

第3章 可動性遺伝因子としての pCAR1 の機能解析

3-1 緒言

pCAR1 上から、接合伝達に関与すると推定される *tra/trh* 遺伝子群が見出され、さらに *car* 遺伝子群を有する 72.8-kb のクラス II 型トランスポゾン Tn4676 の存在が明らかになった。このことは、*car* 遺伝子群が pCAR1 と Tn4676 という2つの機構によって水平伝播し得ることを示唆する。一方、様々な CAR 分解菌より CA10 株の *car* 遺伝子群ホモログが見出された (Inoue *et al.*, 2004, 2005)。このように相同性の高い遺伝子群が異なる細菌から見出される場合、水平伝播によって獲得するケースが多いと考えられる。本章では各菌株が pCAR1 や Tn4676 の水平伝播によって *car* 遺伝子群を獲得したのではないかという仮説に基づき、各菌株の *car* 遺伝子群の周辺領域を pCAR1 の遺伝子構造と比較した。また Tn4676 の転移能と pCAR1 の接合伝達能について実験的に検証した。

3-2 結果

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

pCAR1 上からは、pWW0 上のクラス II トランスポゾン Tn4651 の転移に必要な遺伝子群が見出され、その構造も類似していた(図 3-1)。また、pCAR1 上には Tn4651 の転移酵素 TnpA が認識する逆向き繰り返し配列 (inverted repeat, IR) と類似の配列が複数見出され、IR-a~IR-f と命名した(図 3-1)。そこで暫定的に最も広い DNA 領域(IR-a から IR-f を両端とする領域)を Tn4676 と命名した。Tn4676 はその構造の類似性、構成する酵素の相同性から Tn3 ファミリー、Tn4652 サブファミリー (Grindely, 2002) に属するクラス II トランスポゾンとして機能することが推定された。さらに、いずれも転移能は失われていると予想されたが、pWW0 上のトランスポゾン Tn4653 の転移酵素 TnpA と解離酵素 TnpR をコードする遺伝子が Tn4676 付近より見出された(図 3-1A)。

また、接合伝達に関与すると推定される遺伝子群 (*tra/trh* 遺伝子群) が見出された(図 3-1B)。これらの遺伝子産物は、接合伝達性のゲノミックアイランド SXT 上の *tra* 遺伝子産物 (Beaber *et al.*, 2002, 2004) とアミノ酸レベルで 30-50%の相同性を示した。また *tra/trh* 遺伝子群には、SXT において接合伝達に必要なことが実験的に示された一連の遺伝子が揃っていた(図 3-1)。このことは、pCAR1 が接合伝達性のプラスミドであることを示唆する。

3-2-2 *car* 遺伝子群ホモログを有する CAR 分解菌の解析

本研究では CA10 株の *car* 遺伝子群ホモログを有する *Novosphingobium* 属細菌 J30 株、*Pseudomonas* 属細菌 K15, K22 および K23 株と、*P. resinovorans* CA06 株および *P. stutzeri* OM1 株を対象として遺伝子解析を行った(図 3-2A)。また、K23 株と *P. putida* DS1 株の接合によって得られた *P. putida* HS01 株(詳細については Shintani *et al.*, 2005b 参照)についても解析を行った。まず、各 CAR 分解菌を Ka and Tiedje (1994) の方法を用いて溶解させ、電気泳動に供した。その後 *carAaAaBbBcCAcAd* 遺伝子より作製したプローブ(以下 *car* プローブ、*carAa* は重複している)を用いてサザン解析を行った。その結果、K15, K22 と K23 株および OM1 株は染色体上に、J30 株、CA06 株および HS01 株はプラスミド上に *car* 遺伝子群を有することが判明した(図 3-2B)。

プラスミドを有する3株からプラスミドの抽出を行い、パルスフィールドゲル電気泳動後、pCAR1 全体より作製したプローブを用いてサザン解析を行った。その結果、各プラスミドとも pCAR1 と良く似た制限断片のパターンを示し、各プラスミドが互いに酷似した遺伝子構造を有することが判明した(図 3-2C)。特に HS01 株の有するプラスミドを pCAR2 と命名して、詳細に制限断片パターンを比較したところ、極めてよく似ていた(図 3-2D)。

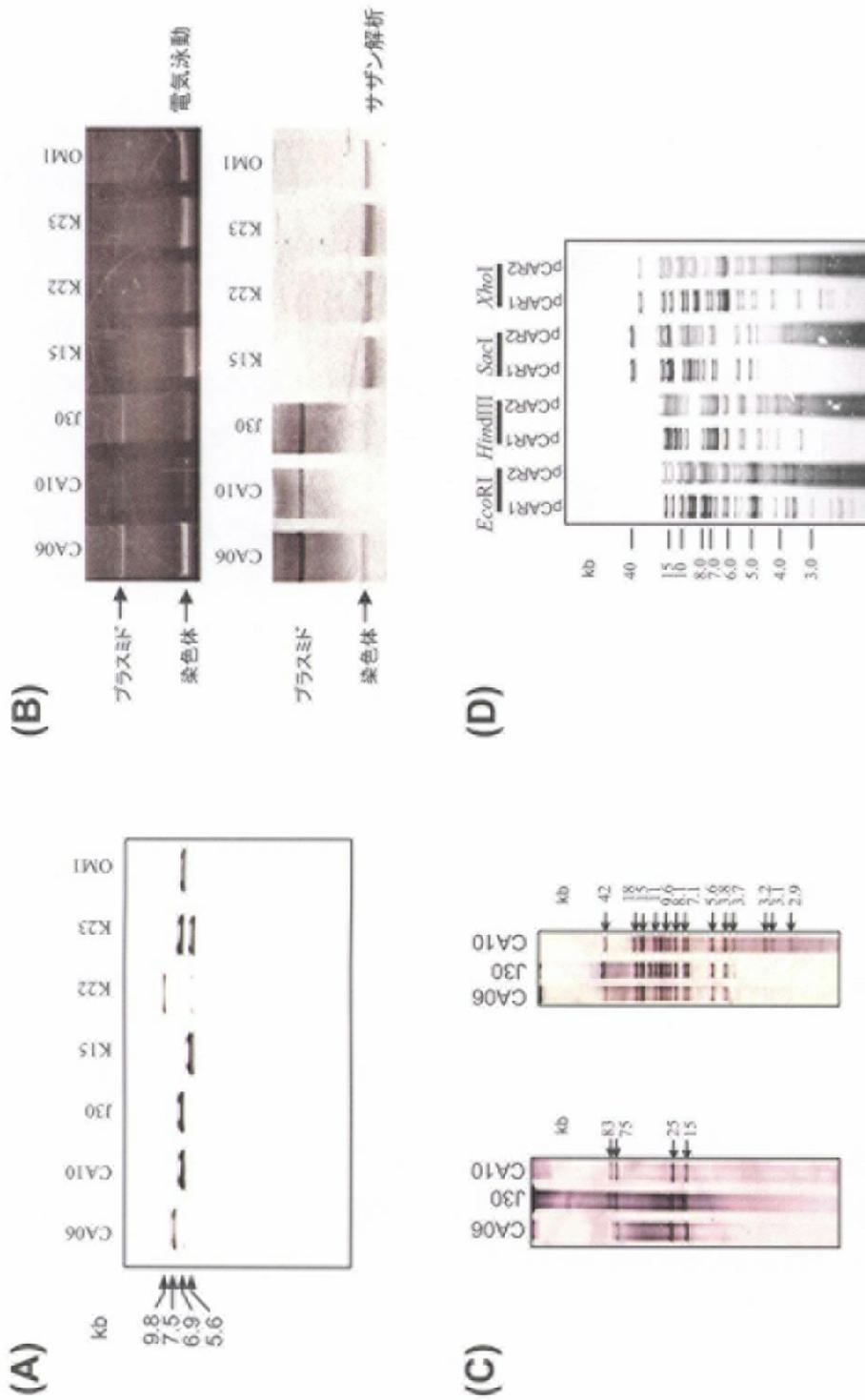


図3-2. CA10株を含むCAR分解菌の遺伝子解析の結果.

- (A) 各CAR分解菌の有する *car* 遺伝子群、それぞれの菌株より全DNAを抽出後 *EcoRI* 処理し、電気泳動後CA10株の *car* 遺伝子群をプローブとしてサザン解析した結果。
- (B) 各CAR分解菌の溶解放液を電気泳動した結果 (上) とその後 *car* プローブでサザン解析した結果 (下)、電気泳動において上のバンドがプラスミドに、下のバンドが染色体DNAにあたる。
- (C) 各CAR分解菌の溶解放液を抽出し、*NorI* (左) および *SacI* (右) 処理後、パルスフィールド電気泳動 (PFGE) に供し、pCARI全体をプローブとして用いてサザン解析を行った結果。
- (D) pCARIとpCAR2の遺伝子構造の比較、それぞれをCA10株、HS01株より抽出後、制限酵素で処理したサンプルをPFGEに供し、pCARI全体をプローブとして用いてサザン解析を行った結果。

さらに *repA*, *oriV* の周辺領域をクローニングし、その 2,276 bp の塩基配列を解読したところ、pCAR1 の対応する領域と完全に一致した(結果は示さない)。従って少なくとも複製領域に関しては pCAR1 と pCAR2 は完全に同一のプラスミドであることが示された。

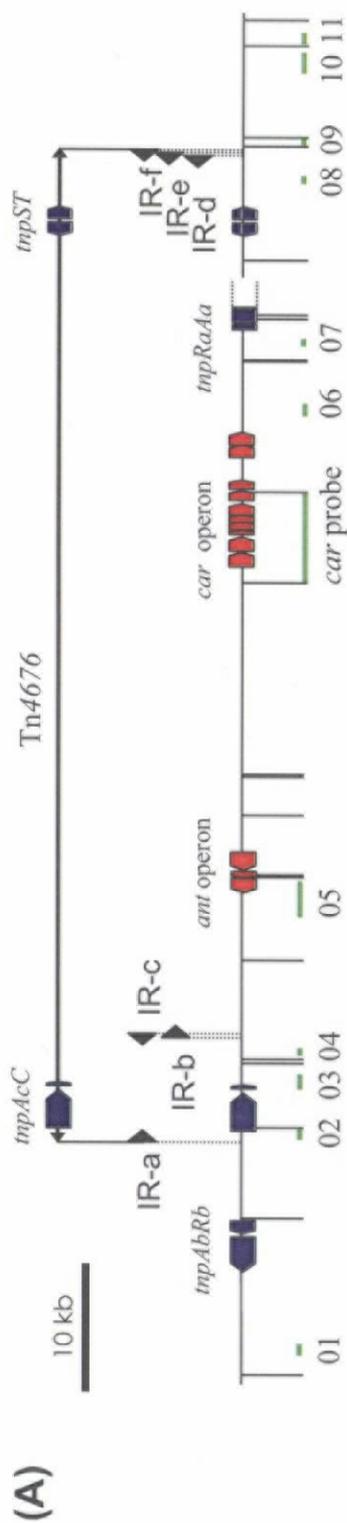
また残りの4株より DNA を抽出し、*EcoRI* 処理後、図 3-3A に示す pCAR1 上の DNA 断片から作製したプローブ (01~11) を用いてサザン解析を行った。その結果、OM1 株はプローブ 04~07 についてのみシグナルが見出され、Tn4676 内部の約 55 kb にわたる DNA 領域を保持していた(図 3-3B, 3-4)。この両末端の DNA 領域をクローニングし(pUOM1101~pUOM1202)、そのインサートの塩基配列を解読したところ、pCAR1 と類似の遺伝子構造を持つ領域の両末端に挿入配列 ISPst3 が見出された(図 3-4、各 ORF の相同性検索の結果については付録 1 参照)。一方 K15、K22 および K23 株については、Tn4676 上の DNA 断片 (02~08) をプローブとした際にのみシグナルが見出された(図 3-3)。さらに、K22 株と K23 株からはプローブ 02 とプローブ 08 を用いた際にシグナルが2本検出され、Tn4676 が2コピー染色体上に存在することが示唆された(図 3-3, 3-5B)。実際に K23 株における Tn4676 の末端領域をクローニング(pUK23301~pUK23601、左端を L1, L2 とし右端を R1, R2 とした)し、そのインサートの塩基配列を解読したところ、IR-a と IR-f を境界として、その内側の配列が完全に一致したのに対し、外側は全く異なる塩基配列だった(図 3-5C)。一般的にトランスポゾン(Transposon)の転移の際には標的配列の重複が生じるが、IR-a と IR-f の外側に、L1 と R1 については 4 bp の、L2 と R2 については 5 bp の重複配列が存在していた(図 3-5C)。以上のことから、K23 株の Tn4676 が染色体上の異なる位置に転移していることが解った。

