

博士論文

芳香族化合物分解プラスミドの接合伝達を担う

遺伝子の包括的機能解明

平成 28 年度

東北大学大学院生命科学研究科

生態システム生命科学専攻

岸田 康平

序章 .....	5
第 1 章 NAH7 の接合伝達開始領域 <i>oriT</i> と relaxase の同定と解析 .....	21
1-1. 緒言.....	21
1-2. 材料及び方法 .....	21
1-2-1. 使用菌株・プラスミド、培地及び培養条件.....	21
1-2-2. DNA の取り扱い.....	24
1-2-3. プラスミドの作製 .....	27
1-2-4. heat shock 法による大腸菌の形質転換法 .....	33
1-2-5. electroporation 法による形質転換法 .....	33
1-2-6. DNA 塩基配列決定法 .....	34
1-2-7. <i>nic</i> site 欠失 NAH7 の作製.....	34
1-2-8. 接合伝達実験 .....	34
1-2-9. Resolution Assay .....	35
1-2-10. His タグを付与した TraC <sub>N292</sub> の大量発現と精製 .....	35
1-2-11 タンパク質濃度の定量 .....	38
1-2-12 SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動(SDS-PAGE) .....	38
1-2-13. <i>nic</i> site の同定 .....	39
1-3. 結果.....	40
1-3-1. NAH7 の <i>oriT</i> の同定 .....	40
1-3-2. TraC による 2 つの <i>oriT<sub>N</sub></i> 間の部位特異的組換え .....	43
1-3-3. NAH7 の <i>nic</i> site の同定 .....	43
1-3-4. <i>oriT</i> の deletion 解析 .....	47
1-4 考察.....	47
第 2 章 NAH7 と pWW0 の接合伝達システムの機能互換性解析 .....	54
2-1. 緒言.....	54
2-2. 材料及び方法 .....	54
2-2-1. 使用菌株・プラスミド、培地及び培養条件.....	54
2-2-2. DNA の取り扱い.....	54
2-2-3. electroporation 法による形質転換法 .....	54
2-2-3. プラスミドの作製 .....	57
2-2-4. 接合伝達実験 .....	57
2-2-5 Resolution Assay .....	57
2-3. 結果.....	60

2-3-1. pWW0 の <i>traD-traA</i> 間は <i>oriT</i> として機能する.....	60
2-3-2. NAH7 と pWW0 の接合伝達システムは機能互換性がある.....	60
2-3-3. NAH7 と pWW0 は両種プラスミドの <i>oriT</i> 間の部位特異的組換えを触媒する.....	60
2-4 考察.....	63
第3章 relaxase の機能解析.....	66
3-1. 緒言.....	66
3-2. 材料及び方法.....	66
3-2-1. 使用菌株・プラスミド、培地及び培養条件.....	66
3-2-2. DNA の取り扱い.....	66
3-2-3. electroporation 法による形質転換法.....	66
3-2-4. His タグを付与したタンパク質の大量発現と精製.....	69
3-2-5. タグなし TraC <sub>N292</sub> の大量発現と粗酵素抽出.....	69
3-2-6. nicking assay.....	69
3-3. 結果.....	72
3-3-1. TraC は MnCl <sub>2</sub> 存在下で <i>nic</i> site 以外の部位に nick を導入する.....	72
3-3-2. 金属コファクターの違いによる性質変化の解析.....	78
3-4. 考察.....	78
第4章 <i>traDEF</i> オペロンの転写制御機構の解明.....	82
4-1. 緒言.....	82
4-2. 材料及び方法.....	82
4-2-1. 使用菌株・プラスミド、培地及び培養条件.....	82
4-2-2. DNA の取り扱い.....	82
4-2-3. プラスミドの作製.....	86
4-2-4. 接合伝達試験.....	86
4-2-5. LacZ 活性の測定.....	86
4-2-6. 菌体からの RNA の調製.....	89
4-2-7. 逆転写反応による cDNA の調製.....	89
4-2-8. 定量リアルタイム PCR.....	89
4-2-9. His タグを付与した TraD の大量発現と精製.....	90
4-2-10. FAM-DNA 断片の作製.....	90
4-2-11. ゲルシフトアッセイ.....	90
4-2-12. フットプリンティング.....	91

