

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

5-1 緒言

序論でも述べたように, 近年の急速な細菌の全ゲノム配列情報の蓄積と並行して, マイクロアレイによる全遺伝子の網羅的な発現解析が進められている. 本研究では, 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共同作業により開始した. まず pCAR1 を全ゲノム配列が解読された KT2440 株に接合伝達させた菌株 KT2440 (pCAR1) 株を用いて, カスタムマイクロアレイを作製した. 本章では, 特に pCAR1 上の遺伝子発現について顕著に発現量に違いの見られた遺伝子を抽出し, 解析した.

5-2 結果

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

プラスミドの複製や分配を担う遺伝子群は、細胞が分裂する周期に応じて発現する必要がある。また、F プラスミドでは、接合伝達に必要な遺伝子群が宿主の増殖期依存的な発現制御を受けることが知られている (Frost and Manchak, 1998)。こうした点は、プラスミドの基本機能を担う一連の遺伝子が、増殖期依存的に転写制御を受ける可能性を想起する。そこで、異なる増殖期におけるプラスミド上の遺伝子発現の違いについて調べるために、以下のようなマイクロアレイ解析を行った。

マイクロアレイに供する RNA サンプルは、KT2440 (pCAR1) 株 (作製法は材料と方法 M-21 参照) から調製した。培養は、コハク酸ナトリウムを唯一の炭素源とする最少培地を用いて行い、生育曲線を作製して (図 5-1)、早期対数増殖期 (以下 EL) と定常期 (以下 ST) における菌体液より RNA を抽出した。マイクロアレイの解析は材料と方法 M-21, M-22 に記した方法で行い、その結果を表 5-1 と、図 5-2AB に示した (pCAR1 上の全ての遺伝子の結果は巻末の付録2に示した)。有意差検定については t 検定後に Bonferroni 補正した p 値が 0.05 より小さいものを有意とみなして行った。その結果、発現量に違いが認められた遺伝子は 138 の遺伝子であった (表 5-1)。発現量の比が大きかった (2倍以上の比) 遺伝子は、表 5-2 に示したように、*parABC* 遺伝子群と、その下流の ORF67、および転写制御因子をコードすると推定される ORF70 であった。一方、*tra/trh* 遺伝子群を含むその他の遺伝子についてはほとんど変動が見られなかった (図 5-2B, 付録2)。

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

前節の解析により抽出された遺伝子のうち、特に *par* 遺伝子群と ORF70 については、KT2440 (pCAR1) より経時的に抽出した全 RNA に対し定量的 RT-PCR を行ってその発現変動を確かめた。ここで、*parA* の下流の遺伝子 *parBC* については、前章で述べたように同じ転写単位と考えられるので、*parA* の転写量のみ調べた。その結果、図 5-1BC に示すように、双方の遺伝子とも早期増殖期において転写量が増大し、定常期に減少していた (およそ 3~4 倍)。従って、マイクロアレイ解析の結果の妥当性が支持された。

5-2-3 *pmr* 破壊株の作製とマイクロアレイ解析

ORF70 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 (それぞれアミノ酸レベルでの相同性) 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 ORF70 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.

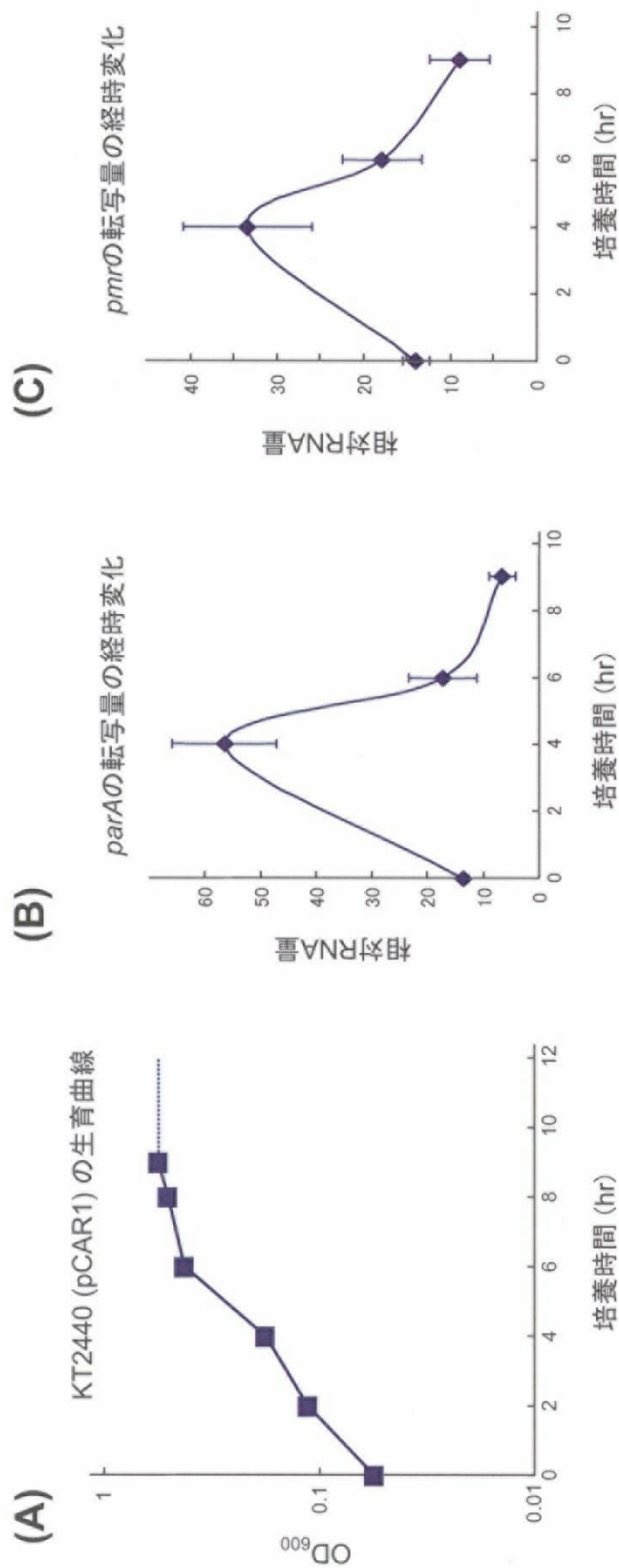


図5-1. KT2440 (pCAR1) 株の生育曲線と*parA*および*pmr*の転写量の経時変化.

(A) KT2440 (pCAR1) 株をコハク酸最少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) および(C) 定量的RT-PCRによる*parA*と*pmr*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, 9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*rnm*遺伝子の転写量で補正した相対値で表した.

表 5-1. 異なる増殖期における KT2440 (pCAR1)株の遺伝子発現の変化

	発現に変化のあった 遺伝子数	t 検定後に抽出された 遺伝子数	Bonferroni 補正後に抽出された 遺伝子数
変化なし	0	0	0
1.5 倍未満	164	112	16
1.5~2.0 倍	18	18	9
2.0~4.0 倍	5	5	5
4.0~8.0 倍	1	1	1
8.0 倍以上	2	2	2
total	190	138	33

表 5-2. 2 倍以上の発現量の差が見出された遺伝子

ST の転写量	EL の転写量	変化倍率	変動	p 値	Bonferroni 補正後 の p 値	遺伝子名
8.18	11.49	9.94	UP	1.11E-16	6.18E-13	<i>parA</i>
8.31	11.34	8.15	UP	4.12E-14	2.29E-10	<i>parB</i>
8.79	10.93	4.41	UP	1.11E-16	6.18E-13	<i>parC</i>
9.34	11.24	3.74	UP	2.70E-14	1.50E-10	<i>tnpA3</i>
9.23	11.07	3.58	UP	0.00E+00	0.00E+00	ORF70 (<i>pmr</i>)
8.21	9.52	2.48	UP	5.65E-13	3.14E-09	ORF67
6.95	8.10	2.22	UP	2.14E-09	1.19E-05	<i>carAa</i>
6.86	7.91	2.07	UP	6.01E-10	3.35E-06	<i>carAa</i>

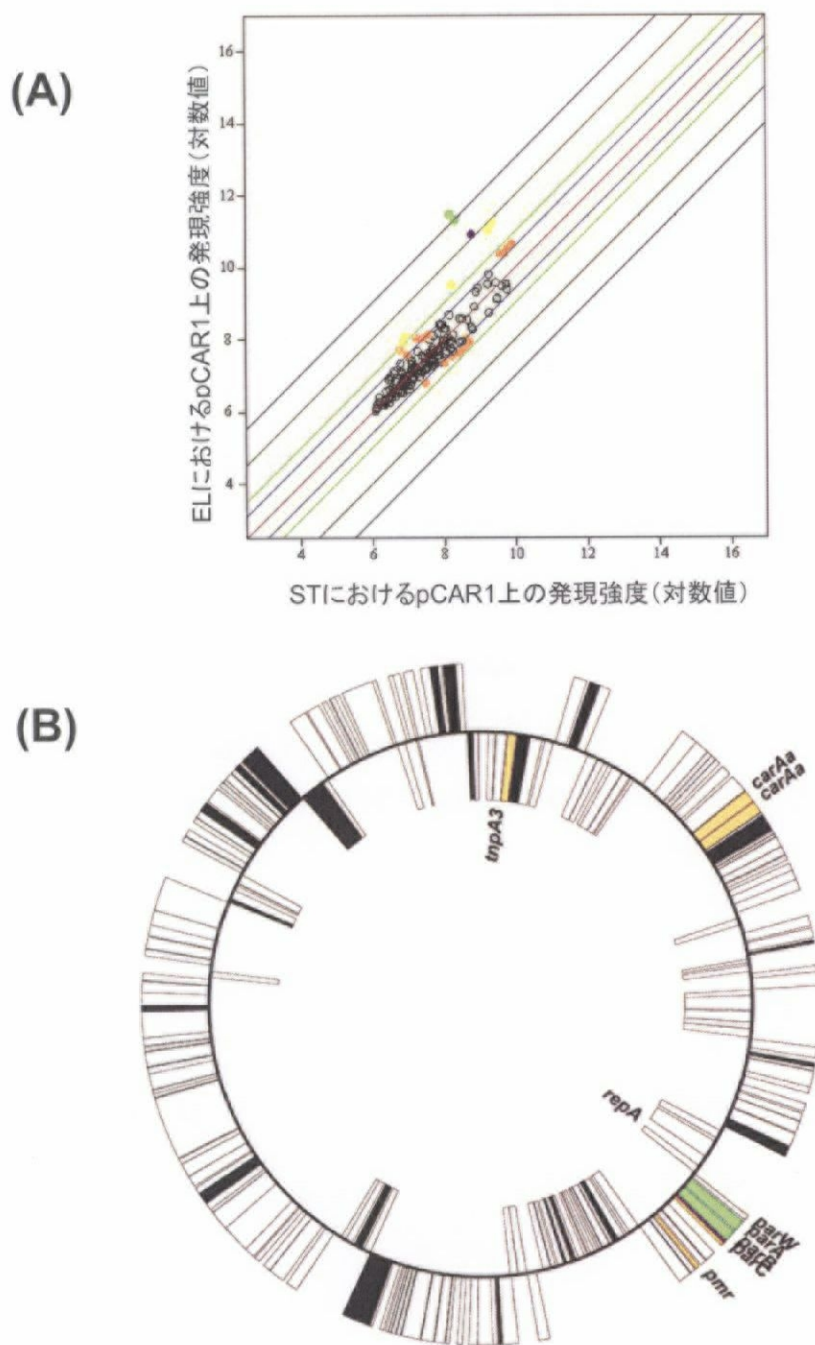


図5-2. KT2440 (pCAR1) 株の異なる増殖期におけるマイクロアレイ解析の結果.

- (A) KT2440 (pCAR1) 株をそれぞれ早期対数増殖期 (EL) と定常期 (ST) まで培養後, RNAを抽出して, マイクロアレイ解析に供した. その結果に基づき, pCAR1上の遺伝子についてその発現変動をプロットした図. 縦軸はELの, 横軸はSTにおける発現強度を示し, 全く発現しない場合に赤線上にプロットされる. 変動に応じて色分けし, 変動倍率が1.5倍未満の場合は黒円で表し, 以下1.5~2.0倍を橙色, 2.0~4.0倍を黄色, 4.0~8.0倍を紫色, 8.0倍以上を緑色で示した.
- (B) pCAR1上で発現変動が認められた遺伝子の位置. pCAR1の全体構造と, 発現に変動が見られた遺伝子を示した. (A)と同じ分類に応じて色分けを行った.

さらに、IncHI プラスミド R27 では、プラスミド上の遺伝子がコードする H-NS タンパク質が接合伝達に必要な *tra/trh* 遺伝子群の発現を制御することが知られている (Forns *et al.*, 2005). 以上の事実から ORF70 産物が pCAR1 の基本機能を担う遺伝子群の転写制御に関与する可能性が考えられたため、ORF70 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 (表 5-3, 図 5-3AB). 以降 ORF70 を *pmr* (plasmid encoded-MvaT-like regulator) と命名した. pCAR1 上の遺伝子のうち, t 検定後 Bonferroni 補正を行って有意な変動を示した遺伝子を表 5-3 に示した. その結果, 特に変動の大きかった遺伝子として *parA* および *parB* が抽出された (表 5-4). また, 機能未知の ORF と, *tnpA3* も抽出された (表 5-4). 一方で, *tra/trh* 遺伝子群については大きな変動が見出されなかった (図 5-3). また, 破壊株と野生株における *parA* および *parB* の転写量を定量的 RT-PCR によって測定したところ, マイクロアレイ解析の結果と一致した (結果は示さない, Terabayashi *et al.*, unpublished).

5-2-4 Pmr と *parAp* のプロモーター活性の関係

前節の結果から, *pmr* 破壊株において *parAB* 遺伝子の転写量が減少した. 4章の結果より *parA* は *parAp* から転写されるため, Pmr が *parAp* からの転写を制御する可能性が考えられる. そこでまず, *parAp* を含む *parA98* 断片を有するレポータープラスミド pME*parA98* を, KT2440 株, KT2440 (pCAR1) 株および KT2440 (pCAR1Δ*pmr*) 株に挿入した. その後, コハク酸最少培地で培養を行い, 3株の早期増殖期におけるプロモーター活性を比較した. その結果, 図 5-4 に示すように, KT2440 株に比べ, pCAR1 を有する KT2440(pCAR1) 株の方が, *parAp* の活性はおよそ3倍程度高かった. 一方, pCAR1 上の *pmr* を破壊した KT2440(pCAR1Δ*pmr*) 株においては, その活性が KT2440 株と同程度まで低下した (図 5-4). 従って, Pmr は *parAp* からの転写を, 直接, あるいは間接的に制御する可能性が示唆された.

表 5-3. KT2440 (pCAR1)株と *pmr* 破壊株における遺伝子発現の変化

	発現に変化のあった 遺伝子数	t 検定後に抽出された 遺伝子数	Bonferroni 補正後に抽出された 遺伝子数
変化なし	0	0	0
1.5 倍未満	159	60	4
1.5~2.0 倍	16	15	5
2.0~4.0 倍	11	11	11
4.0~8.0 倍	3	3	3
8.0 倍以上	1	1	1
Total	190	90	24

表 5-4. 2 倍以上の発現量の差が見出された遺伝子

野生株の 転写量	破壊株の 転写量	変化倍率	変動	p 値	Bonferroni 補正後 の p 値	遺伝子名
10.23	7.12	8.68	DOWN	0.00E+00	0.00E+00	<i>parA</i>
10.30	7.54	6.78	DOWN	1.11E-16	6.18E-13	<i>parB</i>
9.54	6.90	6.24	DOWN	8.22E-15	4.57E-11	<i>pmr</i>
11.88	9.84	4.12	DOWN	0.00E+00	0.00E+00	ORF145
10.35	8.51	3.56	DOWN	2.36E-12	1.31E-08	ORF146
10.72	8.91	3.51	DOWN	2.22E-12	1.23E-08	ORF108
10.41	8.63	3.44	DOWN	4.44E-16	2.47E-12	ORF106
11.16	9.57	3.00	DOWN	0.00E+00	0.00E+00	ORF101
12.04	10.62	2.69	DOWN	0.00E+00	0.00E+00	ORF100
12.00	10.62	2.61	DOWN	0.00E+00	0.00E+00	ORF104
10.92	9.66	2.39	DOWN	1.40E-12	7.76E-09	ORF102
8.04	6.81	2.35	DOWN	2.08E-12	1.16E-08	ORF107
8.42	7.19	2.35	DOWN	1.87E-10	1.04E-06	<i>tnpA3</i>
6.68	5.56	2.16	DOWN	7.49E-13	4.17E-09	ORF34
8.52	7.47	2.06	DOWN	1.37E-07	7.62E-04	ORF105

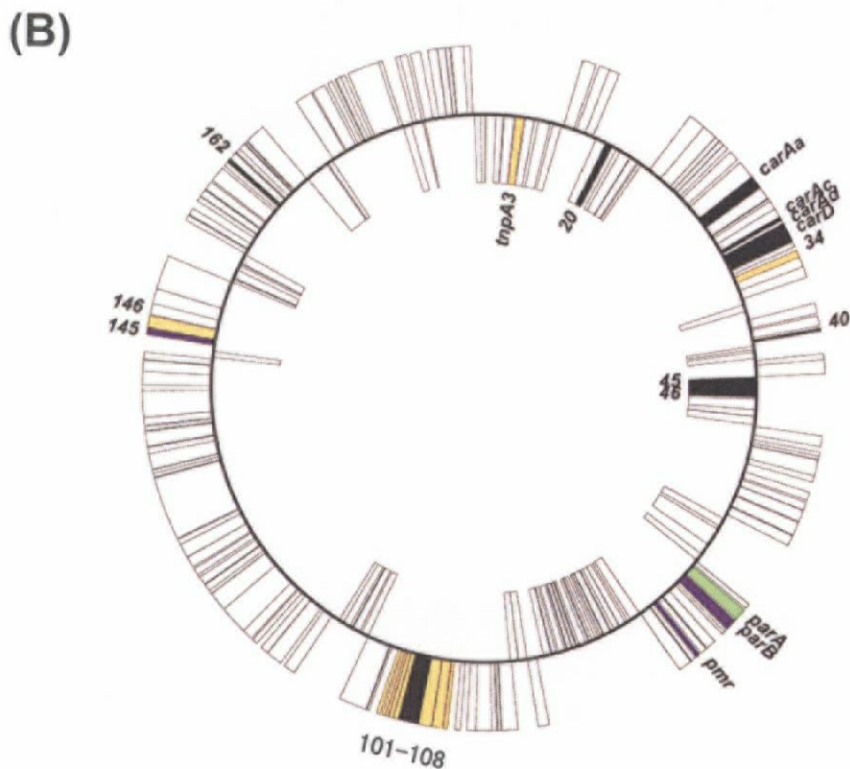
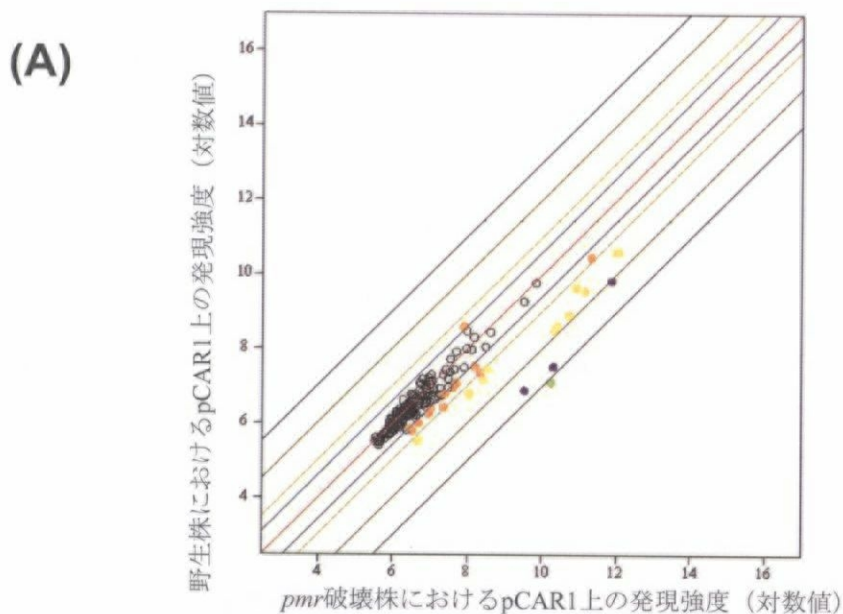


図5-3. KT2440 (pCAR1) 株とKT2440 (pCAR1Δpmr) におけるマイクロアレイ解析の結果.

- (A) KT2440 (pCAR1)株とKT2440 (pCAR1Δpmr)株をそれぞれ早期対数増殖期まで培養後、RNAを抽出し、マイクロアレイ解析に供し、pCAR1上の遺伝子についてその発現変動をプロットした図。縦軸は野生株の、横軸は破壊株における発現強度を示した。全く発現しない場合に赤線上にプロットされる。変動に応じて色分け、倍率が1.5倍未満の場合は黒円で、1.5~2.0倍を橙色、2.0~4.0倍を黄色、4.0~8.0倍を紫色、8.0倍以上を緑色で示した。
- (B) pCAR1上で発現変動が認められた遺伝子の位置。pCAR1の全体構造と、発現に変動が見られた遺伝子を示した。(A)と同じ分類に応じて色分けを行った。

*pmr*の存在と*parAP*活性の関係

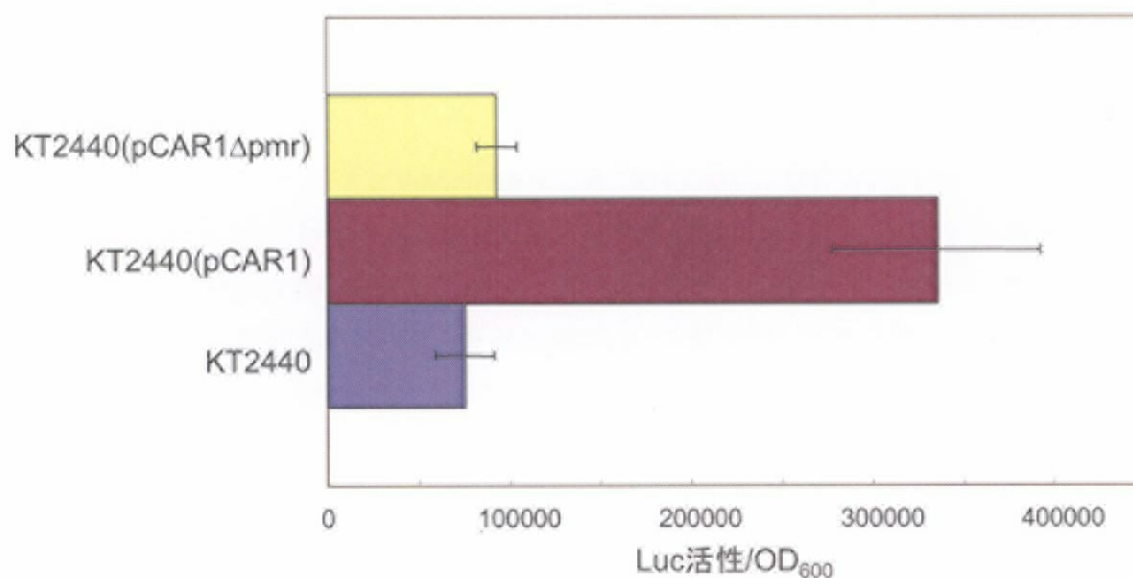


図5-4. KT2440株, KT2440 (pCAR1)株, KT2440(pCAR1Dpmr)株における*parAP*活性.

pCAR1を保持する菌株と*pmr*破壊株に4章で用いたレポータープラスミドを挿入して, *parAp*の活性をによって比較した. サンプルは各菌株をコハク酸を唯一の炭素源とする培地でOD₆₀₀ 0.2~0.3まで培養して調製し, 少なくとも3連で行った.

