

性決定因子 R100 の接合伝達遺伝子 *traM* 及び  
接合伝達開始点 *oriT* の周辺領域に関する分子遺伝学的解析

Molecular studies on the *traM* gene and the *oriT* region of  
sex factor R100

阿 保 達 彦

①

博士論文

性決定因子R100の接合伝達遺伝子*traM*及び  
接合伝達開始点*oriT*の周辺領域に関する分子遺伝学的解析

Molecular studies on the *traM* gene and the *oriT* region of  
sex factor R100

阿保達彦

東京大学大学院農学系研究科農芸化学専攻  
平成3年度博士課程進学

指導教官 大坪栄一

## 論文の内容の要旨

農芸化学専攻

平成3年度博士課程進学

氏名 阿保達彦

指導教官名 大坪栄一

論文題目 性決定因子R100の接合伝達遺伝子*traM*及び  
接合伝達開始点*oriT*の周辺領域に関する分子遺伝学的解析  
(Molecular studies on the *traM* gene and the *oriT* region of sex factor R100)

### 序

細菌における有性生殖に相当する接合伝達は、供与菌細胞から受容菌細胞へとDNAが一方方向に伝達される現象である。その際、ある頻度で染色体DNAが伝達され、受容菌内で遺伝子の組換えが起こることにより組換え体が生じる。この接合伝達による組換えは、1946年にLederbergとTatumによって初めて大腸菌において報告されて以来細菌の遺伝学的解析に用いられ、そこからオペロン説、レプリコンモデルなどが生まれるなど、今日の分子遺伝学の発展のきっかけを作った。

接合伝達においてDNAの供与菌となるのは性決定因子と呼ばれる伝達性プラスミドを持つ菌であり、性決定因子上には接合伝達に必要な遺伝子(*tra*遺伝子)が存在する。いわゆるF型プラスミドと呼ばれる一連の性決定因子の一つであるR100は、F(F因子)とともにその*tra*遺伝子の解析が最も進んでいる伝達性プラスミドである。R100上には20以上の*tra*遺伝子が約34キロ塩基対に及ぶ領域に遺伝子群をなして存在する。*tra*遺伝子はその機能によって、性繊毛の形成、接合対の安定化、表面排斥、*tra*遺

伝子の発現制御、DNAの移動、の5つに分類することができる。このうちDNAの移動に関わるものとしては*traM*、*traY*、*traD*、*traI*があり、また、シスエレメントとしてDNA伝達開始点(*oriT*)及びその周辺領域(*oriT*領域)がDNAの移動に必須である。*TraY*、*TraI*両タンパク質は協同して*oriT*にニックを入れる反応に関与していることが明らかとなっており、この反応には宿主タンパク質IHFも関与している。*TraD*タンパク質は接合伝達でDNAが通り抜ける伝達口を形成するものと考えられている。一方、*traM*遺伝子はDNA伝達に必須であることはわかっていたが、その具体的な機能はこれまで明らかにされていなかった。本研究は、*traM*が接合伝達において果たす機能を、*TraM*タンパク質の精製及びその性質の解析、*traM*の発現調節機構の解析、*TraM*の作用部位である*oriT*領域の構造の解析を通して明らかにし、接合によるDNA伝達の開始及び制御機構を解明することを目的として行なったものである。

## 結果と考察

### 1. *TraM*タンパク質の精製と、その性質の解析

*TraM*タンパク質を*TraM*-コラーゲン-LacZ融合タンパク質の形で大腸菌中で過剰生産し、LacZ( $\beta$ -ガラクトシダーゼ)の基質アフィニティを利用して精製した。コラーゲナーゼでコラーゲンリンカーを切断することにより、この融合タンパク質中の*TraM*部分とLacZ部分とを分離することができた。精製した*TraM*はR100の*oriT*領域に特異的なDNA結合活性を示した。その結合部位は*oriT*領域中の、プラスミドに特異性がある領域、つまり他のF型プラスミドとの相同性が比較的低い領域内の4カ所に存在し、それらを上流側から*sbmA*、B、C、Dと命名した。*sbmA*とB、及び*sbmC*とDはそれぞれ隣接するが、*sbmB*と*sbmC*との間には宿主タンパク質IHFの結合部位*ihfB*が存在した(図1)。本研究の結果とこれまでに得られている知見から、*oriT*領域には接合伝達に関わるタンパク質の結合もしくは認識部位が整然と並んで存在することが明らかとなった。最近R100と類縁の性決定因子であるFやR1においてもR100と極めて類似した*oriT*領域の構造が見られることが報告され、R100で明らかにしたこの構造がDNA伝達に重要な役割を持つことが支持されている。

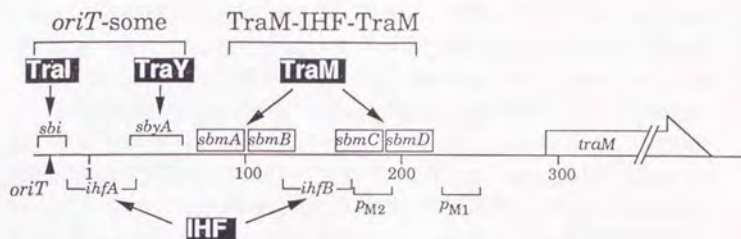


図1 *oriT*領域に存在する各タンパク質の結合、認識部位及び*traM*のプロモーターの位置。

*TraM*が膜に高い親和性を示すことは既に報告されており、それに加えて*oriT*領域中約150 bpにも及ぶ領域に結合することから、*TraM*は*oriT*領域を膜近傍、おそらくは*TraD*によって形成されるDNAの伝達口の近傍に保持することで一本鎖DNAの受容菌への移動を可能にする機能を果たしているとの仮説をたて、これを、*TraM*のanchoring機能と名付けた。

## 2. *traM*遺伝子の発現制御

*traM*のプロモーターの探索を行なうために*traM*の開始コドンと*lacZ*遺伝子との融合遺伝子 (*traM<sub>ATG</sub>-lacZ*融合遺伝子) を持つプラスミドを作成し、それを保持する菌体の*LacZ*活性を指標に*traM*の発現を調べた。その結果、*traM*の上流には二つのプロモーターが存在することが明らかとなり、*traM*構造遺伝子に近い下流側のプロモーターを*p<sub>M1</sub>*、上流側のプロモーターを*p<sub>M2</sub>*と命名した。*p<sub>M1</sub>*からの発現は*p<sub>M2</sub>*からの発現に比べて約20%と弱いものであった。菌体からRNAを調製し、プライマー伸長法により*p<sub>M1</sub>*、*p<sub>M2</sub>*両プロモーターの正確な位置を決定したところ、*p<sub>M1</sub>*は*sbm*部位と*traM*構造遺伝子の間に、また、*p<sub>M2</sub>*は*sbm*部位のうちの*sbmC*、*sbmD*と重なるように位置していた(図1)。*p<sub>M2</sub>*からの*traM*の発現は*TraM*を供給することによってほぼ完全に抑制され、*traM*の発現に自己抑制が働くことが示された。*p<sub>M2</sub>*に重なって存在する*sbmC*、*sbmD*が存在しさえすれば抑制が起こることから、これらの領域への*TraM*の結合がRNAポリメラーゼの*p<sub>M2</sub>*へ

の結合を物理的に妨げるものと考えられる。実際にプライマー伸長法によって調べると、*in vivo*での $p_{\Delta M}$ からの転写産物の量はTraM存在下で大きく減少しており、自己抑制が転写レベルで行なわれることが示された。一方、TraMが存在しない条件では、 $p_{\Delta M}$ のすぐ上流に存在する*ihfB*が欠くか、または宿主菌がIHFが欠くかすると $p_{\Delta M}$ からの発現が増し、IHFがTraMの発現を部分的に抑制することが示された。IHFもTraM同様RNAポリメラーゼの $p_{\Delta M}$ への結合を物理的に妨げるものと考えられる。 $p_{\Delta M}$ がTraMやIHFによって抑制を受けるのに対して、 $p_{\Delta M}$ はそれらによる抑制を受けなかった。

IHFに関しては、TraMの発現の抑制がその本来の機能であるとは考えにくい。むしろDNAに結合して湾曲させるというIHFの性質を考えると、*ihfB*に結合したIHFはDNAを湾曲させることによりその両側に存在する*sbmA*、*B*と*sbmC*、*D*との間の立体配置的な距離を近づけ、その結果この領域におけるTraM-IHF-TraM複合体の形成を可能にするものと考えられる。この複合体形成がTraMのanchoring機能の発揮にとって重要なのであろう。

### 3. *oriT*領域の構造

*oriT*領域にはTraI、IHF、TraYタンパク質の結合、または認識部位*sbi*、*ihfA*、*sbyA*が存在し、これらのタンパク質がここに*oriT*-someと呼ばれる複合体を形成することが、*oriT*に効率よくニックを入れるのに必要であると考えられている。一方、同様に*oriT*領域に存在する*sbmA*、*B*、*ihfB*、*sbmC*、*D*からなるTraM-IHF-TraM領域については、それが実際にDNA伝達に必須であるか否かといった情報はこれまで得られていない。そこで、これらの部位が実際にDNA伝達に必要とされることを*in vivo*において示すために、R100の*oriT*の周辺を含む様々な長さのDNA断片を保持するプラスミドを作成し、Traタンパク質をトランスの位置から供給することによってそれらが受容菌へと伝達されるかどうかを解析する系を構築した。その結果、先に挙げたタンパク質の結合及び認識部位を全て含む領域があれば伝達されること、また、TraM-IHF-TraM領域を完全に欠失させると伝達されないことが明らかとなった。さらにTraM-IHF-TraM領域内の各結合部位に塩基置換変異を導入したところ、どの結合部位の変異も伝達効率を低下させたが、*sbmA*、*ihfB*に変異を導入したときに特に伝達効率が

大きく低下した。*ihfB*の変異による伝達効率の低下は、この領域でTraM-IHF-TraM複合体が形成され、それが高効率の伝達に必要とされるとの仮説を支持する。また、*sbyA*と*sbmA*との間に5、あるいは10 bpの塩基配列を挿入したところphasing効果が見られ、*oriT*-someとTraM-IHF-TraM複合体との間にはタンパク質間の相互作用が存在することが示唆された。*sbmA*に変異を導入したときの伝達効率の低下が大きいことから、TraM-IHF-TraM複合体中の*sbmA*に結合したTraMがその相互作用に特に重要であろうと考えられた。

## 結び

本研究により、接合伝達の開始機構には*oriT*-someとTraM-IHF-TraM複合体とが共に関与していることが示された。一本鎖DNAの生成とその細菌細胞間の移動というダイナミックな現象はこれら二つのタンパク質-DNA複合体の高次の構造体が関わり、連関することで開始され、制御されていると考えられる。本研究の結果などから予想される接合伝達開始時における*oriT*領域の模式図を図2に示す。

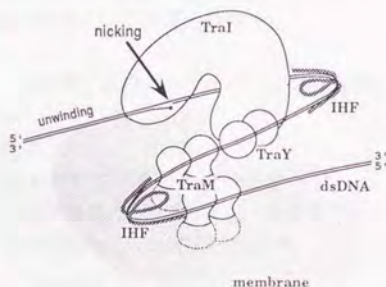


図2 接合伝達開始時の*oriT*領域周辺の模式図

ニックを入れる*oriT*-someと、この領域を保持するTraM-IHF-TraM複合体とが形成される。ここには示さないが、TraDがこの近傍にDNA伝達口を形成すると考えられる。

目次	
第一章 序論	1
1. 接合伝達と性決定因子	2
2. プラスミドR100とF型プラスミド	4
3. F型プラスミドの $oriT$ 領域とDNA伝達に関与する遺伝子	10
第二章 TraMタンパク質の精製とその性質の解析	16
1. 序	17
2. 結果	17
(1) TraM*タンパク質の精製	17
(2) TraM*の $oriT$ 領域に対する結合	22
(3) TraM'の $oriT$ 領域に対する特異的結合	26
(4) $oriT$ 領域におけるTraMタンパク質の結合部位	29
3. 考察	33
(1) TraMタンパク質の精製	33
(2) TraMタンパク質のDNA結合性	34
(3) $oriT$ 領域におけるTraMタンパク質の結合部位	35
(4) TraMタンパク質の構造	36
(5) TraMタンパク質の機能	36
第三章 $traM$ 遺伝子のプロモーター領域の解析	40
1. 序	41
2. 結果	41
(1) $traM$ のプロモーターの探索	41
(2) IHFは $p_{ME}$ からの発現を一部抑制する	43
(3) TraMの $p_{ME}$ における自己抑制	45
(4) $p_{MI}$ 、 $p_{ME}$ の位置の決定	46
(5) TraMタンパク質はシスの位置にある自身のプロモーター $p_{ME}$ からの発現を抑制する	47
(6) TraJは $traM$ の発現に影響を与えない	50
3. 考察	53
(1) $traM$ の二つのプロモーターの位置の決定	53
(2) $traM$ の発現の抑制機構とその意味	53
第四章 $oriT$ 領域の構造と機能	56
1. 序	57
2. 結果	60
(1) $oriT$ プラスミド伝達系の構築	60
(2) TraM-IHF-TraM領域はDNA伝達に必要とされる	63

(3) <i>oriT</i> -some と TraM-IHF-TraM 複合体との関係	65
3. 考察	70
(1) <i>oriT</i> プラスミド伝達系	70
(2) TraM-IHF-TraM 領域の機能	71
(3) IHF の機能と <i>ihf</i> 部位の重要性	73
第五章 総括	76
第六章 材料と方法	82
1. 菌株とプラスミド	82
2. pABO プラスミドの構築	86
(1) TraM* の精製に用いた pABO プラスミド	86
(2) <i>traM</i> のプロモーターの解析に用いた pABO プラスミド	86
(3) TraM タンパク質を細胞内のトランスの位置から供給するプラスミド	87
(4) <i>oriT</i> 領域をもつ pABO プラスミド	87
3. プラスミド DNA への部位特異的塩基置換変異の導入	89
4. 合成オリゴヌクレオチド	91
5. 合成 DNA 断片の作成	93
6. 培地	93
7. 試薬、酵素、キット	94
8. プラスミド DNA の調製	95
9. 形質転換	95
10. DNA 塩基配列の決定	95
11. TraM* の精製	96
12. タンパク質の定量	96
13. タンパク質のゲル電気泳動	97
14. DNA のゲル電気泳動	97
15. $\beta$ -ガラクトシダーゼ活性の測定	97
16. ゲルシフト法	97
17. TraM* タンパク質のコラゲナーゼ処理	98
18. DNA 断片の $^{32}\text{P}$ による 5' 末端標識	99
19. DNase I フットプリンティング法	99
20. P1 トランスダクション	100
21. RNA の調製	100
22. プライマー伸長法による転写産物の 5' 末端の決定	101
23. 接合伝達	101
参考文献	103
謝辞	112

## 第一章 序論

## 1. 接合伝達と性決定因子

接合伝達は細菌細胞間の接合 (conjugation) により一つの細菌細胞から他の細菌細胞へとDNAが移動する現象である。接合伝達には細菌細胞内に存在する性決定因子もしくは「伝達性」プラスミドと呼ばれる大型のプラスミドが関与し、性決定因子を持つ菌が供与菌、持たない菌が受容菌となって、DNAの移動は常に供与菌から受容菌への一方方向に限られる。通常性決定因子は宿主菌染色体とは独立に存在し、接合によって自身のみが伝達される。しかし性決定因子はある頻度で宿主染色体に組み込まれる場合があり、そのような場合には宿主菌染色体DNAが接合によって伝達され、その結果受容菌内において遺伝子の組換えが起こる。接合伝達は1946年に Lederberg と Tatum (1946a, b) によって初めて報告されたが、それはこの接合伝達による遺伝子組換えを大腸菌K-12株において検出したものであった。通常は二分裂による無性生殖を行なう細菌の異なる菌株間で遺伝子の組換えを引き起こすことから、接合伝達はまた細菌の有性生殖とも呼ばれる。接合伝達においてどのような菌株に対しても供与菌となり得ない菌株は稔性 (fertility) を持たないという意味で  $F^-$ 、 $F^-$  株に対して供与菌となり得る菌株は  $F^+$  と呼ばれて区別され、接合による遺伝子の伝達が常に  $F^+$  株から  $F^-$  株への一方方向であることが示された (Lederberg et al., 1952; Hayes, 1953b)。  $F^+$  株、 $F^-$  株はそれぞれ雄株、雌株とも呼ばれた。また、 $F^+$  株よりもはるかに高効率で遺伝子組換えを起こす株が分離され、高頻度組換え (Hfr: High frequency of recombination) 株と呼ばれた (Cavalli-Sforza, 1950; Hayes, 1953a)。接合による遺伝子の伝達の一方方向性に加えて、 $F^+$  株がアクリジン色素処理等で  $F^-$  株に変わり得ること (Hirota, 1960) などから、 $F^+$ 、 $F^-$  の表現型の違いが性決定因子の有無によること、性決定因子がいわゆるエピソーム (episome; 染色体外遺伝因子) であることが示唆され、後に Marmur ら (1961) によって実際に性決定因子F (F因子) が染色体外DNA因子として同定された。これに先立ちHfr株が  $F^+$  株から生じることが示されており (Jacob and Wollman, 1961)、その生成機構としてはCampbell (1969) による  $\lambda$  ファージの染色体への組み込みモデル (episome integration model) になぞらえたF因子の染色体への組み込みモデルが提唱され、後に証明されている。このモデルによれば  $F^+$  株中にはある確率でF因

子が宿主染色体に組み込まれた株が生じ、その伝達の際に宿主染色体も同時に伝達することで遺伝子組換えが起こるが、それに対してHfr株ではF因子が既に宿主染色体に組み込まれている状態であるため高効率で遺伝子組換えが起こると説明できる。また、F因子が宿主染色体上の遺伝子の一部を持つF'因子の生成も、Hfr株の染色体からF因子が切り出される際に周囲の遺伝子を取り込んだものとして説明できる。以後、Hfr株の接合伝達を利用することにより遺伝子のマッピングをはじめとする解析が可能となり、それはバクテリオファージを用いる解析と共に、大腸菌の遺伝学を大きく進歩させ、そこから細菌の環状染色体の概念や、オペロン説、レプリコンモデルといった様々な重要な概念が提出され、現在の分子生物学の発展へとつながった。

性決定因子上には接合伝達に必要なとされる遺伝子のほとんど全てが存在する。接合伝達においてDNAは一本鎖の形で供与菌から受容菌へと移動し、それに伴い双方の細胞内でDNAの相補鎖が合成される。そのため、接合伝達後は供与菌、受容菌ともに性決定因子を持つことになり、その結果、DNAを受け取った受容菌は今度は供与菌としての機能を持つこととなる。DNAの移動は常に性決定因子上の決まった点、伝達開始点 (origin of transfer: *oriT*) から始まり、二本鎖DNAの特定の鎖が受容菌へと移動する。接合伝達に際しては細胞同士が直接に接触し、接合対を作ることが必要であるが、それは細胞質の融合を伴わず、例外的なものを除き供与菌、受容菌相互間のタンパク質の移動は無い。また、多くの場合接合伝達に先立って性繊毛と呼ばれる特殊な細胞外器官が形成されることが必要である (総説: Willets and Wilkins, 1984; Ippen-Ihler and Minkley, 1986; Willets and Skurray, 1987; Ippen-Ihler and Skurray, 1993)。

1946年にLederbergとTatumによって初めて発見された大腸菌の接合伝達における性決定因子はFまたはF因子 (fertility factor: 稔性因子) と呼ばれ、後にその本体がプラスミドであることが示された (Marmur et al., 1961)。その後腸内細菌の薬剤耐性が細菌間で伝搬されるという現象が見つかったのをきっかけにR100が (Nakaya et al., 1960)、次いでR1、R6といったR因子 (resistance factor: 薬剤耐性因子) が薬剤耐性を決定する因子として分離され (Meynell and Datta, 1966; Lebek, 1963)、それらのR因子に加えてColBなどのコリシンプラスミドも伝達性プラスミドであることが判明する (Ozeki and Howarth, 1961) など、現在までに数多くの性決定因子が発見されており

(Appendix B in Bukhari et al., 1977)、その宿主や受容菌となり得る菌の種類も多岐にわたることがわかっている。実際、自然界から分離されるプラスミドのうち全長が約50キロ塩基対(kb)以上の大型のものは、そのほとんどが伝達性である。しかし小型のプラスミドの中にもColE1プラスミドのように、自分自身では伝達能を持たないが、性決定因子Fの共存下で伝達されるようなものも多い。性決定因子の自律的な伝達をtransferと呼ぶのに対し、ColE1などの小型のプラスミドが性決定因子の存在下で伝達される現象はmobilizationと呼ばれる。これまでに分離された性決定因子はいくつかの不和合性グループ(incompatibility group: Inc)に分類され、それぞれのグループ内のもの同士は類似した接合伝達の機構を持つことが知られている(総説: Willetts and Skurray, 1980)。例えばFはIncFI、R100やR1、R6はIncFIIに属しており、これらはIncFと呼ばれるグループ内のサブグループである。その他にもIncI、IncN、IncPなどの様々な不和合性グループの存在がこれまでに示されている。これらはそれぞれ互いに異なる接合伝達機構を持ち、その中には、部位特異的な遺伝子組換えによって受容菌の特異性を変えるR64(Komano et al., 1987)、性繊毛を形成するかわりに性フェロモンによって誘導される接合凝集によって伝達を行なう*Enterococcus faecalis*のpAD1及びその類縁のプラスミド(Clewell, 1993)、さらには広範なグラム陽性菌の染色体中に見られ、接合伝達によって自身のみが伝達されることによって受容菌の染色体上に転移するTn916などに代表される接合伝達性トランスポゾン(conjugative transposon)(Clewell and Flannagan, 1993)など、様々な接合伝達様式が見られる。

## 2. プラスミドR100とF型プラスミド

R100は1960年に日本においてはじめて*Shigella flexneri*から性決定因子として分離された薬剤耐性を示すプラスミドであり、またNR1、R222等とも呼ばれる(Nakaya et al., 1960)。多剤耐性を示す*Shigella flexneri*の薬剤耐性がそのまま一揃い同時に他の細胞に移るという事実からこれらの薬剤耐性が一つの性決定因子に由来すると予測され(Mitsuhashi et al., 1960; Watanabe et al., 1960, 1961)、後に実際にプラスミドR100が同定された。図1-1に示すようにR100は水銀イオン、スルホンアミド、ストレプト

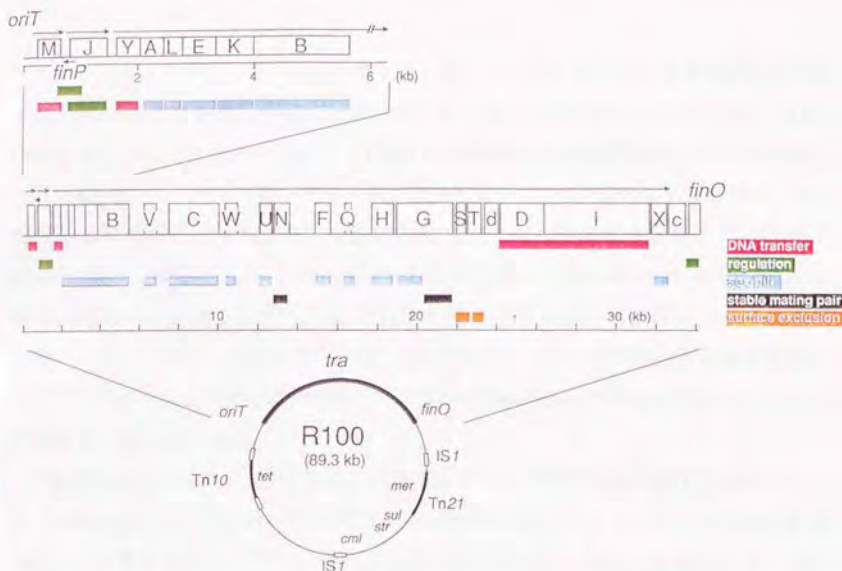


図1-1 R100及び*tra*遺伝子群の構造と遺伝子地図

図の下部にR100の構造が示してある (Taylor et al., 1977; Womble and Rownd, 1988)。白抜きのはしり角は挿入配列IS1及びIS10を表す。IS10は*tet*遺伝子をはさんで二つ存在し、Tn10を構成する。*oriV*、*oriT*はそれぞれ複製開始点及びDNA伝達開始点である。*finO*は接合伝達の抑制遺伝子である。*mer*、*sfr*、*str*、*cml*、*tet*とあるのはそれぞれ水銀イオン、スルホンアミド、ストレプトマイシン、クロラムフェニコール、テトラサイクリンに対する薬剤耐性遺伝子を示す。*mer*はTn21に、*tet*はTn10に運ばれる。

R100の外側に示した*tra*遺伝子領域 (*tra*) を図の上部に拡大して示し、そのうち*oriT*に近い領域についてはさらに拡大して最上部に示した。水平な矢印は転写単位を、数字はキロ塩基対 (kb) 単位の座標を表す。矢印の下に各*tra*遺伝子を示してある。*oriT*はDNAの伝達開始点、*finP*、*finO*はともに接合伝達の抑制遺伝子である。M、J、Y、A、L等の大文字のアルファベットはそれぞれ*traM*、*traJ*、*traY*、*traA*、*traL*等の*tra*遺伝子を表している。d、cはそれぞれ機能不明のオープンリーディングフレーム*orfD*、*orfC*を表す (Yoshioka et al., 1990)。*traV*、*traW*、*traU*、*traN*はR100では確認はされていないが、R100と相同性の高い*tra*遺伝子群を持つFに存在することからR100にも存在すると推定される (総説: Willetts and Wilkins, 1984)。各*tra*遺伝子の機能は色分けして示してある。青は性繊毛の形成、赤はDNAの伝達、緑は*tra*遺伝子の発現調節、橙は表面排斥、そして黒が接合対の安定化に関わる遺伝子である。*traG*遺伝子産物はN末端が性繊毛の形成に、C末端が接合対の安定化に働くとして示されている (総説: Willetts and Skurray, 1980; Ippen-Ihler and Skurray, 1993)。

マイシン、クロラムフェニコール、テトラサイクリンのそれぞれに対する耐性遺伝子と接合伝達に関する遺伝子群 (*tra*遺伝子群) を持つ性決定因子である (Sugino and Hirota, 1962; Womble et al., 1988)。R100はその接合伝達の機構がF因子とよく似た、いわゆるF型プラスミドと呼ばれる一連の性決定因子の一つである。F型プラスミドの特徴としては①互いに構造的にも機能的にもよく似た性繊毛を形成する (総説; Frost, 1993)、②互いに多くの *tra*遺伝子を相補し得る (Ohtsubo et al., 1970; Ohtsubo, 1970; Achtman et al., 1978) ③互いに高い相同性を示す *tra*遺伝子を持つ (Sharp et al., 1973)、などが挙げられる。また、多くのF型プラスミドによる接合伝達は好気条件下でのみ行なわれ、その至適温度は37℃である (Harada and Mitsuhashi, 1977) といった特徴も共通に見られる。

R100をはじめとするR因子の薬剤耐性遺伝子は、可動性の遺伝因子トランスポゾン (transposon) の一部として存在することが多い。R100のテトラサイクリン耐性遺伝子は分子遺伝学の分野で広く用いられるトランスポゾンTn10の内部に存在する。Tn10は可動性の遺伝因子である挿入配列 (insertion sequence) IS10がテトラサイクリン耐性遺伝子の両側に位置する複合トランスポゾンと呼ばれるトランスポゾンである (Kleckner et al., 1975)。また、R100上には水銀耐性遺伝子も存在するが、これはTn21に含まれている (Zheng et al., 1982)。Tn21はTn10とは異なるタイプのトランスポゾンであり、プラスミドR1上に存在するアンピシリン耐性遺伝子を運ぶトランスポゾンTn3と類縁のトランスポゾンである。F上にもTn3と類縁のトランスポゾンである $\gamma\delta$  (Tn1000とも呼ばれる) が存在するが、これは薬剤耐性遺伝子を持たない。その他、性決定因子上には種々のISも存在し、特にF上に存在するこれら可動性遺伝因子はHfr株の成立に関与していると考えられる。また、R100の薬剤耐性遺伝子のほとんどは二つのIS1にはさまれた形で存在しており (図1-1)、この領域はr-determinant領域と呼ばれる。この領域は両側にISを持つ複合トランスポゾン形成し、その転移 (transposition) はゲノム間での多剤耐性の伝播に関与している。テトラサイクリン耐性遺伝子を運ぶTn10はr-determinant領域とは独立して存在するが、水銀耐性遺伝子を運ぶTn21はr-determinant領域内に位置し、このことはR100がこれらの薬剤耐性遺伝子を獲得するに至った進化的な過程を解明する際の指標となるものと考えられる。

様々な伝達性プラスミドの中でもF型プラスミドは接合伝達の機構や接合伝達に関与する遺伝子群 (*tra*遺伝子群) の解析が特に進んでおり、Fに関してはその*tra*領域の塩基配列が1990年までに全て決定されている。R100の*tra*遺伝子群はR100自身の40%にも及ぶ約34キロ塩基対 (kb) にわたり、少なくとも20を越える*tra*遺伝子を含んでおり、*traM*、*traJ*、*traY-I*の3つの主要オペロンからなると考えられている (図1-1)

(総説: Willetts and Wilkins, 1984; Dempsey, 1993)。各*tra*遺伝子の機能は性繊毛の形成、接合対の安定化、表面排斥、*tra*遺伝子の発現制御、DNA移動、の5つに大きく分類することができる (図1-1 / 総説: Ippen-Ihler and Minkley, 1986)。

性繊毛 (sex pili) は接合伝達において供与菌の表面に形成され受容菌を認識する役割を持つ細胞外器官であり、その形成には*traY-I*オペロンの大半の遺伝子 (図1-1で青く示した*traA*、*L*、*E*、*K*、*B*、*P*、*V*、*C*、*W*、*U*、*F*、*Q*、*H*、*G*、*X*の各遺伝子) が関与している。性繊毛の主な構成要素はピリン (pilin) と呼ばれるタンパク質であり、ピリンはTraAタンパク質がTraQタンパク質や宿主のタンパク質によってプロセッサされ、TraXタンパク質によってそのN末端がアセチル化されることによって生じる (Maneevannakul et al., 1993; Moore et al., 1993)。その他のここに挙げた遺伝子はピリンが重合して性繊毛を形成する過程に関与する。F型プラスミドの性繊毛 (F-pili) はまた、繊維状一本鎖DNAファージ*f1*、*fd*、*M13*や球状RNAファージ*Q $\beta$* 、*MS2*などの大腸菌への感染に必要であり、*f1*、*fd*、*M13*は性繊毛の先端に、*Q $\beta$* 、*MS2*はその側面に吸着する (Caro and Schnos, 1966)。そのためこれらのファージはF型プラスミドを保持する菌体のみ感染する性質を持ち、雄株特異的 (male specific) ファージと呼ばれる。

性繊毛によって供与菌が受容菌を認識した後、その二つの細胞は接触し、接合対 (mating pair) を形成するが、この接触しただけの接合対は不安定なものであり、この状態のままではDNAの伝達は起こらない。DNAが移動するにはこの接合対が安定化される必要があり、それに関与するのは*traN*及び*traG*の各遺伝子である (Manning et al., 1981)。

接合伝達によりDNAを受け取った受容菌は、同じ、もしくは類縁の性決定因子を持つ供与菌からは受容菌として認識されなくなる。この現象は表面排斥 (surface

exclusion)と呼ばれ、*traS*遺伝子及び*traT*遺伝子が関与している (Jalajakumari et al., 1987)。*traT*遺伝子はまた細菌が血清に対して示す抵抗性にも関与しており、FやR100、またはクローン化した*traT*遺伝子を保持する細菌は血清に対して抵抗性を示す (Pramoonjago et al., 1992)。*TraT*タンパク質は大腸菌外膜の外側に突出部を持つリポタンパク質であり、その突出部に目的のエピトープを構成するアミノ酸配列を挿入して、大腸菌の菌体表面に発現させる手段としても用いられる (Sukupolvi and O'Connor, 1990)。