4-2-13. 転写開始点の同定 .....	92
4-3. 結果.....	95
4-3-1. NAH7ΔD2 の接合伝達能.....	95
4-3-2. TraD による自己転写制御機構.....	95
4-3-3. ゲルシフトアッセイを用いた TraD の DNA 結合能の検討 .....	95
4-3-4. TraD の結合部位の特定 .....	99
4-3-5. <i>traD</i> の転写開始点(TSS)の同定 .....	99
4-4 考察.....	99
第 5 章 NAH7 の全接合伝達関連遺伝子の同定.....	103
5-1. 緒言.....	103
5-2. 材料及び方法 .....	103
5-2-1. 使用菌株・プラスミド、培地及び培養条件.....	103
5-2-2. DNA の取り扱い.....	103
5-2-3. electroporation 法による形質転換法 .....	103
5-2-4. プラスミドの作製 .....	109
5-2-5. 接合伝達実験 .....	111
5-2-6. プラスミドの安定性試験 .....	111
5-2-7. タンパク質の <i>in vivo</i> 相互作用試験.....	112
5-2-8. 転写単位の解析.....	112
5-2-9. <i>orf34</i> のシグナル配列の推測 .....	112
5-3. 結果.....	112
5-3-1. NAH7 の接合伝達関連遺伝子群の推定機能.....	112
5-3-2. pKKO1 の接合伝達能.....	113
5-3-3. 大規模欠失 NAH7 誘導体の接合伝達能.....	113
5-3-4. <i>orf34</i> は接合伝達必須 .....	113
5-3-5. Orf34 の配列情報の解析.....	114
5-3-6. <i>orf34</i> は <i>mpfJ</i> と単一転写単位 .....	114
5-3-7. <i>orf34</i> 発現に伴う宿主細胞の生育への影響.....	118
5-3-8. <i>orf34</i> の発現に伴う NAH7 の安定性試験.....	118
5-3-9. Orf34 の <i>in vivo</i> 相互作用 .....	118
5-4. 考察.....	118
第 6 章 pNIT101 を用いた NAH7 の接合伝達能の評価.....	124
6-1. 緒言.....	124



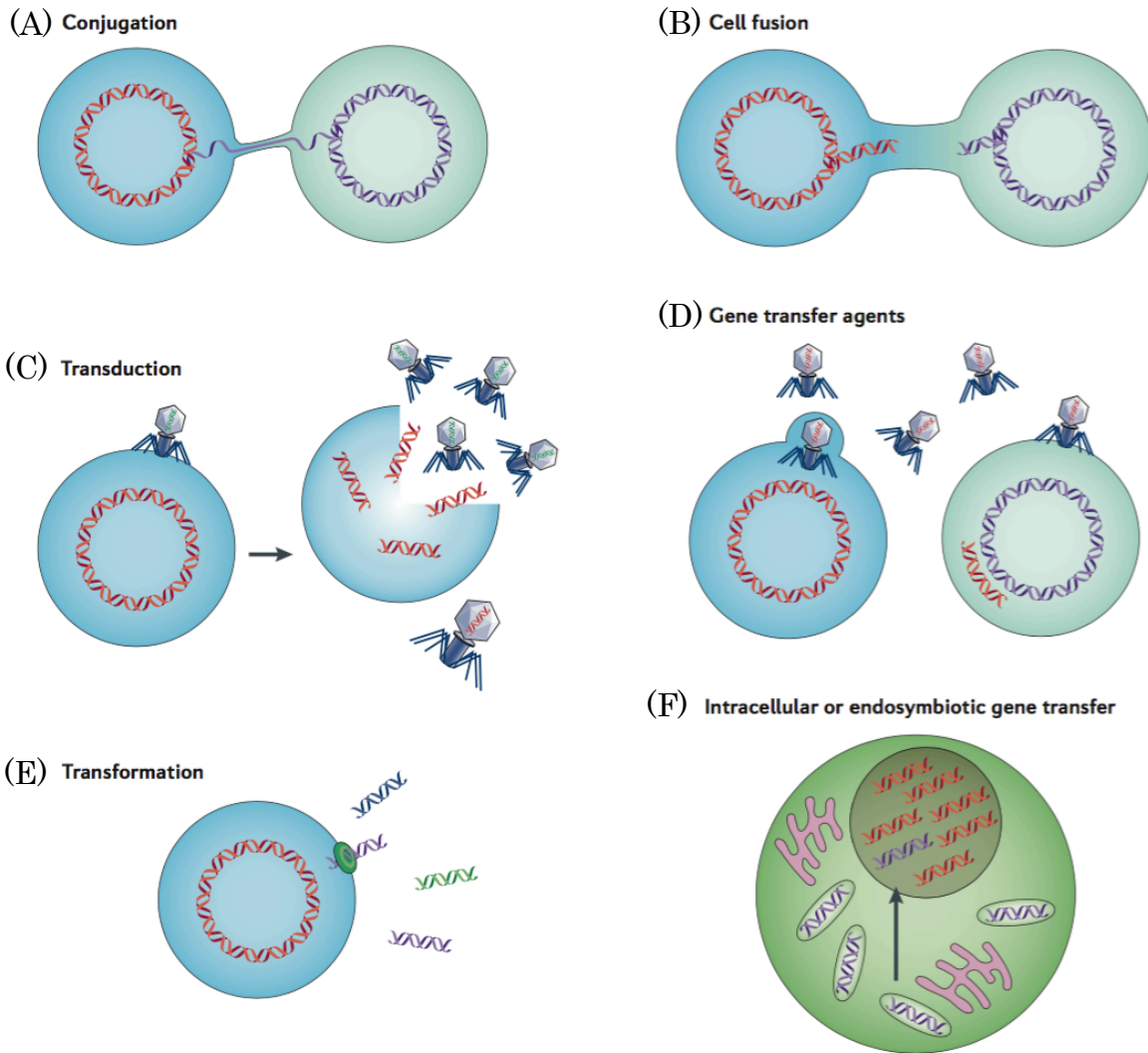
6-2. 材料及び方法 .....	124
6-2-1. 使用菌株・プラスミド、培地及び培養条件.....	124
6-2-2. electroporation 法による形質転換法 .....	127
6-2-3 受容菌株への Gm 耐性遺伝子の付与.....	127
6-2-4. 接合伝達実験 .....	127
6-3. 結果.....	128
6-3-1 pNIT101 の複製維持能の評価.....	128
6-3-2 NAH7 の接合伝達能の評価 .....	128
6-4. 考察.....	128
6-4-1. NAH7 の接合伝達能の検討.....	128
総合考察 .....	131
謝辞 .....	141

