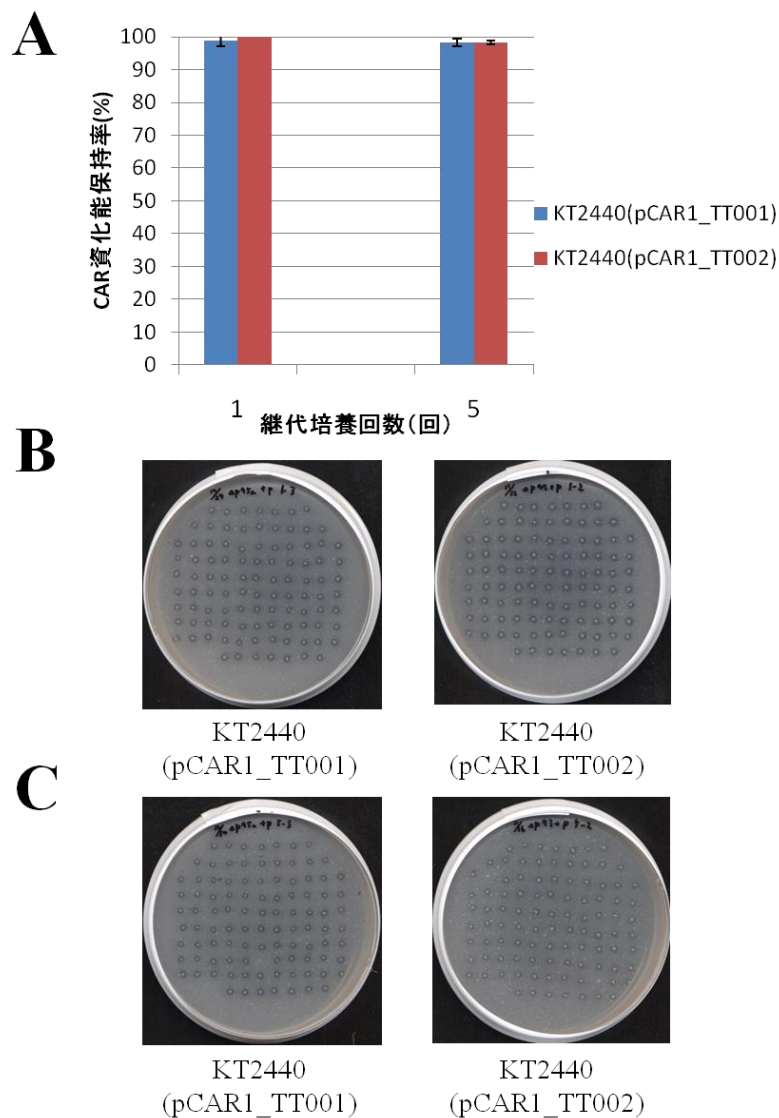
**Figure 4-14. *pmr* の推定プロモーター配列および ORF98-99 遺伝子間領域の転写シグナル**

(A) プライマー伸長解析による *pmr* の転写開始点の同定 [Yun and Suzuki et al., 2010]。 *pmr* は翻訳開始点の 69 塩基上流に転写開始点を有する。推定される -35、 -10 配列を下線で示す。(B) RNA マッピングによる ORF98-99 遺伝子間領域の転写解析。SUC 培地で対数増殖期まで培養した KT2440(pCAR1)株から調製した 2 連のサンプルを RNA マッピング解析に供した結果を示す(4-2-10, 4-3-11 参照)。x 軸は pCAR1 上の領域を、y 軸は各プローブの示したシグナル値の大きさを、青四角はアノテーションされた各 ORF を、太矢印は相補用 *pmr* の挿入位置を表す。ORF98-99 遺伝子間領域では+鎖側、 -鎖側いずれでもシグナルは検出されなかった。



**Figure 4-15. PCR による ORF98-99 遺伝子間領域への *pmr* 挿入の確認**

M は marker、N は KT2440(pCAR1)株の total DNA を表す。ORF98-99 遺伝子領域は野生株では 851 bp、 *pmr* および Gm cassette が挿入された株では 2,483 bp、 Gm cassette が除去された株では 1,515 bp の断片が増幅される。(A) S1 は KT2440(pCAR1\_TT002::Gm<sup>r</sup>)株、 S2 は KT2440(pCAR1\_TT002)株の total DNA を表す。(B) S3 は KT2440(pCAR1\_TT001::Gm<sup>r</sup>)株、 S4 は KT2440(pCAR1\_TT001)株の total DNA を表す。



**Figure 4-16. KT2440(pCAR1\_TT001)株およびKT2440(pCAR1\_TT002)株のSUC液体培地での継代培養時のCAR資化能保持率測定**

(A) 各株について3連の実験の平均値を示す。(B) 継代培養1回目の各株を100コロニーずつCAR plateにパッチした様子を示す。CAR資化能を有するコロニーはplate上でクリアゾーンを形成する。(C) 継代培養5回目の各株を100コロニーずつCAR plateにパッチした様子を示す。CAR資化能を有するコロニーはplate上でクリアゾーンを形成する。いずれの株もCAR資化能を安定に保持していた。



#### 4-3-10. Phenotype MicroArray による表現型の網羅的解析

各核様体タンパク質の除去が宿主に与える影響をより幅広く明らかにするため、野生株である KT2440(pCAR1)株、単独破壊株および二重破壊株をそれぞれ Phenotype MicroArray (Biolog)に供し、各株の表現型を網羅的に解析・比較した。解析対象とする表現型は、利用できる基質 (C 源 [PM1, 2A]、N 源 [PM3B]、P 源 [PM4A]、S 源 [PM4A])、浸透圧耐性 (PM9)、pH 耐性 (PM10)の計 576 条件について行った (Table M4-3)。各株を各 plate で 30°C、48 h 培養し、単独破壊株と KT2440(pCAR1)株、二重破壊株と単独破壊株の表現型を比較した。Biolog Kinetic and Parametric software (version 1.20.02)を用いて図示したデータの見方を補章 Fig. S1 に、各 plate で得られたデータを補章 Fig. S2~S7 に示した。また PM1~4A plate で用いた各基質を Pathway Projector [Kono et al., 2009]を用いて KEGG Atlas の代謝マップ上にプロットした図を Fig. 4-17 に示した。

##### <C 源として利用できる基質について>

各 well での各株の呼吸量をプロットした面積図を補章 Fig. S2, S3 に示した。また、比較する 2 株間で面積値に差があると判定した基質を Table 4-1 に示した。

まず単独破壊株と KT2440(pCAR1)株を比較すると、*pnd* を破壊した場合にはいずれの基質でも呼吸量に差は認められなかった (Fig. S2A, S3A)。一方、*phu* および *pmr* の破壊によって succinic acid や  $\alpha$ -keto-glutaric acid、L-lactic acid など TCA 回路やその周囲の基質を C 源とした際に呼吸量が増加した (Fig. S2B, C)。

次に二重破壊株と単独破壊株を比較すると、*pmr* と *pnd* の二重破壊によって *pmr* 単独破壊よりもアルギニン・プロリン代謝に関わる putrescine を C 源とした際に呼吸量が減少した (Fig. S3D)。また *pnd* 単独破壊よりも fumaric acid や propionic acid など TCA 回路やその周囲の基質を C 源とした際に呼吸量が増加し (Fig. S2E)、putrescine を C 源とした際に呼吸量が減少した (Fig. S3E)。一方、*phu* と *pmr* の二重破壊によって *pmr* 単独破壊よりも L-lactic acid を C 源とした際に呼吸量が減少し (Fig. S2F)、*phu* 単独破壊よりも propionic acid を C 源とした際に呼吸量が増加した (Fig. S2G)。

##### <N 源として利用できる基質について>

各 well での各株の呼吸量をプロットした面積図を補章 Fig. S4 に示した。また、比較する 2 株間で面積値に差があると判定した基質を Table 4-1 に示した。ほとんどの基質において各株間で呼吸量に変化は認められなかったが、*pmr* と *pnd* を二重に破壊した場合には各々を単独で破壊した場合よりもカプロラクタム分解に関わる  $\epsilon$ -amino-N-caproic acid や TCA 回路および糖新生に関わる Gly, Glu を N 源とした際に呼吸量が減少した (Fig. S4D, E)。



#### <P 源として利用できる基質について>

各 well での各株の呼吸量をプロットした面積図を補章 Fig. S5 に示した。PM 4A plate のうち、A01～E12 までの 60 well が P 源として利用できる基質を評価する well である。また、比較する 2 株間で面積値に差があると判定した基質を Table 4-1 に示した。

まず単独破壊株と KT2440(pCAR1)株を比較すると、*pnd* の破壊によってアミノ糖代謝に関わる D-glucosamine-6-phosphate を P 源とした際に呼吸量が増加し (Fig. S5A)、*phu* の破壊によって解糖系に関わる D-glucose-6-phosphate を P 源とした際に呼吸量が減少した (Fig. S5B)。また *pmr* の破壊によってアミノ糖代謝に関わる D-glucosamine-6-phosphate や tripolyphosphate を P 源とした際に呼吸量が増加し、解糖系に関わる D-glucose-6-phosphate を P 源とした際に呼吸量が減少した (Fig. S5C)。

次に二重破壊株と単独破壊株を比較すると、*pmr* と *pnd* の二重破壊によって *pmr* 単独破壊よりもアミノ糖代謝に関わる D-glucosamine-6-phosphate や tripolyphosphate を P 源とした際に呼吸量が減少した (Fig. S5D)。また *pnd* 単独破壊よりもアミノ糖代謝に関わる D-glucosamine-6-phosphate や tripolyphosphate、および解糖系に関わる D-glucose-1-phosphate や D-glucose-6-phosphate を P 源とした際に呼吸量が減少した (Fig. S5E)。一方、*phu* と *pmr* の二重破壊によって *pmr* 単独破壊よりも tripolyphosphate を P 源とした際に呼吸量が減少し、プリン代謝に関わる guanosine 5'-monophosphate や解糖系に関わる 2-deoxy-D-glucose 6-phosphate、D-mannose-6-phosphate を P 源とした際に呼吸量が増加した (Fig. S5F)。また *phu* 単独破壊よりもプリン代謝や解糖系、アミノ糖代謝に関わる基質、およびアルギニン代謝に関わる phosphocreatine を P 源とした際に呼吸量が増加した (Fig. S5G)。

#### <S 源として利用できる基質について>

各 well での各株の呼吸量をプロットした面積図を補章 Fig. S5 に示した。PM 4A plate のうち、F01～H12 までの 36 well が N 源として利用できる基質を評価する well である。いずれの基質でも各株間で呼吸量の変化は検出されなかった。

#### <浸透圧ストレス耐性について>

各 well での各株の呼吸量をプロットした面積図を補章 Fig. S6 に示した。また、比較する 2 株間で面積値に差があると判定した条件を Table 4-2 に示した。全体の傾向として、単独破壊株の耐性は KT2440(pCAR1)株とほとんど差が認められなかったのに対し、二重破壊株は単独破壊株と比較して多くの条件で耐性が変動していた。

単独破壊株と KT2440(pCAR1)株を比較すると、唯一 *pmr* の破壊によって sodium lactate 2% の条件で耐性の低下が認められた (Fig. S6C)。

二重破壊株と単独破壊株を比較すると、*pmr* と *pnd* を二重に破壊した場合には各々を単独で破壊した場合よりも NaCl や potassium chloride の存在下で耐性が低下し、sodium lactate 2% の条件で耐性が向上した (Fig. S6D, E)。一方、*phu* と *pmr* を二重に破壊した場合には各々を単独で破壊した場合よりも potassium chloride、sodium sulfate、sodium formate などの存在下で耐性が向上し、sodium lactate 2% の条件下で耐性が低下するなど逆の傾向を示した (Fig. S6F, G)。

#### <pH ストレス耐性について>

各 well での各株の呼吸量をプロットした面積図を補章 Fig. S7 に示した。また、比較する 2 株間で面積値に差があると判定した条件を Table 4-3 に示した。全体の傾向として、株間での耐性の差は小さいものの、二重破壊株・単独破壊株間での比較の方が単独破壊株・KT2440(pCAR1)株間での比較よりも多くの条件で耐性の変動が認められた。

単独破壊株と KT2440(pCAR1)株を比較すると、*pmr* を破壊した場合のみ pH 9.5 をベースとした条件で耐性が低下した (Fig. S7C)。

二重破壊株と単独破壊株を比較すると、*pmr* と *pnd* を二重に破壊した場合には各々を単独で破壊した場合よりも pH 9.5 をベースとした条件で耐性が低下した (Fig. S7D, E)。一方、*phu* と *pmr* を二重に破壊した場合には各々を単独で破壊した場合よりも pH 5.5 の条件で耐性が低下し、pH 9.5 をベースとした条件では耐性の向上が認められるなど様々な条件で逆の表現型を示した (Fig. S7F, G)。

Table 4-1. Phenotype MicroArrayにおいて各基質をC、N、P源とした際の呼吸量比較

Test sample vs. Reference sample <sup>a</sup>	Plate No.	Well	Substrate <sup>b</sup>	Difference <sup>c</sup>	Mode of action <sup>d</sup>
C-source					
$\Delta pnd$ vs. KT2440(pCAR1)					
$\Delta phu$ vs. KT2440(pCAR1)	PM 1	A05	Succinic Acid	+	TCA cycle
	PM 1	B09	L-Lactic Acid	+	Gluconeogenesis
	PM 1	D06	$\alpha$ -Keto-Glutaric Acid	+	TCA cycle
$\Delta pmr$ vs. KT2440(pCAR1)	PM 1	A05	Succinic Acid	+	TCA cycle
	PM 1	B09	L-Lactic Acid	+	Gluconeogenesis
	PM 1	D06	$\alpha$ -Keto-Glutaric Acid	+	TCA cycle
$\Delta pmr \Delta pnd$ vs. $\Delta pmr$	PM 2A	H08	Putrescine	-	Arginine and proline metabolism
$\Delta pmr \Delta pnd$ vs. $\Delta pnd$	PM 1	F05	Fumaric Acid	+	TCA cycle
	PM 1	F07	Propionic Acid	+	Propanoate metabolism
	PM 2A	H08	Putrescine	-	Arginine and proline metabolism
$\Delta phu \Delta pmr$ vs. $\Delta pmr$	PM 1	B09	L-Lactic Acid	-	Gluconeogenesis
$\Delta phu \Delta pmr$ vs. $\Delta phu$	PM 1	F07	Propionic Acid	+	Propanoate metabolism
N-source					
$\Delta pnd$ vs. KT2440(pCAR1)					
$\Delta phu$ vs. KT2440(pCAR1)					
$\Delta pmr$ vs. KT2440(pCAR1)					
$\Delta pmr \Delta pnd$ vs. $\Delta pmr$	PM 3B	G09	$\epsilon$ -Amino-N-Caproic Acid	-	Caprolactam degradation
	PM 3B	H10	Gly-Glu	-	TCA cycle
$\Delta pmr \Delta pnd$ vs. $\Delta pnd$	PM 3B	G09	$\epsilon$ -Amino-N-Caproic Acid	-	Caprolactam degradation
	PM 3B	H10	Gly-Glu	-	TCA cycle
$\Delta phu \Delta pmr$ vs. $\Delta pmr$					
$\Delta phu \Delta pmr$ vs. $\Delta phu$					
P-source					
$\Delta pnd$ vs. KT2440(pCAR1)	PM 4A	C06	D-Glucosamine-6-Phosphate	+	Amino sugar and nucleotide sugar metabolism
$\Delta phu$ vs. KT2440(pCAR1)	PM 4A	C04	D-Glucose-6-Phosphate	-	Glycolysis
$\Delta pmr$ vs. KT2440(pCAR1)	PM 4A	A05	Triphosphosphate	+	Oxidative phosphorylation
	PM 4A	C04	D-Glucose-6-Phosphate	-	Glycolysis
	PM 4A	C06	D-Glucosamine-6-Phosphate	+	Amino sugar and nucleotide sugar metabolism
$\Delta pmr \Delta pnd$ vs. $\Delta pmr$	PM 4A	A05	Triphosphosphate	-	Oxidative phosphorylation
	PM 4A	C06	D-Glucosamine-6-Phosphate	-	Amino sugar and nucleotide sugar metabolism
$\Delta pmr \Delta pnd$ vs. $\Delta pnd$	PM 4A	A05	Triphosphosphate	-	Oxidative phosphorylation
	PM 4A	C03	D-Glucose-1-Phosphate	-	Glycolysis
	PM 4A	C04	D-Glucose-6-Phosphate	-	Glycolysis
	PM 4A	C06	D-Glucosamine-6-Phosphate	-	Amino sugar and nucleotide sugar metabolism
$\Delta phu \Delta pmr$ vs. $\Delta pmr$	PM 4A	A05	Triphosphosphate	-	Oxidative phosphorylation
	PM 4A	B10	Guanosine 5'-Monophosphate	+	Purine metabolism
	PM 4A	C05	2-Deoxy-D-Glucose 6-Phosphate	+	Glycolysis
	PM 4A	D02	D-Mannose-6-Phosphate	+	Glycolysis
$\Delta phu \Delta pmr$ vs. $\Delta phu$	PM 4A	B10	Guanosine 5'-Monophosphate	+	Purine metabolism
	PM 4A	C03	D-Glucose-1-Phosphate	+	Glycolysis
	PM 4A	C05	2-Deoxy-D-Glucose 6-Phosphate	+	Glycolysis
	PM 4A	C06	D-Glucosamine-6-Phosphate	+	Amino sugar and nucleotide sugar metabolism
	PM 4A	E03	Phosphocreatine	+	Arginine and proline metabolism

<sup>a</sup>  $\Delta pnd$  はKT2440(pCAR1 $\Delta pnd$ )、 $\Delta phu$  はKT2440(pCAR1 $\Delta phu$ )、 $\Delta pmr$  はKT2440(pCAR1 $\Delta pmr$ )、 $\Delta pmr \Delta pnd$  はKT2440(pCAR1 $\Delta pmr \Delta pnd$ )、 $\Delta phu \Delta pmr$  はKT2440(pCAR1 $\Delta phu \Delta pmr$ )を表す。

<sup>b</sup> 各plateで各株を培養し、呼吸量に差があると判定した基質を示す。

<sup>c</sup> Test sampleの呼吸量がReference sampleよりも多い場合は+、少ない場合は-で示した。

<sup>d</sup> 基質の種類および利用される経路を示す。

Table 4-2. Phenotype MicroArrayを用いた浸透圧ストレス条件下での耐性比較

Test sample vs. Reference sample <sup>a</sup>	Plate No.	Well	Substrate <sup>b</sup>	Difference <sup>c</sup>
<b>Osmolyte</b>				
<i>Δpnd</i> vs. KT2440(pCAR1)				
<i>Δphu</i> vs. KT2440(pCAR1)				
<i>Δpmr</i> vs. KT2440(pCAR1)	PM 9	F02	Sodium Lactate 2%	—
<i>Δpmr Δpnd</i> vs. <i>Δpmr</i>	PM 9	A02	NaCl 2%	—
	PM 9	A03	NaCl 3%	—
	PM 9	D01	Potassium chloride 3%	—
	PM 9	D02	Potassium chloride 4%	—
	PM 9	F02	Sodium Lactate 2%	+
<i>Δpmr Δpnd</i> vs. <i>Δpnd</i>	PM 9	A02	NaCl 2%	—
	PM 9	A03	NaCl 3%	—
	PM 9	D01	Potassium chloride 3%	—
	PM 9	D02	Potassium chloride 4%	—
<i>Δphu Δpmr</i> vs. <i>Δpmr</i>	PM 9	A03	NaCl 3%	—
	PM 9	D01	Potassium chloride 3%	+
	PM 9	D02	Potassium chloride 4%	+
	PM 9	D03	Potassium chloride 5%	+
	PM 9	D06	Sodium sulfate 3%	+
	PM 9	D07	Sodium sulfate 4%	+
	PM 9	D08	Sodium sulfate 5%	+
	PM 9	E04	Sodium formate 4%	+
	PM 9	E05	Sodium formate 5%	+
	PM 9	F02	Sodium Lactate 2%	—
	PM 9	G04	Sodium Phosphate pH 7 200 mM	+
	PM 9	H08	Sodium Nitrite 20 mM	+
	PM 9	H09	Sodium Nitrite 40 mM	+
<i>Δphu Δpmr</i> vs. <i>Δphu</i>	PM 9	A03	NaCl 3%	+
	PM 9	D01	Potassium chloride 3%	+
	PM 9	D02	Potassium chloride 4%	+
	PM 9	D03	Potassium chloride 5%	+
	PM 9	D07	Sodium sulfate 4%	+
	PM 9	D08	Sodium sulfate 5%	+
	PM 9	E04	Sodium formate 4%	+
	PM 9	E05	Sodium formate 5%	+
	PM 9	F02	Sodium Lactate 2%	—
	PM 9	G04	Sodium Phosphate pH 7 200 mM	+

<sup>a</sup> *Δpnd* はKT2440(pCAR1*Δpnd*)、*Δphu* はKT2440(pCAR*Δphu*)、*Δpmr* はKT2440(pCAR1*Δpmr*)、*Δpmr Δpnd* はKT2440(pCAR1*ΔpmrΔpnd*)、*Δphu Δpmr* はKT2440(pCAR1*ΔphuΔpmr*)を表す。

<sup>b</sup> 各plateで各株を培養し、呼吸量に差があると判定した条件を示す。

<sup>c</sup> Test sampleの呼吸量がReference sampleよりも多い場合は+、少ない場合は-で示した。

Table 4-3. Phenotype MicroArrayを用いたpHストレス条件下での耐性比較

Test sample vs. Reference sample <sup>a</sup>	Plate No.	Well	Substrate <sup>b</sup>	Difference <sup>c</sup>
pH				
$\Delta pnd$ vs. KT2440(pCAR1)				
$\Delta phu$ vs. KT2440(pCAR1)				
$\Delta pmr$ vs. KT2440(pCAR1)	PM 10	E04	pH 9.5 + L-Asparagine	—
	PM 10	E08	pH 9.5 + Glycine	—
$\Delta pmr \Delta pnd$ vs. $\Delta pmr$	PM 10	E06	pH 9.5 + L-Glutamic Acid	—
$\Delta pmr \Delta pnd$ vs. $\Delta pnd$	PM 10	E06	pH 9.5 + L-Glutamic Acid	—
	PM 10	F10	pH 9.5 + L-Ornithine	—
	PM 10	G06	pH 9.5 + Putrescine	—
$\Delta phu \Delta pmr$ vs. $\Delta pmr$	PM 10	A05	pH 5.5	—
	PM 10	E03	pH 9.5 + L-Arginine	—
	PM 10	E08	pH 9.5 + Glycine	+
	PM 10	G01	pH 9.5 + Anthranilic acid	+
	PM 10	G08	pH 9.5 + Phenylethylamine	+
$\Delta phu \Delta pmr$ vs. $\Delta phu$	PM 10	A05	pH 5.5	—
	PM 10	F12	pH 9.5 + L-Homoserine	+
	PM 10	G01	pH 9.5 + Anthranilic acid	+

<sup>a</sup>  $\Delta pnd$  はKT2440(pCAR1 $\Delta pnd$ )、 $\Delta phu$  はKT2440(pCAR $\Delta phu$ )、 $\Delta pmr$  はKT2440(pCAR1 $\Delta pmr$ )、 $\Delta pmr \Delta pnd$  はKT2440(pCAR1 $\Delta pmr \Delta pnd$ )、 $\Delta phu \Delta pmr$  はKT2440(pCAR1 $\Delta phu \Delta pmr$ )を表す。

<sup>b</sup> 各plateで各株を培養し、呼吸量に差があると判定した条件を示す。

<sup>c</sup> Test sampleの呼吸量がReference sampleよりも多い場合は+、少ない場合は-で示した。

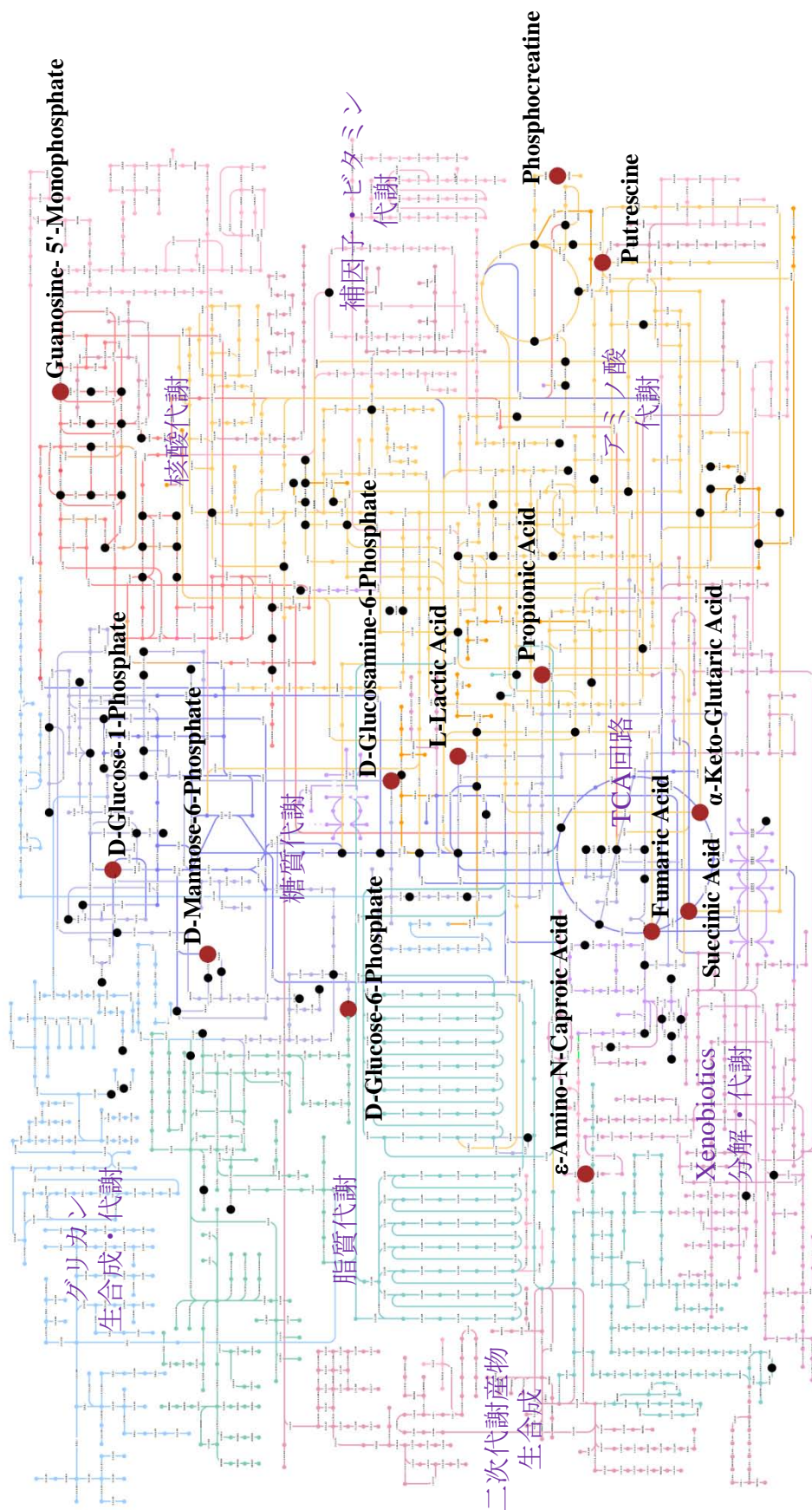


Figure 4-17. Phenotype MicroArray解析において表現型の変動が検出された基質の代謝マップ

Phenotype MicroArray解析においてC源、N源、P源、S源として利用した基質をPathway Projector [Kono et al., 2009]を用いて代謝マップ上にプロットした図を示す。利用した337種類の基質のうちKEGG IDを有するものは252個存在し、そのうち123個が代謝マップ上にプロットされた。黒丸はいずれの株の組み合わせでも表現型の変動が検出されなかった基質、茶丸はいずれかの株の組み合わせで表現型が変動した基質を表す。茶丸で示した基質はその名前も併記した。表現型が変動した16種類の基質のうち13個が代謝マップ上にプロットされた。

#### 4-3-11. RNA マッピングによるレギュロンの網羅的抽出

それぞれの核様体タンパク質が KT2440(pCAR1)株の染色体・プラスミド両ゲノム上の全ての遺伝子の転写レベルの制御に及ぼす影響を網羅的に調べるため、KT2440(pCAR1)株、単独破壊株、二重破壊株それぞれについて高密度タイリングアレイを用いたトランスクリプトーム比較を行った。本博士論文第3章の **3-3-1** の結果から *phu*、*pnd* はいずれも培養 4 h 後の対数増殖期中期に転写量が最大となること、大腸菌における研究から HU タンパク質は対数増殖期に発現量が最大となることが明らかとなっていた [Azam et al., 1999a]。また **4-3-2**、**4-3-6** の結果から各破壊株も KT2440(pCAR1)株と同様に培養 4 h で対数増殖期中期に達することが明らかとなった。そこで全ての株について SUC 培地で 4 h 培養した菌体からサンプルを調製し、RNA マッピング解析に供した。比較した株の組み合わせを Table 4-4 に示す。

Table 4-4. トランスクリプトーム比較を行った株の組み合わせと評価する転写変動

Test sample	Reference sample	評価する転写変動
KT2440(pCAR1Δpnd)	KT2440(pCAR1)	Intact な <i>pmr</i> 存在下で <i>pnd</i> の破壊により生じる変動
KT2440(pCAR1Δphu)	KT2440(pCAR1)	Intact な <i>pmr</i> 存在下で <i>phu</i> の破壊により生じる変動
KT2440(pCAR1Δpmr)	KT2440(pCAR1)	<i>pmr</i> の破壊により生じる変動
KT2440(pCAR1ΔpmrΔpnd)	KT2440(pCAR1Δpmr)	<i>pmr</i> 非存在下で <i>pnd</i> の破壊により生じる変動
KT2440(pCAR1ΔpmrΔpnd)	KT2440(pCAR1Δpnd)	<i>pnd</i> 非存在下で <i>pmr</i> の破壊により生じる変動
KT2440(pCAR1ΔphuΔpmr)	KT2440(pCAR1Δpmr)	<i>pmr</i> 非存在下で <i>phu</i> の破壊により生じる変動
KT2440(pCAR1ΔphuΔpmr)	KT2440(pCAR1Δphu)	<i>phu</i> 非存在下で <i>pmr</i> の破壊により生じる変動

<核様体タンパク質を 1 つ除去することで宿主に生じる影響の解析>

作製した各単独破壊株と野生株である KT2440(pCAR1)株のトランスクリプトームを比較することで、各核様体タンパク質の除去が宿主に与える影響を解析した。

##### ・ *pnd* 破壊に伴い転写変動する遺伝子の抽出

KT2440(pCAR1Δpnd)株と KT2440(pCAR1)株のトランスクリプトームを比較した結果、染色体上では全 5,398 遺伝子のうち 2 遺伝子の転写量が増加し、30 遺伝子の転写量が減少した (補章 Table S1)。また pCAR1 上では全 192 遺伝子のうち 11 遺伝子の転写量が増加した一方、転写量が減少した遺伝子は除去した *pnd* ただ 1 つのみであった (補章 Table S2)。

##### ・ *phu* 破壊に伴い転写変動する遺伝子の抽出

KT2440(pCAR1Δphu)株と KT2440(pCAR1)株のトランスクリプトームを比較した結果、染色体上では全 5,398 遺伝子のうち 11 遺伝子の転写量が増加し、29 遺伝子の転写量が減少した (補章 Table S3, S4)。一方、pCAR1 上では全 192 遺伝子のうち転写量が増加した遺伝子は無く、転写量が減少した遺伝子も除去した *phu* ただ 1 つのみであった (補章 Table S5)。

- ・ *pmr* 破壊に伴い転写変動する遺伝子の抽出

KT2440(pCAR1Δ*pmr*)株と KT2440(pCAR1)株のトランスクリプトームを比較した結果、染色体上では全 5,398 遺伝子のうち 107 遺伝子の転写量が増加し、19 遺伝子の転写量が減少した (補章 Table S6, S7)。また pCAR1 上では全 192 遺伝子のうち 3 遺伝子の転写量が増加し、3 遺伝子の転写量が減少した (補章 Table S8)。

<核様体タンパク質を 2 つ除去することで宿主に生じる影響の解析>

作製した各二重破壊株と単独破壊株のトランスクリプトーム比較を行うことで、*pmr* を含む 2 つの核様体タンパク質を除去することにより宿主に生じる影響を解析した。

- ・ *pmr* と *pnd* を共に破壊することで転写変動する遺伝子の抽出

まず KT2440(pCAR1Δ*pmr*Δ*pnd*)株と KT2440(pCAR1Δ*pmr*)株のトランスクリプトームを比較した結果、染色体上では全 5,398 遺伝子のうち 3 遺伝子の転写量が増加し、88 遺伝子の転写量が減少した (補章 Table S9)。また pCAR1 上では全 192 遺伝子のうち 7 遺伝子の転写量が増加し、2 遺伝子の転写量が減少した (補章 Table S10)。

次に KT2440(pCAR1Δ*pmr*Δ*pnd*)株と KT2440(pCAR1Δ*pnd*)株のトランスクリプトームを比較した結果、染色体上では全 5,398 遺伝子のうち 49 遺伝子の転写量が増加し、26 遺伝子の転写量が減少した (補章 Table S11, S12)。また pCAR1 上では全 192 遺伝子のうち 10 遺伝子の転写量が増加し、3 遺伝子の転写量が減少した (補章 Table S13)。

- ・ *phu* と *pmr* を共に破壊することで転写変動する遺伝子の抽出

まず KT2440(pCAR1Δ*phu*Δ*pmr*)株と KT2440(pCAR1Δ*pmr*)株のトランスクリプトームを比較した結果、染色体上では全 5,398 遺伝子のうち転写量が増加した遺伝子は存在しなかった一方で、138 遺伝子の転写量が減少した (補章 Table S14)。また pCAR1 上では全 192 遺伝子のうち 3 遺伝子の転写量が増加し、2 遺伝子の転写量が減少した (補章 Table S15)。

次に KT2440(pCAR1Δ*phu*Δ*pmr*)株と KT2440(pCAR1Δ*phu*)株のトランスクリプトームを比較した結果、染色体上では全 5,398 遺伝子のうち 17 遺伝子の転写量が増加し、62 遺伝子の転写量が減少した (補章 Table S16)。また pCAR1 上では全 192 遺伝子のうち 9 遺伝子の転写量が増加した一方、転写量が減少した遺伝子は除去した *pmr* ただ 1 つのみであった (補章 Table S17)。



#### 4-4. 考察

本章では、カルバゾール分解プラスミド pCAR1 上にコードされる核様体タンパク質 Pmr、Pnd、Phu の機能を明らかにするため、pCAR1 を保持する *P. putida* KT2440 株を用いて *pmr*、*pnd* および *phu* をそれぞれ 1 つずつ除去した単独破壊株、あるいは 2 つ除去した二重破壊株を作製し、表現型やトランスクリプトームの変化を解析した。

まず各遺伝子の単独破壊株を作製し、succinate を炭素源とする液体培地での生育を野生株である KT2440(pCAR1)株と比較したが、ほとんど生育に差は認められなかった。つまり単独培養時の生育曲線を比較するだけでは各核様体タンパク質を除去した影響は測れなかったが、興味深いことに、単独で液体培養を行った際には生育にほとんど差の無い KT2440 株と KT2440(pCAR1)を混合培養すると継代培養に伴って KT2440(pCAR1)株の割合が顕著に減少するという現象が見出されている [当研究室、高瀬ら、未発表データ]。このことを考慮すると、破壊株では混合培養時に KT2440(pCAR1)株とは異なる挙動を示す可能性が考えられ、今後実験により調べる必要がある。また KT2440(pCAR1)株は pCAR1 の保持により LB plate (0.3%および 0.5% agar)、1/3 LB plate (0.3% agar)、PG agar plate (0.3% agar)上で KT2440 株よりも運動性が低下することが明らかとなった。各 plate 上での KT2440 株の運動性は swimming あるいは swarming であり、この運動性には flagella が関与することが明らかとなっている [Harshey, 2003]。つまり KT2440(pCAR1)株では flagella 合成系遺伝子の転写量が減少していることが考えられた。一方、単独破壊株の運動性は KT2440(pCAR1)株と差は認められなかった。つまり KT2440 株で pCAR1 を保持することにより生じた運動性の低下は、少なくとも各 NAPs 遺伝子単独の機能により生じたものではなく、各 NAPs 遺伝子の複合的な影響によるものか、あるいは pCAR1 上に存在する他の因子によるものだと考えられた。さらに単独破壊株と野生株それぞれについて succinate を炭素源とする液体培地で継代培養を行ったところ、いずれの株も pCAR1 を安定に保持していた。以前の研究において *pmr* 破壊によりプラスミドの分配に関わる *parA*、*parB* の転写量が 2 分の 1 程度に減少することが示されていたが [Yun and Suzuki et al., 2010]、その転写量は依然として pCAR1 を安定して分配するのに十分だったのだろう。

次に二重破壊株を作製し、succinate を炭素源とする液体培地での生育を KT2440(pCAR1)株と比較したが、単独破壊株と同様に生育の差は認められなかった。一方、各株を succinate を炭素源とする無機液体培地で継代培養したところ、KT2440(pCAR1ΔphuΔpmr)株および KT2440(pCAR1ΔpmrΔpnd)株では carbazole 代謝に関わる *car* 遺伝子群の欠落などの pCAR1 構造変化、あるいは pCAR1 そのものの脱落が生じる頻度が増加することが明らかとなった。このプラスミドの安定性の低下は各二重破壊株に *pmr* を導入することで相補されたことから、核様体タンパク質遺伝子の除去に由来する表現型であることが強く示唆された。以前の研究において、pCAR1 の構造変化は pCAR1 上に存在する同じ向きの挿入配列 ISPre1 間での相同性組換えによって生じることが明らかとなっており [Takahashi et al., 2009b]、本研究でも PCR によりそのことが確かめられた。しかしながら、pCAR1 上に存在する 5 つの挿入配列のうち

*car* 遺伝子群を挟むように存在する ISPre1 でのみ組換えが頻繁に生じる理由については依然として不明なままである。可能性としては、これら ISPre1 は物理的に距離が近く recombinase が働きやすいのかもしれない。菌体内でプラスミドは核様体タンパク質により小さく折りたたまれた状態で存在している [Maurer et al., 2009]。特に H-NS や Fis など離れた DNA 領域同士を結び付け topological domain を形成することが知られており [Hardy and Cozzarelli, 2005]、菌体内での染色体構造の構築に重要な役割を果たしている。実際、ChAP-chip 解析により pCAR1 上の *car* 遺伝子領域には H-NS 様因子である Pmr の結合サイトが多く見出されていることから [Yun and Suzuki et al., 2010]、この領域は菌体内でコンパクトに折りたたまれ物理的に距離が近い可能性が示唆される。H-NS 様因子の DNA 結合様式は bridging と呼ばれ [Dame et al., 2000]、Pmr が存在する際には菌体内に多量に存在する H-NS 様タンパク質が ISPre1 領域に多量に結合することで recombinase の働きを阻害するが、*pmr* を破壊することで H-NS 様因子の存在量が減少して ISPre1 領域が適度に緩み、recombinase が作用しやすくなるのかもしれない。ただし、*pmr* を含む複数の NAPs 遺伝子を同時に破壊することで初めて上記の表現型が観察されたことから、Phu や Pnd も ISPre1 領域に結合し recombinase の機能に影響している可能性が考えられる。今後は Phu および Pnd の該当領域への結合能についても調べる必要があるだろう。

また野生株および単独破壊株、二重破壊株を Phenotype MicroArray に供し、表現型を網羅的に解析した。まず intact な *pmr* が存在する条件で *pnd* を破壊した場合には、アミノ糖代謝に関わる D-glucosamine-6-phosphate を P 源とした際に呼吸量の増加が認められた以外には表現型の変動は検出されなかった。一方、*pmr* 非存在下で *pnd* を破壊した場合には C 源としてアルギニン・プロリン代謝に関わる putrescine を用いた場合、N 源としてカプロラクタム分解に関わる  $\epsilon$ -amino-N-caproic acid や TCA 回路および糖新生に関わる Gly, Glu を用いた場合、P 源として D-glucosamine-6-phosphate や tripolyphosphate を用いた場合に呼吸量に変動したのに加え、NaCl や potassium chloride を加えた浸透圧ストレス条件下、pH 9.5 + L-glutamic acid の pH ストレス条件下で耐性の低下が見出された。興味深いことに、*pnd* 単独破壊により表現型が変化した条件では *pmr* を単独で破壊した場合、あるいは *pnd* 非存在下で *pmr* を破壊した場合のいずれでも表現型が変動していた。また、*pnd* と *pmr* を二重に破壊することでより多くの条件で表現型の変化が検出された。すなわち Pnd および Pmr はこれら表現型の発現を協調的に制御していると推測された。

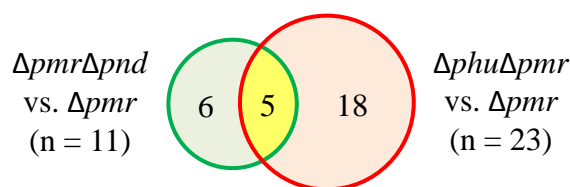
同様に、intact な *pmr* が存在する条件で *phu* を破壊した場合には、C 源として TCA 回路などに関わる succinic acid や  $\alpha$ -keto-glutaric acid、L-lactic acid を用いた場合、P 源として解糖系に関わる D-glucose-6-phosphate を用いた場合にのみ呼吸量の変動が検出された。一方、*pmr* 非存在下で *phu* を破壊した場合には C 源として L-lactic acid を用いた場合、P 源としてプリン代謝や解糖系に関わる基質を用いた場合に呼吸量に変動したのに加え、potassium chloride や sodium sulfate、sodium formate を加えた浸透圧ストレス条件下、pH 9.5 ベースの pH ストレス条件下で耐性の向上が見出された。*phu* 単独破壊により表現型が変化した全ての条件で、

