

IncP-7 群カルバゾール分解プラスミド pCAR1 の分子遺伝学的研究

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15年度博士課程 進学

氏 名 新谷 政己
指導教員 山根 久和

目次

| | |
|---|--------|
| 目次 | i |
| 略語表 | iii |
| 論文の内容の要旨 | iv |
| 第1章 序論 | - 1 - |
| 第2章 pCAR1 の全塩基配列の決定および不和合性群の決定 | - 14 - |
| 2-1 緒言 | - 14 - |
| 2-2 結果 | - 15 - |
| 2-2-1 pCAR1 の全塩基配列の解読と相同性検索による解析 | - 15 - |
| 2-2-2 pCAR1 の複製に関与すると推定される遺伝子領域 | - 15 - |
| 2-2-3 pCAR1 の複製に必要な領域の絞込み | - 18 - |
| 2-2-4 <i>repA</i> と <i>oriV</i> の詳細な解析 | - 18 - |
| 2-2-5 pCAR1 の不和合性群の決定 | - 20 - |
| 2-2-6 pCAR1 の <i>Pseudomonas</i> 以外の宿主における複製能 | - 22 - |
| 2-3 考察 | - 24 - |
| 第3章 可動性遺伝因子としての pCAR1 の機能解析 | - 28 - |
| 3-1 緒言 | - 28 - |
| 3-2 結果 | - 29 - |
| 3-2-1 pCAR1 上より見出された可動性遺伝因子に関与する遺伝子 | - 29 - |
| 3-2-2 <i>car</i> 遺伝子群ホモログを有する CAR 分解菌の解析 | - 29 - |
| 3-2-3 Tn4676 の転移能 | - 32 - |
| 3-2-4 pCAR1 の接合伝達能と pCAR2 との比較 | - 36 - |
| 3-2-5 pCAR1 上の <i>tra/trh</i> 遺伝子群の解析 | - 40 - |
| 3-3 考察 | - 42 - |
| 第4章 pCAR1 の安定な保持に寄与する遺伝子群の解析 | - 48 - |
| 4-1 緒言 | - 48 - |
| 4-2 結果 | - 49 - |
| 4-2-1 pCAR1 上より見出された安定な保持能に関する遺伝子群 | - 49 - |
| 4-2-2 <i>parWABC</i> 遺伝子群のプラスミドの安定な保持能への寄与 | - 49 - |
| 4-2-3 各 <i>par</i> 遺伝子群の転写解析 | - 52 - |
| 4-3 考察 | - 58 - |
| 第5章 マイクロアレイ解析を用いた pCAR1 上の遺伝子の発現解析 | - 61 - |
| 5-1 緒言 | - 61 - |
| 5-2 結果 | - 62 - |

| | | |
|----------------------|---|---------------|
| 5-2-1 | 早期対数増殖期と定常期における pCAR1 上の遺伝子発現の比較 | - 62 - |
| 5-2-2 | マイクロアレイ解析の結果抽出された遺伝子の経時的な発現量 | - 62 - |
| 5-2-3 | <i>pmr</i> 破壊株の作製とマイクロアレイ解析 | - 62 - |
| 5-2-4 | Pmr と <i>parAp</i> のプロモーター活性の関係 | - 67 - |
| 5-3 | 考察 | - 71 - |
| 総括と展望 | | - 74 - |
| 材料および方法 | | |
| M-1. | 菌株および培地 | 80 |
| M-2. | 試薬, 酵素 | 80 |
| M-3. | 使用したオリゴヌクレオチド | 80 |
| M-4. | DNA および RNA の取り扱い | 80 |
| M-5. | アガロースゲル電気泳動とゲルからの DNA の回収 | 86 |
| M-6. | エレクトロポレーション | 87 |
| M-7. | パルスフィールドゲル電気泳動 (Pulsed-field gel electrophoresis; PFGE) | 87 |
| M-8. | サザンハイブリダイゼーション | 87 |
| M-9. | Polymerase chain reaction (PCR) | 89 |
| M-10. | 塩基配列決定法 | 89 |
| M-11. | プラスミドの構築 | 89 |
| M-12. | プラスミドの不和合性テスト | 91 |
| M-13. | pCAR1 脱落株の取得 | 91 |
| M-14. | トランスポゾンの転移実験 (mating out 法) | 91 |
| M-15. | プラスミドの接合伝達実験 | 95 |
| M-16. | Reverse Transcription-PCR | 95 |
| M-17. | 定量的 RT-PCR | 95 |
| M-18. | プラスミドの安定性の検証実験 | 95 |
| M-19. | ルシフェラーゼ活性測定 | 95 |
| M-20. | プライマー伸長反応 | 95 |
| M-21. | マイクロアレイの作製と RNA サンプルの調製 | 96 |
| M-22. | マイクロアレイ解析 | 96 |
| M-23. | <i>pmr</i> 破壊株の作製 | 96 |
| 参考文献 | | 98 |
| 付録 | | |
| 謝辞 | | |

略語表

| | |
|------|-------------------------------------|
| Ap | Ampicillin |
| CAR | Carbazole |
| Cb | Carbenicillin |
| Cm | Chloramphenicol |
| CTAB | Hexadecyltrimethyl ammonium bromide |
| DMSO | Dimethylsulfoxide |
| DR | Direct repeat |
| EDTA | Ethylenediaminetetraacetic acid |
| Gm | Gentamicin |
| IR | Inverted repeat |
| IS | Insertion sequence |
| kb | Kilobase |
| Km | Kanamycin |
| OD | Optical density |
| ORF | Open reading frame |
| PCR | Polymerase chain reaction |
| Rif | Rifampicin |
| rpm | Round per minute |
| SDS | Sodium dodecylsulfate |
| Sm | Streptomycin |
| Su | Sulfonamide drug |
| TAE | Tris-acetate-EDTA (buffer) |
| TBE | Tris-borate-EDTA (buffer) |
| Tc | Tetracycline |
| Tm | trimethoprim |
| Tn | Transposon |
| Tris | Tris(hydroxymethyl)aminomethane |

論文の内容の要旨

応用生命工学 専攻
平成15年度博士課程 進学

氏 名 新谷 政己
指導教員 山根 久和

論文題目 IncP-7 群カルバゾール分解プラスミド pCAR1 の分子遺伝学的研究

カルバゾール (CAR) は、環境汚染物質として知られる含窒素芳香族化合物である。これまでに CAR 分解菌が多数単離され、特に *Pseudomonas resinovorans* CA10 株の有する CAR 分解系 *car* 遺伝子群とそれにコードされる酵素群については詳細に解析されてきた。一般的に、類似の分解系遺伝子群が数多くの分解菌より見出される場合、接合伝達性の分解プラスミドや、分解トランスポゾンといった可動性遺伝因子による遺伝子の水平伝播が起こっていると考えられる¹⁾。CAR 分解菌でも同様に CA10 株由来 *car* 遺伝子群と類似な遺伝子が多数の他の CAR 資化菌から見つかるが、CA10 株の *car* 遺伝子群はプラスミド pCAR1 上に局在することから、自然界での CAR 代謝系遺伝子群の分布に pCAR1 の寄与が考えられた。研究開始当初は pCAR1 については CAR 代謝系遺伝子群以外の領域についての情報が無かったことから、その全体構造を明らかにするために、我々は 199,035 bp の全塩基配列を決定した²⁾。その結果、接合伝達に必要なと推定される一連の *tra/trh* 遺伝子群と、*car* 遺伝子群を含む 73-kb のクラス II トランスポゾン (Tn4676 と命名) が見出され、*car* 遺伝子群も pCAR1 自身と Tn4676 によって水平伝播する可能性が示された。我々が明らかにした pCAR1 の複製、分配、接合伝達に関与すると考えられる領域は、既知プラスミドの対応する領域と相同性が低く、pCAR1 は塩基配列情報未知の不和合性群 (IncP 群) に属すると推定された。これらの背景に基づいて本研究では pCAR1 の複製・保持能の解析と、可動性遺伝因子としての機能解析を行った。

1. プラスミド pCAR1 の複製に必要な領域と不和合性群の決定³⁾

pCAR1 の塩基配列の解析と相同性検索によって、プラスミドの複製を開始するために必要と推定される遺伝子が見出され (*repA* と命名)、その直上流に染色体の複製開始点付近によく見られる A+T に富む領域、12-bp および 18-bp からなる反復配列 (それぞれ 12 mer および iteron と命名) と、DnaA box と推定される塩基配列が存在した (図)。さらに *repA* 周辺には複製に関与すると推定される他の読み枠も見出された。そこで、周辺領域を含む様々な長さの DNA 断片と、選択マーカーとしてカナマイシン耐性遺伝子を連結したミニプラスミドを作製し、*Pseudomonas* 属細菌内で複製されるために必要な領域の絞込みを行った。その結果、*repA* とその直上流の配列のみが pCAR1 の複製に必要であり、複製開始点 (*oriV* と命名) が *repA* 上流の約 500 bp の領域に含まれることを明らかにした (図)。また *repA* と *oriV* が別の DNA 鎖上に存在しても複製可能なことが判明した。さらに pCAR1 は大腸菌内で複製されないことも併せて明らかにした。

上で作製したミニプラスミドを既知の12種の IncP 群プラスミドを有する菌株に対して挿入し、2つ

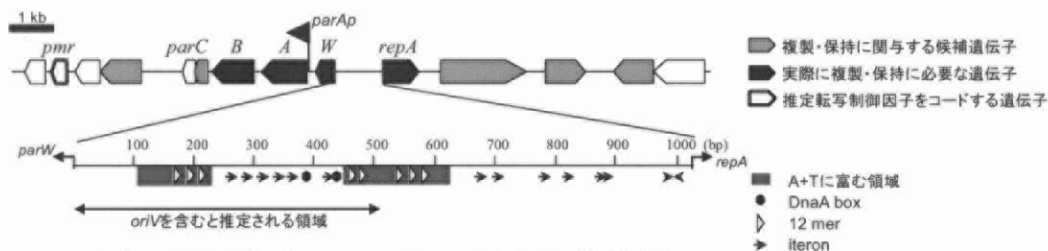


図. pCAR1上のrepA-oriV-parWABC周辺領域

のプラスミドの共存を確かめる不和合性試験を行ったところ, IncP-7 群に属する薬剤耐性プラスミド Rms148 と共存できなかった. また pCAR1 の repA-oriV 領域をプローブとしたサザン解析でも Rms148 のみに強いシグナルが検出できたことから, pCAR1 が IncP-7 群プラスミドであると結論した. pCAR1 の塩基配列決定以前に IncP-7 群に属するプラスミドの塩基配列情報は無く, 複製に必要な複製開始タンパクと, そのターゲットとなる DNA 領域を決定した初めての例である.

2. 可動性遺伝因子としての pCAR1 の解析^{3), 4), 5), 6)}

これまでに CA10 株の car 遺伝子群ホモログは他の複数の CAR 分解菌より見出されていた. そこで7株の CAR 分解菌について car 遺伝子群の局在性を調べ, 周辺の遺伝子領域を pCAR1 や Tn4676 と遺伝子レベルで比較した. その結果, 1株は Tn4676 内部の約 55-kb の遺伝子領域を保持していたが⁴⁾, 3株は pCAR1 と酷似したプラスミドを有しており, さらに残りの3株は Tn4676 を染色体上に保持していた⁵⁾. さらに pCAR1 とその遺伝子構造について pCAR1 との違いが見出されないプラスミド pCAR2 を保持する *P. putida* HS01 株においては, 実際に宿主内部でプラスミド上の Tn4676 が染色体上に転移する現象を見出した⁵⁾. 以上のことは pCAR1 や Tn4676 が car 遺伝子群の異なる細菌間の水平伝播に寄与することを示唆している. そこで可動性遺伝因子としての pCAR1 および Tn4676 の解析をより詳細に行った.

まず Tn4676 のトランスポゼースとレゾルベースおよび推定制御タンパクをコードする *tnpAc*, *tnpST* および *tnpC* と推定逆向き繰返し配列 IR-a および IR-f を含む DNA 領域に, ゲンタマイシン耐性遺伝子を組込んだミニトランスポゾン を構築した. その後, 大腸菌内で RP4 および R388 を標的プラスミドとする mating out 法を用いてミニトランスポゾンの転移能を検証した. その結果, 接合伝達したプラスミドあたり約 10^{-5} の頻度で転移が認められた.

次に pCAR1 の接合伝達性を解析するために, *Pseudomonas* 属細菌を中心とした様々な受容菌に対し pCAR1 の接合実験を行った. この際 pCAR1 を脱落させた CA10 株 (CA10dm4 株と命名) を作製し, 受容菌の1つとして用いた. その結果, pCAR1 は CA10dm4 株と *P. putida* KT2440 株には高い頻度 (供与菌当たり $10^{-1} \sim 10^{-3}$ 程度) で伝達した^{3), 6)}. これらの結果から, pCAR1 と Tn4676 が異なる細菌間での car 遺伝子群の水平伝播装置として実際に機能しうることが実験的に証明された.