## 序章

地球上には多種多様な生物が存在するが、この多様性は環境変動に対して柔軟な適応を可能とし、その時々環境に適応できた生物が優先して次世代にゲノム情報を伝えることができる。多様性は遺伝情報をコードするゲノムDNAの多様性に起因する。この多様性をもたらす要因として、突然変異と水平伝播の2通りがあり、突然変異と比べて水平伝播は環境変動に対して迅速に適応していく上で重要な役割を果たすと考えられている。近年、盛んに行われているゲノム解析でも水平伝播の重要性が認識できる。自然界での遺伝子の水平伝播様式は形質転換、形質導入、接合伝達、細胞融合、Gene transfer agents、Intracellular gene transferなどが知られている(1) (Fig. 0-1)。このうち接合伝達は細菌由来のプラスミドなどが担うIV型分泌装置(T4SS)を介した供与細胞から受容細胞へDNAを輸送するシステムである。基本的に接合伝達関連タンパク質は接合伝達開始配列 *oriT* (origin of Transfer)を認識してプラスミドのみを受容細胞に輸送するが、(i)相同組換えやトランスポゾンによって染色体にプラスミドが組み込まれた状態で接合伝達を開始した場合、(ii)染色体上の *oriT* と相同性の高い領域を接合伝達関連タンパク質が誤認識した場合(2)は、プラスミド上の遺伝子に限らず染色体DNA由来のものを含む大規模な遺伝子の移動をもたらし、受容細胞のゲノムを大きく変化させうる。さらに接合伝達は細菌細胞同士のみならず、細菌細胞から古細菌、植物細胞、酵母、ヒト培養細胞へのDNAの輸送が可能であることが実験的に示されており(3)、細菌由来のDNAが接合伝達を介して全生物に水平伝播可能であることを示唆している。それ故に、接合伝達の研究は細菌のみならず全生物の多様性・進化を理解する上で重要である。一方、プラスミドは薬剤耐性遺伝子、病原性遺伝子、難分解性物質分解酵素遺伝子など、人類にとって有害あるいは有用な遺伝子を有しており、医療分野や環境浄化の観点からも重要である(4)。また、接合伝達を介した形質転換は一般に他の形質転換法より導入効率が高いため、プラスミドは遺伝子操作のベクターという分子生物学ツールとしても幅広く用いられている。このように、プラスミドは様々な分野で利用されており、応用面からも重要な研究対象である。

### プラスミドの分類

近年のシーケンス技術の革新により多くのプラスミドの塩基配列が解読され、National Center for Biotechnology Information (NCBI)のデータベースには8,514のプラスミドの塩基配列が登録されている(2017年1月18日現在)。これらプラスミドは不和合性(Inc)と接合伝達関連遺伝子(MOB、MPF)を指標に分類されてきた。同一の細胞に共存させた際に、細胞分裂を繰り返すうちにほとんどがどちらか1種のみを保持する細胞の集団になる関係にある2種のプラスミドを同じ不和合性群に属するプラスミドとする。本手法は古典的ではあるがいまだに用いられている有効な分類方法である。実際に同一不和合性群のプラスミドは類似した複製・維持装置をコードする遺伝子群を



(1)より一部変更して転載

Fig. 0-1 各種水平伝播のメカニズム。(A)接合伝達は供与菌と受容菌が接合対で連結して、供与菌から受容菌へ DNA が伝達する機構、(B)細胞融合は接合伝達とは異なり、DNA が伝達する方向性がなく、両細胞が DNA を受け取る機構、(C)形質導入はファージから細胞へ DNA が伝達する機構、(D) Gene transfer agent は形質導入と同様にファージが DNA を伝達するが、形質導入とは異なり、溶菌すること無く宿主細胞がファージの外部への放出をコントロールしている機構、(E)形質転換は外環境に存在する裸の DNA を細胞が取り込み、ゲノム内に組み込む機構、(F) Intracellular or endosymbiotic gene transfer は真核生物内で起きる水平伝播で、核とオルガネラ間での水平伝播する機構である。