*pmr* を単独で破壊した場合あるいは *phu* 非存在下で *pmr* を破壊した場合のいずれかでも表現型が変動したこと、*phu* と *pmr* を二重に破壊することでより多くの条件で表現型の変化が検出されたことから、前述の *Pnd* と *Pmr* の関係と同様に、*Phu* および *Pmr* も協調的に宿主の表現型の発現を制御していると推測された。

さらに各タンパク質の制御下にある表現型の重複を調べたところ、*Pmr* と *Pnd*、2つのタンパク質により特有に制御される表現型が6つ、*Phu* と *Pmr* により特有に制御される表現型が18個と、多く見出された (Fig. D4-1A)。また共通して変動する5条件のうち4条件は浸透圧ストレスに関するものであり (Fig. D4-1B)、*pnd* と *pmr* の二重破壊株では主に耐性が低下したのに対し、*phu* と *pmr* の二重破壊株では主に耐性の向上が見出されるなど、逆の傾向を示した (Fig. S6D, F)。これらの事実から、*Pnd* と *Phu* は宿主の表現型の制御機構が異なり、各二重破壊株は継代培養時に *pCAR1* の構造変化や脱落の頻度が上昇するという共通の表現型を示すものの、菌体内では異なる転写ネットワーク変動が生じていると考えられた。

Phenotype MicroArray 解析の結果をまとめると、*pmr*、*pnd*、*phu* 単独破壊株はそれぞれ野生株と比較して9、1、4個の条件で異なる表現型を示した。すなわち、NAPs 遺伝子を単独で破壊した際には表現型の変動は少ないものの、3種の NAPs 遺伝子の中では *pmr* を破壊した際に最も表現型が変動する条件が多いことが明らかとなった。また *pmr* と *pnd* の二重破壊株は *pmr*、*pnd* 単独破壊株と比較してそれぞれ11、16個の条件で、*pmr* と *phu* の二重破壊株は *pmr*、*phu* 単独破壊株と比較してそれぞれ23、19個の条件で異なる表現型を示した。この事実は、NAPs 遺伝子を1つ破壊したことで生じる影響よりも、*pmr* を含む2つの NAPs 遺伝子を破壊したことで生じる影響の方が大きく、より多くの条件で宿主の呼吸量および耐性に変動が生じることを示している。この結果から、NAPs 遺伝子を2つ破壊することで宿主により大きな負荷が生じていると考えられた。

**A**



**B**

	Plate No.	Well	Substrate	Mode of action
<b>PmrとPnd特有に制御される表現型</b>				
C-source	PM 2A	H08	Putrescine	Arginine and proline metabolism
N-source	PM 3B	G09	$\epsilon$ -Amino-N-Caproic Acid	Caprolactam degradation
N-source	PM 3B	H10	Gly-Glu	TCA cycle
P-source	PM 4A	C06	D-Glucosamine-6-Phosphate	Amino sugar and nucleotide sugar metabolism
Osmolyte	PM 9	A02	NaCl 2%	
pH	PM 10	E06	pH 9.5 + L-Glutamic Acid	
<b>PhuとPmr特有に制御される表現型</b>				
C-source	PM 1	B09	L-Lactic Acid	Gluconeogenesis
P-source	PM 4A	B10	Guanosine 5'-Monophosphate	Purine metabolism
P-source	PM 4A	C05	2-Deoxy-D-Glucose 6-Phosphate	Glycolysis
P-source	PM 4A	D02	D-Mannose-6-Phosphate	Glycolysis
Osmolyte	PM 9	D03	Potassium chloride 5%	
Osmolyte	PM 9	D06	Sodium sulfate 3%	
Osmolyte	PM 9	D07	Sodium sulfate 4%	
Osmolyte	PM 9	D08	Sodium sulfate 5%	
Osmolyte	PM 9	E04	Sodium formate 4%	
Osmolyte	PM 9	E05	Sodium formate 5%	
Osmolyte	PM 9	G04	Sodium Phosphate pH 7 200 mM	
Osmolyte	PM 9	H08	Sodium Nitrite 20 mM	
Osmolyte	PM 9	H09	Sodium Nitrite 40 mM	
pH	PM 10	A05	pH 5.5	
pH	PM 10	E03	pH 9.5 + L-Arginine	
pH	PM 10	E08	pH 9.5 + Glycine	
pH	PM 10	G01	pH 9.5 + Anthranilic acid	
pH	PM 10	G08	pH 9.5 + Phenylethylamine	
<b>Phu、Pmr、Pnd全てに制御される表現型</b>				
P-source	PM 4A	A05	Tripolyphosphate	Oxidative phosphorylation
Osmolyte	PM 9	A03	NaCl 3%	
Osmolyte	PM 9	D01	Potassium chloride 3%	
Osmolyte	PM 9	D02	Potassium chloride 4%	
Osmolyte	PM 9	F02	Sodium Lactate 2%	

**Figure D4-1. 複数の核様体タンパク質により制御される表現型**

(A) Phenotype MicroArray解析において *pnd*、*phu*、*pmr* の破壊に伴い表現型が変動した条件数をベン図で示す。nは変動した条件の総数を表す。PmrとPndにより特有に制御される表現型を緑色、PhuとPmrにより特有に制御される表現型を赤色、3つの核様体タンパク質全ての制御下にある表現型を黄色で表す。(B) 各核様体タンパク質により協調的に制御され则认为られる表現型の一覧を示す。

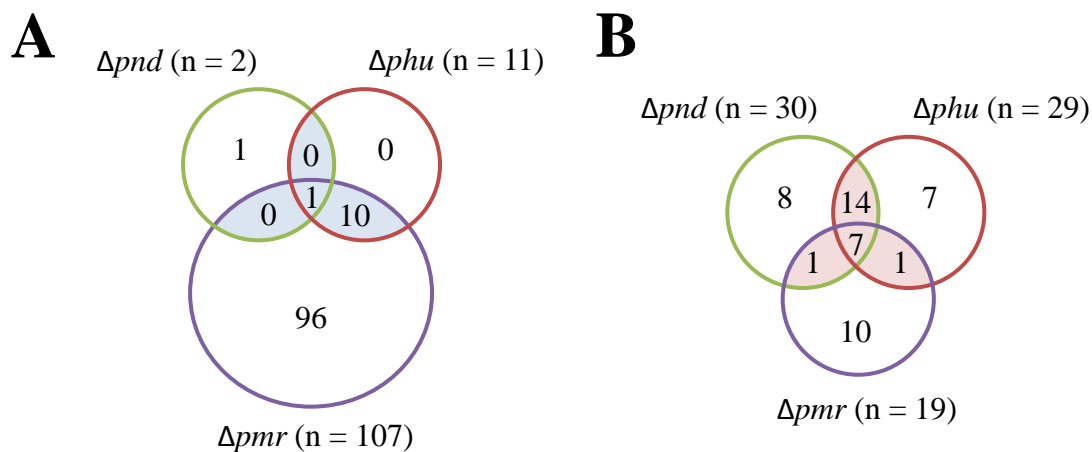
続いて高密度タイリングアレイを用いて各株のトランスクリプトームを比較した。まず単独破壊株と野生株を比較すると、*pmr* の破壊により染色体上 126 遺伝子、pCAR1 上 6 遺伝子が転写変動し、その多くは転写量が増加していたことから、*pmr* は主に転写抑制因子として機能することが示唆された。このことは、プラスミド pSf-R27 上にコードされる H-NS ホモログ Sfh が主に転写抑制因子として働くという知見と合致する [Doyle et al., 2007]。一方、*phu* を破壊した場合には染色体上 40 遺伝子、pCAR1 上 1 遺伝子のみ転写変動した。大腸菌において染色体上に複数コードされる HU は単独で破壊しても宿主の表現型への影響は少なく [Huisman et al., 1989; Boubrik and Rouviere-Yaniv, 1995]、またトランスクリプトームの変動も少ないことが報告されている [Oberto et al., 2009]。KT2440 株染色体上には HU ホモログをコードする遺伝子が 3 つ (*hupA*、*hupB*、*hupN*) 存在していることから、*phu* 単独破壊で転写変動した遺伝子が少ないこともまた本博士論文第 3 章の結果と同様に Phu が大腸菌における HU と類似の性質を有する可能性を支持するものである。さらに *pnd* を破壊した場合に転写変動した遺伝子も染色体上 32 遺伝子、pCAR1 上 11 遺伝子のみであった。NdpA の転写制御様式に関する報告例は現在まで無いが、KT2440 株染色体上には NdpA ホモログをコードする遺伝子が 1 つ (PP\_0973) 存在しており、*pnd* の除去による影響は PP\_0973 により相補されているのかもしれない。この可能性は *pnd* と PP\_0973 の二重破壊株を作製することで調べることができるであろう。また転写量が増加した遺伝子の中には pCAR1 上にコードされ細胞接着に関わる ORF101 や ORF103、DNA primase と相同性の高い ORF145 などが含まれていたことから、破壊株では接合伝達頻度が上昇している可能性が考えられた。興味深いことに、これらは異なる宿主に保持された際の pCAR1 トランスクリプトームを比較した結果、宿主間で転写量の変動が大きいことが明らかになった遺伝子である [徳丸、平成 21 年度修士論文]。すなわち、各宿主における染色体由来の NdpA ホモログタンパク質と pCAR1 由来の Pnd の相互作用の差異がこれら遺伝子の宿主間での転写変動を生み出している主因である可能性がある。今後は異なる宿主を用いて *pnd* を破壊した際にもこれら遺伝子の転写量の変動するかを調べる必要があるだろう。

各核様体タンパク質間の相互作用の有無を考察するため、レギュロンの重複を調べたところ、pCAR1 上の遺伝子では唯一 ORF107 のみが *pnd*、*pmr* 破壊により共通して転写量の増加が検出され、共通して転写量が減少した遺伝子は抽出されなかった。一方、染色体上の遺伝子では *phu* の破壊に伴って転写量が増加した 11 遺伝子は全て *pmr* の破壊によっても転写量が増加していた (Fig. D4-2A)。これらは酸化還元関連遺伝子やストレス応答遺伝子などを含んでおり (Fig. D4-2C)、Phu、Pmr、2 つのタンパク質により直接もしくは間接的に制御を受けていると考えられた。また、*pnd* の破壊に伴って転写量が減少した 21 遺伝子は *phu* の破壊によっても転写量が減少していた (Fig. D4-2B)。これらの遺伝子に共通な性質は見出されなかったが、オペロンを形成する一連の遺伝子などが含まれていた (Fig. D4-2C)。異なる核様体タンパク質を除去した際に共通で転写変動するこれら遺伝子は、各核様体タンパク質による協調的な転写制御を受けている可能性がある。さらに、各核様体タンパク質遺伝子の破壊により

固有に転写変動した遺伝子も見出された (Fig. D4-3)。これらは多くが機能未知な遺伝子であったが、各タンパク質固有の機能を反映しているものと推測される。

単独破壊株での結果をまとめると、3つの核様体タンパク質の中では *pmr* を破壊した場合に最も転写変動する遺伝子数が多いことが明らかとなった。すなわち、本実験の培養条件では *pmr* の破壊が宿主の phenotype に最も大きな影響を与える可能性を示唆している。このことは、培養条件が異なるものの、Phenotype MicroArray 解析において3つの核様体タンパク質遺伝子の中で *pmr* を破壊した場合に最も多く表現型の変動が見出されたという事実と一致している。加えて、各核様体タンパク質遺伝子の破壊により転写変動した遺伝子は互いに多く重複していたことから (Fig. D4-2)、各タンパク質は協調的に遺伝子転写制御を行っている可能性が示唆された。このことから、単独破壊株におけるトランスクリプトーム解析では各核様体タンパク質により単独で制御される遺伝子は抽出されるものの、複数の核様体タンパク質による制御下にある遺伝子の中には抽出されないものが存在する、すなわち各核様体タンパク質の実際のレギュロンのうち一部しか抽出できていない可能性が考えられた。そのため、3つの核様体タンパク質それぞれの真のレギュロンを明らかにするため、二重破壊株と単独破壊株のトランスクリプトーム比較を行った。

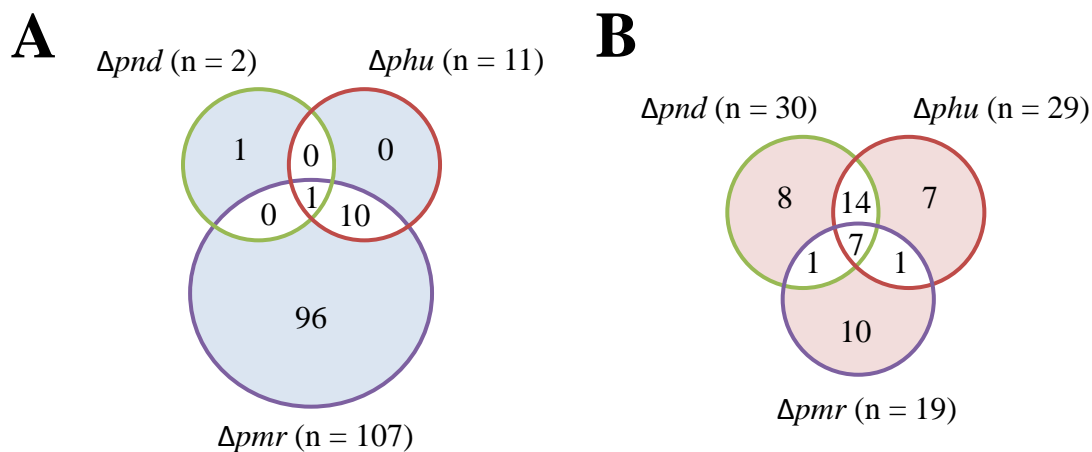
*pmr* と *pnd* の二重破壊株と *pmr* 単独破壊株のトランスクリプトームを比較することで、Pmr が存在しない状態での Pnd のレギュロンとなる遺伝子を 100 個抽出した。この中で *pnd* 単独破壊株における解析でも抽出された 46 遺伝子と重複する 3 遺伝子 (染色体上の機能未知な PP\_4604、pCAR1 上の機能未知な ORF146、および *pnd*)を除く 97 遺伝子が Pmr と Pnd、2つのタンパク質による制御下にある遺伝子だと考えられた (Fig. D4-4A)。同様にして Phu と Pmr、2つのタンパク質により制御される遺伝子を抽出した結果、重複する 1 遺伝子 (pCAR1 上の *phu*)を除く 142 遺伝子が新たにレギュロンとして見出された (Fig. D4-4B)。次に2つの核様体タンパク質による制御下にあるこれら遺伝子間の重複を調べたところ、Pmr と Pnd による制御を受ける 97 遺伝子のうち、重複しないものは 22 個見出され、これらは機能未知な遺伝子を多く含んでいた (Table D4-1)。また、Phu と Pmr による制御下にある 142 遺伝子のうち重複しないものは 67 個見出され、排出ポンプ関連遺伝子などが含まれていた (Table D4-2)。これら重複しない遺伝子は Phu、Pnd の機能の差異を反映しているものと推測された。一方、重複する 75 遺伝子の中には酸化還元関連遺伝子などオペロンを形成する一連の遺伝子が含まれており、これらは3つの核様体タンパク質全てによる直接あるいは間接的な制御下にあると考えられた (Fig. D4-4C、Table D4-3)。以上のように、複数の核様体タンパク質による協調的な制御下にあると推測される遺伝子が多数抽出されたことから、菌体内では3つの核様体タンパク質が複合的に機能し、宿主の表現型を決定しているのであろう。



C

Gene name	破壊した核様体タンパク質遺伝子		Description	
共通して転写量が増加する遺伝子				
PP_0235	lsfA	phu	pmr	antioxidant protein LsfA
PP_0273		phu	pmr	hypothetical protein
PP_1002	arcD	phu	pmr	arginine/ornithine antiporter
PP_1742		phu	pmr	hypothetical protein
PP_2010		phu	pmr	cytochrome b561
PP_2187		phu	pmr	universal stress protein family
PP_2648		phu	pmr	universal stress protein family
PP_2735		phu	pmr	hypothetical protein
PP_3610		phu	pmr	hypothetical protein
PP_3839		phu	pmr	alcohol dehydrogenase
PP_4870	pnd	phu	pmr	azurin
共通して転写量が減少する遺伝子				
PP_1083	pnd		pmr	bacterioferritin-associated ferredoxin, putative
PP_1820	pnd	phu		benzoate transport protein
PP_2872	pnd	phu		hypothetical protein
PP_3023	pnd	phu		amino acid efflux protein, putative
PP_3330	pnd	phu	pmr	outer membrane ferric siderophore receptor, putative
PP_3331	pnd	phu	pmr	hypothetical protein
PP_3332	pnd	phu	pmr	cytochrome c-type protein
PP_3333	pnd	phu	pmr	
PP_3334	pnd	phu		
PP_3335	pnd	phu	pmr	hypothetical protein
PP_3336	pnd	phu	pmr	hypothetical protein
PP_3337		phu	pmr	hypothetical protein
PP_3339	pnd	phu	pmr	hypothetical protein
PP_3340	pnd	phu		TonB-dependent receptor, putative
PP_3405	pnd	phu		hypothetical protein
PP_4314	pnd	phu		hypothetical protein
PP_4315	pnd	phu		phenazine biosynthesis protein, PhzF family
PP_4316	pnd	phu		2-hydroxyacid dehydrogenase
PP_4604	pnd	phu		hypothetical protein
PP_4836	pnd	phu		hypothetical protein
PP_4837	pnd	phu		hypothetical protein
PP_4838	oprC	pnd	phu	outer membrane copper receptor OprC
PP_4839		pnd	phu	hypothetical protein

**Figure D4-2.** 各核様体タンパク質遺伝子の破壊により共通して転写変動する染色体上の遺伝子 *pnd*、*phu*、*pmr*の単独破壊により(A) 転写量が増加する (B) 転写量が減少する、KT2440(pCAR1)株染色体上の遺伝子数をベン図で示す。nは変動した遺伝子の総数を表す。(C) 各核様体タンパク質遺伝子の単独破壊により共通して転写変動する染色体上の遺伝子の一覧を示す。

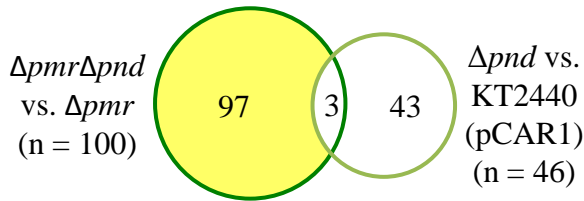
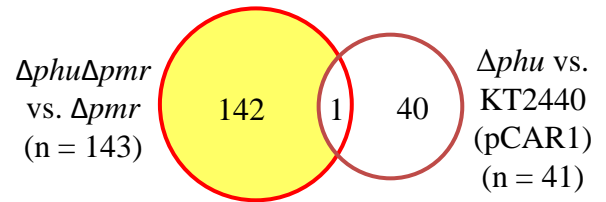
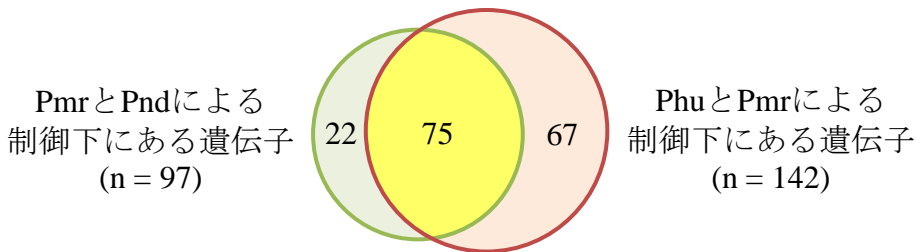


**C**

Gene name	破壊した核様体タンパク質遺伝子	Description
固有に転写量が増加する遺伝子		
PP_1172	<i>pnd</i>	hypothetical protein
固有に転写量が減少する遺伝子		
PP_0202	<i>pnd</i>	CBS domain protein
PP_2203	<i>pnd</i>	hypothetical protein
PP_2873	<i>pnd</i>	hypothetical protein
PP_2994	<i>pnd</i>	oxidoreductase, FMN-binding
PP_3296	<i>pnd</i>	YeeE/YedE family protein
PP_3891	<i>pnd</i>	hypothetical protein
PP_4360	<i>pnd</i>	hypothetical protein
PP_4605	<i>pnd</i>	transcriptional regulator, AraC family
PP_0153	<i>phu</i>	hypothetical protein
PP_1991	<i>phu</i>	hypothetical protein
PP_2385	<i>phu</i>	branched-chain amino acid transport protein AzlC
PP_2883	<i>phu</i>	hypothetical protein
PP_3404	<i>phu</i>	hypothetical protein
PP_3782	<i>phu</i>	hypothetical protein
PP_4214	<i>phu</i>	aminotransferase, class V
PP_0352	<i>pmr</i>	RNA polymerase sigma factor
PP_0534	<i>pmr</i>	transcriptional regulator PfeR, putative
PP_0704	<i>pmr</i>	RNA polymerase sigma-70 factor, ECF subfamily
PP_0865	<i>pmr</i>	RNA polymerase sigma-70 factor, putative
PP_2419	<i>pmr</i>	hypothetical protein
PP_4070	<i>pmr</i>	hypothetical protein
PP_4728	<i>grpE</i>	heat shock protein GrpE
PP_5306	<i>exbB</i>	ferric siderophore transport system protein ExbB
PP_5307	<i>exbD</i>	biopolymer transport protein ExbD
PP_5359	<i>pmr</i>	CobW/P47K family protein

**Figure D4-3.** 各核様体タンパク質遺伝子の破壊により固有に転写変動する染色体上の遺伝子 *pnd*、*phu*、*pmr*の単独破壊により(A) 転写量が増加する (B) 転写量が減少する、KT2440(pCAR1)株染色体上の遺伝子数をベン図で示す。nは変動した遺伝子の総数を表す。(C) 各核様体タンパク質遺伝子の単独破壊により固有に転写変動する染色体上の遺伝子のうち、*pmr*の破壊により転写量が増加する96遺伝子を除いた26遺伝子の一覧を示す。



**A****B****C****Figure D4-4. 複数の核様体タンパク質により協調的に制御される遺伝子の抽出**

(A) *pmr*存在時、非存在時に*pnd*の破壊に伴い転写変動する遺伝子数をベン図で示す。nは変動した遺伝子の総数を表す。PmrとPndによる協調的な制御下にあると推測される遺伝子を黄色で示す。(B) *pmr*存在時、非存在時に*phu*の破壊に伴い転写変動する遺伝子数をベン図で示す。nは変動した遺伝子の総数を表す。PhuとPmrによる協調的な制御下にあると推測される遺伝子を黄色で示す。(C) 2つ以上の核様体タンパク質により制御される遺伝子数をベン図で示す。PmrとPndにより特有に制御される遺伝子を緑色、PhuとPmrにより特有に制御される遺伝子を赤色、3つの核様体タンパク質全ての制御下にある遺伝子を黄色で表す。

Table D4-1. PmrとPndにより特有に制御される22遺伝子

Gene name		Description
染色体上		
転写量が増加する遺伝子		
PP_1685		hypothetical protein
PP_2530		hypothetical protein
PP_5382		hypothetical protein
転写量が減少する遺伝子		
PP_0620		transcriptional regulator, GntR family
PP_0625	<i>clpB</i>	ATP-dependent Clp protease, ATP-binding subunit ClpB
PP_0859		carbon-nitrogen hydrolase family protein
PP_1009	<i>gap-1</i>	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
PP_3147		periplasmic polyamine-binding protein, putative
PP_3320		hypothetical protein
PP_3321		hypothetical protein
PP_3662		decarboxylase family protein
PP_4249		hypothetical protein
PP_4261		cation-transporting P-type ATPase
PP_5361		CobW/P47K family protein
PP_5364	<i>cls</i>	cardiolipin synthetase
pCAR1上		
転写量が増加する遺伝子		
	ORF144	hypothetical protein
	ORF39	hypothetical protein
	<i>ssb</i>	single-strand DNA binding protein
	<i>recT</i>	DNA recombination protein
	<i>trhA</i>	putative transfer protein
	<i>dsbC</i>	putative disulfide bond isomerase
転写量が減少する遺伝子		
	ORF94	hypothetical protein

Table D4-2. PhuとPmrにより特有に制御される67遺伝子

Gene name		Description
染色体上		
転写量が減少する遺伝子		
PP_0354		CBS domain protein
PP_0489		
PP_0504	<i>oprG</i>	outer membrane protein OprG
PP_0545		aldehyde dehydrogenase family protein
PP_0550		hypothetical protein
PP_0585		transcriptional regulator, MerR family
PP_0789	<i>ampD</i>	N-acetyl-anhydromuranmyl-L-alanine amidase
PP_0790		inner membrane protein AmpE
PP_0794	<i>fruK</i>	1-phosphofructokinase
PP_1211		hypothetical protein
PP_1384	<i>ttgC</i>	multidrug/solvent RND outer membrane protein TtgC
PP_1385	<i>ttgB</i>	multidrug/solvent RND transporter TtgB
PP_1631		conserved hypothetical protein TIGR00730
PP_1660		hypothetical protein
PP_1743	<i>actP</i>	acetate permease
PP_1893	<i>fadE</i>	acyl-CoA dehydrogenase
PP_1960		hypothetical protein
PP_1961		hypothetical protein
PP_2018		BNR domain protein
PP_2132		universal stress protein family
PP_2310		methyl-accepting chemotaxis transducer
PP_2512	<i>folE</i>	GTP cyclohydrolase I
PP_2624		hypothetical protein
PP_2628		ABC transporter, ATP-binding protein
PP_2629		hypothetical protein
PP_2630		hypothetical protein
PP_2631		hypothetical protein
PP_2632		hypothetical protein
PP_2665	<i>agmR</i>	DNA-binding response regulator AgmR
PP_2666		hypothetical protein
PP_2669		outer membrane protein, putative
PP_2675		cytochrome c-type protein
PP_2676		periplasmic binding protein, putative
PP_2680		aldehyde dehydrogenase family protein
PP_2681		pyrroloquinoline quinone biosynthesis protein PqqD
PP_2729		hypothetical protein
PP_2853		hypothetical protein
PP_2942		response regulator
PP_3128		exopolysaccharide biosynthesis/transport protein, putative
PP_3134		hypothetical protein
PP_3291		metallo-beta-lactamase family protein
PP_3453		sensor protein RstB, putative
PP_3455		multidrug efflux RND membrane fusion protein
PP_3456		multidrug efflux RND transporter
PP_3457	<i>mobA</i>	molybdopterin-guanine dinucleotide biosynthesis protein A
PP_3580		hypothetical protein
PP_3664	<i>pssA</i>	phosphatidylserine synthase
PP_3720		NAD(P)H quinone oxidoreductase, putative
PP_3721	<i>aspC</i>	aspartate aminotransferase

Table D4-2. 続き

Gene name		Description
染色体上		
転写量が減少する遺伝子		
PP_3742		glutathione S-transferase family protein
PP_3822		cytochrome c family protein
PP_3927		hypothetical protein
PP_3931		transporter, sodium/sulfate symporter family
PP_4050	<i>glgA</i>	glycogen synthase
PP_4285		transthyretin family protein
PP_4448		hypothetical protein
PP_4593		hypothetical protein
PP_4597	<i>moaA</i>	molybdenum cofactor biosynthesis protein A
PP_4650	<i>cioB</i>	ubiquinol oxidase subunit II, cyanide insensitive
PP_4651	<i>cioA</i>	ubiquinol oxidase subunit I, cyanide insensitive
PP_5003	<i>phaA</i>	poly(3-hydroxyalkanoate) polymerase 1
PP_5005	<i>phaC</i>	poly(3-hydroxyalkanoate) polymerase 2
PP_5207		ABC transporter, ATP-binding protein/permease protein, putative
pCAR1上		
転写量が増加する遺伝子		
	ORF105	hypothetical protein
	ORF106	hypothetical protein
	ORF107	hypothetical protein
転写量が減少する遺伝子		
	ORF37	hypothetical protein

Table D4-3. 3つの核様体タンパク質全ての制御下にある75遺伝子

Gene name		Description
染色体上		
転写量が減少する遺伝子		
PP_0181		hypothetical protein
PP_0204		transcriptional regulator, GntR family
PP_0205		hypothetical protein
PP_0235	<i>lsfA</i>	antioxidant protein LsfA
PP_0273		hypothetical protein
PP_0395		hypothetical protein
PP_0396		hypothetical protein
PP_0397		hypothetical protein
PP_0481	<i>katA</i>	catalase
PP_0563		response regulator
PP_0586		heavy metal translocating P-type ATPase
PP_0596		beta alanine--pyruvate transaminase
PP_0619		branched-chain amino acid ABC transporter, periplasmic amino acid-binding protein
PP_0738		hypothetical protein
PP_0739	<i>phrB</i>	deoxyribodipyrimidine photolyase
PP_0807		anaerobic nitric oxide reductase transcription regulator
PP_0998		hypothetical protein
PP_0999	<i>arcC</i>	carbamate kinase
PP_1000	<i>argI</i>	ornithine carbamoyltransferase
PP_1001	<i>arcA</i>	arginine deiminase
PP_1002	<i>arcD</i>	arginine/ornithine antiporter
PP_1003		arginine/ornithine antiporter
PP_1210		DNA-binding stress protein, putative
PP_1291		PhoH family protein
PP_1318	<i>petB</i>	ubiquinol--cytochrome c reductase, cytochrome b
PP_1729		hypothetical protein
PP_1742		hypothetical protein
PP_2010		cytochrome b561
PP_2107		hypothetical protein
PP_2121		lipoprotein, putative
PP_2161		hypothetical protein
PP_2187		universal stress protein family
PP_2648		universal stress protein family
PP_2727		C-factor, putative
PP_2728		hypothetical protein
PP_2730		lipoprotein, putative
PP_2731		hypothetical protein
PP_2732		hypothetical protein
PP_2733		hypothetical protein
PP_2734	<i>cfa</i>	cyclopropane-fatty-acyl-phospholipid synthase
PP_2735		hypothetical protein
PP_2736		hypothetical protein
PP_2737		oxidoreductase, short-chain dehydrogenase/reductase family
PP_2738		transcriptional regulator, putative
PP_2745		universal stress protein family
PP_3234		heat shock protein, HSP20 family
PP_3235		hypothetical protein
PP_3236		lipoprotein OprI, putative
PP_3237		universal stress protein family

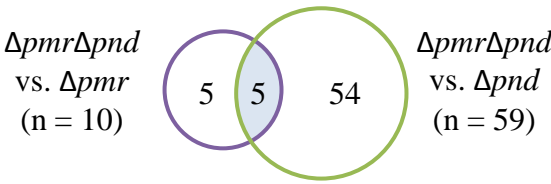
Table D4-3. 続き

Gene		Description
name		
染色体上		
転写量が減少する遺伝子		
PP_3287		transcriptional regulator, Crp/Fnr family
PP_3610		hypothetical protein
PP_3722	<i>alr</i>	alanine racemase
PP_3839		alcohol dehydrogenase
PP_3840		hypothetical protein
PP_4103		low-affinity inorganic phosphate transporter
PP_4234		
PP_4250	<i>ccoN-I</i>	cytochrome c oxidase, cbb3-type, subunit I
PP_4251	<i>ccoO-I</i>	cytochrome c oxidase, cbb3-type, subunit II
PP_4252	<i>ccoQ-I</i>	cytochrome c oxidase, cbb3-type, CcoQ subunit
PP_4253	<i>ccoP-I</i>	cytochrome c oxidase, cbb3-type, subunit III
PP_4259		iron-sulfur cluster-binding protein
PP_4260		hypothetical protein
PP_4264	<i>hemN</i>	coproporphyrinogen III oxidase
PP_4278	<i>xdhA</i>	xanthine dehydrogenase, XdhA subunit
PP_4279	<i>xdhB</i>	xanthine dehydrogenase, XdhB subunit
PP_4428		amino acid ABC transporter, periplasmic amino acid-binding protein
PP_4509		hypothetical protein
PP_4870		azurin
PP_5208		ABC transporter, permease protein
PP_5358		hypothetical protein
PP_5389		hypothetical protein
PP_5390		hypothetical protein
PP_5391		hypothetical protein
PP_5392		hypothetical protein
PP_5394		

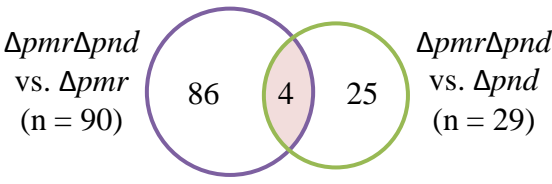
さらに、二重破壊株において継代培養時に pCAR1 の構造変化・脱落の頻度が上昇する原因遺伝子を明らかにするため、*pmr* と *pnd* の二重破壊株と各々の単独破壊株、*phu* と *pmr* の二重破壊株と各々の単独破壊株のトランスクリプトームを比較し、共通して転写変動した遺伝子を抽出した。*pmr* と *pnd* の二重破壊株の解析から、共通して転写変動する遺伝子として染色体上で転写量が増加する 1 遺伝子と減少する 4 遺伝子、pCAR1 上で転写量が増加する 4 遺伝子が見出された (Fig. D4-5)。これらの遺伝子は機能未知なものが多かった。同様に *phu* と *pmr* の二重破壊株の解析から、共通変動遺伝子として染色体上で転写量が減少した 34 遺伝子、pCAR1 上で転写量が増加した 3 遺伝子が抽出された (Fig. D4-6)。これらはいずれも *pmr* と *pnd* の二重破壊株における解析で共通に抽出された 9 遺伝子とは異なるものであり、**4-3-7** や **4-3-10** の実験において二重破壊株特異的に検出された表現型の原因遺伝子と推測されるものは見出されなかった。

二重破壊株での結果をまとめると、*intact* な *pmr* が存在する状態で *pnd* および *phu* を破壊した場合よりも、*pmr* を除去した状態で *pnd* および *phu* を破壊した場合の方が多くの遺伝子の転写量の変動することが明らかとなった。このことから、*pmr* の存在下では *pnd* および *phu* の破壊により生じる宿主への影響が *Pmr* の働きで抑制されるものの、*Pmr* が除去された二重破壊株ではそのような抑制作用が機能しないために多くの遺伝子の転写量の変動したという可能性が推測された。またこの結果は、Phenotype MicroArray 解析において *pmr* を含む 2 つの核様体タンパク質遺伝子を同時に破壊した方がそれぞれを単独で破壊した場合よりも多くの条件で表現型が変化したこととも一致する。一方で、タイリングアレイ解析の結果からは Phenotype MicroArray 解析で表現型が変動した原因と推測される遺伝子、例えば浸透圧ストレス耐性に関する *trkA*、*bet* 遺伝子群、*ompR* 等の遺伝子 [Wood, 2007] や、TCA 回路の代謝に関わる *suc* 遺伝子群、*sdh* 遺伝子群などは抽出されなかった。これはタイリングアレイ解析と Phenotype MicroArray 解析では培地が異なるなど、実験条件が大きく異なることに起因すると推測される。また、相同性組換えに関与する遺伝子も抽出されず、二重破壊株の継代培養時の pCAR1 構造変化を促進する原因遺伝子の特定には至っていない。理由としてはアレイ解析に供したサンプルはいずれも対数増殖期中期の菌体から抽出したものであり、その時点では相同性組換えが生じていない可能性が考えられる。継代培養の培養時間を調節して実験を行うことで相同性組換えが生じる時期を明らかにし、その時点でサンプリングしアレイ解析に供することで原因遺伝子を特定できるかもしれない。あるいは菌体を培養の各時点で経時的にサンプリングし、相同性組換えに関する *recA* 遺伝子などの転写量を定量 RT-PCR により調べることで明らかに出来るかもしれない。

A



B

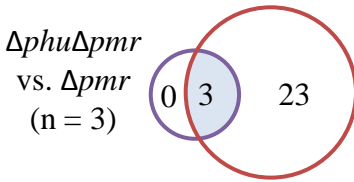
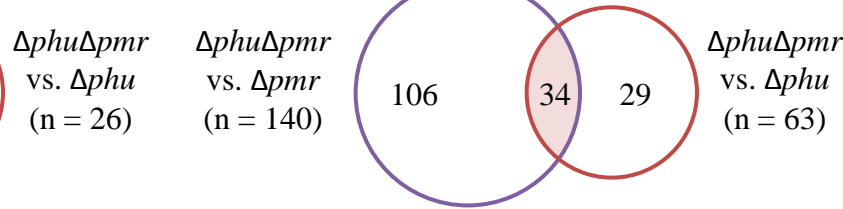


C

Gene name	Description
染色体上	
共通して転写量が増加する遺伝子	
PP_5382	hypothetical protein
共通して転写量が減少する遺伝子	
PP_0620	transcriptional regulator, GntR family
PP_3320	hypothetical protein
PP_3321	hypothetical protein
PP_5361	CobW/P47K family protein
pCAR1上	
共通して転写量が増加する遺伝子	
ORF39	hypothetical protein
<i>dsbC</i>	putative disulfide bond isomerase
ORF144	hypothetical protein
<i>trhA</i>	putative transfer protein

**Figure D4-5.** *pmr*と*pnd*の二重破壊により各々の単独破壊と比較して共通して転写変動する遺伝子 *pmr*と*pnd*を二重に破壊することで各々を単独で破壊した場合よりも(A) 転写量が増加する (B) 転写量が減少する、遺伝子数をベン図で示す。nは変動した遺伝子の総数を表す。(C) *pmr*および*pnd*を単独で破壊した場合と比較して共通して転写変動する遺伝子の一覧を示す。



**A****B****C**

Gene name	Description
染色体上	
共通して転写量が減少する遺伝子	
PP_0235 <i>lsfA</i>	antioxidant protein LsfA
PP_0273	hypothetical protein
PP_0354	CBS domain protein
PP_0545	aldehyde dehydrogenase family protein
PP_0789 <i>ampD</i>	N-acetyl-anhydromuranmyl-L-alanine amidase
PP_0790	inner membrane protein AmpE
PP_1001 <i>arcA</i>	arginine deiminase
PP_1002 <i>arcD</i>	arginine/ornithine antiporter
PP_1291	PhoH family protein
PP_1384 <i>ttgC</i>	multidrug/solvent RND outer membrane protein TtgC
PP_1385 <i>ttgB</i>	multidrug/solvent RND transporter TtgB
PP_1742	hypothetical protein
PP_1743 <i>actP</i>	acetate permease
PP_2010	cytochrome b561
PP_2121	lipoprotein, putative
PP_2161	hypothetical protein
PP_2187	universal stress protein family
PP_2628	ABC transporter, ATP-binding protein
PP_2648	universal stress protein family
PP_2666	hypothetical protein
PP_2675	cytochrome c-type protein
PP_2680	aldehyde dehydrogenase family protein
PP_2731	hypothetical protein
PP_2735	hypothetical protein
PP_2738	transcriptional regulator, putative
PP_3287	transcriptional regulator, Crp/Fnr family
PP_3453	sensor protein RstB, putative
PP_3455	multidrug efflux RND membrane fusion protein
PP_3456	multidrug efflux RND transporter
PP_3839	alcohol dehydrogenase
PP_3927	hypothetical protein
PP_4250 <i>ccoN-1</i>	cytochrome c oxidase, cbb3-type, subunit I
PP_4252 <i>ccoQ-1</i>	cytochrome c oxidase, cbb3-type, CcoQ subunit
PP_5392	hypothetical protein
pCAR1上	
共通して転写量が増加する遺伝子	
ORF105	hypothetical protein
ORF106	hypothetical protein
ORF107	hypothetical protein

**Figure D4-6. *phu*と*pmr*の二重破壊により各々の単独破壊と比較して共通して転写変動する遺伝子**  
*phu*と*pmr*を二重に破壊することで各々を単独で破壊した場合よりも(A) 転写量が増加する (B) 転写量が減少する、遺伝子数をベン図で示す。nは変動した遺伝子の総数を表す。(C) *phu*および*pmr*を単独で破壊した場合と比較して共通して転写変動する遺伝子の一覧を示す。

以上の解析より、二重破壊株では多くの遺伝子の転写量が変動し、表現型にも変化が生じていることが明らかとなった。そのため、単独破壊株では野生株と比較して運動性に変化が認められなかったが、二重破壊株で運動性試験を行うことで野生株および単独破壊株とは異なる運動性が観察されるかもしれない。また、大腸菌においてプラスミドを保持するだけでバイオフィーム形成能が上昇し、菌体が凝集しやすくなる [Yang et al., 2008]という知見から、当研究室の李らにより KT2440 株、KT2440(pCAR1)株、単独破壊株および二重破壊株に実験室環境での固体表面上でバイオフィームを形成させ、バイオフィーム構造やバイオフィーム中での菌体の様子を比較する実験が行われている。その結果、KT2440 株は pCAR1 を保持することでバイオフィーム中で菌体が若干 filamentous になること、二重破壊株は KT2440(pCAR1)株や単独破壊株と比較してより顕著な filamentous 形状を示すことが明らかとなりつつある [当研究室、李ら、未発表データ]。すなわち、各 NAPs はバイオフィーム中の菌体の生理的な状態にも大きく影響を与えていると考えられ、各株を混合した状態でバイオフィームを形成させ、バイオフィーム中での菌体の分布や割合が野生株と各破壊株で変化するかを調べることにより、各 NAPs 破壊が宿主に与える影響をより広く明らかにすることができるであろう。

さらに、今後は各核様体タンパク質間の協調的な遺伝子転写制御機構についてより詳細な解析を行っていく必要がある。精製 Pmr、Phu、Pnd を用いたプルダウンアッセイやビアコア法によりタンパク質間相互作用の有無を明らかにすることが可能であろう。相互作用検出法としては bacterial two-hybrid assay [Karimova et al., 1998]も有用だと思われる。これらの解析を行うことで、pCAR1 上にコードされる各核様体タンパク質を単独、あるいは二重に破壊した際に宿主に生じた変化の原因に迫れるものと期待される。