発現制御に関する遺伝子としては*traJ*、*finO*、*finP*が知られている。*TraJ*タンパク質は*traY-I*オペロンの転写を正に制御する働きを持つ (Willetts and Skurray, 1987; Inamoto et al., 1988; Ippen-Ihler and Skurray, 1993; Taki et al, unpublished result)。*finO*及び*finP*は協同して*traJ*の発現を抑制することで*traY-I*オペロンの転写を抑える (Finnegan and Willetts, 1973; Yoshioka et al., 1987)。*finP*は*traJ* mRNAにハイブリダイズするアンチセンスRNAであり、*TraJ*の翻訳を抑制する (Koraimann et al., 1991; van Biesen et al., 1993)。*FinO*タンパク質は*finP* RNAの安定化、*finP* RNAと*traJ* RNAのハイブリダイゼーションに関与する (Lee et al, 1992)。*traY-I*オペロンの転写の調節には*TraJ*の他にもArcやCpxといった宿主側のタンパク質も関与していることが知られている (Silverman, 1985)。特にArcは環境中の酸素分圧を感知して呼吸系遺伝子の状況に応じた発現を引き起こすいわゆる二成分伝達系 (two component system) を構成しており (Iuchi and Lin, 1992)、接合伝達が好気的条件下でのみ行なわれることとの関連が指摘されている。

*traM*、*traY*、*traD*、*traI*の各遺伝子はDNAの移動に直接関与すると考えられている。これらについては後述する。

R100などのF型プラスミドの接合伝達の過程は以下のように進行すると考えられている (図1-2/総説: Willetts and Skurray, 1980)。まず、性決定因子を持つ供与菌の表面に性繊毛が形成される。この性繊毛が受容菌を認識し (図1-2、I)、接合対を形成 (図1-2、II)、接合対は*traN*及び*traG*の働きで安定化される (図1-2、III)。あらかじめ*traY*、*traI*両遺伝子産物の働きでDNA伝達開始点 (*origin of transfer; oriT*) の特定のDNA鎖に入っていたニックより、ニックの5'側を先頭にして、

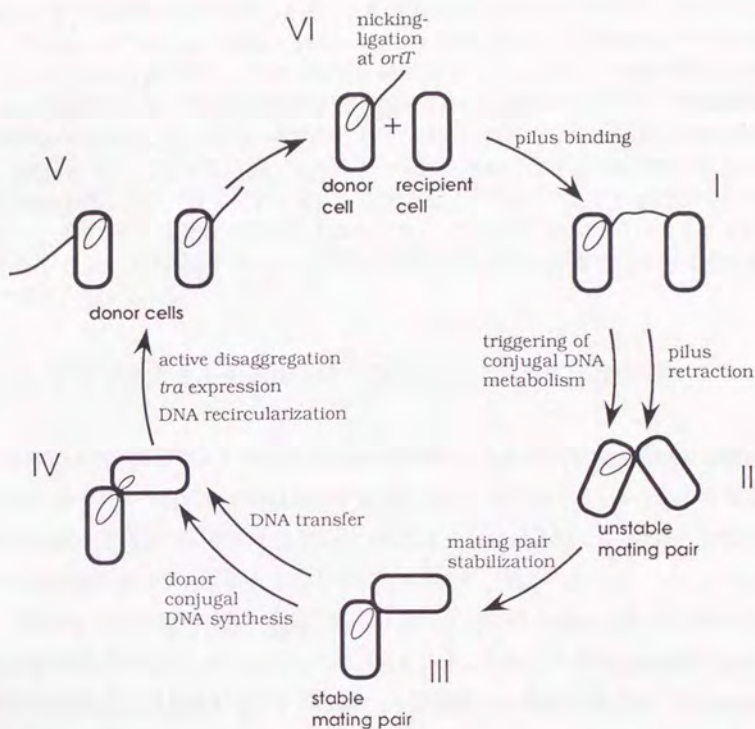


図 1-2 接合伝達過程の模式図

供与菌の細胞表面には性繊毛が形成され、これによって受容菌が認識される。*oriT*部位には受容菌が認識される以前からニックが入ったり再結合されたりしている (I 及び VI)。性繊毛によって受容菌が認識されると受容菌が供与菌に引き寄せられ、接合対が形成される (II)。接合対は *traN*、*traG* 両遺伝子の働きで安定化され (III)、一本鎖 DNA が受容菌へと移動する (IV)。DNA の移動が開始すると同時に供与菌内、受容菌内双方で相補鎖 DNA の複製が始まり、DNA の移動が完了すると DNA 鎖が環状化する (IV ~ V)。接合対の解離によって接合伝達は完了し、受容菌内で *tra* 遺伝子が発現して供与菌となる (V) (総説: Willetts and Skurray, 1980 より転載)。

*tra*遺伝子群が最後に受容菌に移る方向で一本鎖DNAが受容菌へと移動する(図1-2、IV)(Ohki and Tomizawa, 1968; Vapnek and Rupp, 1970, 1971)。移動するのは常に決まった一方のDNA鎖であり、その相補鎖は供与菌内にとどまる。DNA鎖の移動が開始すると同時に供与菌、受容菌双方において宿主菌のDNA複製系を用いて一本鎖DNAの相補鎖の合成が行われ、全DNAが移動した後に受容菌内においてDNA鎖が再環状化され、DNAの移動が完了する(図1-2、IV~V)。その後供与菌と受容菌が解離して接合伝達は完了する(図1-2、V)。性決定因子を受け取り、その*tra*遺伝子が発現すると受容菌は接合伝達能を獲得して供与菌としての性質を持つようになる。また、そうになると*traS*、*traT*の働きにより、同じ性決定因子を持つ供与菌に対しては受容菌として認識されなくなる。

### 3. F型プラスミドの*oriT*領域とDNA伝達に関与する遺伝子

R100などのF型プラスミドの接合伝達の過程は、性繊毛の形成を含む細菌細胞間の相互作用と細菌細胞内でのDNAに関する諸反応とに大別して考えることが出来る。供与菌細胞内でのDNAに関する諸反応は*oriT*及びその周辺領域(*oriT*領域)において様々なタンパク質が機能することによって行なわれる(図1-1)。

前述のように、接合伝達の初期反応は*tra*遺伝子群の最上流に位置する*oriT*に部位及びDNA鎖特異的にニックが入ることで始まり、そこから二本鎖DNAが巻戻されて一本鎖DNAが生じ、5'末端を先頭にしたDNAの受容菌への移動が始まる(Cohen et al., 1968; Ohki and Tomizawa, 1968; Rupp and Ihler, 1968; Ihler and Rupp, 1969)。これまでにR100及び類縁の様々なF型プラスミドについて*oriT*領域の塩基配列が報告されているが(Thompson et al., 1984; Ostermann et al., 1984; Fee and Dempsey, 1986; Finlay et al., 1986a, b; Salazar et al., 1992; Lopez et al., 1991; Di Laurenzio et al., 1991; Graus-Goldner et al., 1990)、これらを互いに比較すると比較的良く保存されている領域とそうでない領域とに分けることが出来る(Inamoto and Ohtsubo, 1990)。図1-3にこれまでに報告されている主なF型プラスミドの*oriT*領域の塩基配列を示す。図1-3 Aでconservedとあるのがこれらのプラスミド間で保存されている領域であり、nonconservedとあるのがそうでない領域、すなわちプラスミド特異的な領域である。



接合伝達におけるDNAの移動に直接関与する遺伝子には、*traM*、*traY*、*traD*、*traI*の四つがあり、これらの遺伝子のどれを欠いた変異体を用いても性纖毛の形成や安定な接合対の形成は行われるが、DNAの受容菌への移動は行われない (Ippen-Ihler and Minkley, 1986)。これら四つの遺伝子の内、*traY*と*traI*は*oriT*領域におけるニッキング (nicking) に関与する遺伝子であると考えられている。*in vivo*の解析から、TraYタンパク質とTraIタンパク質は協同して*oriT*にニックを入れるが、このニッキング活性はTraY単独あるいはTraI単独では見られず、TraY-TraI複合体の形になってはじめてニックを入れる活性が生じるものとされていた (Everett and Willets, 1980; Traxler and Minkley, 1988)。しかし近年R100やFを材料とした*in vitro*のニッキング反応系による解析から、*oriT*にニックをいれるエンドヌクレアーゼがTraIタンパク質であること、TraIのみでもニッキング反応は行なわれるが、TraYタンパク質と宿主タンパク質IHF (integration host factor) を加えることで効率的なニッキング反応が起こることが示されている (Inamoto et al., 1991; Matson et al., 1991; Reygers et al., 1991)。*in vivo*においてはこれら三種類のタンパク質が*oriT*領域上で複合体を形成することが効率的なニッキング反応に必要なと考えられ、この複合体は*oriT*-someと呼ばれる (Inamoto et al., 1991)。*oriT*DNAのニックの5'末端はTraIと共有結合しており (Inamoto et al., 1991; Fukuda and Ohtsubo, unpublished result)、ニックの入った状態と入らない状態とは平衡状態にあると考えられている。最近TraIが*oriT*にニックをいれるのには*oriT*近辺の18 bpの領域*sbi*が必要であること、TraIは一本鎖状態の*oriT*に対しても働き、さらに、切断された状態の*oriT*同士を再結合することで*oriT*間におけるDNAのつなぎ変え反応を起こすことが示された (Fukuda and Ohtsubo, unpublished result)。このことからDNAが受容菌に伝達された後で起こる再環状化もTraIが行なうものと考えられる。TraIはまた、二本鎖DNAを巻戻す活性を持つDNAヘリカーゼI (DNA helicase I) として知られ (Abdel-Monem et al., 1983)、ニックが入ったDNA鎖を巻戻して一本鎖にし、DNAの移動を可能にすると考えられる。DNAヘリカーゼIによるDNAの巻戻し反応はATPの加水分解を伴い、そのエネルギーが一本鎖DNAを受容菌へと移動させるものと推測されている。TraYタンパク質は*oriT*領域に特異的に結合し、その結合部位*sbyA*はプラスミド特異的な領域に存在する (Inamoto and Ohtsubo, 1990; Nelson et al., 1993)。これは

*traY*遺伝子がプラスミド特異的であることとよく一致している。*TraY*は自身のプロモーターに隣接する部位*sbyB*、*C*にも結合し (Inamoto and Ohtsubo, 1990; Nelson et al., 1993)、*traY-I*オペロンの転写を抑制している (Taki et al., unpublished result)。*TraI*の認識部位*sbi*と*TraY*の結合部位*sbyA*の間にはIHFの結合部位*ihfA*が存在し、これらの領域上で*oriT*-someが形成されると考えられる (Inamoto et al., 1991)。*traM*、*traY*、*traI*各遺伝子がプラスミド特異性を示すのに対し、*traD*遺伝子はプラスミド特異性が低く、類縁の性決定因子の*traD*遺伝子の変異を相補することが出来る (Ohtsubo et al., 1970; Willetts, 1971; Alfaro and Willetts, 1972; Yoshioka et al., 1990)。*TraD*タンパク質は内膜に存在し、DNAに対して非特異的に結合することが報告されており (Panicker, 1985. Ph.D. thesis: Ippen-Ihler and Minkley, 1986に引用)、加えて*traD*を欠いてもDNAの受容菌への移動以外の全ての接合伝達の過程が行われることなどから*TraD*タンパク質は一本鎖DNAが供与菌から受容菌へと移る際に通り抜ける伝達口を形成するものと考えられている (総説: Ippen-Ihler and Minkley, 1986)。一方、本研究においてとりあげた*traM*遺伝子産物はDNA移動の開始に働いていると考えられているが、その具体的な機能は明らかではない。図1-4に*traM*遺伝子周辺の塩基配列を示す。*traM*は*tra*遺伝子群中最も上流、*oriT*領域のすぐ下流に位置し、接合伝達においては一番最後に受容菌へと移る遺伝子である。また、*traM*遺伝子は他の*tra*遺伝子とはオペロンを形成しないことが知られてる。この遺伝子は、アミノ酸配列からの計算では14508ダルトン (Da)、マキシセル法による解析ではSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) 上で約10キロダルトン (kDa) の分子量を示す127アミノ酸残基から成るタンパク質をコードし (Inamoto et al., 1988)、この*TraM*タンパク質はプロテオリティックなプロセッシングを受けずに内膜に取り込まれる内膜タンパク質であるとされている (Achtman et al., 1979)。

遺伝学的な解析により*traM*遺伝子は接合伝達におけるDNAの移動に必須な遺伝子であり、その機能はプラスミド特異性を示すことが判明しているが、その具体的な機能や性質は現在までのところ明らかにされていない。予備的な実験によってF因子の*TraM*タンパク質の*oriT*領域に対する結合が観察されたとの報告が私信の形でされているが (Musgrave and Achtman, personal communication; Thompson and Taylor, 1982に引用)、



図1-4 R100の*traM*遺伝子及びその周辺の塩基配列

*traM* transcriptとあるのはDempseyによって報告された*traM*遺伝子の転写開始点と推定される部位である (Dempsey; 1989)。また、それから推定されるプロモーター配列を示してある。*traM*遺伝子のコーディングフレームの下に塩基配列から予想される*traM*タンパク質のアミノ酸配列を示す。\*\*\*は終止コドンに対応する。また、*traI*の一部についても同様にアミノ酸配列を示す。SDは、リボソーム結合部位となりうる配列を表す。

これまでのところそれに関する詳しい報告はされておらず、詳細は不明である。また、その機能についても、安定な接合対の形成が刺激となってTraMタンパク質になんらかの変化が生じ、そのことがDNA伝達のひきがねを引く (triggering) という説 (Everett and Willetts, 1980) や、この領域の転写産物が *finP* 転写産物や *traJ* 転写産物と共に *finO-finP* 調節系に関与するのではないかという説 (Dempsey, 1989) などが出されているがどれも確証はなく、詳しい解析が求められている。

このような背景の下、本研究では性決定因子R100の *traM* 遺伝子の機能についての知見を得ることを目的として解析を行ない、精製したTraMタンパク質が *oriT* 領域に特異的に結合すること、*traM* の発現が自己抑制を受けることを示し、さらにその結合領域を含む *oriT* 領域の構造の解析を通して、*oriT* 領域上で形成され接合伝達の開始、及び制御に関与するタンパク質-DNA複合体の機能と構造について考察した。

## 第二章 TraMタンパク質の精製とその性質の解析

### 要約

性決定因子R100のTraMタンパク質をTraM-コラーゲン-LacZ融合タンパク質 (TraM\*) の形で大腸菌内で発現させ、LacZに対するアフィニティーカラムで精製し、またコラゲナーゼ処理によってTraM\*のTraM部分 (TraM') を得ることができた。TraM\*、TraM'は共に*traM*構造遺伝子上流の広い領域に特異的に結合し、その結合領域 (*sbm* 領域) は*oriT*領域中、他のF型プラスミドとの間で比較的相同性の低い領域に存在した。*sbm*領域には*sbmA*、*B*、*C*、*D*の四つの結合部位が存在し、それらは15 bpからなる相同的な配列を含んでいた。ここで得られた結果、及びTraMが膜画分に存在することとを考え合わせ、TraMは膜に形成される一本鎖DNAの伝達口の近傍に*oriT*領域を保持する機能を有するとの仮説を立て、これをTraMのanchoring機能と命名した。また*sbmC*、*D*は*traM*のプロモーターが存在すると考えられる領域に重なっており、*traM*の発現が自己抑制を受ける可能性が示唆された。

本章の内容は以下の論文によって公表した

"Specific DNA binding of the TraM protein to the *oriT* region of plasmid R100"  
*Journal of Bacteriology*, 173:6347-6354 (1991)

"Binding sites of integration host factor in *oriT* of plasmid R100"  
*Journal of General and Applied Microbiology*, 36:287-293 (1990)

## 1. 序

R100の*tra*遺伝子のうち接合伝達においてDNA伝達に直接関与するのは*traM*、*traY*、*traD*、*traI*である。これらの遺伝子の変異は性繊毛の形成、安定な接合対の形成、表面排斥には影響を与えないが、接合対を形成してもDNA伝達は行なわれない。本章では接合伝達におけるDNAの移動に必須な遺伝子である*traM*遺伝子の機能についての知見を得ることを目的として、TraMタンパク質を精製し、その性質について解析を行なった。その結果TraMが*oriT*領域中の四ヶ所に特異的に結合するDNA結合タンパク質であることを明らかにでき、そこからTraMの機能について考察を行なった。また、本章での解析を通して種々のタンパク質の結合、認識部位が整然と並んだ*oriT*領域の構造が明らかとなった。

## 2. 結果

### (1) TraM\*タンパク質の精製

TraMタンパク質を精製するにあたっては、*traM*遺伝子をコラーゲン遺伝子の一部をリンカーとして $\beta$ -ガラクトシダーゼ遺伝子 (*lacZ*) と融合させて、TraM-コラーゲン-LacZ融合タンパク質を大腸菌に過剰生産させた。TraM-コラーゲン-LacZ融合タンパク質は $\beta$ -ガラクトシダーゼ (*LacZ*) に対するアフィニティークロマトグラフィーによって一段階で精製することができた。この方法 (Germino and Bastia, 1984) を用いることで、その活性のわからないTraMタンパク質を容易に精製することができ、その後コラーゲナーゼで処理することにより目的のタンパク質部分だけを切り離して性質を調べることが可能であった (図2-1)。

実際にはまずR100の*traM*遺伝子及びその周辺の領域を含むR100の断片をベクターpUC119にクローニングしたプラスミドpABO1に対して*traM*遺伝子の54 bp上流に*Bam*HI認識部位を、*traM*遺伝子のすぐ下流に*Bgl*II認識部位をKunkelの方法によりそれ

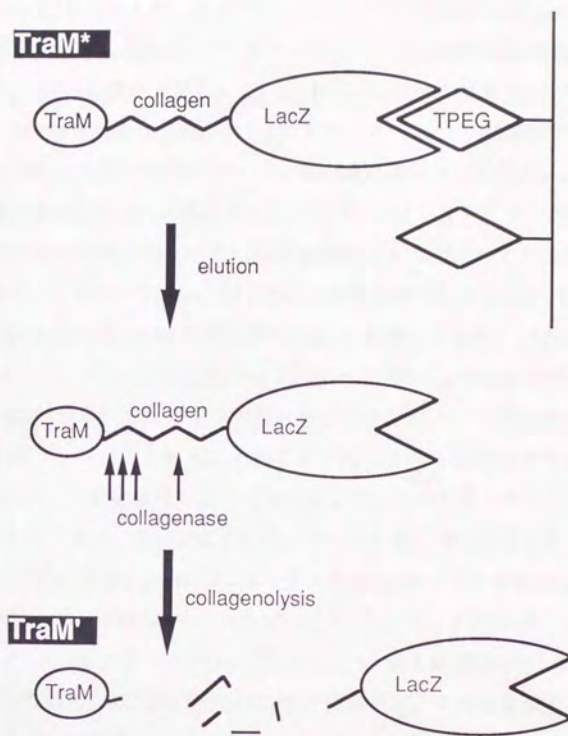


図 2-1 LacZの基質アフィニティーを利用したTraM\*の精製の模式図

TraM\*のLacZ部分の酵素活性を利用して、その基質アナログであるTPEGを固定化したカラムにTraM\*を保持させる。他のタンパク質を除いた後にホウ酸バッファーによってpHを高めてTraM\*とTPEGの結合を解離させ、TraM\*を溶出する（elution）。得られたTraM\*はコラゲナーゼ処理によってTraM部分（TraM'）とLacZ部分とに分離できる（collagenolysis）。

ぞれ導入してpABO12を作成した(図2-2)。次いでこのpABO12のBamHI認識部位とBgII認識部位とに挟まれる領域をベクタープラスミドpJG200のBamHI認識部位にクローニングしてpABO22を得た(図2-2)。pJG200はバクテリオファージλのcI857(リプレッサー-cIの温度感受性変異)から $p_R$ プロモーターをへてcro遺伝子の開始コドン(ATGcro)までの領域の下流にコラーゲン-lacZ融合遺伝子を配置し、ATGcroからコラーゲンの遺伝子が翻訳される構造をとっている(図2-2)。そのためリプレッサー-cI857が活性を保つ30℃では $p_R$ からの転写は抑制されるが、42℃ではcI857が失活して抑制が解除され、コラーゲン-lacZ融合遺伝子が高効率で発現される(Germine and Bastia, 1984)。pJG200のBamHI認識部位はATGcroに隣接しており、pABO22上でtraM遺伝子はtraM-コラーゲン-lacZ融合遺伝子を形成する。ATGcroとtraM-コラーゲン-lacZ融合遺伝子(traM\*遺伝子)とはコドンの読み枠がずれており、ATGcroの直後には連続する2つの終始コドンが存在する。そのためATGcroからの翻訳はすぐに終結し、traM遺伝子のリボゾーム結合部位を用いてtraM遺伝子自身の開始コドンからあらためて翻訳が開始される。また、traM遺伝子の終止コドンに相当する位置からコラーゲン遺伝子がin frameで続くため、pABO22にコードされるTraM-コラーゲン-LacZ融合タンパク質のTraM部分は本来のTraMタンパク質と全く同じアミノ酸配列となっている(図2-2)。このTraM-コラーゲン-LacZ融合タンパク質を以後TraM\*と呼ぶ。

このようにして得たpABO22を宿主MC1000に保持させ、その培養温度を30℃から42℃へとシフトして90分間培養すると菌体のβ-ガラクトシダーゼ活性は約1000ユニットから約100000ユニットへとおよそ100倍増加した。また、菌体の全タンパク質に対してSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動(SDS-PAGE)を行ったところ約130 kDaの位置に新たなバンドが出現することが確認できた(図2-3)。塩基配列から計算したTraM\*の分子量が135 kDaであること、pABO22の代わりにpJG200を保持させた菌体ではこのバンドは出現しないことからこの温度シフトで誘導されるバンドがTraM\*のバンドであると考えられた。

TraM\*の生産を誘導した菌体を破壊し、抽出液から膜画分を除いた後にLacZに対するアフィニティークロマトグラフィーを行ったところ、得られた試料はSDS-PAGE上で分子量約130 kDaの、温度シフトによって誘導されたバンドと同じ位置にバンド

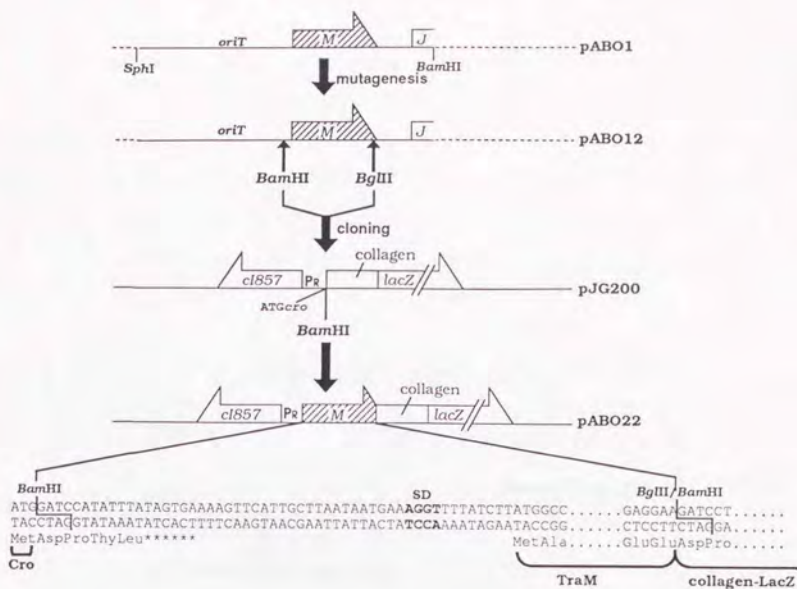


図 2-2 pABO22の構築

pABO1はR100の *oriT* から *traJ* の途中までを含むDNA断片（図1-4に示した領域に相当）をpUC119にクローニングしたプラスミドである。pABO1に対してプライマー1とプライマー2を用いてKunkel法を行ない、*Bam*HI認識部位と*Bgl*II認識部位をそれぞれ図に示した位置に導入したのがpABO12である。その*Bam*HI-*Bgl*II 434 bp断片をベクタープラスミドpJG200の*Bam*HI認識部位にクローニングしてpABO22を得た。水平方向の矢印は遺伝子とその方向を表す。MはR100の*traM*を、Jは*traJ*の一部をそれぞれ示す。pJG200上に存在する*cI857*、*p<sub>K</sub>*、*ATGcro*はそれぞれバクテリオファージλのリプレッサー-*cI*の温度感受性変異遺伝子、*p<sub>K</sub>*プロモーター及び*cro*遺伝子の開始コドン（ATG）である。同じくpJG200上に存在するcollagen-*lacZ*融合遺伝子は*p<sub>K</sub>*プロモーターから転写され、*ATGcro*から翻訳されて発現する。pABO22の*traM*の周辺部分の塩基配列を下に抜き出して、アミノ酸配列とともに示してある。\*\*\*は終止コドンに対応する。SDはメッセンジャーRNAのリボゾーム結合部位と考えられる部位である。*traM*とcollagen-*lacZ*融合遺伝子との境界の部分は*Bam*HI認識部位と*Bgl*II認識部位とのhybridになっている。

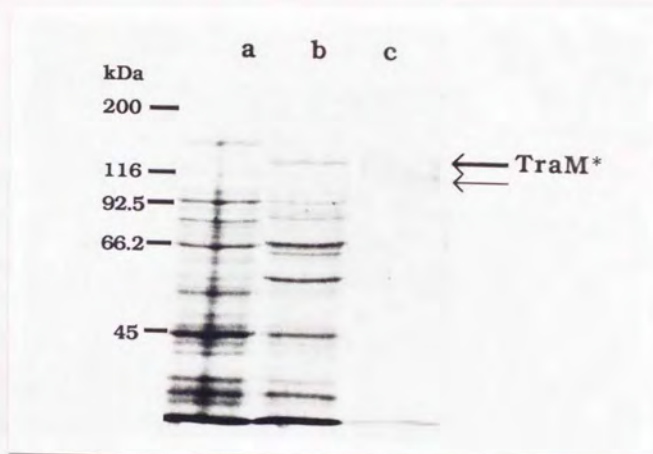


図 2-3 TraM\*のSDS-PAGEのパターン

pABO22を保持する宿主菌MC1000を30℃で培養したもの（レーン a）、30℃で培養した後に培養温度を42℃にシフトして90分間発現を誘導したもの（レーン b）についての菌体の全タンパク質、及びTPEG-Sepharoseによって精製したTraM\*標品（レーン c）をSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動（SDS-PAGE）後、クマシーブリリアントブルーによって染色した。図左に分子量標準として用いたタンパク質の位置とその分子量を示してある。図右の太い矢印はTraM\*、細い矢印はその分解産物であるLacZ部分と考えられるバンドをそれぞれ示す。

を示した(図2-3、レーンc)。また、分子量マーカーとして使用しているLacZ (116 kDa) とほぼ同じ位置にもバンドがみられた。これら二つのバンドはほぼ同じ量であり、この二つで試料中のタンパク質量のほとんどを占めていた。分子量や基質アフィニティーカラムによって精製されたことなどから前者はTraM\*、後者はTraM\*が分解されて出来たLacZ部分に相当すると考えられた。なお、後者のTraM\*に対する割合はアフィニティークロマトグラフィー前と比べて大きくなっている。これは、精製過程でTraM\*が分解されたためと考えられた。以後この試料をTraM\*標品として解析に用いた。

## (2) TraM\*のoriT領域に対する結合

得られたTraM\*標品を用いてゲルシフト法による解析を行った結果、TraM\*がoriT領域を含むDNA断片のみに特異的に結合することが示された(図2-4~2-6)。TraM\*の結合したDNA断片はゲル上にはっきり確認することはできなかったが、TraM\*の分子量が非常に大きいこと、さらにはTraM\*の構成要素であるLacZが四量体として存在することなどから、移動度が極端に遅れ、ゲルの上端に存在するものと考えられる。また、TraM\*の濃度が増すと、大きいDNA断片に泳動度の遅れが見られた(図2-4、レーン2、4)。これはTraM\*の非特異的なDNA結合能によるものと考えられる。このような非特異的な結合は特異的な塩基配列を認識して結合する他のタンパク質においてもよく見られることである(Ichikawa et al., 1987)。

TraM\*がoriT領域に特異的に結合することが明らかとなったので、その結合条件を解析するために反応条件を変えて結合性を調べた。まず結合に対するpHの影響を調べるために反応液に加えるMES-KOHのpHをpH 5.0からpH 8.0までの範囲で検討したところ、TraM\*タンパク質のoriT領域への特異的結合は*in vitro*ではpH 5.5において至適であった(図2-5)。また、DNA結合タンパク質の解析においてDNAアナログとしてしばしば用いられるヘパリンを加えると反応液中の濃度が5 ng/ $\mu$ lですでに特異的なフラグメントのバンドの消失が見られなくなり、ヘパリンがTraM\*タンパク質の特異的結合を阻害することが明らかとなった(図2-6)。

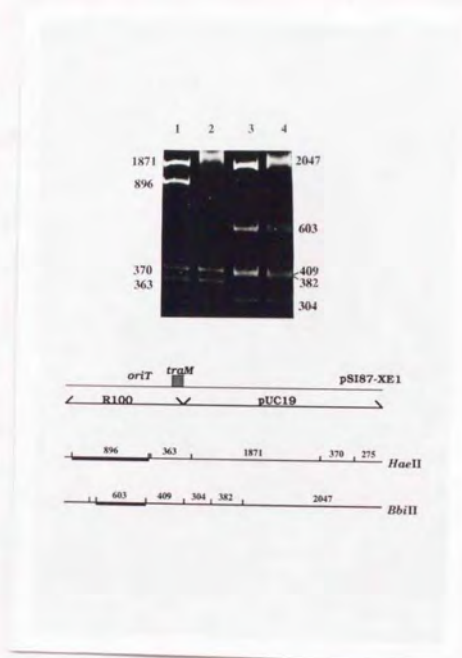


図 2-4 TraM\*の*oriT*領域に対する結合

*Hae*II (レーン 1、2) または *Bbl*II (レーン 3、4) で切断した pSI87-XE1 と TraM\* 標品とを結合反応液中で結合させ、4% PAGE 後臭化エチジウムで染色した。レーン 2、4 は TraM\* 標品を加えたもの、レーン 1、3 は TraM\* 標品を加えないコントロールである。TraM\* 標品を加えたレーンは、モル比が  $\text{TraM}^*/\text{DNA} = 120$  となるように反応液を調製した。図下部に各制限酵素による pSI87-XE1 の切断地図を示す。数字は断片の長さ (bp) を示し、太い線は TraM\* を加えたことによって泳動度が変わった断片を示す。ゲルの写真の両側に各バンドに対応する断片の長さ (bp) を示す。

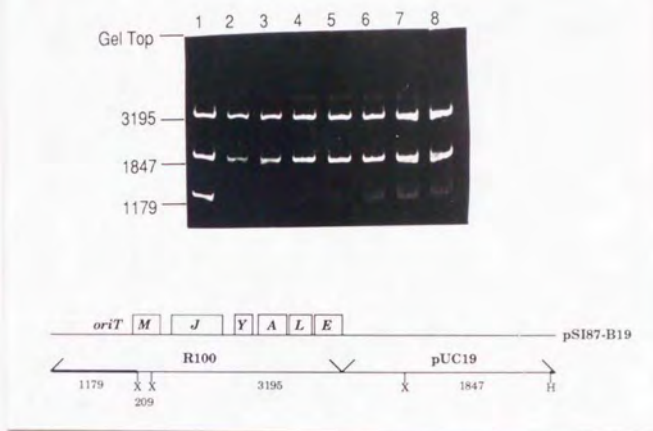


図 2-5 溶液のpHがTraM\*の*oriT*領域に対する結合に与える影響

*XmnI*及び*HindIII*で切断したpSI87-B19とTraM\*標品とを反応させ、3.5% PAGE後臭化エチジウムで染色した。レーン1はTraM\*を加えないコントロールである。レーン2、3、4、5、6、7、8はそれぞれ反応液のpHが5.0、5.5、6.0、6.5、7.0、7.5、8.0となっている。図下部にpSI87-B19の*XmnI*及び*HindIII*による切断地図を示す。図中Xとあるのは*XmnI*、Hとあるのは*HindIII*による切断部位である。数字は断片の長さ (bp) を示し、TraM\*を加えたことによって泳動度が変わった断片は太い線で示している。ゲルの写真の左側に各バンドに対応する断片の長さ (bp) を示す。209bpのバンドはこのゲル上には見えない。