一方, *P. putida* HS01 株の有する pCAR2 は, pCAR1 が伝達しない *P. chlororaphis* や *P. fluorescens* に対しても接合伝達を検出できたが, pCAR2 を pCAR1 の元の宿主である CA10dm4 株や KT2440 株に移し, これらの菌株を供与菌とすると, pCAR1 と同じ傾向を示した. 従って, pCAR1 と pCAR2 は *Pseudomonas* 属の菌株間で約 $10^{-5} \sim 10^{-7}$ 程度の頻度で同様の接合伝達能を有するが, 供与菌と受容菌の組み合わせによってはさらに大きく接合伝達頻度が変化することが

示された⁶⁾. RT-PCR 解析に基づく、pCAR1 および pCAR2 において接合伝達に関与すると推定された *tra/trh* 遺伝子群は4つのオペロンから構成されるが、各オペロン上の遺伝子を標的とした定量的 RT-PCR によって pCAR1 および pCAR2 を保持する各供与菌における mRNA の量を比較しても、大きな転写量の変化はなかった⁶⁾. このため、供与菌を変えた際の接合伝達性の変化は *tra/trh* 遺伝子群の転写量の違いに起因せず、pCAR1 上の他の遺伝子や、供与菌内の制限・修飾系機構などの宿主因子が関与する可能性が示唆された.

3. pCAR1 の安定な保持に寄与する遺伝子群の解析³⁾

一般に知られるプラスミドの安定化に必要な分配機構 (partition) には、プラスミド上の遺伝子にコードされる ATPase (ParA) と DNA 結合タンパク質 (ParB) の2つのタンパク質と、1つの動原体様の DNA 配列が必要である. pCAR1 上 *repA* 上流からもこれらの2つ遺伝子と相同性を示す読み枠 (*parA*, *parB* と命名) が見出されたが、同一オペロンと考える *parA* 直上流と *parB* 直下流に、機能については全く未解明の *parW* および *parC* が存在していた (図). これらの読み枠は pCAR1 の塩基配列発表後に報告された IncP-7 群プラスミド (pWW53, pND6-1, pL6.5) に共通して見出されることから、IncP-7 群に特異的な高い安定性を担う可能性が示唆された. そこでプラスミドの安定化にこれらの *par* 遺伝子群が寄与するかどうかを解析した. まず pCAR1 の *repA-oriV* のみを含むミニプラスミドと、*repA-oriV-parWABC* を含むミニプラスミドを作製後、*Pseudomonas* 属細菌内における安定性を比較した. その結果、前者が急速に脱落したのに対し、後者は極めて安定に保持され、*par* 遺伝子群が pCAR1 の安定性に必要であることが示された. 次に、どの遺伝子が安定化に必要なのかを決定するため、各 *par* 遺伝子をフレームシフト変異によって破壊したミニプラスミドを作製し、同様に安定性について調べた. その結果 *parC* を欠損してもプラスミドは安定であったが、*parW*, *parA* および *parB* それぞれに変異を入れたミニプラスミドはいずれも不安定化した. 各 *par* 遺伝子を広宿主域ベクター上の構成的に発現するプロモーター下流に挿入したプラスミドを用いて相補実験を行ったところ、ParW, ParA および ParB を単独に相補した場合には安定性が 10% 以下の回復に留まったが、*parWAB* 全体を含むプラスミドを用いて相補した場合、各プラスミドの安定性が 50~70% 程度回復した. 以上より pCAR1 の安定性には ParWAB が必要であることが示された.

プラスミドの安定性を維持するためには *parWAB* 遺伝子の適切な発現が重要であることから、*par* 遺伝子群の転写単位を調べるため、pCAR1 を保持する菌体より全 RNA を抽出して RT-PCR 解析を行ったところ、*parWABC* が少なくとも1つのオペロン (*par* オペロン) として転写されていた. 次に、*parW*, *parA* および *parB* 各上流の DNA 領域をルシフェラーゼ遺伝子の直上流に連結したレポータープラスミドを構築し、プロモーター活性の解析を行った. その結果、*parW* 開始コドン上流に弱いプロモーターが、*parA* 開始コドン上流に強いプロモーターが存在していることが判明した. *parA* 上流についてさらに詳細に解析したところ、98 bp までに強いプロモーターが存在していることが判明した (*parAp* と命名). また *parA* 上流の DNA 領域についてプライマー伸張反応を行ったところ、*parA* 開始コドン上流 25 bp の位置に転写開始点が存在した. さらに、レポーターアッセイを詳細に行い σ^{70} 因子が結合すると推定される、-35、-10 プロモーター配列を見出した.

4. マイクロアレイ解析を用いた pCAR1 上における遺伝子の発現解析

上で述べたようなプラスミドの基本機能は宿主染色体との何らかの (相互) 作用により制御されていると考えられる. そこで我々は、様々な宿主において pCAR1 と染色体上の全遺伝子がどのような協調的発現をしているか網羅的に解析することを最終目的として、マイクロアレイ解析を開始し

た. 本研究ではその第一歩として pCAR1 をゲノム配列が解読済みの *P. putida* KT2440 株に接合伝達させた KT2440(pCAR1)株を対象としてマイクロアレイ解析を行った. まずコハク酸を炭素源として, それぞれ早期対数増殖期と定常期まで培養した各菌株より全 RNA を抽出してマイクロアレイ解析に供したところ, 変動が顕著に大きかった pCAR1 上の遺伝子として, *parABC* と ORF70 (図; *pmr* と命名) が抽出された (いずれも早期対数増殖期に3倍以上増大). *pmr* 産物は *P. aeruginosa* PAO1 株より見出された転写制御因子 MvaT や大腸菌における histone like-nucleoid structuring (H-NS) タンパク質と相同性を示すが, これらのタンパク質は複数の遺伝子の発現を制御することが知られている. また, これまでに pCAR1 上からは相同性検索によって推定された転写制御因子の候補が *pmr* を含めて3つしか見出されず, このうち1つは CAR 代謝系に特異な転写制御因子であることが判明している. 従ってこの *pmr* 産物が pCAR1 上の遺伝子の転写制御に関与する可能性が考えられたため, *pmr* 破壊株を作製し, 破壊株と野生株の早期対数増殖期における遺伝子発現の相違をマイクロアレイ解析によって比較した. その結果, 最も顕著に発現が変化した遺伝子として *parA* および *parB* が抽出された (破壊株において野生株の約8倍発現量が低下). さらに破壊株と野生株における *parAp* 活性をレポーターアッセイによって比較したところ, 破壊株における *parAp* 活性が野生株に比べて約7倍低かった. この結果より *pmr* 産物が *par* オペロンの転写を正に制御することが確認された. また, 破壊株と野生株においては, 他の遺伝子についても発現強度の変化が複数観察され, *pmr* 産物が複数の遺伝子の発現制御に関与する可能性が示唆された. このように H-NS 様の転写制御因子をコードする遺伝子が IncP 群プラスミドから見出された報告例は未だなく, その機能の詳細な解明が待たれる.

まとめ

本研究によって, pCAR1 はプラスミドとしても, また内部のトランスポゾンによっても *car* 遺伝子群の水平伝播装置として機能していることが実験的に証明された. また複製, 保持および接合伝達についてほとんど未解明であった IncP-7 群プラスミドの諸性質が明らかになった. 既知の分解プラスミドのうち, これらの性質が詳細に解析されたものは IncP-1 と IncP-9 群のみであったが, 本研究によって, この2つのタイプとは全く異なる性質を有する第3の分解プラスミド群を提唱することができた. またマイクロアレイ解析の結果, pCAR1 上の *pmr* がプラスミドの保持能に必要な遺伝子の発現制御を行うことが推定されたが, これはプラスミドの安定化における新規の制御機構の存在を示唆している. また, pCAR1 の塩基配列情報を用いたマイクロアレイ解析を確立したことによって, 今後プラスミドの有無によって影響される染色体上の遺伝子の発現変動や, 異なる生育条件における染色体とプラスミド上の遺伝子の発現の相関を解析するなど, 新しい視点からの解析が可能となり, さらなる研究の発展が期待される.

- (1) Nojiri, H., Shintani, M. *et al.*, 2004. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **64**: 154-174.
- (2) Maeda, K., Nojiri, H., Shintani, M. *et al.*, 2003. *J. Mol. Biol.* **326**: 21-33.
- (3) Shintani, M. *et al.* *Appl. Environ. Microbiol.* in press.
- (4) Shintani, M. *et al.*, 2005. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **67**: 370-382.
- (5) Shintani, M. *et al.*, *Biotechnol. Lett.* **27**: 1847-1853.
- (6) Shintani, M. *et al.*, 2003. *Biotechnol. Lett.* **25**: 1255-1261.

第1章 序論

細菌の多様性や環境適応能力の高さは驚くべきものであり、地球上のどのような環境下にあっても、なんらかの細菌が生存している場合が多い。20世紀に人為起源の様々な化学物質が環境中に大量に放出されたが、その中には環境に本来は無かった物質(ここではこのような物質を xenobiotics として解釈する)も含まれる。こうした xenobiotics に対しても、一定の馴養期間を経るとそれを分解したり代謝したりする能力を獲得した細菌が出現する現象が多数報告されてきた。こうした分解菌は遺伝子の再編成を引き起こして新規の遺伝子や遺伝子制御機構を作り出す、あるいは新規の代謝系遺伝子群を外部から獲得する(遺伝子の水平伝播)ことによって新たな代謝能力を得ると考えられている。特に後者の遺伝子の水平伝播は、細菌の世界ではかなり頻繁に生じていると考えられ、外部の「裸の」状態の DNA を取り込む形質転換 (transformation)、バクテリオファージを介した形質導入 (transduction)、および自己伝達性プラスミド、可動性プラスミドやゲノミックアイランドが細菌同士の接触によって移動する接合 (conjugation) の3つの方法に大別される (図 1-1; Arber, 2000, Bushman, 2002, Thomas and Nielsen, 2005)。このほかに、細胞内のレプリコン間を移動するトランスポゾン、インテグロンも知られている。こうした細胞間あるいは細胞内を動く遺伝因子は可動性遺伝因子 (mobile genetic elements; MGEs) とよばれ、分解系遺伝子群の多くは可動性遺伝因子によって水平伝播すると考えられている (Furukawa *et al.*, 1989, Wyndham *et al.*, 1994, Davison, 1999, Tan, 1999, Tsuda *et al.*, 1999, Nojiri *et al.*, 2004, Ogawa *et al.*, 2004, Williams *et al.*, 2004)。

分解プラスミド

プラスミドという語は、細胞質で増殖する自己増殖因子(真核細胞の核外の増殖因子も含んでいた)を総称するために提唱され、今日では特に細菌の細胞内で物理的に別個に存在し、自律増殖をするレプリコン(物理的に独立した単位として増殖するユニット、増殖の単位)に限って用いている(松原, 1978, Thomas, 2000)。このうち、トルエン、サリチル酸、2,4-ジクロロフェノキシ酢酸(2,4-D)、クロロ安息香酸、およびナフタレンなどの芳香族化合物の好気分解に関与するプラスミドが1970年代より見出され、これを分解プラスミドと総称する(Ogawa *et al.*, 2004, Williams *et al.*, 2004, 津田・曾田, 2005)。現在までに報告されたグラム陰性細菌由来の主な分解プラスミドを表 1-1 に示した。一般に、プラスミドは複製・保持機構の類似性によって分類される。類似した複製・保持機構を有する2種のプラスミドは同一の細胞内では共存できず、互いに排除しあう性質(不和