## 第5章

### 総括と展望

本研究では、核様体タンパク質遺伝子のプラスミド上での分布を明らかにし、その特徴を考察した。また、カルバゾール分解プラスミド pCAR1 上にコードされる3種の核様体タンパク質(Pmr、Pnd、Phu)の性質および、各々を除去することで宿主に生じる影響を網羅的に解析した。

第2章では、グラム陰性細菌由来の主要な核様体タンパク質をコードする遺伝子を保持するプラスミドを網羅的に抽出し、それらのプラスミドはサイズが大きい傾向があることを見出した [Takeda et al., in press]。本研究はプラスミド上に存在する核様体タンパク質遺伝子について網羅的・客観的な情報を示した初めての例であり、細菌染色体上における核様体タンパク質遺伝子の分布を考察する上でも、また遺伝子の水平伝播による細菌の進化を考察する上でも非常に有用な基礎的知見を提供すると考えられる。一方、核様体タンパク質は広く原核生物全般において重要な役割を担っていると考えられるが、これまでの研究は主にグラム陰性細菌由来の核様体タンパク質を対象に行われてきた。そうした中、近年、グラム陽性細菌において H-NS 様因子 Lsr2 が見出され、グラム陰性細菌の H-NS と同様に AT-rich な領域に結合し、主に global な転写抑制因子として働くという研究例が報告された [Gordon et al., 2008, 2010]。こうした背景から、今後はグラム陽性細菌や古細菌などにおいても核様体タンパク質の研究が盛んに行われることが予想される。そこでグラム陽性細菌由来、古細菌由来の核様体タンパク質をコードする遺伝子についても本研究と同様の手法によりプラスミド上での分布を調べることで、核様体タンパク質の機能・役割を明らかにする上で重要な知見が得られるものと期待される。

第3章では、pCAR1 上にコードされる核様体タンパク質 Phu が染色体由来の HU と同様の性質・機能を有する可能性が高いことを示した。KT2440(pCAR1)株内でタンパク質としての発現の検出には至っていないが、大腸菌由来の HU と同様の発現プロファイル [Azam et al., 1999a]を示すとすれば、Phu は対数増殖期をピークとしつつ、全ての生育段階において構成的に発現していることが予想される。Pmr は菌体内で生育段階後期になるにつれてタンパク質としての発現量が増加することが示されている [Yun and Suzuki et al., 2010] (Fig. D3-2)ことを考慮すると、Phu と Pmr は菌体内でのタンパク質レベルでの発現プロファイルが異なり、それにより生育段階ごとに異なる転写制御に関わっている可能性も考えられる。一方 Pnd についても菌体内でタンパク質の発現の検出には至っておらず、NdpA 自体研究例がほとんどなく多量体形成能や菌体内での発現プロファイルが不明なタンパク質であることから、現時点ではタンパク質レベルでの発現プロファイルの予測は不可能である。pnd は停止期よりも

対数増殖期の方が転写量が多い傾向があるものの、mRNA の転写量とタンパク質の存在量は必ずしも一致しない [Deighan et al., 2003; Vallet-Gely et al., 2005]ことに注意しなければならない。Phu、Pnd いずれも C 末端側に His タグを付加したことで菌体内での発現量が変化した可能性を考慮し、今後は His タグ付加位置を変更した株を作製したり、各核様体タンパク質特異的な抗体を作製してウェスタンブロット解析に供することで、菌体内での発現様式を明らかにする必要がある。また各タンパク質について DNA との結合能やタンパク質間相互作用の有無を調べることで、菌体内での役割に迫ることが出来るであろう。

第 4 章では各核様体タンパク質を 1 つあるいは 2 つ除去した破壊株を作製することで、*pmr* を含む 2 つの核様体タンパク質遺伝子を除去した場合に初めて pCAR1 構造が不安定化するという表現型が発現することを明らかにした。また各株を Phenotype MicroArray やタイリングアレイによる網羅的解析に供することで、菌体内では pCAR1 由来の 3 つの核様体タンパク質のうち Pmr が中心となって機能し、Phu および Pnd が補佐的に働くことで多数の遺伝子について協調的な転写制御を行っている可能性が推測された。さらに各核様体タンパク質は TCA 回路およびその周囲の基質の代謝など、宿主の表現型の根幹に関わる制御にも関与することが強く示唆されると共に、Phu および Pnd は宿主の浸透圧ストレス耐性に関して逆の制御を行うなど、異なる機能を有することが明らかとなった。本研究は、複数の核様体タンパク質遺伝子を保持するプラスミドにおいて、複数の核様体タンパク質遺伝子を除去した際の影響を網羅的に解析した初めての例である。一方、pCAR1 安定性試験および Phenotype MicroArray 解析で見出された表現型は、いずれも対数増殖期や停止期など様々な生育段階を経た菌体の総合的な結果を示すものであるのに対し、タイリングアレイで見出された結果は中期対数増殖期の 1 時点での菌体の様子を示しているに過ぎない。そのため、見出された各表現型の原因をより明確にするためには、異なる経時点におけるタイリングアレイ解析などを行う必要があるであろう。また、3 つの核様体タンパク質遺伝子を全て除去した破壊株を作製し、表現型を二重破壊株と比較することで各核様体タンパク質遺伝子の機能にさらに迫れるものと考えられる。

本研究により、カルバゾール分解プラスミド pCAR1 上にコードされる 3 つの核様体タンパク質が協調的に作用しあい、プラスミド機能をはじめとして宿主に様々な影響を与えることが明らかとなった。今後は本研究で明らかになったレギュロンについて、各核様体タンパク質が実際にどのように制御に関わっているのかを明らかにする必要があると考えられる。そのため、まずは各々についてタンパク質レベルでの相互作用の有無を調べる必要がある。また、プラスミド由来の核様体タンパク質は宿主染色体由来の核様体タンパク質と相互作用することが知られており [Deighan et al., 2003]、Pmr については宿主染色体由来の H-NS 様因子とのタンパク質レベルでの相互作用が示されている [Yun and Suzuki et al., 2010]。そこで Phu、Pnd と宿主染色体由来の HU、NdpA との相互作用の有無に興味を持たれる。

さらに、本研究は *P. putida* KT2440 株のみを宿主として解析を行ったが、pCAR1 は接合伝達性プラスミドであり *Pseudomonas* 属細菌を中心として他の細菌にも保持されうる。宿主が異なれば染色体上にコードされる核様体タンパク質の種類・数も異なり、pCAR1 上の各核様体タンパク質の相互作用様式も変化するものと予想される。そのため、今後は異なる宿主においても pCAR1 上の核様体タンパク質を除去した際の影響を調べることで、pCAR1 上にコードされる 3 つの核様体タンパク質の役割についてより深い理解が得られるものと期待される。pCAR1 は不和合性群 IncP-7 に属するプラスミドであり、IncP-7 に属するプラスミドについては現在までに pCAR1 以外に pWW53 [Yano et al., 2007]、pND6-1 [Li et al., 2004]、pDK1 [Yano et al., 2010] の全塩基配列が明らかとなっている。pND6-1 は全長約 100 kb で核様体タンパク質遺伝子を持たないが、pWW53 は約 100 kb、pDK1 は約 130 kb でいずれも MvaT ホモログ遺伝子を有する。これらに対して約 200 kb とサイズが大きい pCAR1 が 3 つもの核様体タンパク質遺伝子を基本骨格部位に保持しているという事実は非常に興味深い。今後、上述の研究を行うことで、pCAR1 上に 3 つの核様体タンパク質遺伝子が存在する意義について、ひいてはプラスミドの構造進化に関して考察することも可能となるであろう。

## 参考文献

- Aeling KA, Opel ML, Steffen NR, Tretyachenko-Ladokhina V, Hatfield GW, Lathrop RH, Senear DF.** 2006. Indirect recognition in sequence-specific DNA binding by *Escherichia coli* integration host factor: the role of DNA deformation energy. *J. Biol. Chem.* **281(51)**: 39236-39248.
- Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, Moore DD, Seidman JG, Smith JA, Struhl K.** 1990. Current Protocols in Molecular Biology. John Wiley and Sons, Inc., N. Y.
- Azam TA, Iwata A, Nishimura A, Ueda S, Ishihama A.** 1999a. Growth phase-dependent variation in protein composition of the *Escherichia coli* nucleoid. *J. Bacteriol.* **181(20)**: 6361-6370.
- Azam TA, Ishihama A.** 1999b. Twelve species of the nucleoid-associated protein from *Escherichia coli*. Sequence recognition specificity and DNA binding affinity. *J. Biol. Chem.* **274(46)**: 33105-33113.
- Baehler E, de Werra P, Wick LY, Péchy-Tarr M, Mathys S, Maurhofer M, Keel C.** 2006. Two novel MvaT-like global regulators control exoproduct formation and biocontrol activity in root-associated *Pseudomonas fluorescens* CHA0. *Mol. Plant Microbe Interact.* **19(3)**: 313-329.
- Bagdasarian M, Lurz R, Rückert B, Franklin FC, Bagdasarian MM, Frey J, Timmis KN.** 1981. Specific-purpose plasmid cloning vectors. II. Broad host range, high copy number, RSF1010-derived vectors, and a host-vector system for gene cloning in *Pseudomonas*. *Gene.* **16(1-3)**: 237-247.
- Ball CA, Osuna R, Ferguson KC, Johnson RC.** 1992. Dramatic changes in Fis levels upon nutrient upshift in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **174(24)**: 8043-8056.
- Bartels F, Fernández S, Holtel A, Timmis KN, de Lorenzo V.** 2001. The essential HupB and HupN proteins of *Pseudomonas putida* provide redundant and nonspecific DNA-bending functions. *J. Biol. Chem.* **276(20)**: 16641-16648.
- Beloin C, Deighan P, Doyle M, Dorman CJ.** 2003. *Shigella flexneri* 2a strain 2457T expresses three members of the H-NS-like protein family: characterization of the Sfh protein. *Mol. Genet. Genomics.* **270(1)**: 66-77.
- Bradford MM.** 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**: 248-254.
- Bradley MD, Beach MB, de Koning AP, Pratt TS, Osuna R.** 2007. Effects of Fis on *Escherichia coli* gene expression during different growth stages. *Microbiology.* **153(9)**: 2922-2940.
- Boubrik F, Rouviere-Yaniv J.** 1995. Increased sensitivity to gamma irradiation in bacteria lacking protein HU. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **92(9)**: 3958-3962.
- Carattoli A.** 2003. Plasmid-mediated antimicrobial resistance in *Salmonella enterica*. *Curr. Issues Mol. Biol.* **5(4)**: 113-122.
- Castaing B, Zelwer C, Laval J, Boiteux S.** 1995. HU protein of *Escherichia coli* binds specifically to DNA that contains single-strand breaks or gaps. *J. Biol. Chem.* **270(17)**: 10291-10296.
- Castang S, McManus HR, Turner KH, Dove SL.** 2008. H-NS family members function coordinately in an opportunistic pathogen. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **105(48)**: 18947-18952.

- Cho BK, Barrett CL, Knight EM, Park YS, Palsson BØ.** 2008a. Genome-scale reconstruction of the Lrp regulatory network in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **105(49)**: 19462-19467.
- Cho BK, Knight EM, Barrett CL, Palsson BØ.** 2008b. Genome-wide analysis of Fis binding in *Escherichia coli* indicates a causative role for A-/AT-tracts. *Genome Res.* **18(6)**: 900-910.
- Chodavarapu S, Felczak MM, Yaniv JR, Kaguni JM.** 2008. *Escherichia coli* DnaA interacts with HU in initiation at the *E. coli* replication origin. *Mol. Microbiol.* **67(4)**: 781-792.
- Choi KH, Schweizer HP.** 2005. An improved method for rapid generation of unmarked *Pseudomonas aeruginosa* deletion mutants. *BMC Microbiol.* **5**: 30.
- Claret L, Rouviere-Yaniv J.** 1996. Regulation of HU $\alpha$  and HU $\beta$  by CRP and FIS in *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.* **263(2)**: 126-139.
- Claret L, Rouvière-Yaniv J.** 1997. Variation in HU composition during growth of *Escherichia coli*: the heterodimer is required for long term survival. *J. Mol. Biol.* **273(1)**: 93-104.
- Cui Y, Wang Q, Stormo GD, Calvo JM.** 1995. A consensus sequence for binding of Lrp to DNA. *J. Bacteriol.* **177(17)**: 4872-4880.
- Dame RT, Wyman C, Goosen N.** 2000. H-NS mediated compaction of DNA visualised by atomic force microscopy. *Nucleic Acids Res.* **28(18)**: 3504-3510.
- Dame RT, Wyman C, Wurm R, Wagner R, Goosen N.** 2002a. Structural basis for H-NS mediated trapping of RNA polymerase in the open initiation complex at the *rrnB* P1. *J. Biol. Chem.* **277(3)**: 2146-2150.
- Dame RT, Goosen N.** 2002b. HU: promoting or counteracting DNA compaction? *FEBS Lett.* **529(2-3)**: 151-156.
- Dame RT, Noom MC, Wuite GJ.** 2006. Bacterial chromatin organization by H-NS protein unravelled using dual DNA manipulation. *Nature.* **444(7117)**: 387-390.
- de los Rios S, Perona JJ.** 2007. Structure of the *Escherichia coli* leucine-responsive regulatory protein Lrp reveals a novel octameric assembly. *J. Mol. Biol.* **366(5)**: 1589-1602.
- Deighan P, Beloin C, Dorman CJ.** 2003. Three-way interactions among the Sfh, StpA and H-NS nucleoid-structuring proteins of *Shigella flexneri* 2a strain 2457T. *Mol. Microbiol.* **48(5)**: 1401-1416.
- Diggle SP, Winzer K, Lazdunski A, Williams P, Cámara M.** 2002. Advancing the quorum in *Pseudomonas aeruginosa*: MvaT and the regulation of N-acylhomoserine lactone production and virulence gene expression. *J. Bacteriol.* **184(10)**: 2576-2586.
- Dillon SC, Cameron AD, Hokamp K, Lucchini S, Hinton JC, Dorman CJ.** 2010. Genome-wide analysis of the H-NS and Sfh regulatory networks in *Salmonella* Typhimurium identifies a plasmid-encoded transcription silencing mechanism. *Mol. Microbiol.* **76(5)**: 1250-1265.
- Dillon SC, Dorman CJ.** 2010. Bacterial nucleoid-associated proteins, nucleoid structure and gene expression. *Nat. Rev. Microbiol.* **8(3)**: 185-195.
- Ditto MD, Roberts D, Weisberg RA.** 1994. Growth phase variation of integration host factor level in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **176(12)**: 3738-3748.

- Domínguez-Cuevas P, Marqués S.** 2004. Compiling  $\sigma^{70}$ -Dependent Promoters, p. 319-343. Ramos JL. (ed.), *Pseudomonas*, vol. 2. Kluwer Academic / Plenum Publishers, N. Y.
- Dorman CJ.** 2004. H-NS: a universal regulator for a dynamic genome. *Nat. Rev. Microbiol.* **2(5)**: 391–400.
- Dorman CJ.** 2009. Nucleoid-associated proteins and bacterial physiology. *Adv. Appl. Microbiol.* **67**: 47–64.
- Doyle M, Fookes M, Ivens A, Mangan MW, Wain J, Dorman CJ.** 2007. An H-NS-like stealth protein aids horizontal DNA transmission in bacteria. *Science.* **315(5809)**: 251–252.
- Falconi M, Brandi A, La Teana A, Gualerzi CO, Pon CL.** 1996. Antagonistic involvement of FIS and H-NS proteins in the transcriptional control of *hns* expression. *Mol. Microbiol.* **19(5)**: 965-975.
- Fernández S, Rojo F, Alonso JC.** 1997. The *Bacillus subtilis* chromatin-associated protein Hbsu is involved in DNA repair and recombination. *Mol. Microbiol.* **23(6)**: 1169-1179.
- Filutowicz M, Ross W, Wild J, Gourse RL.** 1992. Involvement of Fis protein in replication of the *Escherichia coli* chromosome. *J. Bacteriol.* **174(2)**: 398-407.
- Forns N, Banos RC, Balsalobre C, Jua´rez A, Madrid C.** 2005. Temperature-dependent conjugative transfer of R27: role of chromosome- and plasmid-encoded Hha and H-NS proteins. *J. Bacteriol.* **187(12)**: 3950–3959.
- Friedman DI.** 1988. Integration host factor: a protein for all reasons. *Cell.* **55(4)**: 545-554.
- Frost LS, Leplae R, Summers AO, Toussaint A.** 2005. Mobile genetic elements: the agents of open source evolution. *Nat. Rev. Microbiol.* **3(9)**: 722-732.
- Garcillán-Barcia MP, Francia MV, de la Cruz F.** 2009. The diversity of conjugative relaxases and its application in plasmid classification. *FEMS Microbiol. Rev.* **33(3)**: 657-687.
- Gille H, Egan JB, Roth A, Messer W.** 1991. The FIS protein binds and bends the origin of chromosomal DNA replication, *oriC*, of *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Res.* **19(15)**: 4167-4172.
- Gordon BR, Imperial R, Wang L, Navarre WW, Liu J.** 2008. Lsr2 of *Mycobacterium* represents a novel class of H-NS-like proteins. *J. Bacteriol.* **190(21)**: 7052-7059.
- Gordon BR, Li Y, Wang L, Sintsova A, van Bakel H, Tian S, Navarre WW, Xia B, Liu J.** 2010. Lsr2 is a nucleoid-associated protein that targets AT-rich sequences and virulence genes in *Mycobacterium tuberculosis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **107(11)**: 5154-5159.
- Grainger DC, Hurd D, Goldberg MD, Busby SJ.** 2006. Association of nucleoid proteins with coding and non-coding segments of the *Escherichia coli* genome. *Nucleic Acids Res.* **34(16)**: 4642–4652
- Grainger DC, Busby SJ.** 2008. Global regulators of transcription in *Escherichia coli*: mechanisms of action and methods for study. *Adv. Appl. Microbiol.* **65**: 93-113.
- Hancock R.** 2004a. Internal organisation of the nucleus: assembly of compartments by macromolecular crowding and the nuclear matrix model. *Biol. Cell.* **96(8)**: 595–601.
- Hancock R.** 2004b. A role for macromolecular crowding effects in the assembly and function of compartments in the nucleus. *J. Struct. Biol.* **146(3)**: 281–290.



- Hancock R.** 2007. Packing of the polynucleosome chain in interphase chromosomes: evidence for a contribution of crowding and entropic forces. *Semin. Cell Dev. Biol.* **18(5)**: 668–675.
- Hardy CD, Cozzarelli NR.** 2005. A genetic selection for supercoiling mutants of *Escherichia coli* reveals proteins implicated in chromosome structure. *Mol. Microbiol.* **57(6)**: 1636–1652.
- Harshey RM.** 2003. Bacterial motility on a surface: many ways to a common goal. *Annu. Rev. Microbiol.* **57**: 249–273.
- Heuer H, Krsek M, Baker P, Smalla K, Wellington EM.** 1997. Analysis of actinomycete communities by specific amplification of genes encoding 16S rRNA and gel-electrophoretic separation in denaturing gradients. *Appl. Environ. Microbiol.* **63(8)**: 3233–3241.
- Hoang TT, Karkhoff-Schweizer RR, Kutchma AJ, Schweizer HP.** 1998. A broad-host-range Flp-*FRT* recombination system for site-specific excision of chromosomally-located DNA sequences: application for isolation of unmarked *Pseudomonas aeruginosa* mutants. *Gene.* **212(1)**: 77–86.
- Huisman O, Faelen M, Girard D, Jaffé A, Toussaint A, Rouvière-Yaniv J.** 1989. Multiple defects in *Escherichia coli* mutants lacking HU protein. *J. Bacteriol.* **171(7)**: 3704–3712.
- Hung SP, Baldi P, Hatfield GW.** 2002. Global gene expression profiling in *Escherichia coli* K12. The effects of leucine-responsive regulatory protein. *J. Biol. Chem.* **277(43)**: 40309–40323.
- Johnson RC, Glasgow AC, Simon MI.** 1987. Spatial relationship of the Fis binding sites for Hin recombinational enhancer activity. *Nature.* **329(6138)**: 462–465.
- Jin DJ, Cabrera JE.** 2006. Coupling the distribution of RNA polymerase to global gene regulation and the dynamic structure of the bacterial nucleoid in *Escherichia coli*. *J. Struct. Biol.* **156(2)**: 284–291.
- Juhas M, van der Meer JR, Gaillard M, Harding RM, Hood DW, Crook DW.** 2009. Genomic islands: tools of bacterial horizontal gene transfer and evolution. *FEMS Microbiol. Rev.* **33(2)**: 376–393.
- Karimova G, Pidoux J, Ullmann A, Ladant D.** 1998. A bacterial two-hybrid system based on a reconstituted signal transduction pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **95(10)**: 5752–5756.
- Kohno K, Wada M, Kano Y, Imamoto F.** 1990. Promoters and autogenous control of the *Escherichia coli* *hupA* and *hupB* genes. *J. Mol. Biol.* **213(1)**: 27–36.
- Kono N, Arakawa K, Ogawa R, Kido N, Oshita K, Ikegami K, Tamaki S, Tomita M.** 2009. Pathway projector: web-based zoomable pathway browser using KEGG atlas and Google Maps API. *PLoS One.* **4(11)**: e7710.
- Kovach ME, Elzer PH, Hill DS, Robertson GT, Farris MA, Roop RM 2nd, Peterson KM.** 1995. Four new derivatives of the broad-host-range cloning vector pBBR1MCS, carrying different antibiotic-resistance cassettes. *Gene.* **166(1)**: 175–176.
- Laemmli UK.** 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* **227(5259)**: 680–685.
- Lang B, Blot N, Bouffartigues E, Buckle M, Geertz M, Gualerzi CO, Mavathur R, Muskhelishvili G, Pon CL, Rimsky S, Stella S, Babu MM, Travers A.** 2007. High-affinity DNA binding sites for H-NS provide a molecular basis for selective silencing within proteobacterial genomes. *Nucleic Acids Res.* **35(18)**: 6330–6337.

- Li S, Waters R.** 1998. *Escherichia coli* strains lacking protein HU are UV sensitive due to a role for HU in homologous recombination. *J. Bacteriol.* **180**(15): 3750-3756.
- Li W, Shi J, Wang X, Han Y, Tong W, Ma L, Liu B, Cai B.** 2004. Complete nucleotide sequence and organization of the naphthalene catabolic plasmid pND6-1 from *Pseudomonas* sp. strain ND6. *Gene.* **336**(2): 231-240.
- Lucchini S, Rowley G, Goldberg MD, Hurd D, Harrison M, Hinton JC.** 2006. H-NS mediates the silencing of laterally acquired genes in bacteria. *PLoS. Pathog.* **2**(8): e81.
- Luijsterburg MS, Noom MC, Wuite GJ, Dame RT.** 2006. The architectural role of nucleoid-associated proteins in the organization of bacterial chromatin: a molecular perspective. *J. Struct. Biol.* **156**(2): 262-272.
- Luijsterburg MS, White MF, van Driel R, Dame RT.** 2008. The major architects of chromatin: architectural proteins in bacteria, archaea and eukaryotes. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **43**(6): 393-418.
- Madrid C, Balsalobre C, García J, Juárez A.** 2007. The novel Hha/YmoA family of nucleoid-associated proteins: use of structural mimicry to modulate the activity of the H-NS family of proteins. *Mol. Microbiol.* **63**(1): 7-14.
- Maeda K, Nojiri H, Shintani M, Yoshida T, Habe H, Omori T.** 2003. Complete nucleotide sequence of carbazole/dioxin-degrading plasmid pCAR1 in *Pseudomonas resinovorans* strain CA10 indicates its mosaicity and the presence of large catabolic transposon Tn4676. *J. Mol. Biol.* **326**(1): 21-33.
- Majdalani N, Vanderpool CK, Gottesman S.** 2005. Bacterial small RNA regulators. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **40**(2): 93-113.
- Mangan MW, Lucchini S, Danino V, Cróinín TO, Hinton JC, Dorman CJ.** 2006. The integration host factor (IHF) integrates stationary-phase and virulence gene expression in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Mol. Microbiol.* **59**(6): 1831-1847.
- Marshall DG, Sheehan BJ, Dorman CJ.** 1999. A role for the leucine-responsive regulatory protein and integration host factor in the regulation of the *Salmonella* plasmid virulence (*spv*) locus in *Salmonella typhimurium*. *Mol. Microbiol.* **34**(1): 134-145.
- Matilla MA, Ramos JL, Duque E, de Dios Alché J, Espinosa-Urgel M, Ramos-González MI.** 2007. Temperature and pyoverdine-mediated iron acquisition control surface motility of *Pseudomonas putida*. *Environ. Microbiol.* **9**(7): 1842-1850.
- Maurer S, Fritz J, Muskhelishvili G.** 2009. A systematic in vitro study of nucleoprotein complexes formed by bacterial nucleoid-associated proteins revealing novel types of DNA organization. *J. Mol. Biol.* **387**(5): 1261-1276.
- Miyakoshi M, Shintani M, Terabayashi T, Kai S, Yamane H, Nojiri H.** 2007. Transcriptome analysis of *Pseudomonas putida* KT2440 harboring the completely sequenced IncP-7 plasmid pCAR1. *J. Bacteriol.* **189**(19): 6849-6860.
- Müller CM, Dobrindt U, Nagy G, Emody L, Uhlin BE, Hacker J.** 2006. Role of histone-like proteins H-NS and StpA in expression of virulence determinants of uropathogenic *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **188**(15): 5428-5438.
- Murphy LD, Rosner JL, Zimmerman SB, Esposito D.** 1999. Identification of two new proteins in spermidine nucleoids isolated from *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **181**(12): 3842-3844.

- Nasser W, Rochman M, Muskhelishvili G.** 2002. Transcriptional regulation of *fis* operon involves a module of multiple coupled promoters. *EMBO J.* **21(4)**: 715-724.
- Navarre WW, Porwollik S, Wang Y, McClelland M, Rosen H, Libby SJ, Fang FC.** 2006. Selective silencing of foreign DNA with low GC content by the H-NS protein in *Salmonella*. *Science*. **313(5784)**: 236–238.
- Navarre WW, McClelland M, Libby SJ, Fang FC.** 2007. Silencing of xenogeneic DNA by H-NS-facilitation of lateral gene transfer in bacteria by a defense system that recognizes foreign DNA. *Genes Dev.* **21(12)**: 1456–1471.
- Nojiri H, Sekiguchi H, Maeda K, Urata M, Nakai S, Yoshida T, Habe H, Omori T.** 2001. Genetic characterization and evolutionary implications of a *car* gene cluster in the carbazole degrader *Pseudomonas* sp. strain CA10. *J. Bacteriol.* **183(12)**: 3663-3679.
- Noom MC, Navarre WW, Oshima T, Wuite GJ, Dame RT.** 2007. H-NS promotes looped domain formation in the bacterial chromosome. *Curr. Biol.* **17(21)**: R913–R914.
- Oberto J, Nabti S, Jooste V, Mignot H, Rouviere-Yaniv J.** 2009. The HU regulon is composed of genes responding to anaerobiosis, acid stress, high osmolarity and SOS induction. *PLoS One*. **4(2)**: e4367.
- Oshima T, Ishikawa S, Kurokawa K, Aiba H, Ogasawara N.** 2006. *Escherichia coli* histone-like protein H-NS preferentially binds to horizontally acquired DNA in association with RNA polymerase. *DNA Res.* **13(4)**: 141–153.
- Ouchiya N, Zhang Y, Omori T, Kodama T.** 1993. Biodegradation of carbazole by *Pseudomonas* spp. CA06 and CA10. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **57(3)**: 455-460.
- Perocchi F, Xu Z, Clauder-Münster S, Steinmetz LM.** 2007. Antisense artifacts in transcriptome microarray experiments are resolved by actinomycin D. *Nucleic Acids Res.* **35(19)**: e128.
- Pinson V, Takahashi M, Rouviere-Yaniv J.** 1999. Differential binding of the *Escherichia coli* HU, homodimeric forms and heterodimeric form to linear, gapped and cruciform DNA. *J. Mol. Biol.* **287(3)**: 485-497.
- Postow L, Hardy CD, Arsuaga J, Cozzarelli NR.** 2004. Topological domain structure of the *Escherichia coli* chromosome. *Genes Dev.* **18(14)**: 1766–1779.
- Ramos JL, Marqués S, Timmis KN.** 1997. Transcriptional control of the *Pseudomonas* TOL plasmid catabolic operons is achieved through an interplay of host factors and plasmid-encoded regulators. *Annu. Rev. Microbiol.* **51**: 341-373.
- Rescalli E, Saini S, Bartocci C, Rychlewski L, De Lorenzo V, Bertoni G.** 2004. Novel physiological modulation of the *Pu* promoter of TOL plasmid: negative regulatory role of the TurA protein of *Pseudomonas putida* in the response to suboptimal growth temperatures. *J. Biol. Chem.* **279(9)**: 7777-7784.
- Rosenthal RS, Rodwell VW.** 1998. Purification and characterization of the heteromeric transcriptional activator MvaT of the *Pseudomonas mevalonii mvaAB* operon. *Protein Sci.* **7(1)**: 178-184.
- Sambrook J, Russell DW.** 2001. Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3rd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N. Y.
- Sato SI, Ouchiya N, Kimura T, Nojiri H, Yamane H, Omori T.** 1997. Cloning of genes involved in carbazole degradation of *Pseudomonas* sp. strain CA10: nucleotide sequences of genes and characterization of meta-cleavage enzymes and hydrolase. *J. Bacteriol.* **179(15)**: 4841-4849.

- Schäfer A, Tauch A, Jäger W, Kalinowski J, Thierbach G, Pühler A.** 1994. Small mobilizable multi-purpose cloning vectors derived from the *Escherichia coli* plasmids pK18 and pK19: selection of defined deletions in the chromosome of *Corynebacterium glutamicum*. *Gene*. **145**(1): 69-73.
- Schägger H.** 2006. Tricine-SDS-PAGE. *Nat. Protoc.* **1**(1): 16-22.
- Schweizer HP.** 2003. Applications of the *Saccharomyces cerevisiae* Flp-FRT system in bacterial genetics. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* **5**(2): 67-77.
- Sheikh J, Hicks S, Dall'Agnol M, Phillips AD, Nataro JP.** 2001. Roles for Fis and YafK in biofilm formation by enteroaggregative *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* **41**(5): 983-997.
- Sherburne CK, Lawley TD, Gilmour MW, Blattner FR, Burland V, Grotbeck E, Rose DJ, Taylor DE.** 2000. The complete DNA sequence and analysis of R27, a large IncHI plasmid from *Salmonella typhi* that is temperature sensitive for transfer. *Nucleic Acids Res.* **28**(10): 2177-2186.
- Shin M, Song M, Rhee JH, Hong Y, Kim YJ, Seok YJ, et al.** 2005. DNA looping-mediated repression by histone-like protein H-NS: specific requirement of Eo<sup>70</sup> as a cofactor for looping. *Genes Dev.* **19**(19): 2388-2398.
- Shintani M, Yano H, Habe H, Omori T, Yamane H, Tsuda M, Nojiri H.** 2006. Characterization of the replication, maintenance, and transfer features of the IncP-7 plasmid pCAR1, which carries genes involved in carbazole and dioxin degradation. *Appl. Environ. Microbiol.* **72**(5): 3206-3216.
- Shintani M, Takahashi Y, Tokumaru H, Kadota K, Hara H, Miyakoshi M, Naito K, Yamane H, Nishida H, Nojiri H.** 2010. Response of the *Pseudomonas* host chromosomal transcriptome to carriage of the IncP-7 plasmid pCAR1. *Environ. Microbiol.* **12**(6): 1413-1426.
- Simon R, O'Connell M, Labes M, Pühler A.** 1986. Plasmid vectors for the genetic analysis and manipulation of rhizobia and other gram-negative bacteria. *Methods Enzymol.* **118**: 640-659.
- Skoko D, Yoo D, Bai H, Schnurr B, Yan J, McLeod SM, Marko JF, Johnson RC.** 2006. Mechanism of chromosome compaction and looping by the *Escherichia coli* nucleoid protein Fis. *J. Mol. Biol.* **364**(4): 777-798.
- Swinger KK, Lemberg KM, Zhang Y, Rice PA.** 2003. Flexible DNA bending in HU-DNA cocrystal structures. *EMBO J.* **22**(14): 3749-3760.
- Swinger KK, Rice PA.** 2004. IHF and HU: flexible architects of bent DNA. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **14**(1): 28-35.
- Swinger KK, Rice PA.** 2007. Structure-based analysis of HU-DNA binding. *J. Mol. Biol.* **365**(4): 1005-1016.
- Takahashi Y, Shintani M, Yamane H, Nojiri H.** 2009a. The complete nucleotide sequence of pCAR2: pCAR2 and pCAR1 were structurally identical IncP-7 carbazole degradative plasmids. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **73**(3): 744-746.
- Takahashi Y, Shintani M, Li L, Yamane H, Nojiri H.** 2009b. Carbazole-degradative IncP-7 plasmid pCAR1.2 is structurally unstable in *Pseudomonas fluorescens* Pf0-1, which accumulates catechol, the intermediate of the carbazole degradation pathway. *Appl. Environ. Microbiol.* **75**(12): 3920-3929.
- Takeda T, Yun CS, Shintani M, Yamane H, Nojiri H.** 2011. Distribution of genes encoding nucleoid-associated protein homologs in plasmids. *Int. J. Evol. Biol.* **2011**: 685015.

- Tani TH, Khodursky A, Blumenthal RM, Brown PO, Matthews RG.** 2002. Adaptation to famine: a family of stationary-phase genes revealed by microarray analysis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **99(21)**: 13471-13476.
- Tendeng C, Soutourina OA, Danchin A, Bertin PN.** 2003. MvaT proteins in *Pseudomonas* spp.: a novel class of H-NS-like proteins. *Microbiology.* **149(Pt 11)**: 3047-3050.
- Tett A, Spiers AJ, Crossman LC, Ager D, Ciric L, Dow JM, Fry JC, Harris D, Lilley A, Oliver A, Parkhill J, Quail MA, Rainey PB, Saunders NJ, Seeger K, Snyder LA, Squares R, Thomas CM, Turner SL, Zhang XX, Field D, Bailey MJ.** 2007. Sequence-based analysis of pQBR103; a representative of a unique, transfer-proficient mega plasmid resident in the microbial community of sugar beet. *ISME J.* **1(4)**: 331-340.
- Tietze E, Tschäpe H.** 1994. Temperature-dependent expression of conjugation pili by IncM plasmid-harboring bacteria: identification of plasmid-encoded regulatory functions. *J. Basic Microbiol.* **34(2)**: 105–116.
- Ueguchi C, Seto C, Suzuki T, Mizuno T.** 1997. Clarification of the dimerization domain and its functional significance for the *Escherichia coli* nucleoid protein H-NS. *J. Mol. Biol.* **274(2)**: 145-151.
- Vallet I, Diggle SP, Stacey RE, Cámara M, Ventre I, Lory S, Lazdunski A, Williams P, Filloux A.** 2004. Biofilm formation in *Pseudomonas aeruginosa*: fimbrial *cup* gene clusters are controlled by the transcriptional regulator MvaT. *J. Bacteriol.* **186(9)**: 2880-2890.
- Vallet-Gely I, Donovan KE, Fang R, Joung JK, Dove SL.** 2005. Repression of phase-variable *cup* gene expression by H-NS-like proteins in *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **102(31)**: 11082-11087.
- van Noort J, Verbrugge S, Goosen N, Dekker C, Dame RT.** 2004. Dual architectural roles of HU: formation of flexible hinges and rigid filaments. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **101(18)**: 6969-6974.
- Wada M, Kano Y, Ogawa T, Okazaki T, Imamoto F.** 1988. Construction and characterization of the deletion mutant of *hupA* and *hupB* genes in *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.* **204(3)**: 581-591.
- Wain J, Diem Nga LT, Kidgell C, James K, Fortune S, Song Diep T, Ali T, O Gaora P, Parry C, Parkhill J, Farrar J, White NJ, Dougan G.** 2003. Molecular analysis of *incHI1* antimicrobial resistance plasmids from *Salmonella* serovar Typhi strains associated with typhoid fever. *Antimicrob. Agents Chemother.* **47(9)**: 2732-2739.
- Wang Q, Calvo JM.** 1993. Lrp, a major regulatory protein in *Escherichia coli*, bends DNA and can organize the assembly of a higher-order nucleoprotein structure. *EMBO J.* **12(6)**: 2495-2501.
- Wei J, Goldberg MB, Burland V, Venkatesan MM, Deng W, Fournier G, Mayhew GF, Plunkett G 3rd, Rose DJ, Darling A, Mau B, Perna NT, Payne SM, Runyen-Janecky LJ, Zhou S, Schwartz DC, Blattner FR.** 2003. Complete genome sequence and comparative genomics of *Shigella flexneri* serotype 2a strain 2457T. *Infect. Immun.* **71(5)**: 2775-2786.
- Werner MH, Clore GM, Gronenborn AM, Nash HA.** 1994. Symmetry and asymmetry in the function of *Escherichia coli* integration host factor: implications for target identification by DNA-binding proteins. *Curr. Biol.* **4(6)**: 477-487.
- Westfall LW, Luna AM, San Francisco M, Diggle SP, Worrall KE, Williams P, Cámara M, Hamood AN.** 2004. The *Pseudomonas aeruginosa* global regulator MvaT specifically binds to the *ptxS* upstream region and enhances *ptxS* expression. *Microbiology.* **150(Pt 11)**: 3797-3806.
- Wood JM.** 2007. Bacterial osmosensing transporters. *Methods Enzymol.* **428**: 77-107.

**Yang X, Ma Q, Wood TK.** 2008. The R1 conjugative plasmid increases *Escherichia coli* biofilm formation through an envelope stress response. *Appl. Environ. Microbiol.* **74(9)**: 2690-2699.

**Yano H, Garruto CE, Sota M, Ohtsubo Y, Nagata Y, Zylstra GJ, Williams PA, Tsuda M.** 2007. Complete sequence determination combined with analysis of transposition/site-specific recombination events to explain genetic organization of IncP-7 TOL plasmid pWW53 and related mobile genetic elements. *J Mol Biol.* **369(1)**: 11-26.

**Yano H, Miyakoshi M, Ohshima K, Tabata M, Nagata Y, Hattori M, Tsuda M.** 2010. Complete nucleotide sequence of TOL plasmid pDK1 provides evidence for evolutionary history of IncP-7 catabolic plasmids. *J Bacteriol.* **192(17)**: 4337-4347.

**Yoshida T, Ayabe Y, Yasunaga M, Usami Y, Habe H, Nojiri H, Omori T.** 2003. Genes involved in the synthesis of the exopolysaccharide methanolan by the obligate methylotroph *Methylobacillus* sp. strain 12S. *Microbiology.* **149(Pt 2)**: 431-444.

**Yun CS, Suzuki C, Naito K, Takeda T, Takahashi Y, Sai F, Terabayashi T, Miyakoshi M, Shintani M, Nishida H, Yamane H, Nojiri H.** 2010. Pmr, a histone-like protein H1 (H-NS) family protein encoded by the IncP-7 plasmid pCAR1, is a key global regulator that alters host function. *J. Bacteriol.* **192(18)**: 4720-4731.

**Zablewska B, Kur J.** 1995. Mutations in HU and IHF affect bacteriophage T4 growth: HimD subunits of IHF appear to function as homodimers. *Gene.* **160(1)**: 131-132.

**Zimmerman SB.** 1993. Macromolecular crowding effects on macromolecular interactions: some implications for genome structure and function. *Biochim. Biophys. Acta.* **1216(2)**: 175-185.

**Zulianello L, de la Gorgue de Rosny E, van Ulsen P, van de Putte P, Goosen N.** 1994. The HimA and HimD subunits of integration host factor can specifically bind to DNA as homodimers. *EMBO J.* **13(7)**: 1534-1540.