5-3 考察

本研究では、KT2440 株を pCAR1 の宿主とした場合の、pCAR1 上の全遺伝子のマイクロアレイ解析を行い、分配を担う遺伝子 *parAB(C)* と、機能未知の転写制御因子 *pmr* の発現が宿主の増殖期に応じて比較的大きく変動していることを見出した。プラスミドが安定に保持されるために、その分配は細菌が分裂する度に機能すると考えられるため、宿主がもっとも増殖する時期に発現が増大するという結果は理に適っていると考えられる。また、その下流の *parC* と ORF67 については、*parA* 上流にあるプロモーターからの転写が終結しないことを示唆している。

結果の項でも述べたが、F プラスミドの接合伝達に関する遺伝子群は、宿主の生育に応じて転写レベルで厳密に制御されており、早期対数増殖期に転写が活性化され、定常期になると抑制される (Frost and Manchak, 1998)。これに対して、マイクロアレイ解析の結果、pCAR1 の接合伝達に関する *tra/trh* 遺伝子群については、早期対数増殖期と定常期を比べてもその発現がほとんど変動していなかった (図 5-2B, 付録2)。この結果は、3章の考察で述べた結果を裏付けるもので、少なくとも転写レベルにおいて、*tra/trh* 遺伝子群が生育依存的な制御を受けないことを示唆する。

プラスミド上の挿入配列 ISPre2 における転移酵素をコードする *tnpA3* の発現については、異なる増殖期においても、*pmr* を破壊しても変動が見られた (図 5-2B, 5-3B)。*tnpA3* は *tnpA1* および *tnpA2* (この 2 つの遺伝子は 100% 同一の配列をもつ) と *tnpA4* 高い相同性を示し (塩基配列レベルで 88%)、共に ISPre1 (pCAR1 上に 3 コピー存在する) と ISPre2 という IS5 ファミリーに属する挿入配列内の転移酵素である。興味深いことに *tnpA1*, *tnpA2*, *tnpA3* の発現量はほとんど変化しなかった。IS5 の転移を制御する機構についてはほとんど知られておらず、なぜ *tnpA3* のみが発現に変動が見られたのか、今後の解析が待たれる。

また *carAa* についても異なる増殖期においてその発現に変動が見られた。*carAa* の転写は 2 つのプロモーターによって制御されることが解かっている (Urata *et al.*, 2004, Miyakoshi *et al.*, in press)。AntR 制御下にあり、アントラニル酸存在下で発現が活性化する P_{ant} と構成的な発現をする P_{carAa} が存在し、 P_{ant} はコハク酸で培養した場合には抑制されているため、今回観察された発現変動は P_{carAa} からの転写によるものであろう。 P_{carAa} は大腸菌の σ^{70} 因子の結合配列と相同性を示し、早期対数増殖期でその活性が増大すると推定される (Miyakoshi *et al.*, in press)。従って、*carAa* の発現が早期対数増殖期において増大するという今回の結果と合致する。

Pmr は *P. aeruginosa* PAO1 株由来の MvaT family の *mvaT* と相同性を示した。このタンパク質は *P. mevaronii* におけるメバロン酸代謝を担う酵素遺伝子群の転写を正に制御する因子として単離された

(Rosenthal and Rodwell, 1998). その後, *Pseudomonas* 属細菌の染色体上に複数のホモログが見出された. また MvaT については, 推定された立体構造から, 大腸菌の制御因子として知られる H-NS タンパク質 (histone like nucleoid-structuring protein または heat-stable nucleoid-structuring protein) との類似性が提唱されている (Tendeng *et al.*, 2003). H-NS タンパク質は大腸菌の核様体構造の研究に端を発し, これまでのところ *hns* 変異は多数の遺伝子発現に影響を及ぼすことが知られており, 大腸菌におけるグローバルな遺伝子発現を特に負に制御する重要な転写因子であることが明らかになっている (Dorman, 2004, Rimsky, 2004). また, H-NS タンパク質はコンセンサス配列を認識して DNA に結合するのではなく, 湾曲 DNA に対して優先的に結合する特性があると考えられている (Dorman, 2004, Rimsky, 2004).

H-NS タンパク質はプラスミドの接合伝達についても影響を及ぼすことが知られ, F プラスミドを有する大腸菌において *hns* を破壊すると, 定常期においてその接合伝達頻度が上昇する (Will *et al.*, 2004). また IncHI プラスミド R27 においては, *hns* ホモログがプラスミド上からも見出され, その破壊によって接合伝達頻度が上昇する (Forns *et al.*, 2005). H-NS タンパク質や MvaT は, そのタンパク質自身と, またはそのホモログと2量体を形成して DNA に結合することが知られている (Dorman, 2004, Rimsky, 2004) が, R27 では, プラスミド上の *hns* 産物が染色体上から発現する H-NS タンパク質と相互作用をすることが示唆されている (Forns *et al.*, 2005). さらに, H-NS タンパク質や MvaT はプラスミドの様々な領域に結合し, その形状を変化させることが pUC ベクターを用いて *in vitro* の実験でも確かめられている (Dame *et al.*, 2000, 2005).

以上の様に, これまでに知られている H-NS タンパク質や MvaT の性質は Pmr についても同様にあてはまるかもしれない. しかし, *Pseudomonas* 属細菌のプラスミド上から *hns* と相同性を示す遺伝子がみつかった例は無く, プラスミド上の他の遺伝子における転写制御に関与するのかどうかや, 染色体上から発現するタンパク質と相互作用するのかどうかなど, まだ解らない点が多い. 本章では pCAR1 上の *pmr* を破壊し, その破壊株について, 野生株とマイクロアレイ解析を行って, 転写レベルの変化を調べた. その結果, pCAR1 上において *parAB* 遺伝子の発現が大きく減少していた. また *par* 遺伝子群上流のプロモーター *parAp* の活性も破壊株において減少していた. しかし, Pmr が直接 *par* 遺伝子群の転写制御を行うかどうかはまだ不明であるが, これまでに, プラスミドの分配を担う酵素遺伝子群が H-NS 様タンパク質によって制御される現象が報告された例は無く, さらなる解析が待たれる.

興味深いことに, *pmr* 破壊株においては, 機能未知の ORF145, ORF146 と, ORF100 付近の遺伝子発現が2倍以上低下していた(図 5-3B). また変動は小さいものの *car* 遺伝子群付近の遺伝子発現が低下していた(図 5-3B). この原因については今のところ不明であるが, プラスミド上のある DNA 領域に存在する一連の遺伝子の発現が低下することは, Pmr が H-NS タンパク質のようにプラスミドの構造を変化させることで生じているのかもしれない. 今後, *pmr* 破壊株に対して Pmr を相補した場合にそれぞれの遺伝子の

発現量がどのように変動するのかについて調べる必要がある。

また, *pmr* を破壊した際に, pCAR1 上のほとんどの遺伝子はその発現が低下していた。既知の報告例によれば, H-NS タンパク質や MvaT が転写活性化因子として作用することは知られていない (Dorman, 2004, Rimsky, 2004)。一方, プラスミドの *par* 遺伝子の発現が *pmr* の破壊によって低下していることを考慮すれば, 集団内におけるプラスミドのコピー数が低下している可能性がある。今後, プラスミドのコピー数についても調べながら, さらに詳細に個々の遺伝子について解析する必要があるだろう。

総括と展望

本研究では、*Pseudomonas resinovorans* CA10 株より単離された CAR 分解プラスミド pCAR1 について、その全塩基配列を決定するとともに基本的性質(複製・保持, 接合伝達)について詳細に解析を行った。また、pCAR1 を全ゲノム配列の明らかになっている *P. putida* KT2440 株に接合伝達させた菌株, KT2440 (pCAR1) 株を用いたマイクロアレイ解析を開始した。

第2章で示したように pCAR1 の属する不和合性群を IncP-7 群と決定した。分解プラスミドを含む IncP 群プラスミドのうち、これまでに塩基配列が解読された例は、表 6-1 に示す IncP-1, IncP-4, IncP-6 および IncP-9 群のみであり、pCAR1 は IncP-7 群プラスミドとして、塩基配列情報が明らかになった世界で初めての例である。また、IncP-7 群プラスミドに特徴的な *repA* と *oriV* 領域の塩基配列が明らかにした。現在までのところ、IncP-7 群プラスミドは *Pseudomonas* 属細菌においてのみ複製される、狭宿主域プラスミドと考えられるが、今後さらに RepA と *oriV* 領域の結合性をより詳細に酵素学的に解析することで、その複製開始反応の宿主特異性が明らかになると考えられる。

第3章で述べたように、pCAR1 は転移性のクラスIIトランスポゾン Tn4676 を有する。また実際に Tn4676 を染色体 DNA 上に保持する菌株も見出した。さらに pWW53 上からもクラスIIトランスポゾンが見出されており (Tsuda and Genka, 2001, Yano and Tsuda, unpublished), IncP-7 群の薬剤プラスミド Rms148 上からも、Tn4676 の転移酵素と解離酵素をコードする *tnpAcCST* を含むトランスポゾン様の構造が見出されている (Genka and Tsuda, unpublished)。こうした事実は Tn4676 が IncP-7 群プラスミドの基本骨格に転移したことによって現在の pCAR1 の構造になった可能性を示唆する。興味深いことに、これまでに報告された Tn4652 サブファミリーに属するトランスポゾンの多くが、分解プラスミド上から見出されており (Tsuda and Iino, 1987, 1988, 1990, Tsuda *et al.*, 1989, Tsuda and Genka, 2001, Nojiri *et al.*, 2004), 分解系遺伝子群と、これらのトランスポゾンの水平伝播に何か関係があるのかもしれない。

pCAR1 は受容菌の幅は狭いものの自己伝達性を示した。またその接合伝達頻度は多くの場合供与菌あたり 10^{-5} 以下と、他の IncP-1 や IncP-9 群プラスミドに比べると低いと考えられる (Adamczyk and Jagura-Burdzy, 2003, Williams and Muray, 1974)。しかし、pCAR1 は由来を同じくする菌株(例えばプラスミド脱落株)に対しては、供与菌あたり 10^{-1} と高い接合伝達頻度を示した(3章)。これは供与菌と受容菌における制限・修飾系が同一であるために生じたと考えられる。また、宿主がたとえ pCAR1 を脱落しても、脱落株にプラスミドを再度接合伝達することによりプラスミド自身を残せるため、生存戦略上有利なように感

じられる。IncP-7 群プラスミド Rms148 は古くから接合伝達能があることが知られているが (Thomas and Heines, 2004), 本研究のサザン解析によって, pCAR1 と良く似た接合伝達機構を有することが示唆された。その一方で, 他の IncP-7 群プラスミド, pND6-1 や pWW53 上からは接合伝達に必要な遺伝子が見出されていない (Li *et al.*, 2004, Yano and Tsuda, unpublished). pCAR1 の接合伝達に必要な遺伝子群は 40 kb にもわたる領域に存在し, これは pCAR1 全長のおよそ 20%にも上る。もしもこの遺伝子群産物が, 宿主にとって効率的に機能しないとすれば, かなりの負担になると予想される。従って, 本研究で行ったような実験室内の接合実験では見出せなかったが, pCAR1 の *tra/trh* 遺伝子群が存在することで生存上有利な(その接合伝達頻度を上昇させるような)条件があるのかもしれない。一方で, *repA-oriV* の上流に存在する *parWABC* 遺伝子群はいずれのプラスミド上にも存在する。第4章で示したように, *parWAB* 産物は pCAR1 に特異的な安定性を付与させていると考えられる。IncP-7 群プラスミドは接合伝達によらなくても, 宿主内で安定に保持される機構があるため, 実験室内で培養する限りでは, 接合伝達に關与する遺伝子群は必要ないのかもしれない。CA10 株が活性汚泥から単離されたことを考えれば, こうした実環境中での接合伝達性についても調べる必要があるだろう。

プラスミドの分配機構において, ParA, ParB および *parS* がそれぞれどのように機能するのかについては, 最も研究が進んでいる P1 プラスミドにおいてさえ細かい点については全くわかっていない。最近, ParB の一部とその結合サイトである *parS* の複合体について X 線立体構造解析が行われ, その構造が明らかになった (Shumacher and Funnell, 2005)。その結果, これまでほとんど不明であった実際の分配機構(どのように ParB がプラスミド DNA に結合し, また ParA と複合体を形成するのか)について, 構造レベルで少しずつ解明されつつある。また ParA や ParB の他に, 細胞分裂の際にプラスミドを娘細胞に正確に移動させるために, プラスミド DNA とそれに結合する ParAB を, 細菌の細胞膜に結合させ, プラスミドの細胞内における位置を決めるためのタンパク質の存在が提唱されている (図 6-1, Funnell and Slavcev, 2004)。しかし, これまでのところそのようなタンパク質や, それに関する遺伝子についても全く情報がない。pCAR1 の ParW が本当に膜タンパク質として機能するのであれば, プラスミドの位置を決めるタンパク質として寄与するのかもしれない。

以上のように本研究によって, IncP-7 群プラスミドの基本的な性質を明らかにすることができた。本研究発表後, 塩基配列の相同性から IncP-7 群に属すると推定されたプラスミドを表 6-2 に抜粋した。このうちナフタレン分解菌 *Pseudomonas* sp. ND6 株由来の pND6-1 と, トルエン・キシレン分解菌 *P. putida* MT53 株由来の pWW53 についてはその全塩基配列が解読されている (Li *et al.*, 2004; Yano and Tsuda, unpublished)。これまでに知られる IncP-7 群に属するプラスミドは, 少なくとも *repA-oriV-parWAB* 遺伝子群を有しており, 現在のところ, IncP-7 群の基本骨格として提唱できるだろう。また, IncP-7 群プラスミドの安定性については pCAR1 と同様の性質を示すと考えられる。今後さらに IncP-7 群プラスミドの pWW53 や

Rms148 の全塩基配列情報が公開されれば、IncP-1 群、IncP-9 群とは全く異なる性質を持つ、第3の分解プラスミド群として、IncP-7 群プラスミドの基本骨格が明らかになるだろう。

マイクロアレイ解析の結果 pCAR1 上から見出された *pmr* は大腸菌における H-NS 様の転写制御因子をコードすると考えられ、その破壊により、*par* 遺伝子群の転写量が大きく減少した。この結果は、*pmr* を破壊することでプラスミドの分配が正常に行われられない可能性を示唆する。このような現象は、これまでに報告例が無く、Pmr と *par* 遺伝子の転写の関係をより詳細に調べる必要がある。また、本論文では述べなかったが、*pmr* 破壊株における染色体上の遺伝子のうち、これまで全く機能未知の遺伝子に大きな発現変動が見出され、宿主内でプラスミド上の遺伝子(産物)と相互作用する可能性が示唆された。また、KT2440(pCAR1)株の炭素源をカルバゾールにした場合においてもマイクロアレイ解析を行っており、この際も *pmr* の発現が有意に減少した。この結果は、Pmr が宿主の栄養条件の変化にも対応して遺伝子発現を制御する可能性を示唆している。

最近、MvaT ホモログが、バイオフィーム形成、xenobiotics 代謝系等に関与する様々な遺伝子の転写を制御するという報告例が増加している (Valet *et al.*, 2004, Resacalli *et al.*, 2004)。P. aeruginosa PAO1 株では、MvaT とそのホモログである MvaU が互いにホモダイマーやヘテロダイマーを形成することで、バイオフィーム形成に重要な役割を果たす遺伝子の転写制御をすることが判明している (Valet-Gely *et al.*, 2005)。一方、KT2440 株は MvaT ホモログが五個存在するが、このうち、今回見出された Pmr との相互作用が行われているのか興味もたれる。今後、Pmr と染色体上の遺伝子由来の MvaT ホモログとの酵素学的な解析を行い、宿主がプラスミドを有することでどのような遺伝子が発現するのか、より詳細に研究をしていきたい。また、pCAR1 を脱落させた CA10dm4 株に対しては、いずれの供与菌からもその接合伝達頻度が高かった。この理由については現在のところ全く不明であるが、CA10dm4 株が IncP-7 群をたまたま「捉える」ことができた、特別な菌株なのかもしれない。このような点を踏まえて、異なる宿主における pCAR1 上の遺伝子発現の変化を検出できれば、可動性遺伝因子による水平伝播現象についてさらに理解が深まると期待される。

ところで、ダイオキシン骨格をも分解することが可能な CAR 分解タンパク質をコードする *car* 遺伝子群が環境中でどのように水平伝播し、また定着するのかを理解することは、これらの遺伝子を利用したバイオレメディエーションへの応用を考える上でも重要である。本研究の結果からは、CA10 株の *car* 遺伝子ホモログのほとんどが pCAR1 や Tn4676 を介して伝播しているように思われる。しかし IncP-7 群プラスミドに関しては、プラスミドの宿主域が狭く、その接合伝達頻度も低いと考えられる。このような性質は、広宿主域プラスミドと考えられている IncP-1 および IncP-9 群プラスミドとは大きく異なる。実際に、近年多くの分解プラスミドが IncP-7 群に属することがわかってきたことを考慮すると、IncP-7 群プラスミドにも、これら2つのプラスミド群とは違った「生き残り」に有利な点があるはずである。本研究で明らかにした pCAR1 の接合伝

達やプラスミドの宿主域については、いずれも実験室レベルで単離され、培養できる細菌を用いて行った。しかし実際に pCAR1 が見出された活性汚泥や土壌といった様々な生物が存在する環境においては、我々の未だ知らない細菌が数多くいるはずである。従って、IncP-7 群プラスミドの宿主域が「狭い」と考えられるのは「既知の細菌内では」という限定がついており、実際にはもっと「広い」のかもしれない。また、接合伝達頻度についても同様である。pCAR1 の接合伝達頻度は「既知の細菌に対しては」低いだけなのかもしれない。繰り返しになるが、IncP-1 群プラスミドが広宿主域で高い接合伝達頻度をもつという報告も、「既知の細菌に対しては」という限定内の事実である。従って、性質の全く異なる不和合性群に属するプラスミドが、実際の環境中でどのような挙動を示すのか、時間を追ってモニタリングできれば、より面白い結果が得られるかもしれない。本論文には掲載できなかったが、我々は既に実験を試みており、水平伝播現象が、実験室レベルで行う場合と、実環境に近づけた条件下で行う場合で、その結果が大きく異なる可能性が示されつつある。同様に、IncP-7 群プラスミドには、宿主内で安定に保持される機構は確かに存在しているが、この安定性については IncP-1, IncP-9 群プラスミドを中心に、他の不和合性群に属するプラスミドと、実験室レベルにおいて、また実環境に近づけた条件においても比較する必要があるだろう。

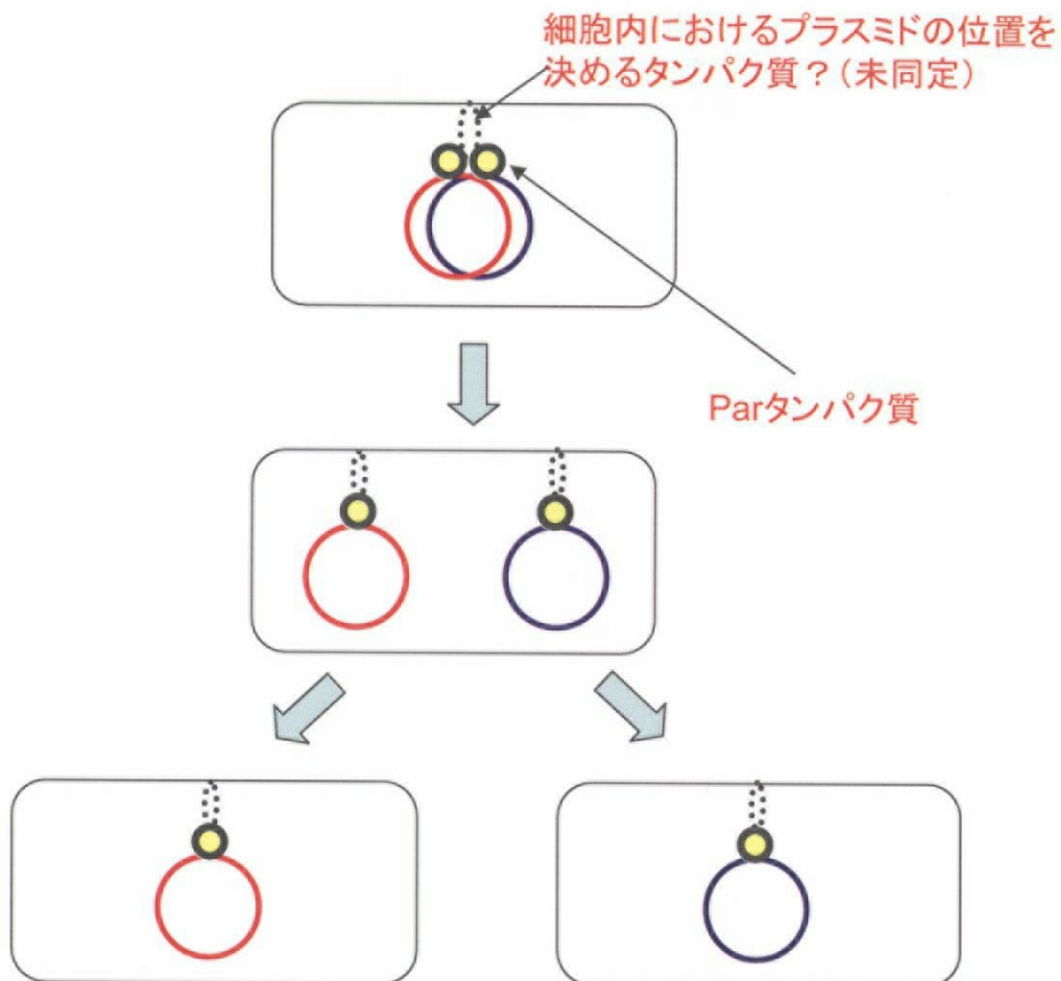


図6-1. 細胞分裂時におけるプラスミドの分配の模式図.

現在提唱されているプラスミドの分配の模式図. Parタンパク質がプラスミドの*parS*サイトに結合し、分配がなされる. このとき、細胞内においてプラスミドの位置を決定するタンパク質が存在すると考えられている(図中点線, Funnell and Slavcev, 2004より一部改変).

表 6-1. 全塩基配列が解読された IncP プラスミド

プラスミド	サイズ (kb)	不和合性群	文献
RP4	60	P1(P1 α)	Pansegrau <i>et al.</i> , 1994.
pTB11	69	P1(P1 α)	Tennstedt <i>et al.</i> , 2005
pADP-1	109	P1(P1 β)	Martinez <i>et al.</i> , 2001.
pB2	61	P1(P1 β)	Heuer <i>et al.</i> , 2004.
pB3	56	P1(P1 β)	Heuer <i>et al.</i> , 2004.
pJP4	80	P1(P1 β)	Trefault <i>et al.</i> , 2004.
pB4	79	P1(P1 β)	Tauchi <i>et al.</i> , 2003.
pB8	57	P1(P1 β)	Schlüter <i>et al.</i> , 2005.
pB10	65	P1(P1 β)	Schlüter <i>et al.</i> , 2003.
pUO1	65	P1(P1 β)	Sota <i>et al.</i> , 2003.
R751	53	P1(P1 β)	Thorsted <i>et al.</i> , 1998.
pEST4011	70	P1(P1 γ)	Vedler <i>et al.</i> , 2004.
pDN1	5.1	P4	Whittle <i>et al.</i> , 2000.
pIE1130	11	P4	Smalla <i>et al.</i> , 2000.
RSF1010	8.7	P4	Scholz <i>et al.</i> , 1989.
Rms149	57	P6	Nojiri <i>et al.</i> , 2001, Maeda <i>et al.</i> , 2003
pDTG1	81	P9	Dennis and Zylstra, 2004.
pWW0	117	P9	Greated <i>et al.</i> , 2002.

表 6-2. これまでに報告された IncP-7 プラスミド(表 1-1 の抜粋)

プラスミド	由来菌株	サイズ(kb)	文献
pCAR1	<i>P. resinovorans</i> CA10	199	Maeda <i>et al.</i> , 2003.
pFME	<i>P. fluorescens</i> FME4	77	Izmalkova <i>et al.</i> , 2005.
pME5	<i>P. fluorescens</i> FME5	80	Izmalkova <i>et al.</i> , 2005.
pND6-1	<i>Pseudomonas</i> sp. ND6	102	Li <i>et al.</i> , 2004.
pNK33	<i>P. fluorescens</i> NK33	100	Izmalkova <i>et al.</i> , 2005.
pNK43	<i>P. fluorescens</i> NK43	123	Izmalkova <i>et al.</i> , 2005.
pOS18	<i>P. fluorescens</i> OS18P	135	Izmalkova <i>et al.</i> , 2005.
pOS19	<i>P. fluorescens</i> OS19P	122	Izmalkova <i>et al.</i> , 2005.
pWW53	<i>P. putida</i> MT53	107	Keil <i>et al.</i> , 1985, 1987.

材料および方法

M-1. 菌株および培地

本研究で使用した菌株を表 M-1 に示した。また通常の培地としては 2×YT, あるいは LB 培地 (Sambrook and Russell, 2001) を用い, 平板培地を作成する際には細菌培地用の精製寒天末 (nacalai tesque, Tokyo, Japan) を終濃度 1.6% (wt/vol) となるように添加した。選択培地には ampicillin (Ap), carbenicillin (Cb), chloramphenicol (Cm), gentamicin (Gm), kanamycin (Km), rifamycin (Rif), tetracycline (Tc), trimetoprim (Tm), および streptomycin (Sm) を加え, それぞれ終濃度は Ap; 50, Cb, 100, Cm; 30, Gm; 15, Km, 50, Rif; 25, Tc, 12.5, Tm, 25, Sm; 450 (いずれも単位は $\mu\text{g/ml}$) となるように添加した。また, CAR 資化菌を選択する培地としては CAR を dimethylsulfoxide (DMSO) に 10 mg/ml となるように溶解させ, 疎水性フィルターで濾過滅菌後, 終濃度 (100 $\mu\text{g/ml}$) となるように培地に添加し, これを加えていない培地と重層した寒天培地を用いた。

培養温度は特に明記しない限り, 大腸菌については 37°C, その他の菌株については 30°C で行った。試験管による振盪培養は 300 stroke/min, 坂口フラスコおよび三角フラスコによる培養は 120 rpm で行った。

M-2. 試薬, 酵素

本研究で使用した試薬の調整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クエンス (杉浦昌弘編, 1989) に従った。本研究で使用し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), ニッポンジーン, ロシュ・ダイグノスティクス社 (Roche Diagnostics) のいずれのものかを購入し, 説明書の指示に従って用いた。DNA 断片の連結は Ligation High (Toyobo) を用いて, 操作はその添付のプロトコールに従って行った。

M-3. 使用したオリゴヌクレオチド

本研究で使用したオリゴヌクレオチドを表 M-2 にまとめた。各オリゴヌクレオチドの合成は, インビトロジェン株式会社 (Invitrogen), シグマアルドリッチジャパン (Sigma), および日清紡研究開発センターのいずれかに依頼した。

M-4. DNA および RNA の取り扱い

菌株からのプラスミド (大きさが 20 kb 程度まで) の大腸菌から抽出は alkaline lysis 法 (Sambrook and Russel, 2001) で行った。

菌株からの全 DNA の調製は Current Protocols in Molecular Biology (Ausubel *et al.*, 1990) の方法を以下に示すように, 一部改変して行った。

試薬

- ・ Hexadecyltrimethyl ammonium bromide (CTAB)/NaCl solution

4.1% (w/v)	NaCl
10% (w/v)	CTAB

操作

- ① 各菌株を試験管で 5 ml の LB 培地を用いて培養し, 2 ml の培養液集菌後, 567 μl の TE buffer に懸濁した。
- ② 10% SDS を 30 μl , proteinase K solution を 3 μl 加えて, 小型回転培養器 (TAITEC RT-5) で 30 分間穏やかに (強度の目盛りは 3~4) 攪拌した。その後 37°C で 1 時間インキュベートした。以後攪拌はすべてこの小型回転培養器を用いて同様に行った。
- ③ 5 M NaCl を 100 μl 加えて 15 分間攪拌し, あらかじめ 65°C に温めた CTAB/NaCl solution を 80 μl 加えて 15 分間攪拌した。その後, 65°C で 10 分間インキュベートした。
- ④ クロロホルムを 800 μl 加え 15 分間攪拌後, 室温で遠心 (13,000 rpm) し, 上層 700 μl を抽出した。
- ⑤ フェノール/クロロホルム抽出を行った後, 2-プロパノールを 700 μl 加え, 30 分間攪拌した後, 13,000 rpm, 室温で 10 分間遠心した。その後 70% エタノールで塩を除去し, 1 $\mu\text{g/ml}$ の RNaseA を含む TE buffer 1 に溶解して使用した。

表 M-1. 本論文で用いた細菌.