このように複数の CAR 分解菌より pCAR1 や Tn4676 と極めて良く似た遺伝子が見出されたことから、*car* 遺伝子群の水平伝播に pCAR1 および Tn4676 が寄与していることが示唆された。

(なお本節の結果は、OM1 株については Shintani *et al.*, 2003 に、その他については Shintani *et al.*, 2005b に発表した。)

3-2-3 Tn4676 の転移能

上述した pCAR2 を有する HS01 株を LB 培地と CAR 培地で継代培養したところ、偶然にもプラスミドと染色体の双方に *car* 遺伝子群を有する菌株を取得した(図 3-5)。この菌株を HS02 株とした。HS02 株について 3-2-2 と同様にサザン解析を行ったところ、pCAR1 と全く同じシグナル(pCAR1 と pCAR2 が同一の遺伝子構造を持つという上の結果を支持する)とは別に、Tn4676 の末端に相当するプローブ 02 とプローブ 08 を用いた場合に、pCAR1 由来のシグナルとは異なるサイズにシグナルが認められた(図 3-2, 3-5)。さらに、このシグナルに相当する DNA 断片をクローニングし(pUHS02101, pUHS02201)、塩基配列を解読したところ、IR-a と IR-f を境界として、その外側は pCAR1 とは全く異なる配列が見出された。



(B)

プローブ番号とサザン解析後のシグナル (*EcoRI*断片) のサイズ (kb)

菌株	01	02	03	04	05	06	07	08	09	10	11
CA10	11.5	6.8	4.8	7.3	6.2	9.4	3.0	8.3	0.8	6.0	1.9
K15	-b	4.2 ^a	4.8	7.3	6.2	9.4	3.0	15 ^a	-b	-b	-b
K22	-b	4.2 ^a , 7.8 ^a	4.8	7.3	6.2	9.4	3.0	18 ^a , 15 ^a	-b	-b	-b
K23	-b	4.2 ^a , 7.8 ^a	4.8	7.3	6.2	9.4	3.0	15 ^a , 15 ^a	-b	-b	-b
OM1	-b	-b	-b	19.3	6.2	9.4	3.0	-b	-b	-b	-b
HS01	11.5	6.8	4.8	7.3	6.2	9.4	3.0	8.3	0.8	6.0	1.9
HS02	11.5	6.8, 2.5 ^a	4.8	7.3	6.2	9.4	3.0	8.3, 6.0 ^a	0.8	6.0	1.9
DS1	-b	-b	-b	-b	-b	-b	-b	-b	-b	-b	-b

図3-3. CA10株を含むCAR分解菌に対するサザン解析に用いたプローブの位置とその結果。

- (A) pCARIの*car*遺伝子群周辺領域の遺伝子地図。各分解系遺伝子群を赤色の五角形で、トランスポソンの転移に参与するORFを青色で示した。また、*EcoRI*サイトを縦棒で示し、サザン解析に用いたプローブの位置とサイズを緑色の線で示した。プローブ05、07および*car*プローブは、それぞれpBCA730、pUCA601およびpUCA1のインサートを利用して作製した。なお*tnpAaAa*は別の挿入配列によって破壊されている。
- (B) 各CAR分解菌の全DNAを*EcoRI*で処理し、(A)に示したプローブを用いてサザン解析を行った結果。シグナルのサイズを数字で示した。^aCA10株と異なるサイズに見出されたシグナル。b“.”はシグナルが検出できなかったことを示す。

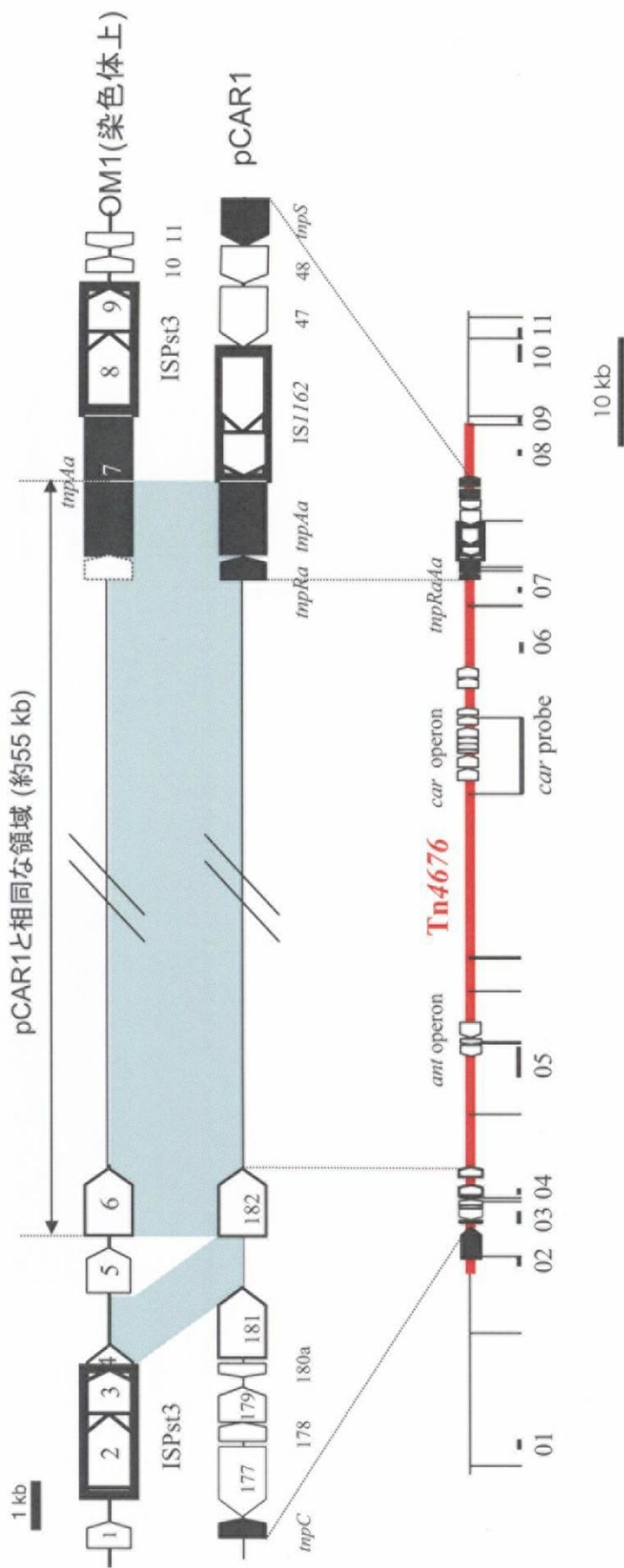
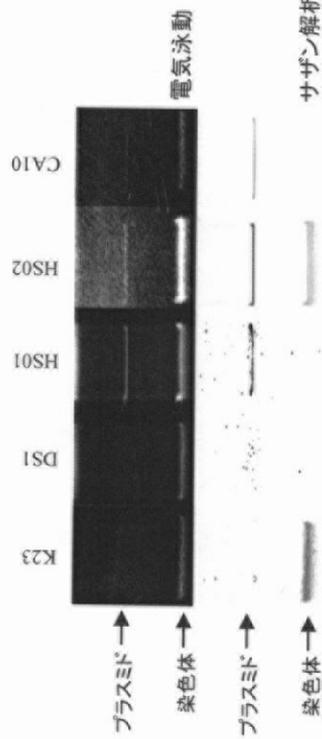


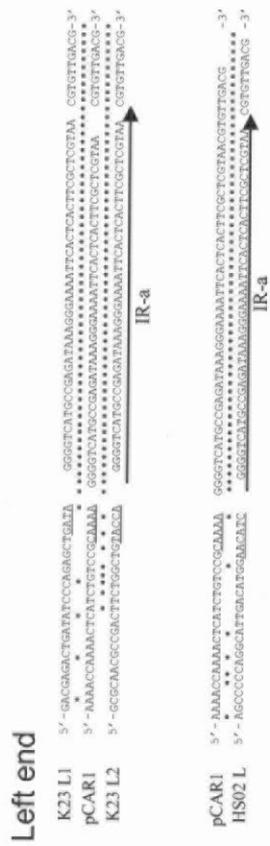
図3-4. pCAR1とOM1株の*car*遺伝子群周辺の保存領域とその末端の遺伝子構造.