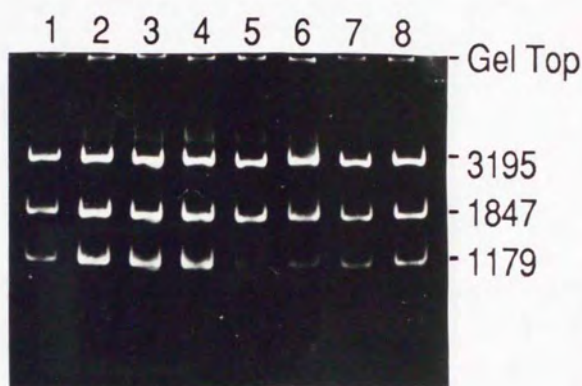


図 2-6 TraM\*の*oriT*領域に対する結合に与えるヘパリンの影響  
及びTraM\*の濃度が増すことによる非特異的結合

用いたDNAは図 2-4 と同じである。各レーンの反応液に加えたTraM\*及びヘパリンの量は以下の通りである。ゲルの写真の右側に各バンドに対応する断片の長さ (bp) を示す。

レーン	1	2	3	4	5	6	7	8
TraM*/DNA	0	150	150	150	150	75	37	9
ヘパリン	0	500	50	5	0	0	0	0

(ng /  $\mu$ l)

### (3) TraM'のoriT領域に対する特異的結合

TraM\*をコラーゲンリンカーの部分で切断してTraM部分とLacZ部分に分離するために、TraM\*標品に対してコラーゲナーゼ (collagenase) 処理を行った。コラーゲナーゼによる切断部位であるアミノ酸配列 P X ↓ G P X (矢印の箇所を切断する。Xはどのアミノ酸でもよいことを示す: Germino and Bastia, 1984) は、TraM\*中コラーゲンリンカーの部分にのみ存在し、コラーゲナーゼ処理によってTraM部分をLacZ部分から分離することが出来る。TraM\*標品に対してコラーゲナーゼ処理を行ない、SDS-PAGEにて調べたところTraM\*のバンドが消失し、LacZと同じ移動度を示すバンド及び約10 kDaの新たなバンドが生じた (図2-7)。後者はTraMタンパク質の塩基配列から計算した分子量 (14508 Da) や、マキシセル法によって示された分子量 (約10 kDa: Inamoto et al., 1988) とよく一致し、コラーゲナーゼ処理によってTraM\*のTraM部分がLacZ部分と分離できることが確認できた。この新たに出現したTraM部分をTraM'と名付けた。TraM'が見られたことで、前節で精製した試料が実際にTraM\*であることがあらためて確認できた。TraM'は本来のTraMのC末端部分にコラーゲン由来の5 アミノ酸残基 D P G P V が付加した形になっていると考えられる。TraM\*標品にコラーゲナーゼ処理を施した試料をTraM'標品として以後の実験に供した。

このようにして得たTraM'標品を用いてゲルシフト法を行ったところ、TraM'もTraM\*と同じようにoriT領域に特異的に結合することがわかった (図2-8)。また、TraM'の方がTraM\*よりも結合能が強いことが示された (図2-8、レーン2、5)。これはTraM\*のDNA結合能がLacZ部分によって部分的に阻害されていることを示唆する結果である。TraM\*の結合したDNA断片、つまりシフトした断片がゲルの上端に存在すると考えられるのに対して、TraM'の結合した断片の泳動度の遅れは小さく、ゲルの上でシフトしたバンドが確認できた。TraM'の濃度が高くなるにつれて泳動度の遅れも大きくなっており (図2-8、レーン4~7)、oriT領域内には複数のTraM'結合部位が存在することが示唆された。

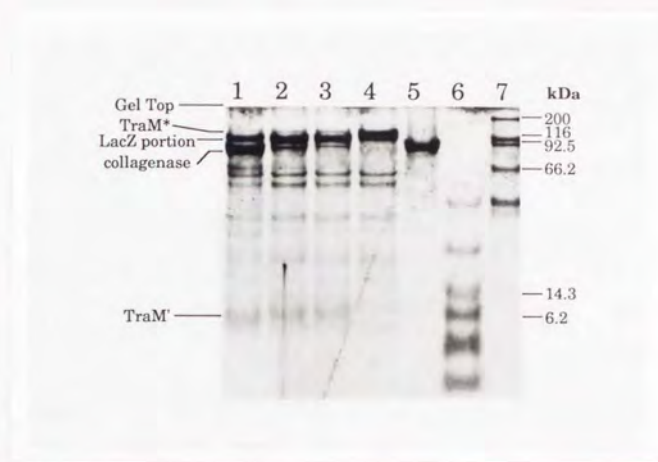


図 2-7 TraM\*標品のコラゲナーゼ処理

レーン1、2、3、はそれぞれTraM\*タンパク質30pmolに対してコラゲナーゼを9  $\mu$ g、900ng、225ng 加えて反応させたものである。レーン4はコラゲナーゼ処理をしないTraM\*標品、レーン5はコラゲナーゼ、レーン6は低分子量タンパク質分子量マーカー (Bethesda Research Laboratories: 上から Ovalbumin: 43 kDa、 $\alpha$ -Chymotrypsinogen: 25.7 kDa、 $\beta$ -Lactoglobulin: 18.4 kDa、Lysozyme: 14.3 kDa、Bovine trypsin inhibitor: 6.2 kDa、Insulin A + B chain: 3 kDa)、レーン7は高分子量タンパク質分子量マーカー (Bio Lad Laboratories: 上から Myosin: 200 kDa、 $\beta$ -galactosidase: 116 kDa、Phosphorylase B: 92.5 kDa、Bovine serum albumin: 66.2 kDa、Ovalbumin: 45 kDa) である。レーン6 及びレーン7のタンパク質分子量マーカーのうち Myosin、 $\beta$ -galactosidase、Phosphorylase B、Bovine serum albumin、Lysozyme、Bovine trypsin inhibitorについては右側にその位置及び分子量を示してある。

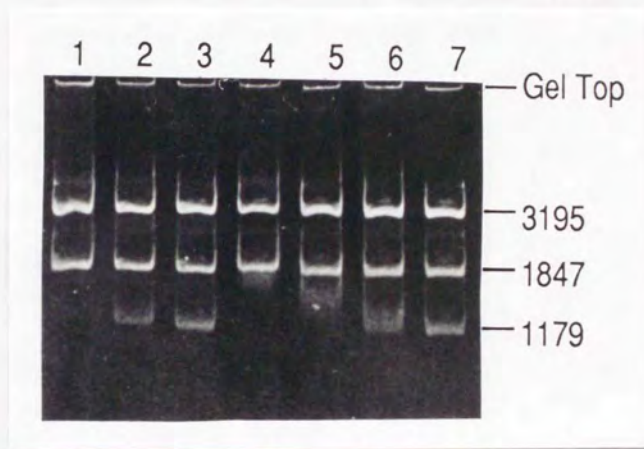


図 2-8 TraM'の*oriT*領域に対する結合

用いたDNAは図 2-4 と同じである。各レーンの反応液でのTraM\*またはTraM'とDNAとのモル比は以下の通りである。レーン 2 とレーン 5 を比較すると、同じタンパク質量でレーン 2 では1179 bpのバンドのシフトがほとんど見られないのに対し、レーン 5 では完全にシフトしている。

レーン	1	2	3	4	5	6	7
TraM*/DNA	120	60	30	0	0	0	0
TraM'/DNA	0	0	0	120	60	30	0

#### (4) *oriT*領域におけるTraMタンパク質の結合部位

TraMタンパク質の*oriT*領域上の結合部位をさらに詳しく調べるために、*oriT*を含むDNA断片（図2-9 A）を用いてDNase Iフットプリンティング法による解析を行った。その結果、TraM\*存在下で*oriT*領域内の4つの箇所にそれぞれ30 bp程度、DNase Iによる切断からの保護が見られ、TraMの結合部位が示された（図2-9 B、2-10）。これらTraM結合部位を *specific binding site of the TraM protein* の略で *sbm* と名付け、上流側より順に *sbmA*、*sbmB*、*sbmC*、*sbmD* とした。これら *sbm* 部位には15塩基対からなる相同的な塩基配列が存在した（図2-9 C）。また、*sbmB*、*sbmC*、*sbmD* にはそれぞれパリンドロミックな逆向き重複配列が存在した（図2-9 B）。TraM\*タンパク質の *sbmA*、*sbmB* に対する結合は *sbmC*、*sbmD* に対する結合より弱く、タンパク量が2倍にならないとDNase Iに対する保護ははっきりとは見られなかった（図2-10）。

*sbmA* と *B*、*sbmC* と *D* とはそれぞれ隣接して存在するが、*sbmB* と *C* の間には20 bp程度の間隔が有り、そこには宿主タンパク質IHFの結合部位に見られる共通配列が見られた。DNase Iフットプリンティング法によって解析した結果、この部位には実際にIHFが結合することが明らかとなった（図2-9 B）。IHFはR100の*oriT*領域中の*oriT*のすぐ近傍にも結合し、その結合部位を *ihfA*、*sbmB* と *C* の間に存在するIHF結合部位を *ihfB* と名付けた（図2-9 B）。

TraMが個々の*sbm*部位を単位として認識、結合することを示すために、*sbmD*全体に相当する33 bpの配列の合成二本鎖DNA断片（図2-11 (A)；SBMD）、*ihfB*中に見られる33 bpの配列の合成二本鎖DNA断片（図2-11 (B)；IHFB）をそれぞれコンペティターとして用いてゲルシフト法を行なった。その結果SBMDはTraMの結合を阻害したが、IHFBは阻害せず、TraMが実際に個々の*sbm*部位を単位として認識、結合することが示された（図2-11）。またコンペティターとして、四つの*sbm*部位にみられる15 bpの共通配列（図2-11 (C)；CONSENSUS）、*ihfB*中に存在するIHF結合部位に見られる共通配列を含む15 bpの配列（図2-11 (D)；IHFCORE）からなる合成二本鎖DNA断片を用いたところ、CONSENSUSはTraMの結合を阻害したが、

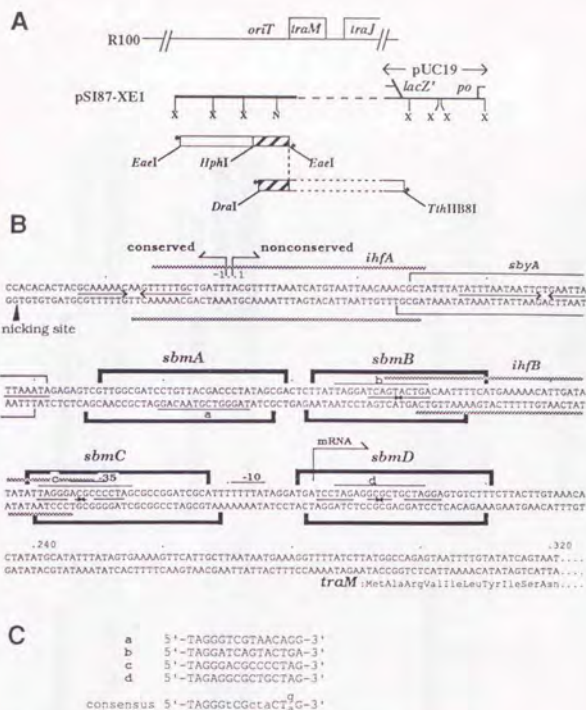


図 2-9 *oriT* 領域における TraM\* タンパク質の結合部位

AにDNase Iフットプリンティングで用いたDNA断片及び<sup>32</sup>Pで標識した5'末端を示す。DNA断片は横長の長方形で示しており、上辺が上側のDNA鎖、下辺が下側のDNA鎖を表す。<sup>32</sup>Pによる標識の部位を\*で示す。長方形全体は標識を入れた段階でのDNA断片であり、そのうち斜線の入った部分がDNase Iフットプリンティングに用いた断片である。BにR100の*oriT*から*traM*構造遺伝子までの間の領域の塩基配列を示す。図中conservedとあるのはR100類似のプラスミド間でよく保存されている領域、nonconservedとあるのは保存されていない、プラスミド特異的な領域である。塩基番号は図1-4に従いプラスミド特異的な領域の最初の塩基を1とした。*sbyA*はTraYの結合部位(Inamoto and Ohtsubo, 1990)、*ihfA*及び*ihfB*はIHFの結合部位を表す。上向きの矢印は*oriT*を示す。ニックは、*oriT*の下側のDNA鎖に入る。Dempseyによって報告された*traM*遺伝子の転写開始点(Dempsey, 1989)とそれから考えられるプロモーター、及び塩基配列から予想されるTraMタンパク質のアミノ酸配列をそれぞれ示してある。TraMタンパク質の結合部位*sbmA*、B、C、Dをそれぞれ示す。*sbmB*、C、Dに存在する逆向き反復配列を上下のDNA鎖の間に矢印で示し、*sbmA*、B、C、D内に存在する保存された塩基配列を上線または下線a~dで示す。CはBの中でa~dで示した各*sbm*部位に存在する保存された塩基配列、ならびにそれらに共通すると思われる塩基配列(consensus)である。

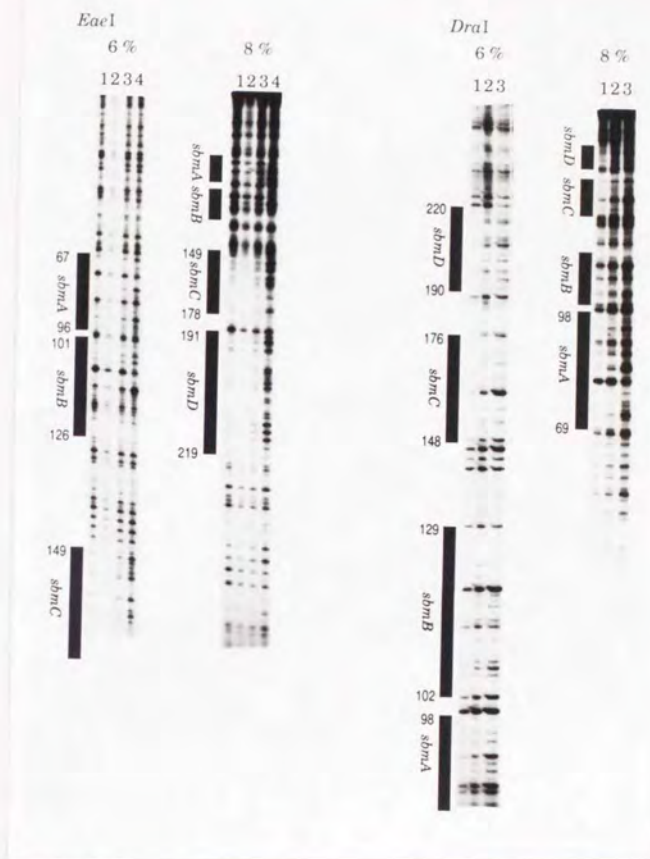


図 2-10 *sbm* 部位の DNase I フットプリント

*EaeI* とあるのは *EaeI* 部位を標識した 353 bp *HphI-EaeI* 断片、*DraI* とあるのは *DraI* 部位を標識した 288 bp *DraI-EaeI* 断片についての DNase I フットプリンティングによるパターンである。DNA 鎖の分離に使用したシーケンスゲルの濃度をそれぞれ示してある。*EaeI* のレーン 1、2、3、4 は TraM\*/DNA がそれぞれ 340、170、85、0 (コントロール)、*DraI* のレーン 1、2、3 はそれぞれ 300、150、0 (コントロール) の条件で反応させたことを示す。*sbm* 部位をゲルの左側に示す。黒い帯が DNase II による切断に対して保護されている領域である。数字は各 *sbm* 部位の両端の位置を示す。*sbmC*、*sbmD* は *sbmA*、*sbmB* よりも薄い TraM\* 濃度でフットプリントが見られる。

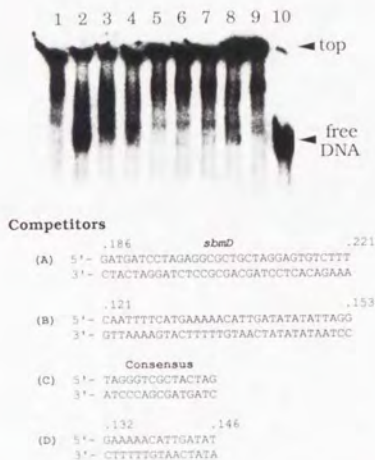


図2-1-1 TraMの結合に対する合成二本鎖DNAによるコンペティション

TraM\*のoriT領域に対する結合を、 $^{32}$ Pで標識した*DraI*-*Tth*HB8I 1131 bp断片に対するゲルシフト法で調べた。3%PAGE後ゲルを真空加熱乾燥し、オートラジオグラフィーにて視覚化した。全てのレーンにおいてTraM\*は0.3 pmol、標識したDNA断片は0.005 pmol用いて28℃で20分間結合反応を行なわせた。レーン1ではコンペティターを加えない条件で、また、レーン10ではTraM\*を加えず、標識したDNA断片のみを泳動している。レーン10で見られるタンパク質の結合していないDNA断片(図右側にfree DNAと示す)はレーン1では全てシフトしている。レーン2~9では以下に示すコンペティターを加えて結合反応を行なっている。レーン2、23 pmolのSBMD；レーン3、2.3 pmolのSBMD；レーン4、0.2 pmolのSBMD；レーン5、23 pmolのIHFB；レーン6、2.3 pmolのIHFB；レーン7、0.2 pmolのIHFB；レーン8、50 pmolのCONSENSUS；レーン9、50 pmolのIHFCORE。下部にそれぞれのレーンで加えたコンペティターSBMD (A)、IHFB (B)、CONSENSUS (C)、IHFCORE (D) の配列を示す。塩基番号は、図1-4に従った。

IHF COREは阻害せず(図2-11)、TraMが $\sigma^{sbm}$ 部位に存在する相同的な15 bpの配列を認識して結合することが示された。

### 3. 考察

#### (1) TraMタンパク質の精製

本研究ではTraMタンパク質の機能を解析するためにTraM-コラーゲン-LacZ融合タンパク質(TraM\*)を構築し、これをLacZに対するアフィニティーを利用して精製した。この方法では本来の形でのTraMタンパク質を得ることはできないが、機能の不明なTraMタンパク質を一段階で精製することが可能となり、硫酸沈澱やいくつかのカラムを用いる通常の方法に比べ精製の手順と時間とが大幅に短くなり、精製過程におけるタンパク質の変性、分解などを最小限に抑えられると考えられる。また、TraM\*の発現の様子を $\beta$ -ガラクトシダーゼ活性(LacZ活性)で追跡できるという利点を持つ。更に、ここではcl857と $p_R$ プロモーターの発現調節系を用いており、熱誘導により目的タンパク質を短時間のうちに大量に生産させることが期待できる。実際、traM\*遺伝子をもつプラスミドpABO22を保持する宿主菌のTraM\*産生の指標となるLacZ活性は、熱誘導により約100倍にもなった。

LacZ活性は菌体の膜画分と可溶性画分とにほぼ等しく分配されていた。本来のTraMタンパク質は膜画分に分画されることが既に報告されているが(Achtman et al., 1979)、TraM\*の場合膜に親和性の強いTraM部分と可溶性のLacZ部分とが融合したタンパク質であるためこのようになったのだらうと考えられる。また、TraMを膜に保持するレセプターが膜に存在するならば、TraM\*の過剰生産によってTraM\*に対するレセプターの量比が低下し、その結果膜に保持しきれないTraM\*が細胞質画分に遊離した可能性もある。

TPEG-Sepharoseカラムを通して得られたTraM\*標品はSDS-PAGE上で主要な二本のバンドを示した(図2-3)。培養温度のシフトによって誘導される点や分子量など

から考えて、そのうちの上のバンドがTraM\*であり、下のバンドはそのTraM\*が分解されて生じたLacZ部分であると推定した。TraM\*標品に対してコラゲナーゼ処理を施すと一番上と二番目のバンドが減じ、それにともなう二番目のバンドのやや下、分子量マーカーとして用いた $\beta$ -ガラクトシダーゼとほぼ同じ位置に新しいバンドが生じたこと、また、約10 kDaの位置にTraM'と考えられる新しいバンドが生じたこと(図2-7)は、この推定を支持する結果である。

TraM\*を発現している菌体の全タンパク質をSDS-PAGEで観察するとTraM\*は、TraM部分が分解されて生じたと考えられるLacZ部分よりはるかに多量に存在する。それに対してTraM\*標品中では両者の存在比は約1:1である(図2-3)。この説明としてTraM\*が精製過程で除かれたか、あるいは分解されたかの二つの考え方が出来る。本研究で用いた方法ではTraM\*は菌体の可溶性画分から精製されている。しかし、先に述べたように菌体のLacZ活性は膜画分と可溶性画分とにほぼ半々に分かっている。しかもLacZが可溶性であることから、もし菌体内でTraM\*が分解を受けLacZ部分が生じていればそれは可溶性画分に分画されると考えられる。従って膜画分のLacZ活性がほとんどTraM\*によるものであると考えられるのに対し可溶性画分のLacZ活性には分解されて生じたLacZ部分によるものも含まれるはずである。従って、可溶性画分のみを用いる限りTraM\*の精製標品中での存在比は低くなると考えられる。TraM\*の量比を上げるためには可溶性画分だけでなく膜画分を可溶化するなどしてアフィニティークロマトグラフィーにかける、各種のプロテアーゼ阻害剤を用いる、などの対策が考えられる。

## (2) TraMタンパク質のDNA結合性

精製されたTraM\*標品及びTraM'標品を用いたゲルシフト法による解析の結果、このタンパク質はR100の*oriT*領域を含むDNA断片に特異的に結合することが明らかとなった。この結合はヘパリンによって阻害され、更にpH 5.5において至適であった。また、TraM\*の量を増やすと*oriT*領域を含まないDNA断片に対する結合もみられ、TraMタンパク質は非特異的DNA結合能も持つと考えられた。

TraM標品を用いたゲルシフト法では、タンパク量が増加するにつれて $oriT$ 領域を含むDNA断片の泳動度の遅れが顕著となった(図2-8)。この理由としては① $oriT$ 領域内にTraMタンパク質に対する親和性の異なる複数の結合部位が存在する、②TraMが濃度が高い状態では二量体もしくは多量体を形成しており、希釈されることでそれが解離する、などが考えられる。このうち②についてはTraMのタンパク質量が $\mu\text{mol}$ レベルであり、その希釈の度合いもたかだか四倍程度であることから考えにくく、従って①のように $oriT$ 領域にはTraMタンパク質の結合部位が複数存在するためであると考えられる。実際にDNase Iフットプリンティング法によって解析した結果、TraMの結合部位が四ヶ所存在することが示された。

### (3) $oriT$ 領域におけるTraMタンパク質の結合部位

DNase Iフットプリンティング法によってTraM\*は $traM$ 遺伝子の上流側4つの部位に結合することが明らかとなった。これまでにF因子のTraMタンパク質が $traM$ 遺伝子の上流にいくつか存在する逆向き重複配列(inverted repeat)や順方向重複配列(direct repeat)に結合するのではないかと想像されていた(総説: Ippen-Ihler and Minkley, 1986)。本研究においてはじめて明らかとなった結合部位 $sbmA$ 、 $sbmB$ 、 $sbmC$ 、 $sbmD$ のうち $sbmA$ を除く3つの部位にはそれぞれパリンδροミックな逆向き重複配列が存在し、 $sbmC$ と $sbmD$ のそれは比較的良好に似た配列であった。また、それとは別に4つの $sbm$ 部位には15塩基対からなるよく保存された塩基配列が存在した。合成二本鎖DNA断片を用いたコンペティション実験から、実際にTraMタンパク質は4つの $sbm$ 部位に共通に見られる15 bpの配列を認識してここに結合することが示された。 $sbm$ 部位はいずれもF型プラスミド間で保存されていない、いわゆるプラスミド特異的な領域に存在していた。これは $traM$ 遺伝子がプラスミド特異的に働く遺伝子であることとよく一致し、 $traM$ 遺伝子の機能にはTraMタンパク質の $oriT$ 領域に対する特異的な結合が直接関与していることを示唆している。TraM\*タンパク質の $sbmA$ 、 $sbmB$ に対する結合は $sbmC$ 、 $sbmD$ に対する結合に比べて弱く(図2-10)、またゲルシフト法による解析でTraMタンパク質の量によって泳動度の遅れに違いがみられたが、これは

TraMタンパク質は濃度が低いときには*sbmC*、*sbmD*に選択的に結合し、濃度が高くなるとはじめて*sbmA*、*sbmB*にも結合するためであると解釈している。

#### (4) TraMタンパク質の構造

F型プラスミドのうちこれまで*traM*構造遺伝子の塩基配列が報告されているF、R1、ColB4、pSU233、pSU316、P307、pED208及びR100の塩基配列から導き出されるTraMタンパク質のアミノ酸配列をそれぞれ比較すると、それらはpED208を除きC末端側の領域はほとんど同じであるのに対して、N末端側の領域の相同性は低い(図2-12)。TraMタンパク質の結合領域がプラスミド特異的な領域に存在すること、*traM*がプラスミド特異的であることから、TraMのDNA結合ドメインはそのN末端側の領域の中にあると考えられる。C末端側の領域はTraMの膜への取り込みやタンパク質同士の相互作用に関わっていると考えられるが、C末端領域には特に疎水性の高い部位や膜貫通ドメインは存在しないことからTraMの膜との親和性はいわゆる膜貫通型の構造によるのではないと考えられる。一つの可能性としては膜にTraMを保持する機能を持つタンパク質が存在することも考えられ、これに関しては今後さらに解析することが必要である。

#### (5) TraMタンパク質の機能

本研究においてTraMタンパク質が*oriT*領域中接合伝達の際ニックが入る部位の*traM*遺伝子側、つまり接合伝達において一番最後に受容菌に移動する領域に特異的に結合することが明らかとなった。このこととTraMタンパク質が膜に親和性のあるタンパク質であるということから、TraMタンパク質が*oriT*領域を膜近傍、特にTraDによって形成されるDNA伝達口近傍に保持する機能をもつとの仮説を立て、これをTraMのanchoring機能と名付けた。この仮説によれば*traM*遺伝子が接合伝達に必須であるということが、TraMタンパク質が存在しなければ*oriT*領域をDNA伝達口近傍に保持することができず、一本鎖DNAが受容菌へと移動することができなくなるためと説明できる

図 2-12 R100類縁のヌラスミドのTAMタンパク質のヌミノ酸配列の比較

R1	MAKVAHVSDIIVYKINKIKIVERRRRAEGAKSTVPSISITMLTELGLRVYEAQMERKESA
PSU233	MAKVNLVYISNDAYEKINAIIEKKRRQEGAREKDVFSATASMLTELGLRVYEAQMERKESA
P307	MAKVNLVYISNDAYEKINAIIEKKRRQEGAREKDVFSATASMLTELGLRVYEAQMERKESA
PSU316	MAKVNLVYISNDAYEKINAIIEKKRRQEGAREKDVFSATASMLTELGLRVYEAQMERKESA
F	MAKVNLVYISNDAYEKINAIIEKKRRQEGAREKDVFSATASMLTELGLRVYEAQMERKESA
R100	MAKVNLVYISNDAYEKINAIIEKKRRQEGAREKDVFSATASMLTELGLRVYEAQMERKESA
COLB4	MAKVNLVYISNVEHHEKINMIVKKRRQEGARDKDISLSTGTSASMLTELGLRVYEAQMERKESA
PED208	MPKIQTYVNNVVEQITDLYTIKKQEGIFE..ASLSNVSSMTLELGLRVYMIQEKREGG
51	
R1	FNQAEFNKTLTLCGVAKTQSTVAKILGIESLSPHVSGNPKFEYANMVEDIIDKVSSEMERFEPF
PSU233	FNQAEFNKTLTLCGVAKTQSTVAKILGIESLSPHVSGNPKFEYANMVEDIIDKVSSEMERFEPF
P307	FNQAEFNKTLTLCGVAKTQSTVAKILGIESLSPHVSGNPKFEYSNNVEDIRKVSSEMERFEPF
PSU316	FNQTEFNKTLTLCGVAKTQSTVAKILGIESLSPHVSGNPKFEYANMVEDIIDKVSSEMERFEPF
F	FNQTEFNKTLTLCGVAKTQSTVAKILGIESLSPHVSGNPKFEYANMVEDIIDKVSSEMERFEPF
R100	FNQTEFNKTLTLCGVAKTQSTVAKILGIESLSPHVSGNPKFEYANMVEDIIDKVSSEMERFEPF
COLB4	FNQTEFNKTLTLCGVAKTQSTVAKILGIESLSPHVSGNPKFEYANMVEDIIDKVSSEMERFEPF
PED208	FNQMEYNKTLTLENVSRVAFMCTEILKMSVLINQESIASGNFDDYAVIKPAIDKFAREQVSIFFEDDEDDQE

R100及びその類縁のヌラスミドの塩基配列から予想されるTAMのヌミノ酸配列を示す。他のヌラスミドのTAMと共通のヌミノ酸残基を網掛けで強調した。各TAM遺伝子の塩基配列は以下の論文から得た。Salazar et al., 1992 (PSU233) ; Lopez et al., 1991 (PSU316) ; Di Laurenzio et al., 1991 (PED208) ; Koronakis et al., 1985 (R1) ; Thompson and Taylor, 1982 (F) ; Finlay et al., 1986b (COLB4) ; Graus-Goldner et al., 1990 (P307) ; Fee and Dempsey, 1986 (R100) 。

(図2-13)。TraMタンパク質とTraDタンパク質などとの相互作用についての生化学的な知見は得られていないが、もしTraMタンパク質がTraDタンパク質と相互作用を持つのであれば、*oriT*領域を単に膜の近傍にというだけでなくDNAの通る孔の近傍に保持するという、より直接的な役割をTraMタンパク質は果たしていることになる。このTraMタンパク質とTraDタンパク質との相互作用は、ぜひとも解析すべき興味深い課題である。

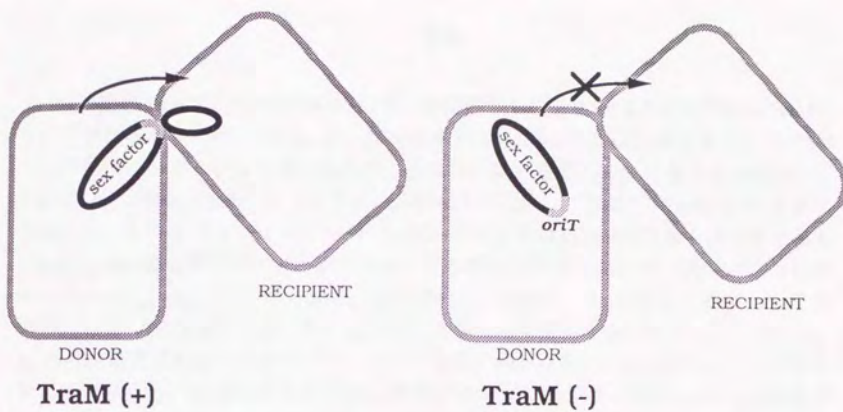


図 2-1-3 TraMのanchoring機能に関する模式図

TraMが存在すると (TraM(+))、*oriT*領域が膜近傍に保持されDNA伝達を開始するが、TraMが存在しないと (TraM(-)) *oriT*領域は膜近傍に固定されず、DNA伝達は開始されない。