バクテリア		諸性質	文献
<i>Burkholderia</i> sp. PJ310		Polyaromatic hydrocarbon-degrading bacterium isolated from soil, naturally Km ^r	Widada <i>et al.</i> , 2002.
<i>Burkholderia</i> sp. PJ310GK		Derivative strain of PJ310 with introduced Gm ^r gene	Shintani <i>et al.</i> , 2005a.
<i>C. testosteroni</i> IAM12419		Type strain, naturally Km ^r	IAM Culture Collection.
<i>C. testosteroni</i> IAM12419GK		Derivative strain of IAM12419 with introduced Gm ^r gene	Shintani <i>et al.</i> , 2005a.
<i>E. coli</i> K12			
CAG18620 (ME8878)		Tn10kan inserted in the gene encoding carbamoyl-phosphate synthase small chain, Km ^r	National Institute of Genetics, Japan.
DH5α		F ⁻ , φ80d, <i>lacZΔM15</i> , Δ(<i>lacZYA-argF</i>), <i>U169</i> , <i>endA1</i> , <i>recA1</i> , <i>hsdR17</i> (r _K ⁻ , m _K ⁺), <i>deoR</i> , <i>thi-1</i> , <i>supE44</i> , λ, <i>gyrA96</i> , <i>relA1</i>	Toyobo.
HB101		<i>supE44</i> , Δ(<i>mcrC-mrr</i>), <i>recA13</i> , <i>ara-14</i> , <i>proA2</i> , <i>lacY1</i> , <i>galK2</i> , <i>rpsL20</i> , <i>xy/-5</i> , <i>mtl-1</i> , <i>leuB6</i> , <i>thi-1</i>	Toyobo.
JM109		<i>recA1</i> , <i>endA1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>thi</i> , <i>hsdR17</i> (r _K ⁻ m _K ⁺), <i>e14⁻</i> (<i>mcrA⁻</i>), <i>supE44</i> , <i>relA1</i> , Δ (<i>lac-proAB</i>)/F ['] [<i>traD36</i> , <i>proAB⁺</i> , <i>lac F⁺</i> , <i>lacZΔM15</i>]	Sambrook and Russell, 2001.
S17-1/λpir		Tm ^r , Sm ^r , <i>recA</i> , <i>thi</i> , <i>pro</i> , <i>hsdR M^r</i> , RP4: 2-Tc:Mu: Km Tn7 λpir	Simon <i>et al.</i> , 1986.
<i>Novosphingobium</i> sp. J30		CAR-degrading bacterium isolate from river sediment, Tc ^r	Inoue <i>et al.</i> , 2004.
<i>P. aeruginosa</i> PAO1808		<i>leu</i> -9001, <i>leu</i> derivative of PAO1 (wild-type isolate)	Royle <i>et al.</i> , 1981.
<i>P. chlororaphis</i> IAM1511RG		Derivative strain of IAM1511, spontaneously Rif ^r , with introduced Gm ^r gene	Shintani <i>et al.</i> , 2005a.
<i>P. chlororaphis</i> IAM1511K		Derivative strain of IAM1511 with introduced Km ^r gene	Shintani <i>et al.</i> , 2005a.
<i>P. fluorescens</i> IAM12022		Type strain	IAM culture collection.
<i>P. fluorescens</i> IAM12022RG		Derivative strain of IAM12022, spontaneously Rif ^r , with introduced Gm ^r gene	Shintani <i>et al.</i> , 2005a.
<i>P. putida</i> DS1		Dimethylsulfoxide-user, naturally Cm ^r and Tc ^r	Endoh <i>et al.</i> , 2003.
<i>P. putida</i> DS1D2		Strain DS1K carrying pCAR2	Shintani <i>et al.</i> , 2005b.

表 M-1. つづき.

<i>P. putida</i> DS1K	Derivative strain of DS1 with introduced Km ^r gene	Shintani <i>et al.</i> , 2005b.
<i>P. putida</i> DS1RG	Derivative strain of DS1, spontaneously Rif ^r , with introduced Gm ^r gene	Shintani <i>et al.</i> , 2005b.
<i>P. putida</i> HS01	DS1-derivative strain carrying pCAR2, naturally Cm ^r and Tc ^r	Shintani <i>et al.</i> 2005b.
<i>P. putida</i> HS02	Derivative of strain HS01	Shintani <i>et al.</i> , 2005b.
<i>P. putida</i> IAM1236	Type strain	IAM culture collection.
<i>P. putida</i> IAM1236RG	Derivative strain of IAM1236, spontaneous-Rif ^r , with introduced Gm ^r gene	This study.
<i>P. putida</i> KT2440	Naturally Cm ^r	Bagdasarian <i>et al.</i> , 1981.
<i>P. putida</i> KT2440D1	Strain KT2440K carrying pCAR1	Shintani <i>et al.</i> , 2005a.
<i>P. putida</i> KT2440D2	Strain KT2440K carrying pCAR2	Shintani <i>et al.</i> , 2005a.
<i>P. putida</i> KT2440K	Derivative strain of KT2440 with introduced Km ^r gene	Shintani <i>et al.</i> , 2005a.
<i>P. putida</i> KT2440RG	Derivative strain of KT2440G, spontaneous-Rif ^r , with introduced Gm ^r gene	Shintani <i>et al.</i> , 2005a.
<i>P. putida</i> KT2440(pCAR1)	Strain KT2440 carrying pCAR1	This study.
<i>P. putida</i> KT2440(pCAR1Δpmr)	Strain KT2440(pCAR1) whose <i>pmr</i> was disrupted by Gm ^r gene.	This study.
<i>P. resinovorans</i> CA06	CAR-degrading bacterium isolated from activated sludge	Shintani <i>et al.</i> , 2005b.
<i>P. resinovorans</i> CA10	CAR-degrading bacterium carrying pCAR1, naturally Cm ^r	Shintani <i>et al.</i> , 2005b.
<i>P. resinovorans</i> CA10dm4	pCAR1-cured strain, naturally Cm ^r	This study.
<i>Pseudomonas</i> sp. K15	CAR-degrading bacterium isolated from activated sludge	Shintani <i>et al.</i> , 2005b.
<i>Pseudomonas</i> sp. K22	CAR-degrading bacterium isolated from activated sludge	Shintani <i>et al.</i> , 2005b.
<i>Pseudomonas</i> sp. K23	CAR-degrading bacterium isolated from activated sludge	Shintani <i>et al.</i> , 2005b.
<i>P. stutzeri</i> OM1	CAR-degrading bacterium isolated from soil.	Ouchiyaama <i>et al.</i> , 1998.

表 M-2. 本研究で行った PCR に用いたオリゴヌクレオチド

Target regions	Sequence (5' → 3')*	
Forward		Reverse
PCR		
Fragment I	TCGATACCCAGGAGTCGGTTA	ACTAGTTGGGTCCTCCAGGTCATAT
Fragment II	ACTAGTAGTATGCAGCAGCCAAGCGAGCAG	CATATGTCAC TGAGAAGCAAAC TCCCG
Km ^r gene	AAGCTTGAACCGGAATTGCCAGCTGG	CATATGGAACCGGAATTGCCAGCTGG
oriV01	GGATCCTGGGTTCTCCAGGTCATAT	AAGCTTCCTTTAGTCTGGCCCCCAGC
oriV02	GGATCCTACGTGGCCTCCAGAGGATC	AAGCTTCCTTTAGTCTGGCCCCCAGC
oriV03	GGATCCAATAGTCTTTGAGTTCACCG	AAGCTTCCTTTAGTCTGGCCCCCAGC
oriV04	GGATCCACGCCACTCAGGGAAATTCA	AAGCTTCCTTTATGGGTTCTCCAGGTCAT
oriV05	GGATCCACGCCACTCAGGGAAATTCA	AAGCTTCCTTTATGGGTTCTCCAGGTCAT
oriV06	GGATCCTGTAGTCGATGATCCTCTGG	AAGCTTCCTTTATGGGTTCTCCAGGTCAT
oriV07	GGATCCCAAAAGCAGACTCTCACAATC	AAGCTTCCTTTATGGGTTCTCCAGGTCAT
oriV08	GGATCCTGTAGTCGTTAGACACAGC	AAGCTTGGATTGTGAGTCTGCTTTTG
oriV09	GGATCCTGTAGTCGTTAGACACAGC	AAGCTTCAGAGGATCATCGACTACA
<i>parA</i> gene	GGATCCAGGAGGATCGTCATGCAGCAGC	CATATGTCAC TGAGAAGCAAAC TCCCG
<i>parB</i> gene	GGATCCAGGAGGAGAAATTATGGCTAAG	CATATGTCCTTATCTCGTAG
<i>parW</i> gene	GGATCCAGGAGGAACCCAAATGAATACTGGCCG	ACTAGTGACGATCCCTGCATTGTTGA
Probe01	AACTCTGAAAAGCCCCAGCTT	CACCATGTGCACGATACACAA
Probe02	TTACCAAATAGACCGCACAGC	TTACGGAGTTGATGATGTCGG
Probe03	TGAGAGCATCGCTCTTACGGT	AGATCGAGGCCGTCGTGTA
Probe04	TTGGTTATGTGGTGCAAAGC	AGTTTGTCCCAGTCGAGCAA
Probe07	TATTTTTGACACCTGCGTGC	GGTTTCCCGACTTATACCGAA
Probe08	AGCACCTGGAGGATTCAACA	GCCTGGATGAACACTTTCAGT
Probe09	AGGTAAACCCCTTCCTGAGCCT	TGGTTAACATGGAGCGGAG
Probe10	AAAGCTTGAGATAGCCGTCGT	CAAAGTGGAAGATTGTCCCA
Probe11	AGCACCTGGAGGATTCAACA	GCCTGGATGAACACTTTCAGT
oriV _{parW}	GGATCCAGGATTAGTAACGGAACCCCT	AAGCTTCCTTTAGACGATCCCTGCATTGTTGAAT
parA10	ATGGATCCCAGGGATCGTCTAAAGGAAGCTTGC	GGAAGCTTCCTTTAGACGATCCCTGGGATCCAT
parA123	GGATCCAGTTGGGTTTACAGGCA	AAGCTTCCTTTAGACGATCCCTGCATTGTTGAAT
parA219	GGATCCGCTGACATCGGCTCTCGCT	AAGCTTCCTTTAGACGATCCCTGCATTGTTGAAT
parA58	GGATCCATTATGATTACCTGT	AAGCTTCCTTTAGACGATCCCTGCATTGTTGAAT
parA68	GGATCCGACTTAACGTATTATGATT	AAGCTTCCTTTAGACGATCCCTGCATTGTTGAAT
parA78	GGATCCTTGAAAAGCGACTTAACG	AAGCTTCCTTTAGACGATCCCTGCATTGTTGAAT
parA88	GGATCCATGATTTTCTTGAA	AAGCTTCCTTTAGACGATCCCTGCATTGTTGAAT
parA98	GGATCCAGCCTGTACCATGATTTTTC	AAGCTTCCTTTAGACGATCCCTGCATTGTTGAAT
parAW508	GGATCCACGCCACTCAGGCAAATTCA	AAGCTTCCTTTAGACGATCCCTGCATTGTTGAAT
parB906	GGATCCTATGACCCAGATTGGCAAG	AAGCTTCCTTTAGAAATTTCTCCGTCAATTAACC
parW1015	GGATCCAGGATTAGTAACGGAACCCCT	AACGTTCCCTTATGGGTTCTCCAGGTCAT
parW141	GGATCCCCAAAAGCAGACTCACAATC	AACGTTCCCTTATGGGTTCTCCAGGTCAT
parW508	GGATCCACGCCACTCAGGCAAATTCA	AACGTTCCCTTATGGGTTCTCCAGGTCAT
parWA141	GGATCCCCAAAAGCAGACTCACAATC	AAGCTTCCTTTAGACGATCCCTGCATTGTTGAAT

表 M-2. つづき.

RT-PCR

<i>trhN</i>	1	TGAGAACGTGACGAAAAACG	AGGTGCGAGTTTGAACGTA
ORF120	2	ATGAGGGTGTCAGCAATGAA	AGAACCAGAAGGTTCCGAAA
<i>tral</i>	3	CGAAGAGCCGTCACAGTTTTT	TTCTGTATGCTCACTCAGCG
<i>tral</i>	4	ATACTGACGCTGATTCGGGT	TTTTGGGAAGCTCCTCGTAA
<i>tral-traD</i>	5	AGCAGTTCGGGATCACATCAA	TCCAACGAGACAGGCTTTTG
<i>traD</i>	6	TTACACGAGTTACTGGCGGAA	GAACCTTGCGCCGAGAGAATT
<i>traD</i> -ORF124	7	AATGTTGGTGAGCGCCTTAT	TTCAAGCATCTCAGCCATTG
ORF123	8	TTCCACTAGAAATTCAGCGGC	TTGCGGGACATTGGTTGTTT
ORF124	9	AAGTGGCCAAAGGCGCTTAT	AAATGCGCTTTGGCAGGTT
ORF124-125	10	TGTTGATGCCTCTGCCTTTAC	ATCTCGATAAGCGTGTACCGA
ORF125	11	CGAAAACGACACCATCGAAA	ATCGAATACCGTCTGGGTGTA
ORF125- <i>trhL</i>	12	ATAAAACAGGTGGCAACGG	CGACTTTAAAAGCATCAGACG
<i>trhL</i>	13	ATCAAAATCCCGCATACATC	TCTCTCGTAGGAATTGGGCAT
<i>trhL-trhE</i>	14	TTGGATGAGGTGATGCCGAT	GATGTACAGAGCCCATGCGT
<i>trhE-trhK</i>	15	ACCGAACCTATGAGTTTGAGC	TGGCCGCTGTAGTTCGTAGA
<i>trhK</i>	16	AGGCATGAACATGCCAGTTG	AGAGCACCGAAGCTGTATCCA
<i>trhK-trhB</i>	17	ACGGCCGACATTTTCGGTA	ATACGGACGAGGCTTGGA
<i>trhB</i>	18	ACTCCATTGCGAGCCAACTT	TTACGCGATTGCGTCGATTT
<i>trhB-trhV</i>	19	TTTGTCTGTCGTTTCGCAAT	TTGATGGTTTATCGCTGCTC
<i>trhV</i>	20	AGCAACTTATCCTGGCGATT	TGGCAATACGCATCACAA
ORF131	21	ACTTCAGGATCGTGCTTGCTA	CGATACGCATCCTCCATGTA
ORF136	22	CGGTCGAAGTTATTGCCTATG	AATCGGCTCCAAAACTCCA
<i>trhA</i>	23	AAGCAACCCCTCCAAACGAT	TACAGGCAGGGCTTGAGA
<i>trhA-dsbC</i>	24	TTTCTTTTCCGGGCCAAA	TTCTTCAGGCTTGCTTCTC
<i>dsbC</i>	25	TCAAACCAACCCAAACCATTC	TGCGATTTCGATTCAATCCAG
<i>trhC</i>	26	GACAATGACCCTCGTGGTGTT	ATTTCGGATCGCTTGACAT
<i>trhC-trhF</i>	27	ACCCATACTCGATCCTCCTCT	AGCACAGGATCGAATTCCTT
<i>trhF-trhW</i>	28	TGTTCCGGGAAGGGAAATAG	TGGAGCCAATAGTCCTAAA
<i>trhW</i>	29	AATTAGCCATGTGCATTGGG	TTGATGCTCATGATTGGCCT
<i>trhW-trhU</i>	30	GCACCTCTGATGATTGCAGGT	TGGAAGAACGCCAACGTA
<i>trhU</i>	31	GGCTTCGGCAGGACAATAGTA	ATCTGTCCATCGCCAGAACAT
ORF146	32	ACTCAGAAGGCAATTACGCCC	TCGGCTTTCTCACCTTTTCAT
<i>traF</i>	33	TTTCCCATCTGTGTGCTTGC	CGTTGTCTTTTGAAGGCG
<i>traF-trhH</i>	34	TCTCGAGTTTAGGTACGGGTT	TTTGGTGGATTTTCGCGTAA
<i>trhH</i>	35	AAATCAAACCGATCGCCCTT	TGCGTTATCGTTGATGGTTC
<i>trhH-trhG</i>	36	GCAATCCGGTTATGACTACCT	TCAGGGTCTTATCCGTTCTCA
<i>trhG</i>	37	TATCTACACCACAGGCAGCG	TGGTCAGAAGTGAACGAAGCA
<i>trhG</i>	38	AAACCATCAGCAGCGAACAA	AGCATCATCGATCGCAGTAA
Fragment I		TCGATACCCAGGAGTCGGTTA	ACTAGTTGGGTTCTCCAGGTCATAT
Fragment II		ACTAGTAGTATGCAGCAGCCAAGCGAGCAG	CATATGTCACTGAGAAGCAAATCCCG
Km ^r gene		AAGCTTGAACCGGAATTGCCAGCTGG	CATATGGAACCGGAATTGCCAGCTGG
oriV01		GGATCCTGGGTTCCCTCCAGGTCATAT	AAGCTTCCTTTAGTCTGGCCCCACG
oriV02		GGATCCTACGTGGCCTCCAGAGGATC	AAGCTTCCTTTAGTCTGGCCCCACG
oriV03		GGATCCAATAGTCTTTGAGTTACCG	AAGCTTCCTTTAGTCTGGCCCCACG

表 M-2. つづき

oriV04	<u>GGATCC</u> ACGCCACTCAGGAAATTCA	<u>AAGCTT</u> CCTTTATGGGTCCTCCAGGTCAT
oriV05	<u>GGATCC</u> ACGCCACTCAGGAAATTCA	<u>AAGCTT</u> CCTTTATGGGTCCTCCAGGTCAT
oriV06	<u>GGATCCT</u> TGTAGTCGATGATCCTCTGG	<u>AAGCTT</u> CCTTTATGGGTCCTCCAGGTCAT
oriV07	<u>GGATCCC</u> AAAAGCAGACTCTCACAATC	<u>AAGCTT</u> CCTTTATGGGTCCTCCAGGTCAT
oriV08	<u>GGATCCT</u> TGTAGTCGTTAGACACAGC	<u>AAGCTT</u> GGATTGTGAGTCTGCTTTTG
oriV09	<u>GGATCCT</u> TGTAGTCGTTAGACACAGC	<u>AAGCTT</u> CCAGAGGATCATCGACTACA
<i>parA</i> gene	<u>GGATCC</u> AGGAGGA TCGTCATGCAGCAGC	<u>CATATG</u> TCACTGAGAAGCAAACCTCCCG
<i>parB</i> gene	<u>GGATCC</u> AGGAGGA GAAATTATGGCTAAG	<u>CATATG</u> TCCTTATCTCGTAG
<i>parW</i> gene	<u>GGATCC</u> AGGAGGA ACCCAATGAATACTGGCCG	<u>ACTAGT</u> GACGATCCCTGCATTGTTGA
<i>parA</i>	AGCGAGCAGTTTGAAGAGGAA	CGAACAGGGCAGATAACAAA
<i>parA</i> -B	ATGGTAAAGCGCTGGATCAA	AATGGGTCAGGCAATTCC
<i>parB</i> -C	TGAGATCAGTGGTATTGGCCG	GGTGCACCACTCTGTGTTCT
<i>parW</i>	ATGAATACTGCCGCTTTCG	TACTGTTTTTGGGCATCGGT
<i>parW</i> -A	ATCCCATGGACACCCAATT	CCCGTTTTCATCCTCAATGT

qRT-PCR		
Target genes	Forward	Reverse
<i>trhN</i>	GACGATGAACACGCTCAAGA	TGCCATCACAGCGTTACTTC
<i>tral</i>	CTGATCTTGCCCCAAAAGCTC	TCCTCAGCAAGGAAGGAAGA
<i>trhA</i>	CGCTTATGCCGTTCTGTTACT	ACAGCTGCTGCTGGGATAGT
<i>traF</i>	AGCTTCAGCACCGTCTCAAT	GCGGATGTAGCGTTGTATT
<i>parA</i>	CCTACCGCTTCTCGACTCAC	ATTCATTCAGCCGCATAAGG
<i>pmr</i>	GATCCCGSCTATCGAAAGCA	TTCCACTCCTTGAGCGTCTT
<i>rrn</i>	TCACCGGCAGTCTCCTTAGA	CTCGTGTCGTGAGATGTTGG

菌体からの全 RNA の調製は NucleoSpin® RNA II (Macherey–Nagel, GmbH and Co. KG Sudbury, MA, USA) 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, Madison, WI, USA) を用いて分解させた。

巨大プラスミドの抽出は以下の2つの方法のいずれかを用いて行った。

Ka and Tiedje の方法による抽出

Ka and Tiedje (1994) の方法を一部改変して行った。

試薬

・ Lysing solution

10% (w/v)	SDS	30 ml
1 M	Tris-HCl (pH 8.0)	5 ml

2 N の NaOH で pH 12.6 に調整後、蒸留水で 100 ml にして常温保存した。

操作

- ① 各菌株を 5 ml の LB 培地に植菌して培養後、培養液 1 ml から集菌し、滅菌蒸留水 100 μ l に懸濁した。
- ② ①に Lysing solution を 250 μ l 加えて、軽く混合し、室温で 15 分間静置した。
- ③ 80°C で 2 分間インキュベートして、350 μ l のフェノール/クロロホルムを加えて室温で一晩静置した。
- ④ 15,000 rpm, 4°C で 20 分間遠心して、上清を新しい 1.5 ml チューブに移して使用した。

Large-Construct Kit による抽出

キアゲン社 (QIAGEN, K. K., Tokyo, Japan) の Large-Construct Kit を用いて行い、操作手順はそのプロトコール (Appendix A, Special Protocol for High Yields of Large-Construct DNA without Removal of Genomic DNA) に従った。

試薬

- ・ Resuspension Buffer (50 mM Tris-HCl, pH 8.0, 10 mM EDTA, 100 μ g/ml RNase A)
- ・ Lysis Buffer (200 mM NaOH, 1 % SDS)
- ・ Neutralization Buffer (3.0 M potassium acetate, pH 5.5)
- ・ Equilibration Buffer (750 mM NaCl, 50 mM MOPS, pH 7.0, 15% isopropanol)
- ・ Wash Buffer (1.0 M NaCl, 50 mM MOPS, pH 7.0, 15% isopropanol)
- ・ Elution Buffer (1.25 M NaCl, 50 mM Tris-HCl, pH 8.5, 15% isopropanol)

操作

- ① 各菌体を 100 ml の LB 培地 (坂口フラスコ) で培養し、50 ml ずつの培養液を遠心して集菌した。
- ② Resuspension buffer 10 ml に菌体を懸濁し、10 ml の Lysis Buffer を加えて混合して室温で 5 分間静置した。
- ③ ②に 10 ml の Neutralization Buffer を加え、穏やかに混合して氷上で 10 分間静置した。
- ④ ③を 4°C, 20,000 \times g で 30 分遠心し菌体膜やタンパクを沈殿させた後、上清を濾紙で濾過した。
- ⑤ 10 ml の Equilibration Buffer を通して平衡化した QIAGEN tip-500 に上の濾過液を通し DNA を tip に結合させた。
- ⑥ 30 ml の Wash Buffer を通して tip を洗浄した。この操作を 2 回繰り返した。
- ⑦ あらかじめ 65°C に温めた 15 ml の Elution Buffer で DNA を溶出後、10.5 ml の 2-プロパノールを用いて DNA を沈殿させた。
- ⑧ ⑦を 4°C, 15,000 \times g で 30 分遠心した後、上清を除き 70%エタノールを用いて塩を除去してから TE buffer に溶解させ使用した。

他の特に明記しない DNA・RNA 関連の操作は Molecular Cloning 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), クローニングとシーケンス (杉山昌弘編, 1989) に従った。また DNA および RNA の濃度測定は DU®7400 Spectrophotometer (Beckman Instrumen Inc. CA., USA) を用いて行った。

M-5. アガロースゲル電気泳動とゲルからの DNA の回収

アガロースゲルは、アガロース ME (ナカライテスクジャパン) を Tris-acetate-EDTA (TAE) buffer に溶解させて作製した。電気泳動はミュールピッド小型電気泳動層 (ADVANCE Co. Ltd., Tokyo, Japan) 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 EZNA® gel extraction kit (Omega Bio. Tek, Doraville, GA, USA) を用い、操作手順はそのプロトコールに従った。

M-6. エレクトロポレーション

各菌株のエレクトロポレーションによる形質転換は、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 培地を用いて試験管で培養後、培養液 500 µl を 100 ml の LB 培地に移し、坂口フラスコを用いて 2～4 時間、本培養を行った。
- ② 培養液を氷上で 10 分以上静置した後、50 ml 容チューブに移して集菌した (3,000×g, 15 分間, 4℃)。これ以降の操作は全て氷上で行った。
- ③ 上清を除いた後、50 ml の滅菌蒸留水を加え、菌体を穏やかに懸濁し、集菌した (4,000×g, 15 分間, 4℃)。
- ④ 上清を除き、25 ml の滅菌蒸留水を加え、菌体を穏やかに懸濁し、再度集菌した (4,000×g, 15 分間, 4℃)。
- ⑤ 再度上清を除き、10%グリセロール 10 ml で菌体を懸濁した後、集菌した (4,000×g, 15 分間, 4℃)。
- ⑥ 上清を除いた後、200 µl 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® (BIORAD) を用い、25 µF, 200 Ω, および 1.9 kV の条件で行った。エレクトロポレーション用のキュベットには greiner bio-one 社の 1 cm ギャップのものを用了。

M-7. パルスフィールドゲル電気泳動 (Pulsed-field gel electrophoresis; PFGE)

PFGE には BIORAD のジーンパスシステムを用い、添付の説明書に従って電気泳動した。PFGE 用のゲルは TAE または Tris-borate-EDTA (TBE) buffer と PFC (Pulsed-Field Certified) アガロース (BIORAD) を用いて作製した。

電気泳動の条件は、pulse 角度を 120°, 泳動温度を 14℃とし、そのほかは表 M-3 に示した条件で行った。また、マーカーとしては Marker 6, Marker 7 および Low Range PFG Merker (New England BioLabs) を用いた。

表 M-3. 本研究で用いた PFGE の条件.