サザン解析から判明したOM1株の染色体上に存在するTn4676内部の領域. OM1株はTn4676内部のおよそ55 kbにわたるDNA領域を保持しており、その両末端はpUOM1101-pUOM1203のインサートを解読したところ、挿入配列ISPst3によってはさまれる形で存在していた。(OM1株における各ORFの位置、サイズ、相同性検索の結果は付録1参照)

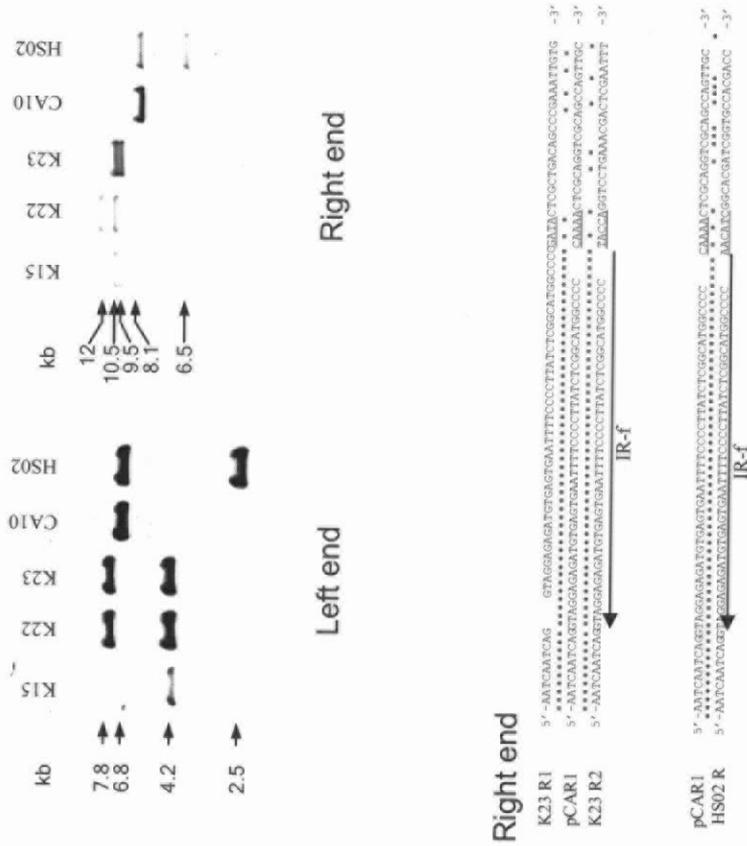
(A)



(C)



(B)



Right end

K23 R1 5'-AACCAATCAG GTAGGAGATGTGAGTGAATTTCCCTTATCTGGCATGCCCGGATATCTGTCGACGCCGGAATTGTC -3'
 pCARI 5'-AACCAATCAG GTAGGAGATGTGAGTGAATTTCCCTTATCTGGCATGCCCGGATATCTGTCGACGCCGGAATTGTC -3'
 K23 R2 5'-AACCAATCAG GTAGGAGATGTGAGTGAATTTCCCTTATCTGGCATGCCCGGATATCTGTCGACGCCGGAATTGTC -3'
 IR-f
 pCARI 5'-AATCAATCAG GTAGGAGATGTGAGTGAATTTCCCTTATCTGGCATGCCCGGATATCTGTCGACGCCGGAATTGTC -3'
 HS02 R 5'-AATCAATCAG GTAGGAGATGTGAGTGAATTTCCCTTATCTGGCATGCCCGGATATCTGTCGACGCCGGAATTGTC -3'
 IR-f

図3-5. CAR分解菌の染色体DNA上に見出されたTn4676の転移位置の解析。

- (A) HS01株のうち、染色体上に*car*遺伝子群を保持するHS02株の出現。HS02株はプラスミド上のみならず、染色体上にも*car*プロンプのハイブリダイゼーションが認められた(下)。
- (B) K15, K22, K23株とHS02株の全DNAに対し、プロンプ04とプロンプ08を用いた際のサザン解析結果。ここで、左図の各DNAは*EcoRI*で、右図は*SacI*で処理後にサザン解析を行った。CA10株とは異なる位置にシグナルが認められた。
- (C) K23株とHS02株で見出された染色体上に存在するTn4676の末端をクロニング後、塩基配列決定した結果、いずれにおいてもIR-aとIR-f(図中矢印)をそれぞれ左端、右端とする内側のDNA配列がTn4676のものと同じであった(図中アスタリスクで示した)。また、K23L1とK23R1、K23L2とK23R2およびHS02LとHS02Rの組合わせにおいて転移した位置の塩基配列が重複していた(図中下線で示した)。

これは染色体 DNA に由来すると考えられるため、HS02 株内部で Tn4676 が転移したことが示唆された。また K23 株の Tn4676 の末端配列の結果と併せると、転移酵素 TnpAc が認識する IR が、IR-a と IR-f であることを示唆している(図 3-5)。次に pCAR2 上の Tn4676 の転移能を調べるため、転移に必要な遺伝子領域を pCAR2 よりクローニングし、ミニトランスポゾンを含むプラスミド pBTN4676 を構築した(図 3-6)。この pBTN4676 を保持する大腸菌内に、接合伝達性のプラスミド R388 および RP4 を挿入し、これらをターゲットプラスミドとして mating out 法によりミニトランスポゾンの転移能を調べた(図 3-6)。その結果、受容菌 HB101 株から、ターゲットプラスミドとミニトランスポゾン双方の抗生物質マーカーに耐性を示す形質転換株が得られた(転移頻度は接合伝達したプラスミドあたり約 10^{-6})。この形質転換株の全 DNA に対して Tn4676 の IR-a 付近のプロープを用いてサザン解析を行ったところ、シグナルが異なるサイズに見出され、トランスポゾンの転移が生じていることが認められた(図 3-6C)。

3-2-4 pCAR1 の接合伝達能と pCAR2 との比較

pCAR1 の接合伝達能を調べるために CA10 株を供与菌、表 3-1 に示す菌株を受容菌としてフィルター上で接合実験を行った。この際、CA10 株から pCAR1 を脱落させた菌株、*P. resinovorans* CA10dm4 株を材料と方法 M-13 に示す方法で作製した。その結果、*P. resinovorans* CA10dm4RG 株、*P. putida* KT2440RG 株を受容菌とした際に接合形質転換株が得られた(表 3-1: 供与菌あたり 10^{-1} および 10^{-3} の頻度)。次に、得られた接合形質転換株を供与菌として(CA10dm4D1 株および KT2440D1 株)、各受容菌と接合実験を行ったところ、CA10dm4RG 株と KT2440RG 株に対してのみ供与菌あたり 10^{-2} ~ 10^{-3} の頻度で接合伝達が認められた(表 3-1)。この結果は、pCAR1 が自己伝達性のプラスミドであることを示している。

一方、pCAR2 を有する HS01 株についても同様の実験を行ったところ、表 3-1 に示す全ての *Pseudomonas* 属細菌に対して接合伝達が認められた。またその頻度は、KT2440RG 株と CA10dm4RG 株、および DS1RG 株(HS01 株から pCAR2 が脱落した菌株)に対しては供与菌あたり 10^{-1} ~ 10^{-2} と高く、他の受容菌に対しては 10^{-5} 程度であった(表 3-1)。

さらに pCAR2 の宿主を KT2440 株あるいは CA10dm4 株(KT2440D2 株および CA10dm4D2 株)とした場合についても、同様の接合実験を行った。その結果、pCAR2 の接合伝達を検出できた受容菌は KT2440RG 株と CA10dm4RG 株のみであった。また、それぞれに対する接合伝達頻度は pCAR1 を有する供与菌(CA10dm4D1 株および KT2440D1 株)を用いた場合とほぼ同程度(それぞれ 10^{-3} および 10^{-1})であった(表 3-1)。従って、pCAR1 と pCAR2 の宿主を同一にした場合、接合伝達を検出できる受容菌の種類とその頻度についてほぼ同じ傾向を示すことがわかった。

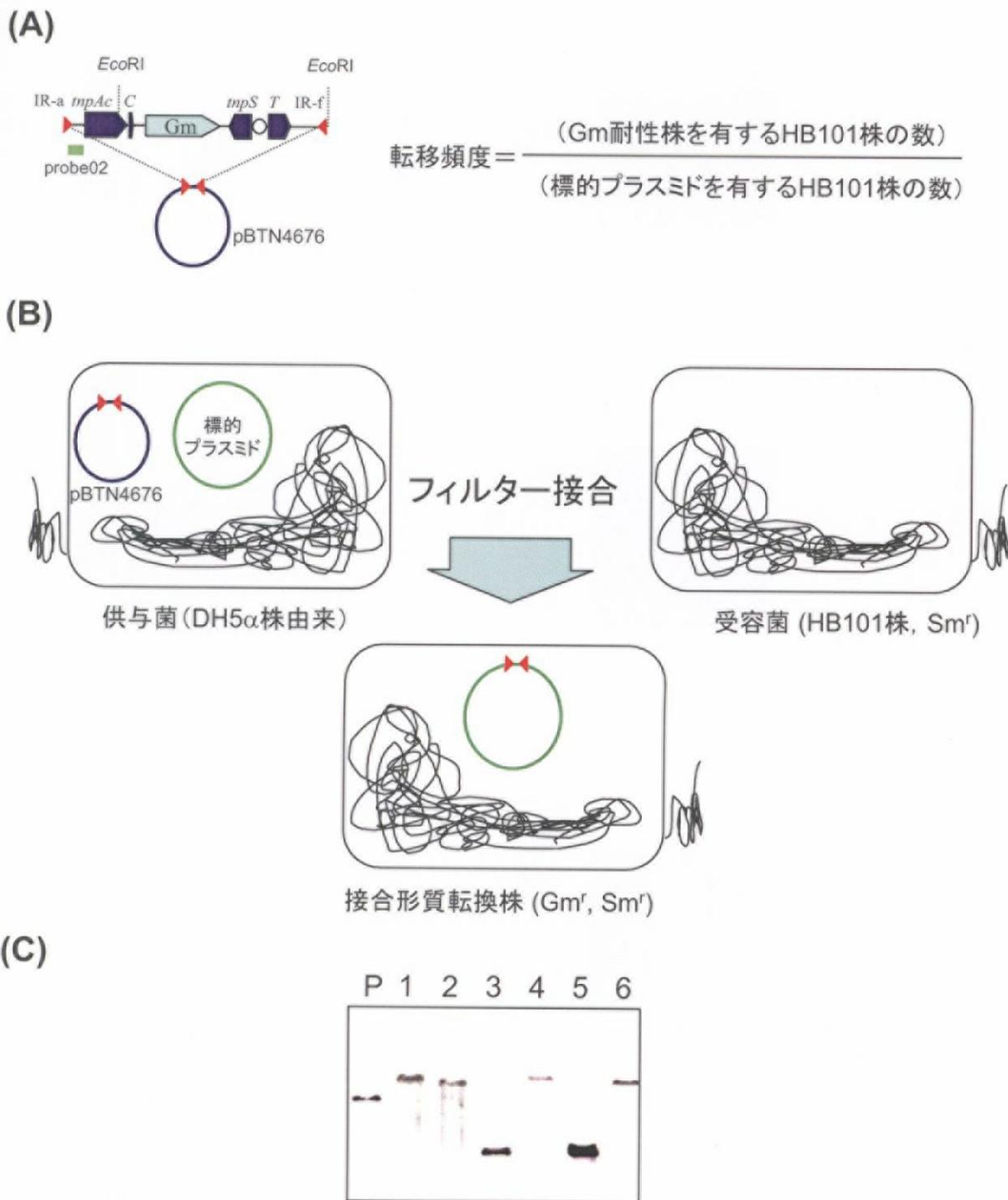


図3-6. ミニTn4676の構築とその転移能の検証.

- (A) ミニTn4676の模式図と転移頻度の算出法. pBlueScriptIIISK(-)の*lac*プロモーター下流に*mpAcC*を連結した. IR-aとIR-fを赤色の三角形で示した.
- (B) Mating out法の概略図. 供与菌内で標的プラスミド(本研究ではRP4またはR388)上にトランスポゾンが転移後, 受容菌にプラスミドが接合伝達した場合に転移を検出できる.
- (C) 得られた接合形質転換株(R388の場合のみ示した)から全DNAを抽出後, *EcoRI*処理し, プローブ02でサザン解析した結果. Pはプラスミドを, 1~6はランダムに選んだ接合形質転換株の全DNAを*EcoRI*処理したサンプルである. Pは約7 kbの位置にシグナルが検出される. (A)で示したように, *EcoRI*サイトは, ミニTn4676の内部には1つのみであるため, R388上に転移した場合, 異なるサイズにシグナルが認められる.