### 第三章 *traM*遺伝子のプロモーター領域の解析

#### 要約

性決定因子R100の*traM*はDNAの伝達に直接関与し、その遺伝子産物であるTraMタンパク質は*traM*の上流、*sbmA*、*B*、*C*、*D*と名付けた四つの部位に結合する。TraMが自己の発現に与える影響を調べるため、*traM*の上流を段階的に欠失させた*traM*遺伝子の開始コドンにin frameになるように*lacZ*遺伝子を融合し、TraM<sup>-</sup>、TraM<sup>+</sup>の宿主菌に保持させ、そのβ-ガラクトシダーゼ (LacZ) 活性を指標に*traM*の発現を調べるとともに*traM*<sub>ATG</sub>-*lacZ*融合遺伝子の転写産物についての解析を行なった。その結果、二つのプロモーター*p*<sub>M1</sub>、*p*<sub>M2</sub>存在が示された。上流側の*p*<sub>M2</sub>は*sbmC*、*D*と重なって存在し、下流側の*p*<sub>M1</sub>は*sbmD*の下流に存在した。*p*<sub>M1</sub>は弱いが構成的に発現するプロモーターであり、*p*<sub>M2</sub>からの発現はTraMの存在下でその発現が完全に抑制され、またIHFによっても部分的に抑制された。TraM非存在下では*p*<sub>M2</sub>の方が強いプロモーターであった。*p*<sub>M2</sub>は接合伝達の直後や細胞増殖に伴いTraMの*oriT*領域に対する相対濃度が低下した際に必要量のTraMを発現するために働くと考えられる。IHFはTraMの発現の部分的な抑制がその第一義的な機能ではなく、TraMとともにDNA伝達に必要な機能を持つ複合体を形成する働きをするものと考えられる。

本章の内容は以下のように印刷、公表した。

"Repression of the *traM* gene of plasmid R100  
by its own product and integration host factor at one of the two promoters"  
*Journal of Bacteriology*, 175:4466-4474 (1993)

## 1. 序

第二章で決定したTraMの結合部位のうち *sbmC*、*D*はDempsey (1989) によってマップされた *traM* のプロモーターと重なっていた。このことはTraMが自身の発現を転写レベルで抑制する可能性を示唆する。*traM* は単独でオペロンを形成しており、*tra* 領域には *traM*、*traJ*、及び巨大な *traY-I* オペロンの三つの主要な転写単位が存在するが、*traJ* の発現がFinOP系によって、*traY-I* オペロンの発現がTraJによってそれぞれ制御されているのに対し、*traM* の発現に関してはTraJによって正に制御されるという結果がこれまでに報告されているのみであり、しかもそれと反する報告もあるなどその実体は不明である。

そこで本章では実際に自己抑制機構が存在するか、また、TraJタンパク質や他のタンパク質による制御が行なわれているのかを確認するために、*traM* 遺伝子のプロモーター領域の解析を行なった。解析の結果、*traM* の発現は自己抑制を受けること、TraJによって活性化されないことが明らかとなった。

## 2. 結果

### (1) *traM* のプロモーターの探索

*traM* 遺伝子のプロモーター領域を $\beta$ -ガラクトシダーゼ活性を指標として解析するために、*traM* の上流の様々な領域を*traM* 遺伝子の開始コドンがベクタープラスミド pR-pMLBの*lacZ* 遺伝子のコドンと読み枠が同じ (in frame) になるように融合した *traM*<sub>ATG</sub>-*lacZ* 融合遺伝子を運ぶプラスミド pABO215、49、216、217、218を構築した。得られたプラスミドが含む *traM* 遺伝子の上流領域の範囲、及びそこに存在する *sby*、*ihf*、*sbm* のそれぞれの部位の位置を図3-1に示す。これらの *traM*<sub>ATG</sub>-*lacZ* 融合遺伝子が発現して得られる TraM<sub>ATG</sub>-LacZ 融合タンパク質のアミノ酸配列は、インタクトな LacZ と全く同じである。これらの pABO プラスミドを *lacZ* の完全欠損株である宿主大腸

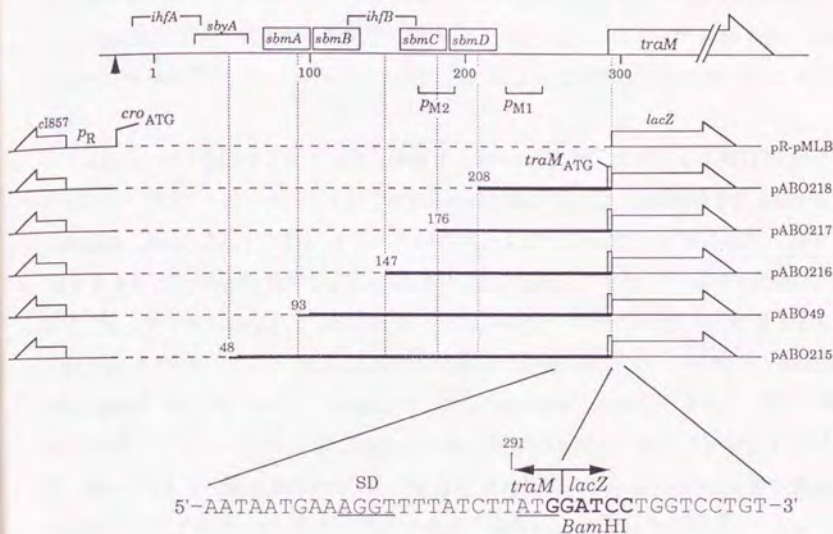


図3-1 プロモーターの検索に用いた *traM*<sub>ATG</sub>-*lacZ* 融合遺伝子の構造

最上部にR100の *oriT* (▲) から *traM* までの領域と、この領域内にマップされているタンパク質の結合部位を模式的に示す。 *ihfA*, *B* は IHF の結合部位、 *shyA* は TraY の結合部位、 *sbmA*, *B*, *C*, *D* は TraM の結合部位をそれぞれ示す。塩基番号は図1-4に従った。 *pM1*, *pM2* は本研究で明らかにした *traM* のプロモーターの位置である。中段には解析に用いたプラスミドの *traM*<sub>ATG</sub>-*lacZ* 融合遺伝子周辺の構造の模式図を示す。pR-pMLB は *traM*<sub>ATG</sub>-*lacZ* 融合遺伝子を作製するのに用いたベクタープラスミドである。d857、*p<sub>R</sub>*、*ATGcro* はそれぞれバクテリオファージλのリプレッサー *cl* の温度感受性変異遺伝子、*p<sub>R</sub>* プロモーター及び *cro* 遺伝子の開始コドン (ATG) であり、pR-pMLB 上の *lacZ* 遺伝子は *ATGcro* から翻訳されて発現する。図中の白抜きの矢印は遺伝子とその方向を表わす。各pABOプラスミドは太線で示した範囲をpR-pMLBの *ATGcro* の直後に存在する *Bam*HI 認識部位にクローニングして得た。最下部に示すのは *traM*<sub>ATG</sub> と *lacZ* との連結部分の塩基配列である。SD配列と *traM*<sub>ATG</sub> を下線で、*Bam*HI 認識部位を太文字でそれぞれ示す。

菌MC1000に保持させ、融合遺伝子が発現して産生される $\text{TraM}_{\text{ATG}}$ -LacZ融合タンパク質による $\beta$ -ガラクトシダーゼ (LacZ) 活性を測定することで、*in vivo*における $\text{traM}$ の発現の強さを調べた。これらのpABOプラスミドにおいては $\text{traM}_{\text{ATG}}$ の上流にpR-pMLB上に存在するバクテリオファージ $\lambda$ のプロモーター $p_R$ が位置するが、 $p_R$ からの転写は同じくpR-pMLBにコードされる温度感受性レプレッサーcI857によって抑制され、cI857が活性を保つ30℃においては挿入したDNA断片による転写活性のみを調べることができる。

これら一連のpABOプラスミドを保持するMC1000を30℃で培養し、菌体の $\beta$ -ガラクトシダーゼ活性を調べた (図3-2A)。その結果pABO217 (*sbm*領域を含まない)、pABO218 (*sbmD*のみを含む) は互いに同程度、しかしpR-pMLBよりは有意に高い $\beta$ -ガラクトシダーゼ活性を示し、pABO218が含む208番目の塩基から $\text{traM}$ の開始コドンまでの間、すなわち $\text{sbmD}$ と $\text{traM}$ 遺伝子との間にプロモーターが存在することが示され、これを $p_{M1}$ と名付けた。一方、pABO215 (*sbmC*と $\text{sbmD}$ を含む)、pABO49 (*sbmB*、*ihfB*、*sbmC*、 $\text{sbmD}$ を含む)、pABO216 (全ての $\text{sbm}$ 部位と*ihfB*とを含む) は更に高い $\beta$ -ガラクトシダーゼ活性を示した。この結果からpABO216にあってpABO217には存在しない147番目の塩基から176番目の塩基までの領域、すなわち $\text{sbmC}$ を含む領域にはさらに強いプロモーターの存在が示され、これを $p_{M2}$ と名付けた (図3-1)。

## (2) IHFは $p_{M2}$ からの発現を一部抑制する

$p_{M2}$ による $\text{traM}_{\text{ATG}}$ -lacZ融合遺伝子の発現が見られるpABO215、49、216のうち、pABO216はpABO49やpABO215よりも高い活性を示した (図3-2A)。pABO49やpABO215にはIHFの結合部位*ihfB*が存在するがpABO216には存在しない (図3-1)。これはIHFが*ihfB*に結合することで $p_{M2}$ による $\text{traM}_{\text{ATG}}$ -lacZ融合遺伝子の発現をある程度抑制することを示唆する。そこで、 $p_{M2}$ からの発現に対するIHFの影響を評価するため、MC1000のIHF欠損変異株TA1000を構築し、それを宿主として同様の解析を行なった。その結果、 $p_{M1}$ のみによって $\text{traM}_{\text{ATG}}$ -lacZ融合遺伝子を発現するpABO217、218、及び $p_{M1}$ 、 $p_{M2}$ は持つが*ihfB*を持たないpABO216の示す $\beta$ -ガラクトシダーゼ活性の値は

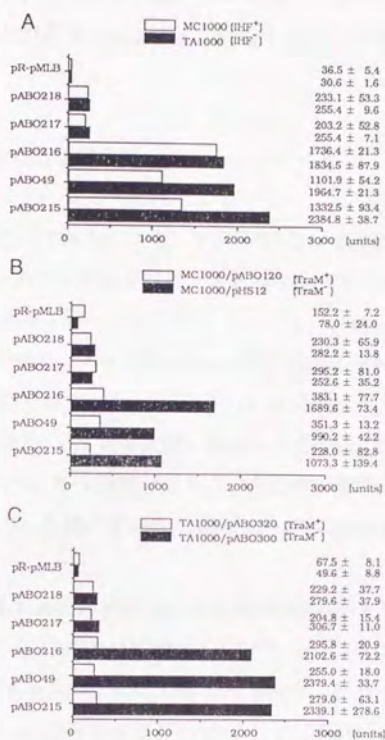


図3-2 TraM<sub>ATG</sub>-LacZ融合タンパク質の発現による  
β-ガラクトシダーゼ活性

各グラフの左側に示した *traM*<sub>ATG</sub>-*lacZ* 融合遺伝子を持つ pABO プラスミドまたは pR-pMLB を保持する宿主菌が 30℃ で示す β-ガラクトシダーゼ (LacZ) 活性を測定した。Miller (1972) による unit で求めた各々の LacZ 活性の値は三回以上の測定値の平均値であり、得られた平均値と標準偏差をグラフの右側に示す。各パネルで用いた宿主菌は以下の通り。

- A. MC1000 (IHF<sup>+</sup>)、(□) ; TA1000 (IHF<sup>-</sup>)、(■)  
 B. MC1000 / pABO120 (TraM<sup>+</sup>)、(□) ; MC1000 / pHS12 (TraM<sup>-</sup>)、(■)  
 C. TA1000 / pABO320 (TraM<sup>+</sup>)、(□) ; TA1000 / pABO300 (TraM<sup>-</sup>)、(■)

IHFの野生株、変異株どちらの細胞中でもほぼ同程度であるのに対してpABO215、49はIHF欠損株細胞中では野生株よりも高い $\beta$ -ガラクトシダーゼ活性を示し、IHFが*ihfB*に結合して $p_{M2}$ からの発現を約60%程度に抑制することが明らかとなった(図3-2A)。

### (3) TraMの $p_{M2}$ における自己抑制

$p_{M2}$ は $sbmC$ 、 $D$ と重なっており、ここにTraMが結合して発現を抑えることが予想された。これを調べるために共存するプラスミドからTraMタンパク質を供給して同様の解析を行なった。TraMタンパク質を供給するプラスミドは、大腸菌*lac*オペロンのプロモーターの下流にプロモーターを欠いた*traM*構造遺伝子を配し、それをpSC101の多コピー変異であるpHS12 (Armstrong et al., 1984) に挿入したプラスミドpABO120を用いた。pABO120の構築については第六章、材料と方法の項で述べる。pABO120においては*traM*は*lac*プロモーターから発現するため、自己抑制機構が存在してもその影響は受けず、Lacレプレッサーを持たない宿主菌MC1000中でTraMタンパク質を発現することが出来る。

pABO120を保持するTraM<sup>+</sup>のMC1000 (MC1000 / pABO120)、及び対照としてpHS12を保持するTraM<sup>-</sup>のMC1000 (MC1000 / pHS12) をそれぞれ宿主菌として、上記と同様にTraM<sub>ATG</sub>-LacZ融合タンパク質による $\beta$ -ガラクトシダーゼ活性を測定した(図3-2B)。その結果、 $p_{M1}$ のみを持つpABO217、218はTraM<sup>+</sup>、TraM<sup>-</sup>どちらの細胞中でも同程度の $\beta$ -ガラクトシダーゼ活性を示した。これは $p_{M1}$ からの発現はTraMタンパク質によって抑制されないことを示す。一方、 $p_{M1}$ 、 $p_{M2}$ 双方からTraM<sub>ATG</sub>-LacZ融合タンパク質が発現するpABO215、49、216の場合、TraM<sup>+</sup>の細胞中ではTraM<sup>-</sup>の細胞中に比べて示す $\beta$ -ガラクトシダーゼ活性が非常に低く、 $p_{M2}$ からの発現がトランスの位置から供給されるTraMによって抑制されることが示された。pABO215、49、216がTraM<sup>+</sup>の細胞中で示す $\beta$ -ガラクトシダーゼ活性はpABO217、218が示す値と同程度であり、 $p_{M2}$ からの発現はTraMタンパク質によってほぼ完全に抑制され、 $p_{M1}$ からの発現のみが行なわれているものと考えられる。また、pABO216においてTraMによる $p_{M2}$ か

らの発現の抑制が見られることから、この抑制は*sbmC*、*D*さえ存在すれば完全に行なわれ、*sbmA*、*B*、*ihfB*は必要ないことが示された。

IHFによって  $p_{M2}$  からの発現が部分的に抑制されることから、ここで観察された TraM の自己抑制が IHF の存在によって何らかの影響を受ける可能性が考えられた。そこで、MC1000 に代えてその IHF 欠損変異株である TA1000 を宿主として同様の解析を行なった。その際、pSC101 由来の pHS12 は複製に IHF を必要とするため TA1000 中では複製できず (Friedman, 1988)、この実験に用いることはできない。そこで IHF 欠損株中でも複製できる pACYC177 由来のベクタープラスミド pHY300PLK (Ishiwa and Shibahara-Sone, 1986) が運ぶテトラサイクリン耐性遺伝子とアンピシリン耐性遺伝子の内、後者を破壊したプラスミド pABO300 を構築し、それに pABO120 に挿入したのと同じ DNA 断片を挿入して pABO320 を得た。pABO300、pABO320 の構築については第六章、材料と方法の項で述べる。pABO320 を保持する TraM<sup>+</sup> の TA1000 (TA1000/pABO320)、及び対照として pABO300 を保持する TraM<sup>-</sup> の TA1000 (TA1000/pABO300) をそれぞれ宿主菌として上記と同様に、 $\beta$ -ガラクトシダーゼ活性を測定した (図 3-2C)。その結果、MC1000 を宿主とした際と同様、TraM<sup>+</sup> の細胞中で pABO215、49、216 が示す  $\beta$ -ガラクトシダーゼ活性は pABO217、218 が示す値と同程度であり、 $p_{M2}$  からの発現は TraM タンパク質によってほぼ完全に抑制されていた。この抑制の様子が MC1000 を宿主として用いたときと変わらないことから、TraM タンパク質による  $p_{M2}$  からの発現の抑制は IHF には依存せず、TraM タンパク質自身のみで完全に抑制されることが明らかとなった。

#### (4) $p_{M1}$ 、 $p_{M2}$ の位置の決定

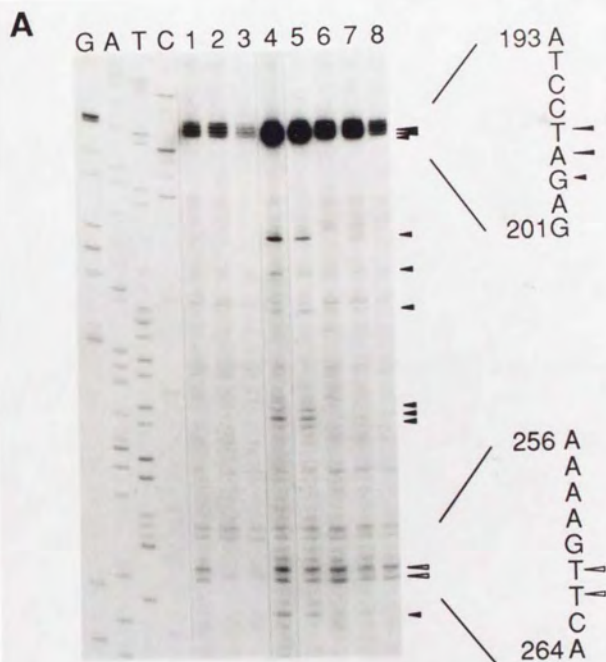
$p_{M1}$ 、 $p_{M2}$  の位置を決定するために、*traM*<sub>ATG</sub>-*lacZ* 融合遺伝子を  $p_{M1}$  から発現するプラスミド pABO217、及び  $p_{M1}$ 、 $p_{M2}$  双方から発現するプラスミド pABO215 を保持する MC1000 から RNA を調製し、*lacZ* 遺伝子にハイブリダイズするプライマー (プライマー M4 [Takara]、表 6-6) を用いて逆転写酵素 (reverse transcriptase) によるプライマー伸長反応を行なって転写開始点を調べた。MC1000/pABO217 から得た RNA につい

て行なったところ、プラスミドを保持しないMC1000、またはMC1000/pR-pMLBでは見られない伸長反応物が見られ（図3-3、レーン1～3；伸長反応物のバンドはゲルの右に△で示す）、その塩基配列上で対応する位置（塩基番号261及び262；図3-4に▽で示す）からこれが $p_{M1}$ からの転写産物によるものであると考えられた。その転写開始点から、 $p_{M1}$ は図3-4に示す位置に存在すると考えられた。MC1000/pABO215を用いて行なったところ、 $p_{M1}$ からの転写産物に由来する伸長反応物の他に、より長い伸長反応物が見られた（図3-3、レーン4；伸長反応物のバンドはゲルの右に▲で示す）。そのうち最も強いシグナル（図3-3の大きい▲）の塩基配列上で対応する位置（塩基番号197及び198；図3-4に▼で示す）からこれが $p_{M2}$ からの転写産物によるものであると考えられた。その転写開始点から、 $p_{M1}$ は図3-4に示す位置に存在すると考えられた。

TraM存在下での $p_{M1}$ 、 $p_{M2}$ からの転写産物を調べるために、pABO215または217にpABO120またはpHS12を共存させ、同様の解析を行なったところ、全てのレーンで $p_{M1}$ からの転写産物に由来するシグナルが見られた（図3-3、レーン5～8）。しかしMC1000/pABO215+pABO120（図3-3、レーン7）では $p_{M2}$ からの転写産物に由来するシグナルはMC1000/pABO217+pHS12（図3-3、レーン6）と比較してほとんど同じ程度にまで弱くなっていた。これは $\beta$ -ガラクトシダーゼ活性を指標にして行なった際に得られた結果と一致し、ここで調べた転写産物が $p_{M1}$ 、 $p_{M2}$ から転写されたものであることを確認できた。また、この結果、TraMタンパク質による $p_{M2}$ からの発現の抑制が転写レベルで行なわれていることが明らかとなった。

#### (5) TraMタンパク質はシスの位置に存在する自身のプロモーター $p_{M2}$ からの発現を抑制する

ここまでの解析でトランスの位置から供給したTraMタンパク質が $traM_{ATG-lacZ}$ 融合遺伝子の発現を抑制することが確認できたので、次に、元のプラスミドFR100上で実際に $traM$ 遺伝子が発現するのと同じ条件、すなわち、 $traM$ 遺伝子がシスの位置にある $p_{M1}$ 、 $p_{M2}$ から発現してTraMタンパク質を生産するときの $p_{M1}$ 、 $p_{M2}$ からの転写産物の状態を調



**B** GATC 1 2 3 4 5 6 7 8

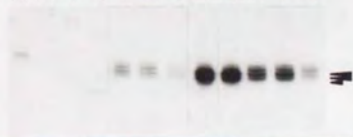


図3-3 *traM<sub>ATG</sub>-lacZ*転写産物に対するプライマー伸長法

A. <sup>32</sup>P標識されたプライマー-M4を用いてプライマー伸長法を行ない、得られた逆転写反応産物を8%シーケンシングゲルにて電気泳動し、乾燥後オートラジオグラフィにて視覚化した。RNAを調製する際に用いた宿主菌は全てMC1000であり、MC1000 / pABO217 (レーン1)、プラスミドを持たないMC1000 (レーン2)、MC1000 / pR-pMLB + pHS12 (レーン3)、MC1000 / pABO215 (レーン4)、MC1000 / pABO215 + pHS12 (レーン5)、MC1000 / pABO217 + pHS12 (レーン6)、MC1000 / pABO215 + pABO120 (レーン7)、MC1000 / pABO217 + pABO120 (レーン8) から調製したRNAに対してプライマー伸長法を行なった。*p<sub>ABO</sub>*からの転写産物由来のバンドを▽、*p<sub>ABO</sub>*からの転写産物由来のバンドを▼でそれぞれ示す。*p<sub>ABO</sub>*からの転写産物由来で最も長く、またシグナルの強いバンド二つを大きい▼で示す。右側に主なバンドの塩基配列上に対応する位置を抜き書きして示す。塩基番号は図1-4に従った。GATCはDNA鎖長を求めるためのマーカーに用いたシーケン斯拉ダーであり、プライマー伸長法に用いたのと同じ5'末端を<sup>32</sup>P標識したM4プライマーを用いてpABO215 DNAをテンプレートとしてdideoxy法にて調製した。B. 上のパネルAの図のうち、宿主菌によるものと考えられるバックグラウンドのバンドと重なってまぎらわしい領域 (大きい▼で示したバンドの周辺) を、露光時間を短くしてオートラジオグラフィを行なった。



べた。*traM*を含むDNA断片を含む3種類のプラスミドpSI87-XE1、pSI87-ES3、pSI87-XS5 (Inamoto et al., 1988) (図3-5B)を保持する大腸菌JM109からRNAを調製し、*traM*構造遺伝子の5'末端付近にハイブリダイズする*traMRV*プライマー(図3-4)を用いてプライマー伸長法を行なった。*traM*の上流領域からその構造遺伝子の途中までを含むプラスミドpSI87-XE1を保持するJM109から調製したRNAを用いたところ、 $P_{M1}$ 、 $P_{M2}$ 双方からの転写産物によるシグナルが確認できた(図3-5A、レーン1)。*traM*の上流領域からその構造遺伝子全てを含み、TraMタンパク質を生産できるプラスミドpSI87-ES3を用いたところ、 $P_{M2}$ からの転写産物が示すシグナルの強度は非常に弱くなっていた(図3-5A、レーン2)。用いた3種のプラスミドを保持しない、もしくは*traM*の上流領域を持たないプラスミドpSI87-XS5を保持するJM109のRNAによってはこれらのシグナルは見られなかった。以上の結果から*traM*遺伝子の発現には、TraMタンパク質が自身のプロモーター $P_{M2}$ を抑制する自己抑制機構が存在することが示された。

#### (6) TraJは*traM*の発現に影響を与えない

*traY-I*オペロンの転写を活性化する正の制御因子であるTraJタンパク質が*traM*の発現をも制御するという考えがあった。そこでTraJが*traM*の発現に与える影響を調べるために、pABO300に*traJ*構造遺伝子をクローニングしてTraJタンパク質を発現するように構築したプラスミドpTAKI301 (Taki et al., unpublished result)を保持するMC1000 (MC1000/pTAKI301)をTraJ<sup>+</sup>の宿主、MC1000/pABO300をTraJ<sup>-</sup>の宿主として用い、TraM<sub>ATG</sub>-LacZ融合タンパク質によるβ-ガラクトシダーゼ活性を測定した。その結果TraJは*traM*の発現に影響を与えないことが明らかとなった(図3-6)。

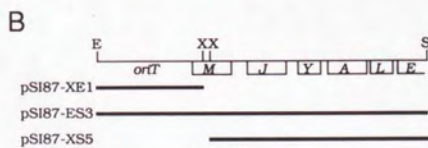
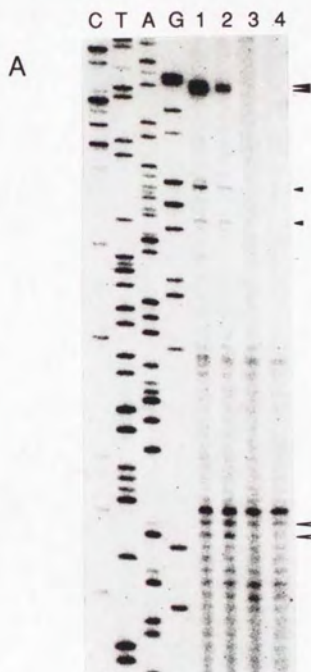


図 3-5 *traM*転写産物に対するプライマー伸長法

A. pSI87-XE1 (レーン1)、pSI87-ES3 (レーン2)、pSI87-XS5 (レーン3) 及びプラスミドを持たない (レーン4) 宿主菌JM109から調製したRNAに対し、5'末端を<sup>32</sup>P標識した*traMRV*プライマーを用いてプライマー伸長法を行なった。 $P_{3M}$ からの転写産物由来のバンドを▽、 $P_{3E}$ からの転写産物由来のバンドを▼でそれぞれ示す。 $P_{3E}$ からの転写産物由来で最も長く、またシグナルの強いバンド二つを大きい▼で示す。CTAGはDNA鎖長を求めるためのマーカーに用いたシークエンスラダーであり、同じ5'末端を<sup>32</sup>P標識した*traMRV*プライマーを用いて、pSI87-XE1 DNAをテンプレートとしてdideoxy法にて調製した。

B. R100の*onT*領域及び*traM*から*traE*の途中までの制限酵素地図と、pSIプラスミドが含む領域を模式的に示した。各pSIプラスミドは太線で示した領域をpUC19にクローニングしたものである。*tra*遺伝子は白抜きの中斜字体で示した。E、X、Sはそれぞれ*EcoRI*、*XmnI*、*SmaI*の認識部位である。

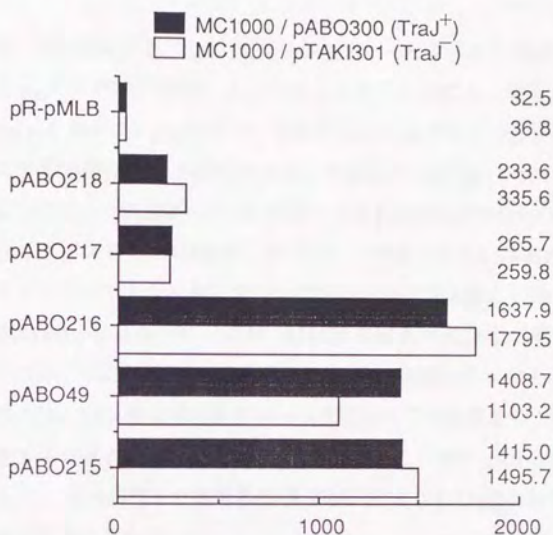


図 3-6 *traM*の発現に対するTraJの影響

TraM<sub>ATG</sub>-LacZ融合タンパク質の発現によるβ-ガラクトシダーゼ活性を指標に*traM*の発現に対するTraJの影響を調べた。各グラフの左側に示した*traM*<sub>ATG</sub>-*lacZ*融合遺伝子を持つpABOプラスミドまたはpR-pMLBを保持する宿主菌が30℃で示すβ-ガラクトシダーゼ(LacZ)活性を測定した。用いた宿主菌はMC1000/pTAKI301 (TraJ<sup>+</sup>) (■)、及びMC1000/pABO300 (TraJ<sup>-</sup>) (□)である。

### 3. 考察

#### (1) *traM*の二つのプロモーターの位置の決定

本研究により、*traM*遺伝子が、 $p_{M1}$ 、 $p_{M2}$ の2つのプロモーターから発現することが明らかとなった。 $p_{M1}$ の存在は本研究によってはじめて明らかになったものである。また、 $p_{M2}$ はDempsey (1989) によってマップされたものとおそらく一致するものであるが、彼の報告した転写開始点は本研究で決定した位置の5 bp上流にマップされていた。Dempseyは転写開始点の決定に、*in vivo*において放射標識したRNAに対してDNAプローブをハイブリダイズさせ、RNaseによる消化から保護されたRNA鎖の鎖長を7M尿素を含むポリアクリルアミドシークエンシングゲルでの電気泳動にて調べる、いわゆるRNase protection assayを行なっているが、RNA鎖の鎖長を決定する際に、MaxamとGilbert (1980) の方法で化学的に調製したDNAラダーを指標に用いている。一般的に用いられる条件では、RNA鎖は同じ長さのDNA鎖に比べ5 %程度遅くシークエンシングゲル中を移動することが知られており (Sambrook et al., 1989)、もしこれを考慮にいれて補正すると、彼の報告した転写開始点は本研究で示した $p_{M2}$ からの転写開始点と同じ位置であると考えられる。

#### (2) *traM*の発現の抑制機構とその意味

TraMタンパク質は $p_{M2}$ からの転写を抑制し、この自己抑制によって細胞内のTraMタンパク質量は一定に保たれていると考えられる。 $p_{M1}$ からの転写はおそらくプロテアーゼによる分解など自己抑制機構では調節できない程度のTraMタンパク質のわずかな減少を補っているのであろう。それに対して $p_{M2}$ からの転写は、DNA伝達をうけた受容菌細胞内や、細胞分裂に伴い細胞の体積が増加した際など、細胞内のTraMタンパク質濃度が大きく低下した場合に抑制が解除され、DNA伝達に必要なだけのTraMが速やかに生産されるのであろう。接合伝達によってR因子を受け取った受容菌が、その直後一時的に高い接合伝達能を示すHFRT (High frequency R transfer) という現象が

ある (Harada et al., 1977)。これは、Traタンパク質の発現を抑制する働きを持つ FinOP系の発現が充分でない間に *traY-I* オペロンの転写が行なわれてTraタンパク質が発現するために起こると考えられているが、これが高い伝達能を示すためには *traY-I* オペロンとは独立に転写されるTraMの生産も速やかに行なわれる必要があり、それは  $p_{M2}$  からの転写の自己抑制の解除によって実現されるのであろう。

TraMタンパク質による  $p_{M2}$  からの転写の抑制は、 $p_{M2}$  が *sbmC*、*D* と重なるためにここに結合したTraMタンパク質がRNAポリメラーゼの  $p_{M2}$  への結合を物理的に妨害することによるものと考えられる。 $p_{M2}$  からの転写はIHFによっても約60%にまで抑制されたが、IHFの結合部位 *ihfB* は  $p_{M2}$  に隣接して存在しており、ここに結合したIHFがRNAポリメラーゼの  $p_{M2}$  への結合を部分的に阻害するものと考えられる。DempseyとFee (1990) はIHF<sup>-</sup>の菌株では *traM* の発現が抑制されると報告しているが、本研究で得られた結果はそれとは一致しない。彼らは *traM* にクロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ (*cat*) 遺伝子を連結し、IHF<sup>+</sup>、IHF<sup>-</sup>の菌株に保持させてクロラムフェニコール濃度の異なるプレート上でのコロニー形成能を調べ、どの濃度まで耐えられるかによって *cat* 遺伝子の発現を評価している。しかし、IHFの欠損はpleiotropicな効果を示すため、彼らの結果は *traM* の発現に対するIHFの効果のみを直接調べているとはいえず、本研究で行なったようにプロモーター領域の欠失を利用したり、また、直接CAT活性を測定するなどして詳しく解析する必要があると考えられる。