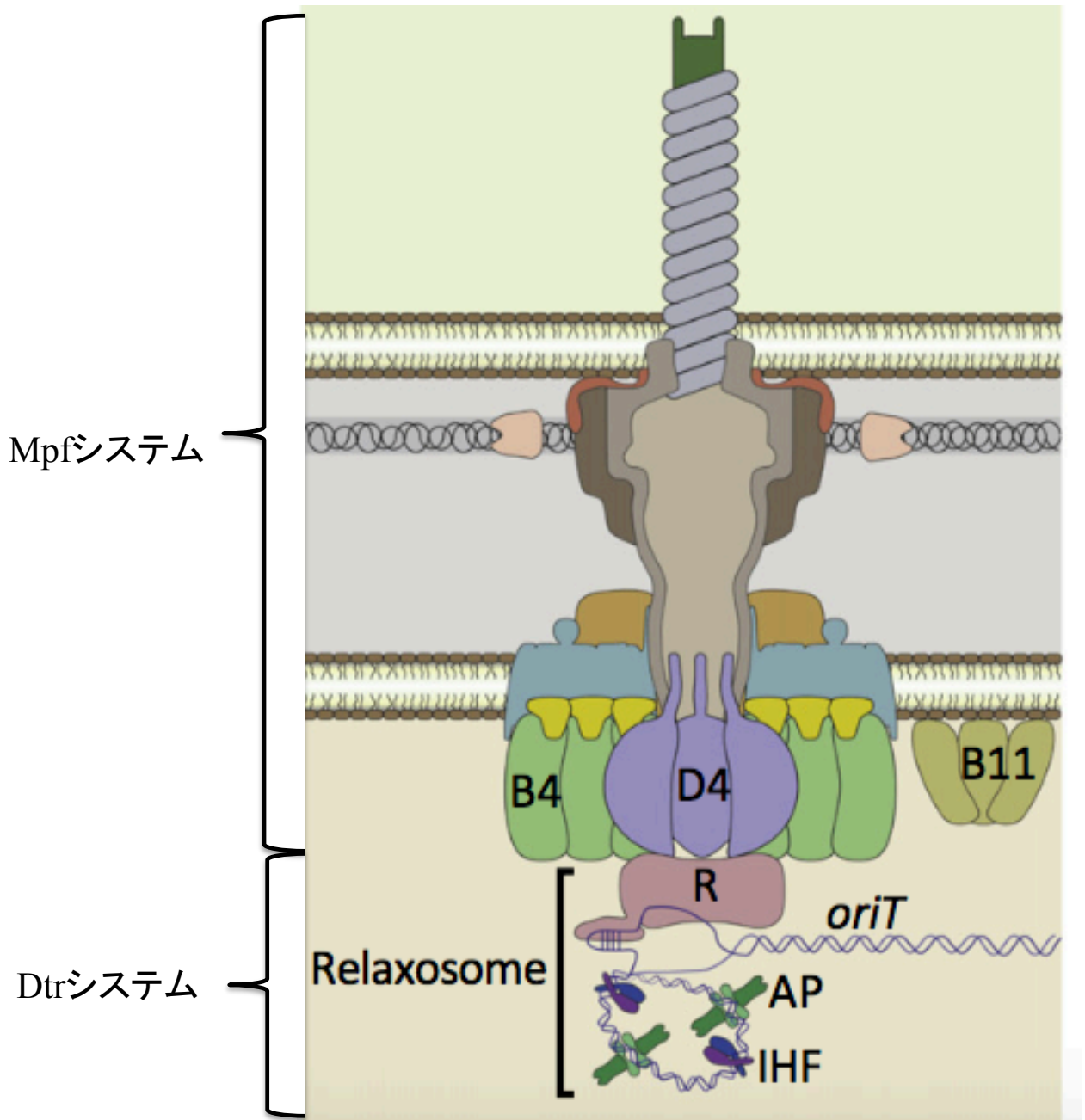
有している。一方、接合伝達関連遺伝子を指標とした分類は近年、Smillieら(5, 6)によって提唱された。接合伝達の鍵酵素の1つであるrelaxaseのrelaxaseドメインを含むN末端300アミノ酸残基の相同性に基づく6種のMOB family (MOB<sub>F</sub>、MOB<sub>H</sub>、MOB<sub>Q</sub>、MOB<sub>C</sub>、MOB<sub>P</sub>、MOB<sub>V</sub>)とT4SSの主コンポーネントであるVirB4のアミノ酸配列の相同性に基づく4種のMPF family (MPF<sub>F</sub>、MPF<sub>I</sub>、MPF<sub>G</sub>、MPF<sub>T</sub>)に分類され、さらにこの2つの分類を組み合わせることで、自己伝達性プラスミドをより細かく分類することができる。

### プラスミドの接合伝達機構

プラスミドの接合伝達は1946年に見出され、その伝達機構に関して多くの研究がなされてきた(7)。その結果、接合伝達には多くのプラスミドで良く保存された遺伝子が関与することが明らかとなり、自己伝達性プラスミドの伝達装置は共通した2つのシステムにより成り立つと理解されている(7)。すなわち、供与菌内で*oriT*内の特定部位(*nic* site)から一本鎖DNA (ssDNA)を生成する過程に関与するrelaxaseを中心としたDtr (DNA transfer and replication)システムと供与菌細胞と受容菌細胞を連結する接合対を形成するためのMpf (mating-pair formation)システムである(Fig. 0-2)。