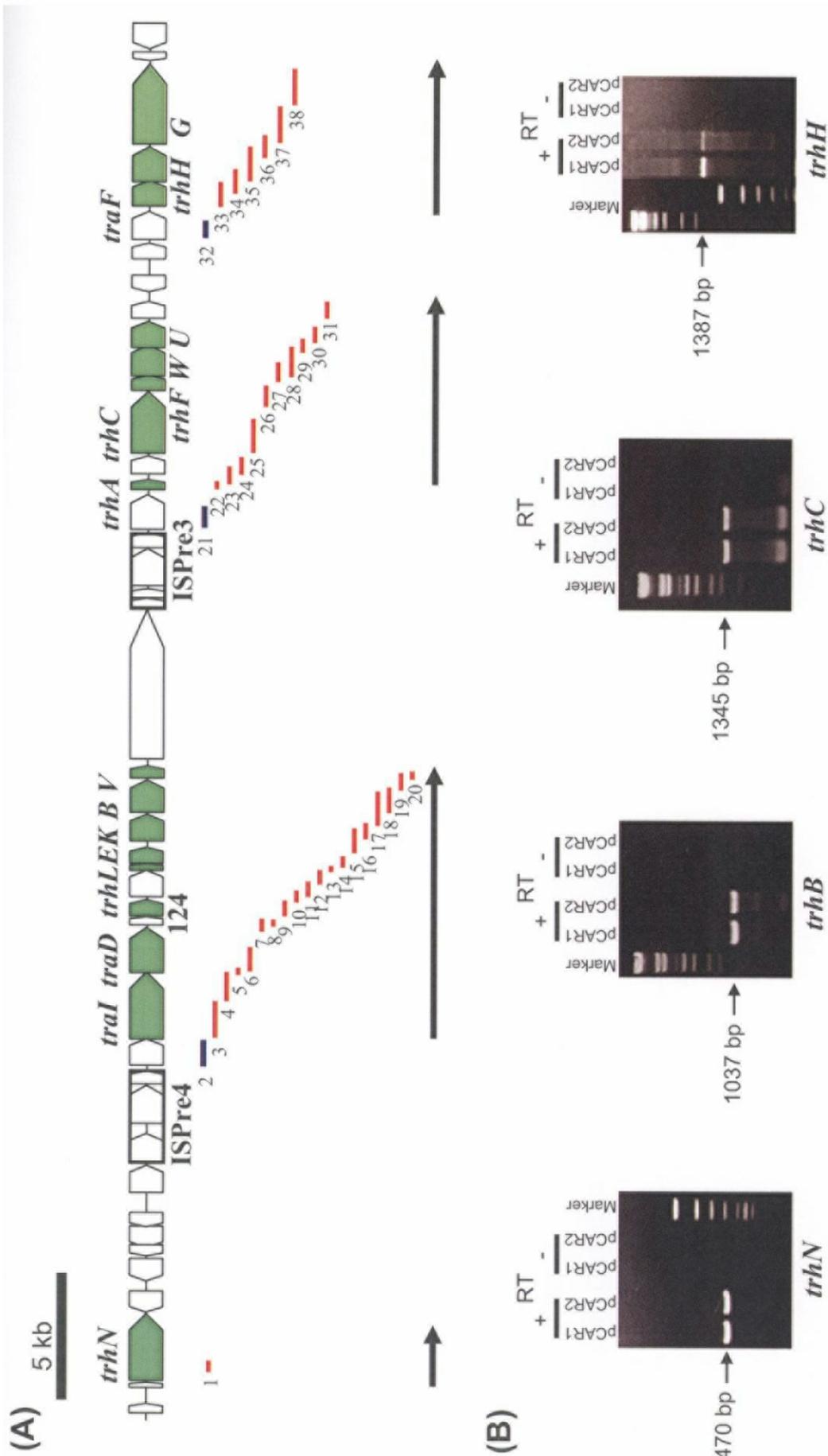


図3-7. pCAR1とpCAR2上の*tra/trh*遺伝子群に対するRT-PCR解析の結果.

(A) pCAR1上の*tra/trh*遺伝子群周辺の遺伝子地図. 相同性検索から接合伝達に関与すると推定されたORFを緑色で示した. RT-PCR解析に用いたプライマーセットから増幅される断片を太線で示した. なお, 増幅がみられた断片を赤色で, 見られなかった断片を青色で示した.

(B) RT-PCR後のサンプルを気泳動した結果. 推定された各転写単位のうち*trhN*, *trhB*, *trhC*, および*trhH*の結果のみを示した. ネガティブコントロールとして, 逆転写酵素 (Reverse transcriptase; RT) を加えないサンプルの結果を示した.

表 3-1. pCAR1 および pCAR2 を有する菌株を供与菌とした場合の接合伝達頻度

受容菌	供与菌とその*接合伝達頻度							
	CA10 (pCAR1)	HS01 (pCAR2)	KT2440D1 (pCAR1)	KT2440D2 (pCAR2)	CA10dm4D1 (pCAR1)	CA10dm4D2 (pCAR2)	CA10dm4D1 (pCAR1)	CA10dm4D2 (pCAR2)
<i>Burkholderia</i> sp. PJ310GK	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
<i>C. testosteroni</i> IAM12419GK	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
<i>E. coli</i> CAG18620 (ME8878)	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
<i>P. chlororaphis</i> IAM1511RG	N.D.	1×10^{-5}	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
<i>P. fluorescens</i> IAM12022RG	N.D.	3×10^{-5}	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
<i>P. putida</i> DS1RG	N.D.	2×10^{-1}	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
<i>P. putida</i> IAM1236RG	N.D.	4×10^{-5}	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
<i>P. putida</i> KT2440RG	3×10^{-3}	2×10^{-4}	4×10^{-2}	3×10^{-2}	4×10^{-4}	3×10^{-2}	4×10^{-4}	2×10^{-4}
<i>P. resinovorans</i> CA10dm4RG	3×10^{-1}	2×10^{-3}	2×10^{-3}	3×10^{-3}	3×10^{-2}	3×10^{-3}	3×10^{-2}	3×10^{-2}
<i>P. stutzeri</i> IAM1268RG	N.D.	1×10^{-5}	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.

*N. D.は接合伝達頻度が検出限界以下だったことを示す(供与菌あたり 10^7 以下). 各実験は少なくとも3回を行い, その平均値を示した.

3-2-5 pCAR1 上の *tra/trh* 遺伝子群の解析

前節の結果, 同一の宿主からの pCAR1 および pCAR2 の接合伝達性には差が見出せないにもかかわらず, HS01 株から pCAR2 が接合伝達可能な受容菌の種類が多いように見える(表 3-1). この原因として宿主の違いに起因する *tra/trh* 遺伝子群の転写量が異なることが挙げられる. そこで, まず各供与菌内で pCAR1 上の *tra/trh* 遺伝子群が転写されていることを確かめるため, CA10 株および HS01 株より全 RNA を抽出し, RT-PCR 解析を行った. RT-PCR に用いたプライマーセットと, 増幅断片の位置とサイズについて図 3-7A に示した. その結果, *tra/trh* 遺伝子群は少なくとも *trhN*, *traI-traV*, *trhA-trhU*, および *traF-trhG* からなる4つの転写単位から構成されていることが示唆された(図 3-7AB). また, KT2440D1 と KT2440D2 についても同様の結果が得られた(結果は示さない).

次に, CA10 株, HS01 株, KT2440D1 株および KT2440D2 株から抽出した全 RNA に対し, 各転写単位のうち *trhN*, *traI*, *trhA* および *traF* 内部の 100 bp をターゲットとした定量的 RT-PCR を行った. 各供与菌は, 接合実験の際と同様の条件で培養後(いずれも LB 培地で 15 hr 培養した), 全 RNA を抽出した. その結果, 得られた相対 RNA 量について, CA10 株の転写量を 100 とした際の他の菌株における RNA 量を算出して比較した(図 3-8). その結果, HS01 株における *traI* の転写量が他の菌株のものに比べてやや低かったが, 他の菌株間では大きな差は見られなかった(図 3-8). なお 3-2-4 と 3-2-5 の結果については Shintani *et al.*, 2005a にまとめて発表した.

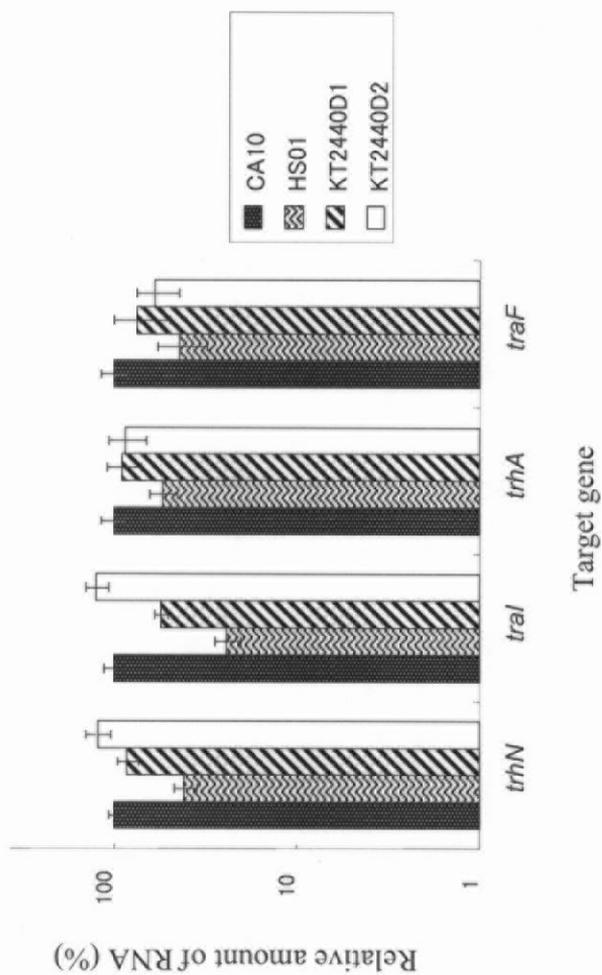


図3-8. 各供与菌内における*trh/tra*遺伝子の転写量の比較.

接合実験に用いた供与菌, CA10株, HS01株, KT2440D1株およびKT2440D2株から全RNAを抽出し, 4つの転写単位上の遺伝子内部の領域100 bpについて定量的RT-PCRを行った結果, CA10株におけるRNA量を100とした際の各菌株内の相対RNAの割合を示した.

3-3 考察

本章では, CA10 株の *car* 遺伝子群ホモログを有する他の CAR 分解菌が pCAR1 に良く似たプラスミドや Tn4676 を有することを示した. また, pCAR1 の接合伝達能や Tn4676 の転移能を実験的に証明した. 従って *car* 遺伝子群を環境中で水平伝播させる可動性遺伝因子として機能し得る2つの機構(接合伝達性プラスミドおよびトランスポゾン)の存在について実験的に証明した.