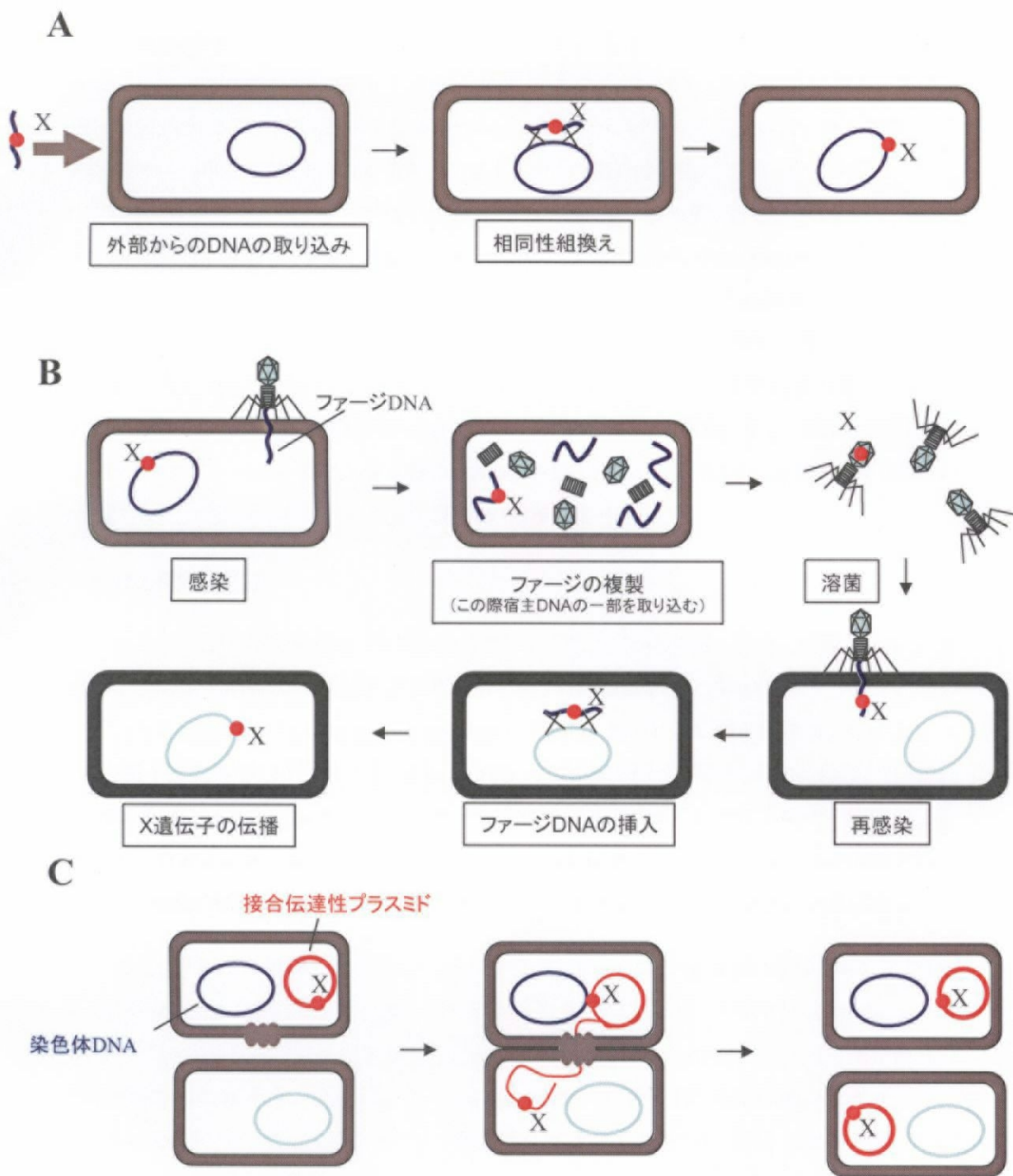


図1-1. 主な遺伝子の水平伝播機構.

A. 外部DNAを取り込む形質転換, B. ファージによる形質導入, C. 接合性プラスミドを介した接合伝達.

合性; incompatibility)を示すが、このとき2つのプラスミドを同一の不和合性群 (incompatibility group, Inc) に属するという。複製・保持能や接合伝達能という、プラスミドの基本性質を規定する遺伝子領域を、プラスミドの基本骨格 (backbone) と呼ぶが、同一の不和合性群に属する場合、この基本骨格の構造(遺伝子の並び方やその塩基配列)の類似性が極めて高い場合が多い。

これまでに報告された分解プラスミドの多くが *Pseudomonas* 属細菌から見出されている (Nojiri *et al.*, 2004, Ogawa *et al.*, 2004, Williams, *et al.*, 2004, Dennis, 2005). *Pseudomonas* 属細菌由来のプラスミドは IncP 群に分類され、現在までに14種のサブグループ (IncP-1~IncP-14) の存在が提唱されているが (Thomas and Haines, 2004), 分解プラスミドのほとんどが IncP-1 群, IncP-2 群および IncP-9 群に属している(表 1-1). 近年、塩基配列決定法とそのデータ解析技術の進歩により、11種の分解プラスミドの全塩基配列が決定されている(2005年12月現在, 表 1-1 参照). これら3つのグループのうち IncP-1 群と IncP-9 群の分解プラスミドについては、古くから詳細に解析されている。以下に、この2つのグループについて研究の推移を述べる。

IncP-1 群プラスミド

IncP-1 群に属する薬剤耐性プラスミドの研究によって、古くから非常に詳細に研究がなされてきた。IncP-1 群の特徴として、非常に広い宿主域をもち Proteobacteria の異なるサブグループに属する宿主内で複製されること (Adamczyk and Jagura-Burdzy, 2003), 高い接合伝達頻度を有すること(供与菌 1 細胞あたり 10^{-1} にも上る)が挙げられる。2つの薬剤耐性プラスミド RP4 (RK2 とよばれる; IncP-1 α 群) と R751 (IncP-1 β 群) について、その全塩基配列がそれぞれ 1994 年, 1998 年に決定された (Pansegrau *et al.*, 1994, Thorsted *et al.*, 1998) 結果、上で述べたような IncP-1 群プラスミドの基本機能(複製・保持能および接合伝達能)についての遺伝子レベルの研究が急速に進んだ。

一般にプラスミドの複製は、プラスミドと宿主染色体上にコードされる複数の因子(染色体の複製に必要な因子の一部)が必要であり、それぞれの相互作用によって行われる (Espinosa *et al.*, 2000). プラスミドの複製開始点を *oriV* (origin of vegetative replication) と呼ぶが、その周囲の DNA 領域には、A や T に富んだ領域 (A+T-rich 領域) や、特徴的な複数の繰り返し配列が存在し、複製開始タンパク質 (IncP-1 群プラスミドの場合は TrfA) が繰り返し配列 (iteron と呼ばれる) に結合することによって複製が開始される (Espinosa *et al.*, 2000). この *oriV* 領域は各不和合性群によって特徴的な配列を有するが、IncP-1 群の場合、*P. aeruginosa* と *P. putida* とを宿主にした場合によって、複製に必要な最小領域が異なる (Adamczyk and Jagura-Burdzy, 2003). これは宿主の違いに応じて異なる複製機構を有するためと推定されている (図 1-2, Adamczyk and Jagura-Burdzy, 2003, Thomas and Haines, 2004).

表 1-1. これまでに報告された主な分解プラスミド (グラム陰性細菌由来のもの)

| *プラスミド | **分解基質 | 由来菌株 | サイズ (kb) | 不適合性群 | 分解系遺伝子群 | 接合伝達性 | 文献 |
|---------------|--|--|-------------|----------|-----------------------------|-------|--|
| pAC25 | 3CBA | <i>P. putida</i> AC858 | 117 | P1 | NA | + | Chatterjee <i>et al.</i> , 1981. |
| pADP-1 | Atrazine | <i>Pseudomonas</i> sp. ADP | 109 | P1(P1β) | atzABCDEF | + | de Souza <i>et al.</i> , 1995, Martinez <i>et al.</i> , 2001. |
| pBRC60 | 3CBA | <i>Alcaligenes</i> sp. BR60 | 75 | P1 | cba | + | Fulthorpe and Wyndham, 1989, Fulthorpe and Wyndham, 1991. |
| pENH91 | 3CBA | <i>Ralstonia eutropha</i> NH9 | 78 | P1 | cbnABCD | NA | Ogawa and Miyashita, 1995, Veldlar <i>et al.</i> , 2000. |
| pEST4011 | 2,4-D | <i>Achromobacter xylosoxidans</i> subsp. <i>denitrificans</i> EST4002 | 70 | P1(P1γ) | tdcCEBKAK, tdfF (IS1071) | + | Mäe <i>et al.</i> , 1993, Vedler <i>et al.</i> , 2004. |
| pJIB1 | 2,4-D, malonate | <i>Burkholderia cepacia</i> 2a | 102 | P1(P1β) | Tjd, mdc | NA | Xia <i>et al.</i> , 2001, Poh <i>et al.</i> , 2002 |
| pJP4 | 2,4-D, 3-CBA | <i>Ralstonia eutropha</i> JMP134 | 80 | P1(P1β) | tdcA, tdfB, tdfCDEF | + | Don and Penperton, 1985, Trefault <i>et al.</i> , 2004. |
| pTSA | p-toluenesulfonic acid | <i>Comamonas testosteroni</i> T-2 | 85 | P1(P1β) | tsaMBBCDR, psbAC | + | Junker and Cook, 1997, Tralau <i>et al.</i> , 2001. |
| pUOI | Haloacetates | <i>Delftia acidovorans</i> B | 65 | P1(P1β) | dehA1, dehA2 | + | Kawasaki <i>et al.</i> , 1981, Sota <i>et al.</i> , 2003. |
| pVII50 CAM | Phenol Camphor | <i>Pseudomonas</i> sp. CF600 <i>P. putida</i> PpG1 | NA 500 | P2 P2 | dmp cam | + | Bartilson <i>et al.</i> , 1990. |
| OCT | Octone Camphor | <i>P. olevorans</i> PpG6 | 500 | P2 | alkBFGHJKL, alkST | + | Chakrabarty, 1973, Rheinwarld <i>et al.</i> , 1973, Tan, 1999. |
| pCAR1 | Carbazole | <i>P. resinovorans</i> CA10 | 199 | ***P7 | carABCDEF | - | Nojiri <i>et al.</i> , 2001, Maeda <i>et al.</i> , 2003. |
| pFME | Naphthalene | <i>P. fluorescens</i> FME4 | 77 | ***P7 | NA | NA | Izmalkova <i>et al.</i> , 2005. |
| pME5 | Naphthalene | <i>P. fluorescens</i> FME5 | 80 | ***P7 | NA | NA | Izmalkova <i>et al.</i> , 2005. |
| pND6-1 | Naphthalene | <i>Pseudomonas</i> sp. ND6 | 102 | ***P7 | nah | - | Li <i>et al.</i> , 2004. |
| pNK33 | Naphthalene | <i>P. fluorescens</i> NK33 | 100 | ***P7 | NA | NA | Izmalkova <i>et al.</i> , 2005. |
| pNK43 | Naphthalene | <i>P. fluorescens</i> NK43 | 123 | ***P7 | NA | NA | Izmalkova <i>et al.</i> , 2005. |
| pOS18 | Naphthalene | <i>P. fluorescens</i> OS18P | 135 | ***P7 | NA | NA | Izmalkova <i>et al.</i> , 2005. |
| pOS19 | Naphthalene | <i>P. fluorescens</i> OS19P | 122 | ***P7 | NA | NA | Izmalkova <i>et al.</i> , 2005. |
| pWW53 | Xylene, toluene | <i>P. putida</i> MT53 | 107 | ***P7 | xyl | - | Keil <i>et al.</i> , 1985, 1987. |
| NAH7 | Naphthalene, phenanthrene, anthracene | <i>P. putida</i> G7 | 83 | P9 | nah | + | Dunn and Gunsalus, 1973, Connors and Barnsley, 1980. |
| pDTG1 | Naphthalene | <i>P. putida</i> NCB19816-4 | 81 | P9 | nah | - | Simon <i>et al.</i> , 1993, Stuart-Keil <i>et al.</i> , 1998, Dennis and Zylstra, 2004. |
| pSAH | 2-Aminobenzene-sulfonate | <i>Alcaligenes</i> sp. O-1 | 172 | P9 | NA | + | Jahnke <i>et al.</i> , 1990 |
| pWW0 | Xylene, toluene | <i>P. putida</i> mt-2 | 117 | P9 | xyl | + | Williams and Murray, 1974, Greated <i>et al.</i> , 2002. |
| SAL1 | Salicylate | <i>P. putida</i> R1 | 85 | P9 | sal | + | Chakrabarty, 1972. |
| NIC | Nicotine, nicotine | <i>P. convexa</i> Pc1 | NA | NA | NA | NA | Thacker <i>et al.</i> , 1978. |
| pAM10.6 | Phenol | <i>P. fluorescens</i> biotype F Cb36 | 10.6 | NA | pheBA | NA | Peters <i>et al.</i> , 1997. |
| pBRX | Bromoxynil | <i>Klebsiella ozaenae</i> | 82 | NA | bxn | NA | Stalker and McBride, 1987. |
| pBS1010 | p-Toluenesulfonate | <i>C. testosteroni</i> BS1310 | 130 | NA | NA | NA | Top <i>et al.</i> , 2000. |
| pCAR3 | Carbazole | <i>Sphingomonas</i> sp. KA1 | 240 | NA | carRcarABC | - | Habe <i>et al.</i> , 2002. |

表 1-1. つづき.