R388 (IncW、MOB<sub>F</sub>、MPF<sub>T</sub>)のDtrシステムがよく研究されている(8)。R388のrelaxaseであるTrwCは*nic* siteへのnickの導入から受容菌細胞内でのssDNAの再環状化までの役割を担っている。この一連の流れ(Fig. 0-3)において、TrwCは、まず2価金属イオンをコファクターとしてそのチロシン残基(Y18)が*nic* siteのリン酸バックボーンを特異的に求核付加反応することで一本鎖DNAを切断し、それと同時に切断部位の5'末端に共有結合してTrwC-ssDNA複合体を形成する。その後、切断部位の3'末端からのDNA合成反応とTrwCのヘリカーゼ活性によってTrwC-ssDNA複合体がプラスミドから引きはがされる。このTrwC-ssDNA複合体はカップリングプロテインを介して接合対に受け渡され、ssDNAのまま受容菌へと伝達される。受容菌内において*nic* site (strand合成により元来と同じ配列になっている)はrelaxaseのY26により再度求核攻撃され、生じた遊離の3'端がY18と共有結合しているDNAの5'端と求核反応することで、環状のssDNAとなる。最後に、再環状化したssDNAは受容菌宿主の複製装置によって環状二本鎖DNAに再合成される。R388の約350 bpの*oriT*領域には複数の繰り返し配列や接合伝達関連タンパク質の結合領域が存在する(Fig. 0-3)。sbcAはTrwC、sbaAとsbaBはTrwCのnickの導入効率を向上させるTrwA、ihfAとihfBは宿主因子であるIHF (integration host factor)の結合領域である。

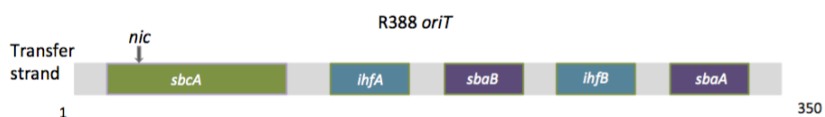
Mpfシステムは10種以上のタンパク質からなり、T4SSとそれに連結した性線毛で構成される。Mpfシステムのうち、Ti-プラスミドとR388などがコードするVirD/VirBシステムはよく研究されており、その立体構造も解かれている(9, 10)。さらにChIP法を元にしたTrIP (transfer DNA immunoprecipitation)法により、ssDNAが受容菌へと輸送される際に経由するコンポーネントとその順番も明らかとなっている(11)。TrIP法とは、ホルムアルデヒドを用いたタンパク質-DNAのク



(12)

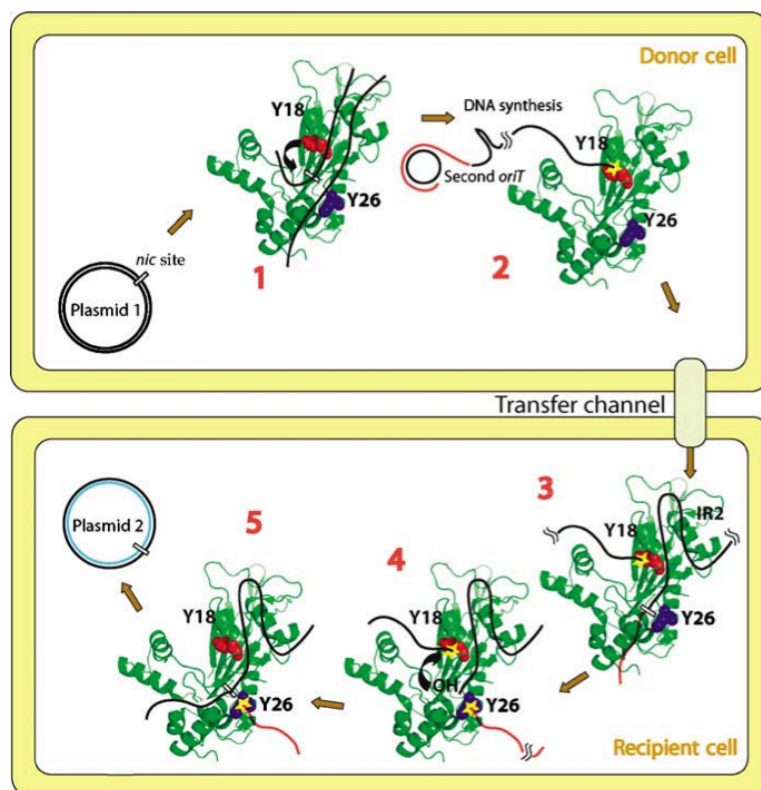
Fig. 0-2 Dtr システムと Mpf システム。D4 はカップリングプロテイン、R は relaxase、AP はアクセサリプロテインを示す。

(A)