分離するサイズ (kb)	アガロース濃度 (%)	パルス時間 (秒)	泳動時間 (時間)	電圧 (V)	Buffer
0.1~23	1.2	0.1	5	200	0.5×TAE
1~50	1.0	0.1-2.5	8	200	0.5×TBE
5~75	1.0	1-6	11	200	0.5×TBE

M-8. 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 non-Radioactive Digoxigenen (DIG) DNA 標識及び検出キット (Roche Diagnostics) を用い、そのプロトコールを一部改変して行った。メンブレンには PALL BYODYN® B MENBLANE を用いた。

<プローブの作成>

- ① ラベルする DNA 1~10 µg を 10 分間 98℃ で変性させ、氷上で 3 分間急冷した。
- ② 2 µl の 10×Hexanucleotide solution, 2 µl の 10×DIG DNA labeling mixture, 10 µl の滅菌水, 1 µl の Klenow fragment を加えて 37℃ で 4 時間~20 時間反応させた。
- ③ 0.8 µl の 0.5 M EDTA を加えて混合し、反応を停止した。
- ④ 99%エタノールを用いて DNA を沈殿させ、70%エタノールで塩を除いた。
- ⑤ 20 µl の TE Buffer に溶解しハイブリダイゼーションの使用前に 98℃ で 5 分間変性させて使用した。

<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 7.0 に調整した。
- Buffer 1 (100 ml あたり)
 - 0.1 M Maleic acid
 - 0.15 M NaCl

NaOH で pH 7.5 に調整した。
- 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。
- Buffer 2
 - Blocking stock solution を Buffer 1 で 10 倍希釈した。
- 20×SSC
 - 3 M NaCl
 - 0.3 M Na₃ · citrate · 2 H₂O
- Hybridization buffer
 - 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

pH 9.5 に調整した。
- 発色溶液
 - NBT/ X-Phosphate solution 200 µl

10 ml の Buffer 3 に溶解して用いた。

操作

ゲルからメンブレンへの transfer については、VacuGene XL Vacuum Blotting System (Amersham Biosciences, LTD., Buckinghamshire, UK)を用いて行い、操作手順はそのプロトコールを一部改変して行った。

- ① 電気泳動後のゲルを VacuGene XL Vacuum Blotting System にセットし、0.2 規定の塩酸をゲルの表面を覆う様に加え、50 ヘクトパスカルの圧力で吸引した (15 分)。
- ② ゲル表面より HCl 液を除いた後、Denaturation buffer を加えて 15 分吸引した。
- ③ Neutralization buffer を加えて 15 分吸引した後、ゲル高の 2 倍程度の位置まで 20×SSC buffer で浸るように加えて 45 分間吸引した。
- ④ 装置よりメンブレンを取り出し、UV を 5 分間照射した。

- ⑤ シールドバック中で 100 cm²あたり 20 ml の hybridization buffer を用い、68℃で 60 分静置した。(以後、反応液に加える液量はメンブレン 100 cm²あたりの量で示す。また温度条件は、特に明記しない限り 68℃で行った。)
- ⑥ Hybridization 液 1 ml あたり 1 µl のプローブを加えたプローブ液 15 ml で⑤の buffer を交換して、68℃で 6 時間以上静置した。
- ⑦ メンブレンを室温で終濃度 0.1%(w/v) の 10% SDS 溶液を加えた 2×SSC buffer で 5 分間洗浄した (2 回)。
- ⑧ 同様に 0.1%(w/v)SDS, 0.1×SSC 溶液で 68℃, 15 分間洗浄した (2 回)。
- ⑨ Buffer 1 でメンブレンを 1 分間洗浄した。
- ⑩ 100 ml の Buffer 2 に浸し、30 分間静置した。
- ⑪ メンブレンを Buffer 2 で 150 mU/ml となるように希釈した希釈抗体溶液に浸し、室温で 30 分間静置した。
- ⑫ 未結合抗体を 100 ml の終濃度 0.3% (v/v) Tween 20 を加えた Buffer 1 で激しく攪拌しながら 15 分間洗浄した (2 回)。
- ⑬ メンブレンを 20 ml の Buffer 3 で 2 分間平衡化させ、暗冷化で発色溶液 10 ml と共に平らな場所に静置した。
- ⑭ 望ましいシグナルが得られたら、メンブレンを取り出して、TE buffer 50 ml で洗浄した (3 回)。

M-9. Polymerase chain reaction (PCR)

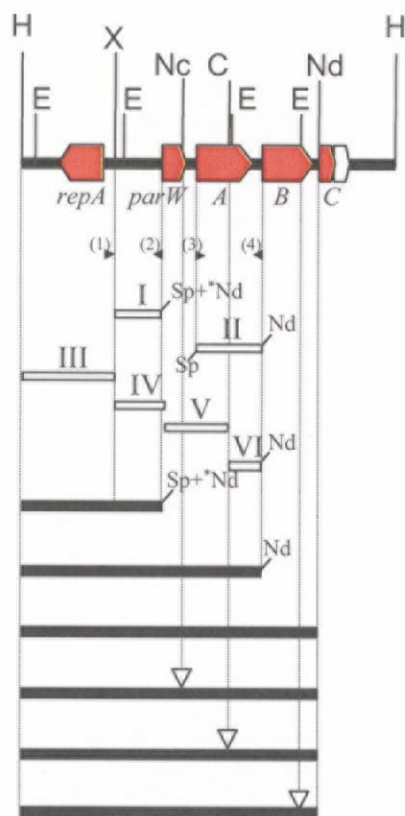
PCR は ExTaq Hot Start Version (Takara) を DNA polymerase として用い、添付のプロトコールに従って行った。またサーマルサイクラーには PCR Thermal Cycler Dice TP600 (Takara)を使用した。

M-10. 塩基配列決定法

塩基配列の決定は DNA4200L-2 auto DNA sequencer (LI-COR Co. Ltd, Nebraska, USA)または ABIPRISM[®] 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystem)を用いて行った。操作は添付の説明書に従って行った。DNA4200L-2 auto DNA sequencer による電気泳動は 3.75%アクリルアミド、7 M 尿素含有ゲルと 0.8×TBE buffer を用いて行った。電気泳動のデータ解析には、e-seq ver. 1.1 および ver. 2.0 を用いた。得られたシーケンズデータの解析には、DNASIS Mac ver. 3.7 (Hitachi Software Engineering Co., Ltd) を用いた。

M-11. プラスミドの構築

- pUCARori001~pUCARori008 は、pCAR1 の複製を担うと推定された遺伝子断片 (図 2-1 参照) を pUC19 ベクターにクローニングした。またその派生プラスミド pUCARori004-Tc, pUCARori004-TcCm および pUCARori004-Gm はそれぞれの耐性遺伝子を pBBR1 ベクターシリーズより切り出して (Kovach et al., 1995), *SacI* サイトに挿入することで作製した。
- pCARori004, pCARori005, pCARori006 は対応する pUCARori シリーズの *HindIII-NdeI* 断片を pTKmHN の Km 耐性遺伝子と連結することで作製した (pUC ベクターの複製に必要な領域は持たない)。
- pBTN4676 は、HS01 株のプラスミドライブラリーより *tnpAcC* と IR-a を含む *XhoI-HindIII* 断片と、*tnpST* および IR-f を含む *HindIII-XhoI* 断片を pBlueScriptII ベクターの *XhoI-EcoRI* サイトにクローニングし、その後 *HindIII* サイトを平滑化、pSJ12 の *SmaI* 断片に含まれる Gm 耐性遺伝子を挿入して作製した。
- pTCARoriV シリーズは図 2-2 に示した *BamHI-HindIII* の DNA 断片を pT7Blue T-vector にクローニングし、*HindIII* サイトに Km 耐性遺伝子を挿入して作製した。
- *par* 遺伝子に変異を導入したプラスミドについては以下のように作製した。まず 2 つの DNA 断片 (I および II) を、制限酵素サイトを付加したプライマーを用い、PCR によって増幅した (図 M-1 参照)。



図M-1. pCAR1 の*par*変異プラスミド作製に用いたDNA領域.

各ミニプラスミドのインサートを作製するために用いたDNA断片 (I~VI) を白抜きで示し、特にIとIIの断片を増幅するために用いたプライマーの位置を(1)~(4)の三角形で示した。各プラスミドのインサートとして用いたDNA断片を太線で示した。また、人為的に付加した制限酵素サイトを末端に示し、このうちベクター由来のものをアスタリスクで示した。さらに、T4ポリメラーゼで平滑化することでフレームシフト変異を導入した制限酵素サイトの位置を白抜きの三角形で示した。

各制限酵素サイトを以下の略文字で示した； E (*Eco*RI), H (*Hind*III), Nc (*Nco*I), Nd (*Nde*I), Sp (*Spe*I), X (*Xba*I).

その後、各断片を pT7Blue T-vector にクローニングして塩基配列を確認し、*XbaI-NdeI* (*NdeI* サイトはベクター由来) および *SpeI-NdeI* を切り出して、これを図 M-1 中の Fragment I と II とした。さらに、Fragment II から Fragment VI を、pUCARori004 から Fragment III~V を作製した。これらに対して、PCR で増幅した *HindIII-NdeI* を両端に付加した Km 耐性遺伝子を増幅し、(pTKm を鋳型とした) 以降の Km 耐性遺伝子として利用した。pCARori008 は、Fragment III と I および Km 耐性遺伝子を同時に連結して作製した。pCARΔparBC は Fragment III~VI を前述した Km 耐性遺伝子と連結して作製した。pCARΔparC は、pUCARori004 の 5.7-kb *HindIII-NdeI* 断片と Km 耐性遺伝子を連結して作製した。得られた pCARΔparC のインサートを pT7Blue T-vector に連結して、pTrepAparWAB とした。その後、*parW* 遺伝子内の *NcoI* サイトを T4 ポリメラーゼ (Takara) で平滑化 (4 塩基を挿入) したものを pTΔparW とした。*NcoI* サイトに変異が導入されていることをシーケンス解析によって確認した後、pTΔparW の 5.7-kb *HindIII-NdeI* を Km 耐性遺伝子と連結して pCARΔparW を作製した。同様に、2 塩基、あるいは 4 塩基を *parA* 内部の *ClaI* サイトと、*parB* 内部の *EcoRI* サイトに挿入した pCARΔparA および pCARΔparB を作製した。

- *par* 遺伝子の相補実験に用いた pBBRparW, pBBRparA, および pBBRparB については、それぞれの遺伝子を PCR で増幅した後、塩基配列を確認して pBBR1MCS-5 (Kovach et al., 1995) のマルチクローニングサイトに連結した。この際、人為的に SD 配列を入れ、ベクターの *lac* プロモーターと同じ向きになるように挿入した。一方 pBBRparWAB については、*parWAB* 遺伝子 (pUCARori004 の *XbaI-NdeI* 断片) を pBBR1MCS-5 の *lac* プロモーターと逆向きに挿入して作製した (*par* 遺伝子は元来のプロモーターによって発現させた)。
- pMEGluc はプロモーター配列をベクター上から除いた pME4510 に pSP-*luc*+NF の *luc* 遺伝子を挿入して作製した。プロモーター解析に用いた pME シリーズは pMEGluc プラスミドをもとに作製した。それぞれ人為的に制限酵素サイトと、SD 配列を付加したプライマーを用いて PCR で増幅した DNA 断片 (表 M-2 参照) を、その塩基配列をシーケンス解析で確認後、pMEGluc のルシフェラーゼ遺伝子上流の *BamHI-HindIII* サイトにクローニングして作製した。

その他、使用したプラスミドを表 M-4 に示した。

M-12. プラスミドの不和合性テスト

pCAR1 の不和合性テストは、既知の IncP 群プラスミドと、pCAR1 のミニレプリコン pUCARori004-Gm または pUCARori004-Tc が同一の宿主内で共存できるか否かを調べることで行った。宿主には *P. aeruginosa* PAO1808 株を用いて行い、宿主にエレクトロポレーションでミニレプリコンを挿入後、IncP 群プラスミドの抗生物質マーカーと、ミニレプリコンの抗生物質マーカー双方を含む選択培地に塗布し、形質転換株が現れた場合に、双方のプラスミドが共存できる (和合性を示す) とした。

M-13. pCAR1 脱落株の取得

pUCARori004 の *parA* 遺伝子内部の *ClaI* サイトを平滑化後、Km 耐性遺伝子を挿入して作製した pUCAΔparA は *Pseudomonas* 属細菌内では Km を加えない培地で培養すると自然に脱落する。一方、pCAR1 と pUCAΔparA の 2 つのプラスミドは、同一の不和合性群に属するため、Km を含む培地で培養すると、Km 耐性を示す後者が優先的に複製される。これらの性質を用いて CA10 株から pCAR1 を脱落させた。CA10 株内に pUCAΔparA をエレクトロポレーションで挿入し、Km 耐性を示す形質転換株を選択した後、抗生物質を加えない LB 培地で培養した。その後、Km 耐性が消失した菌株を取得し、この菌株が双方のプラスミドを有さないことを PCR とサザンハイブリダイゼーション解析によって確かめて pCAR1 脱落株とした。この菌株を *Pseudomonas resinovorans* CA10dm4 株と命名した。

M-14. トランスポゾンの転移実験 (mating out 法)

本研究におけるミニトランスポゾンの転移の検証には mating out 法 (Tsuda et al., 1988) に従って行った。ミニトランスポゾンを含むプラスミド (pBSTN4676, Gm 耐性) を転移先の受容プラスミド (RP4, Km 耐性, または R388, Tm 耐性) と同じ大腸菌 DH5α 株 (Gm, Km, Sm, および Tm 感受性) 内に共存させた。その後、受容菌として用いた大腸菌 HB101 株と接合させて、トランスポゾン (Gm 耐性)、プラスミド (Km 耐性または Tm 耐性)、および受容菌 (Sm 耐性) の耐性マーカーを含む選択培地に塗布して形質転換株が現れるかどうかを調べた。転移頻度は、接合伝達したプラスミドをあたりの転移の生じたプラスミドの数の比を用いて表した。

表 M-4. 本研究で用いたプラスミド.

プラスミド	備考	参照
pBBR1MCS-2	Km ^r , <i>lacZa mob</i> ; compatible with IncP, IncQ, and IncW plasmids	Kovach <i>et al.</i> , 1995.
pBBR1MCS-3	Tc ^r , <i>lacZa mob</i> ; compatible with IncP, IncQ, and IncW plasmids	Kovach <i>et al.</i> , 1995.
pBBR1MCS-5	Gm ^r , <i>lacZa mob</i> ; compatible with IncP, IncQ, and IncW plasmids	Kovach <i>et al.</i> , 1995.
pBBR1MCS-3Cm	pBBR1MCS-3, Cm gene (from pBSL181) inserted into <i>SacI</i> site.	Shintani <i>et al.</i> , in press.
pBBRparA	pBBR1MCS-5, <i>BamHI-SpeI</i> fragment containing <i>parA</i> gene	Shintani <i>et al.</i> , in press.
pBBRparB	pBBR1MCS-5, <i>BamHI-SpeI</i> fragment containing <i>parB</i> gene	Shintani <i>et al.</i> , in press.
pBBRparW	pBBR1MCS-5, <i>BamHI-SpeI</i> fragment containing <i>parW</i> gene	Shintani <i>et al.</i> , in press.
pBBRparWAB	pBBR1MCS-5, <i>XbaI-NdeI</i> fragment containing <i>parWAB</i> genes (opposite to <i>lac</i> promoter)	Shintani <i>et al.</i> , in press.
pBCA731	Ap ^r , pBluescript II SK(-) with 7.5-kb <i>EcoRV-ClaI</i> insert of strain CA10 DNA	Shintani <i>et al.</i> , 2005b.
pBluescript II KS(-)	Ap ^r , <i>lacZ</i> , pMB9 replicon	Stratagene
pBSL181	Ap ^r , Cm ^r minitransposon with IS50 inner and outer ends	Alexeyev <i>et al.</i> , 1995b.
pBSL202	Ap ^r , Gm ^r minitransposon consisted of IS50 inner and outer ends.	Alexeyev <i>et al.</i> , 1995a.
pBTN4676	pBluescript II KS(-), carrying <i>XhoI-HindIII</i> (containing <i>tnpAcC</i> genes and IR-a) and <i>HindIII-EcoRI</i> (containing <i>tnpST</i> genes and IR-f) with Gm ^r gene.	This study.
pCAR1	199,035-bp CAR degradative plasmid isolated from <i>P. resinovorans</i> CA10	Nojiri <i>et al.</i> , 2001, Maeda <i>et al.</i> , 2003.
pCARori004	6.9-kb <i>HindIII</i> fragment of pUCARori004 combined with Km ^r gene cassette	This study.
pCARori004-Gm	6.9-kb <i>HindIII</i> fragment of pUCARori004 combined with Gm ^r gene cassette	This study.
pCARori005	2.9-kb <i>HindIII-AatII</i> fragment of pUCARori005 combined with Km ^r gene cassette	This study.
pCARori006	1-kb <i>XbaI-AatII</i> fragment of pUCARori006 combined with Km ^r gene (non-functional replicon)	This study.
pCARori008	Fragment III and I combined with Km ^r gene cassette	Shintani <i>et al.</i> , in press.
pCARΔparA	pCARΔparC with <i>parA</i> gene mutated	Shintani <i>et al.</i> , in press.
pCARΔparB	pCARΔparC with <i>parB</i> gene mutated	Shintani <i>et al.</i> , in press.
pCARΔparBC	<i>repA</i> and <i>oriV</i> region combined with Km ^r gene cassette (Fig. 1)	Shintani <i>et al.</i> , in press.
pCARΔparC	pCARori004 with <i>parC</i> deletion	Shintani <i>et al.</i> , in press.
pCARΔparW	pCARΔparC with <i>parW</i> gene mutated (see Fig. 1)	Shintani <i>et al.</i> , in press.
pME4510	Cb ^r , Gm ^r , <i>ori1600</i> , absence of an inserted promoter fragment.	Rist and Kertesz 1998.
pK19mobsacB	Km ^r , <i>oriT</i> (RP4), <i>sacB</i> , <i>lacZα</i> , pMB1 replicon	Schafer <i>et al.</i> , 1994.
pK19Δpmr	pK19mobsacB, 3.8-kb <i>EcoRI-PstI</i> fragment including <i>pmr</i> gene disrupted with Gm ^r gene	This study.
pMEGluc	pME4510, with <i>luc</i> genes	Miyakoshi <i>et al.</i> , in press.

M-4. つづき.

pMEoriVparW	pMEGluc, oriVparW fragment in <i>Bam</i> HI- <i>Hind</i> III site	This study.
pMEparA10	pMEGluc, parA10 fragment in <i>Bam</i> HI- <i>Hind</i> III site	This study.
pMEparA123	pMEGluc, parA123 fragment in <i>Bam</i> HI- <i>Hind</i> III site	This study.
pMEparA219	pMEGluc, parA219 fragment in <i>Bam</i> HI- <i>Hind</i> III site	This study.
pMEparA414	pMEGluc, parA414 fragment in <i>Bam</i> HI- <i>Hind</i> III site	This study.
pMEparA508	pMEGluc, parA508 fragment in <i>Bam</i> HI- <i>Hind</i> III site	This study.
pMEparA58	pMEGluc, parA58 fragment in <i>Bam</i> HI- <i>Hind</i> III site	This study.
pMEparA68	pMEGluc, parA68 fragment in <i>Bam</i> HI- <i>Hind</i> III site	This study.
pMEparA78	pMEGluc, parA78 fragment in <i>Bam</i> HI- <i>Hind</i> III site	This study.
pMEparA88	pMEGluc, parA88 fragment in <i>Bam</i> HI- <i>Hind</i> III site	This study.
pMEparA98	pMEGluc, parA98 fragment in <i>Bam</i> HI- <i>Hind</i> III site	This study.
pMEparAW1015	pMEGluc, parAW1015 fragment in <i>Bam</i> HI- <i>Hind</i> III site	This study.
pMEparAW141	pMEGluc, parAW141 fragment in <i>Bam</i> HI- <i>Hind</i> III site	This study.
pMEparAW508	pMEGluc, parAW508 fragment in <i>Bam</i> HI- <i>Hind</i> III site	This study.
pMEparB906	pMEGluc, parB906 fragment in <i>Bam</i> HI- <i>Hind</i> III site	This study.
pMEparW1015	pMEGluc, parW1015 fragment in <i>Bam</i> HI- <i>Hind</i> III site	This study.
pMEparW141	pMEGluc, parW141 fragment in <i>Bam</i> HI- <i>Hind</i> III site	This study.
pMEparW508	pMEGluc, parW508 fragment in <i>Bam</i> HI- <i>Hind</i> III site	This study.
pSJ12	pBluescript II KS(-) with 0.7-kb <i>Sma</i> I fragment containing a non-polar Gm ^r gene cassette	Jain and Ohman, 1998.
pSP-luc+NF	Ap ^r , <i>luc</i> +NF	Promega
pT7Blue T-vector	Ap ^r , <i>lacZ</i>	Takara
pTKm	pT7Blue T-vector, Km ^r gene cassette	Yoshida <i>et al.</i> , 2003.
pTrepAparWAB	pT7Blue T-vector, 5.7-kb <i>Hind</i> III- <i>Nde</i> I fragment of pUCARori004.	Shintani <i>et al.</i> , in press.
pTCARoriV01	pT7Blue T-vector, Km ^r gene, 1005-bp <i>Bam</i> HI- <i>Hind</i> III fragment of <i>oriV</i> region	Shintani <i>et al.</i> , in press.
pTCARoriV02	pT7Blue T-vector, Km ^r gene, 785-bp <i>Bam</i> HI- <i>Hind</i> III fragment of <i>oriV</i> region	Shintani <i>et al.</i> , in press.
pTCARoriV03	pT7Blue T-vector, Km ^r gene, 403-bp <i>Bam</i> HI- <i>Hind</i> III fragment of <i>oriV</i> region	Shintani <i>et al.</i> , in press.
pTCARoriV04	pT7Blue T-vector, Km ^r gene, 488-bp <i>Bam</i> HI- <i>Hind</i> III fragment of <i>oriV</i> region	Shintani <i>et al.</i> , in press.
pTCARoriV05	pT7Blue T-vector, Km ^r gene, 388-bp <i>Bam</i> HI- <i>Hind</i> III fragment of <i>oriV</i> region	Shintani <i>et al.</i> , in press.
pTCARoriV06	pT7Blue T-vector, Km ^r gene, 250-bp <i>Bam</i> HI- <i>Hind</i> III fragment of <i>oriV</i> region	Shintani <i>et al.</i> , in press.
pTCARoriV07	pT7Blue T-vector, Km ^r gene, 121-bp <i>Bam</i> HI- <i>Hind</i> III fragment of <i>oriV</i> region	Shintani <i>et al.</i> , in press.
pTCARoriV08	pT7Blue T-vector, Km ^r gene, 345-bp <i>Bam</i> HI- <i>Hind</i> III fragment of <i>oriV</i> region	Shintani <i>et al.</i> , in press.
pTCARoriV09	pT7Blue T-vector, Km ^r gene, 258-bp <i>Bam</i> HI- <i>Hind</i> III fragment of <i>oriV</i> region	Shintani <i>et al.</i> , in press.
pUC18/19	Ap ^r , <i>lacZ</i> , pMB9 replicon	Sambrook and Russell, 2001.
pUC119	pUC19 derivative containing the intergenic region of M13 for production of ssDNA	Takara

表 M-4. つづき.

pUCA610	Ap ^r , pUC19 with 4.0-kb <i>SalI</i> insert of strain CA10 DNA	Nojiri <i>et al.</i> , 2001.
pUCA1	Ap ^r , pUC119 with 6.9-kb <i>EcoRI</i> insert of strain CA10 DNA	Sato <i>et al.</i> , 1997a.
pUCARori001	pUC19, Ap ^r , Km ^r , containing 17.0-kb <i>SacI</i> – <i>PstI</i> fragment of pCAR1	Shintani <i>et al.</i> , in press.
pUCARori002	pUC19, Ap ^r , Km ^r , containing 13.2-kb <i>HpaI</i> – <i>PstI</i> fragment of pCAR1	Shintani <i>et al.</i> , in press.
pUCARori003	pUC19, Ap ^r , Km ^r , containing 7.8-kb <i>SacI</i> – <i>XbaI</i> fragment of pCAR1	Shintani <i>et al.</i> , in press.
pUCARori004	pUC19, Ap ^r , Km ^r , containing 7.0-kb <i>NheI</i> – <i>HindIII</i> fragment of pCAR1	Shintani <i>et al.</i> , in press.
pUCARori004-Gm	pUCARori004 with Km ^r cassette replaced by a Gm ^r gene cassette	Shintani <i>et al.</i> , in press.
pUCARori004-Tc	pUCARori004 with Km ^r gene cassette replaced by a Tc ^r gene cassette	Shintani <i>et al.</i> , in press.
pUCARori005	pUC19, Ap ^r , Km ^r , containing 3.0-kb <i>NheI</i> – <i>AatII</i> fragment of pUCARori004	Shintani <i>et al.</i> , in press.
pUCARori006	pUC19, Ap ^r , Km ^r , containing 2.7-kb <i>HindIII</i> – <i>XbaI</i> fragment of pUCARori004	Shintani <i>et al.</i> , in press.
pUCARori007	pUC19, Ap ^r , Km ^r , containing 1.0-kb <i>XbaI</i> – <i>AatII</i> fragment of pUCARori004	Shintani <i>et al.</i> , in press.
pUHS02101	Ap ^r , pUC18 with 2.7-kb <i>EcoRI</i> insert of strain HS02 DNA	Shintani <i>et al.</i> , 2005b.
pUHS02201	Ap ^r , pUC18 with 7.0-kb <i>SacI</i> insert of strain HS02 DNA	Shintani <i>et al.</i> , 2005b.
pUK23301	Ap ^r , pUC18 with 4.2-kb <i>EcoRI</i> insert of strain K23 DNA	Shintani <i>et al.</i> , 2005b.
pUK23401	Ap ^r , pUC18 with 10.5-kb <i>SacI</i> insert of strain K23 DNA	Shintani <i>et al.</i> , 2005b.
pUK23501	Ap ^r , pUC18 with 7.8-kb <i>EcoRI</i> insert of strain K23 DNA	Shintani <i>et al.</i> , 2005b.
pUK23601	Ap ^r , pUC18 with 9.5-kb <i>SacI</i> insert of strain K23 DNA	Shintani <i>et al.</i> , 2005b.
pUOM1101	Ap ^r , pUC18 with 10 kb <i>BamHI</i> – <i>HindIII</i> insert of strain OM1 DNA	Shintani <i>et al.</i> , 2003.
pUOM1202	Ap ^r , pUC18 with 4.7 kb <i>EcoRI</i> – <i>EcoRV</i> insert of strain OM1 DNA	Shintani <i>et al.</i> , 2003.
pUOM1203	Ap ^r , pUC18 with 10 kb <i>HpaI</i> – <i>NdeI</i> insert of strain OM1 DNA	Shintani <i>et al.</i> , 2003.