*traY-I* オペロンの転写を活性化する正の制御因子であるTraJタンパク質が *traM* の発現にどのような影響を与えるかについては、これまでに二通りの結果が報告されている。Gaffneyら (1983) は *lacZ* 遺伝子を *traM* 構造遺伝子中に挿入した解析からTraJタンパク質が *traM* の発現を活性化すると報告しており、一方MullineauxとWillets (1985) は *galK* をレポーターに用いた系による解析から、*traM* の発現がTraJタンパク質には影響を受けないと報告している。本研究で得られた結果はMullineauxとWilletsの報告と一致する。

IHFが *traM* の発現を抑制したのは興味深い結果である。しかし、この部分的な抑制が *ihfB* に結合したIHFの第一義的な機能であるとは考えにくい。*oriT* 領域には *traM* の自己抑制に関与する *sbmC*、*D* の他に、抑制には必要とされないTraMの結合部位 *sbmA*、

*B*も存在し、*ihfB*は*sbmA*、*B*と*sbmC*、*D*との間に位置する（図3-1）。*ihfB*に結合したIHFはその両側に結合したTraMタンパク質と共にこの領域に高次の構造体を形成し、それがDNA伝達に必要なのであろう。*oriT*のすぐ近傍にはもう一つのIHFの結合部位*ihfA*が存在する。*ihfA*はTraIの認識部位*sbi*とTraYの結合部位*sbyA*との間に位置し（図3-1）、そこに結合したIHFは、ニッキング反応を触媒するTraIタンパク質とそれを補佐するTraYタンパク質との相互作用を助け、*oriT*に効率的にニックを導入する装置である*oriT*-someを形成するものと考えられている。*ihfB*においてもそれと同様に、TraMの機能の発揮に必要な構造にIHFが関与していると考えられる。

## 第四章 *oriT*領域の構造と機能

### 要約

R100の接合伝達開始点 $oriT$ のすぐ近傍にはTraI、IHF、TraYが結合する領域が存在し、そこには $oriT$ にニックを入れるのに必要な複合体 $oriT$ -someが形成され则认为られている。それに隣接した領域にはTraMの結合部位 $sbmA$ 、 $B$ 、 $C$ 、 $D$ が存在し、 $sbmB$ と $C$ の間にはIHFの結合部位 $ihfB$ が存在する。この領域（TraM-IHF-TraM領域）に様々な変異を導入し、 $oriT$ プラスミドのR100による可動性を指標に各結合部位の接合伝達における機能を解析した。TraM-IHF-TraM領域を完全に欠失すると接合伝達は行なわれず、個々の $sbm$ 部位及び $ihfB$ に変異を導入すると伝達効率が低下したことから、高効率の接合伝達にはTraM-IHF-TraM領域が完全な形で存在することが必要であることが示された。 $ihfB$ の変異による伝達効率の低下は、ここに結合するIHFがTraM-IHF-TraM複合体の形成に関与し、それが高効率のDNA伝達を可能にしていることを示唆する。一方、 $ihfA$ に変異を導入しても伝達効率は低下した。これは $ihfA$ に結合するIHFが $oriT$ -someの形成に関与し高効率のDNA伝達を可能にするとの仮説を支持する。また、 $sbyA$ と $sbmA$ との間に挿入変異を導入したところphasing効果が見られ、 $oriT$ -someとTraM-IHF-TraM複合体との間に高次構造の形成における立体配置的な相互の関連、おそらくはタンパク質間の相互作用が存在することが示唆された。

## 1. 序

接合伝達開始点 $oriT$ の周辺領域( $oriT$ 領域)は、接合伝達において、ニックの導入、二本鎖DNAの巻戻しとそれによって生じる一本鎖DNAの受容菌への伝達及び完了といった一連の反応が行なわれる場であり、DNAが伝達されるために必要なシスのエレメントである。 $oriT$ 領域にはTraIタンパク質の認識部位( $sbi$ )、IHF、TraY各タンパク質の結合部位( $ihfA$ ,  $sbyA$ )が存在する。これらに加えてTraMタンパク質の結合部位( $sbmA \sim D$ )、IHFのもう一つの結合部位( $ihfB$ )の存在が本研究で示されたことで、 $oriT$ 領域には接合伝達に必要なタンパク質の認識、結合部位が整然と並んで存在することが明らかになった(図4-1、図4-2)。最近R100と類縁のプラスミドであるFやR1の $oriT$ 領域がR100とよく似た構造をとることが確認されており(Schwab et al., 1991; Di Laurenzio et al., 1992)(図4-1)、F型プラスミドの接合伝達における $oriT$ 領域のこの構造の重要性が認識されてきている(総説: Ippen-Ihler and Skurray, 1993)。 $oriT$ にニックを導入する活性を持つのはTraIであり、*in vitro*においてはTraIのみでニックを導入できることが確認されている(Matson and Morton, 1991; Reygers et al. 1991; Fukuda and Ohtsubo, unpublished result)。しかしTraYとIHFとが共存することでニッキング活性の効率が上がること(Inamoto et al., 1991)、実際のDNA伝達にはTraYが必須であることから、*in vivo*においては $sbi$ 、 $ihfA$ 、 $sbyA$ にTraI、IHF、TraYが結合することにより $oriT$ に効率的にニックを導入する装置、 $oriT$ -someが形成されることが接合伝達に必要であると考えられている(Inamoto et al., 1991)。一方 $sbmA$ 、 $B$ 、 $ihfB$ 、 $sbmC$ 、 $D$ の領域(TraM-IHF-TraM領域)は、第二章で考察したように、TraMタンパク質がDNAの膜通過装置の近傍に $oriT$ 領域を保持するのに重要な役割を果たすものと考えられる。本章では $oriT$ 領域内に存在するタンパク質の結合部位のDNA伝達における機能を解析する目的で、これらの部位に様々な変異を導入してDNA伝達能に及ぼす影響を調べることにより、 $oriT$ 領域の構造と機能についての解析を行なった。

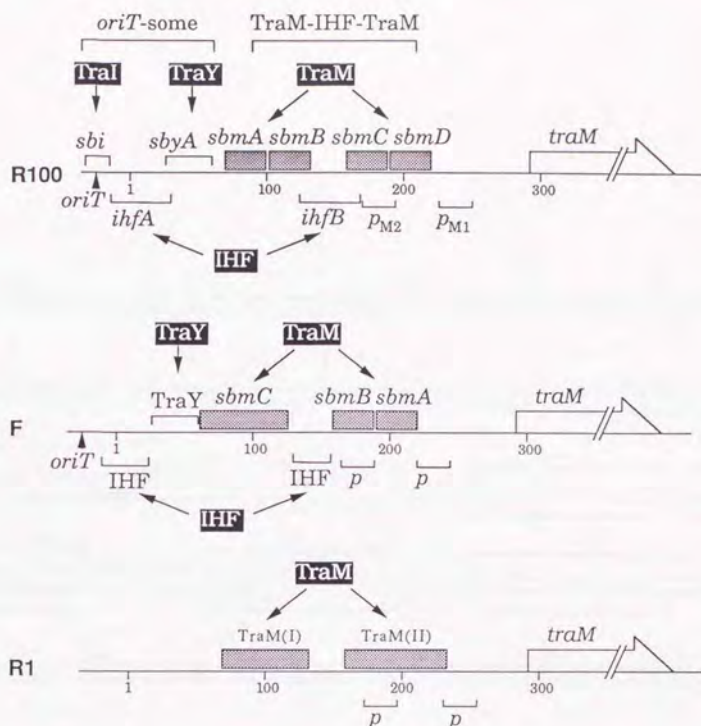


図 4-1 *oriT*領域の模式図

これまでに判明しているR100、F、R1の*oriT*領域内に存在するタンパク質の結合、認識部位を模式的に示した。上からR100、*oriT*はDNA伝達開始点、*sbm*は*TraI*の認識部位、*shyA*は*TraY*の結合部位 (Inamoto and Ohtsubo, 1990)、*ihfA*及び*ihfB*はIHFの結合部位、*sbmA*、*B*、*C*、*D*は*TraM*の結合部位、*P<sub>M2</sub>*、*P<sub>M1</sub>*は*traM*のプロモーター；F、*oriT*はDNA伝達開始点 (Matson and Morton, 1991；Reygers et al., 1991)、*TraY*は*TraY*の結合部位 (Nelson et al., 1993)、IHFはIHFの結合部位 (Tsai et al., 1990)、*sbmA*、*B*、*C*は*TraM*の結合部位 (Di Laurenzio et al., 1992)、*p*は予想される*traM*のプロモーター；R1、*TraM*(I)、(II)は*TraM*の結合部位 (Schwab et al., 1991)、*p*は*traM*のプロモーター (Schwab et al., 1993)を示す。それぞれの部位に作用するタンパク質を白抜きで示した。塩基番号はそれぞれ非相同領域の始まりを1とした。R100については*sbm*、*ihfA*、*shyA*の領域には*oriT*にニックを入れる装置である*oriT*-someが形成され则认为られるのでその旨示し、また、*sbm*及び*ihfB*からなる領域は、その配置からTraM-IHF-TraM領域とした。



図 4-2 *oriT* 領域の塩基配列

本研究の結果も含め、これまでに判明している *oriT* 領域内に存在するタンパク質の結合、認識部位を塩基配列上に示した。*oriT* は、DNA 伝達開始点、*sbi* は TraI の認識部位 (Fukuda, unpublished result)、*sbyA* は TraY の結合部位 (Inamoto and Ohtsubo, 1990)、*ihfA* 及び *ihfB* は IHF の結合部位、*sbmA*、*B*、*C*、*D* は TraM の結合部位、 $p_M$ 、 $p_{\lambda M}$  は *traM* のプロモーターである。*geneX* は機能不明の ORF である。塩基番号は図 1-4 に従った。

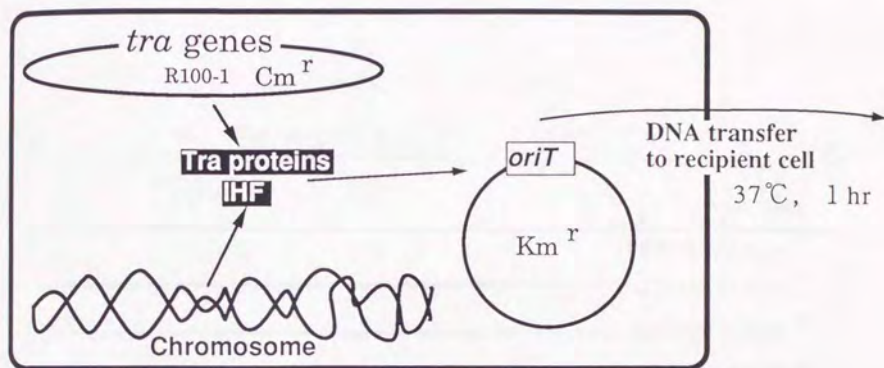
## 2. 結果

### (1) *oriT*プラスミド伝達系の構築

R100は約90 kbの大きなプラスミドであり、この*oriT*領域に部位特異的な変異を導入することは困難である。そこで、*oriT*領域を持った小型のプラスミドを作製し、R100-1の存在下でTraタンパク質をトランスに供給することによってそれらのプラスミドを伝達させる系（図4-3）の構築を試みた。R100-1はR100の*finO*変異体であり、伝達抑制機構が解除されているため、元のR100の1000倍程度（Fと同程度）の伝達効率を示す（Yoshioka et al., 1987; Womble et al., 1988）。この系を用いることにより、*oriT*領域に系統的に導入した変異が伝達能にどのような影響を受けるかを調べることができるものと考えられた。

まず、*oriT*領域を含むDNA断片をカナマイシン耐性（Km<sup>r</sup>）のベクタープラスミドpHSG299（Takeshita et al., 1987）にクローニングすることにより、いくつかの*oriT*領域を持ったプラスミド（*oriT*プラスミド）を得、これらの*oriT*プラスミドをNM554/R100-1（R100-1を保持する大腸菌NM554）に導入した。受容菌として大腸菌DH1から分離したリファンピシン耐性（Rif<sup>r</sup>）株であるDH1Rifを用いれば、接合伝達によりプラスミドを受け取った菌（transconjugant）の内*oriT*プラスミドが伝達されたものはRif<sup>r</sup>、Km<sup>r</sup>のコロニーとして選択することができる。また、R100-1が伝達されたtransconjugantはRif<sup>r</sup>とクロラムフェニコール耐性（Cm<sup>r</sup>）で選択できる。

R100などのF型プラスミドには*oriT*の*tra*遺伝子とは反対側、すなわち接合伝達において最初に受容菌へと移動する領域（leading region）に*tra*遺伝子とは反対方向の機能不明のORFである*geneX*（Dempsey and Fee, 1990; Koraimann et al., 1993）が存在する（図4-2）。この*geneX*から*traE*の途中までの約6 kbの*oriT*を含むDNA断片を運ぶ*oriT*プラスミドpABO401の伝達効率は $1.7 \times 10^{-2}$ であり（図4-4）、これはR100-1とは同じ値であった。それに対してpHSG299は伝達されないことから、pABO401上の断片に伝達活性があることが示された。この伝達活性は*geneX*から*traM*の途中までの断片にも見られた（図4-4、pABO421）。*sbi*から*traM*構造遺伝子の直前までの領域



$$\text{Mating efficiency} = \frac{\text{transconjugant}}{\text{donor}}$$

図4-3 *oriT*プラスミドの接合伝達解析系

宿主菌（供与菌）には大腸菌NM554を用いた。*oriT*と記した白抜き四角は、カナマイシン耐性（ $Km^r$ ）プラスミドpHSG299にクローニングした*oriT*領域を含む様々なR100由来のDNA断片を示す。供与菌細胞内に共存するR100-1はR100の*finO*変異によって抑制が解除され、Traタンパク質が大量に生産される脱抑制変異体である。R100-1から供給されるTraタンパク質、宿主菌から供給されるIHF（及び未知の宿主因子）の働きにより*oriT*プラスミドが伝達される。*oriT*プラスミドの伝達は $Km$ 耐性が伝達されることで知ることができる。

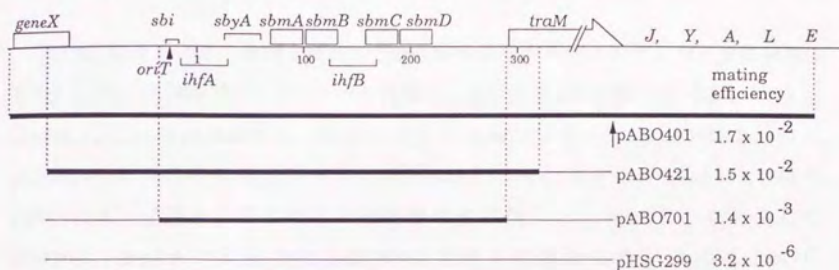


図 4-4 R100のoriT領域を含むDNA断片をクローニングした  
oriTプラスミドの接合伝達効率

上にoriT領域内に存在する各結合、認識部位、*geneX*、及び*tra*遺伝子の一部を模式的に示す。  
pHSG299はR100由来のDNA断片を持たないコントロールのプラスミドである。太線はpABOプラスミドがもつR100由来のDNA断片の範囲を示す。プラスミド名の右にその伝達効率を示す。

を含む断片（図4-4、pABO701）ではその伝達活性は低下した。これらの結果はpABO421の持つ領域があれば伝達が行なわれること、また、その領域のうちpABO701が持たない部分、おそらくは*oriT*と*geneX*との間のleading regionに何らかの接合伝達の効率を高める働きがあることを示している。この結果、pABO421及びpABO701が十分な伝達効率を示すことが明らかとなった。これ以降はpABO421、pABO701をもとに様々な解析を行なった。

## (2) TraM-IHF-TraM領域はDNA伝達に必要とされる

pABO701をもとに、*sbj*側を固定して*traM*側の領域から個々のタンパク質結合部位を欠失した*oriT*領域を持つプラスミドを作製し、その伝達効率を調べた（図4-5）。*sbmD*を欠失したpABO731と、*sbmD*に加えて*sbmC*を欠失したpABO741は、共にpABO701の約半分の伝達効率を示した。*ihfB*までを欠失するが*sbmA*と*B*を持つpABO751は、伝達されるもののその効率は更に低下し、*sbmB*までを欠失したpABO761、*sbmA*まで欠失したpABO771は伝達されなかった。このことからTraM-IHF-TraM領域のうち*sbmA*と*B*さえ存在すればDNAは伝達されるがその効率は低く、それが高効率で行なわれるためには完全な形のTraM-IHF-TraM領域が必要であることが示された。

次に、TraM-IHF-TraM領域内の個々の結合部位の役割を知るために、塩基置換変異を導入した*oriT*領域を持つプラスミドを作製してその伝達効率を調べた（図4-6、図4-7）。第二章で述べたように、四つの*sbm*部位には15 bpからなる共通配列が存在し、これがTraMによる認識配列であると考えられる。そこで*sbm*部位については、各*sbm*部位の15 bpの共通配列に対して基本的にはトランスポージョン変異になるように、そして一部に制限酵素部位が含まれるように塩基置換変異（図4-8）を導入した。また、*ihfB*については、これまでに報告されているIHFの結合部位に見られる共通配列（Friedman, 1988）に対して同様に塩基置換（図4-8）を導入した。

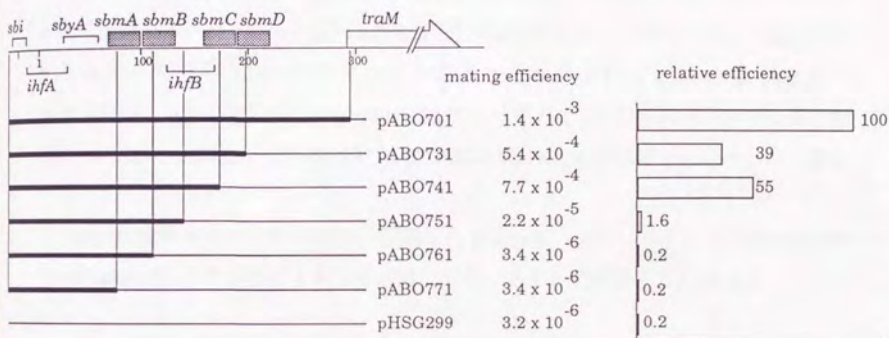


図4-5 pABO701の*oriT*領域を*traM*側から順次欠失したプラスミドの接合伝達効率

上に*oriT*領域内に存在する各結合、認識部位、及び*traM*遺伝子を模式的に示す。太線は各pABOプラスミドがもつR100由来のDNA断片の範囲を示す。pHSG299はR100由来のDNA断片を持たないコントロールのプラスミドである。プラスミド名の右にその伝達効率を示し、pABO701の伝達効率を100とした伝達効率の相対値をグラフに表わした。

*sbmA*~*D*それぞれに変異を持つプラスミドpABO421MA、MB、MC、MDについてその伝達を調べたところ、どのプラスミドにおいてもDNA伝達の効率は低下した(図4-6)。この結果はどの*sbm*部位もそれぞれ高効率のDNA伝達に必要なことを示す。特に、*sbmA*に変異を持つpABO421MAの伝達効率の低下は著しく、その効率は親プラスミドpABO421の約1%であった。それに対し、*sbmB*、*C*、*D*それぞれに変異を持つpABO421MB、MC、MDの伝達効率はpABO421の約半分であった。*sbmA*への変異の導入がDNA伝達効率を大きく低下させたことは、ここに結合するTraMタンパク質が特に重要であることを示唆する。

*oriT*領域に存在する二つのIHF結合部位*ihfA*、*ihfB*に変異を持つプラスミドについてその伝達を調べたところいずれもDNA伝達の効率は低下し(図4-7)、各*ihf*部位がそれぞれ高効率のDNA伝達に必要なことが示された。*ihfA*に変異を持つpABO421F5、*ihfB*に変異を持つpABO421F1は、いずれもpABO421の約1%の伝達効率を示し、*ihfA*、*ihfB*双方に変異を持つpABO421F15はほとんど伝達されなかった(図4-7)。

*sbyA*に変異を持つpABO421Y2は伝達されなかった(図4-6)。これは*oriT*領域に*oriT*-someが形成されることが接合伝達に必要なこととの仮説を支持する。

### (3) *oriT*-some領域とTraM-IHF-TraM領域との関係

TraM-IHF-TraM領域と*oriT*-some領域との関係を調べるために*sbyA*と*sbmA*との間に5 bpまたは10 bpからなる塩基配列の挿入を持つプラスミドを作製し、その伝達効率を調べた(図4-9)。その結果、5 bpの配列の挿入を持つpABO421G5では伝達効率がpABO421の約1%にまで低下したが、10 bpの配列の挿入を持つpABO421G10ではその低下は約10%にとどまった。このことはTraM-IHF-TraM複合体と*oriT*-someとの間の距離にphasing効果が見られることを示す。

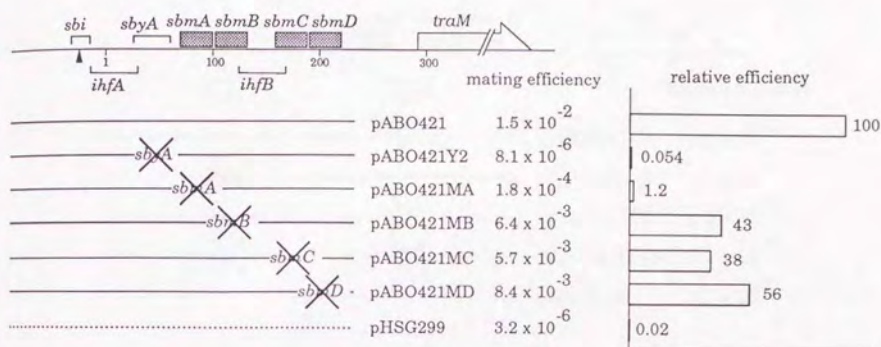


図4-6 pABO421の*oriT*領域中の*sbm*、*sbj*部位に変異を導入したプラスミドの接合伝達効率

上に*oriT*領域内に存在する各結合、認識部位、及び*traM*遺伝子を模式的に示す。各pABOプラスミドはpABO421に対して図中に示す部位に塩基置換変異を導入して得た。pHSG299はR100由来のDNA断片を持たないコントロールのプラスミドである。プラスミド名の右にその伝達効率を示し、pABO421の伝達効率を100とした伝達効率の相対値をグラフに表わした。

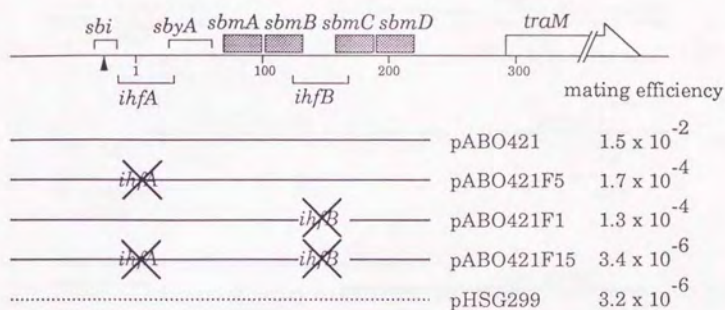


図 4-7 pABO421の*oriT*領域中の*ih*部位に変異を導入したプラスミドの接合伝達効率

上に*oriT*領域内に存在する各結合、認識部位、及び*traM*遺伝子を模式的に示す。各pABOプラスミドはpABO421に対して図中に示す部位に塩基置換変異を導入して得た。pHSG299はR100由来のDNA断片を持たないコントロールのプラスミドである。プラスミド名の右にその伝達効率を示す。

```

GCTTCGCAGATCCCATTATAAACATCAGGCAGATTGCTAACATCCATTTTTCATTTTT -121
CGAAGCGCTAGGGTAAATATTGTAGTCCGTCTAACGATTGTAGGTAAAAAAGTA
<-- geneX
P11*-->

CCACCTCTGGTGACTTTATCCGTAAATAATTTAACCCTCCACAAAAAGGCTCAACAGG -61
sbi
TGTGGTGGTTCTCACCACCAAAAGCACCACACTACGCAAAAACAAGTTTTTGTGTGATTT -1
P12*-->
oriT
ihfA
sbyA
-->nonconserved
ACGTTTTAAATCATGTAATTAACAAACGCTATTATATTTAATAATTCGAATTATATAA 60
<--*P15 <--*A11
ggatccGTctgcAg atcgatATAAagCTtAATgtTaAc
(F5, F15) (Y2)

sbmA sbmB
TAGAGAGTCGTTGGCGATCCTGTTACGACCTATAGCGACTCTTATTAGGATCAGTACTG 120
<--*P17 <--*P8
(G5) CTCGA agctgctatcaaagc gcattgatagcagc
CCATGGACTA (MA) (MB)
(G10)

ihfB sbmC
ACAATTTTCATGAAAAACATTGATATATATTAGGGACGCCCCCTAGCGCCGATCGCATTT 180
<--*A12 <--*A13
t (MB) tctAgaAgatc gctttgatagcagc
(F1, F15) (MC)

-10pM2 sbmD -35pM1
TTTTATAGGATGATCCTAGAGCGCTGCTAGGAGTGTCTTTCTTACTGTAAACTATA 240
<--*A14 <--*A1
ggattgatagcagct
(MD)

-10pM1 SD --> traM
TGCATATTTATAGTGAAAAGTTCATTGCTTAATAATGAAAGGTTTATCTTATGGCCAGA 300
<--*A10

```

図4-8 pABO421のoriT領域に導入した塩基置換変異

oriTは、DNA伝達開始点、sbiはTralの認識部位、sbyAはTraYの結合部位 (Inamoto and Ohtsubo, 1990)、ihfA及びihfBはIHFの結合部位、sbmA、B、C、DはTraMの結合部位である。geneXは機能不明のORFである。塩基番号は図2-9に従った。pABO421の各変異プラスミドに導入した変異を塩基配列の上に小文字で示す。pABO421G5、pABO421G10については図に示した位置に小文字で示した5 bp、10 bpの塩基配列を挿入して得た。

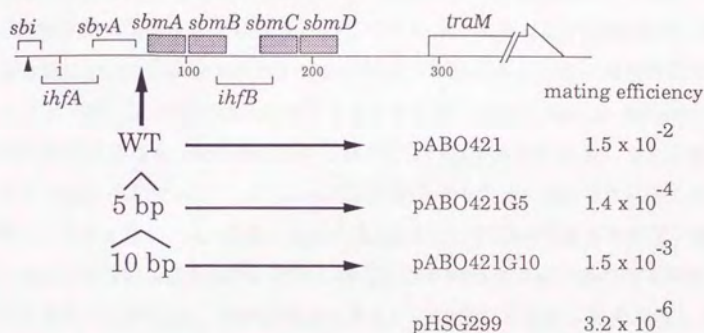


図 4-9 *sbyA*と*sbmA*との間の距離と接合伝達効率の関係

上に*oriT*領域内に存在する各結合、認識部位、及び*traM*遺伝子の大体の位置を示す。  
 pABO421G5、pABO421G10はpABO421に対して図に示した位置にそれぞれ5 bp、10 bpの塩基配列を挿入して得た。pHSG299はR100由来のDNA断片を持たないコントロールのプラスミドである。  
 プラスミド名の右にその伝達効率を示す。

### 3. 考察

#### (1) *oriT*プラスミド伝達系

*oriT*領域には接合伝達に必要なタンパク質の結合、認識部位が整然と隙間なく並んで存在する。そのうち*sbi*、*ihfA*、*sbyA*上ではTraI、IHF、TraYが*oriT*-someを形成し、それが効率的に*oriT*にニックを導入するのに必要とされることは、これまでに*in vitro*での解析の結果から示唆されていた。一方、TraMタンパク質に関しては第二章において*oriT*領域を膜に保持するとの仮説を立てていたが、実際に*oriT*領域内に四ヶ所存在する結合部位*sbm*上でTraMタンパク質がどのように働くのか、その結合部位が四ヶ所ではなく二ヶ所、三ヶ所になった場合どうなるのか、また、IHFによるTraMの発現の部分的な抑制に必要な*ihfB*が接合伝達においてどの程度重要なのか、など不明な点が残されていた。そこで本章ではこれらの点を解明するため、*oriT*プラスミドの伝達系を構築し、これを用いて*oriT*領域に変異を導入した際のDNA伝達効率の変化を調べた。TraMやIHFのように*oriT*領域内に複数の結合部位を持つタンパク質の個々の結合部位の機能を解析する際には、各結合部位に系統的に変異を導入する必要があるが、*oriT*プラスミドの伝達系はそのような解析に適した系であると考えられる。

本章で開発した*oriT*プラスミドの伝達の系では、Traタンパク質を供給するために共存させたR100-1は伝達能を有するため、R100-1の伝達も行なわれる。実際、Km耐性で選択したtransconjugant中には*oriT*プラスミドの他にR100-1を持つものも多く見られた。*oriT*領域を持たないベクタープラスミドpHSG299を用いた場合、 $10^{-6}$ 程度の頻度でKm耐性の伝達が行なわれたが、そのtransconjugantはいずれもpHSG299を保持しておらず、R100-1を保持していた。おそらくR100-1上に存在するトランスポソンやISの働きなどによってpHSG299がR100-1に組み込まれた形で伝達されたものと考えられる。一方、*oriT*プラスミドを用いた場合には、Km耐性で選択したtransconjugantは*oriT*プラスミドを保持しており、これはR100-1への組み込みを介して伝達されたのではなく、*oriT*プラスミドが独立に伝達されたものと考えられる。この系における伝達効率の検出限界は $10^{-6}$ 程度であり、この程度まで効率が低下すると上記のR100-1への組み

込みを介したKm'の伝達が影響するようになる。

## (2) TraM-IHF-TraM領域の機能

*oriT*プラスミドの伝達の系を用いて、*oriT*領域に導入した変異のDNA伝達への影響を調べることによって以下の結果と示唆が得られた。

1. DNA伝達が行なわれるためには少なくとも *sbmA*、*B* が必須であるが、それだけでは伝達の効率は低く、TraM-IHF-TraM領域全体が存在することによって初めて高効率のDNA伝達が実現する。
2. TraM-IHF-TraM領域に存在するIHFの結合部位 *ihfB* は高効率のDNA伝達に必要な。このことと上述の1. とから、おそらく *ihfB* に結合するIHFはDNAに湾曲を導入することでTraM-IHF-TraM複合体を形成するものと考えられる (図4-10)。
3. *oriT* のすぐ近傍に存在する *ihfA* は高効率のDNA伝達に必要な。これはおそらく *oriT*-someの形成に関わる影響であると考えられ、*oriT* における高効率のニッキングに *oriT*-someの形成が必要であるとの仮説を支持する。
4. TraM-IHF-TraM領域と *oriT*-some領域との間に phasing 効果が見られることと、*sbm* 部位の変異の内 *oriT*-some領域に最も近い *sbmA* による変異が最も伝達効率を低下させたことから、TraM-IHF-TraM複合体と *oriT*-someとの間には高次構造を形成する上での立体配置的な関係、おそらくはタンパク質同士の相互作用が存在すると考えられる。

TraMタンパク質が *oriT* 領域の四ヶ所に結合することはすでに第二章で明らかにしたが、それら *sbm* 部位がDNA伝達に必要なということは、本章の結果によって初めて明らかにされた。*sbmA*、*B* のみがあれば低頻度ながら伝達が行なわれるが、高効率の伝達には完全な形のTraM-IHF-TraM領域が必要であるという結果は、第二章で考察したTraMのanchoring機能、すなわち *oriT* 領域の膜への保持能力が *sbmA*、*B* しか存在しない場合には充分に発揮されないが、TraM-IHF-TraM領域が完全な形で存在するとその機能が強化され、結果的にDNA伝達効率が上昇するものと説明できる。