(12)

(B)



(8)

Fig. 0-3 (A) R388 の *oriT* の模式図。 *nic* は *nic* site、 *ihfA* と *ihfB* は IHF 結合領域、 *sbaA* と *sbaB* は TrwA 結合領域を示す。

(B) 供与菌及び受容菌内の TrwC の働き。

1. Cleavage : relaxase が *nic* site 近傍領域に結合し、Y18 により nick を入れ、5' 端側の *nic* site と共有結合する。
2. Transfer & Replication : TrwC-ssDNA 複合体(T-strand)は輸送チャンネルを介して受容菌へ伝達される。*nic* site の 3' 端から供与菌に残る一本鎖環状 DNA を鋳型に DNA 複製が開始する。
3. Recognition of *nic* site : プラスミドの全体が複製され、再び *nic* site が現れる。
4. Cleavage : Y26 により再び nick が導入され、T-strand と伸長鎖(赤色)が開裂する。この時生じた *nic* site の 3' 端側の-OH が Y18-ssDNA に求核反応する。
5. Plasmid release & recircularization : 再環状化する。

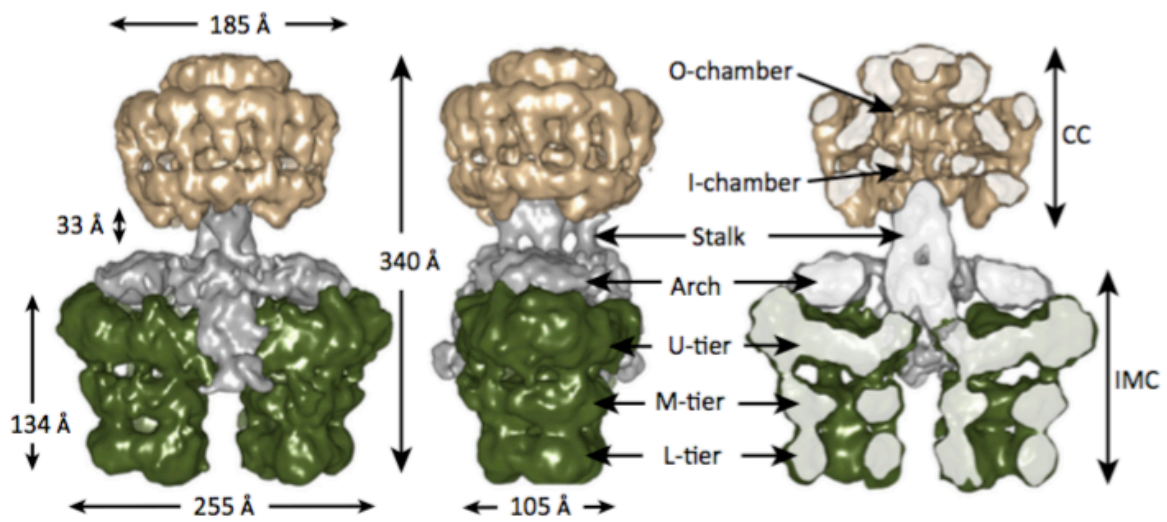


ロスリンクと T4SS の各構成要素に対する抗体を用いた免疫沈降により、ssDNA が T4SS のどのコンポーネントと相互作用しているかを検出する方法である。

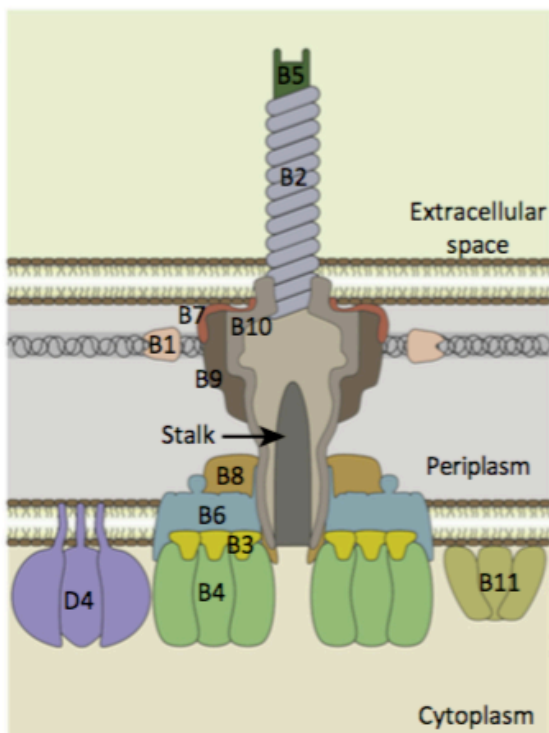
VirD/VirB の T4SS は 12 種のタンパク質からなるが、役割の違いからコアコンプレックス、Stalk、内膜コンプレックスの 3 つに分けられる(12) (Fig. 0-4)。コアコンプレックスは VirB7、9、10 からなる輸送チャンネルで外膜から内膜にかけて局在している。立体構造解析より VirB7、9、10 からなる複合体が 14 分子集合して環状構造になることでチャンネルを形成していることが示されている (Fig. 0-5)(13)。個々の役割として、VirB7 は外膜・VirB9 と結合して、コアコンプレックスの安定性に関与している。VirB10 はコアコンプレックス内で最も大きいコンポーネントであり、外膜と内膜の両方を繋ぐように局在し、細胞質側に突出した VirB10 の ATPase ドメインは細胞質側の他のコンポーネントに応じてリン酸化状態になり、基質を分泌できるような構造変化をする(13)。Stalk は VirB8 と VirB6 からなりコアコンプレックスのチャンネルを塞ぐような位置に存在する構造である。