| pCINNP | Cinnamate | <i>P. putida</i> CINNP | 75 | NA | NA | + | Andreoni and Bestetti, 1986. |
|---------|-------------------------|---|------|----|------------------------|----|---|
| pCIT1 | Aniline | <i>Pseudomonas</i> sp. CIT1 | 100 | NA | NA | NA | Anson and Mackinnon, 1984. |
| pCPE3 | Chlorobenzoates | <i>Alcaligenes</i> sp. CPE3 | 16 | NA | <i>chaABC</i> | + | Fava <i>et al.</i> , 1993. |
| pCSI | Parathion | <i>P. diminuta</i> | 66 | NA | <i>opd</i> | NA | Serdar <i>et al.</i> , 1982, Mulbry <i>et al.</i> , 1986. |
| pCgI | Naphthalene | <i>P. putida</i> CgI | 86 | NA | <i>nah</i> | + | Park <i>et al.</i> , 2003. |
| pDBT2 | Dibenzothiophene | <i>P. atcaligenes</i> DBT2 | 80 | NA | NA | NA | Foght and Westlake, 1990, Top <i>et al.</i> , 2000. |
| pDK1 | Xylene, toluene | <i>P. putida</i> HSI | 180 | NA | <i>xyI</i> | + | Kunz and Chapman, 1981. |
| pENH91 | 3CBA | <i>Ralstonia eutropha</i> NH9 | 78 | NA | <i>cbnABCD</i> | | Ogawa and Miyashita, 1995, Vedlar <i>et al.</i> , 2000. |
| pHMT112 | Benzene | <i>P. putida</i> ML2 | NA | NA | <i>bedCIC2BA, bedD</i> | NA | Tan and Mason, 1990, Fong <i>et al.</i> , 1996. |
| pKA2 | 2,4-D | <i>Alcaligenes paradoxus</i> 2811P | 42.9 | NA | <i>tfdA</i> | + | Ka and Tiedge, 1994. |
| pKA4 | 2,4-D | <i>P. pikettii</i> 712 | 40.9 | NA | <i>tfdA</i> | + | Ka and Tiedge, 1994. |
| pKJ1 | Toluene | <i>Pseudomonas</i> sp. TA8 | 225 | NA | NA | + | Yano and Nishi, 1980. |
| pNB1 | Nitrobenzene | <i>P. putida</i> HSI2 | 59 | NA | <i>nbzA, nbzCDE</i> | NA | Park and Kim, 2000. |
| pNB2 | Nitrobenzene | <i>P. putida</i> HSI2 | 44 | NA | <i>nbzB</i> | NA | Park and Kim, 2000. |
| pNL1 | Biphenyl, naphthalene, | <i>Novosphingobium aromaticivorans</i> F199 | 184 | NA | <i>bphABCD, xyI</i> | + | Stillwell <i>et al.</i> , 1995, Romine <i>et al.</i> , 1999. |
| pOAD2 | Nylon | <i>Flavobacterium</i> sp. K172 | 45.5 | NA | <i>nyIABC</i> | NA | Negoro <i>et al.</i> , 1980, Negoro and Okada, 1982, Kato <i>et al.</i> , 1994. |
| pOPH1 | Phthalate | <i>C. acidoborans</i> UCC61 | 70 | NA | <i>phI</i> | NA | Dutton <i>et al.</i> , 1995. |
| pP51 | Chlorinated benzene | <i>Pseudomonas</i> sp. P51 | 110 | NA | <i> tcbCDEF, tcbAB</i> | + | van der Meer <i>et al.</i> , 1991. |
| pPGH1 | Phenol | <i>P. putida</i> H | 220 | NA | <i>phIABCD, EFGH</i> | NA | Herrmann <i>et al.</i> , 1988. |
| pPOB | Carboxyldiphenyl ethers | <i>P. pseudocalcaligenes</i> POB310 | - | NA | <i>pabAB</i> | NA | Dehmel <i>et al.</i> , 1995. |
| pRA500 | 3,5-xyleneol | <i>P. putida</i> NCIB9869 | 500 | NA | <i>pchACX, FHG</i> | + | Hooper and Kemp, 1980, Cronin <i>et al.</i> , 1999. |
| pRE4 | Isopropyl benzene | <i>P. putida</i> RE204 | 105 | NA | <i>ipbABCEG, FHD</i> | + | Eaton and Timmis, 1986. |
| pTDN1 | Aniline | <i>P. putida</i> UCC22 | NA | NA | <i>tdnQTAT1A2BR</i> | NA | Saint <i>et al.</i> , 1990. |
| pTKO | Toluene | <i>P. putida</i> PPK1 | 150 | NA | NA | NA | Keshavart <i>et al.</i> , 1985. |
| pWW100 | Biphenyl, benzoate | <i>Pseudomonas</i> sp. CB406 | 200 | NA | <i>bph</i> | - | Lloyd-Jones <i>et al.</i> , 1994. |
| pWW174 | Benzene | <i>Acinetobacter calcoaceticus</i> RJE174 | 200 | NA | <i>cat</i> | + | Winstanley <i>et al.</i> , 1987. |
| pYAI | Aniline | <i>Acinetobacter</i> sp. YAA | NA | NA | <i>atdA</i> | NA | Fujii <i>et al.</i> , 1997. |

*既に全塩基配列情報が明らかになっているもの (NAH7, pCAR3, pWW53 は未発表) を赤字で示した.

**NA, 情報なし; PCBs, ポリ塩化ビフェニル; 3CBA, 3-クロロ安息香酸 2,4-D, 2,4-ジクロロフェノキシ酢酸

***本研究発表後に IncP-7 群に属することが明らかになったプラスミド.

ほとんどの分解プラスミドは 50 kb 以上と比較的大きなサイズである。一般にサイズの大きなプラスミドは低コピーであり、その分裂の際に各娘細胞に正確に分配する (partition) 機構を有する。一般に知られるプラスミドの安定化に必要な分配機構 (partition) には、プラスミド上の遺伝子にコードされる ATPase (ParA) と DNA 結合タンパク質 (ParB) の 2 つのタンパク質と、1 つの動原体様の DNA 配列が必要である。IncP-1 群プラスミドにおいては、ParA, ParB に対応するタンパク質が IncC と KorB で、IncP-1 群の安定な保持に必要なことが解っている (Adamczyk and Jagura-Burdzy, 2003)。なお、IncP-1 α プラスミドには、このほかに 2 つのオペロンにコードされる保持機構が存在する (*parCBA* と *parDE*)。 *parCBA* にコードされるタンパク質は、複製後のプラスミドが多量体化して不安定になるのを防ぐために、組換え反応によって解離する。後者は、細菌に対する毒素と、それに結合して無力化するタンパク質で、集団内でプラスミドを持たない細菌を殺す役割を担うことが判明した (図 1-2; Easter *et al.*, 1997, 1998)。

RK2 については、プラスミド上の遺伝子群の転写を制御する複雑なネットワークが存在することが判明している。少なくとも 4 種類の複数の遺伝子群の転写を制御する因子 (global regulator) が存在し (KorA, KorB, IncC, TrfA), RK2 上の様々な領域に結合して、プラスミドの基本機能を担う遺伝子の転写抑制因子として働く (図 1-2; Adamczyk and Jagura-Burdzy, 2003, Bingle *et al.*, 2003, 2005)。これらの因子は IncP-1 群に共通して見出され、異なる宿主内においても基本機能を担う遺伝子の発現を厳密に制御して、プラスミドの生存戦略上有利にはたらくと推定されている。

以上のような性質から、IncP-1 群プラスミドは効率の良い可動性遺伝因子となりうる。表 1-1 に IncP-1 群に属する分解プラスミドを挙げたが、これらの特徴は、互いに異なる分解系遺伝子群が、その基本骨格 (37.8~42.3 kb) の決まった 2 箇所の位置に (*oriV-trfA* の間と *trb-tra* 遺伝子の間) 挿入されていることである (図 1-3)。これは、上でも述べたように、基本骨格上の各オペロンが厳密に制御されているためと考えられる。最も研究された IncP-1 群の分解プラスミドは *Ralstonia eutropha* JMP134 株より単離された 2,4-D 分解プラスミド, pJP4 (IncP-1 β) である。本プラスミドは 2004 年に全塩基配列が決定された (Trefault *et al.*, 2004)。pJP4 は 2,4-D 分解に必要な一連の酵素遺伝子群 (*tfd* 遺伝子群) を 2 コピー有し (図 1-3; *tfd-I*, *tfd-II*)、これらの遺伝子産物が 2,4-D 分解に寄与することが示され、またその転写制御機構についても解析がなされた (Laemmi *et al.*, 2000, Perez-Pantoja *et al.*, 2000, 2003, Plumeier *et al.*, 2002)。

IncP-9 群プラスミド

IncP-9 群に属するプラスミドについては、トルエン・キシレン分解プラスミド pWW0 について古くから解析され、その基本構造よりも分解系遺伝子群について詳細に研究がなされた。

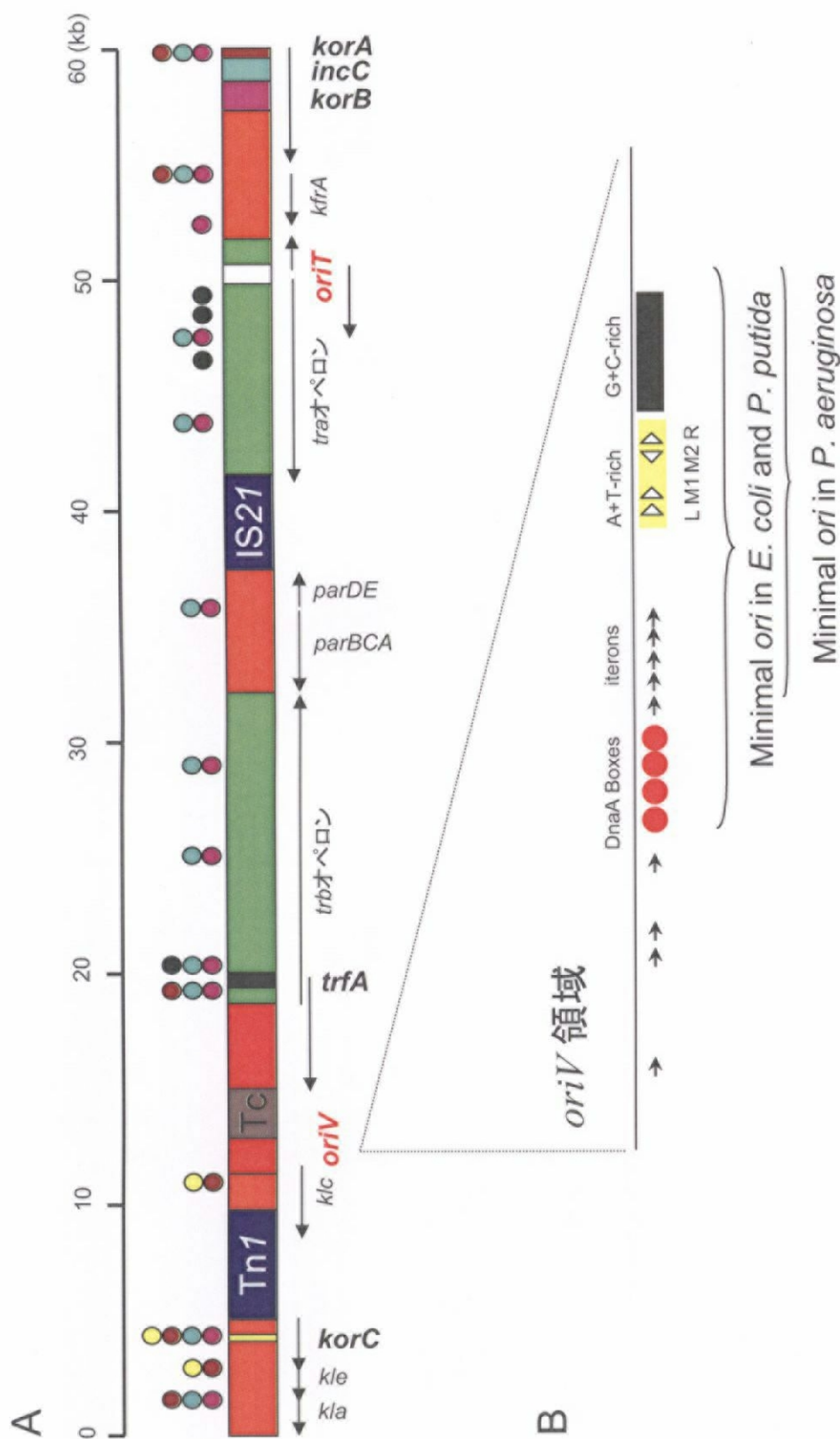


図1-2. IncP-1 α 群プラスミドRP4/RK2の線状遺伝子地図と*oriV*領域.

- (A) RP4全体を線状の地図で表した図. 遺伝子産物の機能を色で表した (赤色; 複製, 橙色; 分配, 緑色; 接合伝達, 青色; 転移因子, 灰色; 抗生物質耐性). また, RP4上の4つの転写制御因子, *TrfA*, *IncC*, *KorABC*をコードする遺伝子をそれぞれ黒色, 水色, 茶色, 桃色および黄色で示し, 各々の結合配列をそれぞれの色のついた丸で示した.
- (B) RP4の*oriV*領域の模式図. 複製開始タンパク質*TrfA*が結合するiteronを矢印で, *DnaA*が結合する*DnaA* boxを赤い丸で示した. またA+TおよびG+C-richな領域をそれぞれ黄色, 黒色で示した. さらに, A+T-richな領域内に見出される繰り返し配列を三角形で示した.