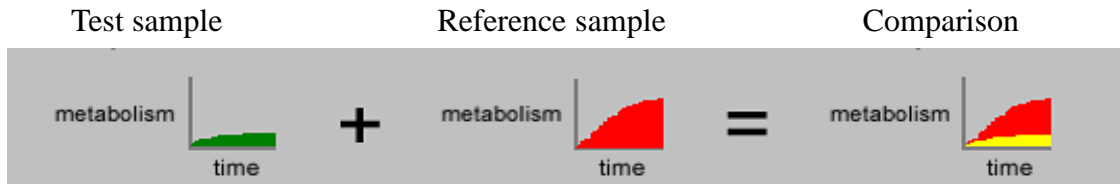
杉浦昌弘編、1989 年、クローニングとシーケンス、農村文化社

東京大学医科学研究所制癌研究部編、1993 年、新細胞工学実験プロトコール、第 1 版、秀潤社

徳丸裕樹、平成 21 年度、東京大学修士論文

## 補章

A



(Biolog社ホームページより抜粋)

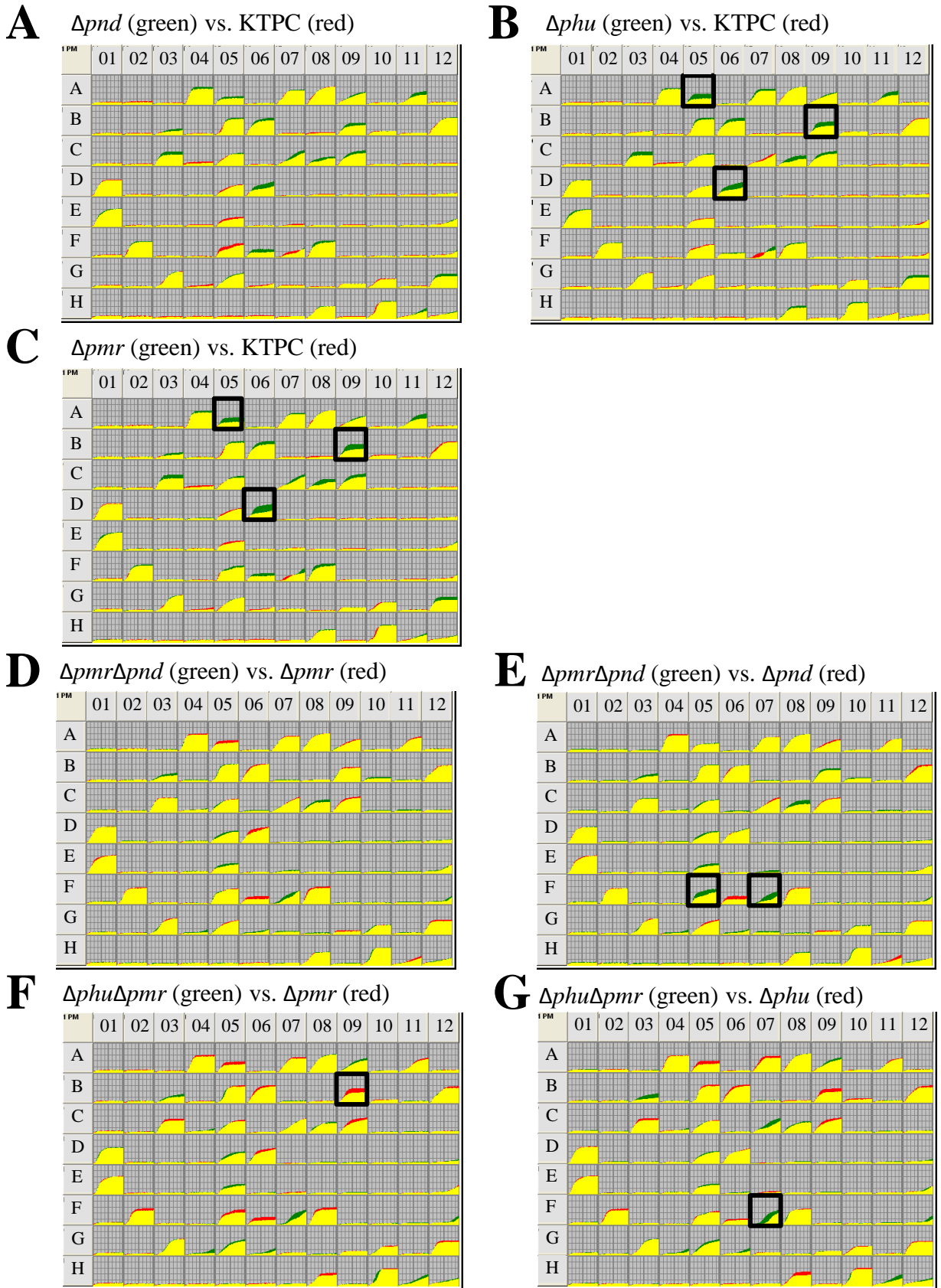
B

	Test sample	Reference sample	評価する表現型
A	$\Delta pnd$	KTPC	Intactな $pmr$ 存在下で $pnd$ の破壊により生じる影響
B	$\Delta phu$	KTPC	Intactな $pmr$ 存在下で $phu$ の破壊により生じる影響
C	$\Delta pmr$	KTPC	$pmr$ の破壊により生じる影響
D	$\Delta pmr\Delta pnd$	$\Delta pmr$	$pmr$ 非存在下で $pnd$ の破壊により生じる影響
E	$\Delta pmr\Delta pnd$	$\Delta pnd$	$pnd$ 非存在下で $pmr$ の破壊により生じる影響
F	$\Delta phu\Delta pmr$	$\Delta pmr$	$pmr$ 非存在下で $phu$ の破壊により生じる影響
G	$\Delta phu\Delta pmr$	$\Delta phu$	$phu$ 非存在下で $pmr$ の破壊により生じる影響

### Figure S1. Phenotype MicroArray 解析におけるデータの見方

(A) Phenotype MicroArrayデータにおける各wellの説明。各wellの横軸は培養時間 (0~48 h)、縦軸は呼吸量を表す。Test sampleの呼吸量を緑色、Reference sampleの呼吸量を赤色で表し、それぞれを1つのwell上で重ね合わせる。重なり合う部分の面積は黄色で表す。すなわち、Test sampleの呼吸量の方が多ければ黄色の上に緑色の部分が表示され、Reference sampleの呼吸量の方が多ければ黄色の上に赤色の部分が表示される。緑色あるいは赤色の部分の面積の大きさによって2 sample間で呼吸量に差があるかどうかを判定する。(B) Fig. S2~S7で示している図のA~Gの各パネルで評価する表現型を示す。KTPCはKT2440(pCAR1)株を表す。

# PM 1 (C源)

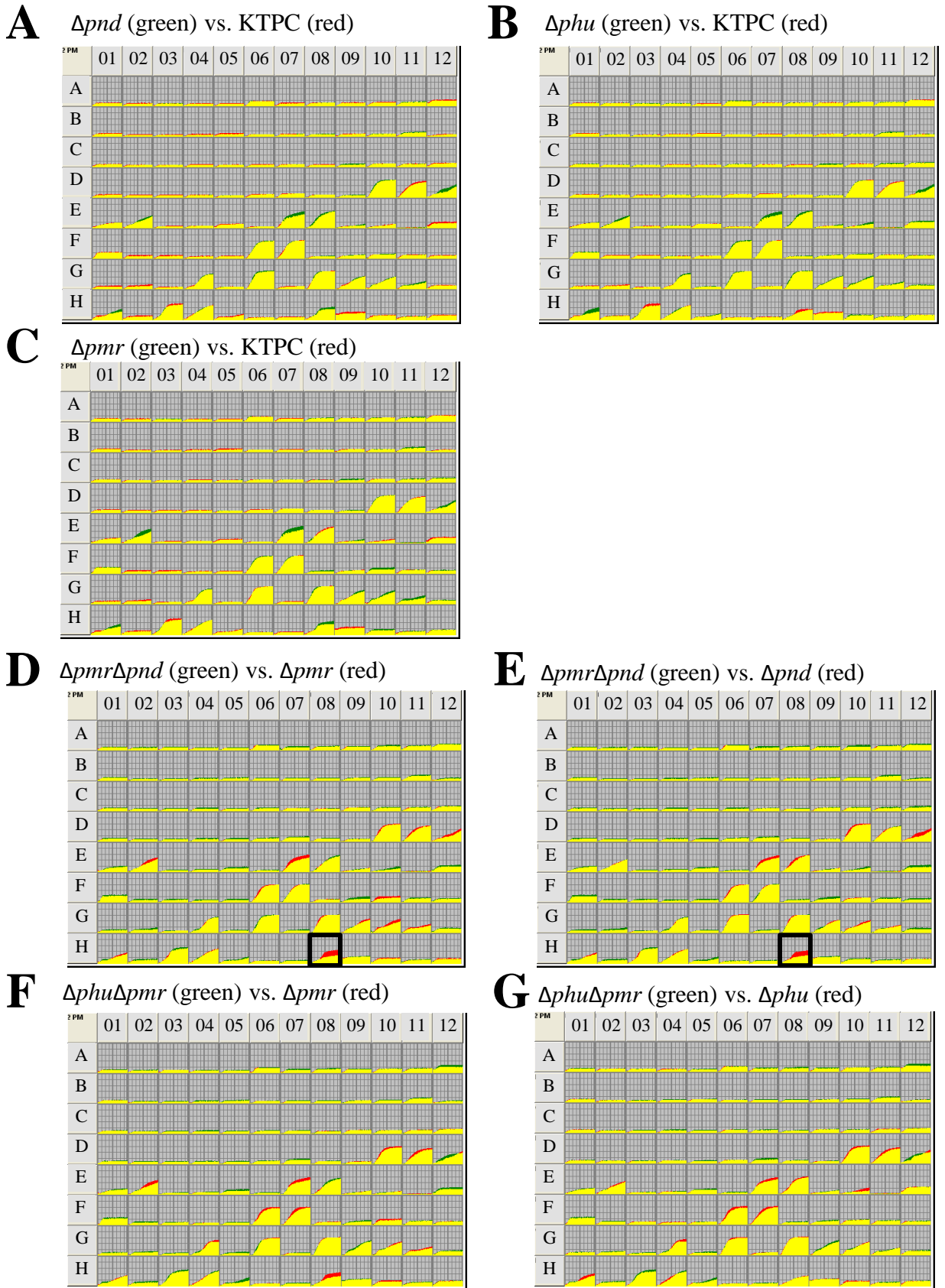


**Figure S2. Phenotype MicroArray による表現型の網羅的解析**

KTPCはKT2440(pCAR1)株を表す。A～Gはそれぞれ各株をPM1 plateで30°C、48 h培養した際の呼吸量をプロットし比較した図を示す。各wellの横軸は培養時間(h)、縦軸は呼吸量を表す。各株の組み合わせのうち左側の株 (Test sample)の呼吸量を緑、右側の株 (Reference sample)の呼吸量を赤、重なる部分を黄色で示す。2株間で呼吸量に差があると判断したwellを黒枠で囲んだ。



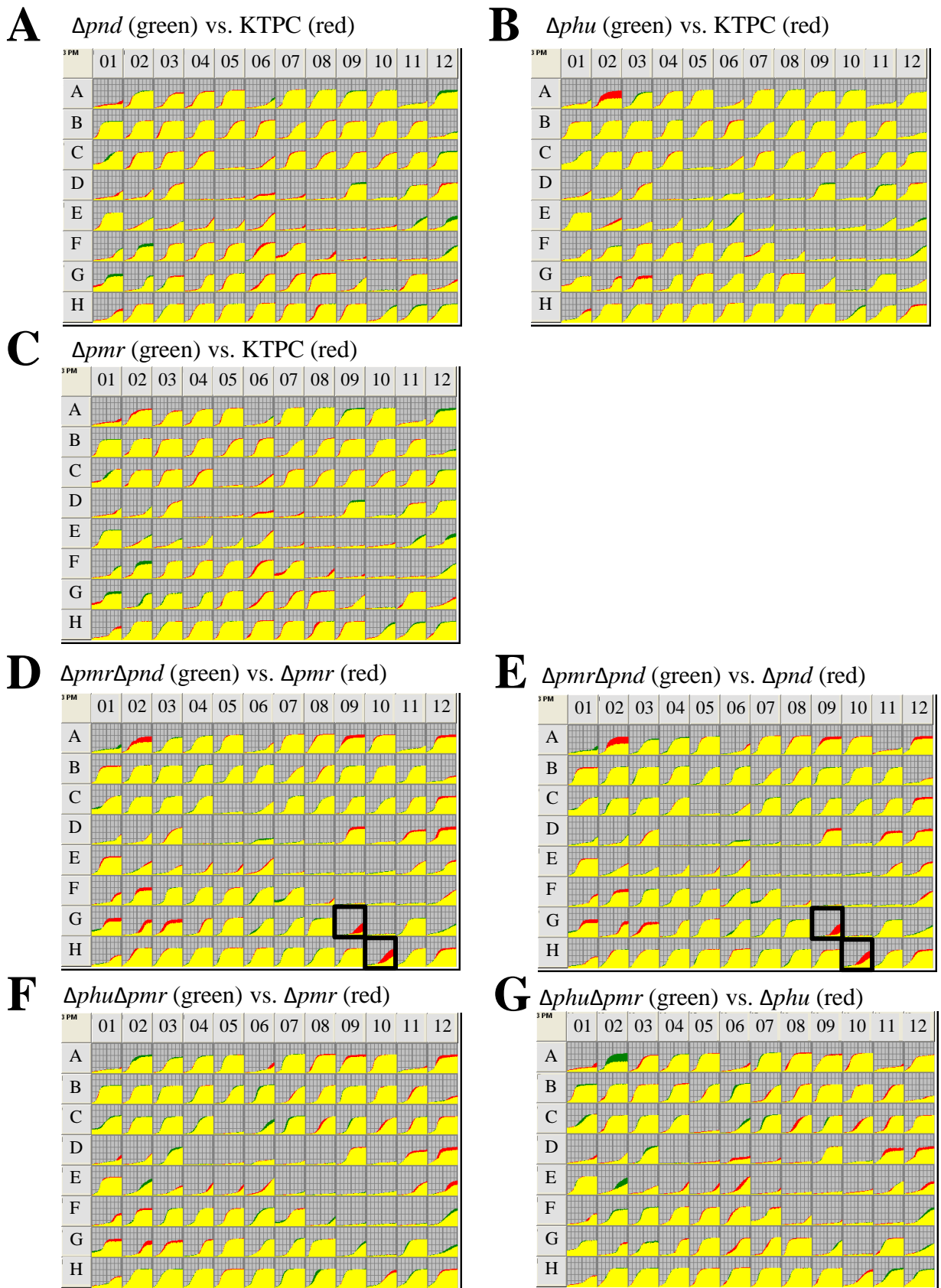
# PM 2A (C源)



**Figure S3. Phenotype MicroArray による表現型の網羅的解析**

KTPCはKT2440(pCAR1)株を表す。A～Gはそれぞれ各株をPM2A plateで30℃、48 h培養した際の呼吸量をプロットし比較した図を示す。各wellの横軸は培養時間(h)、縦軸は呼吸量を表す。各株の組み合わせのうち左側の株 (Test sample)の呼吸量を緑、右側の株 (Reference sample)の呼吸量を赤、重なる部分を黄色で示す。2株間で呼吸量に差があると判断したwellを黒枠で囲んだ。

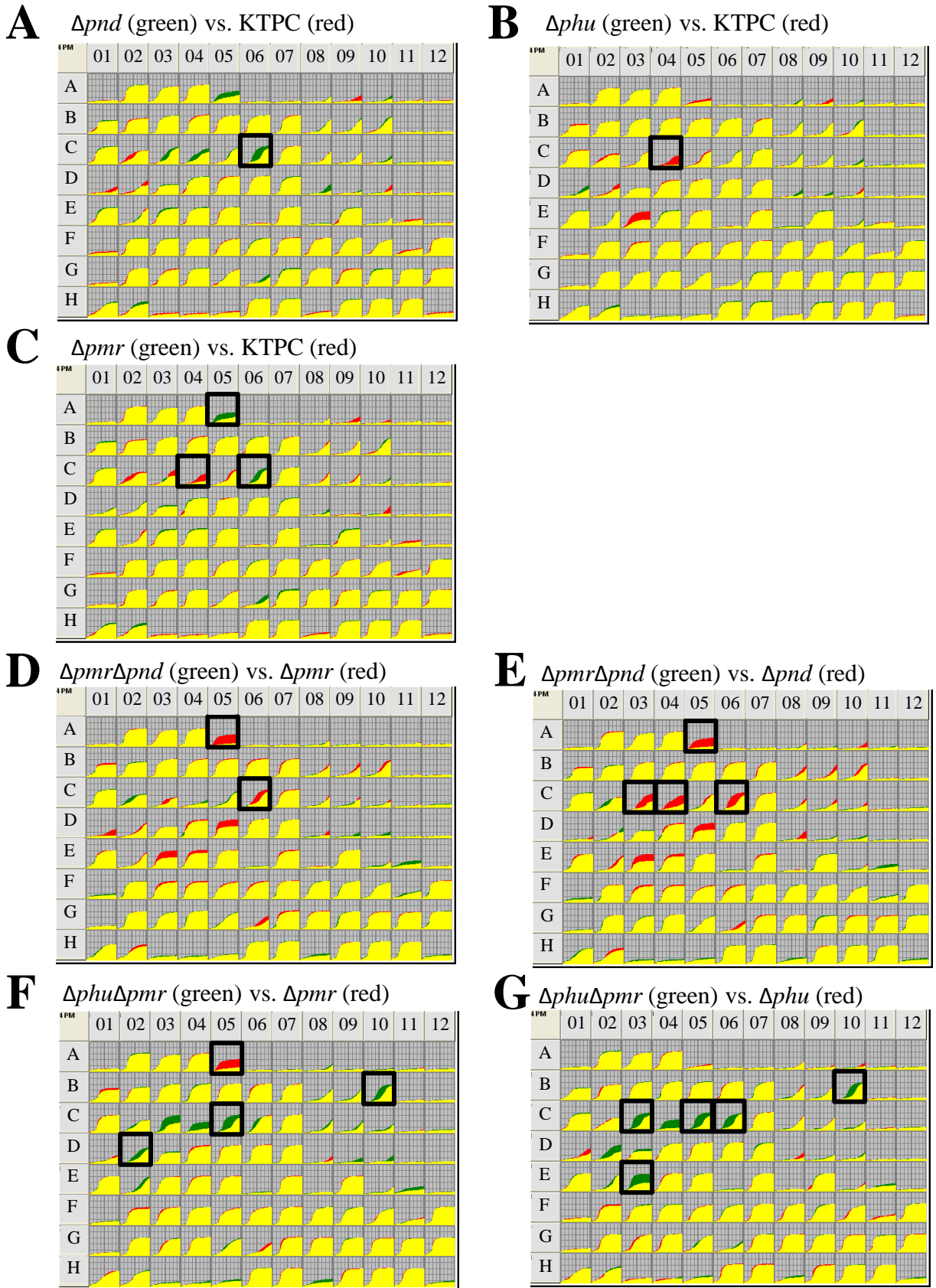
# PM 3B (N源)



**Figure S4. Phenotype MicroArray による表現型の網羅的解析**

KTPCはKT2440(pCAR1)株を表す。A～Gはそれぞれ各株をPM3B plateで30°C、48 h培養した際の呼吸量をプロットし比較した図を示す。各wellの横軸は培養時間(h)、縦軸は呼吸量を表す。各株の組み合わせのうち左側の株 (Test sample)の呼吸量を緑、右側の株 (Reference sample)の呼吸量を赤、重なる部分を黄色で示す。2株間で呼吸量に差があると判断したwellを黒枠で囲んだ。

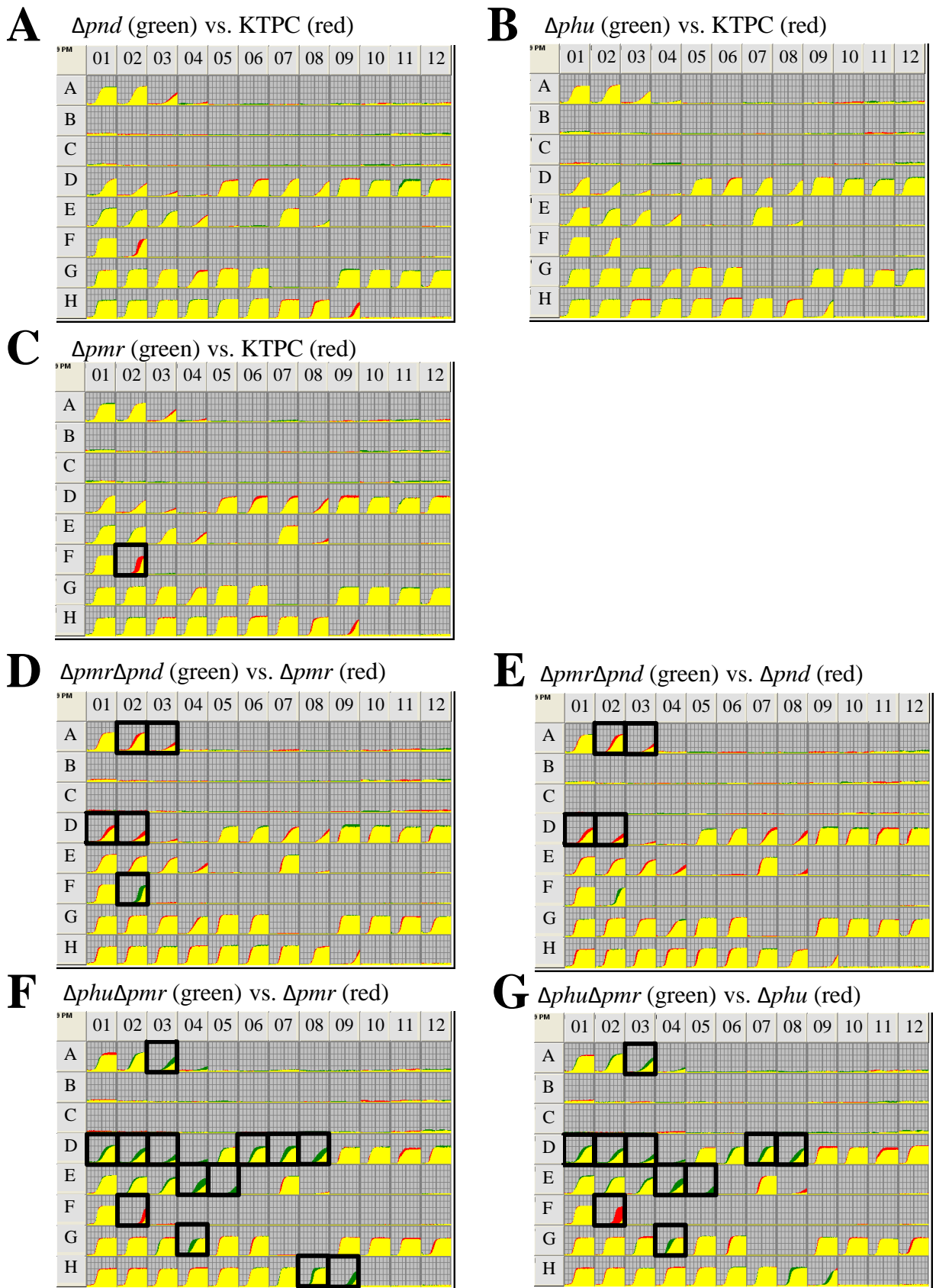
# PM 4A (P, S源)



**Figure S5. Phenotype MicroArray による表現型の網羅的解析**

KTPCはKT2440(pCAR1)株を表す。A～Gはそれぞれ各株をPM4A plateで30℃、48 h培養した際の呼吸量をプロットし比較した図を示す。各wellの横軸は培養時間(h)、縦軸は呼吸量を表す。各株の組み合わせのうち左側の株 (Test sample)の呼吸量を緑、右側の株 (Reference sample)の呼吸量を赤、重なる部分を黄色で示す。2株間で呼吸量に差があると判断したwellを黒枠で囲んだ。

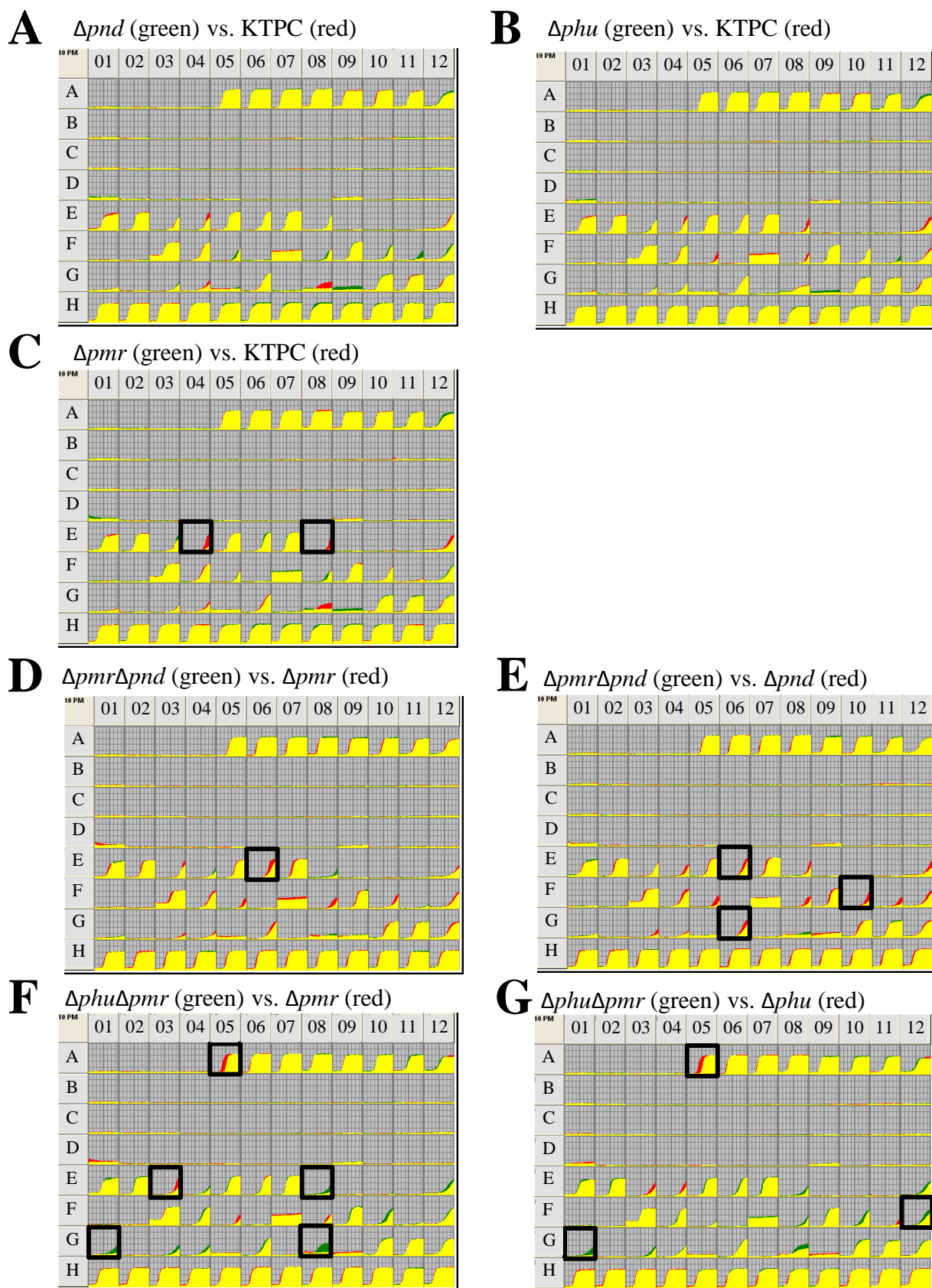
# PM 9 (浸透圧耐性)



**Figure S6. Phenotype MicroArray による表現型の網羅的解析**

KTPCはKT2440(pCAR1)株を表す。A～Gはそれぞれ各株をPM9 plateで30°C、48 h培養した際の呼吸量をプロットし比較した図を示す。各wellの横軸は培養時間(h)、縦軸は呼吸量を表す。各株の組み合わせのうち左側の株 (Test sample)の呼吸量を緑、右側の株 (Reference sample)の呼吸量を赤、重なる部分を黄色で示す。2株間で呼吸量に差があると判断したwellを黒枠で囲んだ。

# PM 10 (pH耐性)



**Figure S7. Phenotype MicroArray による表現型の網羅的解析**

KTPCはKT2440(pCAR1)株を表す。A～Gはそれぞれ各株をPM10 plateで30°C、48 h培養した際の呼吸量をプロットし比較した図を示す。各wellの横軸は培養時間(h)、縦軸は呼吸量を表す。各株の組み合わせのうち左側の株 (Test sample)の呼吸量を緑、右側の株 (Reference sample)の呼吸量を赤、重なる部分を黄色で示す。2株間で呼吸量に差があると判断したwellを黒枠で囲んだ。



Table S1. 染色体上で*pnd*破壊に伴い転写量が増加する2遺伝子、減少する30遺伝子

Gene name	Reference		Test sample		Fold change				Description
	KTPC		$\Delta pnd$		Test 1 / Ref 1	Test 2 / Ref 2	Test 1 / Ref 1	Test 2 / Ref 2	
転写量が増加する遺伝子									
PP_1172	46	39	101	100	2.21	2.60	2.19	2.58	hypothetical protein
PP_4870	208	228	313	464	1.50	1.37	2.23	2.04	azurin
転写量が減少する遺伝子									
PP_0202	79	110	22	13	0.28	0.20	0.16	0.12	CBS domain protein
PP_1083	262	459	87	43	0.33	0.19	0.17	0.09	bacterioferritin-associated ferredoxin, putative
PP_1820	324	525	72	62	0.22	0.14	0.19	0.12	benzoate transport protein
PP_2203	96	116	18	21	0.19	0.16	0.22	0.18	hypothetical protein
PP_2872	497	719	90	107	0.18	0.13	0.21	0.15	hypothetical protein
PP_2873	183	273	61	45	0.33	0.23	0.24	0.16	hypothetical protein
PP_2994	65	70	9	12	0.14	0.13	0.19	0.18	oxidoreductase, FMN-binding
PP_3023	376	523	111	48	0.30	0.21	0.13	0.09	amino acid efflux protein, putative
PP_3296	78	99	18	10	0.23	0.18	0.13	0.10	YeeE/YedE family protein
PP_3330	644	835	18	10	0.03	0.02	0.02	0.01	outer membrane ferric siderophore receptor, putative
PP_3331	177	229	14	10	0.08	0.06	0.06	0.04	hypothetical protein
PP_3332	1134	1336	20	1	0.02	0.02	0.00	0.00	cytochrome c-type protein
PP_3333	1395	1685	40	29	0.03	0.02	0.02	0.02	
PP_3334	244	313	35	20	0.15	0.11	0.08	0.06	
PP_3335	388	501	6	25	0.01	0.01	0.06	0.05	hypothetical protein
PP_3336	614	739	15	21	0.02	0.02	0.03	0.03	hypothetical protein
PP_3339	502	640	166	99	0.33	0.26	0.20	0.16	hypothetical protein
PP_3340	359	489	18	13	0.05	0.04	0.04	0.03	TonB-dependent receptor, putative
PP_3405	367	717	24	52	0.06	0.03	0.14	0.07	hypothetical protein
PP_3891	105	109	22	22	0.21	0.20	0.21	0.20	hypothetical protein
PP_4314	257	495	82	42	0.32	0.16	0.16	0.08	hypothetical protein
PP_4315	641	869	160	110	0.25	0.18	0.17	0.13	phenazine biosynthesis protein, PhzF family
PP_4316	471	616	131	89	0.28	0.21	0.19	0.15	2-hydroxyacid dehydrogenase
PP_4360	187	161	34	20	0.18	0.21	0.11	0.12	hypothetical protein
PP_4604	253	376	23	39	0.09	0.06	0.16	0.10	hypothetical protein
PP_4605	169	214	47	41	0.28	0.22	0.24	0.19	transcriptional regulator, AraC family
PP_4836	1168	1362	147	133	0.13	0.11	0.11	0.10	hypothetical protein
PP_4837	1389	2099	59	43	0.04	0.03	0.03	0.02	hypothetical protein
PP_4838 <i>oprC</i>	2074	2798	10	22	0.00	0.00	0.01	0.01	outer membrane copper receptor OprC
PP_4839	508	726	40	33	0.08	0.06	0.07	0.05	hypothetical protein

Table S2. pCAR1上で*pnd*破壊に伴い転写量が増加する11遺伝子、減少する1遺伝子

Gene	Reference		Test sample		Fold change				Description	
	KTPC		$\Delta pnd$		Test 1 /		Test 2 /			
	name	1	2	1	2	Ref 1	Ref 2	Ref 1		Ref 2
転写量が増加する遺伝子										
ORF100	1716	944	2817	2068	1.64	2.98	1.21	2.19	hypothetical protein	
ORF101	1143	758	2999	1953	2.62	3.95	1.71	2.57	cobalamin biosynthesis protein	
ORF102	1554	927	3407	2319	2.19	3.67	1.49	2.50	cobalamin biosynthesis protein	
ORF103	1228	747	2792	1906	2.27	3.74	1.55	2.55	hypothetical protein	
ORF104	943	620	1762	1361	1.87	2.84	1.44	2.19	hypothetical protein	
ORF105	469	291	878	558	1.87	3.02	1.19	1.92	hypothetical protein	
ORF106	346	186	898	541	2.60	4.84	1.57	2.92	hypothetical protein	
ORF107	66	49	164	83	2.49	3.32	1.27	1.69	hypothetical protein	
ORF108	524	302	1011	754	1.93	3.35	1.44	2.49	hypothetical protein	
ORF145	1067	656	2645	1797	2.48	4.03	1.68	2.74	putative DNA primase	
ORF146	499	414	965	677	1.93	2.33	1.36	1.63	putative DNA primase	
転写量が減少する遺伝子										
<i>pnd</i>	407	588	3	3	0.01	0.01	0.01	0.00	nucleoid-associated protein	

Table S3. 染色体上で*phu*破壊に伴い転写量が増加する11遺伝子

Gene name	Reference KTPC		Test sample <i>Δphu</i>		Fold change						Description
	1	2	1	2	Test 1 /		Test 2 /		Ref 1	Ref 2	
					Ref 1	Ref 2	Ref 1	Ref 2			
PP_0235 <i>lsfA</i>	174	199	463	652	2.66	2.33	3.74	3.28			antioxidant protein LsfA
PP_0273	63	69	329	433	5.18	4.73	6.83	6.24			hypothetical protein
PP_1002 <i>arcD</i>	205	196	439	663	2.14	2.24	3.23	3.39			arginine/ornithine antiporter
PP_1742	189	162	403	457	2.14	2.50	2.42	2.83			hypothetical protein
PP_2010	128	178	301	232	2.35	1.69	1.81	1.30			cytochrome b561
PP_2187	128	132	342	522	2.68	2.59	4.09	3.94			universal stress protein family
PP_2648	148	130	402	507	2.71	3.10	3.42	3.91			universal stress protein family
PP_2735	23	17	74	218	3.24	4.30	9.56	12.69			hypothetical protein
PP_3610	54	74	171	181	3.19	2.30	3.38	2.43			hypothetical protein
PP_3839	278	262	673	691	2.43	2.57	2.49	2.64			alcohol dehydrogenase
PP_4870	208	228	697	764	3.35	3.06	3.67	3.36			azurin

Table S4. 染色体上で*phu* 破壊に伴い転写量が減少する29遺伝子

Gene name	Reference		Test sample		Fold change				Description	
	1	2	KTPC	Δphu		Test 1 /		Test 2 /		
				1	2	Ref 1	Ref 2	Ref 1		Ref 2
PP_0153	1480	1710		601	503	0.41	0.35	0.34	0.29	hypothetical protein
PP_1820	324	525		126	101	0.39	0.24	0.31	0.19	benzoate transport protein
PP_1991	89	69		11	21	0.13	0.17	0.24	0.31	hypothetical protein
PP_2385 <i>azlC</i>	109	137		44	35	0.40	0.32	0.32	0.26	branched-chain amino acid transport protein AzlC
PP_2872	497	719		129	128	0.26	0.18	0.26	0.18	hypothetical protein
PP_2883	132	125		45	33	0.34	0.36	0.25	0.27	hypothetical protein
PP_3023	376	523		120	116	0.32	0.23	0.31	0.22	amino acid efflux protein, putative
PP_3330	644	835		17	16	0.03	0.02	0.02	0.02	outer membrane ferric siderophore receptor, putative
PP_3331	177	229		24	19	0.14	0.11	0.11	0.08	hypothetical protein
PP_3332	1134	1336		22	12	0.02	0.02	0.01	0.01	cytochrome c-type protein
PP_3333	1395	1685		39	26	0.03	0.02	0.02	0.02	
PP_3334	244	313		60	78	0.25	0.19	0.32	0.25	
PP_3335	388	501		31	22	0.08	0.06	0.06	0.04	hypothetical protein
PP_3336	614	739		34	47	0.06	0.05	0.08	0.06	hypothetical protein
PP_3337	495	681		169	108	0.34	0.25	0.22	0.16	hypothetical protein
PP_3339	502	640		125	71	0.25	0.19	0.14	0.11	hypothetical protein
PP_3340	359	489		31	22	0.09	0.06	0.06	0.05	TonB-dependent receptor, putative
PP_3404	253	375		126	91	0.50	0.34	0.36	0.24	hypothetical protein
PP_3405	367	717		104	45	0.28	0.15	0.12	0.06	hypothetical protein
PP_3782	1055	1283		281	287	0.27	0.22	0.27	0.22	hypothetical protein
PP_4214	82	164		37	30	0.45	0.23	0.37	0.18	aminotransferase, class V
PP_4314	257	495		90	61	0.35	0.18	0.24	0.12	hypothetical protein
PP_4315	641	869		203	156	0.32	0.23	0.24	0.18	phenazine biosynthesis protein, PhzF family
PP_4316	471	616		143	94	0.30	0.23	0.20	0.15	2-hydroxyacid dehydrogenase
PP_4604	253	376		39	45	0.15	0.10	0.18	0.12	hypothetical protein
PP_4836	1168	1362		214	141	0.18	0.16	0.12	0.10	hypothetical protein
PP_4837	1389	2099		71	76	0.05	0.03	0.05	0.04	hypothetical protein
PP_4838 <i>oprC</i>	2074	2798		27	25	0.01	0.01	0.01	0.01	outer membrane copper receptor OprC
PP_4839	508	726		38	35	0.07	0.05	0.07	0.05	hypothetical protein

Table S5. pCAR1上で*phu* 破壊に伴い転写量が減少する1遺伝子

Gene name	Reference		Test sample		Fold change				Description
	KTPC		$\Delta phu$		Test 1 /		Test 2 /		
	1	2	1	2	Ref 1	Ref 2	Ref 1	Ref 2	
<i>phu</i>	2090	2853	1	1	0.00	0.00	0.00	0.00	nucleoid-associated protein



Table S6. 染色体上で *pmr* 破壊に伴い転写量が増加する107遺伝子

Gene name	Reference		Test sample		Fold change				Description
	KTPC		$\Delta pmr$		Test 1 /		Test 2 /		
	1	2	1	2	Ref.1	Ref.2	Ref.1	Ref.2	
PP_0023	392	416	1481	1298	3.78	3.56	3.31	3.12	hypothetical protein
PP_0122	281	268	1152	866	4.10	4.29	3.09	3.23	hypothetical protein
PP_0181	286	455	2236	1683	7.82	4.92	5.89	3.70	hypothetical protein
PP_0204	30	25	196	109	6.43	7.90	3.59	4.41	transcriptional regulator, GntR family
PP_0235 <i>lsfA</i>	174	199	1660	1415	9.54	8.36	8.13	7.13	antioxidant protein LsfA
PP_0273	63	69	1409	1147	22.20	20.29	18.08	16.53	hypothetical protein
PP_0397	195	243	950	791	4.88	3.92	4.06	3.26	hypothetical protein
PP_0481 <i>katA</i>	57	66	337	289	5.87	5.13	5.03	4.39	catalase
PP_0482	205	222	2012	1436	9.79	9.08	6.99	6.48	bacterioferritin
PP_0489	72	67	385	266	5.38	5.79	3.71	3.99	
PP_0504 <i>oprG</i>	1020	925	4115	3727	4.04	4.45	3.65	4.03	outer membrane protein OprG
PP_0546	68	88	299	227	4.42	3.40	3.36	2.59	sigma-54 dependent transcriptional regulator
PP_0550	75	67	320	246	4.24	4.78	3.26	3.68	hypothetical protein
PP_0563	122	125	836	540	6.87	6.67	4.43	4.30	response regulator
PP_0738	112	101	900	662	8.04	8.91	5.92	6.55	hypothetical protein
PP_0739 <i>phrB</i>	231	183	1772	1372	7.66	9.68	5.93	7.50	deoxyribodipyrimidine photolyase
PP_0807	137	124	1039	809	7.58	8.36	5.90	6.51	anaerobic nitric oxide reductase transcription regulator
PP_0998	118	131	735	406	6.23	5.60	3.44	3.09	hypothetical protein
PP_0999 <i>arcC</i>	162	193	1371	911	8.47	7.12	5.63	4.73	carbamate kinase
PP_1000 <i>argI</i>	167	199	2051	1484	12.26	10.30	8.87	7.45	ornithine carbamoyltransferase
PP_1001 <i>arcA</i>	246	307	3065	2321	12.47	9.98	9.44	7.56	arginine deiminase
PP_1002 <i>arcD</i>	205	196	2299	1954	11.21	11.75	9.53	9.99	arginine/ornithine antiporter
PP_1082 <i>bfr</i>	66	102	1127	799	17.15	11.07	12.16	7.85	bacterioferritin
PP_1185 <i>oprH</i>	173	174	1116	762	6.45	6.43	4.40	4.39	outer membrane protein H1
PP_1210	402	379	1879	1451	4.68	4.95	3.61	3.83	DNA-binding stress protein, putative
PP_1291	217	291	2221	1591	10.21	7.63	7.32	5.46	PhoH family protein
PP_1318 <i>petB</i>	290	359	1209	972	4.16	3.36	3.35	2.70	ubiquinol--cytochrome c reductase, cytochrome b
PP_1319 <i>petC</i>	149	175	739	442	4.97	4.23	2.97	2.53	ubiquinol--cytochrome c reductase, cytochrome c1
PP_1522 <i>cspA-I</i>	80	140	726	598	9.02	5.20	7.44	4.28	cold shock protein CspA
PP_1729	235	203	1616	1102	6.88	7.98	4.70	5.44	hypothetical protein
PP_1742	189	162	1232	622	6.53	7.63	3.29	3.85	hypothetical protein
PP_2010	128	178	767	632	5.99	4.30	4.94	3.55	cytochrome b561
PP_2107	75	125	511	368	6.81	4.08	4.90	2.94	hypothetical protein
PP_2121	424	409	2351	1803	5.54	5.75	4.25	4.41	lipoprotein, putative