M-15. プラスミドの接合伝達実験

プラスミドの接合伝達は、LB 培地上に 0.45 μm 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。

操作

- ① 供与菌および受容菌を LB 培地で 8-15 時間、300 strokes/min で振盪培養した。
- ② それぞれの培養液より 1 ml ずつ 1.5 ml 容チューブで集菌し (13,000 rpm, 1 min), 750 μl の LB 培地で洗浄し、再度集菌した。
- ③ 200 μl の LB 培地に懸濁して、供与菌と受容菌を良く混合し、LB 平板培地上においた cellulose membrane filter に懸濁液をのせた。
- ④ 30°C で 15 時間静置した後、フィルターごと滅菌済み 15 ml 容コーニングチューブに移し、1 ml の CF buffer に懸濁して、選択培地に spread した。接合伝達頻度は、供与菌の数に対する選択培地に現れたコロニー数で表した。

M-16. Reverse Transcription-PCR

Reverse Transcription (RT)-PCR は One step RNA PCR Kit (Takara) を用いて行い、操作は添付のプロトコールを一部改変して行った。反応条件は、逆転写反応を 60°C で 30 分行い、94°C で 5 分間置いたのち (94°C で 30 秒、60°C で 1 分 72°C で 1 分) の反応を 30 サイクル行った。

M-17. 定量的 RT-PCR

定量的 RT-PCR は ABI PRISM™ 7700 Sequence Detection System (Applied Biosystems) を用いて行い、反応試薬は QuantiTect SYBR Green RT-PCR kit (QIAGEN) のものを使用した。操作は添付のプロトコールに従った。解析対象の遺伝子断片中 100 bp についてプライマーを設計し、PCR で増幅した DNA 断片を用いて検量線を作成することで、全 RNA 中における目的の遺伝子の RNA 量を測定した。RNA 量は cycle threshold value (Ct) で評価し、RT-PCR 産物の 60-95°C における融解曲線を調べ、測定後に産物を電気泳動して PCR 産物が一種類であることと、シーケンス解析して目的の断片が増幅していることを確認して、測定が妥当であるとした。

M-18. プラスミドの安定性の検証実験

プラスミドの安定性の検証実験は Kwong et al., 2001 の論文を参考にして行った。

- ① 各ミニプラスミドをもつ菌株を、Km を含む 4 ml の LB 培地を用いて試験管で培養した。
- ② 培養液のうち 4 ml を、抗生物質を含まない新しい LB 培地に植菌して再度培養した。これを 5 回繰り返した。
- ③ 新たに植菌する度に培養液を 10^4 倍希釈して LB 平板培地に塗布し、ランダムに 100 個のコロニーを選択して、抗生物質耐性能の有無を調べた。

M-19. ルシフェラーゼ活性測定

レポータープラスミドを有する菌株を 4 ml の培地で培養し、培養液 50 ml を 96-well microtiter plate に分注した。その後 Centro LB960 (Berthold Technologies GmbH and Co. KG, Bad WildBad, Germany) を用いてルシフェラーゼ活性を測定した。同時に菌体の濁度 OD_{600} を Pharmacia Biotech Ultraspec1000 () で測定し、 $\text{OD}_{600}=1.0$ あたりの活性値を産出した。活性測定に用いた基質は Picagene LT2.0 (Toyo Ink Co. Ltd., Tokyo, Japan) を 50 μl 用いた。結果は 3 つの独立した活性値の平均値と標準偏差によって評価した。

M-20. プライマー伸長反応

プライマー伸長反応の検出には DNA4200L-2 auto DNA sequencer(Li-Cor)を用いた。プライマーには 5' 末端を IRD800 でラベルしたオリゴヌクレオチド parAPE-1 および parAPE-2 を用いた (Aloka Ltd.)。なお、

parAPE-1, parAPE-2 はそれぞれ ParA 翻訳開始点に対して+18~+38, +112~+134 の配列に相補的な配列を有する。

プライマー伸張反応には SuperScript™ III Reverse Transcriptase (Invitrogen Corp. Carlsbad, Calif)を用い、添付のプロトコールを一部改変して用いた。2 pmol のラベルプライマー、10 µg の KT2440(pCAR1)株より抽出した total RNA、10 mmol の dNTP 溶液を含む 13 µl の混合液を 65℃で 5 分間インキュベートした後、氷上に 1 分間静置した。その後、4 µl の 5×First-Strand Buffer、1 µl の 0.1M dithiothreitol、1 µl (40U) RNaseOUT 1 µl (100U) SuperScript™ III Reverse Transcriptase を加えて、50℃で 60 分間逆転写反応を行った。反応後、産物をフェノール/クロロホルム抽出に供し、エタノール沈殿した後 2 µl の滅菌蒸留水に溶解させて、1 µl の stop solution (Li-Cor)を加えた。シークエンスラダーの作成は pUCARori004 を用いて行った。

M-21. マイクロアレイの作製と RNA サンプルの調製

マイクロアレイ解析のために、pCAR1 を *P. putida* KT2440 株に接合伝達させた *P. putida* KT2440(pCAR1)株を作製した。この際、受容菌の KT2440 株の弱い Tc 耐性の自然耐性能を利用した。マイクロアレイは KT2440 株と pCAR1 のそれぞれ accession no. NC_002947 と AB088420 に登録された塩基配列情報を用いて作製した(ジーンフロンティア株式会社に委託、詳細なスペックについては表 M-5 を参照)。一方、RNA サンプルは、KT2440 (pCAR1) 株を LB 培地で前培養後、洗菌して、終濃度 0.1%のコハク酸ナトリウムを唯一の炭素源とする最少培地で培養した。その後、生育曲線を作製して(5章図 5-1A)早期対数増殖期と定常期にあたる菌体培養液より RNA を抽出してマイクロアレイ解析に用いた。

M-22. マイクロアレイ解析

マイクロアレイ解析は、ジーンフロンティア株式会社の「なんでもアレイ」解析サービスによって解析された遺伝子発現値を対数変換した値を用いて行った。本研究では、プラスミド上の遺伝子の発現変動についての結果のみを利用した。発現に変動のあった遺伝子については、その有意差検定を t 検定について行った。本マイクロアレイでは、pCAR1 上の遺伝子プローブは1遺伝子あたり 15 本用意し、かつ3連に配置したため、1つの遺伝子につき 45のプローブによってその発現値を評価している。このため、検定の多重性(検定を複数回行うことで、検定に用いた帰無仮説を棄却するための有意水準が向上してしまう現象。これを無視すると擬陽性数が増加してしまう)を回避するために、Bonferroni 補正を行い、有意確立 p 値を補正した。p 値が 0.05 より小さい場合、2 つの条件における遺伝子の発現変動が有意であるとした。

M-23. *pmr* 破壊株の作製

KT2440(pCAR1)株の *pmr* 破壊株の作製法は、Resacalli *et al.*, 2004 の方法に倣って行った。遺伝子破壊様のプラスミドとしては、*Pseudomonas* 属細菌で複製されない pK19mobsacB (Km 耐性) を用いた。まず、*pmr* を含む 3.8-kb の *EcoRI-PstI* 断片 (pCAR1 上の塩基 75681-79457; accession no. AB0088420) を pK19mobsacB 上にクローニングし、*pmr* (77640-77999) の一部を含む *SalI-SalI* (pCAR1 上 77486-77909) を Gm 耐性遺伝子と置換して (Gm 耐性遺伝子の向きは *pmr* と逆向き)、pK19Δ*pmr* を作製した。本プラスミドを大腸菌 S17-1/λ*pir* 株に挿入し、KT2440(pCAR1)株に接合伝達させ、Gm と Km を含む 0.1%のクエン酸を唯一の炭素源とする培地に塗布した(相天性組換えにより、目的とする *pmr* の領域とベクター部分が pCAR1 に組み込まれた菌株)。得られた形質転換株が pK19mobsacB 上の *sacB* 遺伝子に由来するスクロース感受性を示すことを確認後、Gm を含む液体培地で培養後、Gm と 10%スクロースを含む培地に塗布した。ここで Gm 耐性を示し、かつスクロース耐性を有する菌株を単離し、目的の *pmr* 破壊株であることを PCR とサザン解析によって確認した。

表 M-5. 本研究で作製したマイクロアレイのスペック

ターゲット数	染色体	5,350
	rRNA	21
	プラスミド	190
全ターゲット数		5,561
プローブ長	24 mer	
プローブ数	1 遺伝子あたり 15 (*PM, MM)	
	染色体上遺伝子は 1 連	$(5350+21) \times 15 \times 2$
	プラスミド上遺伝子は 3 連	$190 \times 15 \times 3 \times 2$
	全プローブ数	178,230

*PM と MM はパーフェクトマッチ (登録された塩基配列をそのまま利用した 24 mer) 配列とミスマッチ (PM の 6 番目と 12 番目の塩基を A⇌T および G⇌C と人為的に入れ替えた) 配列を示す。

参考文献

- Adameczyk, M., and Jagura-Burdzy, G. 2003. Spread and survival of promiscuous IncP-I plasmids. *Acta. Biochim. Pol.* **50**: 425-453.
- Alexeyev, M. F., Shokolenko, I. N., and Croughan, T. P. 1995a. New mini-Tn5 derivatives for insertion mutagenesis and genetic engineering in Gram-negative bacteria. *Can. J. Microbiol.* **41**: 1053-1055.
- Alexeyev, M. F., Shokolenko, I. N., and Croughan, T. P. 1995b. Improved antibiotic-resistance gene cassettes and omega elements for *Escherichia coli* vector construction and in vitro deletion/insertion mutagenesis. *Gene* **160**: 59-62.
- Andreoni, V., and Bestetti, G. 1986. Comparative analysis of different *Pseudomonas* strains that degrade cinnamic acid. *Appl. Environ. Microbiol.* **52**: 930-934.
- Anson, J. G., and Mackinnon, G. 1984. Novel *Pseudomonas* plasmid involved in aniline degradation. *Appl. Environ. Microbiol.* **48**: 868-869.
- Arber, W. 2000. Genetic variation: molecular mechanisms and impact on microbial evolution. *FEMS Microbiol. Rev.* **24**: 1-7.
- Ashikawa, Y., Fujimoto, Z., Noguchi, H., Habe, H., Omori, T., Yamane, H., and Nojiri, H. 2005. Crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of the electron-transfer complex between the terminal oxygenase component and ferredoxin in the Rieske non-heme iron oxygenase system carbazole 1,9a-dioxygenase. *Acta. Crystallogr. Sect. F.* **61**: 577-580.
- Ausubel, F. M., Brent, R., Kingston, R. E., Moore, D. D., Seidman, J. G., Smith, J. A., and Struhl, K. 1990. Current protocols in molecular biology. John Wiley and Sons, Inc., N. Y.
- Bagdasarian, M., Lurz, R., Ruckert, B., Franklin, F. C. H., Bagdasarian, M. M., Frey, J., and Timmis, K. N. 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**: 237-247.
- Berger, B., and Haas, D. 2001. Transposase and integrase: specialized transposition proteins of the bacterial insertion sequence IS21 and related elements. *Cell Mol. Life. Sci.* **58**: 403-419.
- Bartilson M, Nordlund I, Shingler V. 1990. Location and organization of the dimethylphenol catabolic genes of *Pseudomonas* CF600. *Mol. Gen. Genet.* **220**: 294-300.
- Beaber, J. W., and Waldor, M. K. 2004. Identification of operators and promoters that control SXT conjugative transfer. *J. Bacteriol.* **186**: 5945-5949.
- Beaber, J. W., Hochhut, B., and Waldor, M. K. 2002. SOS response promotes horizontal dissemination of antibiotic resistance genes. *Nature* **427**: 72-74.
- Bingle, L. E., Macartney, D. P., Fantozzi, A., Manzoor, S. E., Thomas, C. M. 2005. Flexibility in repression and cooperativity by KorB of broad host range IncP-I plasmid RK2. *J. Mol. Biol.* **349**: 302-316.
- Bingle, L. E., Zatyka, M., Manzoor, S. E., and Thomas, C. M. 2003. Co-operative interactions control conjugative transfer of broad host-range plasmid RK2: full effect of minor changes in TrbA operator depends on KorB. *Mol. Microbiol.* **49**: 1095-1108.
- Böltner, D., MacMahon, C., Pembroke, J. T., Strike, P., and Osborn, A. M. 2002. R391: a conjugative integrating mosaic comprised of phage, plasmid, and transposon elements. *J. Bacteriol.* **184**: 5158-5169.
- Bramhill, D., and Kornberg, A. 1988. Duplex opening by dnaA protein at novel sequences in initiation of replication at the origin of the *E. coli* chromosome. *Cell* **52**: 743-755.
- Bryan, L. E., Semaka, S. D., van Den Elzen, H. M., Kinnear, J. E., and Whitehouse, R. L. S. 1973. Characteristics of R931 and other *Pseudomonas aeruginosa* R factors. *Antimicrob. Agents Chemother.* **3**: 625-637.
- Bryan, L. E., Shahrabadi, M. S., van den Elzen, H. M. 1974. Gentamicin resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: R-factor-mediated resistance. *Antimicrob. Agents Chemother.* **6**: 191-199.
- Bryan, L. E., van den Elzen, H. M., and Tseng, J. T. 1972. Transferable drug resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1**: 22-29.
- Burlage, R. S., Bemis, L. A., Layton, A. C., Sayler, G. S., and Larimer, F. 1990 Comparative genetic organization of incompatibility group P degradative plasmids. *J. Bacteriol.* **172**: 6818-6825.

- Bushman, F.** 2002. Lateral DNA transfer: mechanisms and consequences. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Cakrabarty, A. M.** 1972. Genetic basis of the biodegradation of Salicylate in *Pseudomonas*. *J. Bacteriol.* **146**: 815-823.
- Chakrabarty, A. M.** 1973. Genetic fusion of incompatible plasmid in *Pseudomonas*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **70**: 1641-1644.
- Chatterjee, D. K., and Chakrabarty, A. M.** 1982. Genetic rearrangements in plasmids specifying total degradation of chlorinated benzoic acids. *Mol. Gen. Genet.* **188**: 279-285.
- Chatterjee, D. K., Kellogg, S. T., Hamada, S., and Chakrabarty, A. M.** 1981. Plasmid specifying total degradation of 3-chlorobenzoate by a modified ortho pathway. *J. Bacteriol.* **146**: 639-646.
- Connors, M.A. and Barnsley, E. A.** 1980. Metabolism of naphthalene by pseudomonads: salicylaldehyde as the first possible inducer in the metabolic pathway. *J. Bacteriol.* **141**: 1052-1054.
- Cronin, C. N., Kim, J., Fuller, J. H., Zhang, X., and McIntire, W. S.** 1999. Organization and sequences of *p*-hydroxybenzaldehyde dehydrogenase and other plasmid-encoded genes for early enzymes of the *p*-cresol degradative pathway in *Pseudomonas putida* NCIMB 9866 and 9869. *DNA seq.* **10**: 7-17.
- Dame, R. T., Luijsterburg, M. S., Krin, E., Bertin, P. N., Wagner, R., and Wuite, G. J. L.** 2005. DNA bridging: a property shared among H-NS-like proteins. *J. Bacteriol.* **187**: 1845-1848.
- Dame, R. T., Wyman, C., and Goosen, N.** 2000. H-NS mediated compaction of DNA visualized by atomic force microscopy. *Nucleic Acids Res.* **28**: 3504-3510.
- Davison, J.** 1999. Genetic exchange between bacteria in the environment. *Plasmid* **42**: 73-91.
- de Souza, M. L., Wackett, L. P., and Sadowsky, M. J.** 1998. The *atzABC* genes encoding atrazine catabolism are located on a self-transmissible plasmid in *Pseudomonas* sp. strain ADP. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**: 2323-2326.
- de Souza, M. L., Wackett, L. P., Boundy-Mills, K. L., Mandelbaum, R. T., and Sadowsky, M. J.** 1995. Cloning, characterization, and expression of a gene region from *Pseudomonas* sp. strain ADP involved in the dechlorination of atrazine. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**: 3373-3378.
- Dehmel, U., Engesser, K.-H., Timmis, K. N., and Dwyer, D. F.** 1995. Cloning, nucleotide sequence and expression of the gene encoding a novel dioxygenase involved in metabolism of carboxydiphenyl ethers in *Pseudomonas pseudoalcaligenes* POB310. *Arch. Microbiol.* **163**: 35-41.
- Denef, V. J., Park, J., Tsoi, T. V., Rouillard, J. M., Zhang, H., Wibbenmeyer, J. A., Verstraete, W., Gulari, E., Hashsham, S. A., Tiedje, J. M.** 2004. Biphenyl and benzoate metabolism in a genomic context: outlining genome-wide metabolic networks in *Burkholderia xenovorans* LB400. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**: 4961-4970.
- Dennis, J. J.** 2005. The evolution of IncP catabolic plasmid. *Curr. Opin. Biotechnol.* **16**: 291-298.
- Dennis, J. J., and Zylstra, G. J.** 2004. Complete sequence and genetic organization of pDTG1, the 83 kilobase naphthalene degradation plasmid from *Pseudomonas putida* strain NCIB 9816-4. *J. Mol. Biol.* **341**: 753-768.
- Don, R. H., and Pemperton, J. M.** 1985. Genetic and physical map of the 2,4-dichlorophenoxyacetic acid degradative plasmid pJP4. *J. Bacteriol.* **161**: 466-468.
- Dorman, C. J.** 2004. H-NS: a universal regulator for a dynamic genome. *Nat. Rev. Microbiol.* **2**: 391-400.
- Dunn, N. W., and Gunsalus, I. C.** 1973. Transmissible plasmid coding early enzymes of naphthalene oxidation in *Pseudomonas putida*. *J. Bacteriol.* **114**: 974-979.
- Dutton, J. R., Venables, W. A., and Saint, C. P.** 1995. *Comamonas acidovorans* UCC61 catabolizes *o*-phthalate via a 4,5-oxygenation pathway that is encoded on a 70 kbp section of plasmid pOPH1 bounded by directly repeated sequences. *Microbiology* **141**: 1673-1682.
- Easter, C. L., Schwab, H., and Helinski, R.** 1998. Role of the *parCBA* operon of the broad-host range plasmid RK2 in stable plasmid maintenance. *J. Bacteriol.* **180**: 6023-6030.
- Easter, C. L., Sobczyk, P. A. and Helinski, R.** 1997. Contribution of different segments of the *par* region to stable maintenance of the broad-host-range plasmid RK2. *J. Bacteriol.* **179**: 6472-6479.
- Eaton R. W., and Timmis, K. N.** 1986. Characterization of a plasmid-specified pathway for catabolism of isopropylbenzene in *Pseudomonas putida* RE204. *J. Bacteriol.* **168**: 123-131.
- Endoh, T., Kasuga, K., Horinouchi, M., Yoshida, T., Habe, H., Nojiri, H., and Omori, T.** 2003. Characterization and identification of genes essential for dimethyl sulfide utilization in *Pseudomonas putida* strain DS1. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **62**: 83-91.

- Espinosa, M., Cohen, S., Mouturier, M., del Solar, G., Díaz-Orejas, R., Giraldo, R., Jänniere, L., Miller, C., Osborn, M., and Thomas, C. M. 2000. Plasmid replication and copy number control. In *The horizontal gene pool* (Thomas, C. M. ed.), pp.1-47, Harwood Academic Publishers, Amsterdam.
- Fava, F., Gioia, D. D., Marchetti, L., Quattrino, G., and Marraffa V. 1993. Aerobic mineralization of chlorobenzoates by a natural polychlorinated biphenyl-degrading mixed bacterial culture. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **40**: 541-548.
- Foght, J. M., and Westlake, D. W. 1990. Expression of dibenzothiophene-degradative genes in two *Pseudomonas* species. *Can. J. Microbiol.* **36**: 718-724.
- Fong, K. P. Y., Goh, C. B. H., and Tan, H. M. 1996. Characterization and expression of the plasmid-borne *bedD* gene from *Pseudomonas putida* ML2, which codes for a NAD⁺-dependent *cis*-benzene dihydrodiol dehydrogenase. *J. Bacteriol.* **178**: 5592-5601.
- Forns, N., Banos, R. C., Balsalobre, C., Juarez, A., and Madrid, C. 2005. Temperature-dependent conjugative transfer of R27: role of chromosome- and plasmid-encoded Hha and H-NS proteins. *J. Bacteriol.* **187**: 3950-3959.
- Frost, L. S., and Manchak, J. 1998. F- phenocopies: characterization of expression of the F transfer region in stationary phase. *Microbiology* **144**: 2579-2587.
- Fujii, T., Takeo, M., and Maeda, Y. 1997. Plasmid-encoded genes specifying aniline oxidation from *Acinetobacter* sp. strain YAA. *Microbiology* **143**:93-99.
- Fulthorpe, R. R., and R. C. Wyndham. 1991. Transfer and expression of the catabolic plasmid pBRC60 in wild bacterial recipients in a freshwater ecosystem. *Appl. Environ. Microbiol.* **57**: 1546-1553.
- Fulthorpe, R.R., and Wyndham, R. C. 1989. Survival and activity of a 3-chlorobenzoate-catabolic genotype in a natural system. *Appl. Environ. Microbiol.* **55**: 1584-1590.
- Funnell, B. E. 1988. Mini-P1 plasmid partitioning: excess ParB protein destabilizes plasmids containing the centromere *parS*. *J. Bacteriol.* **170**: 954-960.
- Funnell, B. E. 2005. Partition-mediated plasmid pairing. *Plasmid.* **53**: 119-125.
- Funnell, B. E., and Slavcev, R. A. 2004. Partition systems of bacterial plasmids, pp. 81-103. In E. Funnell and G. J. Philips (ed.), *Plasmid Biology*. ASM Press, Washington, D.C.
- Furukawa, K., N. Hayase, K. Taira, and N. Tomizuka. 1989. Molecular relationship of chromosomal genes encoding biphenyl/polychlorinated biphenyl catabolism: some soil bacteria possess a highly conserved *bph* operon. *J. Bacteriol.* **166**: 392-398.
- Gelder, L. E., Vandecasteele, F. P. J., Brown, C. J., Forney, L. J., and Top, E. M. 2005. Plasmid donor affects host range of promiscuous IncP-1β plasmid pB10 in an activated-sludge microbial community. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**: 5309-5317.
- Gerdes, K., Ayora, S., Canosa, I., Ceglowski, P., Díaz-Orejas, R., Franch, T., Gulyaev, A. P., Bugge Jensen, R., Kobayashi, I., Macpherson, C., Summers, D., Thomas, C. M., and Zielenkiewicz, U. 2000. Plasmid maintenance systems. In *The horizontal gene pool* (Thomas, C. M. ed), pp.49-85, Harwood Academic Publishers, Amsterdam.
- Gilmour, M. W., Thomson N. R., Sanders, M., Parkhill, J., and Talyor, D. E. 2004. The complete nucleotide sequence of the resistance plasmid R478: defining the backbone components of incompatibility group H conjugative plasmids through comparative genomics. *Plasmid* **52**: 182-202.
- Giraldo, R., and Fernández-Tresguerres, M. E. 2004. Twenty years of the pPS10 replicon: insights on the molecular mechanism for the activation of DNA replication in iteron-containing bacterial plasmids. *Plasmid* **52**: 69-83.
- Goodman, A. L., and Lory, S. 2004. Analysis of regulatory networks in *Pseudomonas aeruginosa* by genomewide transcriptional profiling. *Curr. Opin. Microbiol.* **7**: 39-44.
- Greated, A., Lambersten, L., Williams P. A., and Thomas, C. M. 2002. Complete sequence of the IncP-9 TOL plasmid pWW0 from *Pseudomonas putida*. *Environ. Microbiol.* **4**: 856-871.
- Grindley, N. D. F. 2002. The movement of Tn3-like elements: Transposition and Cointegrate resolution. pp. 272-302. In *Mobile DNA II*. (Craig, L., N., R., Craigie, R., Gellert, M., and Lambowitz, A. M. ed.), ASM Press, Washington, D. C.
- Habe, H., Ashikawa, Y., Saiki, Y., Yoshida, T., Nojiri, H., and Omori, T. 2002. *Sphingomonas* sp. strain KA1, carrying a carbazole dioxygenase gene homologue, degrades chlorinated dibenzo-*p*-dioxins in soil. *FEMS Microbiol. Lett.* **211**: 43-49.