トランスポゾンは同一細胞内で遺伝子の位置を変化させ, DNA の構造変化を引き起こす転移因子である. トランスポゾンの大きな特徴は, 転移元と転移先において DNA の相同性を必要としない点であり, その転移の様式に従って大きく2つのクラスに分けられる. クラス I に属するトランスポゾンは, いわゆる“cut and paste”によって転移し, 転移前後でそのコピー数が増加しない. これに対して Tn3 ファミリーに属するクラスIIタイプのトランスポゾンは複製的に転移をする (Grindley, 2002). Tn4676はこのトランスポゾンに分類され, 転移前後で *car* 遺伝子群のコピー数が増加するため, *car* 遺伝子の水平伝播をより効率よく行う可能性がある. 特に, 本研究で用いた *Pseudomonas* 属細菌 K22 株と K23 株は, 2つの *car* 遺伝子群を, 2つの Tn4676 が染色体上に転移した形で保有する比較的珍しい菌株である. 本論文では詳しくは述べなかったが, かつて K23 株からプラスミドを持たない *P. putida* DS1 株に pCAR2 が接合伝達したことから, 過去に pCAR1 様のプラスミドを保持した可能性がある (Shintani *et al.*, 2005b). 一方, Tn4676 の転移酵素の認識する IR の候補は pCAR1 上に6コピー (IR-a~IR-f) 存在した(図 3-1)が, 本研究の結果 IR-a と IR-f が Tn4676 の末端の IR として機能することが示唆された. Tn4652 サブファミリーの IR は 40 bp 以上と長いのが特徴である (Glindely, 2002). pCAR1 上の IR の候補はそれぞれ類似のトランスポゾン Tn4651 の IR と高い相同性を示したが, IR-a と IR-f はその中で最も相同性の低い配列であった(67%の相同性). これは, Tn4651 と Tn4676 の転移酵素の認識配列の違いを示すものであり, 今後 Tn4651 の TnpA と Tn4676 の TnpAc と, それぞれの IR との互換性の有無について酵素学的に確かめたり, また, pCAR1 上の他の IR について Tn4651 の TnpA が認識できるかどうかなどについて調べたりすることで, Tn4652 ファミリーの進化について考察ができるかもしれない. 一方, Tn3 ファミリーに属するトランスポゾンは, 転移の際にそのターゲット配列において 5 bp の重複配列を生成することが知られているが (Grindley, 2002), Tn4652 サブファミリー (Tn4651, Tn5041 および Tn4676) においては生成する重複配列が 4~6 bp とばらつきがあり (Tsuda *et al.*, 1989, Kholodii *et al.*, 1997) トランスポゾンの基礎的な性質上興味深い.

P. stutzeri OM1 株からは染色体上に 55-kb の保存領域が見出され, その末端には2コピーの ISPst3 が存在し(付録1), 各々の ISPst3 における塩基配列は互いに 98%以上保存されていた. 本 IS には, IS21 ファミリーに特徴的に見られる IstA タンパクおよび IstB タンパクと相同性を示す(それぞれ 48, 58%), 2つの ORF が存在し(ORF2 と ORF3, および ORF8 と ORF9), それぞれの機能において重要と考えられる

motifも保存されていた(結果は示さない, Berger and Haas, 2001). また IR の末端の配列が 5'-TG(5'-CA)であることも IS21 ファミリーに特徴的であった (Berger and Haas, 2001). 以上より, ISPst3 は, その転移能については未知であるが, IS21 ファミリーに属する IS である可能性が示唆された.

ISPst3 の挿入部位には DR が認められなかったことから, OM1 株においても, K23 株や HS02 株同様, 染色体に Tn4676 が転移したが, その後 ISPst3 が挿入され, 遺伝子構造が変化した可能性がある. 一方, 2つの ISPst3 に挟まれた領域が複合トランスポゾンとして働いた可能性も考えられる. ただし, 保存領域の外側に DR は存在しなかった点や, 複合トランスポゾンとして機能するには 55 kb と大きすぎる点を考慮すると, 実際に転移するのは難しいかもしれない.

ところで, OM1 株の保存領域の右端側と, 対応する pCAR1 の領域との双方から, 複製的転移をするトルエン/キシレン分解トランスポゾン Tn4653 における転移酵素 (TnpA) と高い相同性を示す遺伝子 *tnpAa* が見出された(図 3-1A). 双方とも IS の挿入によって, Tn4653 上の *tnpA* よりも短い領域しか存在せず, 機能を失っていると考えられる. しかし, ①それぞれの *tnpAa* に異なる IS が挿入していること(OM1 株では ISPst1, pCAR1 上では IS1162), ②*tnpAa* における IS の挿入箇所が異なること(OM1 株は, *tnpAa* の開始コドン下流 2635 bp の位置, pCAR1 は開始コドン 1266 bp 下流), の2点から, かつてこの領域に完全長の遺伝子 *tnpAa* が存在した可能性が考えらる. Tn4653 は Tn4676 とは異なり, 転移酵素をコードする *tnpA* と, 解離酵素をコードする *tnpR* が隣接する特徴をもつ (Grindley, 2002). pCAR1 上の *tnpAa* の上流には, *tnpRa* が存在するが, この遺伝子領域は OM1 株においても保存されている(図 3-4B). さらに, これらの転移酵素の基質となる IR の候補となりうる配列が pCAR1 上か 4 コピー見出されており(図 3-4A, Maeda *et al.*, 2003), OM1 株上にもいくつか存在することが予想される. 以上の事実から, OM1 株の染色体上に見出された *car* 遺伝子を含む保存領域が, かつて Tn4653 タイプのトランスポゾンであった可能性も考えられた.

塩基配列の解析から, *tra/trh* 遺伝子群は, IncP に属する他のプラスミドよりも, 腸内細菌由来の IncHI 群プラスミド R27 (Sherburne *et al.*, 2000, Lawley *et al.* 2002, 2003), および R478 (Gilmour *et al.* 2004) や, 腸内細菌群由来のプラスミド Rts1 (Murata *et al.*, 2002) やゲノミックアイランド SXT (Beaber *et al.*, 2002, 2004) および R391 (Böltner *et al.*, 2002) 上の遺伝子と高い相同性を示した(図 3-9). これらの特徴として, 水環境中において高い接合伝達頻度を示すことが挙げられる (van Elsas *et al.*, 2000). そこで液体培地中における pCAR1 の接合実験を試みた. しかし, その頻度は固体培地を用いた場合に比べ大きな変化は見られなかった(結果は示さない). また IncHI 群プラスミドは低い温度で接合伝達頻度が上昇し, 逆に高い温度では接合伝達しないことも知られている (Rodriguez-Lemoine *et al.* 1975). そこで, HS01 株と IAM12022RG 株との接合を 25°C, 37°C, および 42°C で行い, その接合伝達頻度を調べたが,

30°Cで行った場合と比べ大きな変化は見られなかった(結果は示さない). さらに, F プラスミドでは, その接合伝達頻度が生育依存的に変動し, 早期対数増殖期で最も高くなり(供与菌あたり 10^{-1}), 定常期に入ると検出限界以下にまで低下する現象が知られている (Frost and Manchak, 1998).

pCAR1 についても、供与菌の培養時間を変え、異なる増殖期における接合伝達頻度について測定したが、大きな変動は見出せなかった(結果は示さない)。以上の事実は pCAR1 が腸内細菌由来のプラスミドに見られる接合伝達性とは異なる性質をもつことを示唆する。一方、pCAR1 上の *trhN*, *tral*, *trhL* および *trhA* を含む DNA 断片をプローブとして IncP-7 群プラスミド Rms148 に対しサザン解析を行ったところ、pCAR1 とはサイズは異なるものの、シグナルが検出できた(結果は示さない)。これは Rms148 が pCAR1 と良く似た *trh/tra* 遺伝子群を有しており、IncP-7 群プラスミドの基本骨格に *tra/trh* 遺伝子群が含まれる可能性を示している。

本研究の結果に示したように、接合伝達プラスミドの供与菌を変えた場合にその接合伝達頻度が変動したという報告例は、IncP-1βプラスミド pB3 についてのみで (Gelder *et al.*, 2005) ほとんど知られていない。プラスミドの接合伝達頻度を変動させる大きな要因としては以下のような可能性が挙げられる (Thomas and Nielsen, 2005)。

① 表面排斥(surface exclusion)現象による接合伝達頻度の低下

この現象は F プラスミドの研究によって明らかになった。受容菌内に良く似た接合伝達機構をもつプラスミドが存在し、それが作る膜タンパク質(Fの場合 TraST)によって生じる。TraTは性繊毛による供与菌と受容菌の接触を妨げ、TraSはDNAの受容菌内への移入を妨げる。

② 不和合性現象によりプラスミドが共存できないため

受容菌内に同じ不和合性群に属するプラスミドが存在する場合、どちらかのプラスミドが追い出されるため、接合伝達頻度が低くなる。

③ 制限・修飾系 (Restriction and modification system) が外部 DNA の侵入を防ぐため

細菌が外部からの DNA の侵入を妨げるために有する機構で、宿主内の制限酵素が DNA と化学修飾が異なる塩基配列を破壊する。制限酵素の認識配列と化学修飾を受ける配列は、宿主によって違うため、供与菌と受容菌の組み合わせによっては、プラスミド DNA が受容菌内で破壊されてしまう。

④ 接合伝達に寄与する遺伝子群の転写調節機構が宿主によって異なるため

接合伝達に必要な一連のタンパク質をコードする遺伝子群は数が多く、その転写制御機構は非常に複雑な場合が多い (Zechner *et al.*, 2000, Lawley *et al.*, 2004)。また、RK2 の場合、転写制御因子である KorB の研究から、わずかな発現量の違いが接合伝達頻度を変化させると考えられている (Bingle *et al.*, 2003)。

以上の4点の可能性について、pCAR1 および pCAR2 の場合についてそれぞれ確かめた。①と②については、受容菌として用いた菌株内に pCAR1 と類似のプラスミドが存在していないことを、受容菌の全 DNA に対するサザン解析によって確かめた(結果は示さない)。

一方, ③については, 供与菌と受容菌が同じ菌株に由来する場合(例えばKT2440D1株とKT2440RG株, またはHS01株とDS1株など)に, そうでない場合と比べて, 接合伝達頻度が $10^2\sim 10^4$ 倍高いことから, pCAR1およびpCAR2の接合伝達においても影響することが考えられる.

④については本章で行った定量的RT-PCRの結果, HS01株における*tra/trh*遺伝子群の転写量が他の3株と比べてやや低い. しかし, この違いが接合伝達頻度に影響を及ぼすかどうかについては現在のところ不明である. 今後, 各転写単位上の遺伝子の機能について解明すると共に, プロモーター配列の決定や, その転写調節機構について明らかにする必要があるだろう.

pCAR1をDS1株に挿入した菌株を作製して, CA10株とその接合伝達性について比較すれば, 宿主を変えた際におけるpCAR1の接合伝達性についてより深く議論ができるが, 現在までにそのような菌株を取得できていない. 本研究ではpCAR1の接合伝達を検出する際, 環境中における*car*遺伝子群の水平伝播現象を見据えた実験として, CAR代謝能をマーカーとした. しかし, プラスミド上の遺伝子が他の宿主内で望ましい発現するかどうかは不明であり, 接合伝達の生じる受容菌の種類について正確に議論するのは難しい. 従って, 様々な宿主で発現することが解っている抗生物質耐性遺伝子等をマーカーとしてプラスミド上に挿入して, 再度接合実験を行う必要がある.