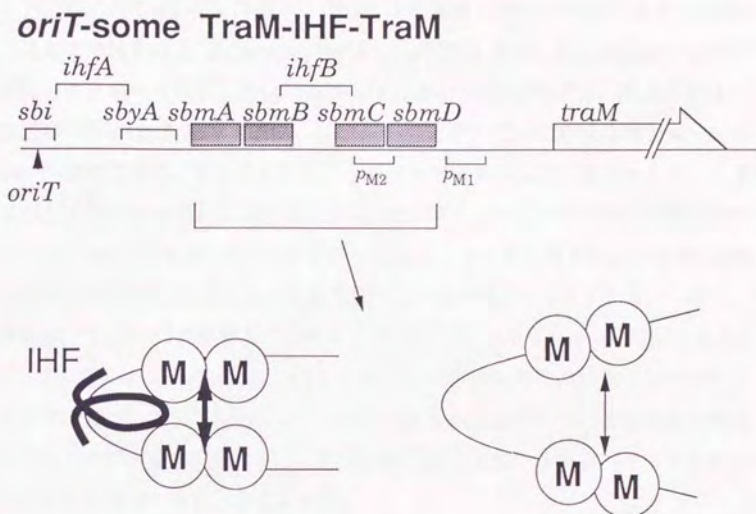


図 4-10 TraM-IHF-TraM領域におけるIHFの役割

上は*oriT*領域内に存在する各結合、認識部位、及び*traM*遺伝子の大体の位置を示す模式図である。下は、TraM-IHF-TraM領域を抜き出して描いた模式図。IHFが*ihfB*に結合すればそこを中心にDNAが湾曲し、*sbmA*、B及び*sbmC*、Dに結合したTraMの間の空間的距離が近くなり（左）、TraM-TraM相互作用によるコンパクトな複合体形成が可能になる。IHFが無いと、または*ihfB*部位が無いと*sbmA*、Bと*sbmC*、Dとが空間的に離れ（右）、複合体が形成されにくく、その結果伝達効率が低下する。

TraMのanchoring機能は $oriT$ 領域を単に膜に保持するのではなく、DNA伝達口の近傍に位置させなければDNA伝達の効率を高める効果は生じないであろう。そのためにはTraMがDNA伝達口を形成すると考えられているTraDと相互作用することにより、TraM-IHF-TraM複合体をDNA伝達口の近傍に位置させるとするのが考えやすい。ところで本章の結果からTraM-IHF-TraM複合体が $oriT$ -someと相互作用するとの示唆が得られた。一方、TraDがTraIと相互作用することにより細胞質タンパク質であるTraIを膜に移行させるとの説もある（Silverman, 1987）。上記のように、もしTraMとTraDとが直接相互作用するのであれば、DNA伝達開始時において $oriT$ 領域では、TraDが形成するDNA伝達口、TraM-IHF-TraM複合体、 $oriT$ -someの三者が互いに相互作用しあって一つの「DNA伝達開始装置」を形成するというモデルが考えられる（図4-11）。また、仮にTraMとTraDとの間に直接の相互作用が無いとしても、TraIとTraDとの相互作用によって $oriT$ -someがDNA伝達口の近傍に形成され、さらにそれをTraM-IHF-TraM複合体が $oriT$ 領域を膜に保持することで安定化するという働きも考えられる。しかし、実際にはTraMとTraDとが直接相互作用するという証拠はこれまで*in vivo*においても*in vitro*においても得られておらず、この点についてはさらに解析を進める必要がある。これについてはTraM、TraI、TraD、TraY各タンパク質の細胞内における局在性の変化を大腸菌細胞抽出液の分画操作によって調べ、相互作用しているタンパク質を検出するといった方法が有効であると考えられる。

### (3) IHFの機能と*ihf*部位の重要性

本章における解析で、*ihfA*または*ihfB*に変異を導入すると伝達効率は約100分の1にまで低下することが明らかになった。このことは、接合伝達において*ihf*部位に結合するIHFの果たす役割が非常に大きいことを示すといえよう。また、*ihfA*、*ihfB*双方に変異を導入したところその効果は相乗的に働き、伝達はほとんど行われなくなった。一方R100-1やFについて、IHF<sup>-</sup>の宿主菌を供与菌としてその伝達への効果を調べた場合には、伝達効率が100分の1から1000分の1に低下することが報告されている（Dempsey, 1987; Gamas et al., 1987）。ここで注目すべきことは*ihfA*、*ihfB*双方に変異を

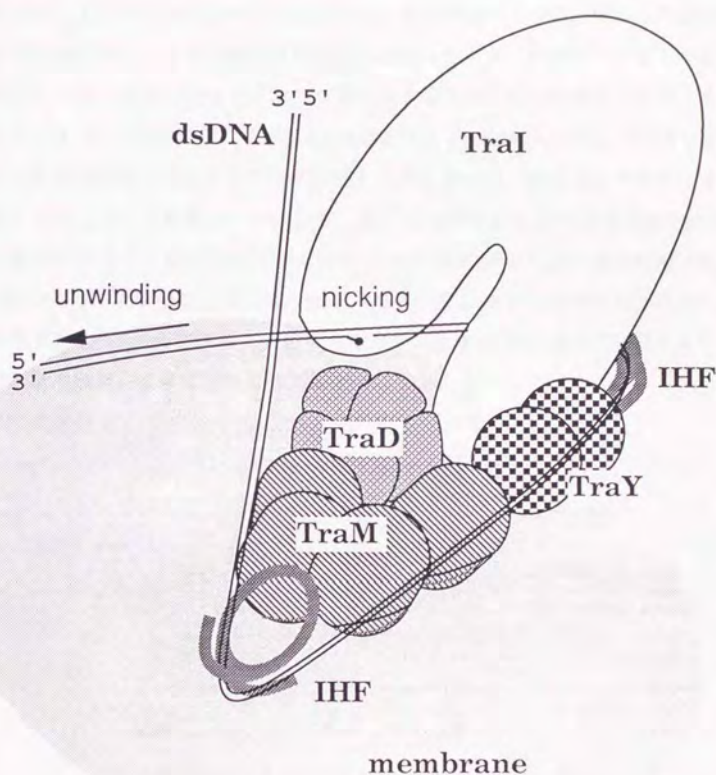


図4-11 接合伝達におけるDNA伝達開始装置の予想図

*oriT*領域の二本鎖DNAを二本の線で表わす。TraI、IHF、TraYは *oriT*-someを、TraMとIHFはTraM-IHF-TraM複合体を、TraDはDNA伝達口をそれぞれ形成するが、各構造体はそれぞれ互いに連絡しあって、膜上に *oriT*領域も含めた「DNA伝達開始装置」を形成する。

導入した場合の伝達効率の低下が、IHF<sup>-</sup>の宿主菌を供与菌とした場合の伝達効率の低下を大きく上回っているということである。この理由の一つに、導入した塩基置換によってDNAのヘリックスの巻き方の強さ、曲がりやすさ、塩基対の解離しやすさなどが変化したことによりDNAとタンパク質の高次構造の形成に影響が及んだことが考えられる。また、IHFの欠損によるpleiotropicな効果（Friedman, 1988）によりIHFの欠損の接合伝達に及ぼす影響をある程度相補する何らかの因子が発現していることもありうる。そのような可能性の一つとして、第三章で明らかにした通り通常ではIHFによって発現が部分的に抑制されているTraMがIHF<sup>-</sup>株においては大量に発現され、それがIHFの欠損による接合伝達効率の低下の度合いを小さくしていることも考えられる。本章で行なったoriTプラスミドの接合伝達の系をIHF<sup>-</sup>株を供与菌に用いて行なうことで解析すれば、これに関する評価が下せるであろう。

## 第5章 総括

本研究は、性決定因子R100の接合伝達遺伝子の中でDNA伝達に直接関わりとされていたがその具体的な機能、性質については不明であった*traM*について様々な角度から解析を行ない、その機能について考察し、さらに接合伝達の開始時に*oriT*領域上で形成されるタンパク質-DNA複合体にまで考察を進めたものである。

本研究ではTraMタンパク質が*oriT*領域に特異的に結合するタンパク質であることを初めて明らかにすることができた。TraMは*oriT*領域内の150 bpにもわたる範囲に四ヶ所の結合部位*sbm*をもち、その結合に際しては各*sbm*部位に共通に見られる15 bpの配列を認識するものと考えられる。これまでR100やFの*oriT*、すなわち特異的にニックが入る点については*in vivo*、*in vitro*における解析が行なわれ、その位置も詳しく調べられていたが、一方、接合伝達に必要な領域という意味での*oriT*領域は、ただ漠然と*oriT*の周辺、または*geneX*と*traM*との間の領域といった概念でしかとらえられておらず、また、*oriT*領域がどのような構造をとっているかについても、その塩基配列から得られる反復配列やGC含量以外には情報も無く、*oriT*領域の構造についての具体的な解析を行なう手掛かりは大変少なかった。しかし、最近TraYやIHFの結合部位がマップされ (Inamoto et al., 1990)、さらに本研究でTraMタンパク質の結合部位、及びもう一つのIHFの結合部位とがマップされたことにより、実は*oriT*領域は様々なタンパク質の結合部位がほとんど隙間なく整然と並んだ構造をとっているということが明らかとなった (図5-1A)。このように*oriT*領域の構造についての情報がタンパク質結合部位という観点から得られたことは、接合伝達におけるDNA伝達の開始、及びその初期過程といった*oriT*領域上で行なわれる動的な状況についての解析を進める上で重要な段階であると考えられる。最近FやR1といったR100類縁の性決定因子においてもTraM、IHF、TraY等の結合部位が報告され (Schwab et al., 1991; Di Laurenzio et al., 1992)、それら性決定因子の*oriT*領域もR100において明らかとなった*oriT*領域の構造と極めて類似した構造をとっていることが示されている (図5-1A)。

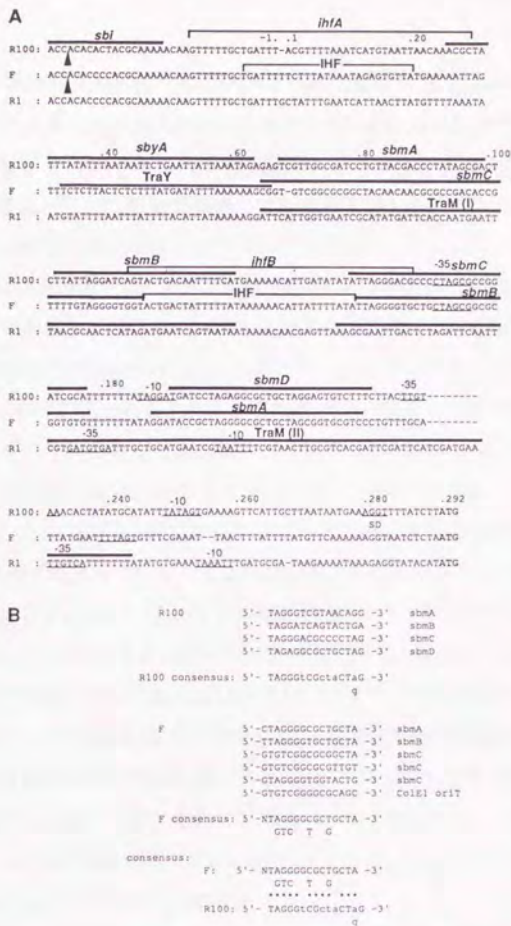


図5-1 R100、F、R1の*oriT*領域中に存在するタンパク質結合部位

A. R100、F、R1それぞれの*oriT*領域の塩基配列上にタンパク質の結合部位を示す。結合部位の呼び方は報告された論文ででの呼び方に従った。FではIHF、TraM、TraYの結合部位及び*traM*のプロモーターが、R1ではTraMの結合部位及び*traM*のプロモーターがそれぞれ報告されている。

B. R100とFのTraM結合部位に見られる共通配列の比較。R100については第二章の結果を、FについてはDi Laurenzioら(1992)の結果を示す。最下部にそれぞれの共通配列同士の比較を示す。

特にFの *oriT* 領域内のTraM、TraY及びIHFの結合部位の配置はR100のそれと全くとってもよいほど良く対応している。R100とFのTraM、TraIまたはTraYは各プラスミドに特異的に働き、互いにほとんど相補しない。しかし、それらの作用する場である *oriT* 領域の構造が互いに極めて類似していることは、F型プラスミドの接合伝達に共通に見られる機構の存在を示すものと考えられる。

FのTraMの結合部位についてのDi Laurenzioら（1992）の報告では本研究で命名した *sbmA*、*B*に相当する部位を一つにまとめて *sbmC*とし、本研究の *sbmC*、*sbmD*に対応する部位をそれぞれ *sbmB*、*sbmA*としている（図5-1A）。彼女らはその報告の中で、Fによって可動化されるプラスミドColE1の *oriT* 領域にもやはりTraMの結合部位が存在すること、それを含めた *sbm* 部位には共通に見られる14 bpの配列が存在することを示している。大変興味深いことにその14 bpの配列から得られる共通配列は本研究で明らかにしたR100の *sbm* 部位に見られる共通配列と非常に相溶性が高く、実に14 bp中12 bpが共通であった（図5-1B）。R100とFのTraMのアミノ酸配列は互いに相溶性が高く（図2-12）、しかもその塩基認識する配列も非常に似ているにもかかわらずこれら二つのTraMは互いに相補しあうことはない。また、ColE1プラスミドもFによっては可動化されるがR100によってはほとんど可動化されない。これはR100、F双方のTraMのアミノ酸配列及びその認識する塩基配列の微妙な違いによるのであろう。第二章でも考察したが、類縁関係にあるF型プラスミドのうちpED208を除いたTraMのアミノ酸配列を比較すると、そのC末端側は全くといってもよいほど相同であるが、N末端側には多少の違いが見られる（図2-12）。おそらくTraMの認識する塩基配列の違いはこのN末端側によるのであろう。

R1においてはR100と同様に *traM* の自己抑制系の存在が報告されている。Fにおける報告はまだなされていないが、Fにもおそらく同様の自己抑制系が存在するものと考えられる。F型プラスミドの *traY-I* オペロンがTraJによって転写レベルで制御を受けること、TraJがFinOP系により転写後調節を受けることはすでに広く受け入れられているが、*traM* の発現についても、その自己抑制機構はF型プラスミド間に共通に見られる現象であると考えられる。*traM* の上流から *traJ* をへて *traY* までの発現調節領域は様々な要素が複雑に作用する領域である。最近 *traY-I* プロモーターの調節には宿主因子

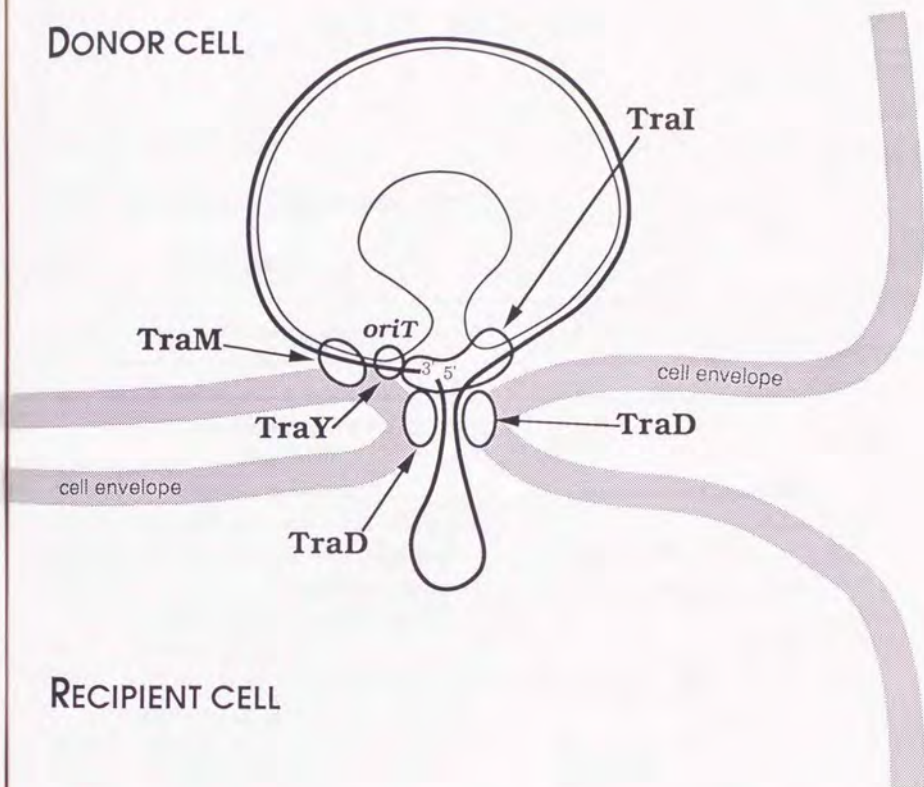
であるArc、Cpx等の制御因子も関与していること (Silverman, 1985)、*finPRNA*が宿主にコードされるRNaseIIIによって調節されていること (van Biesen et al., 1993) が示され、また、本研究によって*traM*の発現がIHFによって部分的に抑制されることが示されたが、他にも未知の要素が関与する可能性は充分考えられ、*tra*遺伝子の発現制御の機構は完全に解明されたとは言いがたい。

本研究においてはTraMの機能として*oriT*領域に結合して*oriT*領域を膜近傍に保持するというanchoring機能仮説を提唱した。TraMの機能としてはこの他にもDNAの高次構造に影響を与えて*in vivo*における*oriT*へのニッキングの効率を高める、あるいはDNA伝達における供与菌内のDNA相補鎖合成の開始に間接的に働くなどといったことも考えられる。本研究で明らかとなった個々の*sbm*部位の欠失や変異がDNA伝達効率の低下を引き起こすという結果や、TraM-IHF-TraM複合体と*oriT*-someとの間の距離にphasing効果が見られるという結果は、他の仮説を決して否定するものではないが、TraMのanchoring機能仮説によって矛盾無く説明することができる。おそらくTraMのanchoring機能を十分に働かせるためにTraM-IHF-TraM複合体が形成され、また、TraM-IHF-TraM複合体と*oriT*-someとの間に相互作用があるのであろう。しかし、膜近傍に保持するといっても非特異的に膜に近寄せられればよいというわけではない。*oriT*をDNA伝達口の近傍に保持することによって初めてDNA伝達に必要とされる機能であるといえよう。現在DNA伝達口は膜タンパク質であるTraDが形成すると広く考えられている。またTraDはとTraIが相互作用することによって、TraIを膜に固定するとの説がある (Silverman, 1987)。ここでもしTraMとTraDが相互作用するのであれば、TraMのanchoring機能とはすなわち*oriT*領域をDNA伝達口の近傍に保持することになり、TraM-IHF-TraM複合体と*oriT*-some、TraDは三者が互いに相互作用を及ぼすことで一つのDNA伝達開始装置とでもいうべき複合体を形成することになる (図4-11)。また、TraMとTraDとの間に相互作用が無いとしてもTraD-TraI相互作用によって決まる配置をTraM-IHF-TraM複合体が膜に保持することで安定化すると解釈もできる。この場合TraD-TraI相互作用が第一義的なものでTraMのanchoring機能はそれを補助する機能であることになる。

接合伝達は性繊毛によって受容菌が認識され、供与菌と接合対を作ることから始

まる。その際供与菌と受容菌の接点は性繊毛の基部のところにできるものと考えられる。したがってDNA伝達口も性繊毛の基部に形成されとするのが妥当であろう。性繊毛の基部がどのタンパク質によってどのように形成されているのかは現在までのところ明らかにされていないが、性繊毛が雄株特異的な細胞外器官であることからその構成成分もTraタンパク質であろうと考えられる。そして、そこにDNA伝達口が形成されるのであればおそらく性繊毛の基部のTraタンパク質とTraDとの間には相互作用があるであろう。このように考えると性繊毛、DNA伝達口、TraM-IHF-TraM複合体、*oriT*-some、そして*oriT*領域DNAとが一つの高次構造体であるDNA伝達装置を形成するとの仮説が立てられる（図4-11、図5-2）。しかし、ここに展開したのはほとんどが仮定に過ぎず、現在までのところTraDとTraIとの相互作用、そして本研究で明らかとなったTraM-IHF-TraM複合体と*oriT*-someとの相互作用が示唆されているに過ぎない。今後、これら構成成分同士の相互作用を解析し、ここで展開したDNA伝達装置仮説について検証することが必要である。特に、性繊毛の基部の構造についてはほとんど情報は得られていなく、その解析が望まれる。また、DNA伝達口についても供与菌側の構成成分がTraDであると考えるのは自然であるが、受容菌側の構成成分がどのようなになっているのか、はたしてTraDが受容菌側にまで伝達口を穿つのか、それとも本来の膜の構成成分が働くのかといったことについても、現在までのところ説得力のある報告はなされていない。本研究で目的としたDNA伝達の開始機構、制御機構の解明には、さらに解析を進めてこれらの問題にまで理解を深めることが必要であろう。

## DONOR CELL



## RECIPIENT CELL

図5-2 接合伝達におけるDNA移動の予想図

太い線で表した特定のDNA鎖の特定の部位に *oriT*-someによってニックが入る。供与菌と受容菌との接点に形成されるDNA伝達口を通して5'側から太い線で示した一本鎖DNAが受容菌へと移動する。その間ニックの5'側は *TraI* タンパク質に結合してDNA伝達口の近傍、供与菌側に残っている。*TraI* は *TraY*、IHF と共に *oriT*-some を形成する。*oriT*-some は *TraM* もしくは *TraD* を介してDNA伝達口近傍の内膜に固定されており、二本鎖DNAを巻き戻して一本鎖DNAを生成する。この巻き戻し活性にはATPが必要であり、これが一本鎖DNAが受容菌へと移動する際の起動力となる（総説：Willett and Wilkins, 1984）。*TraM* は *oriT* 領域を膜に固定する。この図では性毛の形成に関与するタンパク質や接合対の安定化に関与するタンパク質及びIHFを含めた宿主タンパク質などは描いていない。この図はWillettとSkurrayによる総説（1987）から改変の上引用した。

## 第六章 材料と方法

### 1. 菌株とプラスミド

使用した大腸菌K-12株の菌株を表6-1に示す。

表6-1 使用した菌株

Strain	Genotype or description	reference
MV1184	F'[ <i>traD36 proAB lacI<sup>q</sup>ZΔM15</i> ] / <i>ara</i> $\Delta$ ( <i>lac-proAB</i> ) <i>rpsL thi</i> ( $\phi$ 80 <i>LacZΔM15</i> ) $\Delta$ ( <i>srl-recA</i> )306::Tn10	Vieira and Messing, 1987
MC1000	F <sup>-</sup> <i>araD139 Δ(ara-leu)7679</i> $\Delta$ <i>lacX74 galU galK hsdR2 mcrB1 rpsL</i>	Casadaban and Cohen, 1980
BW313	Hfr <i>lysA dut1 ung1 thi-1 recA1 spoT1</i>	Kunkel, 1985
JM109	F'[ <i>traD36 proAB lacI<sup>q</sup>ZΔM15</i> ] / <i>recA1</i> <i>endA1 gyrA96 thi hsdR17 supE44</i> <i>relA1 Δ(lac-proAB)</i>	Yanisch-Perron et al., 1985
C600	F <sup>-</sup> <i>thr-1 leuB6 thi-1 lacY1 supE44</i> <i>rfbD1 fhuA21 mcrA1</i>	Bachmann, 1987
YK2523	$\Delta$ 3[ <i>hip</i> ]::cat	Kano et al., 1991
TA1000	MC1000 $\Delta$ 3[ <i>hip</i> ]::cat	This Work
NM554	F <sup>-</sup> <i>araD139 Δ(ara-leu)7679</i> $\Delta$ <i>lacX74 galU galK hsdR2 mcrB1 rpsL recA13</i>	Raleigh, 1988
DH1	F <sup>-</sup> <i>recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17</i> <i>supE44 relA</i>	Bachmann, 1987
DH1Rif	DH1 Rif <sup>r</sup>	This Work
JE177	harbors R100-1	A. Nishimura

MV1184はpUC119由来のプラスミドの宿主として用いた。

BW313はKunkel法による部位特異的塩基置換変異の導入の際、DNAにデオキシウラシル (dU) を導入するために用いた。

MC1000はTraM\*の精製の際に用いたpJG200由来のpABO22、及び*traM*のプロモーター

の解析に用いたpR-pMLB由来のプラスミドの宿主として用いた。

TA1000はMC1000の*hip*変異株であり、YK2523 ( $\Delta 3[hip]::cat$ ) から調製したP1ファージを用いてMC1000に対しP1トランスダクションを行ない、Cm<sup>r</sup>を指標に選択して得た。C600はP1ファージのタイターを測定する際の指示菌として用いた。

JM109はpHSG299由来のプラスミド、及びpSIプラスミドを含むpUC19由来のプラスミドの宿主として用いた。

NM554は*oriT*領域解析のために構築したpABOプラスミドとR100-1とを保持させて接合伝達の供与菌に用いた。R100-1をNM554に移すにはJE177を供与菌、NM554を受容菌として液体培地中にて接合伝達を行なわせた。JE177は国立遺伝学研究所・西村昭子博士より分与された、R100-1を保持する菌株である。

DH1Rifは本研究においてDH1から得たりファンピシン耐性を示す自然突然変異株であり、接合伝達を受容菌に用いた。

使用したプラスミドを表6-2~4に示す。

表6-2 第二章で使用したプラスミド

Plasmid	description	Source or reference
pUC119	pBR322-derived phagemid	Vieira and Messing, 1987
pJG200	pBR322-derived plasmid	Germino and Bastia, 1984
pSI87-ES3	pUC19 with R100 <i>tra</i> region	Inamoto et al., 1988
pSI87-B19	pUC19 with R100 <i>tra</i> region	Inamoto et al., 1988
pSI87-XE1	pUC19 with R100 <i>tra</i> region	Inamoto et al., 1988
pABO1	pUC119 with R100 <i>traM</i>	This Work
pABO12	pABO1 with two additional restriction sites	This Work
pABO22	carries <i>traM</i> -collagen- <i>lacZ</i> fusion gene	This Work

表6-3 第三章で使したプラスミド

Plasmid	Marker	Parental plasmid(s)	Source or reference
pR-pMLB	Amp	pBR322	D. Bastia
pHS12	Tc	pSC101	Armstrong et al., 1984
pUC119	Amp	pBR322	Vieira and Messing, 1987
pABO1	Amp	pUC119	This Work
pABO10	Amp	pABO1	This Work
pABO11	Amp	pABO1	This Work
pABO15	Amp	pABO10	This Work
pABO16	Amp	pABO10	This Work
pABO17	Amp	pABO10	This Work
pABO18	Amp	pABO10	This Work
pABO49	Amp	pABO1 and pR-pMLB	This Work
pABO215	Amp	pABO15 and pR-pMLB	This Work
pABO216	Amp	pABO16 and pR-pMLB	This Work
pABO217	Amp	pABO17 and pR-pMLB	This Work
pABO218	Amp	pABO18 and pR-pMLB	This Work
pABO119	Amp	pUC119	This Work
pABO101	Amp	pABO11 and pABO119	This Work
pABO120	Tc	pABO101 and pHS12	This Work
pHY300PLK	Amp, Tc	pACYC177	Ishiwa and Shibahara-Sone, 1986
pABO300	Tc	pHY300PLK	This Work
pABO320	Tc	pABO101 and pABO300	This Work
pSI87-XE1	Amp	pUC19	Inamoto et al., 1988
pSI87-ES3	Amp	pUC19	Inamoto et al., 1988
pSI87-XS5	Amp	pUC19	Inamoto et al., 1988
pTAKI301	Tc	pABO300	K. Taki

表6-4 第四章で使したプラスミド

Plasmid	description	Source or reference
R100-1	<i>finO</i> mutant of R100 resistant to Tc, Cm, Str, Sfa, Hg	Yoshioka et al., 1987
pUC119	pBR322-derived phagemid	Vieira and Messing, 1987
pHSG299	Km-resistant pUC type plasmid	Takeshita et al., 1987
pSI87-ES3	pUC19 with R100 <i>tra</i> region	Inamoto et al., 1988
pSI87-B19	pUC19 with R100 <i>tra</i> region	Inamoto et al., 1988
pABO401	pHSG299 with R100 <i>oriT</i> and <i>tra</i> region	This work
pABO421	pHSG299 with R100 <i>oriT</i> region	This work
pABO601	deletion mutant of pABO421	This work
pABO701	deletion mutant of pABO421	This work
pABO731	deletion mutant of pABO421	This work
pABO741	deletion mutant of pABO421	This work
pABO751	deletion mutant of pABO421	This work
pABO761	deletion mutant of pABO421	This work
pABO771	deletion mutant of pABO421	This work
pABO421MA	pABO421 mutated at <i>sbmA</i>	This work
pABO421MB	pABO421 mutated at <i>sbmB</i>	This work
pABO421MC	pABO421 mutated at <i>sbmC</i>	This work
pABO421MD	pABO421 mutated at <i>sbmD</i>	This work
pABO421Y2	pABO421 mutated at <i>sbyA</i>	This work
pABO421F1	pABO421 mutated at <i>ihfB</i>	This work
pABO421F5	pABO421 mutated at <i>ihfA</i>	This work
pABO421F15	pABO421 mutated at <i>ihfA</i> and <i>ihfB</i>	This work
pABO421G5	pABO421 with 5 bp insert	This work
pABO421G10	pABO421 with 10 bp insert	This work

pUC119 (Vieira and Messing, 1987) はKunkel法により部位特異的塩基置換変異を導入するために用いるプラスミドを作製する際のベクターとして用いたファージミドである。

pUC119由来のプラスミドを保持する菌から一本鎖DNAを調整する際にはバクテリオファージM13KO7 (Vieira and Messing, 1987) をヘルパーファージとして用いた。

pHSG299 (Takeshita et al., 1987) はR100由来のDNA断片をクローニングして、*oriT* プラスミドの伝達系に用いるpABOプラスミドを構築する際のベクタープラスミドとして

用いた。

pR-pMLBはpBR322由来のプラスミドであり、バクテリオファージ $\lambda$ の温度感受性リプレッサー $\phi$ 857から $p_R$ プロモーターをへて $cro$ 遺伝子の開始コドン (ATG $_{cro}$ )、及びそれに融合した $lacZ$ 遺伝子を持つ。ATG $_{cro}$ の直後にはBamHI認識部位が存在する (図3-1)。

pJG200 (Germino and Bastia, 1984) はpR-pMLBのATG $_{cro}$ と $lacZ$ 遺伝子との間にコラーゲン遺伝子を挿入して得られたプラスミドである。

pHS12 (Armstrong et al., 1984) はpSC101 (Stoker et al., 1982) 由来の、コピー数が増加した変異プラスミドである。pHY300PLK (Ishiwa and Shibahara-Sone, 1986) はpACYC177 (Chang and Cohen, 1978) 由来のプラスミドである。これらは $traM$ の自己抑制を示す際用いたtransの位置からTraMを供給するプラスミドの構築の際のベクターである。

pSI87-B19、pSI87-ES3は、性決定因子R100の $tra$ 遺伝子群のうち $oriT$ 領域から $traM$ 、J、Y、A、L及び $traE$ 遺伝子の一部までを、pSI87-XE1は $oriT$ 領域から $traM$ 遺伝子の一部までをpSI87-XS5は $traM$ 遺伝子の一部から $traE$ 遺伝子の一部までを、それぞれベクターpUC19 (Yanisch-Perron et al., 1985) にクローニングしたプラスミドである (Inamoto et al., 1988)。pTAKI301はpABO300に $traJ$ 構造遺伝子をクローニングしてTraJタンパク質を発現するように構築したプラスミドである (Taki et al., unpublished result)。

pABOと名付けられた一連のプラスミドは本研究で作製したものである。

## 2. pABOプラスミドの構築

### (1) TraM\*の精製に用いたpABOプラスミド

pABO1はpSI87-ES3の $SphI$ 部位からBamHI部位まで、つまりR100の $tra$ 遺伝子群のうち $oriT$ 領域から $traM$ 、さらに $traJ$ 遺伝子の一部までの領域をpUC119のマルチプルクローニングサイトにクローニングしたプラスミドである。pABO12はpABO1の $traM$ 遺伝子の上流及び終止コドンのところにBamHI認識部位、BglII認識部位をそれぞれ導入して得た。さらにpABO12の $traM$ を含むBamHI-BglII断片をpJG200のBamHI認識部位にクローニングしてpABO22を得た (図2-2)。