- Habe, H., Morii, K., Fushinobu, S., Nam, J.-W., Ayabe, Y., Yoshida, T., Wakagi, T., Yamane, H., Nojiri, H., and Omori, T.** 2003. Crystal structure of a histidine-tagged serine hydrolase involved in the carbazole degradation (CarC enzyme). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **303**: 631-639.
- Haines, A. S., Jones, K., Cheung, M., and Thomas, C. M.** 2005. The IncP-6 plasmid Rms149 consists of a small mobilizable backbone with multiple large insertions. *J. Bacteriol.* **187**: 4728-4738.
- Hedges, R. W., and Jacob, A. E.** 1975. Mobilization of plasmid-borne drug resistance determinants for transfer from *Pseudomonas aeruginosa* to *Escherichia coli*. *Mol. Gen. Genet.* **140**: 69-79.
- Hedges, R. W., and Jacoby, G. A.** 1980. Compatibility and molecular properties of plasmid Rms149 in *Pseudomonas aeruginosa* and *Escherichia coli*. *Plasmid* **3**: 1-6.
- Herrmann, H., Janke, D., Krejsa, S., and Roy, M.** 1988. In vivo generation of R68.45-pPGH1 hybrid plasmids conferring a Phl⁺ (meta pathway) phenotype. *Mol. Gen. Genet.* **214**: 173-176.
- Heuer, H., Szczepanowski, R., Schneiker, S., Puhler, A., and Top, E. M.** 2004. The complete sequences of plasmids pB2 and pB3 provide evidence for a recent ancestor of the IncP-1 β group without any accessory genes. *Microbiology* **150**: 3591-3599.
- Hooper, D. J., and Kemp, P. D.** 1980. regulation of enzymes of the 3,5-xyleneol degradative pathway in *Pseudomonas putida*: evidence for a plasmid. *J. Bacteriol.* **142**: 21-26.
- Ingram, L., Sykes, R. B., Grinsted, J., Saunders, J. R., and Richmond, M. H.** 1972. A transmissible resistance element from a strain of *Pseudomonas aeruginosa* containing no detectable extrachromosomal DNA. *J. Gen. Microbiol.* **72**: 269-279.
- Inoue, K., Habe, H., Yamane, H., Omori, T., and Nojiri, H.** 2005. Diversity of carbazole-degrading bacteria having the *car* gene cluster: isolation of a novel gram-positive carbazole-degrading bacterium. *FEMS Microbiol. Lett.* **245**: 145-153.
- Inoue, K., Widada, J., Nakai, S., Endoh, T., Urata, M., Ashikawa, Y., Shintani, M., Saiki, Y., Yoshida, T., Habe, H., Omori, T., and Nojiri, H.** 2004. Divergent structures of carbazole degradative *car* operons isolated from gram-negative bacteria. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **68**: 1467-1480.
- Izmalkova, T. Yu., Sazonova, O. I., Sokolov, S. L., Kosheleva, I. A., and Boronin, A. M.** 2005. The P-7 incompatibility group plasmids responsible for biodegradation of naphthalene and salicylate in fluorescent *Pseudomonads*. *Microbiology(Pleiades publish)* **74**: 342-348.
- Jacoby, G. A.** 1974. Properties of R plasmids determining gentamicin resistance by acetylation in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **6**: 239-252.
- Jacoby, G. A.** 1986. Resistance plasmids of *Pseudomonas*, pp.265–293. In J. R. Sokatch (ed.), *The Bacteria*. Academic Press, New York.
- Jacoby, G. A., Sutton, L., Knobel, L., and Mammen, P.** 1983. Properties of IncP-2 plasmids of *Pseudomonas* spp. *Antimicrob. Agents Chemother.* **24**: 168-175.
- Jahnke, M., El-Banna, T., Klintworth, R., and Auling, G.** 1990. Mineralization of orthonilic acid is a plasmid-associated trait in *Alcaligenes* sp. O-1. *J. Gen. Microbiol.* **136**: 2241-2249.
- Jain, S., and Ohman, D. E.** 1998. Deletion of *algK* in mucoid *Pseudomonas aeruginosa* blocks alginate polymer formation and results in uronic acid secretion. *J. Bacteriol.* **180**: 634-641.
- Junker, F., and Cook, A. M.** 1997. Conjugative plasmids and the degradation of arylsulfonates in *Comamonas testosteroni*. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**: 2403-2410.
- Ka, J. O. and Tiedje, J. M.** 1994. Integration and excision of a 2,4-dichlorophenoxyacetic acid-degradative plasmid in *Alcaligenes paradoxus* and evidence of its natural intergeneric transfer. *J. Bacteriol.* **176**: 5284-5289.
- Kang, Y., Weber, K. D., Qiu, Y., Kiley, P. J., and Blattner, F. R.** 2004. Genome-wide expression analysis indicates that FNR of *Escherichia coli* K-12 regulates a large number of genes of unknown function. *J. Bacteriol.* **187**: 1135-1160.
- Kato, K., Ohtsuki, K., Mitsuda, H., Yomo, T., Negoro, S., and Urabe, I.** 1994. Insertion sequence IS6100 on plasmid pOAD2, which degrades nylon oligomers. *J. Bacteriol.* **76**: 1197-1200.
- Kawasaki, H., Yahara, H., and Tonomura, K.** 1981. Isolation and characterization of plasmid pUO1 mediating dehalogenation of haloacetate and mercury resistance in *Moraxella* sp. *B. Agric. Biol. Chem.* **45**: 1477-1481.
- Keil, H., Keil, S., Pickup, R. W., and Williams, P. A.** 1985. Evolutionary conservation of genes coding for meta pathway enzymes within TOL plasmids pWW0 and pWW53. *J. Bacteriol.* **164**: 887-895.

- Keil, H., S. Keil, and Williams, P. A.** 1987. Molecular analysis of regulatory and structural *xyl* genes of the TOL plasmid pWW53-4. *J. Gen. Microbiol.* **133**: 1149-1158.
- Keshavartz, T., Lilly, M. D., Clarke, P. H.** 1985. Stability of a catabolic plasmid in continuous culture. *J. Gen. Microbiol.* **131**: 1193-1203.
- Khodursky, A. B., Peter, B. J., Cozzarelli, N. R., Botstein, D., Brown, P. O., and Yanofsky, C.** 2000. DNA microarray analysis of gene expression in response to physiological and genetic changes that affect tryptophan metabolism in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **97**: 12170-12175.
- Kholodii, G. Y., Yurieva, O. V., Gorlenko, Z. M., Mindlin, S. Z., Bass, I. A., Lomovskaya, O. L., Kopteva, A. V., and Nikiforov, V. G.** 1997. Tn5041: a chimeric mercury resistance transposon closely related to the toluene degradative transposon Tn4651. *Microbiology* **143**: 2549-2556.
- Kovach, M. E., Elzer, P. H., Hill, D. S., Robertson, G. T., Farris, M. A., Roop, R. M., II, and Peterson K. M.** 1995. Four new derivatives of the broad-host-range cloning vector pBBR1MCS, carrying different antibiotic-resistance cassettes. *Gene* **166**: 175-176.
- Krüger, R., Rakowski, S. A., and Filutowicz, M.** 2004. Participating elements in the replication of iteron-containing plasmids, pp. 25-45. *In* E. Funnell and G. J. Philips (ed.), *Plasmid Biology*. ASM Press, Washington, D.C.
- Kunz, D. A., and Chapman, P. J.** 1981. Isolation and characterization of spontaneously occurring TOL plasmid mutants of *Pseudomonas putida* HS1. *J. Bacteriol.* **146**: 952-964.
- Kwong, S. M., Yeo, C. C., Poh, C. L.** 2001. Molecular analysis of the pRA2 partitioning region: ParB autoregulates *parAB* transcription and forms a nucleoprotein complex with the plasmid partition site, *parS*. *Mol. Microbiol.* **40**: 621-633.
- Laemmli, C. M., Leveau, J. H., Zehnder, A. J., and van der Meer, J. R.** 2000. Characterization of a second *tfd* gene cluster for chlorophenol and chlorocatechol metabolism on plasmid pJP4 in *Ralstonia eutropha* JMP134 (pJP4). *J. Bacteriol.* **182**: 4165-4172.
- Lambertsen, L. M., Molin, S., Kroer, N., Thomas, C. M.** 2004. Transcriptional regulation of pWW0 transfer genes in *Pseudomonas putida* KT2440. *Plasmid* **52**: 169-181.
- Lawley, T. D., Gilmour, M. W., Gunton, J. E., Stamdevem, L. J., and Taylor, D. E.** 2002. Functional and mutational analysis of conjugative transfer region 1 (Tra1) from the IncHI1 plasmid R27. *J. Bacteriol.* **184**: 2173-2180.
- Lawley, T. D., Gilmour, M. W., Gunton, J. E., Tracz, D. M., and Taylor, D. E.** 2003. Functional and mutational analysis of conjugative transfer region 2 (Tra2) from the IncHI1 plasmid R27. *J. Bacteriol.* **185**: 581-591.
- Lawley, T., Wilkins B. M., and Frost, L. S.** 2004. Bacterial conjugation in Gram negative bacteria. pp. 203-226. *In* E. Funnell and G. J. Philips (ed.), *Plasmid Biology*. ASM Press, Washington, D.C.
- Li, W., Shi, J., Wang, X., Han, Y., Tong, W., Ma, L., Liu, B., and Cai, B.** 2004. Complete nucleotide sequence and organization of the naphthalene catabolic plasmid pND6-1 from *Pseudomonas* sp. strain ND6. *Gene* **336**: 231-240.
- Lloyd-Jones, G., De Jong, C., Ogden, R. C., Duetz, W. A., and Williams, P. A.** 1994. Recombination of the *bph* (biphenyl) catabolic genes from plasmid pWW100 and their deletion during growth on benzoate. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**: 691-696.
- Mäe, A., Marits, R., Ausmees, N., Kõiv, V., Heinaru, A.** 1993. Characterization of a new 2,4-dichlorophenoxyacetic acid degrading plasmid pEST4011: physical map and localization of catabolic genes. *J. Gen. Microbiol.* **139**: 3165-3170.
- Maeda, K., Nojiri, H., Shintani, M., Yoshida, T., Habe, H., and Omori, T.** 2003. Complete nucleotide sequence of carbazole/dioxin-degrading plasmid pCAR1 in *Pseudomonas resinovorans* strain CA10 indicates its mosaicism and the presence of large catabolic transposon Tn4676. *J. Mol. Biol.* **326**: 21-33.
- Martinez, B., Tomkins, J., Wackett, L. P., Wing, R., and Sadowsky, M. J.** 2001. Complete nucleotide sequence and organization of the atrazine catabolic plasmid pADP-1 from *Pseudomonas* sp. strain ADP. *J. Bacteriol.* **183**: 5684-5697.
- Miyakoshi, M., Urata, M., Habe, H., Omori, T., Yamane, H., and Nojiri, H.** Differentiation of carbazole catabolic operons by replacement of the regulated promoter via transposition of an insertion sequence. *J. Biol. Chem.* in press.
- Mulbry, W. W., Karns, J. S., Kearney, P. C., Nelson, J. O., McDaniel, C. S., Wild, J. R.** 1986. Identification of a plasmid-borne parathion hydrolase gene from *Flavobacterium* sp. by Southern hybridization with *opd* from *Pseudomonas diminuta*. *Appl. Environ. Microbiol.* **51**: 926-930.

- Murata, T., Ohnishi, M., Ara, T., Kaneko, J., Han, C. -G., Li, W. F., Takashima, K., Nojima, H., Nakayama, K., Kaji, A., Kamio, Y., Miki, T., Mori, H., Ohtsubo, E., Terawaki, Y., and Hayashi, T. 2002. Complete nucleotide sequence of plasmid RtsI: implications for evolution of large plasmid genomes. *J. Bacteriol.* **184**: 3194-3202.
- Negoro, S., and Okada, H. 1982. Physical map of nylon oligomer degradative plasmid pOAD2 harbored in *Flavobacterium* sp. K172. *Agric. Biol. Chem.* **46**: 745-750.
- Negoro, S., Shinagawa, H., Atsuo, N., Kinoshita, S., Hatozaki, T., Okada, H. 1980. Plasmid control of 6-aminohexanoic acid cyclic dimer degradation enzymes of *Flavobacterium* sp. K172. *J. Bacteriol.* **143**: 238-245.
- Nieto, C., Girado, R., Fernández-Tresguerres, M. E., and Diaz, R. 1992. Genetic and functional analysis of the basic replicon of pPS10, a plasmid specific for *Pseudomonas* isolated from *Pseudomonas syringae* patovar *savastanoi*. *J. Mol. Biol.* **223**: 415-426.
- Nojiri, H., and Omori, T. 2002. Molecular bases of aerobic bacterial degradation of dioxins: involvement of angular dioxygenation. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **61**: 2001-2016.
- Nojiri, H., Ashikawa, Y., Noguchi, H., Nam, J.-W., Urata, M., Fujimoto, Z., Uchimura, H., Terada, T., Nakamura, S., Shimizu, K., Yoshida, T., Habe, H., and Omori, T. 2005. Structure of the terminal oxygenase component of angular dioxygenase, carbazole 1,9a-dioxygenase. *J. Mol. Biol.* **351**: 355-370.
- Nojiri, H., Sekiguchi, H., Maeda, K., Urata, M., Nakai, S., Yoshida, T., Habe, H., and Omori, T. 2001. Genetic characterization and evolutionary implications of *car* gene cluster in the carbazole degrader *Pseudomonas* sp. strain CA10. *J. Bacteriol.* **183**: 3663-3679.
- Nojiri, H., Shintani, M., and Omori, T. 2004. Divergence of mobile genetic elements involved in the distribution of xenobiotic-catabolic capacity. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **64**: 154-174.
- Ogawa, N., Chakrabarty, A. M., and Zaborina, O. 2004. Degradative plasmids, pp. 341–376. In E. Funnell and G. J. Philips (ed.), *Plasmid Biology*. ASM Press, Washington, D.C.
- Ogawa, N., Miyashita, K. 1995. Recombination of a 3-chlorobenzoate catabolic plasmid from *Alcaligenes eutrophus* NH9 mediated by direct repeat elements. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**: 3788-3795.
- Ouchiya, N., Miyachi, S., and Omori, T. 1998. Cloning and nucleotide sequence of carbazole catabolic genes from *Pseudomonas stutzeri* strain OM1, isolated from activated sludge. *J. Gen. Appl. Microbiol.* **44**: 57-63.
- Ouchiya, N., Y. Zhang, T. Omori, and T. Kodama. 1993. Biodegradation of carbazole by *Pseudomonas* spp. CA06 and CA10. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **57**: 455–460.
- Pansegau, W., Lanka, E., Barth, P. T., Figurski, D. H., Guiney, D. G., Haas, D., Helsinki, D. R., Schwab, H., Stanisich, V. A., and Thomas, C. M. 1994. Complete nucleotide sequence of Birmingham IncPα plasmids. Compilation and comparative analysis. *J. Mol. Biol.* **239**: 623-663.
- Pappas, C. T., Sram, J., Moskvina, O. V., Ivanov, P. S., Mackenzie, R. C., Choudhary, M., Land, M. L., Larimer, F. W., Kaplan, S., and Gomelsky, M. 2004. Construction and validation of the *Rhodobacter sphaeroides* 2.4.1 DNA microarray: transcriptome flexibility at diverse growth modes. *J. Bacteriol.* **186**: 4748-4758.
- Park, H. S., and Kim, H. S. 2000. Identification and characterization of nitrobenzene catabolic plasmids pNB1 and pNB2 in *Pseudomonas putida* HS12. *J. Bacteriol.* **182**: 573-580.
- Park, W., Jeon, C. O., Hohnstoch-Ashe, A. M., Winans, S. C., Zylstra, G. J., and Madsen, E. L. 2003. Identification and characterization of the conjugal transfer region of the pCgl plasmid from naphthalene-degrading *Pseudomonas putida* Cgl. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**: 3263-3271.
- Pemberton, J. M., and Clark, A. J. 1973. Detection and characterization of plasmids in *Pseudomonas aeruginosa* strains PAO. *J. Bacteriol.* **114**: 424-433.
- Perez-Pantoja, D., Guzman, L., Manzano, M., Pieper, D. H., Gonzalez, B. 2000. Role of *tfdC(I)D(I)E(I)F(I)* and *tfdD(II)C(II)E(II)F(II)* gene modules in catabolism of 3-chlorobenzoate by *Ralstonia eutropha* JMP134(pJP4). *Appl. Environ. Microbiol.* **66**: 1602-1608.
- Perez-Pantoja, D., Ledger, T., Pieper, D. H., and Gonzalez, B. 2003. Efficient turnover of chlorocatechols is essential for growth of *Ralstonia eutropha* JMP134 (pJP4) in 3-chlorobenzoic acid. *J. Bacteriol.* **185**: 1534-1542.
- Peters, M., Heinaru, E., Talpsep, E., Wand, H., Stottmeister U., Heinaru, A., and Nurk, A. 1997. Acquisition of a deliberately introduced phenol degradation operon, *pheBA*, by different indigenous *Pseudomonas* species. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**: 4899-4906.
- Plumeier, I., Perez-Pantoja, D., Heim, S., Gonzalez, B., Pieper, D. H. 2002. Importance of different *tfd* genes for degradation of chloroaromatics by *Ralstonia eutropha* JMP134. *J. Bacteriol.* **184**: 4054-4064.

- Poh, R. P. C., Smith, A. R. W., and Bruce, I. J.** 2002. Complete characterization of Tn5530 from *Burkholderia cepacia* strain 2a (pIJB1) and studies of 2,4-dichlorophenoxyacetate uptake by the organism. *Plasmid* **48**: 1-12.
- Rescalli, E., Saini, S., Bartocci, C., Rychlewski, L., de Lorenzo, V., and Berton, G.** 2004. Novel Physiological modulation of the Pu promoter of TOL plasmid. *J. Biol. Chem.* **279**: 7777-7784.
- Rheinwald J. G., Chakrabarty, A. M., and Gunsalus, I. C.** 1973. A transmissible plasmid controlling camphor oxidation in *Pseudomonas putida*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **70**: 885-889.
- Rimsky, S.** 2004. Structure of the histone-like protein H-NS and its role in regulation and genome superstructure. *Curr. Opin. Microbiol.* **7**: 109-114.
- Rist, M., and Kertesz, M. A.** 1998. Construction of improved plasmid vectors for promoter characterization in *Pseudomonas aeruginosa* and other Gram-negative bacteria. *FEMS Microbiol. Lett.* **169**: 179-183.
- Rodriguez-Lemoine, V., Jacob, A. E., Hedges, R. W., and Datta, N.** 1975. Thermosensitive production of their transfer systems by group S plasmids. *J Gen Microbiol* **86**: 111-114.
- Romine, M. F., Stillwell, L. C., Wong, K. K., Thurston, S. J., Sisk, E. C., Sensen, C., Gaasterland, T., Fredrickson, J. K., Saffer, J. D.** 1999. Complete sequence of a 184-kilobase catabolic plasmid from *Sphingomonas aromaticivorans* F199. *J. Bacteriol.* **181**: 1585-1602.
- Rosenthal, R. S., and Rodwell, V. W.** 1998. Purification and characterization of heteromeric transcriptional activator MvaT of the *Pseudomonas mevalonii* mvaAB operon. *Protein Sci.* **7**: 178-184.
- Royle, P. L., Matsumoto, H., and Holloway, B. W.** 1981. Genetic circularity of the *Pseudomonas aeruginosa* PAO chromosome. *J. Bacteriol.* **145**: 145-155.
- Sagai, H., Hasuda, K., Iyobe, S., Bryan L. E., Holloway, B. W., and Mitsuhashi, S.** 1976. Classification of R plasmids by incompatibility in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **10**: 573-578.
- Saint, C. P., McClure, N. C., and Venables, W. A.** 1990. Physical map of the aromatic amine and m-toluate catabolic plasmid pTDN1 in *Pseudomonas putida*: location of a unique meta-cleavage pathway. *J. Gen. Microbiol.* **136**: 615-625.
- Sambrook, J., and Russell, D. W.** 2001. *Molecular cloning: a laboratory manual*, 3rd ed. Cold Spring Harbour Laboratory, Cold Spring Harbour, NY.
- Sato, S., Nam, J. -W., Kasuga, K., Nojiri, H., Yamane, H., and Omori, T.** 1997a. Identification and characterization of genes encoding carbazole 1,9a-dioxygenase in *Pseudomonas* sp. strain CA10. *J. Bacteriol.* **179**: 4850-4858.
- Sato, S., Ouchiya, N., Kimura, T., Nojiri, H., Yamane, H., and Omori, T.** 1997b. 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**: 4841-4849.
- Sawada, Y., Yaginuma, S., Tai, M., Iyobe, S., and Mitsuhashi, S.** 1976. Plasmid-mediated penicillin beta-lactamases in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **9**: 55-60.
- Schafer, A., Tauch, A., Jager, W., Kalinowski, J., Thierbach, G., and Puhler, 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**: 69-73.
- Schlüter, A., Heuer, H., Szczepanowski, R., Forney, L. J., Tho,as, C. M., Puhler, A., and Top, E. M.** 2003. The 64,508 bp IncP-1 β antibiotic multiresistance plasmid pB10 isolated from a waste-water treatment plant provides evidence for recombination between members of different branches of the IncP-1 β group. *Microbiology* **149**: 3139-3153.
- Schlüter, A., Heuer, H., Szczepanowski, R., Poler, S. M., Schneiker, S., Puhler, A., and Top, E. M.** 2005. Plasmid pB8 is closely related to the prototype IncP-1 β plasmid R751 but transfers poorly to *Escherichia coli* and carries a new transposon encoding a small multidrug resistance efflux protein. *Plasmid* **54**: 135-148.
- Scholz, P., Haring, V., Murillo, J., Witmann-Liebold, B., and Ashman, K.** 1989. Complete nucleotide sequence and gene organization of the broad host range plasmid RSF1010. *Gene* **75**: 271-288.
- Schumacher, M. A., and Funnell, B. E.** 2005. Structures of ParB bound to DNA reveal mechanism of partition complex formation. *Nature* **438**: 516-519.
- Serfer, C. M., Gibson, D. T., Munnecke, M., Lancaster, J. H.** 1982. Plasmid involvement in parathion hydrolysis by *Pseudomonas diminuta*. *Appl. Environ. Microbiol.* **44**: 246-249.
- Sevastyanovich, Y. R., Titok, M. A., Kraspwoak, R., Bingle, L. E. H., and Thomas, C. M.** 2005. Ability of

- IncP-9 plasmid pM3 to replicate in *Escherichia coli* is dependent on both *rep* and *par* functions. *Mol. Microbiol.* **57**: 819-833.
- Shaper, S., and Messer, W.** 1995. Interaction of the initiator protein DnaA of *Escherichia coli* with its DNA target. *J. Biol. Chem.* **270**:17622–17626
- Sherburne, C. K., Lawley, T. D., Gilmour, M. W., Blattner, F. R., Burland, V., Grotbeck, E., Rose, D. J., and Taylor, D. E.** 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**: 2177-2186.
- Shintani, M., Habe, H., Tsuda, M., Omori, T., Yamane, H., Nojiri, H.** 2005a. Recipient range of IncP-7 conjugative plasmid pCAR2 from *Pseudomonas putida* HS01 is broader than from other *Pseudomonas* strains. *Biotechnol. Lett.* **27**: 1847-1853.
- Shintani, M., Nojiri, H., Yoshida, T., Habe, H., and Omori, T.** 2003. Carbazole/dioxin-degrading *car* gene cluster is located on the chromosome of *Pseudomonas stutzeri* strain OM1 in a form different from the simple transposition of Tn4676. *Biotechnol. Lett.* **25**: 1255-1261.
- Shintani, M., Yano, H., Habe, H., Omori, T., Yamane, H., Tsuda, M., Nojiri, H.** Characterization of the replication, maintenance, and transfer features of the IncP-7 plasmid pCAR1 that carries carbazole/dioxin degradative genes. *Appl. Environ. Microbiol.* in press.
- Shintani, M., Yoshida, T., Habe, H., Omori, T., and Nojiri, H.** 2005b. Large plasmid pCAR2 and class II transposon Tn4676 are functional mobile genetic elements to distribute the carbazole/dioxin-degradative *car* gene cluster in different bacteria. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **67**: 370-382.
- Simon, M. J., Osslund, T.D., Saunders, R., Ensley, B. D., Suggs, S. Harcourt, A., Suen, W. C., Cruden, D. L., Gibson, D. T., and Zylstra, G. J.** 1993. Sequences of genes encoding naphthalene dioxygenase in *Pseudomonas putida* strains G7 and NCIB 9816-4. *Gene* **127**: 31-37.
- Simon, R., O'Connell, N., Labes, M., and Puhler, A.** 1986 Plasmid vectors for genetic analysis and manipulation of *Rhizobia* and other gram-negative bacteria. *Methods Enzymol.* **118**: 640-659.
- Smalla, K., Osborn, A. M., and Wellington, E. M. H.** 2000. Isolation and characterization of plasmids from bacteria. In *The horizontal gene pool* (Thomas, C. M. eds), pp.207-248, Harwood Academic Publishers, Amsterdam.
- Sota, M., Kawasaki, H., and Tsuda, M.** 2003. Structure of haloacetate-catabolic IncP-1 β plasmid pUO1 and genetic mobility of its residing haloacetate-catabolic transposon. *J. Bacteriol.* **185**: 6741–6745.
- Stalker, D. M., and McBride, K. E.** 1987. Cloning and expression in *Escherichia coli* of *Klebsiella azaenae* plasmid-borne gene encoding a nitrilase specific for the herbicide bromoxynil. *J. Bacteriol.* **169**: 955-960.
- Stillwell, L. C., Thurston, S. J., Schneider, R. P., Romine, M. F., Fredrickson, J. K., and Saffer, J. D.** 1995. Physical mapping and characterization of a catabolic plasmid from the deep-subsurface bacterium *Sphingomonas* sp. strain F199. *J. Bacteriol.* **177**: 4537-4539.
- Stuart-Keil, K. G., Hohnstock, A. M., Drees, K. P., Herrick, J. B., and Madsen E. L.** 1998. Plasmids responsible for horizontal transfer of naphthalene catabolism genes between bacteria at a coal tar-contaminated site are homologous to pDTG1 from *Pseudomonas putida* NCIB 9816-4. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**: 3633–3640.
- Summers, A. O., and Jacoby, G. A.** 1978. Plasmid-determined resistance to boron and chromium compounds in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **13**: 637–640.
- Tan, H. M.** 1999. Bacterial catabolic transposons. *Appl. Microbiol. Biotech.* **51**: 1-12.
- Tan, H. M., and Mason, J. R.** 1990. Cloning and expression of the plasmid encoded benzene dioxygenase genes from *Pseudomonas putida* ML2. *FEMS Microbiol. Lett.* **72**: 259-264.
- Tauchi, A., Schluter, A., Bischoff, N., Goemann, A., Meyer, F. & Puhler, A.** 2003. The 79,370-bp conjugative plasmid pB4 consists of an IncP-1 β backbone loaded with a chromate resistance transposon the *strA-strB* streptomycin resistance gene pair, the oxacillinase gene *bla_{NPS-1}*, and a tripartite antibiotic efflux system of the resistance-nodulation-division family. *Mol. Genet. Genomics.* **268**: 570-584.
- Tendeng, C., Soutourina, O. A., Danchin, A., and Bertin, P. N.** 2003. MvaT proteins in *Pseudomonas* spp.: a novel class of H-NS-like proteins. *Microbiology* **149**: 3047-3050.
- Tennstedt, T., Szczepanowski, R., Krahn, I., Puhler, A., and Schluter, A.** 2005. Sequence of the 68,869 bp IncP-1 α plasmid pTB11 from a waste-water treatment plant reveals a highly conserved backbone, a Tn402-like integron and other transposable elements. *Plasmid* **53**: 218-238.
- Thacker, R., Rorvig, O., Kahlon, P., and Gunsar, I. C.** 1978. NIC, a conjugative nicotine-nicotinate degradative

plasmid in *Pseudomonas convexa*. J Bacteriol **135**: 289-290.