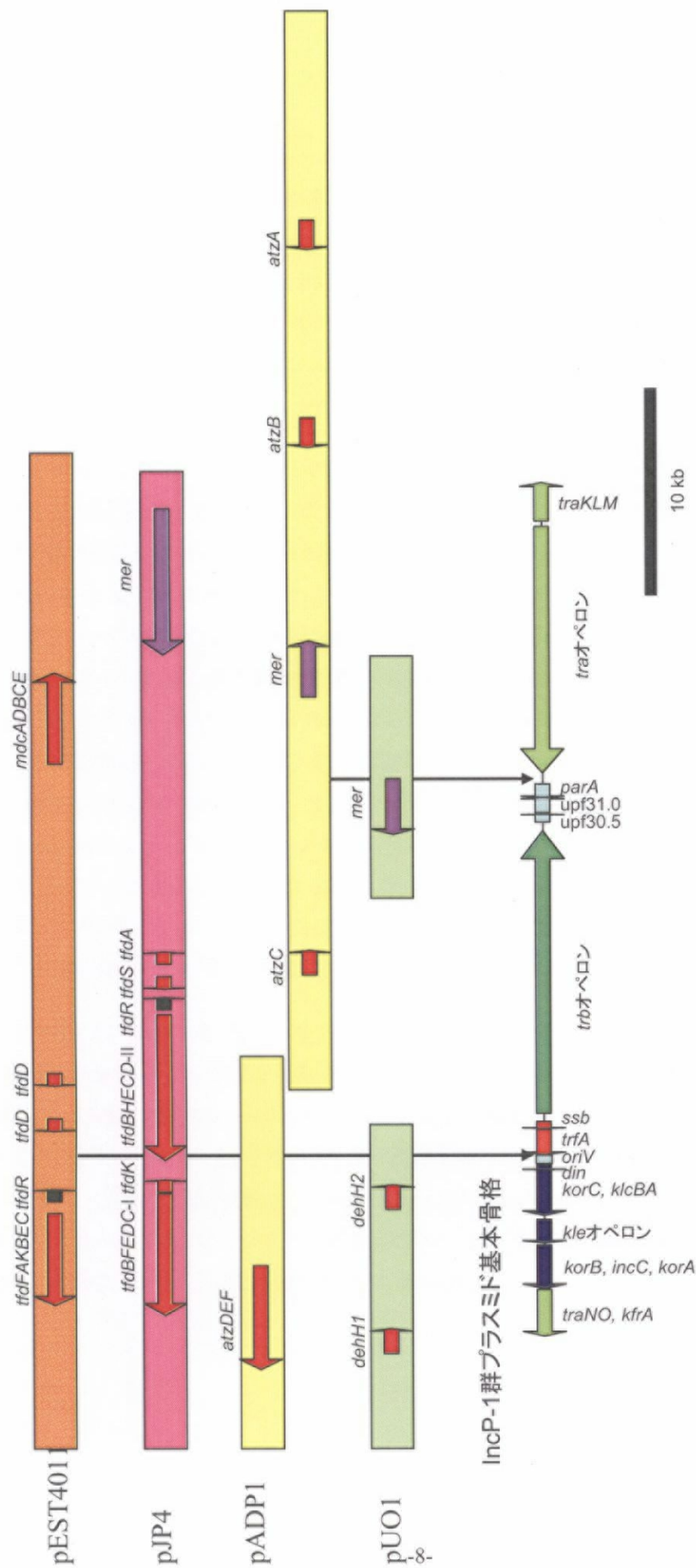


図1-3. IncP-1群の基本骨格.

これまでに全塩基配列情報が報告されたIncP-1群に属する分解プラスミド (4種) とその基本骨格、各プラスミド上の分解系遺伝子群を赤色の矢印で、その転写制御因子を黒色の矢印で示した。水銀耐性に関与する遺伝子群を紫色の矢印で示した。分解系遺伝子群はそれぞれ*oriV-trfA*の間と*tra-trb*オペロンの間に挿入されている。

その分解反応系はトルエン・キシレンから安息香酸までの上流経路と、安息香酸以降の下流経路に分けられるが、それぞれの酵素遺伝子群 (*xyl* 遺伝子群) も2つのオペロンから構成され、それぞれ異なる転写制御を受けることが明らかになっている (Williams *et al.*, 2004). また, pWW0 上において, 上記の *xyl* 遺伝子群はトランスポゾン Tn4651, および Tn4653 含まれる形で存在している(図 1-4). これらは複製的転移を生じるクラスIIトランスポゾンで, 転移の前後でそのコピー数が2倍になることから, 分解系遺伝子群のレプリコン間の伝播に重要な役割を果たし得ることが実験的に証明されている (Tsuda and Iino, 1987, 1988, Tsuda *et al.*, 1989).

IncP-9 群プラスミドは, 大腸菌内で複製されるが, 温度によっては不安定であることや, 自己伝達性を有することが知られていたが (Thomas and Haines, 2004), その基本骨格や, 基本機能についての遺伝子解析は最近まで報告されていなかった. しかし, 2002 年に pWW0 の, 2004 年に *Pseudomonas* sp. NCBI9816-4 株由来のナフトレン分解プラスミド pDTG1 の全塩基配列が解読され, 遺伝子レベルの解析が進んだ (Greated *et al.*, 2002, Dennis and Zylstra, 2004). さらに未発表であるが, *P. putida* G7 株由来のナフトレン分解プラスミド NAH7 についても配列が決定され, IncP-9 群プラスミドにおいて分解系遺伝子群が基本骨格(およそ 40 kb)の異なる位置に挿入されていることが判明した(図 1-4; 津田・曾田, 2005). 最近 IncP-9 群プラスミドは *Pseudomonas* 属細菌と大腸菌とを宿主にした場合において, その複製に必要な遺伝子領域が異なることが報告された (Sevastyanovich *et al.*, 2005). また pWW0 の接合伝達に寄与する一連のタンパク質は, *tra/impf* オペロン上にコードされること, またその転写解析についても報告された (Lambersten *et al.*, 2004). IncP-1 群プラスミドに比べると, いずれもまだ詳細は解明されていないが, 今後さらに IncP-9 群プラスミドの基本機能について明らかになると考えられる.

以上のように IncP-1 群, IncP-9 群については比較的詳細に研究され, 現在この2つのグループに属する分解プラスミドの性質を予測することは難しくない. 一方 IncP-2 群の分解プラスミドにおいては, その分解系酵素をコードする遺伝子群については解析がなされているが (Tan, 1999), プラスミド自体が巨大(約 500 kb)でその物理的単離が困難あることや, *Pseudomonas* 属細菌に宿主域が限られ, 大腸菌では複製されない (Bryan *et al.*, 1974, Jacoby *et al.*, 1983) ことなどから, その基本骨格を含む全体構造についての解析は未だない. また, 属する不和合性群やその基本骨格構造と基本機能について不明な分解プラスミドも多い(表 1-1).

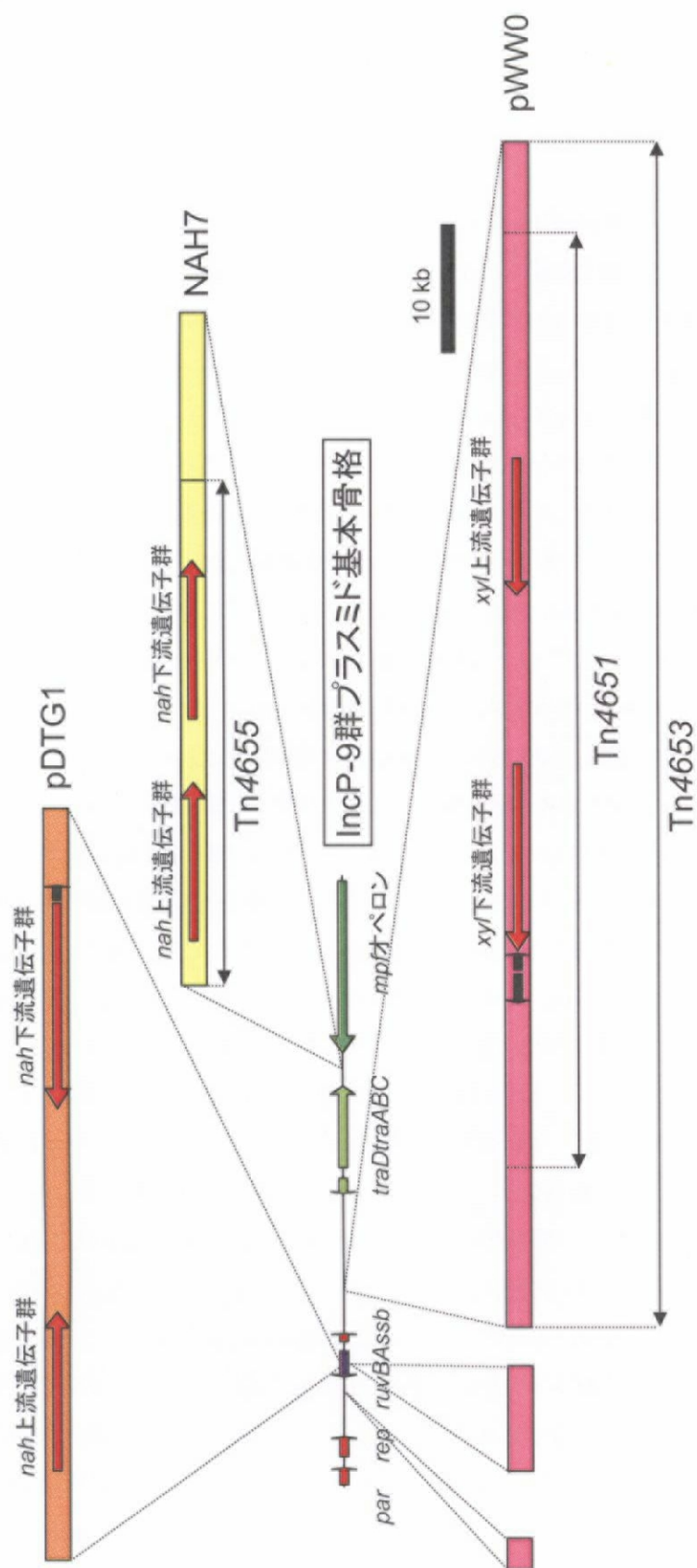


図1-4. IncP-9群の基本骨格.

これまでに全塩基配列情報が報告されたIncP-9群に属する分解プラスミド (3種, NAH7は未発表) とその基本骨格, 各プラスミド上の分解系遺伝子群を赤色の矢印で, その転写制御因子を黒色の矢印で示した. また, pWW0とNAH7上から見出されたクラスIIトランスポゾンを両向きの矢印で示した. (津田・曾田ら, 2005より一部改変)

カルバゾール分解プラスミド pCAR1

1993 年, 当研究グループの Ouchiyama らによって環境汚染物質の一つであるカルバゾール (CAR) を唯一の炭素源・窒素源・エネルギー源として資化できる *Pseudomonas resinovorans* CA10 株が単離された (Ouchiyama *et al.*, 1993). CA10 株は図 1-5 に示す経路で CAR を代謝し, それぞれの変換反応を担う一連の酵素遺伝子群は *carAaAaBaBbCAcAdDFE* (*carAa* は重複している) からなる *car* オペロン上にコードされている (Sato *et al.*, 1997ab). その初発酸化反応は CAR の窒素原子に結合している炭素原子と, その隣の炭素原子にそれぞれ水酸基が導入されることで生じるが, このような反応を触媒する酸化酵素は非常に珍しく, その新規性が高い (Nojiri and Omori, 2002). 最近, X 線結晶構造解析によって一連の酵素群の立体構造が決定され, その構造と機能の相関について解明されつつある (Habe *et al.*, 2003, Ashikawa *et al.*, 2005, Nojiri and Ashikawa *et al.*, 2005). また *car* オペロンの転写調節機構についても研究が精力的になされており, CA10 株において *car* オペロンは AntR によって制御され, そのエフェクター分子が CAR の代謝中間産物, アントラニル酸であることが判明した (Urata *et al.*, 2004). 以上のように CAR 分解系とそれを触媒する酵素および酵素遺伝子群については詳細に解析されてきた.

一方, CA10 株以外の CAR 分解菌の解析により, CA10 株の *car* 遺伝子ホモログが, 異なる土地由来の様々な CAR 分解菌に存在することが判明した (Inoue *et al.*, 2004, 2005). これは *car* 遺伝子群も可動性遺伝因子を介して水平伝播することを示唆する. 実際, *car* 遺伝子群がプラスミド (pCAR1 と命名) 上に局在することが判明した (Nojiri *et al.*, 2001).

以上のような背景に基づき, 本研究では pCAR1 全体の遺伝子構造を明らかにし, pCAR1 の基本機能 (複製・保持能, 接合伝達能) について遺伝子レベルで解析するとともに, pCAR1 の可動性遺伝因子としての機能について分子遺伝学手法を用いて解析することにした. まず 199,035 塩基対からなる全塩基配列を共同作業により解読し, その解析を行った (2章). 塩基配列の情報から pCAR1 が IncP-1 群や IncP-9 群とは異なる不和合性群に属することが示唆された. そこで pCAR1 の不和合性群を決定するために, まず pCAR1 の複製や保持に必要な遺伝子と DNA 領域の決定を試みた. その後, 既知の IncP 群のプラスミドと不和合性試験を行い, pCAR1 の不和合性群を決定した (2章). また, pCAR1 上から *car* 遺伝子群を水平伝播させる可動性遺伝因子として機能し得る遺伝子構造が複数見出された. そこで, 各 CAR 分解菌の *car* 遺伝子群周辺領域の解析を行うとともに, 可動性遺伝因子としての pCAR1 の機能を実験的に検証した (3章). さらに塩基配列の解析から, pCAR1 の安定な保持には, 既知の IncP 群プラスミドとは異なる遺伝子産物が関与することが示唆されたため, その保持機構について解析を行った (4章).