### (2) $traM$ のプロモーターの解析に用いたpABOプラスミド

$traM_{ATG}$ - $lacZ$ 融合遺伝子を有するプラスミドのうち、pABO215、216、217、218は以下のようにして構築した (図3-1)。pABO1に対してプライマー10を用いて部位特異的塩基置換を行ない、 $traM$ 構造遺伝子の開始コドンATGの直後にBamHIの認識部位を導入してpABO10を得た。さらにプライマー11、12、13、14を用いてpABO10上の $traM$ 遺伝子

の上流領域に *Bam*HI または *Bgl*II の認識部位を導入して pABO11、12、13、14 を得、これらの pABO プラスミドから *Bam*HI-*Bam*HI 及び *Bgl*II-*Bam*HI 断片を切り出してベクタープラスミド pR-pMLB の *Bam*HI 認識部位にクローニングして pABO215、216、217、218 を得た。pABO49 は、プライマー 10 と 16 を用いて pABO1 をテンプレートとして PCR 反応を行ない、得られた DNA 断片を *Bam*HI 処理した後にベクタープラスミド pR-pMLB の *Bam*HI 認識部位にクローニングして得た。pABO218 は *sbmD* と *traM* 構造遺伝子の間の領域を含む。その領域に加えて pABO217 には *sbmD* が、pABO216 には *sbmC* と *sbmD* が、pABO49 には *sbmB*、*ihfB*、*sbmC*、*sbmD* が、pABO215 には全ての *sbm* 部位と *ihfB* とがそれぞれ完全な形で存在する。(図 3-1)

#### (3) TraM タンパク質を細胞内のトランスの位置から供給するプラスミド

TraM タンパク質を細胞内のトランスの位置から供給するプラスミド pABO120、pABO320 は以下のように構築した (図 6-1)。プライマー 21N を用いた部位特異的塩基置換でベクタープラスミド pUC119 の *lacPO* 領域の上流に *Eco*RI 認識部位を導入して pABO119 を得た。また、プライマー 1 を用いた部位特異的塩基置換で pABO1 の *traM* 構造遺伝子の SD 配列のすぐ上流に *Bam*HI 認識部位を導入して pABO11 を得、pABO11 から *Bam*HI-*Bam*HI 断片を切り出して pABO119 の *Bam*HI 認識部位にクローニングして pABO101 を得た。この pABO101 から得られる *Eco*RI-*Eco*RI 断片上には *lacP* から発現する *traM* 構造遺伝子が存在し、それをベクタープラスミド pHS12 にクローニングして得たのが pABO120 である。また、ベクタープラスミドとして pHS12 のかわりに、pHY300PLK の *Amp<sup>r</sup>* 遺伝子を *Pvu*I 処理と T4 DNA polymerase 処理でフレームシフト変異を導入することによって破壊したプラスミド pABO300 を用いて得たのが pABO320 である。pHS12 は pSC101 由来の、コピー数が増加した変異プラスミドである。pHY300PLK は pACYC177 由来のプラスミドである。したがって、pABO120、pABO320 はともに pBR322 由来のプラスミド pR-pMLB と共存することができる。さらに、pSC101 は自身の複製に IHF が必要であるので pABO120 は IHF 欠損株に保持させることはできないが (Friedman, 1988)、pABO320 は IHF 欠損株内でも複製することが可能である。

#### (4) *oriT* 領域を持つ pABO プラスミド

pABO401 は pSI87-B19 の *Eco*RI-*Pst*II 3.8 kb 断片 (*oriT* 領域から *traM*、*J*、*Y*、*A*、*L* 及び *traE* 遺伝子の一部までを含む) を pHSG299 にクローニングして得た。pABO421 は pSI87-ES3 の *Sph*I-*Xmn*I 0.7 kb 断片 (*oriT* 領域から *traM* 遺伝子の一部までを含む) を pHSG299 にクローニングして得た。700 番台の番号をつけた pABO プラスミドは *Eco*RI 処理によって直鎖状にした pSI87-ES3 をテンプレートとして、PCR 反応を行なうことにより得られた断片を pHSG299 にクローニングして得た。PCR 反応に用いた個々のプライマーの位置、それらによって増幅される *oriT* 領域の範囲、及びそれらをクローニングして得られる pABO プ

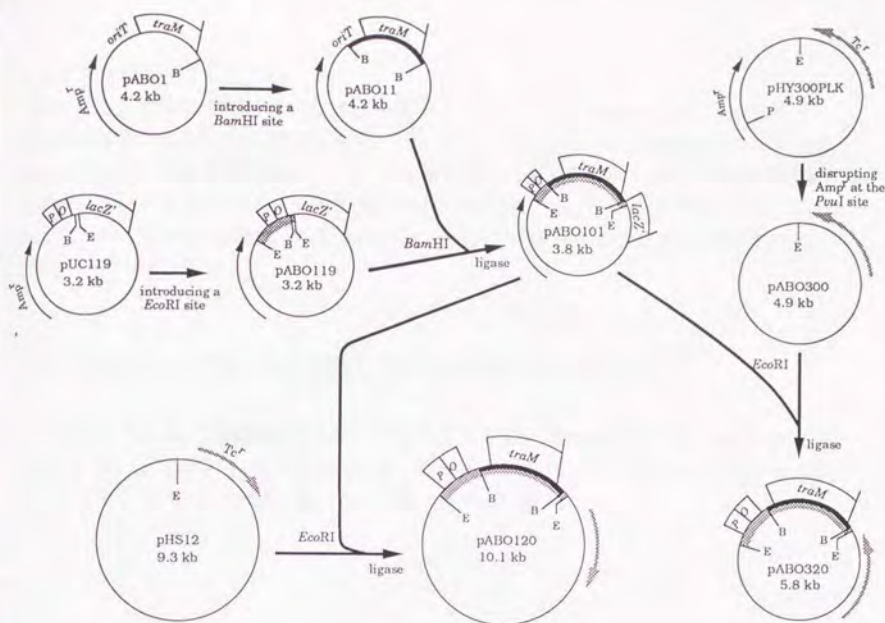


図6-1 TraMをトランスの位置から供給するプラスミド  
pABO120、pABO320の構築

pABO11はpUC119にtraMとその周辺をクローニングしたプラスミドpABO1のtraM構造遺伝子の上流に、プライマー1を用いたKunkel法にてBamHI認識部位を導入して得たプラスミドである。pABO119はpUC119のlacPOの上流にプライマー21Nを用いたKunkel法にてEcoRI認識部位を導入して得たプラスミドである。pABO11のtraMを含むBamHI-BamHI断片を黒い太線で、pABO101のlacPO-traMを含むEcoRI-EcoRI断片を網かけの太線でそれぞれ示す。traMとpUC119のlacZ' (LacZ  $\alpha$ 断片をコードする)の位置及び方向は白抜きの矢印で示す。アンピシリン耐性遺伝子 (Amp<sup>r</sup>)、テトラサイクリン耐性遺伝子 (Tc<sup>r</sup>) はそれぞれ実線、網かけ線の矢印でその位置及び方向を表わす。p、oはlacオペロンのプロモーター、オペレーターである。pABO101のEcoRI-EcoRI断片においてtraMはlacPから転写される。lacZ'の開始コドンから始まる翻訳はすぐ下流に存在する終止コドンで終結し、また、LacZ'はtraM構造遺伝子とはフレームがずれている。したがってpABO22 (第二章、図2-2) におけるのと同様に、この断片から生産されるTraMはインタクトなTraMであると考えられる。pHY300PLK上のAmp<sup>r</sup>遺伝子は、その構造遺伝子内に存在するPvuII認識部位でPvuIIにて切断し、その結果生じる突出末端をT4 DNA polymeraseにて平滑化した後にセルフライゲーションさせることでフレームシフト変異を導入して破壊した。B、E、PはそれぞれBamHI、EcoRI、PvuIIの認識部位である。

ラスミドは図6-2に示した。

個々の結合部位に部位特異的塩基置換変異を導入した変異pABO421は、pABO421の *EcoRI-SphI* 0.7 kb断片をpUC119にクローニングして得たプラスミドpABO9421に対してKunkelの方法で塩基置換を導入し、しかる後にその *EcoRI-SphI* 0.7 kb断片をpHSG299に再クローニングすることによって得た。PCR及びKunkel法に用いた合成DNAプライマーは表6-7、6-8に示す。各変異pABO421の作成において導入した変異は図4-8に示す。

### 3. プラスミドDNAへの部位特異的塩基置換変異の導入

プラスミドDNAに制限酵素認識部位を導入する際にはMutagene Kit (BioRad)、Mutan-K Kit (宝酒造)を用いたKunkel法 (Kunkel, 1985)、またはGeneAmp PCR Kit (宝酒造)を用いたPCRによる塩基置換法を行なった。

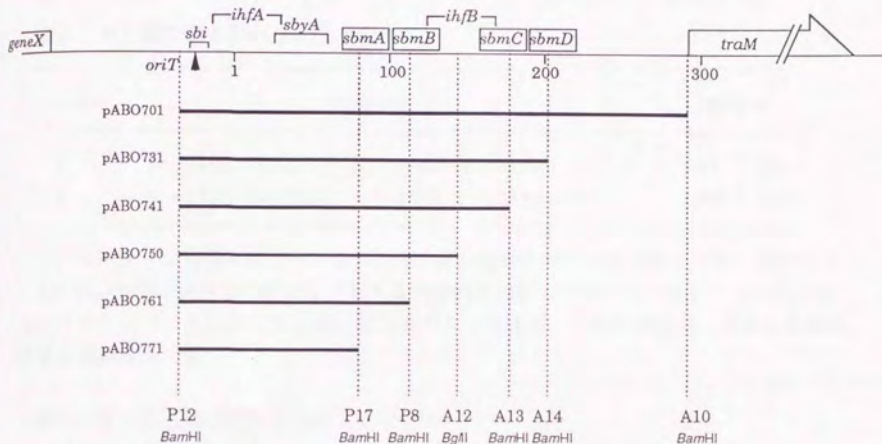


図 6-2 PCRによる欠失 $oriT$ 領域断片を持つpABOプラスミドの構築

上に $oriT$ 領域内に存在する各結合、認識部位、 $geneX$ 、及び $tra$ 遺伝子の一部を模式的に示す。下に600番台、700番台の番号を付けたpABOプラスミドの構築のためのPCRに用いたプライマーの位置及びそれによって導入される制限酵素認識部位を示す。各pABOプラスミドは図に示した太線の領域を持つ。

#### 4. 合成オリゴヌクレオチド

塩基配列決定、プライマー伸長法、及びKunkel法またはPCR法による部位特異的塩基置換導入に用いたオリゴヌクレオチドは、Applied Biosystem社のDNA合成装置380Bを用いてホスホアミダイド法によって合成した。合成に要する試薬類はApplied Biosystem社及びCruachem社より購入した。

表6-5 第二章で用いた合成プライマー

primer	sequence	position
1	5'-CACTATAAATAT <u>GgATcc</u> AGTGTTTACAAG-3'	255 - 226
2	5'-CTTTTAATTCTT <u>agaTc</u> TCCTCATCATTT-3'	689 - 660

各プライマーの位置は図1-4中のoriT領域の塩基番号による位置を示す。プライマー1及び2はpABO1からpABO12を作製する際にKunkel法のプライマーとして用いた。各プライマーによって導入される塩基置換変異を小文字で、その変異によって生じる制限酵素認識部位を下線で示す。

表6-6 第三章で用いた合成プライマー

primer	sequence	position
1	5'-CACTATAAATAT <u>GgATcc</u> AGTGTTTACAAG-3'	255 - 226
10	5'-TACAAAATTACT <u>ggatCC</u> ATAAGATAAAAC-3'	311 - 282
11	5'-TTAATAATTCAG <u>agatc</u> TTAAATATAAATA-3'	59 - 30
12	5'-CGTCCCTAATAT <u>AgATCt</u> ATGTTTTCATG-3'	158 - 129
13	5'-TATAAAAAAATGgGATCCGGCGCTAGGGGC-3'	187 - 158
14	5'-AGACACTCCTAG <u>ggatc</u> CCTCTAGGATCAT-3'	219 - 190
16	5'-CGATCCTGTTACG <u>gatcc</u> ATAGCGACTCTT-3'	75 - 104
21N	5'-CTTTCCAGTCGGG <u>AAttC</u> TGTCGTGCCAGC-3'	602' - 631'
M4	5'-GTTTTCCAGTCACGAC-3'	359' - 375'
traMRV	5'-CTGATATACAAAATTACTCT-3'	317 - 298

プライマーM4とtraMRVはプライマー伸長法に用いた。そのほかのプライマーはpABO

プラスミドを構築する際の部位特異的塩基置換変異の導入に用いた。その際導入される制限酵素認識配列を下線で示し、その配列をとるために導入された置換変異の位置及び変異後の塩基を小文字で示す。プライマー21N、M4はpUCプラスミドに、それ以外のプライマーはoriT領域の周辺にハイブリダイズする。プライマー10、11、12、13、14、15、21NはKunkel法による塩基置換導入、プライマー10と16はPCRによる塩基置換導入にそれぞれ用いた。

各プライマーの位置は、右肩に印のないものは図1-4中のoriT領域の塩基番号による位置を、右肩に' 'が付いた位置はpUC19上の塩基番号 (Yanisch-Perron et al, 1985) に従った位置を示す。

表6-7 第四章でのPCRに用いた合成DNAプライマー

primer	sequence	position
10	5'-TACAAAATTACTg <sup>g</sup> atCCATAAGATAAAAC-3'	311 - 282
12	5'-CGTCCCTAATATAgATCtATGTTTTTCATG-3'	158 - 129
13	5'-TATAAAAAAATGgGATCCGGCGCTAGGGGC-3'	187 - 158
14	5'-AAAGACACTCCTAGg <sup>g</sup> atcCCTCTAGGATCAT-3'	221 - 190
F8	5'-TGTCAGTACgGATCCTAATAA-3'	123 - 103
F11	5'-TTTCATggaTCCACCTCTGGTGAC-3'	-130 - -107
F12	5'-GTTg <sup>g</sup> atCCACCAAAGCACCACA-3'	-54 - -31
F17	5'-ACAGGATCcCCAACGACTCTCTAT-3'	83 - 60

各プライマーの位置は、図1-4中のoriT領域の塩基番号による位置を示す。各プライマーによって導入される変異を小文字で、その変異によって生じる制限酵素認識部位を下線で示す。

表 6-8 第四章でのKunkel法に用いたプライマー

primer	sequence	position	mutation
32	5'-GTCCTAATATATAgatcTtcTagaCATGAAAATTGTCAGTA-3'	157 - 118	F1, F15
43	5'-TAAATAGCGTTTGcTgcagACggtaccTAAACGTAAATC-3'	35 - -5	F5, F15
51	5'-CCTAATAAGAGTCGTCGtAgctttgatagcagctATCGC CAACGACTCTCTA-3'	110 - 61	MA
52	5'-ATGTTTTTCATGAAAATTGagctgctatcaatgcATA AGAGTCGCTATAG-3'	140 - 91	MB
53	5'-AAATGCGATCCGCGCGctgctatcaaagcATATATA TCAATGTTTTTCA-3'	180 - 131	MC
54	5'-ACAAGTAAGAAAGACACTCagctgctatcaatccGGA TCATCCTATAAAA-3'	230 - 181	MD
55	5'-GGTCGTAACAGGATCGCCAACGACTcgagTCTCTATT TAATAATTCAGAATTATT-3'	90 - 41	G5
56	5'-GGTCGTAACAGGATCGCCAACGACTagtccatggTCT CTATTTAATAATTCAGAATTATT-3'	90 - 41	G10
57	5'-ATCGCCAACGACTCTCTATgTtAacATTaAGctTTAT atcgatTAAATAGCGTTTGTTAATTAC-3'	78 - 15	Y2

各プライマーの位置は、図 1-4 中の *oriT* 領域の塩基番号による位置を示す。各々のプライマーによって導入される塩基置換変異を小文字で、その結果生じる制限酵素認識部位を下線で示す。各プライマーによって変異を導入した pABO421 プラスミドの変異の名前を右に示す (図 4-8 参照)。

## 5. 合成DNA断片の作成

TraM の結合に対するコンペティターとして用いた二本鎖 DNA 断片は、それぞれの配列について上下両 DNA 鎖を各々合成し、10 mM Tris-HCl (pH 7.5)、25 mM NaCl、0.1 mM EDTA (pH 8.0) 中にて混合し、95℃2分間の変性処理の後に 65℃で30分間保温し、さらに一分間に1℃の割合で温度を37℃まで下げ、30分間保温してアニールさせて得た。

## 6. 培地

使用した培地は L-rich 培地、2 × YT 培地、LB 培地 (Miller, 1972)、 $\phi$  培地 (Yoshioka

et al., 1987)、EHA培地、R培地 (Miller, 1972) である。これらの培地は全て120℃15分間のオートクレーブで滅菌した後に使用した。L-rich培地、2 × YT培地にはオートクレーブ後、やはりオートクレーブで滅菌したグルコースを終濃度が0.2%となるように加えて使用した。EHA培地はオートクレーブ後グルコースを0.15%となるように、クエン酸ナトリウムを6.8 mMとなるようにそれぞれ加えて使用した。R培地にはオートクレーブ後グルコースを0.1%となるように、CaCl<sub>2</sub>を2 mMとなるようにそれぞれ加えて使用した。

プレートは適当な培地にBacto agar (Difco) を加えて作製した。LBプレート、EHAプレートはそれぞれ培地にBacto agarを1.5%になるように加えて作製した。RプレートはR培地にBacto agarを1.2%になるように加えて作製した。R Top agarはR培地にBacto agarを0.8%になるように加えて作製した。

2 × YT培地はDNAの大量調製 (Ohtsubo et al., 1978) の際の培養に用いた。L-rich培地はアルカリ-SDS法によるプラスミドDNA調製で、高収量が必要な際に用いた。φ培地はルビジウム形質転換法 (Yoshioka et al., 1987) の際の本培養に用いた。R培地、EHA培地はP1トランスダクションに用いた。LBプレートには必要に応じてアンピシリン (Amp)、テトラサイクリン (Tc; Sigma)、クロラムフェニコール (Cm; Sigma)、カナマイシン (Km; Sigma)、リファンピシン (Rif; Sigma)、グルコース、5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactopyranoside [X-gal] (Sigma)、isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside [IPTG] (Sigma) を加えてコロニーの選択に使用した。その際 Ampは100 μg/ml、Tcは5 μg/ml、Cmは30 μg/ml、Kmは50 μg/ml、Rifは100 μg/ml、グルコースは0.2%、X-galは0.2%、IPTGは0.14 mMになるように加えた。

## 7. 試薬、酵素、キット

使用した試薬はそのつど述べた。特に示さない限り、和光純薬より購入したものを使用した。

使用した制限酵素はNew England Biolabs、BioRad、宝酒造、東洋紡より購入した。DNase I、T4 DNA polymerase、T4 polynucleotide kinase、DNA polymerase I Klenow fragment、calf intestine alkaline phosphatase (CIAP)、T4 DNA ligase、RNase inhibitor、reverse transcriptase (RAV-2)、M13 DNA Sequencing kit、Mutan-K mutagenesis kit、Gene Amp polymerase chain reaction (PCR) kitは宝酒造より購入した。Mutagene KitはBioRadより購入した。RNase A、コラゲナーゼ (タイプⅦ) はSigmaより購入した。コラゲナーゼは、300 μgを50% [v/v] グリセロールを含むバッファーB (バッファーB-G50) 340 μlに溶解

して $0.9 \mu\text{g} / \mu\text{l}$ の保存液を作製、 $-20^{\circ}\text{C}$ にて保存し、実験に供した。これらの酵素は全て製造者の示す反応条件にて使用した。

## 8. プラスミドDNAの調製

ベクターとして用いたpUC119及びDNase Iフットプリンティング法に用いたpSI87-XE1のsupercoiled DNAは、1リットルの培地よりBrij-DOCを用いる方法で調製し、CsCl密度勾配により精製した(Ohtsubo et al., 1978)。DNA塩基配列の決定、Kunkel法(1985)に用いたプラスミドDNAはアルカリ-SDS法(Maniatis et al., 1982)によって調製した。プラスミドDNAの迅速な単離、同定には、R100-1を確認する必要があるときにはMachidaら(1982)によるcrude lysis法を、単離したプラスミドDNAを制限酵素処理する必要があるときにはリチウムバッファーを用いるHeらの方法(1989)をそれぞれ用いた。

## 9. 形質転換

菌体の形質転換はHanahan(1983)の方法を改良したルビジウム法(Yoshioka et al., 1987)またはTSS法(Chung et al., 1989)によって行なった。特にKunkel法により塩基置換を導入したプラスミド等、ライゲーション反応で得られたプラスミドによる菌体の形質転換は効率の良いルビジウム法によって行ない、また、Heら(1989)の方法、アルカリ-SDS法(Maniatis et al., 1982)、crude lysis法(Machida et al., 1982)によって調製したプラスミドDNAによる菌体の形質転換はより簡便なTSS法によって行なった。

## 10. DNA塩基配列の決定

プラスミドDNAに導入した変異の確認のために合成オリゴヌクレオチドをプライマーとしてジデオキシ法(Sanger et al., 1977; Messing, 1983)により塩基配列を決定した。その際7-DEAZA Sequencing Kit(宝酒造)またはBcaBEST Sequencing Kit(宝酒造)を用い、 $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]$  dCTP (15 TBq / mmol: Amersham)の取り込みによって標識を行った。

DNase Iフットプリンティング法、プライマー伸長法の位置マーカーには、5'末端を $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$  ATP (166.5 TBq / mmol: Amersham)によるリン酸化で標識したプライマーを用いてM13 Sequencing Kit(宝酒造)を一部変更したジデオキシ法により決定したシーケンスラダーを用いた。その際DNA鎖の伸長にはDNA polymerase I Klenow fragmentを用

いた。

## 11. TraM\*の精製

TraM\*は $\beta$ -ガラクトシダーゼに対するアフィニティーを利用した方法 (Ullmann, 1984; Inamoto et al., 1988) によって以下のように精製した。

TraM\*を生産するプラスミドpABO22を保持する宿主菌MC1000をL-rich培地中で一晩前培養の後、L-rich培地 (0.2%グルコース、50  $\mu$ g/mlアンピシリンを含む) 250 mlに2.5 ml加え、500 ml容坂口フラスコ中で30℃にて振盪培養した。OD<sub>600</sub>が0.5~0.6となったところで培養温度を42℃にシフトしてさらに90分間振盪培養した後に氷水中で冷却し、遠心分離にて集菌した。以後の操作は、特に示さない限り0℃~4℃で行った。集めた菌体を40 mlの氷冷したAFバッファー (20 mM Tris·HCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM 2-mercaptoethanol, 1.6 M NaCl [pH 7.4]) (250  $\mu$  M phenylmethylsulfonyl fluoride [PMSF] を含む) で洗浄し、培地500 mlに相当する菌体 (湿重量で約1.5 g) を一つにまとめ、再び遠心分離で集菌した。集菌した菌体はドライアイス中で凍結させ、-80℃にて保存した。

菌体を氷冷したAFバッファー24 ml (PMSF 250  $\mu$  Mを含む) に懸濁し、Branson sonic oscillatorを用いて強度4、50%の間欠超音波処理にて細胞を破壊し、11000×gの遠心分離で破壊されずに残った細胞を沈殿させて除いた後に100000×gの超遠心分離で膜画分を除いた。このようにして得られた可溶性画分をp-amino-phenyl- $\beta$ -D-thiogalactoside (TPEG)-Sephroseカラムに通し、TraM\*をカラムに保持させ、AFバッファー (250  $\mu$  M PMSFを含む) 100 mlでカラムを洗い余分なタンパク質などを除いた後に、ほう酸バッファー (100 mM Na<sub>2</sub>B<sub>4</sub>O<sub>7</sub>, 10 mM 2-mercaptoethanol, [pH 10.0]) を用いてカラムから溶出させた。溶出したタンパク質は直ちにPD-10カラム (Pharmacia) を用いてバッファーB (10 mM Tris·HCl, 250 mM NaCl, 10 mM CaCl<sub>2</sub>, 10 mM 2-mercaptoethanol [pH 7.4]) に移し、10% [w/v]のグリセロールを含むバッファーB (バッファーB-G10) に対して透析し、TraM\*標品とした。精製の過程でのTraM\*の確認は、SDS-PAGE及びLacZ活性の測定によって行った。このようにして得られた標品はエッペンドルフチューブに分注し、ドライアイス中にて凍結の後-80℃で保存し、以後適宜融解して実験に供した。

## 12. タンパク質の定量

タンパク質の定量はBradfordの方法 (1976) に従い、bovine serum albumine (BSA: 生化学工業) をタンパク質量の標準として行なった。

### 13. タンパク質のゲル電気泳動

タンパク質のSDS-ポリアクリルアミドゲルによる電気泳動 (SDS-PAGE) は、Laemmliの方法 (1970) に従って行った。TraM\*に対してコラゲナーゼ処理を行った試料についてTraM\*の消失とTraM'の出現を確認するためにはHussainらの方法 (1980) に従って行った。いずれの方法においても、ゲルの染色にはクマシーブリリアントブルー (Sigma) を用いた。

### 14. DNAのゲル電気泳動

ゲルシフト法による解析は変性剤を加えないポリアクリルアミドゲルにて行なった。プラスミドDNAの制限酵素断片の回収には変性剤を加えないポリアクリルアミドゲルまたはアガロースゲルによる電気泳動を行なった。泳動バッファーにはTAEバッファー (40 mM Tris-acetate, 2 mM EDTA [pH 8.0]) を用いた (Sambrook et al., 1989)。

DNAシークエンシング、DNase I フットプリンティング、プライマー伸長法を行なう際には7M尿素を含むポリアクリルアミドゲル (シークエンシングゲル) を用いた電気泳動を行なった。泳動バッファーにはTBEバッファー (90 mM Tris-borate, 2 mM EDTA [pH 8.0]) を用いた (Sambrook et al., 1989)。

### 15. $\beta$ -ガラクトシダーゼ活性の測定

TraM\*を発現している菌、TraM\*標品などの $\beta$ -ガラクトシダーゼ活性 (LacZ活性) は、Millerの方法 (1972) に従い $o$ -nitrophenyl- $\beta$ -D-galactoside (ONPG; 和光純薬) を用いた比色法によって測定した。

TraM<sub>ATG</sub>-LacZ融合タンパク質による $\beta$ -ガラクトシダーゼ活性 (LacZ活性) は、0.2%のグルコースを含むL-rich培地中、30℃にてOD600が0.4~0.6になるまで振盪培養した培養液について、同様に測定した。

### 16. ゲルシフト法

TraM\*及びTraM'のDNAに対する結合はゲルシフト法を用いて調べた。

用いた直鎖DNAはプラスミドDNAを適当な制限酵素で切断し、フェノール処理、クロ

ロホルム処理、エタノール沈澱によって精製して得、TEバッファー (10 mM Tris·HCl, 1 mM EDTA [pH 8.0]) に溶解して保存した。DNA断片に対するタンパク質の結合は binding solution (50 mM NaCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.1 mM EDTA, 5 mM dithiothreitol (DTT; Nacalai)、0.1 mg/ml BSA、10% [w/v]グリセロール、25 mM MES-KOH) (MES: 2-(N-morpholino) ethanesulfonic acid (Sigma)) 中、28℃、20分間の条件で行なわせ、結合反応後直ちにTAEバッファー中でのポリアクリルアミドゲル電気泳動 (PAGE) に供し、臭化エチジウムによる染色でDNA断片のバンドの泳動度を観察した。反応液のpH値は、加えるMES-KOHによって調節した。binding solutionの組成を変えることで結合に対する各種イオンの影響を知ることが出来る。結合に対するヘパリンの影響は20分間の結合反応の後ヘパリンを加え、さらに5分間保温することによって調べた。

コンペティションの実験を行なう際には、*oriT*領域を含むDNA断片としてはpSI87-XE1の*DraI*-*Tth*HB8I 1131 bp断片の5'末端を<sup>32</sup>Pで標識して用い、コンペティターには互いに相補しあう一本鎖合成DNAをアニールさせて調製した二本鎖DNAを用いて以下のように行なった。

まず、コンペティター及びTraM\*標品を含む10 μlのbinding solution (前述) を28℃にて5分間保温し、そこにあらかじめ28℃にしておいた<sup>32</sup>Pで標識したDNA断片0.005 pmolを含むbinding solution 5 μlを加え、さらに28℃にて20分間保温しTraM\*と<sup>32</sup>P標識DNA断片との結合反応を行なわせた。その後直ちにTAEバッファー中でPAGEを行ない、電気泳動終了後ゲルを真空加熱乾燥し、オートラジオグラフィーによりバンドを視覚化してそれを観察した。

## 17. TraM\*タンパク質のコラゲナーゼ処理

TraM\*のTraM部分 (TraM') とLacZ部分とを分離するためにTraM\*標品に対してコラゲナーゼ処理を行った。TraM\*標品の溶媒であるバッファーB-G10はコラゲナーゼの反応条件を満たす組成であるので、これに直接コラゲナーゼを加えることで反応を行なわせることが出来る (Inamoto et al., 1990)。TraM\*標品 (0.6 pmol / μlのTraM\*を含む) に対しコラゲナーゼ保存液 (コラゲナーゼ0.9 μg / μlを含むバッファーB-G50) を適量加え30℃にて15分間反応させた後氷中にて冷却した。TraM'の生成はSDS-PAGEにて確認した。このTraM\*をコラゲナーゼ処理した溶液 (LacZ部分やコラゲナーゼなども含む) をTraM'標品としてゲルシフト法に用いた。

## 18. DNA断片の $^{32}\text{P}$ による5'末端標識

DNA断片の5'末端はT4 polynucleotide kinase及び $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ を用いたリン酸化反応によって $^{32}\text{P}$ にて標識した。

DNase Iフットプリンティング法に用いた片側の5'末端のみを $^{32}\text{P}$ で標識したDNA断片は以下のように作製した(図2-9A)。

*EaeI*側を標識した353塩基対(353-bp)の*HphI-EaeI*断片を作製するために、まずプラスミドpSI87-XE1を*EaeI*で切断し、ポリアクリルアミドゲル電気泳動(PAGE)の後1018-bpの断片をゲルから回収し精製した(Maxam and Gilbert, 1980; Sambrook et al., 1989)。この断片の5'末端をCIAPによる脱リン酸化処理後、T4 polynucleotide kinase及び $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ を用いて $^{32}\text{P}$ 標識し、*HphI*で切断した後に353-bp *HphI-EaeI*断片を同様にPAGE後ゲルから回収し精製した。

*DraI*側を標識した288-bp *DraI-EaeI*断片は、プラスミドpSI87-XE1の1131-bp *DraI-TthHB8I*断片を上記と同様にゲルから回収、精製して $^{32}\text{P}$ 標識し、*EaeI*にて切断し、同様にPAGE後ゲルから回収し精製して得た。

ゲルシフト法に用いた1131-bp *DraI-TthHB8I*断片は、上記と同様に $^{32}\text{P}$ 標識した断片を*EaeI*による切断を行わずに用いた。反応液中に残存するT4 polynucleotide kinase及び $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ はフェノール処理、クロロホルム処理、エタノール沈殿による精製で除き、得られた $^{32}\text{P}$ 標識断片はTEバッファーに溶解して用いた。

いずれの場合も精製したDNA断片はTEバッファーに溶解した。

## 19. DNase Iフットプリンティング法

*oriT*領域におけるTraM\*の結合部位を決定するためにはDNase Iフットプリンティング法を用いた(Galas and Schmitz, 1978; Inamoto et al., 1990)。