Table S6. 続き

PP_2161	812	836	4470	3331	5.51	5.34	4.10	3.98	hypothetical protein
PP_2187	128	132	1921	1531	15.04	14.52	11.99	11.57	universal stress protein family
PP_2205	23	26	104	70	4.51	4.06	3.04	2.74	copper resistance protein, CopA family
PP_2310	128	122	1163	936	9.07	9.52	7.30	7.66	methyl-accepting chemotaxis transducer
PP_2512 <i>folE</i>	137	33	753	554	5.49	22.85	4.04	16.81	GTP cyclohydrolase I
PP_2624	14	21	83	66	6.03	3.86	4.81	3.09	hypothetical protein
PP_2648	148	130	2044	1713	13.77	15.75	11.54	13.20	universal stress protein family
PP_2666	38	100	641	297	16.96	6.40	7.85	2.96	hypothetical protein
PP_2725 <i>pfpI</i>	24	26	107	72	4.38	4.06	2.96	2.75	protease PfpI
PP_2727	63	49	323	222	5.12	6.58	3.51	4.52	C-factor, putative
PP_2728	132	54	748	524	5.67	13.85	3.97	9.70	hypothetical protein
PP_2729	171	38	1055	784	6.17	27.76	4.58	20.61	hypothetical protein
PP_2730	147	43	1021	839	6.95	23.65	5.71	19.43	lipoprotein, putative
PP_2731	97	37	958	859	9.83	26.19	8.82	23.49	hypothetical protein
PP_2732	42	31	567	460	13.49	18.04	10.95	14.64	hypothetical protein
PP_2733	50	13	332	333	6.63	25.88	6.65	25.96	hypothetical protein
PP_2734 <i>cfa</i>	19	20	1385	1130	74.49	70.18	60.76	57.25	cyclopropane-fatty-acyl-phospholipid synthase
PP_2735	23	17	1974	1549	86.77	115.14	68.07	90.33	hypothetical protein
PP_2736	110	35	1604	1478	14.63	45.93	13.48	42.32	hypothetical protein
PP_2737	296	76	1771	1485	5.97	23.45	5.01	19.66	oxidoreductase, short-chain dehydrogenase/reductase family
PP_2738	338	130	2021	1484	5.97	15.55	4.38	11.42	transcriptional regulator, putative
PP_2745	14	29	119	97	8.45	4.06	6.89	3.31	universal stress protein family
PP_2942	46	58	255	161	5.48	4.37	3.46	2.76	response regulator
PP_2947	196	234	972	619	4.96	4.16	3.16	2.65	transcriptional regulator MvaT, P16 subunit, putative
PP_2983	28	32	109	85	3.88	3.42	3.01	2.65	hypothetical protein
PP_3081	83	61	351	264	4.21	5.80	3.16	4.35	conserved hypothetical protein TIGR00481
PP_3147	40	30	184	196	4.57	6.09	4.86	6.49	periplasmic polyamine-binding protein, putative
PP_3234	22	33	398	263	18.01	11.98	11.87	7.89	heat shock protein, HSP20 family
PP_3235	17	36	355	308	21.08	9.78	18.32	8.50	hypothetical protein
PP_3236	20	19	171	170	8.62	8.82	8.55	8.75	lipoprotein OprI, putative
PP_3237	21	11	82	72	3.98	7.31	3.52	6.48	universal stress protein family
PP_3287	49	23	293	213	5.93	12.88	4.32	9.37	transcriptional regulator, Crp/Fnr family
PP_3290	38	37	144	111	3.75	3.88	2.89	2.99	universal stress protein family
PP_3291	35	39	139	122	4.02	3.60	3.51	3.15	metallo-beta-lactamase family protein
PP_3444	7	27	117	105	16.20	4.32	14.62	3.90	glyoxalase family protein
PP_3610	54	74	620	490	11.58	8.33	9.16	6.59	hypothetical protein
PP_3722 <i>alr</i>	70	90	335	263	4.76	3.72	3.73	2.92	alanine racemase

Table S6. 続き

PP_3822	50	78	338	292	6.72	4.34	5.80	3.74	cytochrome c family protein
PP_3823	105	127	616	481	5.88	4.85	4.59	3.78	cytochrome c-type protein
PP_3839	278	262	2466	1891	8.88	9.42	6.81	7.22	alcohol dehydrogenase
PP_3840	249	257	1687	1082	6.77	6.56	4.34	4.21	hypothetical protein
PP_4102	103	117	419	345	4.06	3.57	3.34	2.94	hypothetical protein
PP_4103	62	50	507	365	8.11	10.23	5.84	7.36	low-affinity inorganic phosphate transporter
PP_4115	132	132	603	384	4.57	4.56	2.91	2.90	hypothetical protein
PP_4234	13	23	123	72	9.63	5.48	5.60	3.19	hypothetical protein
PP_4249	70	72	411	333	5.90	5.73	4.78	4.64	hypothetical protein
PP_4250	513	561	3453	2617	6.73	6.15	5.10	4.66	cytochrome c oxidase, cbb3-type, subunit I
PP_4251	329	380	2683	2044	8.15	7.06	6.21	5.38	cytochrome c oxidase, cbb3-type, subunit II
PP_4252	559	487	2859	2174	5.12	5.87	3.89	4.46	cytochrome c oxidase, cbb3-type, CcoQ subunit
PP_4253	247	227	1957	1412	7.91	8.62	5.71	6.22	cytochrome c oxidase, cbb3-type, subunit III
PP_4259	188	183	1146	821	6.10	6.27	4.37	4.49	iron-sulfur cluster-binding protein
PP_4260	149	203	982	804	6.59	4.83	5.40	3.96	hypothetical protein
PP_4264	518	401	2660	2233	5.14	6.63	4.31	5.57	coproporphyrinogen III oxidase
PP_4278	43	49	381	267	8.84	7.78	6.18	5.44	xanthine dehydrogenase, XdhA subunit
PP_4279	35	52	258	157	7.46	4.98	4.54	3.03	xanthine dehydrogenase, XdhB subunit
PP_4428	1	18	116	76	115.78	6.52	75.95	4.27	amino acid ABC transporter, periplasmic amino acid-binding protein
PP_4490	50	47	241	145	4.84	5.11	2.93	3.08	phenylalanine 4-monooxygenase
PP_4556	38	48	183	147	4.76	3.83	3.81	3.07	hypothetical protein
PP_4642	228	180	899	677	3.94	5.00	2.97	3.77	hypothetical protein
PP_4643	34	38	142	116	4.17	3.73	3.42	3.06	xanthine/uracil permease family protein
PP_4705	37	45	175	126	4.70	3.86	3.39	2.78	ring-cleaving dioxygenase, putative
PP_4817	49	51	207	157	4.26	4.03	3.21	3.04	MaoC domain protein
PP_4870	208	228	2681	1640	12.89	11.77	7.88	7.20	azurin
PP_5206	362	300	1724	1431	4.76	5.75	3.95	4.77	membrane fusion protein
PP_5207	132	138	679	521	5.16	4.92	3.96	3.77	ABC transporter, ATP-binding protein/permease protein, putative
PP_5208	46	76	288	215	6.23	3.78	4.67	2.83	ABC transporter, permease protein
PP_5358	208	198	1259	1035	6.06	6.36	4.98	5.23	hypothetical protein
PP_5389	150	219	1689	1557	11.27	7.70	10.39	7.10	hypothetical protein
PP_5390	380	352	2518	1906	6.62	7.16	5.01	5.42	hypothetical protein
PP_5391	274	310	2397	1853	8.74	7.73	6.75	5.98	hypothetical protein
PP_5392	352	395	1917	1427	5.45	4.86	4.05	3.62	hypothetical protein
PP_5393	42	65	239	169	5.63	3.66	3.99	2.59	hypothetical protein
PP_5394	73	64	410	296	5.64	6.45	4.06	4.65	hypothetical protein

Table S7. 染色体上で*pmr*破壊に伴い転写量が減少する19遺伝子

Gene name	Reference		Test sample		Fold change				Description
	KTPC		$\Delta pmr$	Test 1 /		Test 2 /			
	1	2		Ref 1	Ref 2	Ref 1	Ref 2		
PP_0352	131	195	88	81	0.67	0.45	0.62	0.41	RNA polymerase sigma factor
PP_0534	129	144	107	84	0.83	0.74	0.65	0.58	transcriptional regulator PfeR, putative
PP_0704	190	235	132	69	0.69	0.56	0.36	0.29	RNA polymerase sigma-70 factor, ECF subfamily
PP_0865	132	208	95	71	0.72	0.46	0.53	0.34	RNA polymerase sigma-70 factor, putative
PP_1083	262	459	162	114	0.62	0.35	0.43	0.25	bacterioferritin-associated ferredoxin, putative
PP_2419	1469	1721	1271	900	0.87	0.74	0.61	0.52	hypothetical protein
PP_3330	644	835	40	347	0.06	0.05	0.54	0.42	outer membrane ferric siderophore receptor, putative
PP_3331	177	229	37	120	0.21	0.16	0.68	0.53	hypothetical protein
PP_3332	1134	1336	32	734	0.03	0.02	0.65	0.55	cytochrome c-type protein
PP_3333	1395	1685	62	628	0.04	0.04	0.45	0.37	
PP_3335	388	501	37	206	0.09	0.07	0.53	0.41	hypothetical protein
PP_3336	614	739	102	273	0.17	0.14	0.45	0.37	hypothetical protein
PP_3337	495	681	439	314	0.89	0.64	0.63	0.46	hypothetical protein
PP_3339	502	640	238	292	0.47	0.37	0.58	0.46	hypothetical protein
PP_4070	88	204	48	60	0.55	0.24	0.68	0.29	hypothetical protein
PP_4728 <i>grpE</i>	1386	2008	1264	835	0.91	0.63	0.60	0.42	heat shock protein GrpE
PP_5306 <i>exbB</i>	786	1264	601	342	0.77	0.48	0.44	0.27	ferric siderophore transport system protein ExbB
PP_5307 <i>exbD</i>	1244	1426	778	481	0.63	0.55	0.39	0.34	biopolymer transport protein ExbD
PP_5359	235	362	204	83	0.87	0.56	0.35	0.23	CobW/P47K family protein

Table S8. pCAR1上で*pmr*破壊に伴い転写量が増加する3遺伝子、減少する3遺伝子

Gene name	Reference KTPC		Test sample <i>Δpmr</i>		Fold change				Description
	1	2	1	2	Test 1 /		Test 2 /		
					Ref 1	Ref 2	Ref 1	Ref 2	
転写量が増加する遺伝子									
<i>antR</i>	21	35	105	110	5.14	3.03	5.34	3.15	transcriptional regulator
ORF107	66	49	277	279	4.22	5.61	4.25	5.66	hypothetical protein
<i>trhV</i>	32	43	136	150	4.26	3.14	4.70	3.47	putative pilus assembly protein
転写量が減少する遺伝子									
<i>pmr</i>	1962	2601	6	15	0.00	0.00	0.01	0.01	nucleoid-associated protein
ORF71	926	1410	720	695	0.78	0.51	0.75	0.49	hypothetical protein
ORF159	2658	4139	2285	2138	0.86	0.55	0.80	0.52	hypothetical protein

Table S9. 染色体上で *pmr* 非存在時に *pnd* 破壊に伴い転写量が増加する3遺伝子、減少する88遺伝子

Gene name	Reference $\Delta pmr$		Test sample $\Delta pmr \Delta pnd$		Fold change				Description
	1	2	1	2	Test 1 / Ref 1	Test 2 / Ref 2	Test 1 / Ref 1	Test 2 / Ref 2	
転写量が増加する遺伝子									
PP_1685	84	54	241	245	2.87	4.45	2.92	4.52	hypothetical protein
PP_2530	31	12	77	76	2.48	6.32	2.45	6.25	hypothetical protein
PP_5382	78	47	261	189	3.37	5.55	2.44	4.02	hypothetical protein
転写量が減少する遺伝子									
PP_0181	2236	1683	1042	876	0.47	0.62	0.39	0.52	hypothetical protein
PP_0204	196	109	69	59	0.35	0.63	0.30	0.54	transcriptional regulator, GntR family
PP_0205	115	77	53	48	0.46	0.69	0.41	0.62	hypothetical protein
PP_0235 <i>lsfA</i>	1660	1415	386	345	0.23	0.27	0.21	0.24	antioxidant protein LsfA
PP_0273	1409	1147	164	230	0.12	0.14	0.16	0.20	hypothetical protein
PP_0395	538	354	274	191	0.51	0.77	0.36	0.54	hypothetical protein
PP_0396	656	428	320	208	0.49	0.75	0.32	0.48	hypothetical protein
PP_0397	950	791	477	273	0.50	0.60	0.29	0.35	hypothetical protein
PP_0481 <i>katA</i>	337	289	150	111	0.44	0.52	0.33	0.38	catalase
PP_0563	836	540	261	267	0.31	0.48	0.32	0.49	response regulator
PP_0586	341	262	169	135	0.49	0.64	0.40	0.51	heavy metal translocating P-type ATPase
PP_0596	710	336	271	181	0.38	0.81	0.25	0.54	beta alanine--pyruvate transaminase
PP_0619	137	91	36	28	0.27	0.40	0.20	0.31	branched-chain amino acid ABC transporter, periplasmic amino acid-binding
PP_0620	274	196	99	110	0.36	0.50	0.40	0.56	transcriptional regulator, GntR family
PP_0625 <i>clpB</i>	990	748	423	408	0.43	0.57	0.41	0.55	ATP-dependent Clp protease, ATP-binding subunit ClpB
PP_0738	900	662	254	196	0.28	0.38	0.22	0.30	hypothetical protein
PP_0739 <i>phrB</i>	1772	1372	290	392	0.16	0.21	0.22	0.29	deoxyribodipyrimidine photolyase
PP_0807	1039	809	221	267	0.21	0.27	0.26	0.33	anaerobic nitric oxide reductase transcription regulator
PP_0859	841	643	445	345	0.53	0.69	0.41	0.54	carbon-nitrogen hydrolase family protein
PP_0998	735	406	252	184	0.34	0.62	0.25	0.45	hypothetical protein
PP_0999 <i>arcC</i>	1371	911	294	157	0.21	0.32	0.11	0.17	carbamate kinase
PP_1000 <i>argI</i>	2051	1484	450	219	0.22	0.30	0.11	0.15	ornithine carbamoyltransferase
PP_1001 <i>arcA</i>	3065	2321	510	322	0.17	0.22	0.10	0.14	arginine deiminase
PP_1002 <i>arcD</i>	2299	1954	439	436	0.19	0.22	0.19	0.22	arginine/ornithine antiporter
PP_1003	276	200	140	119	0.51	0.70	0.43	0.59	arginine/ornithine antiporter
PP_1009 <i>gap-1</i>	347	234	181	139	0.52	0.77	0.40	0.59	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
PP_1210	1879	1451	769	540	0.41	0.53	0.29	0.37	DNA-binding stress protein, putative
PP_1291	2221	1591	591	413	0.27	0.37	0.19	0.26	PhoH family protein
PP_1318 <i>petB</i>	1209	972	511	436	0.42	0.53	0.36	0.45	ubiquinol--cytochrome c reductase, cytochrome b
PP_1729	1616	1102	638	543	0.39	0.58	0.34	0.49	hypothetical protein
PP_1742	1232	622	391	239	0.32	0.63	0.19	0.38	hypothetical protein

Table S9. 続き

PP_2010	767	632	344	269	0.45	0.54	0.35	0.43	cytochrome b561
PP_2107	511	368	255	223	0.50	0.69	0.44	0.61	hypothetical protein
PP_2121	2351	1803	795	726	0.34	0.44	0.31	0.40	lipoprotein, putative
PP_2161	4470	3331	1835	1557	0.41	0.55	0.35	0.47	hypothetical protein
PP_2187	1921	1531	347	329	0.18	0.23	0.17	0.21	universal stress protein family
PP_2648	2044	1713	278	289	0.14	0.16	0.14	0.17	universal stress protein family
PP_2727	323	222	103	130	0.32	0.47	0.40	0.59	C-factor, putative
PP_2728	748	524	225	326	0.30	0.43	0.44	0.62	hypothetical protein
PP_2730	1021	839	186	365	0.18	0.22	0.36	0.44	lipoprotein, putative
PP_2731	958	859	126	245	0.13	0.15	0.26	0.29	hypothetical protein
PP_2732	567	460	69	86	0.12	0.15	0.15	0.19	hypothetical protein
PP_2733	332	333	55	31	0.17	0.17	0.09	0.09	hypothetical protein
PP_2734	1385	1130	57	48	0.04	0.05	0.03	0.04	cyclopropane-fatty-acyl-phospholipid synthase
PP_2735	1974	1549	100	108	0.05	0.06	0.05	0.07	hypothetical protein
PP_2736	1604	1478	116	324	0.07	0.08	0.20	0.22	hypothetical protein
PP_2737	1771	1485	412	712	0.23	0.28	0.40	0.48	oxidoreductase, short-chain dehydrogenase/reductase family
PP_2738	2021	1484	511	831	0.25	0.34	0.41	0.56	transcriptional regulator, putative
PP_2745	119	97	45	47	0.37	0.46	0.40	0.49	universal stress protein family
PP_3147	184	196	97	64	0.53	0.49	0.35	0.33	periplasmic polyamine-binding protein, putative
PP_3234	398	263	64	33	0.16	0.24	0.08	0.13	heat shock protein, HSP20 family
PP_3235	355	308	77	59	0.22	0.25	0.17	0.19	hypothetical protein
PP_3236	171	170	51	50	0.30	0.30	0.29	0.30	lipoprotein OprI, putative
PP_3237	82	72	39	31	0.48	0.55	0.37	0.42	universal stress protein family
PP_3287	293	213	63	66	0.21	0.30	0.22	0.31	transcriptional regulator, Crp/Fnr family
PP_3320	708	298	75	132	0.11	0.25	0.19	0.44	hypothetical protein
PP_3321	2004	1039	295	610	0.15	0.28	0.30	0.59	hypothetical protein
PP_3610	620	490	235	229	0.38	0.48	0.37	0.47	hypothetical protein
PP_3662	1533	1121	804	669	0.52	0.72	0.44	0.60	decarboxylase family protein
PP_3722	335	263	153	119	0.46	0.58	0.36	0.45	alanine racemase
PP_3839	2466	1891	539	507	0.22	0.29	0.21	0.27	alcohol dehydrogenase
PP_3840	1687	1082	515	453	0.31	0.48	0.27	0.42	hypothetical protein
PP_4103	507	365	114	135	0.23	0.31	0.27	0.37	low-affinity inorganic phosphate transporter
PP_4234	123	72	51	41	0.41	0.71	0.33	0.56	
PP_4249	411	333	210	174	0.51	0.63	0.42	0.52	hypothetical protein
PP_4250	3453	2617	788	821	0.23	0.30	0.24	0.31	cytochrome c oxidase, cbb3-type, subunit I
PP_4251	2683	2044	475	444	0.18	0.23	0.17	0.22	cytochrome c oxidase, cbb3-type, subunit II
PP_4252	2859	2174	479	428	0.17	0.22	0.15	0.20	cytochrome c oxidase, cbb3-type, CcoQ subunit
PP_4253	1957	1412	351	279	0.18	0.25	0.14	0.20	cytochrome c oxidase, cbb3-type, subunit III
PP_4259	1146	821	329	322	0.29	0.40	0.28	0.39	iron-sulfur cluster-binding protein

Table S9. 続き

PP_4260	982	804	356	271	0.36	0.44	0.28	0.34	hypothetical protein
PP_4261	346	271	183	148	0.53	0.67	0.43	0.55	cation-transporting P-type ATPase
PP_4264 <i>hemN</i>	2660	2233	830	980	0.31	0.37	0.37	0.44	coproporphyrinogen III oxidase
PP_4278 <i>xdhA</i>	381	267	87	60	0.23	0.33	0.16	0.23	xanthine dehydrogenase, XdhA subunit
PP_4279 <i>xdhB</i>	258	157	84	56	0.33	0.53	0.22	0.36	xanthine dehydrogenase, XdhB subunit
PP_4428	116	76	28	18	0.24	0.37	0.16	0.24	amino acid ABC transporter, periplasmic amino acid-binding protein
PP_4509	370	240	173	146	0.47	0.72	0.39	0.61	hypothetical protein
PP_4604	145	584	61	53	0.42	0.10	0.36	0.09	hypothetical protein
PP_4870	2681	1640	917	750	0.34	0.56	0.28	0.46	azurin
PP_5208	288	215	125	91	0.43	0.58	0.32	0.42	ABC transporter, permease protein
PP_5358	1259	1035	589	529	0.47	0.57	0.42	0.51	hypothetical protein
PP_5361	2751	1641	365	951	0.13	0.22	0.35	0.58	CobW/P47K family protein
PP_5364 <i>cls</i>	223	154	88	84	0.39	0.57	0.38	0.55	cardiolipin synthetase
PP_5389	1689	1557	387	291	0.23	0.25	0.17	0.19	hypothetical protein
PP_5390	2518	1906	719	524	0.29	0.38	0.21	0.28	hypothetical protein
PP_5391	2397	1853	845	638	0.35	0.46	0.27	0.34	hypothetical protein
PP_5392	1917	1427	620	657	0.32	0.43	0.34	0.46	hypothetical protein
PP_5394	410	296	147	119	0.36	0.50	0.29	0.40	

Table S10. pCAR1上で*pmr*非存在時に*pnd*破壊に伴い転写量が増加する7遺伝子、減少する2遺伝子

Gene name	Reference		Test sample		Fold change						Description
	1	2	$\Delta pmr$	$\Delta pmr \Delta pnd$	Test 1 / Ref 1	Test 1 / Ref 2	Test 2 / Ref 1	Test 2 / Ref 2			
転写量が増加する遺伝子											
ORF144	218	203	738	626	3.39	3.64	2.87	3.09	3.09	hypothetical protein	
ORF39	14	17	68	73	4.72	4.09	5.03	4.36	4.36	hypothetical protein	
<i>ssb</i>	464	451	1278	1271	2.75	2.83	2.74	2.82	2.82	single-strand DNA binding protein	
<i>recT</i>	113	128	350	325	3.09	2.74	2.87	2.54	2.54	DNA recombination protein	
<i>trhA</i>	502	444	1624	1611	3.23	3.66	3.21	3.63	3.63	putative transfer protein	
<i>dsbC</i>	165	154	483	418	2.93	3.14	2.54	2.72	2.72	putative disulfide bond isomerase	
ORF146	1558	1378	4242	4631	2.72	3.08	2.97	3.36	3.36	putative DNA primase	
転写量が減少する遺伝子											
<i>pnd</i>	950	1092	12	13	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	nucleoid-associated protein	
ORF94	134	150	44	34	0.33	0.29	0.25	0.22	0.22	hypothetical protein	

Table S11. 染色体上で *pnd* 非存在時に *pmr* 破壊に伴い転写量が増加する49遺伝子

Gene name	Reference		Test sample		Fold change				Description
	$\Delta pnd$		$\Delta pmr \Delta pnd$		Test 1 /		Test 2 /		
	1	2	1	2	Ref 1	Ref 2	Ref 1	Ref 2	
PP_0157	11	10	116	104	10.17	12.15	9.12	10.90	transcriptional regulator, LysR family
PP_0571	29	23	218	163	7.50	9.35	5.62	7.01	hypothetical protein
PP_0683	19	12	176	92	9.37	14.22	4.90	7.43	hypothetical protein
PP_0808 <i>hmpA</i>	13	11	98	85	7.86	9.20	6.79	7.95	nitric oxide dioxygenase
PP_0837	190	109	1457	1007	7.67	13.33	5.30	9.22	hypothetical protein
PP_1082 <i>bfr</i>	88	68	822	613	9.31	12.04	6.94	8.98	bacterioferritin
PP_1101	155	113	1219	751	7.84	10.74	4.83	6.62	hypothetical protein
PP_1277 <i>algA</i>	7	8	123	65	17.39	15.08	9.23	8.00	mannose-1-phosphate guanylyltransferase/mannose-6-phosphate isomerase
PP_1374	62	43	518	423	8.36	11.98	6.82	9.77	hypothetical protein
PP_1473	2	31	287	225	132.13	9.13	103.43	7.15	hypothetical protein
PP_1479 <i>hicB-I</i>	7	11	149	110	21.10	13.27	15.56	9.79	hicB protein
PP_1513	22	12	171	111	7.77	13.83	5.03	8.95	hypothetical protein
PP_1522 <i>cspA-I</i>	48	17	483	328	9.99	27.76	6.79	18.86	cold shock protein CspA
PP_1788	14	11	112	82	7.94	10.51	5.78	7.65	hypothetical protein
PP_1829	49	37	368	302	7.57	10.01	6.21	8.21	hydrolase, alpha/beta fold family
PP_1932	9	2	146	78	15.79	64.90	8.43	34.64	hypothetical protein
PP_2203	18	21	204	146	11.05	9.56	7.91	6.85	hypothetical protein
PP_2644	62	25	772	621	12.46	30.89	10.02	24.84	hypothetical protein
PP_2655	14	5	102	81	7.24	20.25	5.73	16.02	hypothetical protein
PP_2669	21	10	339	107	16.41	35.48	5.16	11.17	outer membrane protein, putative
PP_2675	35	29	968	281	27.40	33.79	7.95	9.81	cytochrome c-type protein
PP_2909	60	36	537	292	8.90	14.82	4.83	8.05	hypothetical protein
PP_2958	18	8	127	103	7.07	15.04	5.73	12.20	glutaredoxin
PP_2982	12	8	101	78	8.27	12.01	6.39	9.27	Tn4652, cointegrate resolution protein T, putative
PP_2994	9	12	107	107	11.53	8.62	11.61	8.68	oxidoreductase, FMN-binding
PP_3016	15	5	123	114	8.11	24.41	7.47	22.47	lipopolysaccharide core biosynthesis protein, putative
PP_3034	1	3	70	71	69.58	27.52	70.61	27.93	regulator protein, putative
PP_3115	17	14	122	92	7.01	8.68	5.28	6.53	ISPpu13, transposase Orf3
PP_3296	18	10	179	112	9.84	17.23	6.17	10.82	YeeE/YedE family protein
PP_3394	15	2	113	98	7.43	50.31	6.45	43.66	3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA lyase, putative
PP_3402	10	1	139	85	14.22	139.13	8.68	84.89	hypothetical protein
PP_3555	180	156	1371	1050	7.61	8.81	5.83	6.75	transmembrane sensor, putative
PP_3687	23	11	137	112	6.08	12.53	4.96	10.20	
PP_3743	28	10	494	259	17.47	51.68	9.17	27.14	hypothetical protein
PP_3824	18	13	208	161	11.61	15.77	8.96	12.17	hypothetical protein
PP_3848	18	10	147	119	8.35	14.19	6.75	11.48	hypothetical protein



Table S11. 続き

PP_3998	12	11	118	105	10.08	10.48	8.96	9.32	glutathione S-transferase domain protein
PP_4010 <i>cspD</i>	22	7	147	123	6.77	20.15	5.66	16.83	cold-shock protein CspD
PP_4096	9	1	66	69	7.62	66.25	7.97	69.26	hypothetical protein
PP_4360	34	20	428	454	12.71	21.78	13.49	23.11	hypothetical protein
PP_4420	13	11	99	79	7.59	8.81	6.05	7.03	transposase, OrfB
PP_4497	37	25	240	207	6.43	9.69	5.56	8.38	conserved hypothetical protein TIGR00281
PP_4557	8	13	154	88	18.85	11.90	10.79	6.81	hypothetical protein
PP_4690	15	10	126	88	8.29	12.47	5.77	8.68	Rieske 2Fe-2S family protein
PP_4705	27	22	223	172	8.38	10.18	6.46	7.86	ring-cleaving dioxygenase, putative
PP_4955	7	2	86	66	12.20	51.15	9.41	39.43	hypothetical protein
PP_5033 <i>hutU</i>	8	20	252	141	33.15	12.83	18.47	7.15	urocanate hydratase
PP_5191	14	6	130	76	9.02	21.03	5.31	12.37	hypothetical protein
PP_5382	33	22	261	189	7.88	11.63	5.71	8.42	hypothetical protein

Table S12. 染色体上で *pnd* 非存在時に *pmr* 破壊に伴い転写量が減少する26遺伝子

Gene name	Reference $\Delta pnd$		Test sample $\Delta pmr \Delta pnd$		Fold change				Description
	1	2	1	2	Test 1 / Ref 1	Test 2 / Ref 2	Test 1 / Ref 1	Test 2 / Ref 2	
PP_0440 <i>tuf</i>	6412	3955	6063	5740	0.95	1.53	0.90	1.45	elongation factor Tu
PP_0445 <i>rplJ</i>	5723	4327	6035	5899	1.05	1.39	1.03	1.36	50S ribosomal protein L10
PP_0452 <i>tuf</i>	5881	3979	6733	6282	1.14	1.69	1.07	1.58	elongation factor Tu
PP_0508	4182	2881	2527	3613	0.60	0.88	0.86	1.25	hypothetical protein
PP_0620	172	181	99	110	0.58	0.55	0.64	0.61	transcriptional regulator, GntR family
PP_0627	124	120	183	139	1.48	1.53	1.12	1.16	hypothetical protein
PP_0898	1814	1624	1995	1722	1.10	1.23	0.95	1.06	hypothetical protein
PP_1172	101	100	141	60	1.40	1.41	0.59	0.60	hypothetical protein
PP_1361 <i>groEL</i>	3339	2366	4209	3790	1.26	1.78	1.13	1.60	chaperonin GroEL
PP_1446	2254	1574	327	1080	0.15	0.21	0.48	0.69	TonB-dependent receptor
PP_1562	428	297	420	467	0.98	1.42	1.09	1.57	phage terminase, small subunit, putative
PP_2467 <i>rpmL</i>	4029	3342	4667	4598	1.16	1.40	1.14	1.38	50S ribosomal protein L35
PP_3320	416	289	75	132	0.18	0.26	0.32	0.46	hypothetical protein
PP_3321	1829	1090	295	610	0.16	0.27	0.33	0.56	hypothetical protein
PP_3322 <i>hemB-2</i>	998	738	277	521	0.28	0.38	0.52	0.71	delta-aminolevulinic acid dehydratase
PP_3323	197	158	77	129	0.39	0.48	0.66	0.82	CobW/P47K family protein
PP_3324	248	138	89	156	0.36	0.64	0.63	1.13	hypothetical protein

Table S12. 続き

PP_3325	2085	1744	1250	2454	0.60	0.72	1.18	1.41	outer membrane ferric siderophore receptor, putative
PP_3599	5071	4364	5826	5388	1.15	1.33	1.06	1.23	5-dehydro-4-deoxyglucarate dehydratase
PP_5306 <i>exbB</i>	474	467	384	427	0.81	0.82	0.90	0.91	ferric siderophore transport system protein ExbB
PP_5307 <i>exbD</i>	453	524	673	504	1.49	1.28	1.11	0.96	biopolymer transport protein ExbD
PP_5308 <i>tonB</i>	270	267	264	249	0.98	0.99	0.92	0.93	ferric siderophore transport system, periplasmic binding protein TonB
PP_5359	209	91	58	104	0.28	0.64	0.50	1.15	CobW/P47K family protein
PP_5360	1421	846	348	803	0.25	0.41	0.57	0.95	hypothetical protein
PP_5361	1768	1453	365	951	0.21	0.25	0.54	0.65	CobW/P47K family protein
PP_5362	709	519	174	388	0.25	0.34	0.55	0.75	hypothetical protein

Table S13. pCAR1上で*pnd*非存在時に*pmr*破壊に伴い転写量が増加する10遺伝子、減少する3遺伝子

Gene name	Reference $\Delta pnd$		Test sample $\Delta pmr \Delta pnd$		Fold change				Description
	1	2	1	2	Test 1 / Ref 1	Test 1 / Ref 2	Test 2 / Ref 1	Test 2 / Ref 2	
転写量が増加する									
ORF144	61	33	738	626	12.16	22.48	10.32	19.07	hypothetical protein
ORF151	37	31	325	294	8.86	10.43	8.01	9.42	hypothetical protein
ORF153	13	11	177	137	13.61	15.46	10.58	12.01	hypothetical protein
ORF39	2	6	68	73	34.17	11.94	36.44	12.73	hypothetical protein
ORF40	27	18	306	250	11.21	17.24	9.15	14.07	hypothetical protein
<i>trhA</i>	156	113	1624	1611	10.43	14.34	10.35	14.22	putative transfer protein
<i>dsbC</i>	38	26	483	418	12.71	18.86	11.00	16.32	putative disulfide bond isomerase
<i>traF</i>	30	18	270	274	9.01	14.95	9.14	15.17	putative pilus assembly protein
ORF155	86	51	680	622	7.88	13.40	7.20	12.25	hypothetical protein
ORF158	19	19	203	179	10.50	10.69	9.24	9.41	hypothetical protein
転写量が減少する									
<i>pmr</i>	1146	948	20	16	0.02	0.02	0.01	0.02	nucleoid-associated protein
ORF71	512	389	660	628	1.29	1.69	1.23	1.61	hypothetical protein
ORF72	440	346	615	592	1.40	1.78	1.34	1.71	hypothetical protein

Table S14. 染色体上で*pmr* 非存在時に*phu* 破壊に伴い転写量が減少する138遺伝子

Gene name	Reference $\Delta pmr$		Test sample $\Delta phu \Delta pmr$		Fold change				Description
	1	2	1	2	Test 1 / Ref 1	Test 2 / Ref 2	Test 1 / Ref 1	Test 2 / Ref 2	
PP_0181	2236	1683	913	685	0.41	0.54	0.31	0.41	hypothetical protein
PP_0204	196	109	71	44	0.36	0.65	0.23	0.41	transcriptional regulator, GntR family
PP_0205	115	77	53	42	0.46	0.69	0.37	0.55	hypothetical protein
PP_0235 <i>lsfA</i>	1660	1415	356	284	0.21	0.25	0.17	0.20	antioxidant protein LsfA
PP_0273	1409	1147	163	154	0.12	0.14	0.11	0.13	hypothetical protein
PP_0354	278	138	87	61	0.31	0.64	0.22	0.45	CBS domain protein
PP_0395	538	354	192	145	0.36	0.54	0.27	0.41	hypothetical protein
PP_0396	656	428	222	140	0.34	0.52	0.21	0.33	hypothetical protein
PP_0397	950	791	283	170	0.30	0.36	0.18	0.21	hypothetical protein
PP_0481 <i>katA</i>	337	289	145	111	0.43	0.50	0.33	0.39	catalase
PP_0489	385	266	133	111	0.34	0.50	0.29	0.42	
PP_0504 <i>oprG</i>	4115	3727	1793	1376	0.44	0.48	0.33	0.37	outer membrane protein OprG
PP_0545	1203	975	617	416	0.51	0.63	0.35	0.43	aldehyde dehydrogenase family protein
PP_0550	320	246	138	82	0.43	0.56	0.26	0.33	hypothetical protein
PP_0563	836	540	229	198	0.27	0.42	0.24	0.37	response regulator
PP_0585	340	241	133	105	0.39	0.55	0.31	0.43	transcriptional regulator, MerR family
PP_0586	341	262	147	117	0.43	0.56	0.34	0.45	heavy metal translocating P-type ATPase
PP_0596	710	336	223	142	0.31	0.66	0.20	0.42	beta alanine--pyruvate transaminase
PP_0619	137	91	56	32	0.41	0.62	0.23	0.35	branched-chain amino acid ABC transporter, periplasmic amino acid-binding protein
PP_0738	900	662	231	149	0.26	0.35	0.17	0.22	hypothetical protein
PP_0739 <i>phrB</i>	1772	1372	189	306	0.11	0.14	0.17	0.22	deoxyribodipyrimidine photolyase
PP_0789 <i>ampD</i>	3388	2591	1138	747	0.34	0.44	0.22	0.29	N-acetyl-anhydromuramyl-L-alanine amidase
PP_0790	1274	1048	417	256	0.33	0.40	0.20	0.24	inner membrane protein AmpE
PP_0794 <i>fruK</i>	217	165	82	62	0.38	0.50	0.28	0.37	1-phosphofructokinase
PP_0807	1039	809	255	273	0.25	0.32	0.26	0.34	anaerobic nitric oxide reductase transcription regulator
PP_0998	735	406	232	128	0.32	0.57	0.17	0.31	hypothetical protein
PP_0999 <i>arcC</i>	1371	911	187	150	0.14	0.21	0.11	0.16	carbamate kinase
PP_1000 <i>argI</i>	2051	1484	325	210	0.16	0.22	0.10	0.14	ornithine carbamoyltransferase
PP_1001 <i>arcA</i>	3065	2321	371	268	0.12	0.16	0.09	0.12	arginine deiminase
PP_1002 <i>arcD</i>	2299	1954	370	273	0.16	0.19	0.12	0.14	arginine/ornithine antiporter
PP_1003	276	200	119	92	0.43	0.59	0.33	0.46	arginine/ornithine antiporter
PP_1210	1879	1451	609	473	0.32	0.42	0.25	0.33	DNA-binding stress protein, putative
PP_1211	832	613	428	305	0.51	0.70	0.37	0.50	hypothetical protein
PP_1291	2221	1591	434	271	0.20	0.27	0.12	0.17	PhoH family protein
PP_1318 <i>petB</i>	1209	972	599	420	0.50	0.62	0.35	0.43	ubiquinol--cytochrome c reductase, cytochrome b
PP_1384 <i>tigC</i>	1399	1072	698	477	0.50	0.65	0.34	0.45	multidrug/solvent RND outer membrane protein TigC

Table S14. 続き

PP_1385	<i>tigB</i>	1926	1500	988	656	0.51	0.66	0.34	0.44	multidrug/solvent RND transporter TtgB
PP_1631		232	150	92	68	0.40	0.62	0.29	0.45	conserved hypothetical protein TIGR00730
PP_1660		183	153	90	53	0.49	0.59	0.29	0.34	hypothetical protein
PP_1729		1616	1102	640	409	0.40	0.58	0.25	0.37	hypothetical protein
PP_1742		1232	622	115	79	0.09	0.19	0.06	0.13	hypothetical protein
PP_1743	<i>actP</i>	705	298	131	109	0.19	0.44	0.15	0.37	acetate permease
PP_1893	<i>fadE</i>	242	181	117	86	0.48	0.65	0.36	0.48	acyl-CoA dehydrogenase
PP_1960		568	411	228	174	0.40	0.55	0.31	0.42	hypothetical protein
PP_1961		515	401	230	183	0.45	0.57	0.36	0.46	hypothetical protein
PP_2010		767	632	284	230	0.37	0.45	0.30	0.36	cytochrome b561
PP_2018		249	187	117	93	0.47	0.63	0.37	0.50	BNR domain protein
PP_2107		511	368	172	149	0.34	0.47	0.29	0.41	hypothetical protein
PP_2121		2351	1803	697	501	0.30	0.39	0.21	0.28	lipoprotein, putative
PP_2132		1648	1092	757	541	0.46	0.69	0.33	0.49	universal stress protein family
PP_2161		4470	3331	1749	1108	0.39	0.53	0.25	0.33	hypothetical protein
PP_2187		1921	1531	266	165	0.14	0.17	0.09	0.11	universal stress protein family
PP_2310		1163	936	463	374	0.40	0.49	0.32	0.40	methyl-accepting chemotaxis transducer
PP_2512	<i>folE</i>	753	554	126	253	0.17	0.23	0.34	0.46	GTP cyclohydrolase I
PP_2624		83	66	23	23	0.27	0.34	0.28	0.35	hypothetical protein
PP_2628		2068	1528	608	406	0.29	0.40	0.20	0.27	ABC transporter, ATP-binding protein
PP_2629		1191	833	524	386	0.44	0.63	0.32	0.46	hypothetical protein
PP_2630		823	620	308	296	0.37	0.50	0.36	0.48	hypothetical protein
PP_2631		1134	975	483	392	0.43	0.50	0.35	0.40	hypothetical protein
PP_2632		242	190	84	84	0.35	0.44	0.35	0.44	hypothetical protein
PP_2648		2044	1713	213	193	0.10	0.12	0.09	0.11	universal stress protein family
PP_2665	<i>agmR</i>	390	242	159	97	0.41	0.66	0.25	0.40	DNA-binding response regulator AgmR
PP_2666		641	297	76	42	0.12	0.26	0.07	0.14	hypothetical protein
PP_2669		169	77	35	25	0.21	0.46	0.15	0.33	outer membrane protein, putative
PP_2675		267	94	47	32	0.18	0.50	0.12	0.34	cytochrome c-type protein
PP_2676		278	118	85	49	0.30	0.72	0.18	0.42	periplasmic binding protein, putative
PP_2680		327	183	111	78	0.34	0.61	0.24	0.43	aldehyde dehydrogenase family protein
PP_2681		364	156	43	22	0.12	0.28	0.06	0.14	pyrroloquinoline quinone biosynthesis protein PqqD
PP_2727		323	222	62	100	0.19	0.28	0.31	0.45	C-factor, putative
PP_2728		748	524	127	224	0.17	0.24	0.30	0.43	hypothetical protein
PP_2729		1055	784	114	316	0.11	0.15	0.30	0.40	hypothetical protein
PP_2730		1021	839	85	209	0.08	0.10	0.20	0.25	lipoprotein, putative
PP_2731		958	859	91	94	0.09	0.11	0.10	0.11	hypothetical protein
PP_2732		567	460	58	46	0.10	0.13	0.08	0.10	hypothetical protein
PP_2733		332	333	37	36	0.11	0.11	0.11	0.11	hypothetical protein