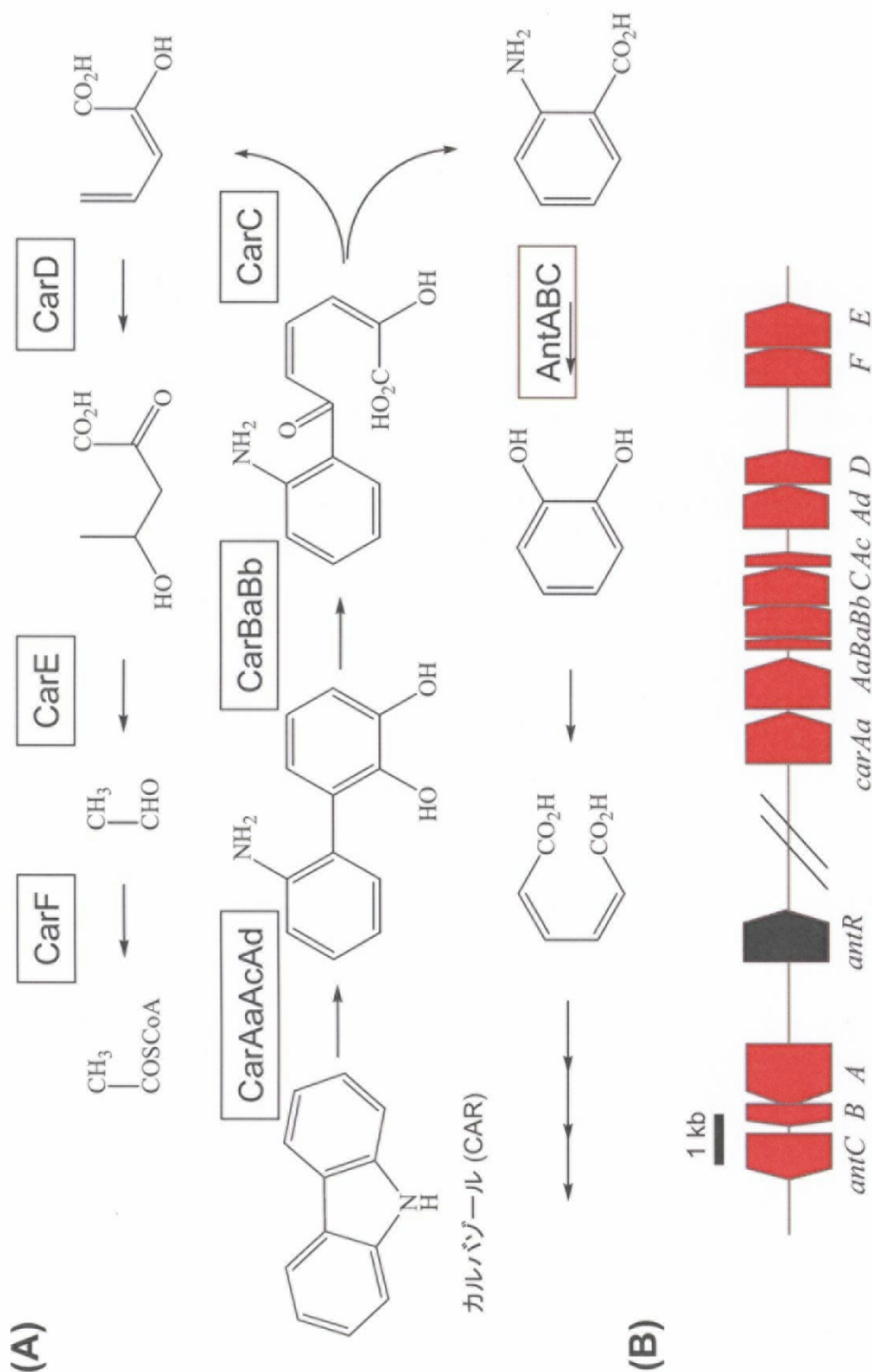


図1-5. *Pseudomonas resinovorans* CA10株のカルバゾール代謝系.

(A) CA10株のカルバゾール(CAR)代謝経路と触媒する酵素群.

(B) CA10株のCAR代謝を触媒する酵素遺伝子群. *antR*は*ant*遺伝子群, *car*遺伝子群の転写制御因子*AntR*をコードする.

近年、大量の塩基配列情報の蓄積と、データの統計処理能力の向上によって、マイクロアレイによる遺伝子の転写解析が有効な方法として確立しつつある。マイクロアレイ解析の利点としては、異なる条件下における細菌の全遺伝子の増減が同時に観察できる点であり、実際、ゲノムの全塩基配列が既に決定された様々な細菌におけるマイクロアレイ解析が報告されている (Khodursky *et al.*, 2000, Deneff *et al.*, 2004, Goodman and Lory, 2004, Pappas *et al.*, 2004, Zhou *et al.*, 2004, Kang *et al.*, 2005, Yuste *et al.*, 2006). 上述してきたプラスミドの基本機能(複製能, 保持能, 接合伝達能)は、宿主染色体からの産物と何らかの(相互)作用によって制御されていると考えられる。また IncP-1 群, IncP-9 群プラスミドでも報告されているように、宿主の変化に応じて必要となる遺伝子領域が異なることが考えられる。こうしたプラスミドと宿主染色体産物の関係に着目し、様々な宿主において pCAR1 と染色体上の全遺伝子がどのような協調的発現をするのか網羅的に解析することを最終目的として、マイクロアレイ解析を開始した。本研究ではその第一歩として pCAR1 をゲノム配列が解読済みの *P. putida* KT2440 株に接合伝達させた KT2440(pCAR1)株を対象として、マイクロアレイ解析を行った。(5章)

第2章 pCAR1 の全塩基配列の決定および不和合性群の決定

2-1 緒言

本章ではまず pCAR1 の全塩基配列を決定し, その解析を共同作業により行った. プラスミドは複製・保持機構の類似性によって分類されるが, pCAR1 は既知のプラスミドとは類似性が低く, 新規な不和合性群に属することが示唆された. そこでまず, *Pseudomonas* 属細菌内で pCAR1 が複製するために必要な DNA 領域を実験的に決定した. その後, 複製に必要な遺伝子断片を用いて, pCAR1 のミニレプリコンを構築し, その不和合性群の決定を試みた.

2-2 結果

2-2-1 pCAR1 の全塩基配列の解読と相同性検索による解析

P. resinovorans CA10 株よりプラスミド pCAR1 を抽出し、その 199,035 bp の塩基配列をドラゴンジェノミクス社に委託して決定した。得られた塩基配列の解析を共同作業により行い、全 190 個の読み枠 (open reading frame; ORF) を見出した。pCAR1 全体の遺伝子構造を図 2-1 に示した。その塩基配列の解析によって明らかになった、特にプラスミドの基本骨格と推定される領域について注目すべき事実を以下に3つ挙げた。

- ① 複製・保持に関すると推定された遺伝子および DNA 領域は、既知のプラスミドの対応する領域との相同性が低く、塩基配列の未知な不和合性群に属する可能性が示唆された(図 2-1)。
- ② *car* 遺伝子群が 72.8-kb からなるクラス II トランスポゾン様因子(暫定的に Tn4676 と命名)に含まれる形でプラスミド上に存在していた(図 2-1)。
- ③ pCAR1 は接合伝達に必要なと推定される一連の *tra/trh* 遺伝子群を有することから、接合伝達性プラスミドであることが示唆された(図 2-1)。

各 ORF の相同性検索の結果、およびその他の領域の解析結果については共著論文として Maeda *et al.*, 2003 に掲載した。また、上の3点については以下各章でさらに詳細について述べることにする。

2-2-2 pCAR1 の複製に関与すると推定される遺伝子領域

pCAR1 上から複製開始タンパク質をコードすると推定された ORF は *repA* のみであり(図 2-2)、その産物は *P. fluorescens* L6.5 株由来のプラスミド pL6.5 の RepA と高い相同性を示した(アミノ酸レベルで 98%)。また *repA* 開始コドンの直上流に存在する推定複製開始点 *oriV* (Maeda *et al.*, 2003 の論文では *oriP* としたが、今後より一般的な *oriV* と改名した)の周辺配列も、登録された pL6.5 と高い相同性を示した(塩基配列レベルで 98%)。しかし、pL6.5 に関してはこれらの塩基配列が登録されているのみで、その機能について実験的な裏付けはなされておらず、また文献として発表もされていなかった (GenBank/EMBL/DBJ accession no. AJ250853)。一方、複製能が実験的に検証された既知のプラスミドのうち、最も高い相同性を示したものは、*P. syringae* pv. *savastanoi* PS93 株由来の pPS10 の RepA であったが(アミノ酸レベルで 39%)、pCAR1 上の *repA* の周囲には、他にもプラスミドや染色体の複製・分配に関与する遺伝子と相同性を示す ORF が数多く見出され、どの遺伝子が複製に必要なのか不明であった(図 2-2 参照)。

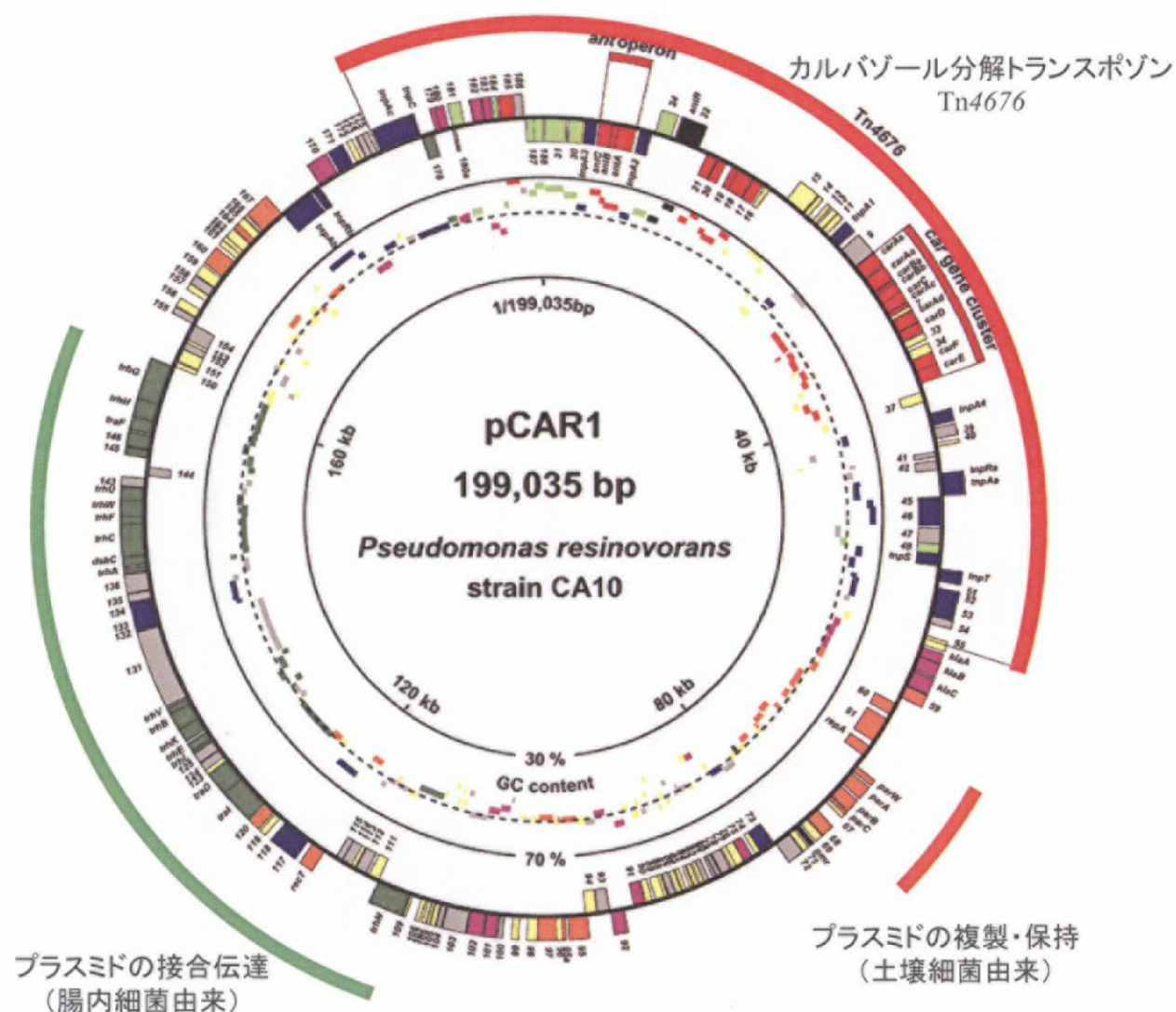


図2-1. カルバゾール分解プラスミドpCAR1の全遺伝子構造.