Thomas, C. M. 2000. Preface. In *The horizontal gene pool* (Thomas, C. M. ed), pp.xi-xv, Harwood Academic Publishers, Amsterdam.

Thomas, C. M., and Haines, A. S. 2004. Plasmids of the genus *Pseudomonas*, pp. 197-231. In J.-L. Ramos. (ed.), *Pseudomonas*, Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York.

Thomas, C. M., and Nielsen, K. M. 2005. Mechanisms of, and barriers to, horizontal gene transfer between bacteria. Nat. Rev. Microbiol. **3**: 711-721.

Thorsted, P. B., Macartney, D. P., Akhtar, P., Haines, A. S., Ali, N., Davidson, P., Stafford, T./ Pocklington, M. J., Pansegrau, W., Wilkins, B. M., Lanka, E., and Thomas, C. M. 1998. Complete sequence of the IncP β plasmid R751: implications for evolution and organization of the IncP backbone. J. Mol. Biol. **282**: 969-990.

Top, E. M., Moënne-Loccoz, Y., Pembroke, T. and Thomas C. M. 2000. Phenotypic traits conferred by plasmids. In *The horizontal gene pool* (Thomas, C. M. eds), pp.249-285, Harwood Academic Publishers, Amsterdam.

Tralau, T., Cook, A. M., and Ruff, J. 2001. Map of the IncP1 β plasmid pTSA encoding the widespread genes (*tsa*) for *p*-toluenesulfonate degradation in *Comamonas teststeroni* T-2. Appl. Environ. Microbiol. 2001 **67**: 1508-1516.

Trefault, N., De la Iglesia, R., Molina, A. M., Manzano, M., Ledger, T., Pérez-Pantoja, D., Sánchez, M. A., Stuardo, M., and González, B. 2004. Genetic organization of the catabolic plasmid pJP4 from *Ralstonia eutropha* JMP134 (pJP4) reveals mechanisms of adaptation to chloroaromatic pollutants and evolution of specialized chloroaromatic degradation pathways. Environ. Microbiol. **6**: 655–668.

Tsuda, M., and Iino, T. 1990. Naphthalene degrading genes on plasmid NAH7 are on a defective transposon. Mol. Gen. Genet. **223**: 33-39.

Tsuda, M., and Genka, H. 2001. Identification and characterization of Tn4656, a novel class II transposon carrying a set of toluene-degrading genes from TOL plasmid pWW53. J. Bacteriol. **183**: 6215-6224.

Tsuda, M., and Iino, T. 1987. Genetic analysis of a transposon carrying toluene degrading genes on a TOL plasmid pWW0. Mol. Gen. Genet. **210**: 270-276.

Tsuda, M., and Iino, T. 1988. Identification and characterization of Tn4653, a transposon covering the toluene transposon Tn4651 on TOL plasmid pWW0. Mol. Gen. Genet. **213**: 72-77.

Tsuda, M., Minegishi, K., and Iino, T. 1989. Toluene transposons Tn4651 and Tn4653 are class II transposons. J. Bacteriol. **171**: 1386-1393.

Tsuda, M., Tan, H. M., Nishi, A., Furukawa, K. 1999. Mobile catabolic genes in bacteria. J. Biosci. Bioeng. **87**: 401-410.

Urata, M., Miyakoshi, M., Kai, S., Maeda, K., Habe, H., Omori, T., Yamane, H., and Nojiri, H. 2004. Transcriptional regulation of the *ant* operon, encoding two-component anthranilate 1,2-dioxygenase, on the carbazole-degradative plasmid pCAR1 of *Pseudomonas resinovorans* strain CA10. J. Bacteriol. **186**: 6815–6823.

Valet, I., Diggle, S. P., Stacey, R. E., Cámara, M., Ventre, I., Lory, S., Lazdunski, A., Williams, P., and Filloux, A. 2004. Biofilm formation in *Pseudomonas aeruginosa*: Fimbrial cup gene clusters are controlled by the transcriptional regulator MvaT. J. Bacteriol. **186**: 2880-2890.

Valet-Gely, I., Donovan, K. E., Fang, R., Joung, J. K., and Dove, S. L. 2005. Repression of phase-variable cup gene expression by H-NS-like proteins in *Pseudomonas aeruginosa*. Proc. Nat. Acad. Sci. USA. **102**: 11082-11087.

van der Meer, J. R., van Neerven, A. R. W., de Vries, E. J., de Vos, W. M., and Zehnder, A. J. B. 1991. Cloning and characterization of plasmid-encoded genes for the degradation of 1,2-dichloro-, and 1,2,4-trichlorobenzene of *Pseudomonas* sp. strain P51. J. Bacteriol. **173**: 6-15.

van Elsas, J. D., Fry, J., Hirsch, P., and Molin, S. 2000. Ecology of plasmid transfer and spread. In *The horizontal gene pool* (Thomas, C. M. eds), pp.175-206, Harwood Academic Publishers, Amsterdam.

Vedler, E., Vahter, M., and Heinaru, A. 2004. The completely sequenced plasmid pEST4011 contains a novel IncP1 backbone and a catabolic transposon harbouring *tfd* genes for 2,4-dichlorophenoxyacetic acid degradation. J. Bacteriol. **186**: 7161-7174.

Veldler, E., Kõiv, V., and Heinaru, A. 2000. Analysis of the 2,4-dichlorophenoxyacetic acid-degradative plasmid pEST4011 of *Achromobacter xylosoxidans* subsp. *denitrificans* strain EST4002. Gene **225**: 281-288.

Whittle, G., Katz, M. E., Clayton, E. H., & Cheetham, B. F. 2000. Identification and characterization of a native *Dichelobacter nodosus* plasmid, pDN1. Plasmid **43**: 230-234.

- Widada, J., Nojiri, H., Kasuga, K., Yoshida, T., Habe, H., and Omori, T. 2002. Molecular detection and diversity of polycyclic aromatic hydrocarbon-degrading bacteria isolated from geographically diverse sites. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **58**: 202–209.
- Will, W. R., Lu, J., and Frost, L. S. 2004. The role of H-NS in silencing F transfer gene expression during entry into stationary phase. *Mol. Microbiol.* **54**: 769–782.
- Williams, P. A., and Murray, K. 1974. Metabolism of benzoate and the methylbenzoates by *Pseudomonas putida* (arvilla) mt-2: evidence for the existence of a TOL plasmid. *J. Bacteriol.* **120**: 416–423.
- Williams, P. A., Jones, R. M., and Zylstra, G. 2004. Genomics of catabolic plasmids, p.165–195. In J.-L. Ramos. (ed.), *Pseudomonas*, Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York.
- Winstanley, C., Taylor, S. C., and Williams, P. A. 1987. pWW174: a large plasmid from *Acinetobacter calcoaceticus* encoding benzene catabolism by the beta-ketoadipate pathway. *Mol. Microbiol.* **2**: 219–227.
- Wyndham, R. C., Cashore, A. E., Nakatsu, C. H. and Peel, M. C. 1994. Catabolic transposons. *Biodegradation* **5**: 323–342.
- Xia, X. S., Aathithan, S., Oswiecimska, K., Smith, A. R., Bruce, I. J. 1998. A novel plasmid pIJB1 possessing a putative 2,4-dichlorophenoxyacetate degradative transposon Tn5530 in *Burkholderia cepacia* strain 2a. *Plasmid* **39**: 154–159.
- Yano, K., and Nishi, T. 1980. pKJ1, a naturally occurring conjugative plasmid coding for suphonamides. *J. Bacteriol.* **143**: 552–560.
- Yoshida, T., Ayabe, Y., Yasunaga, M., Usami, Y., Habe, H., Nojiri, H., and Omori, T. 2003. Genes involved in the synthesis of the exopolysaccharide methanolan by the obligate methylotroph *Methylobacillus* sp. strain 12S. *Microbiology* **149**: 431–444.
- Yuste, L., Hervas, A. B., Canosa, I., Tobes, R., Jimenez, J. I., Nogales, J., Perez-Perez, M. M., Santero, E., Diaz, E., Ramos, J. L., de Lorenzo, V., and Rojo, F. 2006. Growth phase-dependent expression of the *Pseudomonas putida* KT2440 transcriptional machinery analysed with a genome-wide DNA microarray. *Environ. Microbiol.* **8**: 165–177.
- Zechner, E. L., de la Cruz, F., Eisenbrandt, R., Grahn, A.M., Koraimann, G., Lanka, E., Muth, G., Pansegrau, W., Thomas, C. M., Wilkins, B. M., and Zatyka, M. 2000. Conjugative-DNA transfer processes. In *The horizontal gene pool* (Thomas, C. M. eds), pp.87–174, Harwood Academic Publishers, Amsterdam.
- Zhou, D., Han, Y., Song, Y., Tong, Z., Wang, J., Guo, Z., Pei, D., Pang, X., Zhai, J., Li, M., Cui, B., Qi, Z., Jin, L., Dai, R., Du, Z., Bao, J., Zhang, X., Yu, J., Wang, J., Huang, P., and Yang, R. 2004. DNA microarray analysis of genome dynamics in *Yersinia pestis*: insights into bacterial genome microevolution and niche adaptation. *J. Bacteriol.* **186**: 5138–5146.
- 前田香奈，2002 年，東京大学修士論文。
- 宮腰昌利，2004 年，東京大学修士論文
- 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，細胞工学実験プロトコール。
- 松原謙一，1978 年，プラスミド，講談社サイエンティフィック
- 津田雅孝，曾田匡洋，2005 年，環境浄化能をつかさどる可動性遺伝因子，蛋白質 核酸 酵素，vol.50: 1527–1534.

付録 1. 図に示した *P. stutzeri* OM1 株の染色体上の ORF の相同性検索結果.

ORF No.	登録した塩基配列中の位置 ^a	アミノ酸の数	遺伝子名と推定機能	タンパク質名	相同性を示したタンパク質		
					アミノ酸レベルの相同性 (%)	由来菌株	Accession No.
1	771-1325	184	CDP-diacylglycerol-glycerol-3-phosphate 3-phosphatidyltransferase	PgsA	73 (135/184) ^b	<i>P. aeruginosa</i> strain PAO1	NP_251274
2	1821-3329	502	Transposase	TnpA	48 (249/509) ^b	<i>Acidovorax avenae</i> subsp. <i>citrulli</i>	AAK00488
3	3334-4125	263	Transposase	TnpB	58 (151/258) ^b	<i>A. avenae</i> subsp. <i>citrulli</i>	AAK00487
4	4321-4704	127	Truncated ORF	3'-Half of ORF181 in pCAR1	100 (127/127)	<i>P. resinovorans</i> strain CA10	BAC41703
5	5449-6369	306	Putative transposase	Probable metal transporter	62 (74/119) ^b	<i>P. aeruginosa</i> strain PAO1	NP_249988
6	7086-7964	292	Aerotaxis receptor	Transposase	85 (230/279) ^b	<i>P. stutzeri</i> strain OX1	CAA06660
7	1-2658	885	Transposase	ORF182 homologue	81 (237/292) ^b	<i>P. resinovorans</i> strain CA10	BAC41704
8	2742-4250	502	Transposase	Aer	50 (231/461) ^b	<i>P. putida</i>	AAD22405
9	4254-5046	263	Transposase	TnpA	87 (777/885) ^b	<i>P. putida</i> strain mt-2 (pWW0)	NP_542906
10	5242-5562	106	Hypothetical protein	Transposase (ORF2)	98 (496/502)	This study	AAK00488
11	5667-6362	231	Putative transcriptional regulator (TetR/AcrR family)	TnpA	48 (248/509) ^b	<i>A. avenae</i> subsp. <i>citrulli</i>	
				Transposase (ORF3)	99 (262/263)	This study	
				TnpB	58 (151/258) ^b	<i>A. avenae</i> subsp. <i>citrulli</i>	AAK00487
				PAO979	76 (76/100) ^b	<i>P. aeruginosa</i> strain PAO1	NC_002516
				PhlH	39 (81/204) ^b	<i>P. fluorescens</i>	AAF20930

^a 各塩基配列は accession No. AB088753 (ORF1~7) および No. AB088757 (ORF8~13) に登録した.

^b 値は比較したアミノ酸残基のうち、同一の残基数で示した.

付録 2. KT2440(pCAR1)株の早期対数増殖期(EL)と定常期(ST)における
pCAR1 上の遺伝子の発現量の変動

遺伝子	EL	ST	変化倍率	培養時間 による変動	p 値	Bonferroni 補正後の p 値
ORF188	8.66	7.90	1.69	DOWN	5.24E-03	1.00E+00
ORF31	8.73	7.96	1.70	DOWN	6.76E-04	1.00E+00
ORF30	7.87	7.56	1.24	DOWN	1.22E-03	1.00E+00
<i>tnpA3</i>	9.34	11.24	3.74	UP	2.70E-14	1.50E-10
<i>antC</i>	8.41	7.64	1.70	DOWN	1.98E-06	1.10E-02
<i>antB</i>	9.49	9.12	1.29	DOWN	2.55E-08	1.42E-04
<i>antA</i>	8.23	7.55	1.61	DOWN	1.61E-05	8.96E-02
<i>tnpA2</i>	9.71	10.40	1.61	UP	1.75E-04	9.74E-01
ORF24	7.29	7.14	1.11	DOWN	1.45E-02	1.00E+00
<i>antR</i>	8.78	8.34	1.35	DOWN	2.45E-09	1.36E-05
ORF22	8.26	8.14	1.09	DOWN	2.23E-05	1.24E-01
ORF21	7.67	7.61	1.04	DOWN	3.73E-02	1.00E+00
ORF20	9.27	8.74	1.44	DOWN	1.74E-05	9.67E-02
ORF19	7.24	7.15	1.06	DOWN	8.72E-02	1.00E+00
ORF18	7.82	7.55	1.21	DOWN	1.59E-04	8.87E-01
ORF17	7.50	7.17	1.26	DOWN	5.36E-05	2.98E-01
ORF16	6.64	6.43	1.16	DOWN	4.87E-03	1.00E+00
ORF15	8.05	7.60	1.36	DOWN	3.03E-05	1.69E-01
ORF14	6.85	6.76	1.07	DOWN	3.53E-03	1.00E+00
ORF13	7.85	7.47	1.31	DOWN	2.46E-05	1.37E-01
ORF12	6.65	6.52	1.10	DOWN	4.77E-05	2.65E-01
ORF11	6.08	6.03	1.04	DOWN	2.53E-01	1.00E+00
<i>tnpA1</i>	9.91	10.66	1.68	UP	3.69E-05	2.05E-01
ORF9	7.07	7.14	1.05	UP	6.63E-02	1.00E+00
<i>carAa</i>	6.86	7.91	2.07	UP	6.01E-10	3.35E-06
<i>carAa</i>	6.95	8.10	2.22	UP	2.14E-09	1.19E-05
<i>carBa</i>	6.49	6.98	1.41	UP	9.14E-06	5.08E-02
<i>carBb</i>	7.87	8.43	1.47	UP	9.03E-07	5.02E-03
<i>carC</i>	6.78	7.35	1.48	UP	8.06E-09	4.48E-05
<i>carAc</i>	7.27	7.68	1.32	UP	3.67E-05	2.04E-01
ORF7	6.84	7.04	1.15	UP	6.24E-02	1.00E+00
<i>carAd</i>	6.80	6.77	1.03	DOWN	9.54E-01	1.00E+00
<i>carD</i>	6.48	6.62	1.10	UP	7.14E-01	1.00E+00
ORF33	6.64	6.64	1.00	DOWN	2.84E-02	1.00E+00
ORF34	6.15	6.22	1.05	UP	6.45E-03	1.00E+00
<i>carF</i>	6.38	6.57	1.14	UP	4.12E-02	1.00E+00
<i>carE</i>	6.20	6.28	1.06	UP	8.79E-01	1.00E+00
ORF37	6.55	6.66	1.07	UP	1.80E-01	1.00E+00
<i>tnpA4</i>	9.78	10.58	1.74	UP	2.31E-05	1.29E-01
ORF40	6.09	6.09	1.00	DOWN	2.12E-01	1.00E+00
ORF40	6.45	6.91	1.38	UP	1.27E-11	7.04E-08
ORF41	8.06	7.99	1.05	DOWN	5.34E-03	1.00E+00
ORF42	8.90	9.32	1.34	UP	1.47E-01	1.00E+00
<i>tnpRa</i>	7.68	7.77	1.07	UP	4.12E-01	1.00E+00
<i>tnpAa</i>	7.70	7.26	1.35	DOWN	9.63E-05	5.36E-01

ORF45	7.65	7.51	1.10	DOWN	1.87E-01	1.00E+00
ORF46	8.20	7.75	1.37	DOWN	1.29E-05	7.17E-02
ORF47	7.39	7.55	1.12	UP	4.50E-01	1.00E+00
ORF48	7.83	8.17	1.27	UP	9.40E-01	1.00E+00
<i>tnpS</i>	8.81	8.27	1.45	DOWN	1.16E-04	6.48E-01
<i>tnpT</i>	7.41	7.28	1.10	DOWN	2.03E-02	1.00E+00
ORF51	9.50	9.16	1.27	DOWN	1.77E-06	9.82E-03
ORF52	7.66	7.44	1.17	DOWN	7.95E-04	1.00E+00
ORF53	7.53	7.61	1.06	UP	6.50E-01	1.00E+00
ORF54	8.03	7.88	1.11	DOWN	2.28E-01	1.00E+00
ORF55	7.24	7.07	1.12	DOWN	1.28E-02	1.00E+00
<i>klaA</i>	6.99	7.01	1.01	UP	1.55E-01	1.00E+00
<i>klaB</i>	7.60	7.55	1.03	DOWN	4.96E-01	1.00E+00
<i>klaC</i>	7.82	7.72	1.07	DOWN	1.80E-02	1.00E+00
ORF59	8.64	8.04	1.52	DOWN	2.18E-07	1.21E-03
ORF60	7.73	7.61	1.09	DOWN	4.49E-01	1.00E+00
ORF61	8.19	7.77	1.34	DOWN	3.79E-05	2.11E-01
<i>repA</i>	7.11	7.20	1.06	UP	1.57E-02	1.00E+00
<i>parW</i>	6.95	6.79	1.12	DOWN	7.30E-04	1.00E+00
<i>parA</i>	8.18	11.49	9.94	UP	1.11E-16	6.18E-13
<i>parB</i>	8.31	11.34	8.15	UP	4.12E-14	2.29E-10
<i>parC</i>	8.79	10.93	4.41	UP	1.11E-16	6.18E-13
ORF67	8.21	9.52	2.48	UP	5.65E-13	3.14E-09
ORF68	6.94	6.96	1.01	UP	1.41E-01	1.00E+00
ORF69	6.89	6.90	1.01	UP	6.65E-02	1.00E+00
<i>pmr</i>	9.23	11.07	3.58	UP	0.00E+00	0.00E+00
ORF71	8.95	9.44	1.40	UP	5.33E-05	2.97E-01
ORF72	7.95	8.42	1.39	UP	1.59E-02	1.00E+00
ORF73	7.39	7.11	1.21	DOWN	3.95E-04	1.00E+00
ORF74	8.07	7.68	1.31	DOWN	1.94E-04	1.00E+00
ORF75	6.14	6.14	1.00	DOWN	4.51E-01	1.00E+00
ORF76	6.19	6.40	1.16	UP	2.68E-09	1.49E-05
ORF77	7.33	7.16	1.12	DOWN	2.71E-01	1.00E+00
ORF78	7.16	6.96	1.15	DOWN	1.53E-05	8.50E-02
ORF79	7.85	7.73	1.09	DOWN	3.15E-01	1.00E+00
ORF80	7.73	7.73	1.00	UP	6.11E-01	1.00E+00
ORF81	7.61	8.00	1.31	UP	2.73E-05	1.52E-01
ORF82	6.83	6.79	1.03	DOWN	9.43E-01	1.00E+00
ORF83	7.36	7.12	1.18	DOWN	1.96E-03	1.00E+00
ORF84	7.10	7.42	1.25	UP	9.69E-03	1.00E+00
ORF85	6.61	7.07	1.37	UP	4.52E-03	1.00E+00
ORF86	6.52	6.89	1.30	UP	4.91E-08	2.73E-04
ORF87	7.90	8.44	1.45	UP	3.11E-03	1.00E+00
ORF88	7.24	8.04	1.74	UP	7.94E-06	4.42E-02
ORF89	9.25	9.80	1.46	UP	3.90E-04	1.00E+00
ORF90	7.59	7.51	1.06	DOWN	1.43E-02	1.00E+00
ORF91	7.58	7.40	1.13	DOWN	2.59E-03	1.00E+00
ORF92	6.81	6.83	1.01	UP	8.54E-01	1.00E+00
ORF93	7.47	7.51	1.03	UP	6.66E-01	1.00E+00