第4章 pCAR1 の安定な保持に寄与する遺伝子群の解析

4-1 緒言

pCAR1 のように比較的大きなサイズのプラスミドが安定に保持されるためには、細菌が分裂する際に正確に娘細胞に分配される必要がある。こうしたプラスミドが安定に保持されるための機構は、プラスミドごとに異なり、その基本的性質として重要である。pCAR1 の塩基配列解析の結果、分配に関与すると推定された *parWABC* 遺伝子群が見出された。本章ではこの遺伝子群の機能解析を試み、pCAR1 の安定な保持機構を担うかどうかを確かめた。

4-2 結果

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

pCAR1 の分配に関与すると推定された ORF は, *repA* の上流に逆向きに存在していた(図 4-1). これらの ORF は *P. fluorescens* L6.5 株由来の pL6.5 における *parWABC* 遺伝子産物と, それぞれアミノ酸レベルで 89, 82, 72 および 94%と高い相同性を示した. しかし, pL6.5 については配列が登録されているのみ (accession no. AJ250853) で, その他の情報は得られなかった. そこで, pCAR1 上の ORF も暫定的に *parWABC* と命名し, その機能について解析することにした. 一般にプラスミドにおける分配は, ATPase (ParA) と DNA 結合タンパク質 (ParB) の2つのタンパク質と, *parA* 上流または *parB* 下流に存在する1つの動原体様の DNA 配列(*parS* と呼ばれることが多い)が必要である. しかし, pCAR1 の *par* 遺伝子群には, *parA* と *parB* の他に, *parW* と *parC* という2つの機能未知の ORF が同一の転写単位を構成すると推定され, また既知のプラスミドに見られるような *parS* 配列が *parAB* 付近に見出されなかった. 以上の事実は, pCAR1 の分配機構が, 既知のものとは異なる可能性を示唆する. そこでまず, 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次節で確かめた.

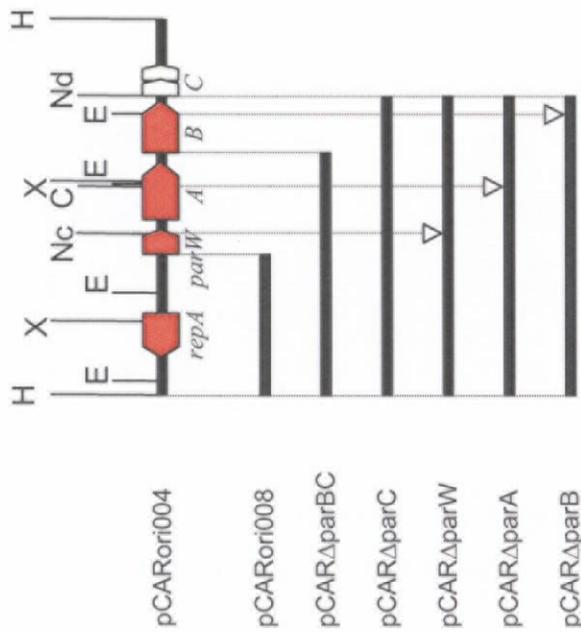
4-2-2 *parWABC* 遺伝子群のプラスミドの安定な保持能への寄与

2章で作製した *repA-oriV* のみを含むプラスミド (pCARori008) と, *repA-oriV-parWABC* を含むプラスミド (pCARori004) の安定性について *P. putida* DS1 株を宿主とし, 選択マーカーの非存在下 (LB 培地) およそ 20 世代毎に継代培養を行って比較した. その結果, pCARori008 が急速に脱落したのに対し, pCARori004 は5回の継代培養を経ても安定に保持された(図 4-1B). この結果は *parWABC* 遺伝子群 (産物) が pCAR1 の安定な保持に寄与することを示している.

次に *par* 遺伝子群のうち, プラスミドの安定化に必要な遺伝子を明らかにするために, まず pCAR Δ parBC (*repA-oriV-parWA* を含む) および pCAR Δ parC (*repA-oriV-parWAB* を含む) を構築した(図 4-1A). これらのプラスミドを用いて, 4-2-2 と同様にしてその安定性を調べたところ, pCAR Δ parBC が 24 時間の培養(およそ 20 世代)でほとんどが脱落したのに対し, pCAR Δ parC は 5 回継代培養を経てもほとんど脱落せず, 安定に保持されていた(図 4-1B, 表 4-1). この結果は *parC* がプラスミドの安定な保持に必要なことを示している.

次に pCAR Δ parC をもとにして, *parWAB* 各遺伝子を破壊した pCAR Δ parW, pCAR Δ parA および pCAR Δ parB を構築し, 同様に安定性を調べた. その結果, いずれのプラスミドについても 24 時間の培養でそのほとんどが脱落した(表 4-1).

(A)



(B)

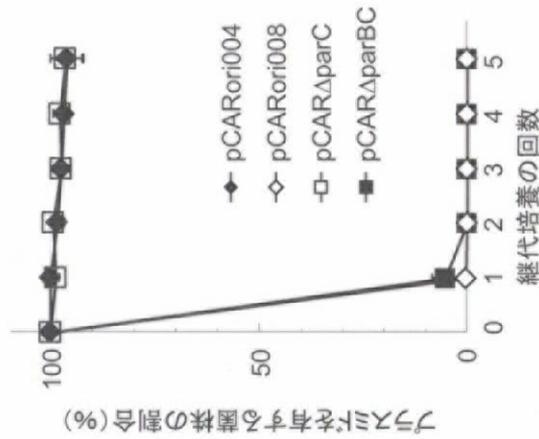


図4-1. pCAR1上のparWABC遺伝子群とプラスミドの安定性の相関。

- (A) pCAR1上のparWABC遺伝子群周辺の遺伝子地図。安定性の試験に用いたプラスミドのDNA断片を太線で示した。また、T4ポリメラーゼによって変異を入れた位置を白抜き三角形で示した。制限酵素サイトを以下の省略記号で示した: C; *Cla*I, E; *Eco*RI, H; *Hind*III, Nc; *Nco*I, Nd; *Nde*I, X; *Xho*I。
- (B) pCAR1ミニプラスミドにおける安定性。(A)に示したDNA断片をカナマイシン(Km)耐性遺伝子と連結し、環状化したプラスミドを用いた。*P. putida* DSI株内にはエレクトロポレーションで挿入し、Kmを含まない培地で、およそ20世代ごとに継代培養した(新しい培地に1/1000の培養液を加えた)。植継ぎの際に、培養液を非選択培地に塗布して、得られたコロニーのうちKm耐性を保持するコロニー数を測定した。少なくとも3回行い、その平均値を示した。

表 4-1. pCAR1 の *par* 遺伝子群を破壊したプラスミドの安定性と相補実験.

プラスミド	プラスミドを保持する宿主の割合	
	24 時間培養後	5 回継代培養後
pCARori004	100±0	96±4
pCARori008	<0.3	<0.3
pCARori008 + pBBRparWAB	57±14	<0.3
pCARΔparC	99±0.6	96±4
pCARΔparBC	5±3	<0.3
pCARΔparW	2±2	<0.3
pCARΔparW + pBBRparW	14±6	<0.3
pCARΔparW + pBBRparWAB	68±14	<0.3
pCARΔparA	1±1	<0.3
pCARΔparA + pBBRparA	14±7	<0.3
pCARΔparA + pBBRparWAB	62±9	<0.3
pCARΔparB	<0.3	<0.3
pCARΔparB + pBBRparB	<0.3	<0.3
pCARΔparB + pBBRparWAB	60±11	<0.3

各プラスミドの安定性は、24または120時間(5回継代培養)非選択培地で培養後、非選択培地に塗布して、現れたコロニーのうち、Km 耐性能を有する数の割合で表した。‘+’ は宿主内で変異プラスミドと相補用プラスミドとを共存させた場合の結果を示す。いずれの実験についても、少なくとも3回行った。

さらに、各 *par* 遺伝子の相補用プラスミド pBBRparW, pBBRparA, pBBRparB および pBBRparWAB を構築し、相補実験を行った。なお相補実験に先立って、相補用プラスミドのみを DS1 株内に挿入した後 RT-PCR 解析を行い、*par* 遺伝子が少なくとも転写レベルで発現することを確かめた(結果は示さない)。相補実験の結果、pCARΔ*par*W と pCARΔ*par*A をもつそれぞれの宿主内で、pBBRparW と pBBRparA をそれぞれ共存させた場合、24 時間培養後、いずれの宿主も約 14%程度プラスミドを保持していた(表 4-1)。これに対し pCARΔ*par*B を有する宿主内で pBBRparB を共存させても、その安定性は全く回復しなかった(表 4-1)。なお pBBRparW, pBBRparA および pBBRparB が各 pCAR1 ミニレプリコンを不安定化しないことは、相補プラスミドを pCARΔ*par*C と共存させも安定性が変化しないことによって確認した(結果は示さない)。

一方、それぞれの変異プラスミドと pBBRparWAB をそれぞれ宿主内で共存させた場合、いずれの変異プラスミドについても、その安定性が回復した(24 時間培養後におよそ 68, 62 および 60%の宿主がプラスミドを保持していた:表 4-1)。また興味深いことに、pBBRparWAB と、pCARori008 (*repA-oriV*のみ含む) を共存させても、その安定性が回復した(表 4-1;約 57%)。

さらに一連のミニプラスミドを挿入した宿主内で、*par* 遺伝子が転写されているかどうか RT-PCR を用いて調べた。その結果、pCARΔ*par*C 上の *parW*, *parA* および *parB* の RT-PCR 産物が得られたのに対し、pCARΔ*par*W, pCARΔ*par*A および pCARΔ*par*B における *parW* の産物が得られなかった(図 4-2C)。この結果は、*parW* 産物がプラスミドの安定性に寄与する可能性を示唆する。

以上の結果から、pCAR1 の安定性には *parWAB* 遺伝子産物が必要なことが示された。

4-2-3 各 *par* 遺伝子群の転写解析

プラスミドの安定性を維持するためには *par* 遺伝子の適切な発現が重要であることが知られおり、その転写は極めて厳密に制御される場合が多い (Gerdes *et al.*, 2000, Funnell and Slavcev, 2004)。そこで pCAR1 における *par* 遺伝子群の転写機構について解析を試みた。まず *par* 遺伝子群の転写単位を調べるため *P. resinovorans* CA10 株より全 RNA を抽出し、図 4-2A に示すプライマーを用いて RT-PCR 解析を行った。その結果、*parWAB* は少なくとも1つの転写単位として転写されることが示された(図 4-2B)。次に、宿主の生育と、これらの遺伝子の発現との関係を調べるため、*par* 遺伝子群の転写量を定量的 RT-PCR によって経時的に定量した。*parWAB* が少なくとも 1 つの転写単位であることを考慮して、*parA* を標的遺伝子として行った。その結果、早期対数増殖期から後期対数増殖期(培養 4-6 時間後)にかけて *parA* の転写量が増大し、その後定常期に入ると減少した(図 4-3)。