$^{32}\text{P}$ で標識したDNA断片(約0.1 pmol)を100  $\mu\text{l}$ のbinding solution中、28℃、20分間の条件でTraM\*と結合させた反応液にDNase I 1  $\mu\text{l}$  (0.001 units)を加え28℃で2分間反応させてDNAを部分消化させた後、20  $\mu\text{l}$ のDNase I反応停止液(2.6 M  $\text{NH}_4\text{Ac}$ 、87 mM EDTA、130  $\mu\text{g/ml}$  sonicated salmon sperm DNA)を加えてDNase Iの反応を停止させた。フェノール処理、エタノール沈殿でタンパク質を除いた後に泳動バッファー(50% [v/v] formamide, 5 mM EDTA, 0.01% [w/v] xylene cyanol, 0.01% [w/v] bromophenol blue)に溶解し、熱変性させ、シークエンシングゲルによる電気泳動でDNA鎖を分離した。フットプリントのパターンはゲルを真空加熱乾燥後オートラジオグラフィーにて視覚化して観察した。DNA鎖の位置マーカーには、末端標識した合成プライマーを用いてジデオキシ法

にて調製したシークエン斯拉ダーを用いた。

## 20. P1トランスダクション

MC1000に*hip*変異を導入してTA1000を得る際にはP1トランスダクションを行なった。まずYK2523 ( $\Delta 3[hip]::cat$ )の培養液に5 mMとなるように $CaCl_2$ を加えた後にm.o.i.が0.01~0.05になるようにP1kcファージを感染させ、R Top agar中で37℃8時間保温してファージを増殖させた。R Top agarを回収し、遠心分離を行ない分離した水相から滲出したファージを回収した。クロロホルムを加えて混入したYK2523を殺菌し、タイターを測定してファージ標品とした。MC1000の培養液に5 mMとなるように $CaCl_2$ を加え、得られたファージ標品を加えて37℃15分間感染させ、その直後にクエン酸ナトリウムを15%になるように加えて重感染を防ぐ。菌体を集めてEHA培地で洗浄した後にEHA培地中で37℃30分間培養し、30  $\mu$ g/mlのCmを含むEHAプレート上でCm耐性のコロニーを選択した。得られたコロニーについて30  $\mu$ g/mlのCmを含むEHAプレート上で単コロニー分離を数回繰り返して、P1ファージを含まないことを確認してTA1000を得た。*lac*<sup>-</sup>であることはX-galとIPTGを含むプレートで、IHF<sup>-</sup>であることはpHS12による形質転換ができないことでそれぞれ確認した。P1ファージのタイター測定の際の指示菌にはC600を用いた。

## 21. RNAの調製

大腸菌細胞からの全RNAの調製は、Miller (1972) 及びAibaら (1981) の方法に従って行なった。

0.2%のグルコース及び適当な薬剤を含むL-rich培地中でA600が0.5~0.6になるまで菌体を増殖させ、培地中に直接氷を加えて急冷し、遠心分離にて集菌した。集めた菌体を0.5%のSDS[Nacalai]を含む0.5 mlのSol A (20 mM sodium acetate, 10 mM EDTA [pH 5.5])に懸濁し、あらかじめ60℃に保温しておいたSol Aで飽和したフェノールを0.5 ml加え、60℃で5分間振盪してフェノール抽出を行なった。遠心分離にて水相を分離し、そこに抽出されたRNAをエタノール沈殿にて回収し、さらに混入したDNAを塩化セシウム密度勾配超遠心を利用して除き、RNA標品とした。操作の全段階を通してRNA標品のバッファーには0.5%のSDSを含むSol Aを用い、保存する際には-20℃にて凍結した。RNA濃度はOD<sub>260</sub>の値から決定した。

## 22. プライマー伸長法による転写産物の5'末端の決定

プライマー伸長法はSambrookら(1989)のプロトコルを参考に適宜改良を加えて行なった。

5'末端を<sup>32</sup>Pで標識したプライマー1 pmolを約20 μgのRNAと混合し、RNase inhibitor及び10 mMのDTTを含むANバッファー(250 mM KCl, 10 mM Tris-HCl (pH 8.5) [Sigma])中で37℃、2時間保温してアニールさせた。エタノール沈殿にて核酸を回収し、RNase inhibitor及び10 mMのDTTを含むRTバッファー(50 mM KCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 50 mM Tris-HCl (pH 8.5))に溶解した後、dNTPを各々2 mMとなるように加え、さらに逆転写酵素(Reverse transcriptase RAV-2)を加えて42℃、2時間保温して逆転写反応(reverse transcription)を行なわせた。DNAが合成された反応液にRNase Aを加え、42℃、30分間反応させてRNAを分解し、フェノール抽出、エタノール沈殿により精製したDNAをシーケンシングゲルで電気泳動してオートラジオグラフィにて視覚化し、その鎖長を決定した。合成されたDNA鎖長のマーカーには、逆転写反応に用いたのと同じプライマーを用い、対象とするmRNAを得るのに用いたプラスミドに対して行なったシーケンスラダーを使用した。

## 23. 接合伝達

接合伝達効率は液体培地中で接合を行なわせて測定した。

供与菌はLB培地中で一晩前培養した培養液0.1 mlをLB培地3 mlに加え、100 ml容量の三角フラスコ中で37℃にて三時間静置培養して性繊毛を十分に形成させた。受容菌はLB培地中で一晩前培養した培養液1 mlを5 mlのLB培地に加え、試験管内で37℃にて三時間振盪培養した。供与菌、受容菌双方とも三時間の培養の後に0.1 mlを分取して適宜希釈してプレート上に塗布し、接合伝達前のそれぞれの生菌数を調べた。受容菌培養液2.5 mlを三角フラスコ中の供与菌培養液に穏やかに加え、37℃にて一時間静置培養して接合伝達を行なわせた。供与菌の培養及び接合伝達に三角フラスコを用いるのは表面積を大きくしてエアレーションを良くするためであり、静置するのは性繊毛や接合対が物理的な力に弱く振盪培養では接合伝達効率が下がり、再現性も悪くなるからである。接合伝達を行なわせた培養液は適宜希釈してプレート上に塗布し、薬剤耐性を示すコロニーによって受容菌、供与菌、transconjugantの生菌数をそれぞれ調べた。供与菌はKm、Cm、X-gal、IPTGを含むプレート上で白いコロニーを形成する。受容菌はRifを含むプレート上でコロニーを形成する。pABOプラスミドが伝達したtransconjugantはKm、Rifを含むプレート上、R100-1が伝達したプラスミドはCm、Rifを含むプレート上、pABOプラス

ミド、R100-1双方が伝達したtransconjugantはKm、Cm、Rifを含むプレート上でそれぞれコロニーを形成する。接合伝達頻度は、一時間の接合伝達が終わった培養液中の供与菌細胞数当たりのtransconjugant細胞数で表わした。接合伝達に際しては、供与菌対受容菌の細胞比は約1対10となるようにした。

## 参考文献

- Abdel-Monem, M. G. Taucher-Scholz, and M.-Q. Klinkert. 1983. Identification of *Escherichia coli* DNA helicase I as the *traI* gene product of the F sex factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80: 4659-4663.
- Achtman, M., B. Kusecek, and K. N. Timmis. 1978. *tra* cistrons and protein encoded by the *Escherichia coli* antibiotic resistance plasmid R6-5. *Mol. Gen. Genet.* 163: 169-179.
- Achtman, M., P. A. Manning, C. Edelbluth, and P. Herrlich. 1979. Export without proteolytic processing of inner and outer membrane proteins encoded by sex factor *tra* cistrons in *Escherichia coli* minicells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76: 4837-4841.
- Aiba, H., S. Adhya, and B. Crombrugghe. 1981. Evidence for two functional *gal* promoters in intact *Escherichia coli* cells. *J. Biol. Chem.* 256: 11905-11910.
- Alfaro, G., and N. Willetts. 1972. The relationship between the transfer systems of some bacterial plasmids. *Genet. Res.* 20: 279-289.
- Armstrong, K. A., R. Acosta, E. Ledner, Y. Machida, M. Pancott, M. McCormick, H. Ohtsubo, and E. Ohtsubo. 1984. A  $37 \times 10^3$  molecular weight plasmid-encoded protein is required for replication and copy number control in the plasmid pSC101 and its temperature-sensitive derivative pHS1. *J. Mol. Biol.* 175: 331-347.
- Bachmann, B. J. 1987. Derivations and genotypes of some mutant derivatives of *Escherichia coli* K-12. p. 1190-1219. In F. C. Neidhardt, J. L. Ingraham, K. B. Low, B. Magasanik, M. Schaechter, and H. E. Umbarger (ed.), *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*: Cellular and molecular biology. American Society for Microbiology, Washington, D. C.
- Bradford, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 248-254.
- van Biesen, T., F. Soderbom, E. Gerhart, H. Wagner, and L. S. Frost. 1993. Structural and functional analyses of the FinP antisense RNA regulatory system of the F conjugative plasmid. *Mol. Microbiol.* 10: 35-43.
- Bukhari, A. I., J. A. Shapiro, and S. L. Adhya. 1977. DNA insertion elements, plasmids, and episomes, p. 601-704. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N. Y.
- Campbell, A. M. 1969. Episomes. *Advanced Genet.* 11: 101-145.
- Caro, L. G., and M. Schnos. 1966. The attachment of the male-specific bacteriophage  $\phi 1$  to sensitive strains of *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 56: 126-132.
- Casadaban, M. J., and S. N. Cohen. 1980. Analysis of gene control signals by DNA fusion

- and cloning in *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.* 138:179-207.
- Cavalli-Sforza, L. L. 1950. La sessualità nei batteri. *Boll. ist. sieroterap. milan.* 29: 281-289.
- Chang, A. C. Y., and S. N. Cohen. 1978. Construction and characterization of amplifiable multicopy DNA cloning vehicles derived from the P15A cryptic miniplasmid. *J. Bacteriol.* 134:1141-1156.
- Clewell, D. B. 1993. Sex pheromones and the plasmid-encoded mating response in *Enterococcus faecalis*. p. 349-368. In D. B. Clewell (ed.), *Bacterial conjugation*. Plenum Press, New York.
- Clewell, D. B. and S. E. Flannagan. 1993. The conjugative transposons of Gram-positive Bacteria. p. 369-394. In D. B. Clewell (ed.), *Bacterial conjugation*. Plenum Press, New York.
- Cohen, A., W. D. Fisher, R. Curtiss III, and H. I. Adler. 1968. The properties of DNA transferred to minicells during conjugation. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 33:635-641.
- Chung, C. T., S. L. Niemela, and H. Miller. 1989. One-step preparation of competent *Escherichia coli*: Transformation and storage of bacterial cells in the same solution. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:2172-2175.
- Dempsey, W. B. 1987. Integration host factor and conjugative transfer of the antibiotic resistance plasmid R100. *J. Bacteriol.* 169:4391-4392.
- Dempsey, W. B. 1989. Sense and antisense transcripts of *traM*, a conjugal transfer gene of the antibiotic resistance plasmid R100. *Mol. Microbiol.* 3:561-570.
- Dempsey, W. B. 1993. Key regulatory aspects of transfer of F-related plasmids. p. 53-74. In D. B. Clewell (ed.), *Bacterial conjugation*. Plenum Press, New York.
- Dempsey, W. B., and B. E. Fee. 1990. Integration host factor affects expression of two genes at the conjugal transfer origin of plasmid R100. *Mol. Microbiol.* 4:1019-1028.
- Dempsey, W. B., and S. A. McIntire. 1983. The *finO* gene of antibiotic resistance plasmid R100. *Mol. Gen. Genet.* 190:444-451.
- Di Laurenzio, L., L. S. Frost, B. Finlay, and W. Paranchych. 1991. Characterization of the *oriT* region of the IncFV plasmid pED208. *Mol. Microbiol.* 5:1779-1790.
- Di Laurenzio, L., L. S. Frost, and W. Paranchych. 1992. The TraM protein of the conjugative plasmid F binds to the origin of transfer of the F and ColE1 plasmids. *Mol. Microbiol.* 6:2951-2959.
- Everett, R., and N. Willetts. 1980. Characterization of an *in vivo* system for nicking at the origin of conjugal DNA transfer of the sex factor F. *J. Mol. Biol.* 136:129-150.
- Fee, B. E., and W. B. Dempsey. 1986. Cloning, mapping, and sequencing of plasmid R100

- traM* and *finP* genes. *J. Bacteriol.* **167**:336-345.
- Finlay B. B., L. S. Frost, and W. Paranchych. 1986. Origin of transfer of IncF plasmids and nucleotide sequences of the type II *oriT*, *traM*, and *traY* alleles from ColB4-K98 and the type IV *traY* allele from R100-1. *J. Bacteriol.* **168**:132-139.
- Finnegan, D. and N. Willetts. 1973. The site of action of the F transfer inhibitor. *Mol. Gen. Genet.* **127**:307-316.
- Friedman, D. I. 1988. Integration host factor: A protein for all reasons. *Cell* **55**:545-554.
- Frost, L. S. 1993. Conjugative pili and pilus-specific phages. p. 189-222. In D. B. Clewell (ed.), *Bacterial conjugation*. Plenum Press, New York.
- Gaffney, D., R. Skurray, and N. Willetts. 1983. Regulation of the F conjugation genes studied by hybridization and *tra-lacZ* fusion. *J. Mol. Biol.* **168**:103-122.
- Galas, D. J., and A. Schmitz. 1978. DNase footprinting: A simple method for the detection of protein-DNA binding specificity. *Nucleic Acids Res.* **5**:3157-3170.
- Gamas, P., L. Caro, D. Galas, and M. Chandler. 1987. Expression of F transfer functions depends on the *Escherichia coli* integration host factor. *Mol. Gen. Genet.* **207**:302-305.
- Germينو, J., and D. Bastia. 1984. Rapid purification of cloned gene product by genetic fusion and site-specific proteolysis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **81**:4692-4696.
- Graus-Goldner, A., H. Graus, T. Schlacher, and G. Hogenauer. 1990. The sequences of genes bordering *oriT* in the enterotoxin plasmid P307: comparison with the sequences of plasmids F and R1. *Plasmid* **24**:119-131.
- Harada, K., and S. Mitsuhashi. 1977. Physiology of R factors. p. 135-160. In S. Mitsuhashi (ed.), *R factor, drug resistance plasmid*. University of Tokyo Press, Tokyo.
- Hayes, W. 1953a. The mechanism of genetic recombination in *E. coli*. *Cold Spring Harbor Symposia Quant. Biol.* **18**:75-93.
- Hayes, W. 1953b. Observation on a transmissible agent determining sexual differentiation in *Bact. coli*. *J. Gen. Microbiol.* **8**:72-88.
- He, M., A. Wilde, and M. A. Kaderbhai. 1989. A simple single-step procedure for small-scale preparation of *Escherichia coli* plasmids. *Nucleic Acids Res.* **18**:1660.
- Hirota, Y. 1960. The effect of acridine dyes on mating type factors in *E. coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **46**:57-64.
- Hussain, M., S. Ichihara, and S. Mizushima. 1980. Accumulation of glyceride-containing precursor of the outer membrane lipoprotein in the cytoplasmic membrane of *Escherichia coli* treated with globomycin. *J. Biol. Chem.* **255**:3707-3712.
- Ichikawa, H., K. Ikeda, W. L. Wishart, and E. Ohtsubo. 1987. Specific binding of transposase to terminal inverted repeats of transposable element Tn3. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **84**:8220-8224.

- Ihler, G., and W. D. Rupp. 1969. Strand-specific transfer of donor DNA during conjugation in *E. coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **63**: 138-143.
- Inamoto, S., and E. Ohtsubo. 1990. Specific binding of the TraY protein to *oriT* and the promoter region for the *traY* gene of plasmid R100. *J. Biol. Chem.* **265**: 6461-6466.
- Inamoto, S., Y. Yoshioka, and E. Ohtsubo. 1988. Identification and characterization of the products from the *traJ* and *traY* genes of plasmid R100. *J. Bacteriol.* **170**: 2749-2757.
- Inamoto, S., Y. Yoshioka, and E. Ohtsubo. 1991. Site- and strand specific nicking in vitro at *oriT* by the TraY-TraI endonuclease of plasmid R100. *J. Biol. Chem.* **266**: 10086-10092.
- Ippen-Ihler, K. A., and E. G. Minkley, Jr. 1986. The conjugation system of F, the fertility factor of *Escherichia coli*. *Annu. Rev. Genet.* **20**: 593-624.
- Ippen-Ihler, K. and R. A. Skurray. 1993. Genetic organization of transfer-related determinants on the sex factor F and related plasmids. p. 23-52. In D. B. Clewell (ed.), Bacterial conjugation. Plenum Press, New York.
- Ishiwa, H., and H. Shibahara-Sone. 1986. New shuttle vectors for *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis*. IV. The nucleotide sequence of pHY300PLK and some properties in relation to transformation. *Jpn. J. Genet.* **61**: 515-528.
- Iuchi, S., and E. C. C. Lin. 1992. Purification and phosphorylation of the Arc regulatory components of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **174**: 5617-5623.
- Jacob, F., and E. Wollman. 1961. Sexuality and the genetics of bacteria. Academic Press.
- Jalajakumari, M. B., A. Guidolin, H. J. Buhk, P. A. Manning, L. M. Ham, A. L. M. Hodgson, K. C. Cheah, and R. A. Skurray. 1987. Surface exclusion genes *traS* and *traT* of the F sex factor of *Escherichia coli* K-12. Determination of the nucleotide sequence and promoter and terminator activities. *J. Mol. Biol.* **198**: 1-11.
- Kleckner, N., R. K. Chan, B. K. Tye, and D. Botstein. 1975. Mutagenesis by insertion of a drug-resistance element carrying an inverted repetition. *J. Mol. Biol.* **87**: 561-575.
- Komano, T., A. Kubo and T. Nishioka. 1987. Shufflon: multi-insertion of four contiguous DNA segments of plasmid R64 creates seven different open reading frames. *Nucleic Acids Res.* **15**: 1165-1171.
- Koraimann, G., C. Koraimann, V. Koronakis, S. Schlager, and G. Hogenauer. 1991. Repression and derepression of conjugation of plasmid R1 by wild-type and mutated *finP* antisense RNA. *Mol. Microbiol.* **5**: 77-87.
- Koraimann, G., C. C. Schroller, H. Graus, D. Angerer, K. Teferle, and G. Hogenauer. 1993. Expression of gene 19 of the conjugative plasmid R1 is controlled by RNase III. *Mol. Microbiol.* **9**: 717-727.
- Koronakis, V. E., E. Bauer, and G. Hogenauer. 1985. The *traM* gene of the resistance plasmid R1: comparison with the corresponding sequence of the *Escherichia coli* F

- factor. *Gene* **36**: 79-86.
- Kunkel, T. A. 1985. Rapid and efficient site-specific mutagenesis without phenotypic selection. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **82**: 488-492.
- Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685.
- Lebek, G. 1963. Ueber die Entstehung mehrfachresistenter Salmonellen. Ein experimenteller Beitrag. *Zentr. Bakteriол. Parasitenk. Abt. I Orig.* **188**: 494-505.
- Lederberg, J., L. L. Cavalli, and E. M. Lederberg. 1952. Sex compatibility in *Escherichia coli*. *Genetics* **37**: 720-730.
- Lederberg, J., and E. L. Tatum. 1946a. Novel genotypes in mixed cultures of biochemical mutants of bacteria. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* **11**: 113-114.
- Lederberg, J., and E. L. Tatum. 1946b. Gene recombination in *Escherichia coli*. *Nature* **158**: 558.
- Lee, S. H., L. S. Frost, and W. Paranchych. 1992. FinOP repression of the F plasmid involves extension of the half-life of FinP antisense RNA by FinO. *Mol. Gen. Genet.* **235**: 131-139.
- Lopez, J., L. Salazar, I. Andres, J. M. Ortiz, and J. C. Rodrigues. 1991. Nucleotide sequence of the *oriT-traM-finP* region of the haemolytic plasmid pSU316: comparison to F. *Nucleic Acids Res.* **19**: 3451.
- Machida, Y., C. Machida, and E. Ohtsubo. 1982. A novel type of transposon generated by insertion element IS102 present in a pSC101 derivative. *Cell* **30**: 29-36.
- Maneewannakul, K., S. Maneewannakul, and K. Ippen-Ihler. 1993. Synthesis of F pilin. *J. Bacteriol.* **175**: 1384-1391.
- Maniatis, T., E. F. Fritsch, and J. Sambrook. 1982. Molecular cloning: A laboratory manual, p. 90-91 and p. 171-172. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N. Y.
- Manning, P. A., G. Morelli, and M. Achtman. 1981. *traG* protein of the F sex factor of *Escherichia coli* K-12 and its role in conjugation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **78**: 7487-7491.
- Marmur, J., R. Rownd, S. Falkow, L. S. Baron, C. Schildkrant and P. Doty. 1961. The nature of intergeneric episomal infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **47**: 972-979.
- Matson, S. W., and B. S. Morton. 1991. *Escherichia coli* DNA helicase I catalyzes a site- and strand-specific nicking reaction at the F plasmid *oriT*. *J. Biol. Chem.* **266**: 16232-16237.
- Maxam, A. M., and W. Gilbert. 1980. Sequencing end-labeled DNA with base-specific chemical cleavages. *Methods Enzymol.* **65**: 499-560.

- Messing, J. 1983. New M13 vectors for cloning. *Methods Enzymol.* 101:20-78.
- Meynell, E., and N. Datta. 1966. The relation of resistance transfer factors to the F-factor (sex-factor) of *Escherichia coli* K12. *Genet. Res.* 7:134-140.
- Miller, J. H. 1972. Experiments in molecular genetics, p. 433 and 352-355. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N. Y.
- Mitsuhashi, S., K. Harada, and H. Hashimoto. 1960. Multiple resistance of enteric bacteria and transmission of drug resistance to other strains by mixed cultivation. *Japan. J. Exp. Med.* 30:179.
- Moore, D., C. M. Hamilton, K. Maneewannakul, Y. Mintz, L. S. Frost, and K. Ippen-Ihler. 1993. The *Escherichia coli* K-12 F plasmid gene *traX* is required for acetylation of F pilin. *J. Bacteriol.* 175:1375-1383.
- Mullineaux, P., and N. Willetts. 1985. Promoters in the transfer region of plasmid F, p. 605-614. In D. R. Helinski, S. N. Cohen, D. B. Clewell, D. A. Jackson, and A. Hollaender (ed.), *Plasmids in bacteria*. Plenum Publishing Corp., New York.
- Nakaya, R., A. Nakamura, and Y. Murata. 1960. Resistance transfer agents in *Shigella*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 3:654-659.
- Nelson, W. C., B. S. Morton, E. E. Lahue, and S. W. Matson. 1993. Characterization of the *Escherichia coli* F factor *traY* gene product and its binding sites. *J. Bacteriol.* 175:2221-2228.
- Ohki, M., and J. Tomizawa. 1968. Asymmetric transfer of DNA strands in bacterial conjugation. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 33:651-658.
- Ohtsubo, E. 1970. Transfer-defective mutants of sex factors in *Escherichia coli*. II. Deletion mutants of an F-prime and deletion mapping of cistrons involved in genetic transfer. *Genetics* 64:189-197.
- Ohtsubo, E., M. Rosenbloom, H. Schrempp, W. Goebel, and J. Rosen. 1978. Site specific recombination involved in the generation of small plasmids. *Mol. Gen. Genet.* 159:131-141.
- Ohtsubo, E., Y. Nishimura, and Y. Hirota. 1970. Transfer-defective mutants of sex factors in *Escherichia coli*. I. Defective mutants and complementation analysis. *Genetics* 64:173-188.
- Ostermann, E., F. Kricek, and G. Hogenauer. 1984. Cloning the origin of transfer region of the resistance plasmid R1. *EMBO J.* 3:1731-1735.
- Ozeki, H., and S. Howarth. 1961. Colicine factors as fertility factors in bacteria: *Salmonella typhimurium* strain LT2. *Nature* 190:986-988.
- Pramoonjago, P., M. Kaneko, T. Kinoshita, E. Ohtsubo, J. Takeda, K. Hong, R. Inagi, and K. Inoue. 1992. Role of TraT protein, an anticomplementary protein produced in

- Escherichia coli* by R100 factor, in serum resistance. *J. Immunol.* **148**:827-836.
- Reygers, U., R. Wessel, H. Muller, and H. Hoffmann-berling. 1991. Endonuclease activity of *Escherichia coli* DNA helicase I dereceted against the transfer origin of the F factor. *EMBO J.* **10**:2689-2694.
- Rupp, W. D., and G. Ihler. 1968. Strand selection during bacterial mating. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* **33**: 647-650.
- Salazar, L., J. Lopez, I. Andres, J. M. Ortiz, and J. C. Rodriguez. 1992. Characterization and nucleotide sequence of the *oriT-traM-finP* region of the IncFVII plasmid pSU233. *Mol. Gen. Genet.* **234**: 442-448.
- Sambrook, J., E. F. Fritsch, and T. Maniatis. 1989. Molecular cloning: Laboratory manual, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N. Y.
- Sanger, F., S. Nicklen, and A. R. Coulson. 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74**: 5463-5467.
- Schwab, M., H. Gruber, and G. Hogenauer. 1991. The TraM protein of plasmid R1 is a DNA-binding protein. *Mol. Microbiol.* **5**: 439-446.
- Schwab, M., H. Reisenzein, and G. Hogenauer. 1993. TraM of plasmid R1 regulates its own expression. *Mol. Microbiol.* **7**: 795-803.
- Sharp, P. A., S. N. Cohen, and N. Davidson. 1973. Electron microscope heteroduplex studies of sequence relations among plasmids of *Escherichia coli* II. Structure of drug resistance (R) factors and F factors. *J. Mol. Biol.* **75**: 235-255.
- Silverman, P. M. 1985. Host cell-plasmid interactions in the expression of DNA donor activity by F' strains of *Escherichia coli* K-12. *Bio Essays* **2**: 254-259.
- Silverman, P. M. 1987. The structural basis of prokaryotic DNA transfer, p. 277-309. In: M. Inoue (ed.) *Bacterial outer membranes as model systems*, John Wiley & Sons, New York.
- Stoker, N. G., N. F. Fairweather, and B. G. Spratt. 1982. Versatile low-copy-number plasmid vectors for cloning in *Escherichia coli*. *Gene* **18**: 335-341.
- Sugino, Y., and Y. Hirota. 1962. Conjugal fertility associated with resistance factor R in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **84**: 902-910.
- Sukupolvi, S., and D. O'Connor. 1990. TraT Lipoprotein, a plasmid-specified mediator of interactions between Gram-negative bacteria and their environment. *Microbiol. rev.* **54**: 331-341.
- Takeshita, S., M. Sato, M. Toba, W. Masahashi, and T. Hashimoto-Gotoh. 1987. High-copy-number and low-copy-number plasmid vectors for *lacZ*  $\alpha$ -complementation and chloramphenicol- or kanamycin-resistance selection. *Gene* **61**: 63-74.
- Taylor, D. P., J. Greenberg, and R. H. Rownd. 1977. Generation of miniplasmids from

- copy number mutant of the R plasmid NR1. *J. Bacteriol.* 132:986-995.
- Thompson, R., and L. Taylor. 1982. Promoter mapping and DNA sequencing of the F plasmid transfer genes *traM* and *traJ*. *Mol. Gen. Genet.* 188:513-518.
- Thompson, R., L. Taylor, K. Kelly, R. Everett, and N. Willetts. 1984. The F plasmid origin of transfer: DNA sequence of wild-type and mutant origins and location of origin-specific nicks. *EMBO J.* 3:1175-1180.
- Traxler, B. A., and E. G. Minkley, Jr. 1988. Evidence that DNA helicase I and *oriT* site-specific nicking are both functions of the F TraI protein. *J. Mol. Biol.* 204:205-209.
- Tsai, M.-M., Y.-H. F. Fu, and R. Deonier. 1990. Intrinsic bends and integration host factor binding at F plasmid *oriT*. *J. Bacteriol.* 172:4603-4609.
- Ullmann, A. 1984. One-step purification of hybrid proteins which have  $\beta$ -galactosidase activity. *Gene* 29:27-31.
- Vapnek, D., and W. D. Rupp. 1970. Asymmetric segregation of the complementary sex-factor DNA strands during conjugation in *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.* 53:287-303.
- Vapnek, D., and W. D. Rupp. 1971. Identification of individual sex-factor DNA strands and their replication during conjugation in thermosensitive DNA mutants of *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.* 60:413-424.
- Vieira and Messing. 1987. Production of single-stranded plasmid DNA. *Methods Enzymol.* 153:3-11.
- Watanabe, T., and T. Fukasawa. 1960. Resistance transfer factor, an episome in Enterobacteriaceae. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 3:660.
- Watanabe, T., and T. Fukasawa. 1961. Episome-mediated transfer of drug resistance in Enterobacteriaceae. I. Transfer of resistance factors by conjugation. *J. Bacteriol.* 81:669-678.
- Willetts, N. 1971. Plasmid specificity of two proteins required for conjugation in *E. coli* K12. *Nature New Biology* 230:183-185.
- Willetts, N., and B. Wilkins. 1984. Processing of plasmid DNA during bacterial conjugation. *Microbiol. Rev.* 48:24-41.
- Willetts, N., and J. Maule. 1986. Specificities of IncF plasmid conjugation genes. *Genet. Res.* 47:1-11.
- Willetts, N., and R. Skurray. 1980. The conjugation system of F-like plasmids. *Annu. Rev. Genet.* 14:41-76.
- Willetts, N., and R. Skurray. 1987. Structure and function of the F factor and mechanism of conjugation, p. 1110-1133. In F. C. Neidhardt, J. L. Ingraham, K. B. Low, B. Magasanik, M. Schaechter, and H. E. Umbarger (ed.), *Escherichia coli* and

*Salmonella typhimurium*: Cellular and molecular biology. American Society for Microbiology, Washington, D. C.

- Womble, D. D. and R. M. Rownd. 1988. Genetic and physical map of plasmid NR1: comparison with other IncFII antibiotic resistance plasmids. *Microbiol. Rev.* 52: 433-451.
- Yanisch-Perron, C., J. Vieira, and J. Messing. 1985. Improved M13 phage cloning vectors and host strains: Nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC18 vectors. *Gene* 33: 103-119.
- Yoshioka, Y., H. Ohtsubo, and E. Ohtsubo. 1987. Repressor gene *finO* in plasmids R100 and F: Constitutive transfer of plasmid F is caused by insertion of IS3 into F *finO*. *J. Bacteriol.* 169:619-623.
- Yoshioka, Y., Y. Fujita, and E. Ohtsubo. 1990. Nucleotide sequence of the promoter-distal region of the *tra* operon of plasmid R100, including *traI* (DNA helicase I) and *traD* genes. *J. Mol. Biol.* 214:39-53.
- Zheng, Z. X., M. Chandler, R. Hipskind, M. Clerget, and L. Caro. 1982. Dissection of the *r*-determinants of the plasmid R100.1: the sequence at the extremities of Tn21. *Nucleic Acids Res.* 9: 6265-6278.

## 謝辞

本研究を遂行するに当たりご指導頂きました東京大学分子細胞生物学研究所・生物物理研究分野、大坪栄一教授に深く感謝いたします。日頃より研究について、コンピューターワークについて、貴重な助言を頂きました真木寿治助教授、大坪久子助手、関根靖彦助手、布村和子博士、いわき明星大学の前田好美教授に感謝いたします。生物物理研究分野入室当初から研究の実際について懇切丁寧に指導して下さった吉岡泰博士、稲本進博士に感謝いたします。プラスミドpJG200、pR-pMLBを分与して下さいましたD. Bastia博士、大腸菌株YK2523を分与して下さいました京都薬科大学の加納康正助教授、大腸菌株JE177を分与して下さいました国立遺伝学研究所の西村昭子助教授、IHFタンパク質を分与して下さいました金沢大学の山口和男教授に深く感謝いたします。五年間もの大学院生活を快く許し、支えてくれた両親に感謝いたします。最後になりましたが共同研究者として常に有意義な討論をし、また、有用な実験材料を分与して下さいました福田博政氏、瀧景子氏をはじめとする生物物理研究分野の皆様にご心よりお礼申し上げます。