Table S14. 続き

PP_2734	<i>cfa</i>	1385	1130	29	7	0.02	0.03	0.01	0.01	cyclopropane-fatty-acyl-phospholipid synthase
PP_2735		1974	1549	47	48	0.02	0.03	0.02	0.03	hypothetical protein
PP_2736		1604	1478	54	153	0.03	0.04	0.10	0.10	hypothetical protein
PP_2737		1771	1485	136	404	0.08	0.09	0.23	0.27	oxidoreductase, short-chain dehydrogenase/reductase family
PP_2738		2021	1484	186	442	0.09	0.13	0.22	0.30	transcriptional regulator, putative
PP_2745		119	97	31	23	0.26	0.32	0.19	0.23	universal stress protein family
PP_2853		245	191	132	76	0.54	0.69	0.31	0.40	hypothetical protein
PP_2942		255	161	85	66	0.33	0.53	0.26	0.41	response regulator
PP_3128		532	386	288	185	0.54	0.75	0.35	0.48	exopolysaccharide biosynthesis/transport protein, putative
PP_3134		238	178	104	60	0.44	0.59	0.25	0.34	hypothetical protein
PP_3234		398	263	50	27	0.13	0.19	0.07	0.10	heat shock protein, HSP20 family
PP_3235		355	308	69	30	0.19	0.22	0.08	0.10	hypothetical protein
PP_3236		171	170	41	8	0.24	0.24	0.05	0.05	lipoprotein OprL, putative
PP_3237		82	72	37	27	0.45	0.51	0.33	0.37	universal stress protein family
PP_3287		293	213	54	49	0.18	0.25	0.17	0.23	transcriptional regulator, Crp/Fnr family
PP_3291		139	122	60	46	0.43	0.50	0.33	0.38	metallo-beta-lactamase family protein
PP_3453		1335	896	624	424	0.47	0.70	0.32	0.47	sensor protein RstB, putative
PP_3455		3628	2641	1558	998	0.43	0.59	0.28	0.38	multidrug efflux RND membrane fusion protein
PP_3456		2423	1805	862	605	0.36	0.48	0.25	0.33	multidrug efflux RND transporter
PP_3457	<i>moba</i>	723	514	318	245	0.44	0.62	0.34	0.48	molybdopterin-guanine dinucleotide biosynthesis protein A
PP_3580		1135	802	572	423	0.50	0.71	0.37	0.53	hypothetical protein
PP_3610		620	490	217	174	0.35	0.44	0.28	0.35	hypothetical protein
PP_3664	<i>pssA</i>	782	517	340	212	0.44	0.66	0.27	0.41	phosphatidylserine synthase
PP_3720		253	187	129	90	0.51	0.69	0.36	0.48	NAD(P)H quinone oxidoreductase, putative
PP_3721	<i>aspC</i>	270	201	137	97	0.51	0.68	0.36	0.48	aspartate aminotransferase
PP_3722	<i>alr</i>	335	263	149	101	0.44	0.57	0.30	0.39	alanine racemase
PP_3742		699	545	368	246	0.53	0.67	0.35	0.45	glutathione S-transferase family protein
PP_3822		338	292	173	120	0.51	0.59	0.35	0.41	cytochrome c family protein
PP_3839		2466	1891	496	398	0.20	0.26	0.16	0.21	alcohol dehydrogenase
PP_3840		1687	1082	469	356	0.28	0.43	0.21	0.33	hypothetical protein
PP_3927		2140	1541	448	339	0.21	0.29	0.16	0.22	hypothetical protein
PP_3931		357	268	152	133	0.43	0.57	0.37	0.50	transporter, sodium/sulfate symporter family
PP_4050	<i>glgA</i>	721	544	358	258	0.50	0.66	0.36	0.47	glycogen synthase
PP_4103		507	365	86	103	0.17	0.24	0.20	0.28	low-affinity inorganic phosphate transporter
PP_4234		123	72	44	40	0.36	0.62	0.32	0.55	
PP_4250	<i>ccoN-I</i>	3453	2617	811	688	0.23	0.31	0.20	0.26	cytochrome c oxidase, cbb3-type, subunit I
PP_4251	<i>ccoO-I</i>	2683	2044	449	358	0.17	0.22	0.13	0.18	cytochrome c oxidase, cbb3-type, subunit II
PP_4252	<i>ccoQ-I</i>	2859	2174	536	422	0.19	0.25	0.15	0.19	cytochrome c oxidase, cbb3-type, CcoQ subunit
PP_4253	<i>ccoP-I</i>	1957	1412	391	299	0.20	0.28	0.15	0.21	cytochrome c oxidase, cbb3-type, subunit III

Table S14. 続き

PP_4259	1146	821	325	296	0.28	0.40	0.26	0.36	iron-sulfur cluster-binding protein
PP_4260	982	804	330	284	0.34	0.41	0.29	0.35	hypothetical protein
PP_4264 <i>hemN</i>	2660	2233	984	935	0.37	0.44	0.35	0.42	coproporphyrinogen III oxidase
PP_4278 <i>xdhA</i>	381	267	68	59	0.18	0.26	0.15	0.22	xanthine dehydrogenase, XdhA subunit
PP_4279 <i>xdhB</i>	258	157	74	60	0.29	0.47	0.23	0.38	xanthine dehydrogenase, XdhB subunit
PP_4285	106	117	57	38	0.54	0.48	0.36	0.32	transhyretin family protein
PP_4428	116	76	39	22	0.34	0.52	0.19	0.30	amino acid ABC transporter, periplasmic amino acid-binding protein
PP_4448	227	155	110	82	0.48	0.71	0.36	0.53	hypothetical protein
PP_4509	370	240	178	109	0.48	0.74	0.29	0.45	hypothetical protein
PP_4593	627	433	300	230	0.48	0.69	0.37	0.53	hypothetical protein
PP_4597 <i>moaA</i>	711	519	332	252	0.47	0.64	0.35	0.49	molybdenum cofactor biosynthesis protein A
PP_4650 <i>cioB</i>	500	374	242	169	0.48	0.65	0.34	0.45	ubiquinol oxidase subunit II, cyanide insensitive
PP_4651 <i>cioA</i>	506	398	250	155	0.49	0.63	0.31	0.39	ubiquinol oxidase subunit I, cyanide insensitive
PP_4870	2681	1640	873	659	0.33	0.53	0.25	0.40	azurin
PP_5003 <i>phaA</i>	1280	1010	715	468	0.56	0.71	0.37	0.46	poly(3-hydroxyalkanoate) polymerase 1
PP_5005 <i>phaC</i>	425	316	212	158	0.50	0.67	0.37	0.50	poly(3-hydroxyalkanoate) polymerase 2
PP_5207	679	521	304	215	0.45	0.58	0.32	0.41	ABC transporter, ATP-binding protein/permease protein, putative
PP_5208	288	215	98	107	0.34	0.46	0.37	0.50	ABC transporter, permease protein
PP_5358	1259	1035	491	364	0.39	0.47	0.29	0.35	hypothetical protein
PP_5389	1689	1557	301	237	0.18	0.19	0.14	0.15	hypothetical protein
PP_5390	2518	1906	573	434	0.23	0.30	0.17	0.23	hypothetical protein
PP_5391	2397	1853	553	408	0.23	0.30	0.17	0.22	hypothetical protein
PP_5392	1917	1427	573	507	0.30	0.40	0.26	0.35	hypothetical protein
PP_5394	410	296	155	110	0.38	0.53	0.27	0.37	hypothetical protein

Table S15. pCAR1上で*pmr*非存在時に*phu*破壊に伴い転写量が増加する3遺伝子、減少する2遺伝子

Gene name	Reference		Test sample		Fold change				Description
	$\Delta pmr$		$\Delta phu \Delta pmr$		Test 1 / Ref 1	Test 2 / Ref 1	Test 1 / Ref 2	Test 2 / Ref 2	
転写量が増加する									
ORF105	1337	1335	3143	2693	2.35	2.35	2.01	2.02	hypothetical protein
ORF106	1187	1221	2797	2649	2.36	2.29	2.23	2.17	hypothetical protein
ORF107	277	279	684	723	2.47	2.45	2.61	2.59	hypothetical protein
転写量が減少する									
ORF37	1039	1063	90	290	0.09	0.08	0.28	0.27	hypothetical protein
<i>phu</i>	5108	5600	1	1	0.00	0.00	0.00	0.00	nucleoid-associated protein

Table S16. 染色体上で *p<sub>h</sub>u* 非存在時に *pmr* 破壊に伴い、転写量が増加する17遺伝子、減少する62遺伝子

Gene name	Reference		Test sample		Fold change				Description
	$\Delta p_{hu}$		$\Delta p_{hu} \Delta p_{mr}$		Test 1 /		Test 2 /		
	1	2	1	2	Ref 1	Ref 2	Ref 1	Ref 2	
転写量が増加する遺伝子									
PP_0681	33	29	270	142	8.16	9.34	4.29	4.91	hypothetical protein
PP_0754	13	20	147	91	11.19	7.16	6.97	4.46	hypothetical protein
PP_1076 <i>glpF</i>	61	33	343	276	5.61	10.26	4.51	8.25	glycerol uptake facilitator protein
PP_1101	210	143	1097	790	5.24	7.66	3.77	5.51	hypothetical protein
PP_1158	17	12	94	66	5.66	8.06	3.99	5.68	
PP_1178	89	62	425	332	4.75	6.87	3.72	5.38	hypothetical protein
PP_1185 <i>oprH</i>	171	129	989	1055	5.77	7.66	6.15	8.18	outer membrane protein H1
PP_1267	158	95	742	526	4.70	7.84	3.33	5.56	hypothetical protein
PP_2843 <i>ureA</i>	1	6	116	82	116.23	19.61	81.67	13.78	urease subunit gamma
PP_2878	37	24	263	174	7.02	11.15	4.66	7.40	hypothetical protein
PP_2883	45	33	345	285	7.65	10.43	6.31	8.62	hypothetical protein
PP_3434	42	39	246	191	5.82	6.26	4.52	4.85	hypothetical protein
PP_3687	32	16	152	113	4.78	9.63	3.54	7.13	
PP_3848	17	17	124	72	7.26	7.39	4.22	4.30	hypothetical protein
PP_3921	89	62	469	359	5.27	7.62	4.04	5.83	hypothetical protein
PP_4504	37	34	260	155	6.95	7.56	4.14	4.50	hypothetical protein
PP_5189	15	30	201	205	13.08	6.73	13.31	6.84	hypothetical protein
転写量が減少する遺伝子									
PP_0235 <i>tsfA</i>	463	652	356	284	0.77	0.55	0.61	0.44	antioxidant protein LsfA
PP_0273	329	433	163	154	0.49	0.38	0.47	0.36	hypothetical protein
PP_0354	128	122	87	61	0.68	0.72	0.48	0.50	CBS domain protein
PP_0543 <i>eutB</i>	298	256	302	191	1.01	1.18	0.64	0.75	ethanolamine ammonia-lyase, heavy subunit
PP_0544	129	109	60	46	0.46	0.55	0.36	0.42	ethanolamine transporter
PP_0545	974	798	617	416	0.63	0.77	0.43	0.52	aldehyde dehydrogenase family protein
PP_0620	198	229	196	128	0.99	0.86	0.65	0.56	transcriptional regulator, GntR family
PP_0627	274	145	191	127	0.70	1.31	0.46	0.87	hypothetical protein
PP_0789 <i>ampD</i>	1875	1415	1138	747	0.61	0.80	0.40	0.53	N-acetyl-anhydromuramyl-L-alanine amidase
PP_0790	586	494	417	256	0.71	0.84	0.44	0.52	inner membrane protein AmpE
PP_1001 <i>arcA</i>	336	543	371	268	1.10	0.68	0.80	0.49	arginine deiminase
PP_1002 <i>arcD</i>	439	663	370	273	0.84	0.56	0.62	0.41	arginine/ornithine antiporter
PP_1291	400	634	434	271	1.09	0.69	0.68	0.43	PhoH family protein
PP_1384 <i>tigC</i>	699	607	698	477	1.00	1.15	0.68	0.79	multidrug/solvent RND outer membrane protein TigC
PP_1385 <i>tigB</i>	1075	810	988	656	0.92	1.22	0.61	0.81	multidrug/solvent RND transporter TigB
PP_1386 <i>tigA</i>	1450	993	1422	916	0.98	1.43	0.63	0.92	multidrug/solvent RND membrane fusion protein
PP_1534	155	70	70	73	0.45	1.00	0.47	1.04	hypothetical protein

Table S16. 続き

PP_1536	129	67	93	62	0.72	1.40	0.48	0.93	hypothetical protein
PP_1539	185	108	102	96	0.55	0.94	0.52	0.89	hypothetical protein
PP_1542	297	131	183	136	0.62	1.40	0.46	1.04	hypothetical protein
PP_1543	251	94	117	87	0.47	1.25	0.35	0.93	hypothetical protein
PP_1544	152	64	68	66	0.45	1.05	0.43	1.02	hypothetical protein
PP_1546	221	114	152	76	0.69	1.33	0.34	0.67	hypothetical protein
PP_1559	445	151	222	133	0.50	1.47	0.30	0.88	phage holin, lambda family
PP_1560	849	301	432	256	0.51	1.43	0.30	0.85	hypothetical protein
PP_1561	414	133	192	124	0.46	1.44	0.30	0.93	phage holin, putative
PP_1565	597	229	282	154	0.47	1.23	0.26	0.67	phage portal protein, HK97 family
PP_1566	567	210	293	133	0.52	1.39	0.23	0.63	head maturation protease, putative
PP_1567	1151	484	597	287	0.52	1.23	0.25	0.59	phage major capsid protein, HK97 family
PP_1569	530	222	317	150	0.60	1.43	0.28	0.68	hypothetical protein
PP_1571	775	292	377	235	0.49	1.29	0.30	0.81	hypothetical protein
PP_1573	768	359	508	264	0.66	1.42	0.34	0.74	major tail protein, putative
PP_1577	302	124	165	73	0.55	1.33	0.24	0.59	phage tail tape measure protein, lambda family
PP_1578	413	155	201	104	0.49	1.29	0.25	0.67	hypothetical protein
PP_1579	332	133	163	87	0.49	1.22	0.26	0.66	hypothetical protein
PP_1581	313	114	171	84	0.55	1.50	0.27	0.73	BNR domain protein
PP_1583	264	116	157	82	0.59	1.35	0.31	0.71	structural protein P5, putative
PP_1742	403	457	115	79	0.29	0.25	0.20	0.17	hypothetical protein
PP_1743	207	233	131	109	0.63	0.56	0.53	0.47	acetate permease
PP_1856	489	414	411	377	0.84	0.99	0.77	0.91	hypothetical protein
PP_2010	301	232	284	230	0.94	1.22	0.76	0.99	cytochrome b561
PP_2121	641	592	697	501	1.09	1.18	0.78	0.85	lipoprotein, putative
PP_2161	1557	1377	1749	1108	1.12	1.27	0.71	0.80	hypothetical protein
PP_2187	342	522	266	165	0.78	0.51	0.48	0.32	universal stress protein family
PP_2628	1014	738	608	406	0.60	0.83	0.40	0.55	ABC transporter, ATP-binding protein
PP_2648	402	507	213	193	0.53	0.42	0.48	0.38	universal stress protein family
PP_2666	80	71	76	42	0.94	1.07	0.52	0.60	hypothetical protein
PP_2675	67	89	47	32	0.70	0.53	0.47	0.35	cytochrome c-type protein
PP_2680	165	178	111	78	0.67	0.62	0.47	0.44	aldehyde dehydrogenase family protein
PP_2731	129	216	91	94	0.70	0.42	0.73	0.44	hypothetical protein
PP_2735	74	218	47	48	0.64	0.22	0.65	0.22	hypothetical protein
PP_2738	577	622	186	442	0.32	0.30	0.77	0.71	transcriptional regulator, putative
PP_3287	66	82	54	49	0.81	0.65	0.73	0.59	transcriptional regulator, Crp/Fnr family
PP_3453	606	427	624	424	1.03	1.46	0.70	0.99	sensor protein RstB, putative
PP_3455	1978	1255	1558	998	0.79	1.24	0.50	0.80	multidrug efflux RND membrane fusion protein
PP_3456	1129	869	862	605	0.76	0.99	0.54	0.70	multidrug efflux RND transporter



Table S16. 続き

PP_3839	673	691	496	398	0.74	0.72	0.59	0.58	alcohol dehydrogenase
PP_3927	1082	775	448	339	0.41	0.58	0.31	0.44	hypothetical protein
PP_4250 <i>ccaN-I</i>	877	930	811	688	0.92	0.87	0.78	0.74	cytochrome c oxidase, cbb3-type, subunit I
PP_4252 <i>ccaQ-I</i>	527	720	536	422	1.02	0.74	0.80	0.59	cytochrome c oxidase, cbb3-type, CcoQ subunit
PP_4309	87	64	73	67	0.85	1.14	0.77	1.04	transporter, NCS1 nucleoside transporter family
PP_5392	674	672	573	507	0.85	0.85	0.75	0.75	hypothetical protein

Table S17. pCAR1上で*phu* 非存在時に*pmr* 破壊に伴い転写量が増加する9遺伝子、減少する1遺伝子

Gene name	Reference $\Delta phu$		Test sample $\Delta phu \Delta pmr$		Fold change				Description
	1	2	1	2	Test 1 / $\Delta phu$	Test 2 / $\Delta phu$	Test 1 / $\Delta phu \Delta pmr$	Test 2 / $\Delta phu \Delta pmr$	
転写量が増加する遺伝子									
ORF105	935	926	3143	2693	3.36	3.40	2.88	2.91	hypothetical protein
ORF106	570	679	2797	2649	4.91	4.12	4.65	3.90	hypothetical protein
ORF107	153	140	684	723	4.48	4.88	4.73	5.16	hypothetical protein
ORF108	879	848	3308	3224	3.76	3.90	3.67	3.80	hypothetical protein
ORF109	204	227	849	715	4.16	3.74	3.50	3.15	hypothetical protein
<i>ssb</i>	272	271	1036	912	3.81	3.83	3.36	3.37	single-strand DNA binding protein
<i>trhA</i>	196	218	709	860	3.61	3.26	4.38	3.95	putative transfer protein
ORF145	1862	1884	6197	7376	3.33	3.29	3.96	3.92	putative DNA primase
ORF146	957	915	3277	4248	3.42	3.58	4.44	4.64	putative DNA primase
転写量が減少する遺伝子									
<i>pmr</i>	2166	2442	13	23	0.01	0.01	0.01	0.01	nucleoid-associated protein

## 謝辞

本博士論文研究を行うに当たりまして、多くの方々からご指導、ご協力を賜りました。この場をお借りして厚く御礼申し上げます。

すばらしい研究環境を与えて下さり、また暖かいご指導とご教示を賜りました、東京大学生物生産工学研究センター環境保全工学研究室教授 山根久和先生に深く感謝いたします。

厳しくも暖かく、大変貴重なご助言を賜り、日頃より直接ご指導頂きました、同センター環境保全工学研究室准教授 野尻秀昭先生に心より感謝いたします。

常に励まし、暖かく見守って下さりました、同センター環境保全工学研究室助教 岡田憲典先生に厚く御礼申し上げます。

タイリングアレイ解析について貴重なご指導、ご助言を賜りました、東京大学大学院農学生命科学研究科アグリバイオインフォマティクス教育研究ユニット特任准教授 西田洋巳先生に深く感謝いたします。

研究生生活全般に渡り、公私にわたって熱心なご指導、有益なご助言、ご協力、励ましの言葉を頂きました、同アグリバイオインフォマティクス教育研究ユニット特任研究員 尹忠鉄博士、理化学研究所バイオリソースセンター微生物材料開発室基礎科学特別研究員 新谷政己博士、マッセー大学博士研究員 中条哲也博士に深く感謝いたします。

また、日々の生活の中で親身なご助言、ご協力を頂きました、堀寄允文氏、清水崇史氏、岩田修氏、梅田隆志氏、高橋裕里香氏、鈴木千穂氏をはじめとする同センター環境保全工学研究室の皆様、及び、内藤邦彦氏、徳丸裕樹氏をはじめとする卒業生の皆様に深く感謝いたします。

最後に、本研究を進めるにあたり常に暖かく見守り、日々の研究生生活を支えて頂きました家族に心から感謝申し上げ、この論文を捧げます。

2011 年 1 月

## 論文の内容の要旨

応用生命工学 専攻  
平成 20 年度博士課程 進学  
氏 名 武田 俊春  
指導教員名 山根 久和

## 論文題目

### カルバゾール分解プラスミド pCAR1 上にコードされる核様体タンパク質の機能解析

核様体タンパク質 (NAPs, nucleoid-associated proteins)は細菌の細胞内に著量存在するタンパク質であり、DNA をコンパクトに折りたたむと共に、様々な遺伝子の転写制御に影響を及ぼすことが知られている。また、これら NAPs がプラスミド上にコードされる例も知られており、こうしたプラスミドが宿主細胞内に入ると、染色体・プラスミド双方にコードされる NAPs が協調的に機能し、遺伝子発現を制御することでプラスミド由来の難分解性物質分解能や重金属耐性、抗生物質耐性といった多様な形質を宿主に付与したり、染色体に由来する種々の機能を変動させたりすることとなる。すなわち、プラスミドの機能発現様式を理解するためには NAPs の機能についての理解が重要となるが、プラスミド上にコードされる NAPs についての研究は本博士論文研究開始当初はほとんど行われていないのが現状であった。そうした中、我々の研究グループでは、全塩基配列が解読済みのカルバゾール分解プラスミド pCAR1 をモデル土壌細菌 *Pseudomonas putida* KT2440 株に保持させ、プラスミド上にコードされる NAPs の役割・制御メカニズムについて解析を行ってきた。pCAR1 上には 3 つの NAPs (Pmr、Phu および Pnd)がコードされており、大腸菌で良く研究されている H-NS (*Pseudomonas* 属細菌の MvaT)の相同タンパク質である Pmr については高密度タイリングアレイを用いたトランスクリプトーム解析や結合位置の網羅的検出から、染色体・プラスミド双方の多数の遺伝子の転写制御に関わること、染色体由来の H-NS 様因子と相互作用することが明らかにされた。このような状況から、pCAR1 上の残る 2 つの NAPs

もプラスミド機能の発現において重要な役割を担っていると推測された。

以上の背景から、本研究では pCAR1 上にコードされる各 NAPs の役割に興味を持ち、これを明らかにすることを目的とした。まず基盤情報として、NAPs を保持するプラスミドの分布・特徴を解析した後に、pCAR1 上にコードされる Phu、Pnd の転写・発現様式および溶液中での性状を解析した。また Pmr を含む各 NAPs をコードする遺伝子を除去した破壊株を作製し、NAPs の除去が宿主に及ぼす影響を解析した。

## 1. 核様体タンパク質遺伝子を保持するプラスミドの分布とその特徴<sup>1)</sup>

可動性遺伝因子であるプラスミドの振る舞いや役割と、プラスミド上に NAPs 遺伝子が存在することの間に何らかの普遍的な関連性があるか否かについて興味を持たれたが、本研究開始当初はプラスミド由来の NAPs 研究自体が少なく、それらも特定のプラスミド由来の特定の NAPs の機能を追究するものに限られており、客観的考察は不十分・不可能であった。そこで、全塩基配列情報既知のプラスミドの配列情報データベースを取得し、NAPs 遺伝子を保持するプラスミドを網羅的に抽出すると共に、それらのサイズ、G+C 含量、接合伝達性等の特徴について考察を行った。

グラム陰性細菌由来の 1,382 個のプラスミドに対し、グラム陰性細菌由来の NAPs (Fis, H-NS, HU, IHF, Lrp, MvaT, NdpA) をクエリとして TBLASTN 解析を行った結果、136 個のプラスミド上に計 210 個の NAPs 遺伝子が存在していた。NAPs 遺伝子を 2 つ以上保持するプラスミド、1 つのみ保持するプラスミドの平均サイズはそれぞれ 790 kb、199 kb であり、1,382 個のプラスミドの平均サイズ (83 kb) よりも大きいことが明らかとなった。サイズの大きなプラスミドほど宿主細菌の転写ネットワークを乱し適合度を低下させるような遺伝子を有する可能性が高くなると共に、宿主細菌由来の NAPs の多くがプラスミド上に結合することで染色体上に結合する量が不足して転写ネットワークに乱れが生じ、宿主にとって負荷となることが予想される。つまりサイズの大きなプラスミドはプラスミドを保持することにより宿主に生じる負荷を軽減させるため、NAPs 遺伝子を保持する方が都合がよいという可能性が考えられた。

また、H-NS ホモログ遺伝子を有するプラスミドは G+C 含量が低い傾向があった。H-NS は A+T-rich な領域に好んで結合するため、比較的サイズが大きく G+C 含量が低いプラスミドが宿主細胞内に入ると、各種 NAPs のうち特に H-NS が不足し宿主に負荷を与えられと考えられた。すなわち、不足分を補うために低 G+C 含量プラスミドは H-NS 遺伝子を持つ方が有利であると考えられた。

さらにプラスミドの接合伝達に必須な relaxase 配列の有無に基づき、プラスミドの伝達性と NAPs 遺伝子の有無に関連があるか否かを調べた。その結果、NAPs 遺伝子を有するプラスミドの方が relaxase 遺伝子を保持する傾向があることが明らかとなった。このことは、グラム陰性細菌由来プラスミドの接合伝達関連遺伝子群はサイズが大きく、そのため接合伝達性プラスミドが必然的にサイズが大きい傾向があることと関連が

あると考えられるが、NAPs が多数の遺伝子の転写を制御する **global regulator** として働くことを考慮するとプラスミドの伝達にも関与していると推測された。

## 2. 核様体タンパク質 Pnd、Phu の発現解析

Pnd は NdpA ホモログであるが、NdpA はグラム陰性細菌内で広く保存されるものの研究例が少なく機能がほとんど不明なタンパク質であった。また Phu は HU ホモログであり、HU は主に大腸菌での研究から二量体を形成し湾曲した DNA 領域に結合すること、様々な遺伝子の転写制御に影響を与えることが明らかとなっていたが、プラスミド上にコードされる HU の機能を追究した研究例は本研究開始当初まで存在しなかった。そのため Pnd および Phu の解析を行うことで NAPs の機能に関する有用な新知見が得られるものと期待された。

まず pCAR1 を保持する *P. putida* KT2440 株を用いて転写レベルの解析を行った結果、*pnd*、*phu* はいずれも対数増殖期をピークとして構成的に転写されることが明らかとなった。また *phu* は翻訳開始点の 70 塩基上流に転写開始点を持ち、その 5' 上流域には  $\sigma^{70}$  因子の結合配列が見出された。一方、我々のグループで以前行われたタイリングアレイ解析により *pnd* の転写レベルは *pmr* および *phu* よりも低いことが明らかとなっており、本研究でも *pnd* の転写開始点の決定には至っていない。次に His タグ融合 Pnd、Phu 発現株を作製し翻訳レベルの解析を行った。各株をコハク酸を唯一の炭素源とする無機液体培地で培養し、経時的にサンプリングした菌体から可溶性タンパク質を抽出してウェスタンブロッティング解析に供した。その結果、Phu、Pnd いずれも可溶性タンパク質 1  $\mu\text{g}$  中に少なくとも 1.1 ng 以下しか存在していないことが明らかとなった。

さらに His タグ融合 Pnd、Phu の大腸菌での発現・精製系を構築した。ゲルろ過クロマトグラフィーおよびクロスリンク法により、Phu は溶液中で二量体を形成していることが示された。*phu* の転写プロファイルおよび Phu の性状はいずれも大腸菌と *Pseudomonas* 属細菌における染色体由来 HU タンパク質の性質と一致していたことから、Phu は HU と配列の相同性を示すだけでなく、類似の機能・役割を有しているものと考えられた。一方、Pnd については明瞭な結果ではないものの溶液中で三量体を形成する可能性が示唆された。NdpA の多量体形成能を解析した研究例は現在までに無く、今後は立体構造解析などによる正確な性状の把握が期待される。

## 3. pCAR1 由来 NAPs 遺伝子破壊が宿主に与える影響の解析

pCAR1 上にコードされる 3 つの NAPs の機能を明らかにするため、各々をコードする遺伝子を除去した破壊株を作製し、表現型やトランスクリプトームの変化を解析した。

まず各遺伝子の単独破壊株を作製し、コハク酸を炭素源とする無機液体培地での生育や軟寒天培地での運動性、プラスミドの保持率といった表現型を調べたが、いずれも野生株との差異は認められなかった。一方、NAPs 遺伝子を 2 つ除去した二重破壊株を

作製したところ、*pmr* と *pnd*、*pmr* と *phu* の二重破壊株では継代培養を経ることで pCAR1 の構造変化および脱落が生じる頻度が高くなることが明らかとなった。この表現型は各株への *pmr* の導入により相補されたことから、各 NAPs 遺伝子破壊に起因するものであることが強く示唆された。これら二重破壊株では他にもバイオフィルム中で宿主菌体の糸状化が促進されること、*pmr* の相補によりこの表現型が消失することが明らかとなりつつある（当研究室、李ら、未発表データ）。

次に作製した破壊株を BIOLOG 社製 Phenotype MicroArray に供し、利用できる基質や浸透圧ストレス耐性、pH 耐性など 576 条件での表現型を解析した。その結果 *pmr*、*pnd*、*phu* 単独破壊株はそれぞれ野生株と比較して 9、1、4 個の条件で異なる表現型を示した。また *pmr* と *pnd* の二重破壊株は *pmr*、*pnd* 単独破壊株と比較してそれぞれ 11、16 個の条件で、*pmr* と *phu* の二重破壊株は *pmr*、*phu* 単独破壊株と比較してそれぞれ 23、19 個の条件で異なる表現型を示した。すなわち、二重破壊株では単独破壊株よりも多くの条件で表現型の変動が検出された。さらに 3 つの NAPs 遺伝子の転写量が共に最大となる対数増殖期まで各株を培養し、高密度タイリングアレイを用いた RNA マッピング解析を行ってトランスクリプトームを比較した結果、*pmr* 単独破壊株および二重破壊株では多くの遺伝子の転写変動が検出された。各解析は培養条件が異なるため同列に議論することはできないが、トランスクリプトーム解析で転写変動遺伝子が多く抽出された破壊株ほど Phenotype MicroArray 解析で変動した表現型の数も多い傾向が見出された。また *pmr*、*pnd*、*phu* のレギュロン間で多くの重複が認められたことから、各 NAPs は協調的に機能し転写制御を行っている可能性が示唆された。二重破壊株で pCAR1 の構造が不安定化する表現型は *pmr* ともう 1 つの NAPs 遺伝子を除去した株でのみ見出され、*pnd* と *phu* の二重破壊株では認められなかったことも考慮すると、菌体内では pCAR1 由来の 3 つの NAPs のうち Pmr が中心となって機能し Pnd および Phu が補佐的に働くことで、多数の遺伝子について協調的な転写制御を行っていることが推測された。

#### 4. まとめと今後の展望

本研究により、pCAR1 上の 3 つの NAPs が協調的に転写ネットワーク制御を行っていることが示唆された。今後は各 NAPs 間のタンパク質レベルでの相互作用の有無を明らかにすると共に、染色体上およびプラスミド上への結合能、染色体由来の NAPs との相互作用の有無についても解析を行うことで、NAPs がプラスミド上にコードされる意義に迫ることができるものと期待される。

#### 文献

1) Takeda, T., Yun, C.-S., Shintani, M., Yamane, H., and Nojiri, H. 2011. Distribution of Genes Encoding Nucleoid-Associated Protein Homologs in Plasmids. *International Journal of Evolutionary Biology*. Vol.2011, Article ID 685015, 30 pages.

## Research Article

# Distribution of Genes Encoding Nucleoid-Associated Protein Homologs in Plasmids

**Toshiharu Takeda,<sup>1</sup> Choong-Soo Yun,<sup>1,2</sup> Masaki Shintani,<sup>3</sup>  
Hisakazu Yamane,<sup>1</sup> and Hideaki Nojiri<sup>1,2</sup>**

<sup>1</sup> Biotechnology Research Center, The University of Tokyo, 1-1-1 Yayoi, Bunkyo-ku, Tokyo 113-8657, Japan

<sup>2</sup> Agricultural Bioinformatics Research Unit, The University of Tokyo, 1-1-1 Yayoi, Bunkyo-ku, Tokyo 113-8657, Japan

<sup>3</sup> Japan Collection of Microorganisms, RIKEN Bioresource Center, 2-1 Hirosawa, Wako, Saitama 351-0198, Japan

Correspondence should be addressed to Hideaki Nojiri, [anojiri@mail.ecc.u-tokyo.ac.jp](mailto:anojiri@mail.ecc.u-tokyo.ac.jp)

Received 14 October 2010; Accepted 27 November 2010

Academic Editor: Hiromi Nishida

Copyright © 2011 Toshiharu Takeda et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Bacterial nucleoid-associated proteins (NAPs) form nucleoprotein complexes and influence the expression of genes. Recent studies have shown that some plasmids carry genes encoding NAP homologs, which play important roles in transcriptional regulation networks between plasmids and host chromosomes. In this study, we determined the distributions of the well-known NAPs Fis, H-NS, HU, IHF, and Lrp and the newly found NAPs MvaT and NdpA among the whole-sequenced 1382 plasmids found in Gram-negative bacteria. Comparisons between NAP distributions and plasmid features (size, G+C content, and putative transferability) were also performed. We found that larger plasmids frequently have NAP gene homologs. Plasmids with H-NS gene homologs had less G+C content. It should be noted that plasmids with the NAP gene homolog also carried the relaxase gene involved in the conjugative transfer of plasmids more frequently than did those without the NAP gene homolog, implying that plasmid-encoded NAP homologs positively contribute to transmissible plasmids.

## 1. Introduction

Bacterial chromosomal DNA is folded to form a compacted structure, the nucleoid. The proteins involved in folding the chromosome are known as nucleoid-associated proteins (NAPs) [1, 2]. Because of their DNA-binding ability, NAPs can also play an important role in global gene regulation [1, 2]. Each well-known NAP in *Enterobacteriaceae* may be categorized as a “factor for inversion stimulation” (Fis), “histone-like nucleoid structuring protein” (H-NS), “histone-like protein from *Escherichia coli* strain U93” (HU), “integration host factor” (IHF), or “leucine-responsive regulatory protein” (Lrp) [1]. Fis is one of the most abundant NAPs in exponentially growing *E. coli* cells, and its role as a transcriptional regulator has been investigated [3]. H-NS binds DNA, especially A+T-rich regions including promoter regions or horizontally acquired DNA and acts as a global transcriptional repressor [4]. HU and IHF are similar in amino acid sequence level, and both are global regulators

[5, 6], although they have distinct DNA-binding activities: HU binds to DNA nonspecifically whereas IHF binds to a consensus sequence [7]. Lrp has a global influence on transcription regulation and is also involved in microbial virulence [8]. In addition to these well-known NAPs, many other NAPs are found not only in *Enterobacteriaceae* but also in other organisms. For instance, NdpA, a functionally unknown NAP, has been found in Gram-negative bacteria [9]. The MvaT family protein is the functional homolog of H-NS in *Pseudomonas* bacteria [10].

Horizontal gene transfer (HGT), which is mediated by transduction, transformation, and conjugation, plays an important role in the evolution of prokaryotic genomes [11, 12]. Genes acquired by HGT can provide beneficial functions such as resistance to antibiotics and advantages to their host under selective pressures [13]. However, the mechanisms underlying the integration of newly acquired genes into host regulatory networks are still unclear. Recent investigations have shown that some plasmids carry the genes

encoding NAP homologs, which play important roles in transcriptional regulation networks between plasmids and host chromosomes and in maintaining host cell fitness. For example, Doyle et al. [14] reported that plasmid-encoded H-NS-like protein has a “stealth” function that allows for plasmid transfer into host cells without disrupting host regulatory networks, maintaining host cell fitness. Yun and Suzuki et al. [15] reported that plasmid-encoded H-NS-like protein can also play a key role in optimizing gene transcription both on the plasmid and in the host chromosome.

In this study, we determined the distributions of NAP homologs among plasmids and discussed their roles in the maintenance of plasmid and host cell fitness.

## 2. Materials and Methods

**2.1. Plasmid Database Collection and Local BLAST Analyses.** The completely sequenced plasmid database was downloaded from the NCBI ftp site (<ftp://ftp.ncbi.nih.gov/genomes/Plasmids/>). Some duplicated sequence data of the same plasmids were removed from the database. Identification of plasmids that contain the genes encoding NAP homologs was performed using the local TBLASTN program (ver. 2.2.24, <ftp://ftp.ncbi.nlm.nih.gov/blast/executables/blast+/LATEST/>) under strict conditions (i.e., thresholds of 30% identity and 70% query coverage). The complete amino acid sequences of Fis (DDBJ/EMBL/GenBank accession no. AP\_003801), H-NS (AP\_001863), Hha (AP\_001109), HU $\alpha$  (AP\_003818), HU $\beta$  (AP\_001090), IHF $\alpha$  (AP\_002332), IHF $\beta$  (AP\_001542), Lrp (AP\_001519), and NdpA (P33920) from *E. coli* K-12 W3110 and MvaT (AAP33788) from *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 were used as query sequences.

**2.2. Bacterial Genome Analyses.** The complete genome sequences of bacteria were downloaded from the NCBI ftp site (<ftp://ftp.ncbi.nih.gov/genomes/Bacteria/>). The number of NAP genes on proteobacterial genomes was investigated using the TBLASTN program ([http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sutils/genom\\_table.cgi](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sutils/genom_table.cgi)) under strict conditions (i.e., thresholds of 30% identity and 70% query coverage).

**2.3. Plasmid Classification.** Plasmids in the database were classified into six groups according to their source organisms: Gram-negative, Gram-positive, archaeal, eukaryotic, viral, and unclassified. Putative transferability of each Gram-negative plasmid was determined by whether it carried the relaxase gene of each MOB family that Garcillán-Barcia et al. proposed [16]. Instead of using the local PSI-BLAST program (ver. 2.2.24, <ftp://ftp.ncbi.nlm.nih.gov/blast/executables/blast+/LATEST/>) as described by Garcillán-Barcia et al. [16], we used the local TBLASTN program.

## 3. Results and Discussion

**3.1. Database Collection and Plasmid Classification by Origin.** We downloaded the whole sequences of 2278 plasmids

from the NCBI ftp site (April 2010). Duplicated plasmids were removed manually, and the resultant 2260 plasmid sequences were used in this study. To understand what types of plasmids were included in the database, we classified them into six groups according to their source organisms. The database included 1382 Gram-negative, 725 Gram-positive, 81 archaeal, 43 eukaryotic, 1 viral, and 28 unclassified plasmids.

**3.2. Identification of the Plasmids Containing NAP Gene Homologs.** Using the amino acid sequences of well-known NAPs (Fis, H-NS, HU, IHF, and Lrp) and newly found NAPs (MvaT and NdpA), their distributions were surveyed for plasmids using the TBLASTN program. Some plasmids had ORFs showing sequence similarities to both HU and IHF. We adopted the one with the higher E value. Of 2260 plasmids, 155 (7%) contained the gene encoding NAP homolog. Of those, 116 (75%) contained only one NAP gene homolog and 39 (25%) contained more than one NAP gene homolog. No plasmids carried the Fis gene homolog. Twenty-two plasmids carried the H-NS gene homolog, and all of them had a Gram-negative origin (Table 1). Sixty-six plasmids had the HU gene homolog; of these, 51 had a Gram-negative origin and 15 had a Gram-positive origin (Table 2). Twenty-seven plasmids (25 with Gram-negative and 2 with Gram-positive origins) carried the IHF gene homolog (Table 3). Forty-eight plasmids (46 with Gram-negative, 1 with a Gram-positive, and 1 with an archaeal origin) carried the Lrp gene homolog (Table 4). Of these, 23 (48%) contained more than one Lrp gene homolog. On the other hand, MvaT and NdpA homologs were encoded on only 3 plasmids, and all of them were of Gram-negative origin (Table 5). Previously reported plasmids that are known to have NAP gene homologs were included in those 155 plasmids. These included R27 (NC\_002305) and pHCM1 (NC\_003384) [18, 19] with the H-NS gene homolog; pQBR103 (NC\_009444) [20] with the HU and NdpA gene homologs; and pCAR1 (NC\_004444) [21, 22] with the MvaT, HU, and NdpA gene homologs. These results indicated the adequacy of our search. Because we used NAPs from Gram-negative bacteria as query sequences, it may be reasonable that 136 (88%) of 155 plasmids with the NAP gene homolog belonged to the group isolated from Gram-negative bacteria. Therefore, in further studies we discussed the Gram-negative plasmid group.

**3.3. Relationships between Plasmid Size and NAP Gene Homolog Distributions.** We first compared the sizes of 136 plasmids with NAP gene homologs with those of all 1382 Gram-negative group plasmids. All 1382 plasmids could be divided into 4 groups according to size, small (<10 kb), intermediate (10 to 100 kb), large (100 kb to 1 Mb), and mega (>1 Mb) plasmids. The distribution of the 136 plasmids, each of which had one or more genes encoding NAP homologs, is shown in Figure 1(a): none of 415 small plasmids, 34 (5%) of 686 intermediate plasmids, 90 (33%) of 269 large plasmids, and 12 (100%) of 12 mega plasmids carried at least one NAP gene homolog. The average size of the 136 plasmids was larger (364 kb) than that of all 1382 plasmids



TABLE 1: Plasmids containing the gene encoding H-NS homolog<sup>a</sup>.