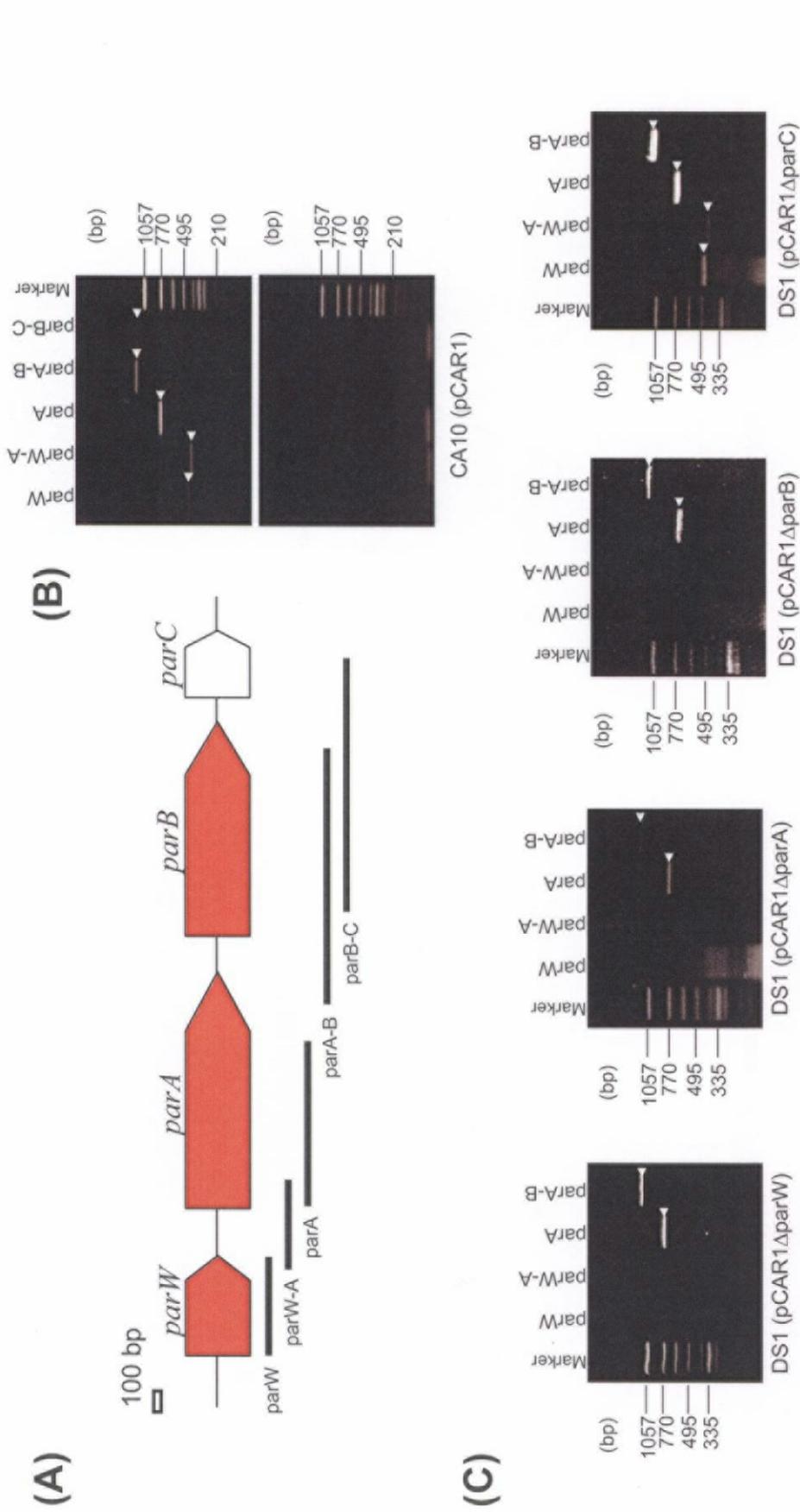


図4-2. *parWABC*遺伝子群のRT-PCRによる転写解析.

- (A) pCAR1上の*parWABC*遺伝子群とRT-PCRに用いたプライマーセットによって予測される増幅断片の位置とサイズ。
 (B) CA10株より抽出した全RNAに対し、(A)に示したプライマーセットを用いてRT-PCRを行った結果。予測された増幅断片の位置を白色の三角形で示した。下の写真は、反応系にDNAの混入がないことを確かめるため、逆転写酵素を加えないネガティブコントロールの結果。
 (C) 各*par*遺伝子に変異を挿入したミニプラスミドを保持する宿主より全RNAを抽出後、(A)に示すプライマーセットを用いてRT-PCRを行った結果。ネガティブコントロールとしては、反応系に逆転写酵素を加えないサンプルを用い、増幅断片が認められないことを確かめた(結果は示さない)。

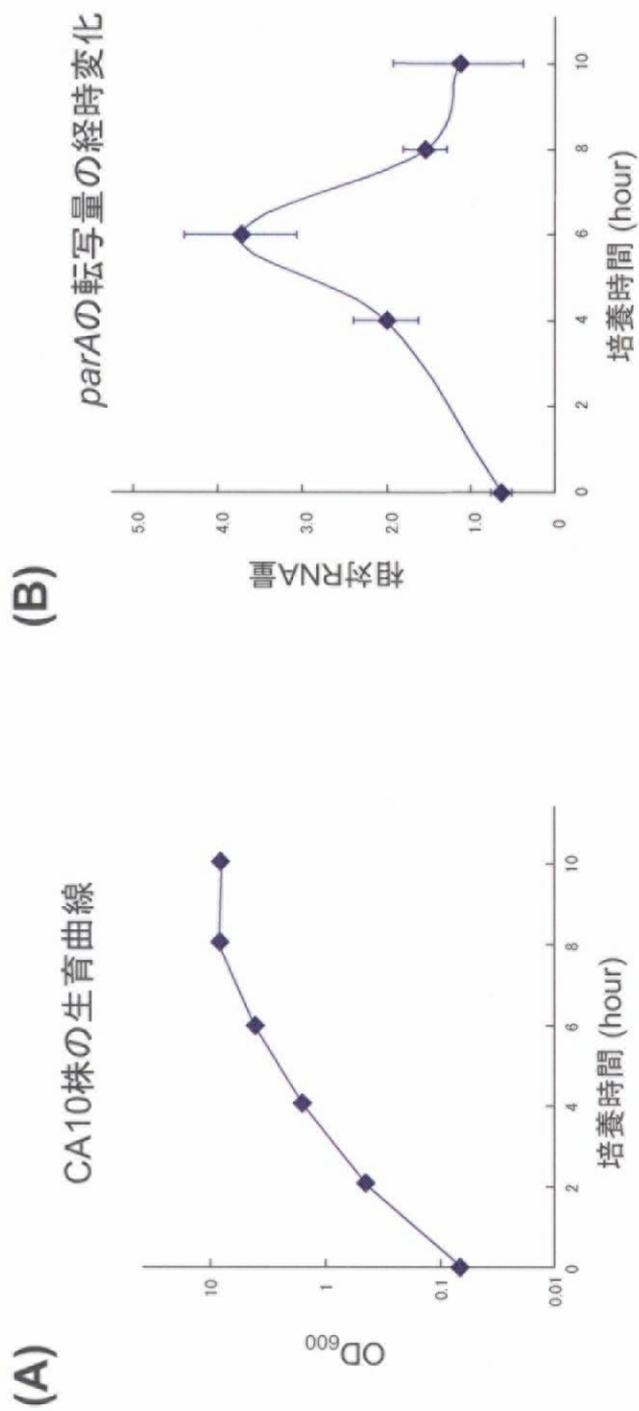


図4-3. pCAR1上*parA*の転写量の経時変化.

(A) CA10株をLB培地で液体培養した際の経時的な濁度 (600 nmの吸光度) 変化.

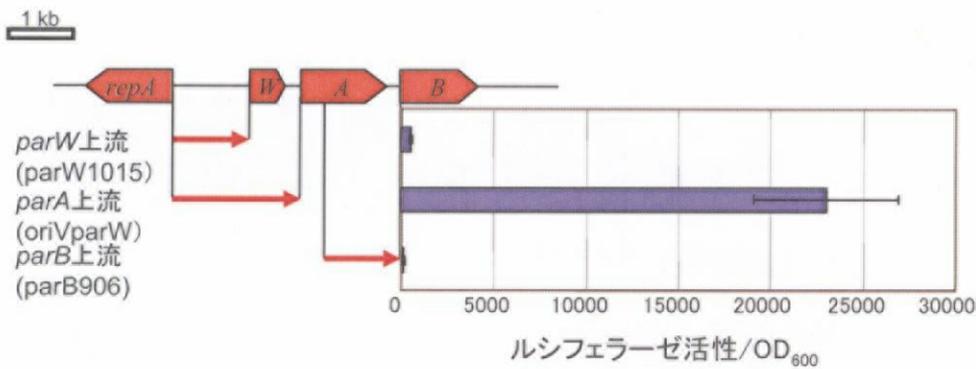
(B) 定量的RT-PCRによる*parA*の転写量の経時変化. 各点のRNAは(A)の生育曲線において培養0, 4, 6, 8, 10時間後のサンプルから抽出した. またサンプルは3連で行い, 全RNAに含まれる*rrn*遺伝子の転写量で補正した相対値で表した.

以上の結果は *P. putida* KT2440 株を用いた際にも同様の結果が得られた(5章で述べる)ため、以降の解析は KT2440 株を宿主として行った。

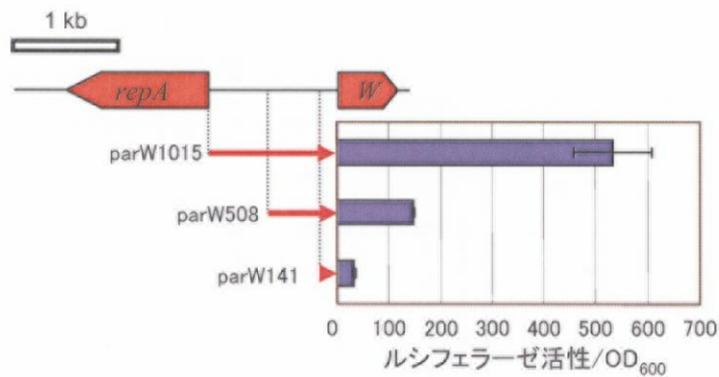
次に、増殖期に依存的な発現をする *parWAB* のプロモーターの決定を試みた。図 4-4A に示すように、*parW*, *parA* および *parB* 開始コドン上流の DNA 断片 (*parW*1015, *oriVparW* および *parB*906) をルシフェラーゼ遺伝子上流に連結したレポータープラスミドを構築して、プロモーター解析を行った。その結果、*parA* 直上流に強いプロモーターが、*parW* 上流に弱いプロモーターが存在することが示唆された(図 4-4AB)。さらに *parA* 上流について、PCR により作製した DNA 断片 (*oriVparW*, *parA*W508~*parA*10) 詳細に同様の解析を行った(図 4-4C)。その結果、*parA*98 と *parA*88 の DNA 断片を用いた場合にルシフェラーゼ活性が大きく変化し、*parA* 上流 98 bp までの領域にプロモーターが存在することが明らかになった(図 4-4C, 以上の結果は *P. putida* DS1 株を宿主とした場合にも同様であった)。

さらに *parA* 上流の転写開始点を決定するために図 4-5A に示す2種類のプライマーを用いてプライマー伸長反応を行った。その結果、図 4-5B に示すように、いずれのプライマーを用いた際にも *parA* の開始コドン上流 25 bp の位置に転写開始点が見出された。転写開始点周辺の塩基配列から、大腸菌の σ^{70} 因子の認識配列と高い相同性を示す -35, -10 配列(5'-TTGAAA-3' および 5'-ATACTA-3')が見出されたため、これを *parA* 上流のプロモーターとし、これを *parAp* と命名した(図 4-5A)。(なお、4-2-1 と 4-2-2 の結果と、4-2-3 の結果の一部は2章の結果とあわせて Shintani *et al.*, in press にまとめて発表した)