ORF94	7.12	6.93	1.14	DOWN	1.03E-03	1.00E+00
ORF95	7.92	7.39	1.45	DOWN	2.01E-05	1.12E-01
ORF95a	9.59	10.39	1.75	UP	5.03E-08	2.80E-04
ORF96	6.37	6.25	1.09	DOWN	9.16E-03	1.00E+00
ORF97	6.36	6.24	1.09	DOWN	4.46E-04	1.00E+00
ORF98	7.66	7.28	1.30	DOWN	3.73E-04	1.00E+00
ORF99	7.10	6.96	1.11	DOWN	2.92E-03	1.00E+00
ORF100	7.71	8.11	1.32	UP	1.20E-05	6.69E-02
ORF101	7.10	7.33	1.17	UP	2.74E-05	1.52E-01
ORF102	8.86	8.91	1.03	UP	6.20E-01	1.00E+00
ORF103	8.45	8.58	1.10	UP	2.08E-01	1.00E+00
ORF104	6.61	7.14	1.44	UP	2.70E-04	1.00E+00
ORF105	7.07	7.11	1.03	UP	4.14E-01	1.00E+00
ORF106	6.91	6.89	1.02	DOWN	1.99E-02	1.00E+00
ORF107	6.34	6.33	1.01	DOWN	9.15E-01	1.00E+00
ORF108	7.14	7.08	1.04	DOWN	5.20E-04	1.00E+00
ORF109	6.58	6.55	1.02	DOWN	2.47E-01	1.00E+00
<i>trhN</i>	7.11	6.92	1.14	DOWN	2.13E-06	1.18E-02
ORF111	8.15	8.69	1.45	UP	1.30E-05	7.21E-02
ORF112	8.63	7.86	1.71	DOWN	1.54E-06	8.55E-03
ORF113	6.92	6.74	1.14	DOWN	7.39E-05	4.11E-01
ORF114	7.92	7.83	1.07	DOWN	1.05E-03	1.00E+00
ORF115	7.47	7.18	1.22	DOWN	5.50E-05	3.06E-01
<i>recT</i>	6.48	6.36	1.09	DOWN	2.28E-02	1.00E+00
ORF117	9.75	9.54	1.15	DOWN	1.88E-02	1.00E+00
ORF118	8.12	8.06	1.04	DOWN	2.57E-01	1.00E+00
ORF119	6.85	6.72	1.09	DOWN	1.04E-03	1.00E+00
ORF120	6.67	6.84	1.13	UP	3.25E-01	1.00E+00
<i>traI</i>	7.01	6.74	1.21	DOWN	1.17E-02	1.00E+00
<i>traG</i>	6.47	6.25	1.16	DOWN	2.23E-04	1.00E+00
ORF123	8.17	7.95	1.16	DOWN	1.03E-05	5.71E-02
ORF124	7.32	6.96	1.28	DOWN	3.60E-04	1.00E+00
ORF125	6.84	6.53	1.24	DOWN	2.10E-06	1.17E-02
<i>trhL</i>	7.48	6.81	1.58	DOWN	1.41E-06	7.85E-03
<i>trhE</i>	6.38	6.35	1.02	DOWN	3.52E-01	1.00E+00
<i>trhK</i>	6.82	6.56	1.20	DOWN	5.78E-05	3.22E-01
<i>trhB</i>	6.82	6.71	1.08	DOWN	1.58E-02	1.00E+00
<i>trhV</i>	6.46	6.37	1.06	DOWN	2.05E-02	1.00E+00
ORF131	6.87	6.87	1.00	UP	1.44E-01	1.00E+00
ORF132	9.77	9.39	1.30	DOWN	2.43E-05	1.35E-01
ORF133	7.58	7.43	1.11	DOWN	6.82E-03	1.00E+00
ORF134	7.62	7.66	1.03	UP	7.11E-01	1.00E+00
ORF135	8.14	7.91	1.18	DOWN	1.33E-03	1.00E+00
ORF136	7.56	7.23	1.26	DOWN	2.02E-05	1.13E-01
<i>trhA</i>	8.02	7.37	1.57	DOWN	3.56E-05	1.98E-01
<i>dsbC</i>	6.64	6.59	1.04	DOWN	7.45E-04	1.00E+00
<i>trhC</i>	7.99	7.81	1.14	DOWN	8.60E-03	1.00E+00
<i>trhF</i>	7.04	6.62	1.34	DOWN	1.88E-08	1.05E-04
<i>trhW</i>	6.52	6.39	1.10	DOWN	1.07E-04	5.96E-01

<i>trhU</i>	7.07	6.77	1.22	DOWN	1.19E-04	6.64E-01
ORF143	6.48	6.41	1.05	DOWN	8.16E-02	1.00E+00
ORF144	6.76	6.71	1.04	DOWN	1.55E-02	1.00E+00
ORF145	6.86	6.97	1.08	UP	9.25E-01	1.00E+00
ORF146	7.08	7.16	1.06	UP	6.09E-01	1.00E+00
<i>traF</i>	6.72	6.58	1.10	DOWN	5.50E-04	1.00E+00
<i>trhH</i>	6.78	6.56	1.17	DOWN	9.23E-06	5.14E-02
<i>trhG</i>	7.98	7.98	1.00	DOWN	2.46E-02	1.00E+00
ORF150	8.25	7.69	1.48	DOWN	1.09E-07	6.06E-04
ORF151	6.32	6.18	1.10	DOWN	1.55E-03	1.00E+00
ORF152	6.35	6.29	1.04	DOWN	5.16E-03	1.00E+00
ORF153	6.83	6.73	1.07	DOWN	1.51E-02	1.00E+00
ORF154	6.70	6.63	1.05	DOWN	2.00E-03	1.00E+00
ORF155	6.92	6.77	1.11	DOWN	1.07E-03	1.00E+00
ORF156	6.84	6.74	1.07	DOWN	6.91E-03	1.00E+00
ORF157	6.12	6.12	1.00	DOWN	6.93E-01	1.00E+00
ORF158	6.56	6.53	1.02	DOWN	3.22E-02	1.00E+00
ORF159	7.03	7.50	1.38	UP	1.25E-06	6.95E-03
ORF160	7.48	7.39	1.07	DOWN	1.04E-02	1.00E+00
ORF161	9.45	9.58	1.09	UP	6.88E-02	1.00E+00
ORF162	8.06	8.30	1.18	UP	5.02E-02	1.00E+00
ORF163	8.03	8.30	1.21	UP	4.78E-02	1.00E+00
ORF164	6.81	7.09	1.22	UP	8.56E-01	1.00E+00
ORF165	6.96	7.59	1.54	UP	8.74E-06	4.86E-02
ORF166	9.63	9.49	1.11	DOWN	2.47E-01	1.00E+00
ORF167	7.42	8.04	1.54	UP	4.88E-07	2.72E-03
<i>tnpAb</i>	8.52	7.96	1.47	DOWN	2.22E-07	1.23E-03
<i>tnpRb</i>	8.01	7.96	1.03	DOWN	2.03E-01	1.00E+00
ORF170	7.56	8.15	1.50	UP	1.93E-05	1.07E-01
ORF171	6.97	6.87	1.07	DOWN	1.65E-02	1.00E+00
ORF172	8.66	8.55	1.08	DOWN	1.19E-01	1.00E+00
ORF173	7.32	7.23	1.07	DOWN	2.35E-04	1.00E+00
ORF174	7.03	7.05	1.01	UP	2.08E-01	1.00E+00
ORF175	7.18	7.27	1.06	UP	1.37E-01	1.00E+00
<i>tnpAc</i>	7.22	7.24	1.01	UP	2.90E-01	1.00E+00
<i>tnpC</i>	7.64	7.39	1.19	DOWN	1.51E-03	1.00E+00
ORF178	7.13	6.89	1.18	DOWN	7.90E-03	1.00E+00
ORF179	8.52	7.71	1.75	DOWN	3.43E-05	1.91E-01
ORF180	8.53	8.57	1.03	UP	8.57E-01	1.00E+00
ORF180a	8.23	7.97	1.20	DOWN	6.93E-03	1.00E+00
ORF181	7.61	7.57	1.03	DOWN	9.92E-03	1.00E+00
ORF182	6.81	7.13	1.25	UP	1.55E-03	1.00E+00
ORF183	6.76	7.72	1.94	UP	1.99E-14	1.11E-10
ORF184	9.24	9.54	1.23	UP	3.55E-04	1.00E+00
ORF185	7.72	7.39	1.25	DOWN	1.26E-08	6.98E-05
ORF186	8.45	7.92	1.44	DOWN	1.04E-05	5.76E-02
ORF187	7.15	6.94	1.16	DOWN	3.19E-06	1.77E-02

付録 3 KT2440(pCAR1)株とKT2440(pCARDpmr)株における pCAR1 上の遺伝子の発現変動

遺伝子	KT2440 (pCAR1)	KT2440 (pCAR1Δpmr)	変化倍率	pmr破壊に よる変化	p 値	Bonferroni 補正後の p 値
ORF188	6.46	6.47	1.01	UP	3.27E-02	1.00E+00
ORF31	6.77	7.04	1.21	UP	3.33E-03	1.00E+00
ORF30	6.47	6.49	1.02	UP	8.89E-01	1.00E+00
<i>tnpA3</i>	8.42	7.19	2.35	DOWN	1.87E-10	1.04E-06
<i>antC</i>	6.13	6.21	1.06	UP	6.85E-02	1.00E+00
<i>antB</i>	6.97	7.23	1.20	UP	7.18E-03	1.00E+00
<i>antA</i>	6.48	6.43	1.03	DOWN	3.96E-02	1.00E+00
<i>tnpA2</i>	7.99	8.49	1.41	UP	3.06E-02	1.00E+00
ORF24	6.19	6.27	1.05	UP	3.93E-01	1.00E+00
<i>antR</i>	6.11	6.14	1.02	UP	9.91E-01	1.00E+00
ORF22	6.71	6.87	1.12	UP	4.73E-01	1.00E+00
ORF21	6.41	6.54	1.09	UP	7.93E-04	1.00E+00
ORF20	6.29	6.64	1.27	UP	5.55E-07	3.09E-03
ORF19	6.20	6.39	1.14	UP	5.30E-02	1.00E+00
ORF18	6.11	6.15	1.03	UP	8.00E-02	1.00E+00
ORF17	6.45	6.57	1.09	UP	5.93E-03	1.00E+00
ORF16	5.81	5.76	1.04	DOWN	5.60E-01	1.00E+00
ORF15	6.56	6.51	1.03	DOWN	2.02E-02	1.00E+00
ORF14	6.24	6.33	1.07	UP	2.61E-01	1.00E+00
ORF13	6.26	6.20	1.04	DOWN	9.47E-01	1.00E+00
ORF12	5.91	5.91	1.00	UP	9.29E-01	1.00E+00
ORF11	5.59	5.54	1.04	DOWN	3.13E-01	1.00E+00
<i>tnpA1</i>	7.91	8.61	1.63	UP	1.18E-01	1.00E+00
ORF9	6.12	5.99	1.10	DOWN	3.51E-01	1.00E+00
<i>carAa</i>	7.62	6.99	1.55	DOWN	3.53E-07	1.97E-03
<i>carAa</i>	7.71	7.10	1.53	DOWN	8.10E-04	1.00E+00
<i>carBa</i>	6.64	6.13	1.42	DOWN	2.58E-04	1.00E+00
<i>carBb</i>	7.23	6.72	1.42	DOWN	5.57E-05	3.10E-01
<i>carC</i>	7.04	6.42	1.54	DOWN	1.92E-03	1.00E+00
<i>carAc</i>	7.36	6.45	1.88	DOWN	2.22E-16	1.23E-12
ORF7	7.34	6.74	1.52	DOWN	1.52E-03	1.00E+00
<i>carAd</i>	6.54	5.81	1.66	DOWN	7.80E-08	4.34E-04
<i>carD</i>	6.38	5.84	1.46	DOWN	2.04E-06	1.14E-02
ORF33	6.50	6.25	1.19	DOWN	1.01E-01	1.00E+00
ORF34	6.68	5.56	2.16	DOWN	7.49E-13	4.17E-09
<i>carF</i>	6.65	6.22	1.35	DOWN	2.04E-01	1.00E+00
<i>carE</i>	6.18	5.89	1.22	DOWN	4.20E-02	1.00E+00
ORF37	6.47	5.88	1.50	DOWN	2.56E-03	1.00E+00
<i>tnpA4</i>	8.19	8.32	1.10	UP	4.28E-01	1.00E+00
ORF40	5.66	5.49	1.13	DOWN	2.11E-05	1.17E-01
ORF40	8.35	7.37	1.97	DOWN	4.20E-06	2.34E-02
ORF41	6.91	6.91	1.00	UP	7.84E-01	1.00E+00
ORF42	7.66	7.45	1.15	DOWN	5.88E-01	1.00E+00
<i>tnpRa</i>	6.69	6.61	1.06	DOWN	9.43E-03	1.00E+00
<i>tnpAa</i>	6.26	6.29	1.02	UP	3.46E-01	1.00E+00
ORF45	6.73	7.09	1.28	UP	1.40E-06	7.81E-03

ORF46	6.54	6.59	1.04	UP	1.12E-01	1.00E+00
ORF47	6.58	6.22	1.29	DOWN	2.71E-05	1.51E-01
ORF48	7.49	7.20	1.22	DOWN	2.67E-01	1.00E+00
<i>tnpS</i>	7.06	7.13	1.05	UP	3.76E-02	1.00E+00
<i>tnpT</i>	6.45	6.33	1.08	DOWN	1.25E-04	6.96E-01
ORF51	7.07	7.15	1.05	UP	9.52E-01	1.00E+00
ORF52	6.55	6.48	1.05	DOWN	4.26E-01	1.00E+00
ORF53	6.81	6.62	1.14	DOWN	1.40E-01	1.00E+00
ORF54	7.00	6.89	1.08	DOWN	9.97E-01	1.00E+00
ORF55	6.11	6.06	1.03	DOWN	8.58E-01	1.00E+00
<i>klaA</i>	6.32	6.14	1.13	DOWN	1.13E-02	1.00E+00
<i>klaB</i>	6.34	6.29	1.03	DOWN	1.60E-04	8.92E-01
<i>klaC</i>	6.22	6.21	1.01	DOWN	3.72E-01	1.00E+00
ORF59	6.72	6.66	1.04	DOWN	2.18E-01	1.00E+00
ORF60	6.12	6.32	1.15	UP	7.11E-02	1.00E+00
ORF61	6.49	6.79	1.23	UP	6.81E-03	1.00E+00
<i>repA</i>	6.10	6.25	1.11	UP	6.30E-02	1.00E+00
<i>parW</i>	6.33	6.19	1.10	DOWN	6.52E-01	1.00E+00
<i>parA</i>	10.23	7.12	8.68	DOWN	0.00E+00	0.00E+00
<i>parB</i>	10.30	7.54	6.78	DOWN	1.11E-16	6.18E-13
<i>parC</i>	9.83	9.78	1.03	DOWN	7.96E-01	1.00E+00
ORF67	8.50	8.06	1.35	DOWN	5.27E-01	1.00E+00
ORF68	6.32	6.20	1.09	DOWN	6.42E-02	1.00E+00
ORF69	6.38	6.29	1.06	DOWN	1.42E-01	1.00E+00
<i>pmr</i>	9.54	6.90	6.24	DOWN	8.22E-15	4.57E-11
ORF71	7.64	7.02	1.54	DOWN	3.50E-04	1.00E+00
ORF72	7.71	7.92	1.16	UP	3.27E-01	1.00E+00
ORF73	6.32	6.21	1.08	DOWN	3.53E-02	1.00E+00
ORF74	6.47	6.38	1.06	DOWN	4.33E-01	1.00E+00
ORF75	5.63	5.42	1.16	DOWN	5.94E-02	1.00E+00
ORF76	6.04	5.80	1.18	DOWN	1.85E-01	1.00E+00
ORF77	7.00	6.60	1.32	DOWN	1.65E-05	9.16E-02
ORF78	6.05	5.93	1.08	DOWN	8.04E-01	1.00E+00
ORF79	6.81	6.76	1.03	DOWN	1.16E-02	1.00E+00
ORF80	6.22	5.97	1.19	DOWN	4.04E-03	1.00E+00
ORF81	7.42	7.44	1.01	UP	7.65E-02	1.00E+00
ORF82	6.36	6.46	1.07	UP	2.21E-02	1.00E+00
ORF83	6.28	6.23	1.04	DOWN	7.13E-01	1.00E+00
ORF84	6.51	6.44	1.05	DOWN	3.15E-01	1.00E+00
ORF85	6.36	6.43	1.05	UP	8.76E-01	1.00E+00
ORF86	6.39	6.19	1.15	DOWN	8.07E-01	1.00E+00
ORF87	6.92	6.84	1.06	DOWN	4.90E-01	1.00E+00
ORF88	6.82	7.19	1.30	UP	2.95E-02	1.00E+00
ORF89	7.56	7.73	1.13	UP	7.84E-01	1.00E+00
ORF90	5.97	6.11	1.10	UP	1.32E-01	1.00E+00
ORF91	6.31	6.42	1.08	UP	8.80E-01	1.00E+00
ORF92	6.66	6.47	1.14	DOWN	1.30E-02	1.00E+00
ORF93	6.87	6.77	1.07	DOWN	5.54E-02	1.00E+00
ORF94	6.15	6.14	1.01	DOWN	1.13E-01	1.00E+00

ORF95	6.22	6.10	1.09	DOWN	3.42E-01	1.00E+00
ORF95a	9.51	9.28	1.18	DOWN	3.56E-03	1.00E+00
ORF96	5.62	5.50	1.09	DOWN	3.88E-01	1.00E+00
ORF97	5.55	5.62	1.05	UP	6.71E-01	1.00E+00
ORF98	5.91	6.03	1.09	UP	1.92E-01	1.00E+00
ORF99	6.31	6.27	1.03	DOWN	1.45E-01	1.00E+00
ORF100	12.04	10.62	2.69	DOWN	0.00E+00	0.00E+00
ORF101	11.16	9.57	3.00	DOWN	0.00E+00	0.00E+00
ORF102	10.92	9.66	2.39	DOWN	1.40E-12	7.76E-09
ORF103	11.33	10.47	1.82	DOWN	1.06E-11	5.92E-08
ORF104	12.00	10.62	2.61	DOWN	0.00E+00	0.00E+00
ORF105	8.52	7.47	2.06	DOWN	1.37E-07	7.62E-04
ORF106	10.41	8.63	3.44	DOWN	4.44E-16	2.47E-12
ORF107	8.04	6.81	2.35	DOWN	2.08E-12	1.16E-08
ORF108	10.72	8.91	3.51	DOWN	2.22E-12	1.23E-08
ORF109	7.63	6.98	1.57	DOWN	2.10E-05	1.17E-01
<i>trhN</i>	6.21	6.08	1.09	DOWN	8.48E-01	1.00E+00
ORF111	6.99	7.12	1.10	UP	1.91E-04	1.00E+00
ORF112	6.51	6.41	1.07	DOWN	5.38E-01	1.00E+00
ORF113	6.06	6.07	1.01	UP	5.26E-01	1.00E+00
ORF114	6.14	6.27	1.09	UP	5.06E-01	1.00E+00
ORF115	6.29	6.18	1.08	DOWN	9.92E-02	1.00E+00
<i>recT</i>	5.93	5.91	1.01	DOWN	3.30E-01	1.00E+00
ORF117	7.99	8.02	1.02	UP	1.32E-02	1.00E+00
ORF118	7.05	7.30	1.20	UP	3.66E-03	1.00E+00
ORF119	5.94	5.95	1.01	UP	4.64E-01	1.00E+00
ORF120	6.02	5.88	1.10	DOWN	3.55E-01	1.00E+00
<i>tral</i>	5.96	6.14	1.13	UP	2.05E-01	1.00E+00
<i>traG</i>	5.75	5.67	1.05	DOWN	2.37E-01	1.00E+00
ORF123	6.10	6.31	1.15	UP	4.46E-01	1.00E+00
ORF124	6.17	5.88	1.22	DOWN	5.52E-01	1.00E+00
ORF125	6.27	6.03	1.18	DOWN	8.25E-03	1.00E+00
<i>trhL</i>	6.28	6.27	1.01	DOWN	6.07E-01	1.00E+00
<i>trhE</i>	5.95	5.76	1.14	DOWN	1.38E-03	1.00E+00
<i>trhK</i>	5.82	5.75	1.05	DOWN	6.97E-01	1.00E+00
<i>trhB</i>	5.91	5.93	1.01	UP	4.79E-01	1.00E+00
<i>trhV</i>	5.76	5.73	1.03	DOWN	5.12E-01	1.00E+00
ORF131	6.41	6.52	1.07	UP	9.10E-01	1.00E+00
ORF132	6.95	6.80	1.11	DOWN	2.04E-02	1.00E+00
ORF133	6.41	6.35	1.04	DOWN	8.05E-01	1.00E+00
ORF134	6.55	6.36	1.15	DOWN	2.12E-01	1.00E+00
ORF135	6.74	6.73	1.01	DOWN	1.16E-01	1.00E+00
ORF136	6.39	6.24	1.11	DOWN	3.82E-02	1.00E+00
<i>trhA</i>	6.86	6.52	1.26	DOWN	1.83E-03	1.00E+00
<i>dsbC</i>	5.94	5.71	1.17	DOWN	7.04E-03	1.00E+00
<i>trhC</i>	6.70	6.53	1.13	DOWN	4.46E-01	1.00E+00
<i>trhF</i>	5.98	6.04	1.04	UP	5.54E-01	1.00E+00
<i>trhW</i>	5.54	5.52	1.01	DOWN	8.89E-01	1.00E+00
<i>trhU</i>	6.19	5.95	1.19	DOWN	1.18E-02	1.00E+00

ORF143	6.07	5.85	1.17	DOWN	6.02E-03	1.00E+00
ORF144	6.70	6.02	1.60	DOWN	6.56E-05	3.65E-01
ORF145	11.88	9.84	4.12	DOWN	0.00E+00	0.00E+00
ORF146	10.35	8.51	3.56	DOWN	2.36E-12	1.31E-08
<i>traF</i>	5.96	5.92	1.03	DOWN	1.52E-02	1.00E+00
<i>trhH</i>	5.93	5.87	1.04	DOWN	2.75E-03	1.00E+00
<i>trhG</i>	6.31	6.28	1.02	DOWN	9.14E-02	1.00E+00
ORF150	7.10	6.94	1.12	DOWN	5.38E-01	1.00E+00
ORF151	5.69	5.55	1.10	DOWN	3.24E-02	1.00E+00
ORF152	5.69	5.63	1.04	DOWN	3.94E-01	1.00E+00
ORF153	6.25	5.97	1.21	DOWN	1.05E-02	1.00E+00
ORF154	5.96	5.95	1.01	DOWN	7.26E-01	1.00E+00
ORF155	6.10	6.08	1.01	DOWN	9.84E-01	1.00E+00
ORF156	5.91	5.69	1.16	DOWN	3.36E-02	1.00E+00
ORF157	5.80	5.60	1.15	DOWN	5.76E-01	1.00E+00
ORF158	6.06	5.95	1.08	DOWN	9.97E-02	1.00E+00
ORF159	6.92	6.56	1.28	DOWN	3.53E-05	1.96E-01
ORF160	6.62	6.38	1.18	DOWN	2.53E-02	1.00E+00
ORF161	8.21	7.55	1.58	DOWN	1.53E-02	1.00E+00
ORF162	7.49	6.97	1.43	DOWN	5.77E-06	3.21E-02
ORF163	7.92	7.50	1.33	DOWN	4.30E-03	1.00E+00
ORF164	6.76	6.30	1.37	DOWN	8.27E-03	1.00E+00
ORF165	6.97	6.28	1.61	DOWN	2.70E-02	1.00E+00
ORF166	7.36	7.32	1.03	DOWN	1.59E-01	1.00E+00
ORF167	7.29	6.76	1.45	DOWN	1.88E-04	1.00E+00
<i>tnpAb</i>	6.61	6.79	1.13	UP	1.55E-02	1.00E+00
<i>tnpRb</i>	6.93	6.74	1.14	DOWN	3.66E-01	1.00E+00
ORF170	7.42	6.82	1.51	DOWN	1.56E-05	8.67E-02
ORF171	6.42	6.21	1.16	DOWN	7.78E-01	1.00E+00
ORF172	7.53	7.38	1.11	DOWN	5.77E-01	1.00E+00
ORF173	6.54	6.38	1.11	DOWN	2.28E-01	1.00E+00
ORF174	6.39	6.19	1.15	DOWN	2.63E-01	1.00E+00
ORF175	6.10	6.15	1.04	UP	4.26E-02	1.00E+00
<i>tnpAc</i>	6.42	6.24	1.14	DOWN	2.18E-01	1.00E+00
<i>tnpC</i>	5.99	6.02	1.02	UP	1.07E-02	1.00E+00
ORF178	5.74	5.68	1.04	DOWN	2.30E-02	1.00E+00
ORF179	6.55	6.52	1.02	DOWN	4.60E-03	1.00E+00
ORF180	7.14	6.65	1.41	DOWN	3.82E-01	1.00E+00
ORF180a	6.89	7.03	1.10	UP	4.86E-02	1.00E+00
ORF181	7.02	7.04	1.01	UP	5.39E-02	1.00E+00
ORF182	7.28	6.95	1.26	DOWN	6.42E-02	1.00E+00
ORF183	8.12	7.99	1.10	DOWN	2.28E-02	1.00E+00
ORF184	8.63	8.46	1.13	DOWN	8.23E-01	1.00E+00
ORF185	6.29	6.33	1.02	UP	4.02E-01	1.00E+00
ORF186	6.55	6.77	1.17	UP	6.27E-01	1.00E+00
ORF187	6.20	6.30	1.07	UP	4.99E-03	1.00E+00

謝辞

本博士論文研究を行うにあたり、素晴らしい研究環境とテーマを与えて下さるとともに、常に親身なご指導と、暖かい励ましを頂き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部門教授 山根久和先生に深く感謝申し上げます。また卒業研究から現在までにわたり、研究の醍醐味を教えて頂くと共に、鋭いご指摘によってその厳しさを教えて頂きました、同センター旧生物制御工学部門教授、現芝浦工業大学大学院応用化学科教授 大森俊雄先生に深く感謝申し上げます。さらに本研究の細部にわたり、直接ご指導を賜り、また公私にわたり貴重なご教示とご助言を頂きました、同センター助教授 野尻秀昭先生に深く感謝申し上げます。また、本研究テーマの発端となる卒業研究において直接ご指導頂き、現在まで暖かいご配慮を頂きました、同センター助手 羽部浩先生に深く感謝申し上げます。また、貴重なご助言を頂きました、同センター助手 岡田憲典先生に深く感謝申し上げます。

プラスミド研究の基礎からトランスポゾンの転移まで貴重なご教示とご助言を頂きました、東北大学大学院生命科学研究科 津田雅孝先生に深く感謝申し上げます。また同研究科 矢野大和氏に感謝申し上げます。

また、本研究を行う上で貴重なご助言を頂き、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 中条哲也博士に深く感謝します。また卒業研究時より同期として常に励まして下さいました芦川雄二氏に深く感謝申し上げます。また同研究室 内田英二氏、井上謙吾氏、宇佐美裕亮氏、岡田敦氏、宮腰昌利氏、高妻篤史氏、寺林継乃氏に深く感謝申し上げます。

環境保全工学研究室の皆様には、折に触れ貴重なご助言、ご協力、励ましのお言葉を頂き、さらに公私にわたり様々なご配慮を頂きました。この場をお借りして厚く御礼申し上げます。

最後に、本研究をまとめるにあたり、常に暖かく見守って下さいました家族と妻 英子に深く感謝するとともに、本論文を捧げます。

2006 年 1 月

新谷 政己