見出された読み枠 (open reading frame; ORF) を最も外の円上にその転写方向に応じて示した (外側の扇型が時計回り、内側の扇形が反時計回りに転写方向を有する)。各ORFは相同性を示したタンパク質の機能の種類によって色分けした (赤色: 分解系遺伝子群、橙色: プラスミドの複製・保持、緑色: プラスミドの接合伝達、黄緑色: 輸送タンパク・膜タンパク質、桃色: その他の機能、青色: 転移因子・挿入因子、灰色: 既知の機能未知のタンパクと相同性を示すORF、および黄色: 既知のタンパクと相同性を示さないORF)。内側の円は各ORFのGC含量を示す。また、Tn4676の位置を外側の青色の扇形で、プラスミドの複製・保持に必要な領域を橙色の扇形で、接合伝達に関与するtra/trh遺伝子の存在する領域を緑色の扇形で表した。



-17-

そこで、次節で pCAR1 の複製に必要な領域について決定した。

2-2-3 pCAR1 の複製に必要な領域の絞込み

まず pCAR1 の複製に必要な DNA 領域を絞りこむために、図 2-2 に示す DNA 断片をカナマイシン (Km) 耐性遺伝子とともに pUC ベクターに挿入した一連のプラスミド (pUCARori001~pUCARori008) を構築した。これらを、他にプラスミドを持たない *P. putida* DS1 株内にエレクトロポレーションで挿入し、形質転換株が現れるかどうか調べ、その複製能を確かめた。pUC ベクターの有する複製機構 (pMB9) は *Pseudomonas* 属内では機能せず、複製されないことはあらかじめ確かめた (結果は示さない)。その結果、図 2-2 に示す pUCARori001, pUCARori002, pUCARori004, pUCARori005 および pUCARori008 のプラスミドについてのみ複製が認められた (形質転換頻度は約 $10^2/\mu\text{g}$ DNA)。さらに pUCARori004 および pUCARori006~pUCARori008 については、pUC ベクター部分を除去したミニプラスミドを構築し (図 2-2, pCARori004, pUCARori006~pUCARori008), 同様の実験を行った。その結果、pCARori004 と pCARori008 についてのみ複製が認められた (図 2-2, 形質転換頻度は約 $10^2/\mu\text{g}$ DNA)。従って pCARori008 が複製に必要な領域を含む pCAR1 のミニレプリコンとして機能することが示された。以上の結果、pCAR1 の複製に必要なプラスミド上の因子は RepA と *oriV* 領域であることが示唆された。

2-2-4 repA と oriV の詳細な解析

前節の結果から、RepA がタンパク質として機能することを確認するため、RepA を *oriV* に対して *trans* に与えた際にも複製が生じるかどうかを調べた。RepA の発現用プラスミドとして、*repA* を広宿主域ベクター pBBR1MCS-5 の *lac* プロモーター下流に挿入した pBBRrepA を構築した。一方、RepA による複製を確認するためのプラスミドとしては、*repA* 開始コドン上流約 1 kb の DNA 断片と Km 耐性遺伝子を挿入した pTCARoriV01 を構築した (図 2-3)。このプラスミドを *P. putida* DS1 株に単独に与えても複製は認められなかった (結果は示さない)。しかし、DS1(pBBRrepA) 株 (pBBRrepA を保持する DS1 株) 内においてはその複製が認められた (形質転換頻度は約 $10^2/\mu\text{g}$ DNA)。また、このプラスミドが pBBR1MCS-5 ベクターのみを有する DS1 株内では複製されないことを確かめた。 (結果は示さない)。さらに、その複製が IPTG 添加の有無に依らないことも確かめた (結果は示さない)。従って、RepA を *oriV* に対して *trans* に与えた場合にも複製されることが明らかになった。

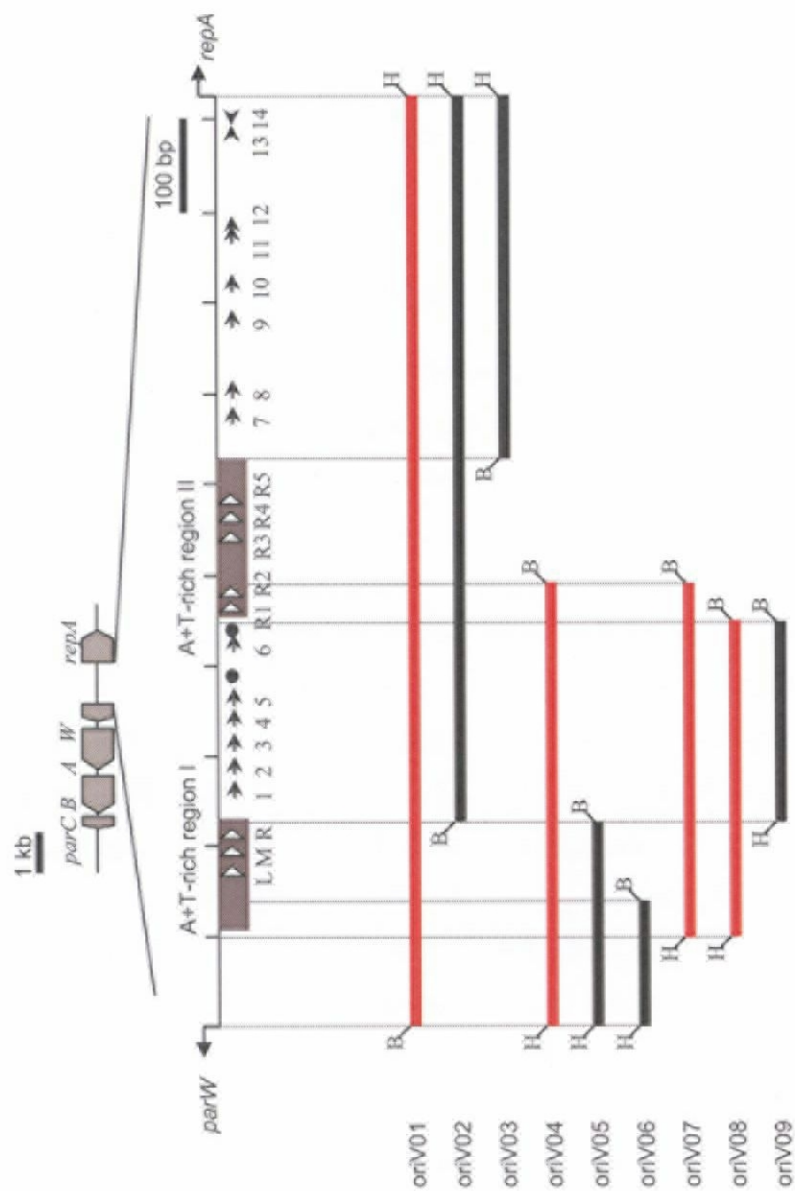


図2-3. pCAR1のoriV領域

pCAR1のrepA上流の遺伝子地図とoriV領域の拡大図。灰色の四角はA+T-rich領域を、三角は12-bpの繰り返し配列を示す（詳細は図2-5）。また、黒丸は推定DnaA boxを示す、pCAR1のoriV領域の絞込みに用いたDNA断片を太線で示した。このうち、*P. putida* DSI(pBBRrepA)株内で複製が認められた断片を赤色で示した。各断片に人為的に付加した制限酵素サイトをB (*Bam*HI) およびH (*Hind*III) で示した。

複製に必要な *oriV* 領域をさらに絞り込むために、図 2-3 に示す DNA 断片を PCR によって増幅後、pT7Blue T-vector に Km 耐性遺伝子とともに挿入して pTCARoriV02~pTCARoriV09 を構築し、同様に DS1 (pBBRrepA) 株に挿入して、これらのプラスミドが複製されるかどうかを確かめた (図 2-3)。その結果、pTCARoriV04, pTCARoriV07 および pTCARoriV08 の複製が認められた。このことは、pCAR1 の複製に必要な *oriV* が図 2-3 に示す 345 bp 内部に存在することを示唆する。

以上より、*repA* が *oriV* からの複製を促すタンパク質をコードすることが示され、また *P. putida* 内においては *trans* に供給できることが明らかになった。

2-2-5 pCAR1 の不和合性群の決定

pCAR1 の塩基配列から不和合性群を推定できないため、不和合性試験を実験的に行った。pCAR1 が *Pseudomonas* 属細菌由来のプラスミドであることを考慮し、既知の IncP 群プラスミド (表 2-1 参照) を有する宿主 (*P. aeruginosa* PA1808 株) 内で実験的に不和合性テストを行った。宿主が Km に対して自然耐性能を有するため、上述した pUCAori004 上の Km 耐性遺伝子をゲンタマイシン (Gm) およびテトラサイクリン (Tc) 耐性遺伝子と入れ替えた pUCAori004Gm, pUCAori004Tc を構築した。これらを、IncP 群プラスミドの宿主に対してエレクトロポレーションで挿入後、双方のプラスミドが有する選択マーカーを含む培地 (例えば RP4 に対しては Tc と Gm を含む培地) に塗布して、形質転換株が現れるかどうか確かめた。その結果、IncP-1, IncP-2, IncP-3, IncP-4, IncP-5, IncP-6, IncP-9, IncP-12, および IncP-13 群プラスミドの宿主に対してはおおよそ $10^2/\mu\text{g}$ DNA の頻度で形質転換株が得られたが、Rms148 (IncP-7, 選択マーカーは Sm 耐性能) の宿主に対しては検出できなかった ($10^{-1}/\mu\text{g}$ DNA 以下)。次に Rms148 の宿主に pUCAori004Gm をエレクトロポレーションで挿入した後、Gm のみを含む培地に塗布した。その結果、頻度は低いものの形質転換株を得ることができた (形質転換頻度は約 $10^{-1}/\mu\text{g}$ DNA)。得られた形質転換株を、Gm を含む LB 液体培地で培養後、さらに Sm 耐性能を調べたところ、その耐性能が失われていた。このことは Rms148 が宿主より脱落したことを示唆する。一方、pCAR1 (選択マーカーは CAR 代謝能) を有する *P. putida* KT2440RG (pCAR1) 株 (pCAR1 を保持し、宿主の染色体内に Gm 耐性遺伝子を挿入した株) に対して Rms148 を接合伝達させ、Sm と Gm のみを含む培地に塗布したところ、接合形質転換株が得られた (供与菌あたり 10^{-5} の頻度)。この接合形質転換株を Sm と Gm を含む液体培地で培養後、CAR 代謝能を調べたところ、その代謝能が失われていた。このことは pCAR1 が宿主から脱落したことを示唆する。以上の結果は、pCAR1 が IncP-7 群に属することを示唆している。

表 2-1. IncP 群プラスミドと pCAR1 との不和合性群テストの結果

| 不和合性群 | プラスミド | 選択マーカー | pUCARori004 との不和合性 | 文献 |
|-------|--------|--------------------|-----------------------|--|
| P-1 | RP4 | Cb, Km, Tc | + | Pansagerau <i>et al.</i> , 1994 |
| P-2 | Rms139 | Cb, Cm, Sm, Tc | + | Sawada <i>et al.</i> , 1976 |
| P-3 | RIP64 | Cb, Cm, Gm | + | Jacoby, 1974 |
| P-4 | R679 | Sm | + | Bryan <i>et al.</i> , 1972 |
| P-5 | Rms163 | Cm, Tc | + | Sagai <i>et al.</i> , 1976; Summers and Jacoby, 1978 |
| P-6 | Rms149 | Cb, Gm, Sm | + | Hedges and Jacoby, 1980; Haines <i>et al.</i> , 2005 |
| P-7 | Rms148 | Sm | - | Sagai <i>et al.</i> , 1976 |
| P-9 | Rsu2 | Cb, Sm | + | Hedges and Jacob, 1975 |
| P-12 | R716 | Sm | + | Bryan <i>et al.</i> , 1973 |
| P-13 | pMG25 | Cb, Cm, Km, Gm, Sm | + | Jacoby, 1986 |

Cb, carbenicilin; Cm, chloramphenicol; Gm, gentamicin; Km, kanamycin; Sm, streptomycin; Tc, tetracycline.

さらに, IncP-8 群 (Fp2, Pemberton and Clark, 1972) および IncP-11 群 (RP1-1, Ingram *et al.*, 1972) プラスミドを加えた 12 のプラスミドの宿主より, それぞれ全 DNA を抽出し, *Hind*III で処理を行って電気泳動後, *repA* と *oriV* を含む 1.3-kb の *Hind*III-*Xba*I 断片をプローブとしてサザン解析を行った. その結果, Rms148 もつ宿主の全 DNA にのみシグナルが認められた (図 2-4). 以上のことから, pCAR1 が IncP-7 群に属するプラスミドであることが示された.