Stalk は、T4SS の組み立てや性線毛の形成時に重要な役割を果たし、チャンネルから Stalk が離脱することで基質が輸送可能となると考えられている。内膜コンプレックスは ATPase である VirB4、VirB11、VirD4 からなり、T4SS の組み立てや基質の輸送に必要なエネルギーを生み出している(11, 14, 15)。VirB4 の C 末端には Walker A と Walker B モチーフがあり、ATPase 活性を担っている(16)。N 末端側のアミノ酸配列も VirB4 ホモログ内で保存されているが、機能は未知である。VirB11 は AAA ファミリーに属する ATPase であり、N 末と C 末にある  $\beta$  シート、 $\alpha$  ヘリックス構造によりリング状の六量体を形成している(17)。VirB11 のホモログは T2SS と T3SS にも存在することからタイプの異なる分泌系装置にも共通した重要な働きを担っていると考えられる。VirD4 (カップリングプロテイン)の主な役割は relaxase を接合対に輸送することであり、relaxase および VirB10 と結合する(18)。立体構造解析より VirD4 は 6 量体を形成していることが判明している。また、Walker A と Walker B のモチーフとヌクレオチド結合サイトを有し、実験的にも DNA 依存的な ATPase であることが示されている(19)。

VirB/VirD4 system の性線毛は、3 つのタイプに分けられた T4SS の性線毛(20)のうち、P-type に分類され(Fig. 0-6)、硬く、短いという性質があり、ダイナミックな伸長と収縮は観察されていない。トランスグリコシラーゼをコードしている VirB1 はペプチドグリカン分解する。性線毛の主要な構成因子は疎水性タンパク質の pilin (VirB2)である。ほとんどの VirB2 ホモログは翻訳後修飾として、シグナルペプチダーゼ I によって N 末端側にあるシグナル領域が切断され、切断部と C 末端が共有結合することで pro-pilin から成熟した cyclic pilin となり、内膜(IM)に輸送される(21)。その後、VirB2 は ATPase である VirB4 と VirB11 の補助によって IM からペリプラズムへ移行する。この移行には VirB4 と VirB11 との結合と ATP の加水分解が重要であることが明らかとなっているが、詳細な機構は不明である。VirB2 が重合してできた性線毛の先端には adhesin(VirB5)が局在し、受容菌への接着に関与している(22)。

(A)



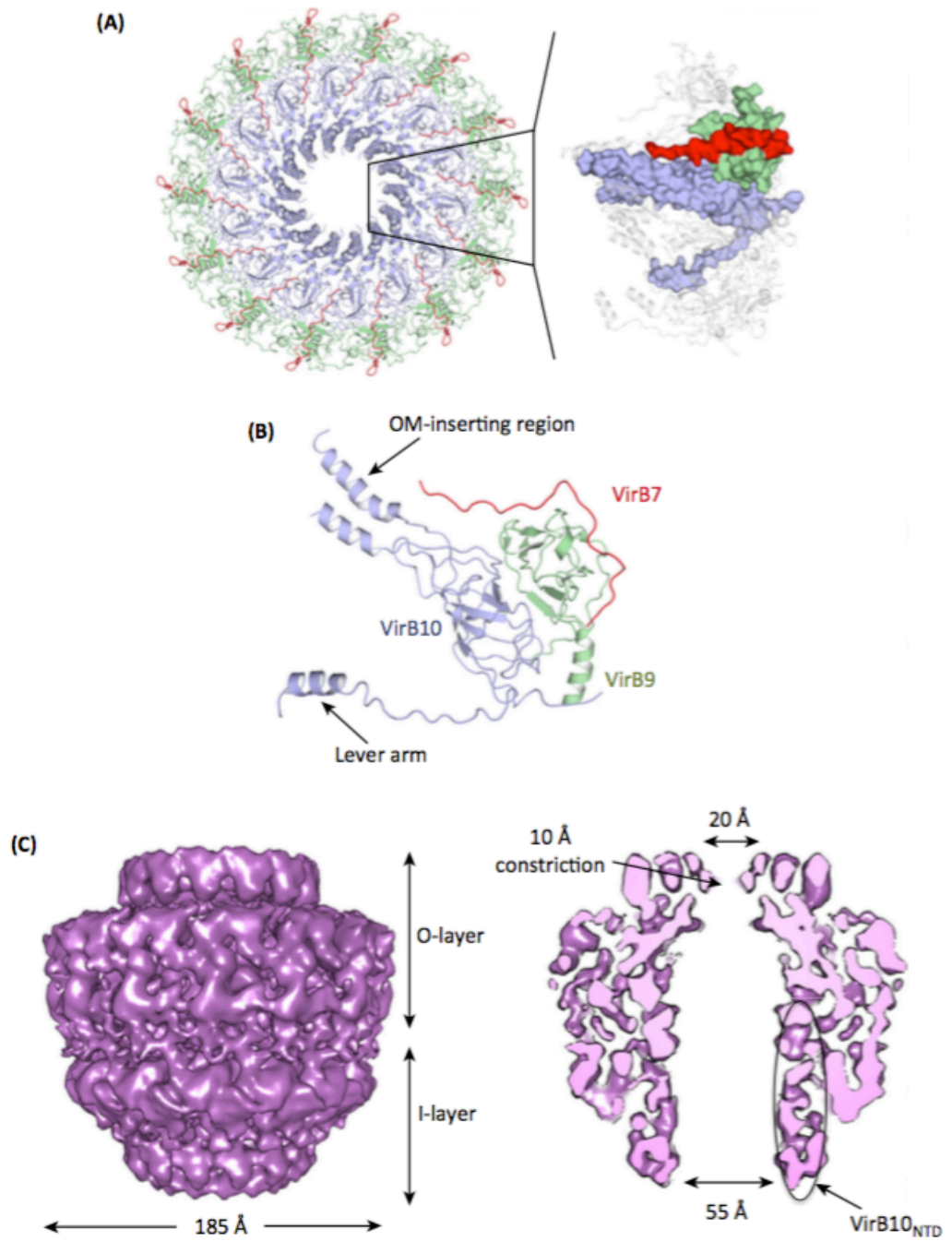
(B)