Plasmid name	Accession no.	Source organism	Length (nt)	G+C content (%) <sup>b</sup>	Identity (%) <sup>c</sup>	Query coverage (%)	Subject start	Subject end	Classification <sup>d</sup>	MOB family <sup>e</sup>
1	NC_013972	<i>Erwinia amylovora</i> ATCC 49946	28243	50	66	99	3129	2728	—	
pAsa5	NC_009350	<i>Aeromonas salmonicida</i> subsp. <i>salmonicida</i> A449	155098	54	46	99	941	534	—	MOB <sub>F</sub>
pAsal5	NC_009352	<i>Aeromonas salmonicida</i> subsp. <i>salmonicida</i>	18536	54	47	99	16890	16483	—	
pEA29	NC_013957	<i>Erwinia amylovora</i> CFBP1430	28259	50	66	99	3129	2728	—	
pEA29	NC_005706	<i>Erwinia amylovora</i>	28185	50	64	99	2991	2590	—	
pEC-IMP	NC_012555	<i>Enterobacter cloacae</i>	318782	48	64	99	109370	108969	—	MOB <sub>H</sub>
pEC-IMPQ	NC_012556	<i>Enterobacter cloacae</i>	324503	48	64	99	109370	108969	—	MOB <sub>H</sub>
pEJ30	NC_004834	<i>Erwinia</i> sp. Ejp 556	29593	50	66	99	4651	4250	—	
pEP36	NC_013263	<i>Erwinia pyrifoliae</i> Ep1/96	35909	50	66	99	25040	25441	—	
pEP36	NC_004445	<i>Erwinia pyrifoliae</i> Ep1/96	35904	50	64	98	4675	4280	—	
pET45	NC_010699	<i>Erwinia tasmaniensis</i> Et1/99	44694	51	52	93	37435	37809	—	MOB <sub>F</sub>
pET49	NC_010697	<i>Erwinia tasmaniensis</i> Et1/99	48751	44	36	94	30821	31204	—	
pHCM1	NC_003384	<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar Typhi str. CT18	218160	48	61	99	131861	131460	—	MOB <sub>H</sub>
pK2044	NC_006625	<i>Klebsiella pneumoniae</i> NTUJH-K2044	224152	50	67	99	35717	36112	—	
plasmid_153kb	NC_009705	<i>Yersinia pseudotuberculosis</i> IP 31758	153140	40	44	100	139846	140265	—	
pLVPK	NC_005249	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	219385	50	67	99	114397	114792	—	
pMAK1	NC_009981	<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar Choleraesuis	208409	47	61	99	60046	59645	—	MOB <sub>H</sub>

TABLE 1: Continued.

Plasmid name	Accession no.	Source organism	Length (nt)	G+C content (%) <sup>b</sup>	Identity (%) <sup>c</sup>	Query coverage (%)	Subject start	Subject end	Classification <sup>d</sup>	MOB family <sup>e</sup>
pO111_L1	NC_013365	<i>Escherichia coli</i> O111:H-str. 11128	204604	47	61	99	80175	79774	–	MOB <sub>H</sub>
pSG1	NC_007713	<i>Sodalis glossinidius</i> str. “morsitans”	83306	49	43	97	2533	2922	–	
R27	NC_002305	<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar Typhi	180461	46	61	99	148225	148626	–	MOB <sub>H</sub>
R478	NC_005211	<i>Serratia marcescens</i>	274762	46	64	99	111747	111346	–	MOB <sub>H</sub>
Unnamed	NC_011148	<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar Agona str. SL483	37978	41	43	95	7671	7288	–	

<sup>a</sup> This list is the result of a TBLASTN analysis using the amino acid sequence of H-NS as a query under strict conditions (i.e., thresholds of 30% identity and 70% query coverage). Besides these plasmids, pSf-R27 from *Shigella flexneri* 2a str. 24571 was completely sequenced by Wei et al. [17] and encodes the H-NS-like protein Sfh.

<sup>b</sup> Average G+C content of the plasmid.

<sup>c</sup> Reported TBLASTN identity to H-NS.

<sup>d</sup> Plasmid classification according to its source organism (–, Gram-negative plasmid).

<sup>e</sup> Plasmid classification according to its relaxase gene sequence as described by Garcillán-Barcia et al. [16].

TABLE 2: Plasmids containing the gene encoding HU homolog<sup>a</sup>.

Plasmid name	Accession no.	Source organism	Length (nt)	G+C content (%) <sup>b</sup>	Identity (%) <sup>c</sup>	Query coverage (%)	Subject start	Subject end	Classification <sup>d</sup>	MOB family <sup>e</sup>
1	NC_006823	<i>Aromatoleum aromaticum</i> EbN1	207355	58	55	99	186175	185909	–	
1	NC_007949	<i>Polaromonas</i> sp. JS666	360405	57	52	99	61052	60786	–	MOB <sub>H</sub>
1	NC_008010	<i>Deinococcus geothermalis</i> DSM 11300	574127	66	38	97	550805	550545	+	
1	NC_008503	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> SK11	14041	34	37	94	9732	10007	+	MOB <sub>P</sub>
1	NC_008242	<i>Chelativorans</i> sp. BNC1	343931	62	41	94	133932	133678	–	MOB <sub>Q</sub>
2	NC_012529	<i>Deinococcus deserti</i> VCD115	314317	64	38	93	269648	269899	+	
3	NC_012528	<i>Deinococcus deserti</i> VCD115	396459	61	40	96	8700	8957	+	
Megaplasmid	NC_007974	<i>Cupriavidus metallidurans</i> CH34	2580084	64	51	99	1393415	1393149	–	MOB <sub>V</sub>
Megaplasmid	NC_005863	<i>Desulfovibrio vulgaris</i> str. <i>Hildenborough</i>	202301	66	31	98	5502	5765	–	
Megaplasmid pDF308	NC_013940	<i>Deferribacter desulfuricans</i> SSM1	308544	24	41	100	253817	253548	–	
Megaplasmid pHG1	NC_005241	<i>Ralstonia eutropha</i> H16	452156	62	48	99	343060	342791	–	
p49879.1	NC_006907	<i>Leptospirillum ferrooxidans</i>	28878	58	47	99	3281	3015	–	MOB <sub>Q</sub>
p49879.2	NC_006909	<i>Leptospirillum ferrooxidans</i>	28012	55	48	99	15858	15592	–	MOB <sub>Q</sub>
pAH187.270	NC_011655	<i>Bacillus cereus</i> AH187	270082	34	59	100	113139	112870	+	
pAH820.272	NC_011777	<i>Bacillus cereus</i> AH820	272145	34	58	100	153060	152791	+	
pAM04528	NC_012693	<i>Salmonella enterica</i>	158213	52	57	99	14067	14333	–	MOB <sub>H</sub>
pAOVO01	NC_008765	<i>Acidovorax</i> sp. JS42	72689	62	46	100	65140	64871	–	MOB <sub>F</sub>
pAPA01-011	NC_013210	<i>Acetobacter pasteurianus</i> IFO 3283-01	191799	53	47	100	154736	154467	–	
pAR060302	NC_012692	<i>Escherichia coli</i>	166530	53	46	99	38442	38708	–	MOB <sub>H</sub>
pAsa4	NC_009349	<i>Aeromonas salmonicida</i> subsp. <i>salmonicida</i> A449	166749	53	57	99	15755	16021	–	MOB <sub>H</sub>
pAtS4c	NC_011984	<i>Agrobacterium vitis</i> S4	211620	59	45	94	141245	140991	–	MOB <sub>Q</sub>
pAtS4e	NC_011981	<i>Agrobacterium vitis</i> S4	631775	57	41	94	40476	40222	–	MOB <sub>Q</sub>
pBc239	NC_011973	<i>Bacillus cereus</i> Q1	239246	33	52	100	191895	192164	+	
pBF9343	NC_006873	<i>Bacteroides fragilis</i> NCTC 9343	36560	32	35	92	15803	15558	–	MOB <sub>P</sub>
pBPHY01	NC_010625	<i>Burkholderia phymatum</i> STM815	1904893	62	43	99	826527	826252	–	

TABLE 2: Continued.

Plasmid name	Accession no.	Source organism	Length (nt)	G+C content (%) <sup>b</sup>	Identity (%) <sup>c</sup>	Query coverage (%)	Subject start	Subject end	Classification <sup>d</sup>	MOB family <sup>e</sup>
pBPHY02	NC_010627	<i>Burkholderia phymatum</i> STM815	595108	59	45	99	98625	98359	–	
pBtoxis	NC_010076	<i>Bacillus thuringiensis</i> serovar israelensis	127923	32	52	99	77382	77648	+	
pBWB401	NC_010180	<i>Bacillus weihenstephanensis</i> KBAB4	417054	34	59	100	338347	338078	+	
pCAR1	NC_004444	<i>Pseudomonas resinovorans</i>	199035	56	42	99	97809	98075	–	MOB <sub>H</sub>
pCAUL01	NC_010335	<i>Caulobacter</i> sp. K31	233649	67	44	99	97598	97329	–	MOB <sub>Q</sub>
pCER270	NC_010924	<i>Bacillus cereus</i>	270082	34	59	100	169548	169279	+	
pDBORO	NC_009137	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> bv. <i>diacetylactis</i>	16404	35	37	94	16387	16112	+	
pDVUL01	NC_008741	<i>Desulfovibrio vulgaris</i> DP4	198504	66	31	98	198317	198054	–	
pEH4H	NC_012690	<i>Escherichia coli</i>	148105	53	57	99	14067	14333	–	MOB <sub>H</sub>
pG9842_209	NC_011775	<i>Bacillus cereus</i> G9842	209488	30	60	100	88828	88559	+	
pH308197_258	NC_011339	<i>Bacillus cereus</i> H3081.97	258484	34	59	100	83033	83302	+	
pHD5AT	NC_012752	<i>Candidatus Hamiltonella defensa</i> 5AT ( <i>Acyrtosiphon pisum</i> )	59032	45	45	99	14981	15247	–	MOB <sub>P</sub>
pIP1202	NC_009141	<i>Yersinia pestis</i> bv. <i>Orientalis</i> str. IP275	182913	53	57	99	14067	14333	–	MOB <sub>H</sub>
plasmid 2	NC_007972	<i>Cupriavidus metallidurans</i> CH34	171459	61	46	99	125530	125261	–	
pMOL28	NC_006525	<i>Cupriavidus metallidurans</i> CH34	171461	61	46	99	51529	51798	–	
pMP118	NC_007930	<i>Lactobacillus salivarius</i> UCC118	242436	32	54	99	56763	56497	+	MOB <sub>V</sub>
pNPUN02	NC_010632	<i>Nostoc punctiforme</i> PCC 73102	254918	41	44	99	74804	74538	–	MOB <sub>V</sub>
pOANT02	NC_009670	<i>Ochrobactrum anthropi</i> ATCC 49188	101491	59	49	94	32700	32446	–	
pP91278	NC_008613	<i>Photobacterium damsela</i> subsp. <i>piscicida</i>	131520	52	57	99	125918	126184	–	MOB <sub>H</sub>
pP99-018	NC_008612	<i>Photobacterium damsela</i> subsp. <i>piscicida</i>	150157	51	57	99	133314	133580	–	MOB <sub>H</sub>
pPER272	NC_010921	<i>Bacillus cereus</i>	272145	34	58	100	153060	152791	+	
pPMA4326A	NC_005918	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>maculicola</i>	46697	55	42	99	1520	1786	–	
pPMA4326B	NC_005919	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>maculicola</i>	40110	55	45	99	1457	1723	–	

TABLE 2: Continued.

Plasmid name	Accession no.	Source organism	Length (nt)	G+C content (%) <sup>b</sup>	Identity (%) <sup>c</sup>	Query coverage (%)	Subject start	Subject end	Classification <sup>d</sup>	MOB family <sup>e</sup>
pQBR103	NC_009444	<i>Pseudomonas fluorescens</i> SBW25	425094	53	51	99	182862	183128	–	
pRI32503	NC_012853	<i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. trifolii WSM1325	516088	59	47	94	300662	300916	–	MOB <sub>Q</sub>
pRA1	NC_012885	<i>Aeromonas hydrophila</i>	143963	51	58	99	15573	15839	–	MOB <sub>H</sub>
pRALTA	NC_010529	<i>Cupriavidus taiwanensis</i>	557200	60	46	98	153542	153276	–	
pREB1	NC_009926	<i>Acaryochloris marina</i> MBIC11017	374161	47	46	100	339743	340012	–	MOB <sub>F</sub>
pREB2	NC_009927	<i>Acaryochloris marina</i> MBIC11017	356087	45	48	100	57583	57852	–	MOB <sub>F</sub>
pREB3	NC_009928	<i>Acaryochloris marina</i> MBIC11017	273121	45	46	100	234682	234951	–	MOB <sub>F</sub>
pRL7	NC_008382	<i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. viciae 3841	151564	58	48	94	20484	20230	–	MOB <sub>Q</sub>
pRLG203	NC_011370	<i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. trifolii WSM2304	308747	58	49	94	141121	140867	–	
pRp12D01	NC_012855	<i>Ralstonia pickettii</i> 12D	389779	58	37	99	321346	321080	–	MOB <sub>H</sub>
pSG2	NC_007184	<i>Sodalis glossinidius</i>	27240	45	45	86	10072	9845	–	
pSG3	NC_007186	<i>Sodalis glossinidius</i>	19201	51	51	100	13812	13543	–	
pSN254	NC_009140	<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar Newport str. SL254	176473	53	57	99	14067	14333	–	MOB <sub>H</sub>
pTiS4	NC_011982	<i>Agrobacterium vitis</i> S4	258824	57	41	94	27356	27102	–	MOB <sub>Q</sub>
pTi-SAKURA	NC_002147	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	206479	56	44	94	83408	83154	–	
pVSAL840	NC_011311	<i>Alivibrio salmonicida</i> LF11238	83540	40	60	99	95763	95509	–	MOB <sub>Q</sub>
pYR1	NC_009139	<i>Yersinia ruckeri</i>	158038	51	58	99	31361	31627	–	MOB <sub>F</sub>
Ti	NC_003065	<i>Agrobacterium tumefaciens</i> str. C58	214233	57	44	94	77350	77084	–	MOB <sub>H</sub>
							15070	15336	–	
							139735	139481	–	MOB <sub>Q</sub>

<sup>a</sup> This list is the result of a TBLASTN analysis using the amino acid sequence of HU $\alpha$  or HU $\beta$  as a query under strict conditions (i.e., thresholds of 30% identity and 70% query coverage).

<sup>b</sup> Average G+C content of the plasmid.

<sup>c</sup> Reported TBLASTN identity to HU.

<sup>d</sup> Plasmid classification according to its source organism (–, Gram-negative plasmid; +, Gram-positive plasmid).

<sup>e</sup> Plasmid classification according to its relaxase gene sequence as described by Garcillan-Barcia et al. [16].

TABLE 3: Plasmids containing the gene encoding IHF homolog<sup>a</sup>.

Plasmid name	Accession no.	Source organism	Length (nt)	G+C content (%) <sup>b</sup>	Identity (%) <sup>c</sup>	Query coverage (%)	Subject start	Subject end	Classification <sup>d</sup>	MOB family <sup>e</sup>
At	NC_003064	<i>Agrobacterium tumefaciens</i> str. C58	542868	57	36	82	112654	112412	–	MOB <sub>Q</sub>
Megaplasmid	NC_012811	<i>Methylobacterium extorquens</i> AM1	1261460	68	33	94	720582	720860	–	
p2META1	NC_012809	<i>Methylobacterium extorquens</i> AM1	37858	65	44	95	28369	28635	–	MOB <sub>Q</sub>
pAAC101	NC_013206	<i>Alicyclobacillus acidocaldarius</i> subsp. <i>acidocaldarius</i> DSM 446	91726	54	43	80	62668	62432	+	
pACHL01	NC_011879	<i>Arthrobacter chlorophenolicus</i> A6	426858	64	32	92	408818	408546	+	
pALVIN02	NC_013862	<i>Allochromatium vinosum</i> DSM 180	39929	53	60	98	10902	10627	–	
pAph01	NC_013193	<i>Candidatus Accumulibacter phosphatis</i> clade IIA str. UW-1	167595	62	56	95	144197	144463	–	MOB <sub>P</sub>
pAph03	NC_013191	<i>Candidatus Accumulibacter phosphatis</i> clade IIA str. UW-1	37695	59	58	97	5412	5140	–	
pAtK84b	NC_011990	<i>Agrobacterium radiobacter</i> K84	184668	59	38	86	54109	53855	–	MOB <sub>Q</sub>
pAtK84c	NC_011987	<i>Agrobacterium radiobacter</i> K84	388169	57	43	93	340807	340532	–	
pAIS4b	NC_011991	<i>Agrobacterium vitis</i> S4	130435	56	46	93	10327	10052		
pBBta01	NC_009475	<i>Bradyrhizobium</i> sp. BTAi1	228826	61	47	97	44880	45152	–	MOB <sub>Q</sub>
pBFY46	NC_006297	<i>Bacteroides fragilis</i> YCH46	33716	34	39	86	6642	6388	–	
pBIND01	NC_010580	<i>Beijerinckia indica</i> subsp. <i>indica</i> ATCC 9039	181736	56	35	89	25098	25343	–	MOB <sub>P</sub>
pCHQ1	NC_014007	<i>Sphingobium japonicum</i> UT26S	190974	63	36	77	179816	179601	–	MOB <sub>F</sub>
pGLOV01	NC_010815	<i>Geobacter lovleyi</i> SZ	77113	53	38	90	63111	63377	–	
pM44601	NC_010373	<i>Methylobacterium</i> sp. 4-46	57951	65	35	92	41196	41468	–	
pMPOP01	NC_010727	<i>Methylobacterium populi</i> BJ001	25164	65	49	97	7806	7534	–	
pMIRAD03	NC_010514	<i>Methylobacterium radiotolerans</i> JCM 2831	42985	63	38	93	10635	10375	–	
						94	26778	26515	–	MOB <sub>F</sub>

TABLE 3: Continued.

Plasmid name	Accession no.	Source organism	Length (nt)	G+C content (%) <sup>b</sup>	Identity (%) <sup>c</sup>	Query coverage (%)	Subject start	Subject end	Classification <sup>d</sup>	MOB family <sup>e</sup>
pMRAD04	NC_010517	<i>Methylobacterium radiotolerans</i> JCM 2831	37743	64	38	94	10763	10500	—	—
pPRO1	NC_008607	<i>Pelobacter propionicus</i> DSM 2379	202397	48	41	94	129679	129957	—	—
pRSPA01	NC_009429	<i>Rhodobacter sphaeroides</i> ATCC 17025	877879	68	49	97	783519	783791	—	—
pSWIT01	NC_009507	<i>Sphingomonas wittichii</i> RW1	310228	64	40	95	106554	106820	—	MOB <sub>F</sub>
pTcM1	NC_010600	<i>Acidithiobacillus caldus</i>	65158	57	56	89	35341	35069	—	MOB <sub>P</sub> , MOB <sub>Q</sub>
pXCV183	NC_007507	<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>vesicatoria</i> str. 85-10	182572	60	33	95	138753	138490	—	—
Ti	NC_002377	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	194140	55	43	97	180164	180436	—	MOB <sub>Q</sub>
Ti plasmid pTiBo542	NC_010929	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	244978	55	36	86	209743	209489	—	MOB <sub>Q</sub>
					45	98	187204	187479		

<sup>a</sup> This list is the result of a TBLASTN analysis using the amino acid sequence of IHF $\alpha$  or IHF $\beta$  as a query under strict conditions (i.e., thresholds of 30% identity and 70% query coverage).

<sup>b</sup> Average G+C content of the plasmid.

<sup>c</sup> Reported TBLASTN identity to IHF.

<sup>d</sup> Plasmid classification according to its source organism (—, Gram-negative plasmid; +, Gram-positive plasmid).

<sup>e</sup> Plasmid classification according to its relaxase gene sequence as described by Garcillán-Barcia et al. [16].

TABLE 4: Plasmids containing the gene encoding Lrp homolog<sup>a</sup>.

Plasmid name	Accession no.	Source organism	Length (nt)	G+C content (%) <sup>b</sup>	Identity (%) <sup>c</sup>	Query coverage (%)	Subject start	Subject end	Classification <sup>d</sup>	MOB family <sup>e</sup>
1	NC_008688	<i>Paracoccus denitrificans</i> PD1222	653815	67	41	92	252075	251623	—	
A	NC_009007	<i>Rhodobacter sphaeroides</i> 2.4.1	114045	69	39	93	30241	29789	—	MOB <sub>F</sub>
B	NC_007488	<i>Rhodobacter sphaeroides</i> 2.4.1	114178	70	43	96	81861	81385	—	
bglu_1p	NC_012723	<i>Burkholderia glumae</i> BGR1	133591	61	36	90	124017	123577	—	
Megaplasmid	NC_008043	<i>Ruegeria</i> sp. TM1040	821788	59	41	84	143820	144233	—	
					41	91	687257	687706		
					36	91	734136	733690		
Megaplasmid	NC_007974	<i>Cupriavidus metallidurans</i> CH34	2580084	64	44	88	1171245	1170814	—	MOB <sub>V</sub>
					40	91	1169702	1169256		
					38	97	1586726	1586250		
Megaplasmid	NC_006569	<i>Ruegeria pomeroyi</i> DSS-3	491611	63	36	88	356303	355869	—	MOB <sub>C</sub>
Megaplasmid	NC_007336	<i>Ralstonia eutropha</i> IMP134	634917	61	35	93	377503	377045	—	
p42e	NC_007765	<i>Rhizobium etli</i> CFN 42	505334	62	34	71	255037	255384	—	
p42f	NC_007766	<i>Rhizobium etli</i> CFN 42	642517	61	45	88	436907	437341	—	
					43	91	406350	405901		
					41	85	491383	491799		
					39	95	210634	211098		
					39	96	199426	199899		
pAB510a	NC_013855	<i>Azospirillum</i> sp. B510	1455109	68	57	88	274908	275342	—	
					44	95	979549	980013		
					32	94	1180335	1179874		
pAB510b	NC_013856	<i>Azospirillum</i> sp. B510	723779	67	44	84	471830	472243	—	
					32	94	318139	318600		
pAB510c	NC_013857	<i>Azospirillum</i> sp. B510	681723	67	45	85	408064	407645	—	
					34	91	36385	36834		
pAB510d	NC_013858	<i>Azospirillum</i> sp. B510	628837	68	44	79	472768	472379	—	
					40	90	323184	322741		
					37	87	281438	281866		
					30	85	619027	618623		
pAtS4e	NC_011981	<i>Agrobacterium vitis</i> S4	631775	57	30	87	460443	460871	—	MOB <sub>Q</sub>
					34	74	425247	424888		
pBPHY01	NC_010625	<i>Burkholderia phymatum</i> STM815	1904893	62	46	85	1153608	1154027	—	
pBPHY02	NC_010627	<i>Burkholderia phymatum</i> STM815	595108	59	41	91	271795	271346	—	



TABLE 4: Continued.

Plasmid name	Accession no.	Source organism	Length (nt)	G+C content (%) <sup>b</sup>	Identity (%) <sup>c</sup>	Query coverage (%)	Subject start	Subject end	Classification <sup>d</sup>	MOB family <sup>e</sup>
pC	NC_010997	<i>Rhizobium etli</i> CIAT 652	1091523	61	46	88	617696	618130	–	MOB <sub>Q</sub>
					42	90	609059	608619		
					39	95	417738	418202		
					42	79	714804	715193		
pCAUL01	NC_010335	<i>Caulobacter</i> sp. K31	233649	67	39	93	406570	407025		MOB <sub>Q</sub>
pEST4011	NC_005793	<i>Achromobacter denitrificans</i>	76958	62	34	89	182479	182042	–	MOB <sub>P</sub>
					58	88	41224	40793	–	
					58	88	34233	33802		
pGMI1000MP	NC_003296	<i>Ralstonia solanacearum</i> GM1000	2094509	67	43	98	1737958	1738437	–	
pHV4	NC_013966	<i>Haloferax volcanii</i> DS2	635786	62	46	93	822030	821572		
pIJB1	NC_013666	<i>Burkholderia cepacia</i>	99448	63	33	71	401763	401410	Archaea	
pK2044	NC_006625	<i>Klebsiella pneumoniae</i> NTUH-K2044	224152	50	58	88	74907	75338	–	MOB <sub>P</sub>
pLVPK	NC_005249	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	219385	50	33	90	194643	195086	–	
pMLa	NC_002679	<i>Mesorhizobium loti</i> MAFF303099	351911	59	33	90	46236	46679	–	
					32	93	185603	185148	–	
					30	89	207314	206877		
pMLb	NC_002682	<i>Mesorhizobium loti</i> MAFF303099	208315	60	37	93	24632	24177	–	
pNGR234a	NC_000914	<i>Rhizobium</i> sp. NGR234	536165	58	41	70	197189	196845	–	MOB <sub>Q</sub>
					30	89	188867	188430		
					46	90	656547	656107	–	MOB <sub>Q</sub>
pNGR234b	NC_012586	<i>Rhizobium</i> sp. NGR234	2430033	62	45	85	667494	667913		
					43	90	1038020	1038463		
					44	85	682796	683215		
					38	96	2400849	2401319		
					44	79	709104	708715		
					41	89	28336	28761		
					33	89	1108900	1109337		
					36	90	703213	702764		
					32	77	1112953	1112582		
pPNAP04	NC_008760	<i>Polaromonas naphthalenivorans</i> CJ2	143747	59	35	90	142511	142068	–	
pR132501	NC_012848	<i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. <i>trifolii</i> WSM1325	828924	60	47	88	234905	234471	–	MOB <sub>Q</sub>
					44	86	386338	386760		

TABLE 4: Continued.

Plasmid name	Accession no.	Source organism	Length (nt)	G+C content (%) <sup>b</sup>	Identity (%) <sup>c</sup>	Query coverage (%)	Subject start	Subject end	Classification <sup>d</sup>	MOB family <sup>e</sup>
pRALTA	NC_010529	<i>Cupriavidus taiwanensis</i>	557200	60	39	93	645542	645087		
pRHL1	NC_008269	<i>Rhodococcus jostii</i> RH1	1123075	65	42	79	147165	146776		
					38	91	465839	465393	–	
					36	91	854207	854656	+	
					33	84	783666	783253		
pRL12	NC_008378	<i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. viciae 3841	870021	61	46	88	599116	598682	–	MOB <sub>Q</sub>
					43	88	658287	658718		
					39	93	45601	45146		
					42	79	450080	449691		
pRL8	NC_008383	<i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. viciae 3841	147463	59	33	87	70763	70344	–	MOB <sub>Q</sub>
pRLG201	NC_011368	<i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. trifolii WSM2304	1266105	60	45	89	917573	917136	–	MOB <sub>Q</sub>
					44	85	41998	42417		
					44	79	473039	472650		
					40	93	1162146	1161691		
					40	93	1150939	1150484		
					32	88	707587	707162		
pRSKD131A	NC_011962	<i>Rhodobacter sphaeroides</i> KDI31	157345	70	42	96	148295	147819	–	
pRSKD131B	NC_011960	<i>Rhodobacter sphaeroides</i> KDI31	103355	70	39	93	98400	97948	–	
pRSPA01	NC_009429	<i>Rhodobacter sphaeroides</i> ATCC 17025	877879	68	40	90	31309	30866	–	
					39	88	659383	658952		
pRSPH01	NC_009040	<i>Rhodobacter sphaeroides</i> ATCC 17029	122606	70	39	93	118088	118540	–	
pSMED01	NC_009620	<i>Sinorhizobium medicae</i> WSM419	1570951	61	40	77	143180	143557	–	MOB <sub>Q</sub>
					34	89	574284	573847		
pSMED02	NC_009621	<i>Sinorhizobium medicae</i> WSM419	1245408	60	42	91	556486	556932	–	MOB <sub>Q</sub>
					40	91	842324	842758		
					31	87	22345	21917		
pSMED03	NC_009622	<i>Sinorhizobium medicae</i> WSM419	219313	60	46	95	105044	105508	–	

TABLE 4: Continued.

Plasmid name	Accession no.	Source organism	Length (nt)	G+C content (%) <sup>b</sup>	Identity (%) <sup>c</sup>	Query coverage (%)	Subject start	Subject end	Classification <sup>d</sup>	MOB family <sup>e</sup>
pSmeSM11a	NC_013545	<i>Sinorhizobium meliloti</i>	144170	60	46	96	70449	70922	–	MOB <sub>Q</sub>
pSymA	NC_003037	<i>Sinorhizobium meliloti</i> 1021	1354226	60	43	89	1060699	1060262	–	MOB <sub>Q</sub>
pSymB	NC_003078	<i>Sinorhizobium meliloti</i> 1021	1683333	62	38	90	440778	440335	–	MOB <sub>Q</sub>
pTiS4	NC_011982	<i>Agrobacterium vitis</i> S4	258824	57	36	89	29555	29992	–	MOB <sub>Q</sub>
Unnamed	NC_011961	<i>Thermomicrobium roseum</i> DSM 5159	917738	66	42	79	96920	97309	–	MOB <sub>P</sub>

<sup>a</sup> This list is the result of a TBLASTN analysis using the amino acid sequence of Lrp as a query under strict conditions (i.e., thresholds of 30% identity and 70% query coverage).  
<sup>b</sup> Average G+C content of the plasmid.  
<sup>c</sup> Reported TBLASTN identity to Lrp.  
<sup>d</sup> Plasmid classification according to its source organism (–, Gram-negative plasmid; +, Gram-positive plasmid).  
<sup>e</sup> Plasmid classification according to its relaxase gene sequence as described by Garcillán-Barcia et al. [16].

TABLE 5: Plasmids containing the gene encoding MvaT or NdpA homolog<sup>a</sup>.

Plasmid name	Accession no.	Source organism	Length (nt)	G+C content (%) <sup>b</sup>	Identity (%) <sup>c</sup>	Query coverage (%)	Subject start	Subject end	Classification <sup>d</sup>	MOB family <sup>e</sup>
MvaT										
pCARI	NC_004444	<i>Pseudomonas resinovorans</i>	199035	56	61	98	77640	77993	–	MOB <sub>H</sub>
pQBR103	NC_009444	<i>Pseudomonas fluorescens</i> SBW25	425094	53	61	96	98076	97717	–	
pWW53	NC_008275	<i>Pseudomonas putida</i>	107929	57	61	98	8415	8768	–	
NdpA										
p0908	NC_010113	<i>Vibrio</i> sp. 0908	81413	49	51	99	79731	78736	–	
pCARI	NC_004444	<i>Pseudomonas resinovorans</i>	199035	56	36	98	95390	94395	–	MOB <sub>H</sub>
pQBR103	NC_009444	<i>Pseudomonas fluorescens</i> SBW25	425094	53	31	99	161413	160400	–	

<sup>a</sup> This list is the result of a TBLASTN analysis using the amino acid sequence of MvaT or NdpA as a query under strict conditions (i.e., thresholds of 30% identity and 70% query coverage).  
<sup>b</sup> Average G+C content of the plasmid.  
<sup>c</sup> Reported TBLASTN identity to MvaT or NdpA.  
<sup>d</sup> Plasmid classification according to its source organism (–, Gram-negative plasmid).  
<sup>e</sup> Plasmid classification according to its relaxase gene sequence as described by Garcillán-Barcia et al. [16].

TABLE 6: Gram-negative plasmids containing the gene encoding Hha-like protein<sup>a</sup>.

Plasmid name	Accession no.	Source organism	Length (nt)	G+C content (%) <sup>b</sup>	NAP gene homolog	Identity (%) <sup>c</sup>	Query coverage (%)	Subject start	Subject end	MOB family <sup>d</sup>
55989p	NC_0111752	<i>Escherichia coli</i> 55989	72482	46		53	92	10025	9828	
NR1	NC_009133	<i>Escherichia coli</i>	94289	52		53	92	87193	87390	MOB <sub>F</sub>
p1658/97	NC_004998	<i>Escherichia coli</i>	125491	51		55	92	36419	36616	MOB <sub>F</sub>
p1ESCUM	NC_0111749	<i>Escherichia coli</i> UMN026	122301	50		53	92	53508	53311	MOB <sub>F</sub>
p2ESCUM	NC_011739	<i>Escherichia coli</i> UMN026	33809	42		62	90	7682	7488	MOB <sub>Q</sub>
p53638.226	NC_010719	<i>Escherichia coli</i> 53638	225683	48		55	92	67615	67418	MOB <sub>F</sub>
pAPEC-O1-R	NC_009838	<i>Escherichia coli</i> APEC O1	241387	46		50	92	61389	61586	MOB <sub>H</sub>
pAPEC-O2-ColV	NC_007675	<i>Escherichia coli</i>	184501	49		55	92	3882	3685	MOB <sub>F</sub>
pAPEC-O2-R	NC_006671	<i>Escherichia coli</i>	101375	53		53	92	4856	4659	MOB <sub>F</sub>
pBS512.211	NC_010660	<i>Shigella boydii</i> CDC 3083-94	210919	46		55	89	190719	190910	MOB <sub>F</sub>
pBS512.33	NC_010657	<i>Shigella boydii</i> CDC 3083-94	33103	41		62	90	2894	3088	
pC15-1a	NC_005327	<i>Escherichia coli</i>	92353	53		53	92	87490	87687	MOB <sub>F</sub>
pCP301	NC_004851	<i>Shigella flexneri</i> 2a str. 301	221618	46		55	92	207828	208025	MOB <sub>F</sub>
pCROD1	NC_013717	<i>Citrobacter rodentium</i> ICC168	54449	47		56	92	53220	53417	
pCROD2	NC_013718	<i>Citrobacter rodentium</i> ICC168	39265	42		62	90	15526	15332	
pCT02021853_74	NC_011204	<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar Dublin str. CT_02021853	74551	49		62	90	48482	48288	MOB <sub>Q</sub>
pCTX-M3	NC_004464	<i>Citrobacter freundii</i>	89468	51		38	71	26136	26294	MOB <sub>P</sub>
pCTXM360	NC_011641	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	89468	51		31	96	40648	40439	
			68018			38	71	64551	64709	MOB <sub>P</sub>
			68018			31	96	10927	10718	
pCVM29188_146	NC_011076	<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar Kentucky str. CVM29188	146811	49		53	92	18755	18558	MOB <sub>F</sub>
pEC14-114	NC_013175	<i>Escherichia coli</i>	114222	51		53	92	113985	114182	MOB <sub>F</sub>
pEC-IMP	NC_012555	<i>Enterobacter cloacae</i>	318782	48	H-NS	50	92	60491	60688	MOB <sub>H</sub>
pEC-IMPQ	NC_012556	<i>Enterobacter cloacae</i>	324503	48	H-NS	50	92	60491	60688	MOB <sub>H</sub>
pEG356	NC_013727	<i>Shigella sonnei</i>	70275	52		53	92	69444	69641	MOB <sub>F</sub>
pEK499	NC_013122	<i>Escherichia coli</i>	117536	53		53	92	41985	42182	
pEK516	NC_013121	<i>Escherichia coli</i>	64471	53		53	92	31410	31213	

TABLE 6: Continued.

Plasmid name	Accession no.	Source organism	Length (nt)	G+C content (%) <sup>b</sup>	NAP gene homolog	Identity (%) <sup>c</sup>	Query coverage (%)	Subject start	Subject end	MOB family <sup>d</sup>
pEL60	NC_005246	<i>Erwinia amylovora</i>	60145	51		38	71	23187	23345	MOB <sub>P</sub>
			60145			31	96	37863	37654	
pEntH10407	NC_013507	<i>Escherichia coli</i> ETEC H10407	67094	51		55	78	43421	43254	MOB <sub>F</sub>
pHCM1	NC_003384	<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar Typhi str. CT18	218160	48	H-NS	47	100	105911	106117	MOB <sub>H</sub>
pK2044	NC_006625	<i>Klebsiella pneumoniae</i> NTUH-K2044	224152	50	H-NS, Lrp	45	85	143331	143528	
pK29	NC_010870	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	269674	46		50	92	59322	59519	MOB <sub>H</sub>
pKF3-70	NC_013542	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	70057	52		53	92	15967	15770	MOB <sub>F</sub>
pKF3-94	NC_013950	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	94219	52		58	96	9596	9390	MOB <sub>F</sub>
pKP187	NC_011282	<i>Klebsiella pneumoniae</i> 342	187922	47		64	96	110083	109877	
			187922			42	89	1550	1344	
pKPN3	NC_009649	<i>Klebsiella pneumoniae</i> subsp. <i>pneumoniae</i> MGH 78578	175879	52		59	97	56930	56721	MOB <sub>F</sub>
plasmid_153 kb	NC_009705	<i>Yersinia pseudotuberculosis</i> IP 31758	153140	40	H-NS	69	93	63342	63542	
			153140			56	92	49734	49931	
pLVPK	NC_005249	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	219385	50	H-NS, Lrp	61	97	148056	147847	
			219385			45	85	214828	215025	
pMAK1	NC_009981	<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar Choleraesuis	208409	47	H-NS	47	100	49208	49414	MOB <sub>H</sub>
pMAS2027	NC_013503	<i>Escherichia coli</i> O103:H2	42644	43		62	90	19685	19491	MOB <sub>Q</sub>
pO103	NC_013354	<i>Escherichia coli</i> O1209 str. 12009	75546	49		55	92	51727	51924	MOB <sub>F</sub>
pO111_1	NC_013365	<i>Escherichia coli</i> O111:H- str. 11128	204604	47	H-NS	47	100	66925	67131	MOB <sub>H</sub>
pO111_3	NC_013366	<i>Escherichia coli</i> O111:H- str. 11128	77690	50		55	92	11975	12172	MOB <sub>F</sub>
pO157	NC_013010	<i>Escherichia coli</i> O157:H7 str. TW14359	94601	48		55	92	70792	70989	
pO157	NC_011350	<i>Escherichia coli</i> O157:H7 str. EC4115	94644	48		55	92	54735	54932	
pO157	NC_007414	<i>Escherichia coli</i> O157:H7 EDL933	92077	48		55	92	1667	1864	
pO157	NC_002128	<i>Escherichia coli</i> O157:H7 str. Sakai	92721	48		55	92	71183	71380	

TABLE 6: Continued.

Plasmid name	Accession no.	Source organism	Length (nt)	G+C content (%) <sup>b</sup>	NAP gene homolog	Identity (%) <sup>c</sup>	Query coverage (%)	Subject start	Subject end	MOB family <sup>d</sup>
pO26l	NC_011812	<i>Escherichia coli</i>	72946	51		53	92	66608	66805	MOB <sub>F</sub>
pO86A1	NC_008460	<i>Escherichia coli</i>	120730	49		55	92	101598	101795	MOB <sub>F</sub>
pOLA52	NC_010378	<i>Escherichia coli</i>	51602	46		62	90	12114	11920	MOB <sub>Q</sub>
pOU1114	NC_010421	<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar Dublin	34595	41		62	90	5446	5252	MOB <sub>Q</sub>
pOU1115	NC_010422	<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar Dublin	74589	49		62	90	37246	37052	MOB <sub>Q</sub>
pSB4_227	NC_007608	<i>Shigella boydii</i> Sb227	126697	47		55	92	110688	110885	MOB <sub>F</sub>
pSE11-1	NC_011419	<i>Escherichia coli</i> SE11	100021	50		56	92	58407	58210	MOB <sub>P</sub>
pSE34	NC_010860	<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar Enteritidis	32950	41		62	90	21875	22069	MOB <sub>Q</sub>
pSFO157	NC_009602	<i>Escherichia coli</i>	121239	50		52	75	1709	1870	MOB <sub>F</sub>
pSG1	NC_007713	<i>Sodalis glossinidius</i> str. "morsitans"	83306	49	H-NS	48	92	2294	2491	
pSG1	NC_007182	<i>Sodalis glossinidius</i>	81553	49		48	92	56217	56414	
pSMS35_130	NC_010488	<i>Escherichia coli</i> SMS-3-5	130440	51		55	92	3364	3167	MOB <sub>F</sub>
pSS_046	NC_007385	<i>Shigella sonnei</i> Ss046	214396	45		55	92	178363	178560	MOB <sub>F</sub>
pUTI89	NC_007941	<i>Escherichia coli</i> UTI89	114230	51		53	92	113993	114190	MOB <sub>F</sub>
pWR501	NC_002698	<i>Shigella flexneri</i>	221851	46		55	92	207534	207731	MOB <sub>F</sub>
R100	NC_002134	<i>Shigella flexneri</i> 2b str. 222	94281	52		53	92	87185	87382	MOB <sub>F</sub>
R27	NC_002305	<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar Typhi	180461	46	H-NS	47	100	159402	159196	MOB <sub>H</sub>
R478	NC_005211	<i>Serratia marcescens</i>	274762	46	H-NS	50	92	59426	59623	MOB <sub>H</sub>
R721	NC_002525	<i>Escherichia coli</i>	75582	43		66	90	35285	35091	
Unnamed	NC_011148	<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar Agona str. SL483	37978	41	H-NS	42	93	1363	1163	

<sup>a</sup> This list is the result of a TBLASTN analysis using the amino acid sequence of Hha as a query under strict conditions (i.e., thresholds of 30% identity and 70% query coverage).

<sup>b</sup> Average G+C content of the plasmid.

<sup>c</sup> Reported TBLASTN identity to Hha.

<sup>d</sup> Plasmid classification according to its relaxase gene sequence as described by Garcillán-Barcia et al. [16].

TABLE 7: MOB<sub>H</sub>-family plasmids of Gram-negative origin<sup>a</sup>.

Plasmid name	Accession no.	Source organism	Length (nt)	G+C content (%) <sup>b</sup>	NAP gene homolog	Identity (%) <sup>c</sup>	Query coverage (%)	Subject start	Subject end
1	NC_007949	<i>Polaromonas</i> sp. JS666	360405	57	HU	52	99	61052	60786
1	NC_008573	<i>Shewanella</i> sp. ANA-3	278942	46					
2	NC_007950	<i>Polaromonas</i> sp. JS666	338007	60					
ICEhin1056	NC_011409	<i>Haemophilus influenzae</i>	59393	39					
pAM04528	NC_012693	<i>Salmonella enterica</i>	158213	52	HU	57	99	14067	14333
pAPEC-O1-R	NC_009838	<i>Escherichia coli</i> APEC O1	241387	46	HU	57	99	15755	16021
pAR060302	NC_012692	<i>Escherichia coli</i>	166530	53	HU	60	99	26844	26578
pAsa4	NC_009349	<i>Aeromonas salmonicida</i>	166749	53	HU				
pCAR1	NC_004444	subsp. <i>salmonicida</i> A449 <i>Pseudomonas resinovorans</i>	199035	56	MvaT NdpA	61 36	98 98	77640 95390	77993 94395
pEC-IMP	NC_012555	<i>Enterobacter cloacae</i>	318782	48	HU	42	99	97809	98075
pEC-IMPQ	NC_012556	<i>Enterobacter cloacae</i>	324503	48	H-NS	64	99	109370	108969
peH4H	NC_012690	<i>Escherichia coli</i>	148105	53	H-NS	64	99	109370	108969
pHCM1	NC_003384	<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar Typhi str. CT18	218160	48	HU	57	99	14067	14333
pIP1202	NC_009141	<i>Yersinia pestis</i> bv. Orientalis str. IP275	182913	53	H-NS	61	99	131861	131460
pK29	NC_010870	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	269674	46					
plasmid1	NC_007901	<i>Rhodoferrax ferritducens</i> T118	257447	54					
pMAK1	NC_009981	<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar Choleraesuis	208409	47	H-NS	61	99	60046	59645
pMAQU02	NC_008739	<i>Marinobacter aquaeolei</i> VT8	213290	53					
pOI11.1	NC_013365	<i>Escherichia coli</i> O111:H- str. 11128	204604	47	H-NS	61	99	80175	79774
pP91278	NC_008613	<i>Photobacterium damsela</i> subsp. <i>Piscicida</i>	131520	52	HU	57	99	125918	126184



TABLE 7: Continued.