2-2-6 pCAR1 の *Pseudomonas* 以外の宿主における複製能

IncP-7 群プラスミドの複製における宿主域についての報告がこれまで全く無いことから, *Pseudomonas* 属以外の細菌を宿主にできるかどうか試みた. まず, Proteobacteria の異なるサブグループ (β -サブグループ) に属する *Burkholderia* 属細菌 PJ310 株や *Comamonas testosteroni* IAM12419 株について対し pCAR1 のミニレプリコンをエレクトロポレーションによって挿入した. ここで, PJ310 株は Cm に, IAM12419 株は Tc に対してそれぞれ感受性であるため, ミニプラスミド pUCAori004TcCm を構築し, エレクトロポレーションによってそれぞれの菌株に挿入した. 対照実験には広宿主域ベクター pBBR1MCS3 (Tc 耐性, Alexeyev *et al.*, 1995) に Cm 耐性遺伝子を挿入した pBBR1MCS3Cm を用いた. その結果, 広宿主域ベクターである pBBR1 ベクターを挿入した場合は形質転換株が得られた ($10^2/\mu\text{g}$ DNA) が, pCAR1 のミニプラスミドを用いた場合は得られなかった ($10^{-2}/\mu\text{g}$ DNA 以下). また *Pseudomonas* と同じ γ -proteobacteria に属する大腸菌 (*E. coli* DH5 α 株および JM109 株) に対して, pCARori005 を用いて同様の実験を行ったが形質転換株を得ることはできなかった ($10^{-2}/\mu\text{g}$ DNA 以下).

以上のことから, pCAR1 が上の 3 株内で複製されないことが示唆された. (なお, 以上の結果は 4 章の結果の一部と合わせて Shintani *et al.*, in press にまとめて発表した)

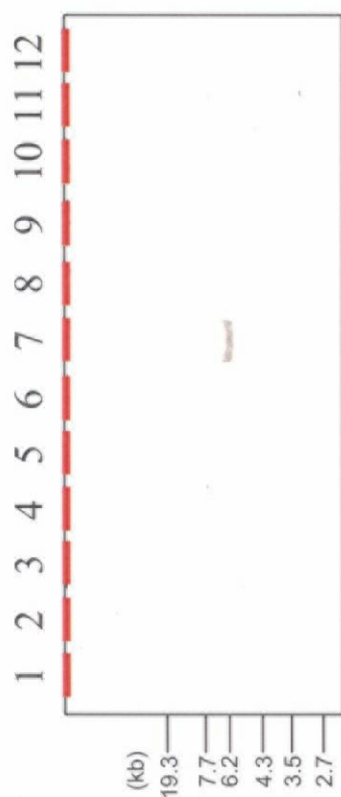


図2-4. pCAR1のrepAをプローブとしたIncP群プラスミドに対するサザン解析.

プローブは pUCARori006の1.7-kb *Hind*III-*Xba*I断片 (*repA*を含む) より作製した. このプローブを用いてIncP-1~IncP-13 (IncP-10を除く) 群プラスミドの宿主から全DNAを抽出し, *Hind*III処理した後, 電気泳動したものに対してサザン解析を行った. なおIncP-8群プラスミドとしてFp2を, IncP-11群プラスミドとしてRP1-1を用いた. レーン1から順にIncP-1, IncP-2~IncP-9, IncP-11~IncP-13.

2-3 考察

本章では、共同作業によって pCAR1 の全塩基配列を決定し、その 190 個の ORF について解析を行った。その結果、プラスミドの基本機能を担う領域を見出した。塩基配列情報に基づいて推定された pCAR1 の複製に必要な領域を実験的に決定することに成功し、また pCAR1 の属する不和合性群が IncP-7 群であることも実験的に示した。pCAR1 の RepA と高い相同性を示す複製開始タンパク質を有するプラスミドは、上で述べた pL6.5 の他に pND6-1 (98%; Li *et al.*, 2004), pWW53 (95%; Keil *et al.*, 1985, Yano and Tsuda, unpublished data) が報告されており、これらのプラスミドは pCAR1 同様に IncP-7 群に属することが推定される。

また先に述べたように、pCAR1 の RepA は pPS10 の RepA とも相同性を示すが、pPS10 の RepA については酵素学的・生化学的に詳細な解析がされている。pPS10 は宿主域の狭いプラスミドとして知られており *P. aeruginosa* および *P. putida* 内での複製は認められているが、*Agrobacterium tumefaciens* 内では複製されない (Giraldo and Fernández-Tresguerres, 2004)。こうしたプラスミドが大腸菌内で複製できれば、様々な研究が行いやすくなることから、大腸菌内での複製の可否は重要な情報である。pPS10 の場合、*E. coli* 内での複製は温度感受性であり、30℃では複製がなされるが、37℃においてはその効率が低下し、42℃では全く複製されなくなることが知られている (Giraldo and Fernández-Tresguerres, 2004)。pCAR1 のミニレプリコンについて同様に調べたところ、培養温度を 30℃にしても大腸菌内では複製されなかった(結果は示さない)。

一方 IncP-9 群プラスミド pMT2 の場合、*Pseudomonas* 属細菌内においては、複製開始タンパク Rep と *oriV* が複製に必要であるが、大腸菌内では *rep-oriV* のみでは十分でない。これは大腸菌内では pMT2 の *rep* 遺伝子上流のプロモーター活性が弱く、十分量の Rep を発現しないためであり、実際に Rep を発現ベクターから *trans* に供給すると、大腸菌においても複製が可能となる (Sevastyanovich *et al.*, 2005)。そこで、pCAR1 についても pBRrepA を保持する大腸菌 JM109 株を調製し、IPTG 存在下において pCAR1 ミニプラスミドの複製の可否を確かめた。しかし、その複製は認められなかった。このことから pCAR1 の大腸菌における複製は、単純に RepA の発現量だけの問題ではない可能性がある。

pPS10 の RepA は、多くのプラスミドと同様 (Krüger *et al.*, 2004)、その *oriV* 領域の繰り返し配列、*iteron* に結合することが報告されている (Giraldo and Fernández-Tresguerres, 2004)。また、*oriV* 領域からは A+T-または G+C-rich な領域が見出され、2コピーの 11 bp からなる繰り返し配列 [11-mers; 5'-TTT (T/C) TTGTTTT-3'] が A+T-rich 領域に存在する(図 2-5, Nieto *et al.*, 1992)。

また、宿主因子の1つである DnaA の結合サイト、DnaA box も *oriV* 領域に存在する(図 2-5, Giraldo and Fernández-Tresguerres, 2004)。

pCAR1 の場合、2つの A+T-rich 領域が存在し(図 2-5 中 regions I and II), 3コピーの 12-bp からなる繰り返し配列が A+T-rich region I 内に、5コピーが region II 内部に存在していた(図 2-5)。これらの配列は、大腸菌の染色体の複製開始点 *oriC* に存在する3コピーの繰り返し配列 (13 mer と呼ばれる。配列は 5'-GATCTNTTNTTTT-3') とよく似ていた(図 2-5, Shaper and Messer, 1995)。そこで pCAR1 より見出された 12 bp の繰り返し配列をそれぞれ 12-mer L, M, and R, and 12-mer R1-R5 と命名した(図 2-5)。さらに2つの DnaA box と推定される配列が見出され (5'-TTATCCACA-3'および 5'-TTGTGCACG-3'), 特に前者の配列は大腸菌の *oriC* 上の配列と完全に一致していた(図 2-5, Bramhill and Kornberg, 1988)。また、14-コピーの 18-bp からなる繰り返し配列が存在していた(図 2-5)。これらの塩基配列は、既知の iteron との相同性が全くないが (Krüger *et al.*, 2004), A+T-rich 領域と DnaA box の位置関係を他のプラスミドと比較し、これらの 18-bp の繰り返し配列を pCAR1 の iteron と命名した(図 2-5)。本章の実験の結果、これらの配列を有する *oriV* に対し、RepA を *trans* に供給しても複製が可能であったことから、*oriV* 領域を RepA が認識して複製が開始されることが示唆された。また、複製に必要な領域を 345 bp にまで絞り込むことができたことから、12-mer L, M, R, R1 および R2 と、iteron 1-6, さらに2つの DnaA box が pCAR1 の複製に重要であることが示唆された(図 2-3, 2-5)。これらの配列は pND6-1, pWW53, および pL6.5 においても保存されており(図 2-6, Yano and Tsuda, unpublished data) IncP-7 群プラスミドの *oriV* に特徴的な配列であることが考えられる。

今後、さらに IncP-7 の複製機構について理解するために、RepA の発現系と精製法を確立して、*in vitro* における RepA と *oriV* の結合を確かめる実験や、あるいは RepA がどの配列を認識して結合するのか、*oriV* 配列に人為的に変異を入れて複製の可否を確かめるなど、より酵素学的な解析が必要であろう。

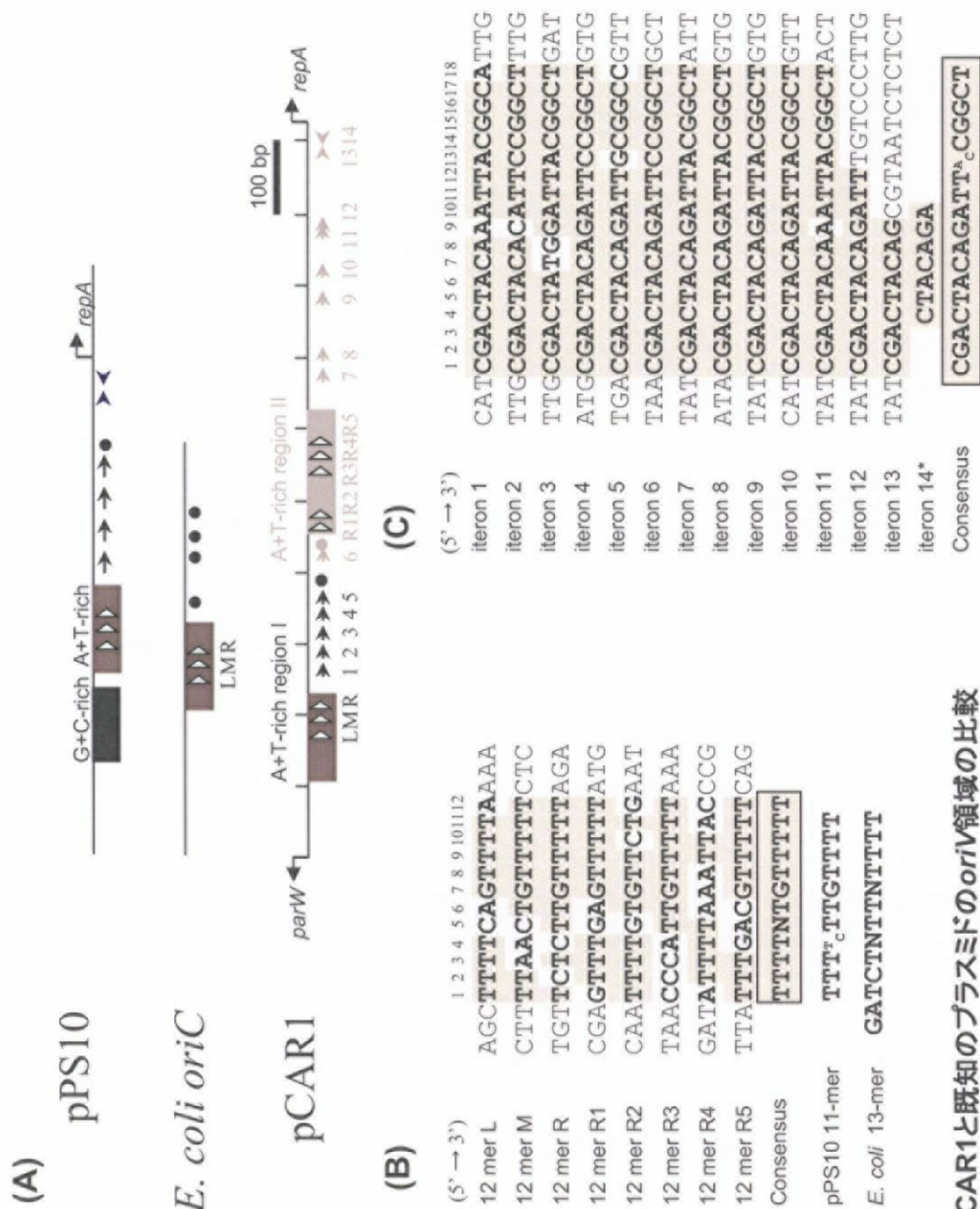


図2-5. pCAR1と既知のプラスミドのoriV領域の比較

(A) pCAR1とpPS10 および大腸菌の染色体のoriCの模式図。図中の記号は図2-2と同じく、灰色の四角はA+T-rich領域を、三角は12-bpの繰り返し配列を示す。矢印はiteronを示す。また、黒丸は推定DnaA boxを示す。pPS10の青色の領域は、逆向き繰り返し配列を示す。また、pCAR1において、複製に必要な領域を濃い灰色で、そうでない領域を薄い灰色で示した。

(B) pCAR1のoriVに見出された12 bpの繰り返し配列(12 mer と命名)とpPS10の11-mer、および大腸菌の13-mer配列との比較。保存された塩基を灰色で示した。

(C) pCAR1のoriVに存在するiteron配列。アスタリスクはiteron14が逆向きであることを示す。保存された配列をコンセンサス配列として示した。