(A)



(B)



(C)

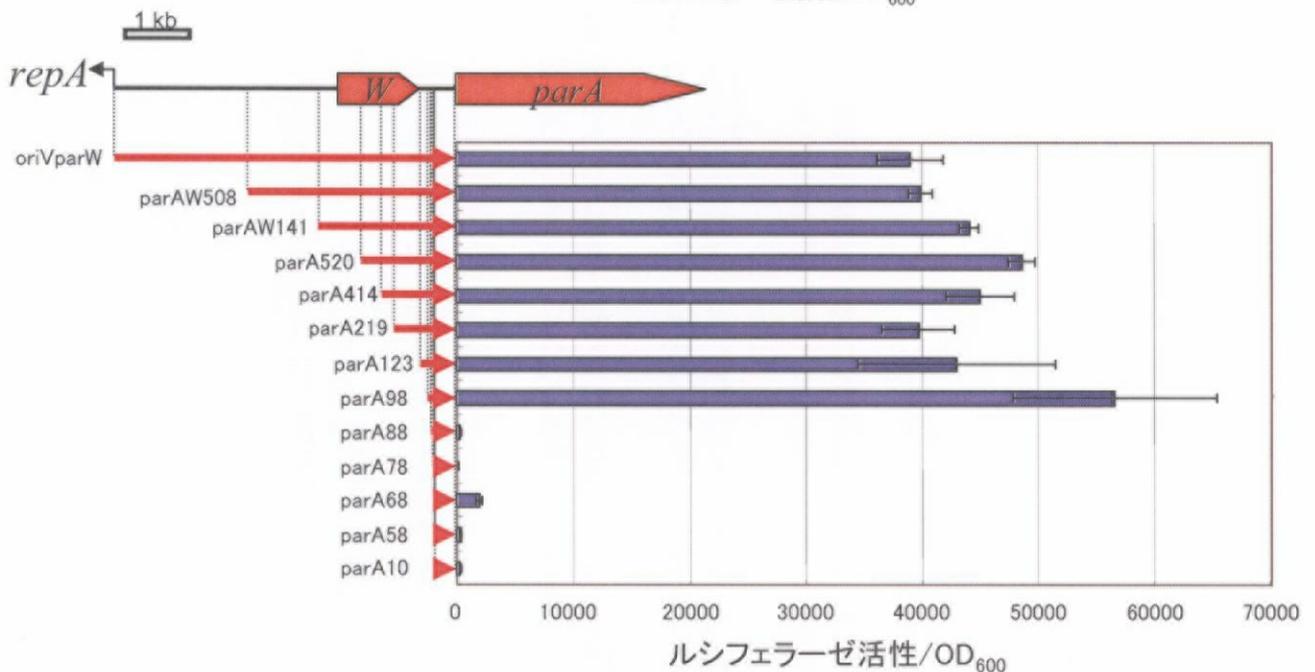


図4-4. 各par遺伝子上流のレポータージーンアッセイによるプロモーター解析.

- (A) 各par遺伝子の開始コドン上流のDNA断片をルシフェラーゼ遺伝子上流に連結させたレポータープラスミドによる形質転換株 (*P. putida* KT2440株) を後期対数増殖期まで培養した際のルシフェラーゼ(OD₆₀₀ 6程度).
- (B) KT2440株内におけるparW上流配列のプロモーター解析(OD₆₀₀ 5.5程度)
- (C) KT2440株内におけるparA上流配列のより詳細なプロモーター解析(OD₆₀₀ 5程度). プラスミドのインサート, parA10-parA123における5'末端の位置は図4-5Aに示した.

4-3 考察

本章では ParW, ParA, および ParB によって pCAR1 が宿主内で安定に保持されることを示した. この事実は, 以前に見出されていた, pCAR1 を栄養培地で22回にわたって継代培養をしても脱落しなかったという現象を裏付けるものである (Urata *et al.*, 2004). また, *par* 遺伝子群を含む約 3.3-kb の領域は, 他の IncP-7 群プラスミド, すなわち pND6-1, pWW53, および pL6.5 においても保存されていた. 従って本章の結果は, IncP-7 群プラスミドに共通した性質を示すことが考えられる.

アミノ酸配列のアライメントの結果, pCAR1 上の *parA*, *parB* 産物は, それぞれ既知のプラスミド上にコードされる Walker タイプの ATPase (ParA) と DNA 結合タンパク質 (ParB) に保存されるドメインを有することが解った (結果は示さない). 実際, *parA* および *parB* の遺伝子型をもつミニプラスミドは *P. putida* DS1 株内で不安定化した (表 4-1). このことは, pCAR1 の ParA, ParB が推定される機能を有することを示唆する. 一方, 各変異プラスミドにおける *parW* の転写が見出されない理由については不明である (図 4-2B) が, *parW* 変異プラスミドが脱落したことで *parW* の転写産物が検出できない可能性もあるため, 定量的 RT-PCR 等によって定量的な議論を行う必要がある. 本章の実験結果から少なくとも *parW* (またはその産物) が pCAR1 の安定性に関与することは明らかである (表 4-1). *parW* がタンパク質として発現しているかどうかについては調べる必要があるが, *parW* の開始コドン 10 bp 上流を中心に, 5'-GGAGGAA-3' という Shine-Dargano 配列と推定される塩基配列が存在しており, 翻訳される可能性は高い. しかし, ParW の機能については未だ不明であり, 相同性検索によっても ParW は機能の推定されたタンパク質と有意な相同性を示さなかった. そこでタンパク質の疎水性についての解析プログラム SOSUI (<http://sosui.proteome.bio.tuat.ac.jp>) を用いたところ, ParW が N 末端に膜貫通領域を有する膜タンパクであると推定された (結果は示さない). この推定結果は他の2つのプログラム, TMPRED (<http://www.ch.embnet.org/wwwtmp/.TMPRED>) や PSPORT (<http://psport.ims.u-tokyo.ac.jp>) を用いた際にも同様に得られた (結果は示さない). 従って, ParW の機能は pCAR1 の分配の際に膜タンパクとして機能する可能性も考えられる.

parW, *parA* および *parB* に変異を導入したプラスミドはいずれも不安定であったが, pBBRparWAB によって部分的に相補された (表 4-1). それに比べて *parW* と *parA* に変異の入ったプラスミドの安定性は pBBRparW または pBBRparA によってわずかに回復したのみ (およそ 14%) であり, pBBRparB は *parB* 変異プラスミドの安定性を全く相補できなかった (表 4-1).

似たような現象が P1 プラスミド (本来は P1 フェージであるが, P1 フェージは溶原化する際, 宿主内でプラスミドとして維持されるため, 本論文では P1 プラスミドと呼称する) の分配機構の研究によって知られている. P1 プラスミドでは, ParA および ParB タンパク質の発現量が宿主内で適正に保たれないと, プラ

スミドが安定に保持されなくなる (Funnell, 1988, Funnell and Slavcev, 2004; Funnell, 2005). 本研究の場合, 相補実験に用いたプラスミドのうち, pBBRparW, pBBRparA および pBBRparB については, 各 *par* 遺伝子が *Pseudomonas* 属細菌内で構成的に発現する *lac* プロモーター (Rist and Kertesz, 1998) の下流にあることを考えると, ParWAB タンパク質それぞれの発現量が, 正しい分配機構が機能するために適正でない可能性がある. 一方, pBBRparWAB は, *lac* プロモーターとは逆向きに *par* 遺伝子群が挿入されているため, pCAR1 上の *par* 遺伝子群のプロモーターを利用して発現していると考えられる. このために 24 時間後の安定性が回復したように見えるのかもしれない(表 4-1). いずれにしても, この相補実験については, *parWAB* 遺伝子をより低コピーのプラスミド上から発現させたり, 染色体 DNA に挿入して, プラスミドのコピー数を揃えたりするなど, さらに実験が必要であろう.

一般に DNA 結合タンパク質 (ParB) の結合する *parS* サイトが *parA* 上流または *parB* 下流に存在するが (Funnell and Slavcev, 2004, Funnell; 2005), pCAR1 の場合, この領域の塩基配列からは候補となりうる配列が見出せなかった. 一方, 同じ *parS* 配列をもつプラスミドが共存する場合, 不和合性が生じ, 片方のプラスミドが脱落する現象が知られている (Kwong *et al.*, 2001). pBBRparWAB を用いた相補実験において, 5回の継代培養を経た後にミニプラスミドは脱落した事実(表 4-1)は, *parWAB* の DNA 断片内に *parS* サイトが存在することを示唆する. さらに, pCARori008(*repA-oriV*のみ有する)の安定性が pBBRparWAB の共存によって回復したことは(表 4-1), pCAR1 の Par タンパク質によって認識される DNA 配列が(pCARori008 上の)*parW* 遺伝子上流に存在することを示唆する. 現在のところ, *parS* サイトは *parW* 上流に存在する可能性が高い. この範囲は 1 kb 未満であるため, *parS* 配列を決定するためには, ParB の発現系を構築し, 精製 ParB 等を用いて *in vitro* で ParB の結合配列を探す実験が必要であろう.

一方, *parA* 開始コドン上流 25 bp の位置に転写開始点が見出されたため, そのプロモーター配列を-10と-35 付近の位置と推定した(図 4-5A). しかし, -35 配列については, プロモーター解析の結果と完全に一致するわけではない. もし-35 配列がプロモーターとして機能するのであれば, レポーターアッセイに用いた DNA 断片のうち *parA78* や *parA88* を含むプラスミドについても活性が上昇するはずである(図 4-4C). これらの活性が低かった原因は今のところ不明であるが, *parA98* から *parA88* の間に重要な配列があるのかもしれない. 一方, *parA68* を用いたレポーターアッセイの結果, プロモーター活性がやや上昇している(図 4-4C). これは, PCR で増幅した *parA68* 断片の 5' 末端に, 人為的に付加した 6 bp の *Bam*HI サイト (5'-GGATCC-3')と, pME ベクターのマルチクローニングサイトの配列 (*Sma*I, 5'-CCCGGG-3')が, -35 配列に相当する位置に存在するため, プロモーター活性が上昇したのかもしれない. pMEGluc は, *luc* 上流にマルチクローニングサイトが存在し, さらにその直上流に転写終結配列が複数存在している. このために, *parA58* より小さな断片を有するプラスミドにおいては, プロモーター活性が上昇しないであろう. *parA* 上流のプロモーターについては, 推定された配列に人為的に変異を導入し, さらに詳細にその活性

を比較する必要がある。

parW 上流の転写開始点については未だ同定されていないが、プロモーター解析の結果、*par* 遺伝子群の転写単位は2つ以上存在することが示唆された。いくつかのプラスミドにおいて、ParA や ParB が DNA 結合能をもち、それ自身 *par* 遺伝子群の転写制御を行うことが知られている (Gerdes *et al.*, 2000, Funnell and Slavcev, 2004)。pCAR1 においても ParA や ParB が *par* 遺伝子群の転写制御を行う可能性があり、*parAp* が ParAB 存在下においてその活性がどのように変化するかを確かめる必要があるだろう。