Plasmid name	Accession no.	Source organism	Length (nt)	G+C content (%) <sup>b</sup>	NAP gene homolog	Identity (%) <sup>c</sup>	Query coverage (%)	Subject start	Subject end
pP99-018	NC_008612	<i>Photobacterium damsela</i> subsp. <i>piscicida</i>	150157	51	HU	57	99	133314	133580
pRA1	NC_012885	<i>Aeromonas hydrophila</i>	143963	51	HU	58	99	15573	15839
pRp12D01	NC_012855	<i>Ralstonia pickettii</i> 12D	389779	58	HU	37	99	321346	321080
pSN254	NC_009140	<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar Newport str. SL254	176473	53	HU	57	99	14067	14333
pTK9001	NC_013930	<i>Thioalkalivibrio</i> sp. K90mix	240256	62					
pYR1	NC_009139	<i>Yersinia ruckeri</i>	158038	51	HU	57	99	15070	15336
R27	NC_002305	<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar Typhi	180461	46	H-NS	61	99	148225	148626
R478	NC_005211	<i>Serratia marcescens</i>	274762	46	H-NS	64	99	111747	111346
Rts1	NC_003905	<i>Proteus vulgaris</i>	217182	46					

<sup>a</sup> This list is the result of a TBLASTN analysis using the 300 N-terminal amino acid sequence of protein TraL\_R27 as a query under strict conditions (i.e., thresholds of 30% identity and 70% query coverage).

<sup>b</sup> Average G+C content of the plasmid.

<sup>c</sup> Reported TBLASTN identity to each NAP.

TABLE 8: MOB<sub>Q</sub>-family plasmids of Gram-negative origin<sup>a</sup>.

Plasmid name	Accession no.	Source organism	Length (nt)	G+C content (%) <sup>b</sup>	NAP gene homolog	Identity (%) <sup>c</sup>	Query coverage (%)	Subject start	Subject end
1	NC_008242	<i>Chelativorans</i> sp. BNC1	343931	62	HU	41	94	133932	133678
3	NC_007617	<i>Nitrosospora multiformis</i> ATCC 25196	14159	50					
3	NC_007961	<i>Nitrobacter hamburgensis</i> X14	121408	62					
At	NC_003064	<i>Agrobacterium tumefaciens</i> str. C58	542868	57	IHF	36	82	112654	112412
C	NC_010542	<i>Cyanotheca</i> sp. ATCC 51142	14685	38					
ColE9-J	NC_011977	<i>Escherichia coli</i>	7577	50					
DN1	NC_002636	<i>Dichelobacter nodosus</i>	5112	62					
F plasmid	NC_008036	<i>Sphingopyxis alaskensis</i> RB2256	28543	60					
p11745	NC_013546	<i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i>	5486	38					
p12494	NC_010889	<i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i>	14393	33					
p1ABAYE	NC_010401	<i>Acinetobacter baumannii</i> AYE	5644	35					
p1META1	NC_012807	<i>Methylobacterium extorquens</i> AM1	44195	68					
p1METDI	NC_012987	<i>Methylobacterium extorquens</i> DM4	141504	65					
p2007057	NC_011897	<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar Bovismorbificans	4270	47					
p2ABSDF	NC_010396	<i>Acinetobacter baumannii</i> SDF	25014	35					
p2ESCUM	NC_011739	<i>Escherichia coli</i> UMN026	33809	42					
p2META1	NC_012809	<i>Methylobacterium extorquens</i> AM1	37858	65	IHF	44	95	28369	28635
p3ABSDF	NC_010398	<i>Acinetobacter baumannii</i> SDF	24922	34					
p42a	NC_007762	<i>Rhizobium etli</i> CFN 42	194229	58					
p49879.1	NC_006907	<i>Leptospirillum ferrooxidans</i>	28878	58	HU	47	99	3281	3015

TABLE 8: Continued.

Plasmid name	Accession no.	Source organism	Length (nt)	G+C content (%) <sup>b</sup>	NAP gene homolog	Identity (%) <sup>c</sup>	Query coverage (%)	Subject start	Subject end
p49879.2	NC_006909	<i>Leptospirillum ferrooxidans</i>	28012	55	HU	48	99	15858	15592
pAb5S9	NC_009476	<i>Aeromonas bestiarum</i>	24716	54					
pACRY07	NC_009473	<i>Acidiphilium cryptum</i> IF-5	5629	58					
pAgK84	NC_011994	<i>Agrobacterium radiobacter</i> K84	44420	54					
pAM5	NC_008691	<i>Acidiphilium multivorum</i>	5161	58					
pAMI2	NC_010847	<i>Paracoccus aminophilus</i>	18563	62					
pAMI3	NC_013513	<i>Paracoccus aminophilus</i>	5575	61					
pAPA01-030	NC_013212	<i>Acetobacter pasteurianus</i> IFO 3283-01	49961	54					
pAPA01-040	NC_013213	<i>Acetobacter pasteurianus</i> IFO 3283-01	3204	54					
pAUK84b	NC_011990	<i>Agrobacterium radiobacter</i> K84	184668	59	IHF	38	86	54109	53855
pAtS4b	NC_011991	<i>Agrobacterium vitis</i> S4	130435	56	IHF	47	97	44880	45152
pAtS4c	NC_011984	<i>Agrobacterium vitis</i> S4	211620	59	HU	45	94	141245	140991
pAtS4e	NC_011981	<i>Agrobacterium vitis</i> S4	631775	57	HU	41	94	40476	40222
					Lrp	30	87	460443	460871
					Lrp	34	74	425247	424888
pAV2	NC_010310	<i>Acinetobacter venetianus</i>	15135	36					
pB	NC_010996	<i>Rhizobium etli</i> CIAT 652	429111	58					
pBGR3	NC_012847	<i>Bartonella grahamii</i> as4aup	28192	36					
pBS512.5	NC_010659	<i>Shigella boydii</i> CDC 3083-94	5114	46					
pC	NC_010997	<i>Rhizobium etli</i> CIAT 652	1091523	61	Lrp	46	88	617696	618130
					Lrp	42	90	609059	608619
					Lrp	39	95	417738	418202
					Lrp	42	79	714804	715193
					Lrp	39	93	406570	407025
pCAUL01	NC_010335	<i>Caulobacter</i> sp. K31	233649	67	HU	44	99	97598	97329
					Lrp	34	89	182479	182042

TABLE 8: Continued.

Plasmid name	Accession no.	Source organism	Length (nt)	G+C content (%) <sup>b</sup>	NAP gene homolog	Identity (%) <sup>c</sup>	Query coverage (%)	Subject start	Subject end
pCAUL02	NC_010333	<i>Caulobacter</i> sp. K31	177878	64					
pCCK1900	NC_011378	<i>Pasteurella multocida</i>	10226	61					
pCCK381	NC_006994	<i>Pasteurella multocida</i>	10874	61					
pCFPG4	NC_011563	<i>Candidatus Azobacteroides pseudotrichonympha</i> genomovar. CFP2	4149	44					
pCHE-A	NC_012006	<i>Enterobacter cloacae</i>	7560	60					
pColE8	NC_012882	<i>Escherichia coli</i>	6751	51					
pCROD3	NC_013719	<i>Citrobacter rodentium</i> ICC168	3910	51					
pCT02021853_74	NC_011204	<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar Dublin str. CT_02021853	74551	49					
pCVM19633_4	NC_011093	<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar Schwarzengrund str. CVM19633	4585	48					
pDSHI01	NC_009955	<i>Dinoroseobacter shibae</i> DFL 12	190506	60					
pET09	NC_010695	<i>Erwinia tasmaniensis</i> Et1/99	9299	47					
pGDIA01	NC_011367	<i>Gluconacetobacter diazotrophicus</i> PAL 5	27455	59					
pGOX3	NC_006674	<i>Gluconobacter oxydans</i> 621H	14547	56					
pHCG3	NC_005873	<i>Oligotropha carboxidovorans</i> OM5	133058	61					
pHRM2a	NC_012109	<i>Desulfohalobacterium autotrophicum</i> HRM2	68709	42					
pIGJC156	NC_009781	<i>Escherichia coli</i>	5146	47					
pIGMS5	NC_010883	<i>Escherichia coli</i>	6750	51					
pIGWZ12	NC_010885	<i>Escherichia coli</i>	4072	50					
pISP3	NC_013970	<i>Sphingomonas</i> sp. MM-1	43398	63					
pJD4	NC_002098	<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	7426	38					
plasmid1	NC_007801	<i>Janaschia</i> sp. CCS1	86072	58					

TABLE 8: Continued.

Plasmid name	Accession no.	Source organism	Length (nt)	G+C content (%) <sup>b</sup>	NAP gene homolog	Identity (%) <sup>c</sup>	Query coverage (%)	Subject start	Subject end
pLD-TEX-KL	NC_009966	<i>Fluoribacter dumoffii</i>	66512	39					
pMAC	NC_006877	<i>Acinetobacter baumannii</i>	9540	35					
pMAS2027	NC_013503	<i>Escherichia coli</i>	42644	43					
pMbo4.6	NC_013500	<i>Moraxella bovis</i>	4658	39					
pMCHL01	NC_011758	<i>Methylobacterium chloromethanicum</i> CM4	380207	66					
pMG160	NC_004527	<i>Rhodobacter blasticus</i>	3431	67					
pMG828-2	NC_008487	<i>Escherichia coli</i>	4091	50					
pMG828-4	NC_008489	<i>Escherichia coli</i>	7462	48					
pMIMCU1	NC_013056	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	8771	35					
pMIMCU2	NC_013506	<i>Acinetobacter baumannii</i>	10270	36					
pMRAD01	NC_010510	<i>Methylobacterium radiotolerans</i> JCM 2831	586164	70					
pMS260	NC_005312	<i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i>	8124	61					
pNGR234a	NC_000914	<i>Rhizobium</i> sp. NGR234	536165	59	Lrp	41	70	197189	196845
					Lrp	30	89	188867	188430
					Lrp	46	90	656547	656107
					Lrp	45	85	667494	667913
					Lrp	43	90	1038020	1038463
					Lrp	44	85	682796	683215
					Lrp	38	96	2400849	2401319
					Lrp	44	79	709104	708715
					Lrp	41	89	28336	28761
					Lrp	33	89	1108900	1109337
					Lrp	36	90	703213	702764
					Lrp	32	77	1112953	1112582
pNL2	NC_009427	<i>Novosphingobium aromaticivorans</i> DSM 12444	487268	66					
pOI11.4	NC_013367	<i>Escherichia coli</i> O111:H-str. 11128	8140	50					
pO26-S4	NC_011228	<i>Escherichia coli</i>	6758	51					
pOLA52	NC_010378	<i>Escherichia coli</i>	51602	46					
pOU1114	NC_010421	<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar Dublin	34595	42					

TABLE 8: Continued.

Plasmid name	Accession no.	Source organism	Length (nt)	G+C content (%) <sup>b</sup>	NAP gene homolog	Identity (%) <sup>c</sup>	Query coverage (%)	Subject start	Subject end
pOU1115	NC_010422	<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar Dublin	74589	49					
pP	NC_003455	<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar <i>Enteritidis</i>	4301	50					
pP742405	NC_011733	<i>Cyanotheca</i> sp. PCC 7424	18083	38					
pP742406	NC_011734	<i>Cyanotheca</i> sp. PCC 7424	15219	40					
pPMA4326C	NC_005921	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>maculicola</i>	8244	53					
pPNAF07	NC_008763	<i>Polaromonas naphthalenivorans</i> CJ2	9898	57					
pPRO2	NC_008608	<i>Pelobacter propionicus</i> DSM 2379	30722	56					
pPT1	NC_002143	<i>Comamonas testosteroni</i>	15398	56					
pRI32501	NC_012848	<i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. trifolii WSM1325	828924	60	Lrp	47	88	234905	234471
					Lrp	44	86	386338	386760
					Lrp	39	93	645542	645087
					Lrp	42	79	147165	146776
pRI32502	NC_012858	<i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. trifolii WSM1325	660973	61					
pRI32503	NC_012853	<i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. trifolii WSM1325	516088	59	HU	47	94	300662	300916
pRI32504	NC_012852	<i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. trifolii WSM1325	350312	61					
pRI32505	NC_012854	<i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. trifolii WSM1325	294782	60					
pRF	NC_007110	<i>Rickettsia felis</i> URRWXCal2	62829	34					
pRFdelta	NC_007111	<i>Rickettsia felis</i> URRWXCal2	39263	33					
pRI1724	NC_002575	<i>Agrobacterium rhizogenes</i>	217594	57					
pRI2659	NC_010841	<i>Agrobacterium rhizogenes</i>	185462	58					
pRL10	NC_008381	<i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. viciae 3841	488135	60					
pRL11	NC_008384	<i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. viciae 3841	684202	61					
pRL12	NC_008378	<i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. viciae 3841	870021	61	Lrp	46	88	599116	598682

TABLE 8: Continued.

Plasmid name	Accession no.	Source organism	Length (nt)	G+C content (%) <sup>b</sup>	NAP gene homolog	Identity (%) <sup>c</sup>	Query coverage (%)	Subject start	Subject end
pRL7	NC_008382	<i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. viciae 3841	151564	58	Lrp	43	88	658287	658718
pRL8	NC_008383	<i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. viciae 3841	147463	59	Lrp	39	93	45601	45146
pRLG201	NC_011368	<i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. trifolii WSM2304	1266105	60	Lrp	42	79	450080	449691
					HU	48	94	20484	20230
					Lrp	33	87	70763	70344
					Lrp	45	89	917573	917136
					Lrp	44	85	41998	42417
					Lrp	44	79	473039	472650
					Lrp	40	93	1162146	1161691
					Lrp	40	93	1150939	1150484
					Lrp	32	88	707587	707162
pRM	NC_010927	<i>Rickettsia monacensis</i>	23486	32					
pSCI01	NC_002056	<i>Salmonella enterica</i> subsp. enterica serovar Typhimurium	9263	51					
pSE11-6	NC_011411	<i>Escherichia coli</i> SE11	4082	49					
pSE34	NC_010860	<i>Salmonella enterica</i> subsp. enterica serovar Enteritidis	32950	41					
pSMED01	NC_009620	<i>Sinorhizobium medicae</i> WSM419	1570951	62	Lrp	40	77	143180	143557
pSMED02	NC_009621	<i>Sinorhizobium medicae</i> WSM419	1245408	60	Lrp	34	89	574284	573847
pSmeSM11a	NC_013545	<i>Sinorhizobium meliloti</i>	144170	60	Lrp	42	91	556486	556932
pSmeSM11b	NC_010865	<i>Sinorhizobium meliloti</i> SM11	181251	59	Lrp	40	91	842324	842758
pSMS35-4	NC_010486	<i>Escherichia coli</i> SMS-3-5	4074	50	Lrp	31	87	22345	21917
pSx-Qyy	NC_006826	<i>Sphingobium xenophagum</i>	5683	56	Lrp	46	96	70449	70922
pSymA	NC_003037	<i>Sinorhizobium meliloti</i> 1021	1354226	60					
pSymB	NC_003078	<i>Sinorhizobium meliloti</i> 1021	1683333	62	Lrp	38	90	440778	440335

TABLE 8: Continued.

Plasmid name	Accession no.	Source organism	Length (nt)	G+C content (%) <sup>b</sup>	NAP gene homolog	Identity (%) <sup>c</sup>	Query coverage (%)	Subject start	Subject end
pTB3	NC_008388	<i>Roseobacter denitrificans</i> OCh 114	16575	55	Lrp	36	89	29555	29992
pTcM1	NC_010600	<i>Acidithiobacillus caldus</i>	65158	57	IHF	56	89	25186	25449
pTis4	NC_011982	<i>Agrobacterium vitis</i> S4	258824	57	HU	41	94	27356	27102
					HU	40	94	83408	83154
					Lrp	42	79	96920	97309
pTi-SAKURA	NC_002147	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	206479	56	HU	44	94	95763	95509
pUT1	NC_014005	<i>Sphingobium japonicum</i> UT26S	31776	64					
pUT2	NC_014009	<i>Sphingobium japonicum</i> UT26S	5398	61					
pXAUT01	NC_009717	<i>Xanthobacter autotrophicus</i> Py2	316164	65					
pXCV19	NC_007505	<i>Xanthomonas campestris</i> pv. vesicatoria str. 85-10	19146	60					
pXF51	NC_002490	<i>Xylella fastidiosa</i> 9a5c	51158	50					
pYAN-1	NC_008246	<i>Sphingobium yanoikuyae</i>	5182	62					
pYAN-2	NC_008247	<i>Sphingobium yanoikuyae</i>	4924	64					
RSF1010	NC_001740	<i>Escherichia coli</i>	8684	61					
Symbiotic plasmid p42d	NC_004041	<i>Rhizobium etli</i> CFN 42	371254	58					
Ti	NC_002377	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	194140	55	IHF	43	97	180164	180436
Ti	NC_003065	<i>Agrobacterium tumefaciens</i> str. C58	214233	57	HU	44	94	139735	139481
Ti plasmid pTiBo542	NC_010929	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	244978	55	IHF	36	86	209743	209489
Unnamed	NC_011143	<i>Phenylobacterium zucineum</i> HLK1	382976	69	IHF	45	98	187204	187479

<sup>a</sup> This list is the result of a TBLASTN analysis using the 300 N-terminal amino acid sequence of protein MobA\_RS1010 as a query under strict conditions (i.e., thresholds of 30% identity and 70% query coverage).

<sup>b</sup> Average G+C content of the plasmid.

<sup>c</sup> Reported TBLASTN identity to each NAP.



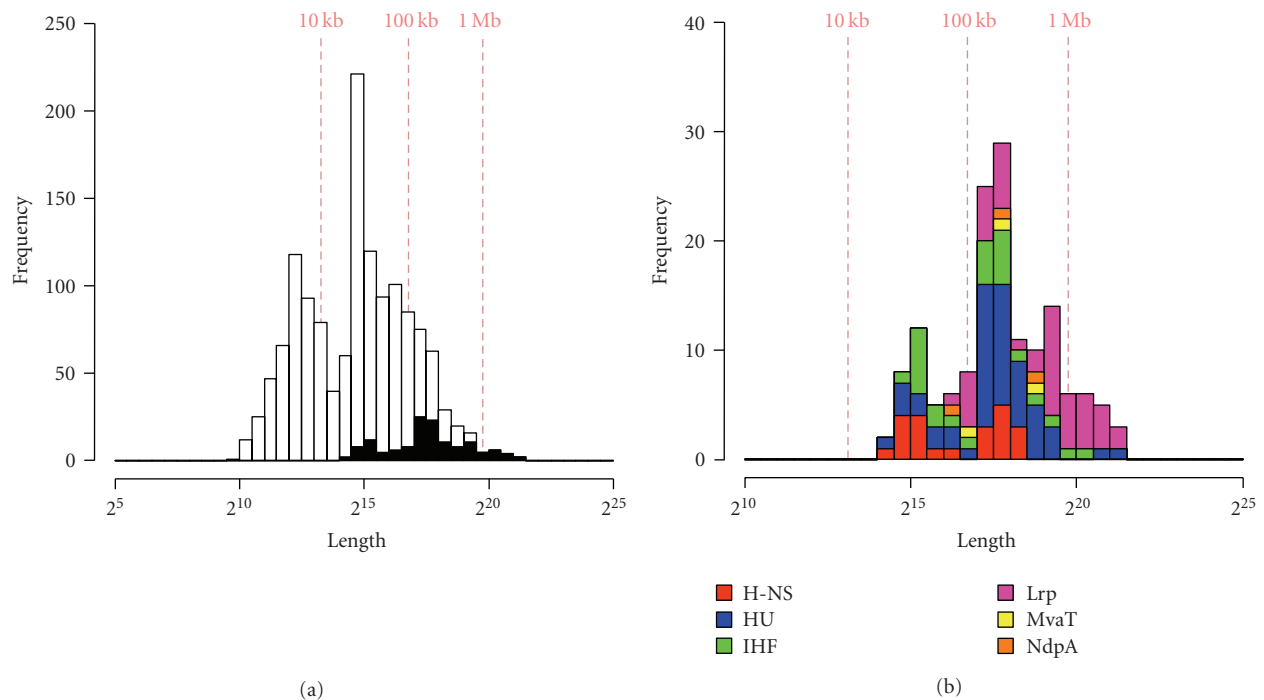


FIGURE 1: Size comparison of the Gram-negative plasmids with and without NAP gene homologs. (a) A total of 136 Gram-negative plasmids with one or more NAP gene homologs and 1246 Gram-negative plasmids without NAP gene homologs are shown by black and white bars, respectively. (b) Gram-negative plasmids with each NAP gene homolog are as follows: H-NS, red; HU, blue; IHF, green; Lrp, purple; MvaT, yellow; and NdpA, orange.

(83 kb). These results suggest that larger plasmids, especially >100 kb, frequently have NAP gene homologs. Carrying large plasmids may reduce host fitness more than carrying small plasmids because the former have more genes that can disrupt transcriptional networks in the host cell. In addition, large plasmids may have more binding sites for NAPs than small plasmids. Because chromosome-encoded NAPs bind to both chromosomes and plasmids, carrying large plasmids may also result in a reduction in the binding of NAPs to the host chromosome, causing undesirable effects on the host cell. Plasmid-encoded NAP homologs may interact with chromosome-encoded NAPs, coordinately sustain the structure of both chromosome and plasmid, and regulate the transcriptional regulation network [23]. In fact, recent studies have shown that some plasmid-encoded NAP homologs can complement the depletion of chromosomal NAPs and optimize gene transcription both on plasmids and in the host chromosome [14, 15, 24]. Thus, larger plasmids may have NAP gene homologs to maintain host cell fitness. In addition, the average size of the 38 plasmids containing more than one NAP gene homolog was larger (790 kb) than that of the 98 plasmids containing only one NAP gene homolog (199 kb). This suggests that particularly large plasmids have many NAP gene homologs to maintain themselves in the host cell.

Distributions of the NAP genes on proteobacterial genomes were also surveyed using the TBLASTN program. The average size of the completely sequenced bacterial genomes was 3.25 Mb and 1054 NAP genes (100, Fis; 125, H-NS; 236, HU; 247, IHF; 127, Lrp; 119, MvaT; and 100, NdpA)

were found in 588 proteobacterial genomes. Frequency of NAP genes in plasmids was higher (1 per 236 kb) than that in proteobacterial genomes (1 per 1.8 Mb), also suggesting that larger plasmids frequently have NAP gene homologs to minimize their negative effects on the host cell.

Of the plasmids with the NAP gene homolog, the average size of those with the H-NS gene homolog was relatively small (132 kb) while that of those with the Lrp gene homolog was relatively large (725 kb). The average sizes of those with the other NAP gene homologs were as follows: HU (301 kb), IHF (230 kb), MvaT (244 kb), and NdpA (235 kb) (Figure 1(b)). H-NS exists in an oligomeric form and binds to DNA, especially A+T-rich regions, by bridging it [25]. This function may be important for regulating gene expression on relatively small plasmids among those with the NAP gene homolog. The activity of H-NS can also be modulated by Hha-like proteins [26]. Intriguingly, TBLASTN analysis showed that 12 (55%) of 22 plasmids with the H-NS gene homolog also carried gene encoding Hha-like protein although only 65 (5%) of all 1382 plasmids carried Hha-like protein gene (Table 6). This suggests the close relationship of H-NS and Hha-like protein. On the other hand, Lrp exists in dimeric, octameric, and hexadecameric forms and compacts DNA by wrapping it [27]. This distinctive DNA-binding ability may be essential for maintaining the structure of particularly larger plasmids.

**3.4. Relationships between Plasmid G+C Content and NAP Gene Homolog Distributions.** Next, we surveyed the G+C content of the Gram-negative group plasmids with and

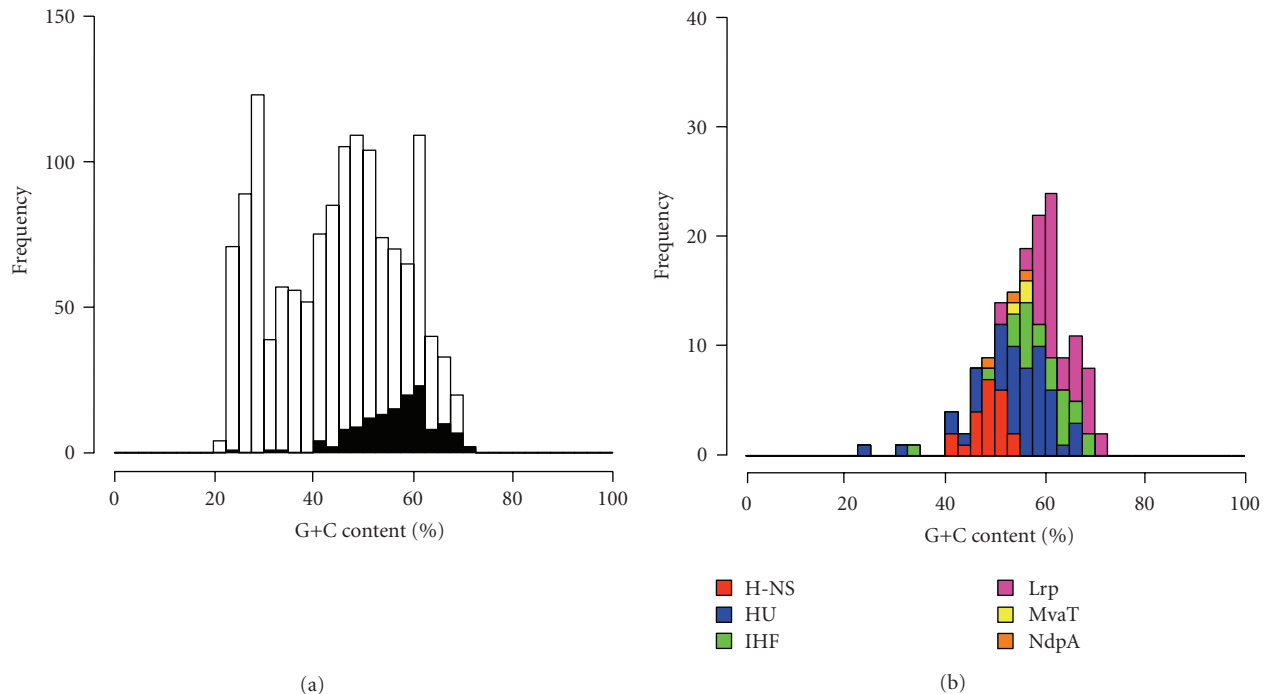


FIGURE 2: G+C content comparison of the Gram-negative plasmids with and without NAP gene homologs. (a) A total of 136 Gram-negative plasmids with one or more NAP gene homologs and 1246 Gram-negative plasmids without NAP gene homologs are shown by black and white bars, respectively. (b) Gram-negative plasmids with each NAP gene homolog are as follows: H-NS, red; HU, blue; IHF, green; Lrp, purple; MvaT, yellow; and NdpA, orange.

without NAP gene homologs. The average G+C content of the 136 plasmids with NAP gene homologs was higher (56.4%) than that of all 1382 plasmids (44.8%) (Figure 2(a)). Note that the average G+C content of large and mega plasmids (55.0% and 62.9%, resp.) was higher than that of small and intermediate plasmids (44.8% and 40.4%). Considering that larger plasmids frequently had NAP gene homologs, this seems reasonable. Nevertheless, plasmids with H-NS gene homologs had a lower G+C content (48.3%) than did those with other NAP gene homologs, including HU (54.2%), IHF (58.7%), Lrp (62.3%), MvaT (55.6%), and NdpA (52.9%) (Figure 2(b)). H-NS family protein binds A+T-rich regions not only on chromosomes but also on plasmids [15]. Acquisition of a large A+T-rich plasmid with many H-NS binding sites may result in a reduction in the binding of H-NS to the host chromosome and host cell fitness [14]. It is therefore possible that large A+T-rich plasmids may have to supply another H-NS encoded on themselves to minimize the effect on the host cell. On the other hand, although MvaT-family proteins are the functional homolog of H-NS [10, 15], plasmids containing the MvaT gene homolog were not particularly low in G+C content. Although only three plasmids contained the MvaT gene homolog and thus we cannot discuss this interesting phenomenon in detail, the difference between H-NS and MvaT may be derived from their different origin or host bacteria.

### 3.5. Relationships between Plasmid Transferability and NAP Gene Homolog Distributions. Conjugative transfer is an

essential function of plasmids, through which they play an important role in bacterial evolution and host cell behavior [11, 12]. Relaxase is an essential protein for plasmid transmission involved in the cleavage of the transferring DNA at the origin of transfer (*oriT*) site, and plasmids with relaxase genes are thought to be transmissible. Garcillán-Barcia et al. [16] proposed that transmissible plasmids can be classified into 6 MOB families (MOB<sub>C</sub>, MOB<sub>F</sub>, MOB<sub>H</sub>, MOB<sub>P</sub>, MOB<sub>Q</sub>, and MOB<sub>V</sub>) according to the amino acid sequences of 6 prototype relaxase proteins. MOB<sub>F</sub> and MOB<sub>H</sub> families are predominantly composed of conjugative plasmids, also called self-transmissible plasmids, and the other 4 families are composed of both mobilizable and conjugative plasmids. Recent studies have reported that plasmid-encoded H-NS family proteins have a “stealth” function and aide horizontal transfer of plasmids [14, 15]. Other NAPs also act as global transcriptional regulators and may regulate expression of genes involved in plasmid transmission. To discuss the relationship between NAP gene homolog distribution and plasmid transferability, we determined the distribution of genes encoding relaxase proteins in Gram-negative plasmids according to the classification by Garcillán-Barcia et al. [16]. Four hundred and nine (30%) of 1382 Gram-negative plasmids carried relaxase genes, and 71 (17%) of those 409 plasmids carried NAP gene homologs. Note that 71 (52%) of 136 plasmids with NAP gene homologs carried relaxase genes. This indicates that plasmids with NAP gene homologs frequently carried the relaxase genes than did those without NAP gene homologs. This phenomenon may be related to the average size of the plasmids. That of the 409 plasmids with

relaxase genes was relatively larger (145 kb) than that of all 1382 plasmids (83 kb), corresponding to the fact that larger plasmids frequently had NAP gene homologs.

Four hundred and nine plasmids were classified into each MOB family (13, MOB<sub>C</sub>; 128, MOB<sub>F</sub>; 29, MOB<sub>H</sub>; 86, MOB<sub>P</sub>; 131, MOB<sub>Q</sub>; and 26, MOB<sub>V</sub>). Plasmid 1 (NC\_008545) was classified into both the MOB<sub>C</sub> and MOB<sub>F</sub> families. In addition, the MOB<sub>P</sub>, MOB<sub>Q</sub>, and MOB<sub>V</sub> families were partially overlapped as described by Garcillán-Barcia et al. [16]. Seventy-one plasmids with NAP gene homologs were contained in each MOB family (1, MOB<sub>C</sub>; 11, MOB<sub>F</sub>; 20, MOB<sub>H</sub>; 8, MOB<sub>P</sub>; 30, MOB<sub>Q</sub>; and 2, MOB<sub>V</sub>). Intriguingly, 20 (69%) of 29 MOB<sub>H</sub>-family plasmids encoded some NAP homologs, and most of them were H-NS or HU (Table 7). The MOB<sub>H</sub> family was composed of predominantly large conjugative plasmids, such as the IncHI1 group of plasmids, suggesting that HU may also contribute to plasmid transmission as does H-NS. Furthermore, 30 (23%) of 131 MOB<sub>Q</sub>-family plasmids also contained some NAP gene homologs, and 15 (50%) of those carried Lrp gene homologs (Table 8). The MOB<sub>Q</sub> family was composed of both mobilizable and conjugative plasmids, such as those of *Rhizobium* and *Agrobacterium*, implying that Lrp may also affect plasmid conjugation. In the other MOB families, plasmids containing NAP gene homologs were less than 10% (8%, MOB<sub>C</sub>; 9%, MOB<sub>F</sub>; 9%, MOB<sub>P</sub>; and 8%, MOB<sub>V</sub>). This phenomenon may also be related to the average size of the plasmids contained in each MOB family. MOB<sub>H</sub> (220 kb) and MOB<sub>Q</sub> (198 kb) were larger than MOB<sub>C</sub> (78 kb), MOB<sub>F</sub> (117 kb), MOB<sub>P</sub> (87 kb), and MOB<sub>V</sub> (149 kb). On the other hand, the average G+C content of all plasmids belonging to each MOB family was as follows: MOB<sub>C</sub> (52%), MOB<sub>F</sub> (52%), MOB<sub>H</sub> (51%), MOB<sub>P</sub> (53%), MOB<sub>Q</sub> (54%), and MOB<sub>V</sub> (46%). No relationship between the distribution of NAP gene homologs of each MOB family and the G+C content of plasmids was found.

**3.6. Conclusions.** We compared the distribution of NAP gene homologs among plasmids and plasmid features. Larger plasmids frequently had NAP gene homologs, possibly to maintain themselves and host cell fitness. Plasmids with NAP gene homologs also frequently carried relaxase genes. Although this may be related to their relatively larger sizes, together with the fact that NAPs affect global gene regulation, it is likely that NAPs contribute to plasmid transmission. Considering the fact that NAPs encoded on plasmids actually help the host cell to integrate newly acquired genes into host regulatory networks [14, 15], large plasmids with NAP gene homologs may be generally more beneficial not only for the host cell, but also for their own existence.

NAP homologs encoded on plasmids can interact with different types of NAPs encoded on the host chromosome and cooperatively regulate host transcriptional networks. Understanding these mechanisms in more detail will shed light on the meanings of the distributions of NAPs on plasmids and chromosomes. Comprehensive analysis of their binding sites in the host and plasmid genomes will help us to understand the relationships between G+C content and the presence of NAPs. Such information will explain

how bacteria adapt and evolve by acquiring foreign genes by HGT.

## References

- [1] C. J. Dorman, "Chapter 2 nucleoid-associated proteins and bacterial physiology," *Advances in Applied Microbiology*, vol. 67, pp. 47–64, 2009.
- [2] S. C. Dillon and C. J. Dorman, "Bacterial nucleoid-associated proteins, nucleoid structure and gene expression," *Nature Reviews Microbiology*, vol. 8, no. 3, pp. 185–195, 2010.
- [3] M. D. Bradley, M. B. Beach, A. P. J. de Koning, T. S. Pratt, and R. Osuna, "Effects of Fis on *Escherichia coli* gene expression during different growth stages," *Microbiology*, vol. 153, no. 9, pp. 2922–2940, 2007.
- [4] W. W. Navarre, S. Porwollik, Y. Wang et al., "Selective silencing of foreign DNA with low GC content by the H-NS protein in *Salmonella*," *Science*, vol. 313, no. 5784, pp. 236–238, 2006.
- [5] J. Oberto, S. Nabti, V. Jooste, H. Mignot, and J. Rouviere-Yaniv, "The HU regulon is composed of genes responding to anaerobiosis, acid stress, high osmolarity and SOS induction," *PLoS One*, vol. 4, no. 2, article e4367, 2009.
- [6] M. W. Mangan, S. Lucchini, V. Danino, T. Ó. Cróinin, J. C. D. Hinton, and C. J. Dorman, "The integration host factor (IHF) integrates stationary-phase and virulence gene expression in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium," *Molecular Microbiology*, vol. 59, no. 6, pp. 1831–1847, 2006.
- [7] K. K. Swinger and P. A. Rice, "IHF and HU: flexible architects of bent DNA," *Current Opinion in Structural Biology*, vol. 14, no. 1, pp. 28–35, 2004.
- [8] B. K. Cho, C. L. Barrett, E. M. Knight, Y. S. Park, and B. Ø. Palsson, "Genome-scale reconstruction of the Lrp regulatory network in *Escherichia coli*," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 105, no. 49, pp. 19462–19467, 2008.
- [9] L. D. Murphy, J. L. Rosner, S. B. Zimmerman, and D. Esposito, "Identification of two new proteins in spermidine nucleoids isolated from *Escherichia coli*," *Journal of Bacteriology*, vol. 181, no. 12, pp. 3842–3844, 1999.
- [10] C. Tendeng, O. A. Soutourina, A. Danchin, and P. N. Bertin, "MvaT proteins in *Pseudomonas* spp.: a novel class of H-NS-like proteins," *Microbiology*, vol. 149, no. 11, pp. 3047–3050, 2003.
- [11] L. S. Frost, R. Leplae, A. O. Summers, and A. Toussaint, "Mobile genetic elements: the agents of open source evolution," *Nature Reviews Microbiology*, vol. 3, no. 9, pp. 722–732, 2005.
- [12] C. M. Thomas and K. M. Nielsen, "Mechanisms of, and barriers to, horizontal gene transfer between bacteria," *Nature Reviews Microbiology*, vol. 3, no. 9, pp. 711–721, 2005.
- [13] A. Carattoli, "Plasmid-mediated antimicrobial resistance in *Salmonella enterica*," *Current Issues in Molecular Biology*, vol. 5, no. 4, pp. 113–122, 2003.
- [14] M. Doyle, M. Fookes, A. L. Ivens, M. W. Mangan, J. Wain, and C. J. Dorman, "An H-NS-like stealth protein aids horizontal DNA transmission in bacteria," *Science*, vol. 315, no. 5809, pp. 251–252, 2007.
- [15] C.-S. Yun, C. Suzuki, K. Naito et al., "Pmr, a histone-like protein H1 (H-NS) family protein encoded by the IncP-7 plasmid pCAR1, is a key global regulator that alters host function," *Journal of Bacteriology*, vol. 192, no. 18, pp. 4720–4731, 2010.

- [16] M. P. Garcillán-Barcia, M. V. Francia, and F. de la Cruz, "The diversity of conjugative relaxases and its application in plasmid classification," *FEMS Microbiology Reviews*, vol. 33, no. 3, pp. 657–687, 2009.
- [17] J. Wei, M. B. Goldberg, V. Burland et al., "Complete genome sequence and comparative genomics of *Shigella flexneri* serotype 2a strain 2457T," *Infection and Immunity*, vol. 71, no. 5, pp. 2775–2786, 2003.
- [18] C. K. Sherburne, T. D. Lawley, M. W. Gilmour et al., "The complete DNA sequence and analysis of R27, a large IncHI plasmid from *Salmonella typhi* that is temperature sensitive for transfer," *Nucleic Acids Research*, vol. 28, no. 10, pp. 2177–2186, 2000.
- [19] J. Wain, L. T. D. Nga, C. Kidgell et al., "Molecular analysis of incHI1 antimicrobial resistance plasmids from *Salmonella* serovar Typhi strains associated with typhoid fever," *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, vol. 47, no. 9, pp. 2732–2739, 2003.
- [20] A. Tett, A. J. Spiers, L. C. Crossman et al., "Sequence-based analysis of pQBR103; a representative of a unique, transfer-proficient mega plasmid resident in the microbial community of sugar beet," *ISME Journal*, vol. 1, no. 4, pp. 331–340, 2007.
- [21] K. Maeda, H. Nojiri, M. Shintani, T. Yoshida, H. Habe, and T. Otori, "Complete nucleotide sequence of carbazole/dioxin-degrading plasmid pCAR1 in *Pseudomonas resinovorans* strain CA10 indicates its mosaicity and the presence of large catabolic transposon Tn4676," *Journal of Molecular Biology*, vol. 326, no. 1, pp. 21–33, 2003.
- [22] Y. Takahashi, M. Shintani, H. Yamane, and H. Nojiri, "The complete nucleotide sequence of pCAR2: pCAR2 and pCAR1 were structurally identical incP-7 carbazole degradative plasmids," *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, vol. 73, no. 3, pp. 744–746, 2009.
- [23] P. Deighan, C. Beloin, and C. J. Dorman, "Three-way interactions among the Sfh, StpA and H-NS nucleoid-structuring proteins of *Shigella flexneri* 2a strain 2457T," *Molecular Microbiology*, vol. 48, no. 5, pp. 1401–1416, 2003.
- [24] S. C. Dillon, A. D. S. Cameron, K. Hokamp, S. Lucchini, J. C. D. Hinton, and C. J. Dorman, "Genome-wide analysis of the H-NS and Sfh regulatory networks in *Salmonella Typhimurium* identifies a plasmid-encoded transcription silencing mechanism," *Molecular Microbiology*, vol. 76, no. 5, pp. 1250–1265, 2010.
- [25] R. T. Dame, M. C. Noom, and G. J. L. Wuite, "Bacterial chromatin organization by H-NS protein unravelled using dual DNA manipulation," *Nature*, vol. 444, no. 7117, pp. 387–390, 2006.
- [26] C. Madrid, C. Balsalobre, J. García, and A. Juárez, "The novel Hha/YmoA family of nucleoid-associated proteins: use of structural mimicry to modulate the activity of the H-NS family of proteins," *Molecular Microbiology*, vol. 63, no. 1, pp. 7–14, 2007.
- [27] S. de los Rios and J. J. Perona, "Structure of the *Escherichia coli* leucine-responsive regulatory protein Lrp reveals a novel octameric assembly," *Journal of Molecular Biology*, vol. 366, no. 5, pp. 1589–1602, 2007.