(12)

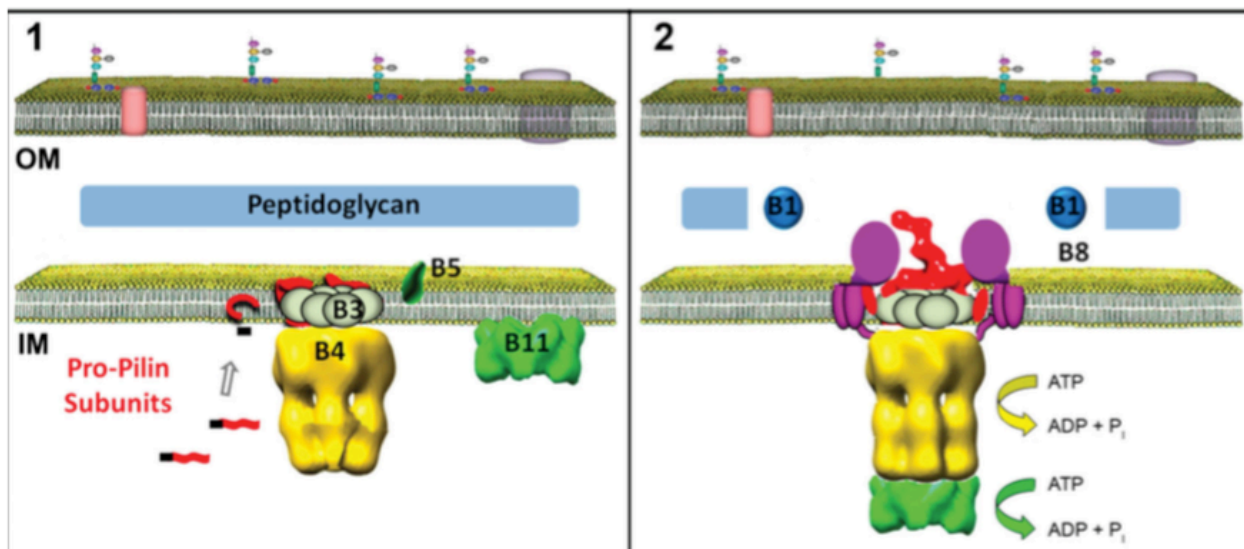
Fig. 0-4 (A) VirB<sub>3-10</sub> 複合体のネガティブ染色電子顕微鏡マップ。茶色はコアコンプレックス(CC)、灰色は Stalk、緑色は内膜コンプレックス(IMC)を示す。(B) T4SS の概略図。ただし、VirD4 と VirB11 の VirB<sub>3-10</sub> 複合体に対する正確な位置関係は不明である。





(12)

Fig. 0-5 X 線結晶構造解析および電子顕微鏡解析で示されたコアコンプレックスの構造。(A) コアコンプレックスは VirB7、VirB9、VirB10 のヘテロ 3 量体が 14 分子で構成されている。赤色が VirB7、緑色が VirB9 の C 末端領域、青色が VirB10 の C 末端領域を示す。(B)ヘテロ 3 量体一分子の構造。OM-inserting region は外膜挿入領域、Lever arm はタンパク質相互作用に重要な領域を示す。(C) コアコンプレックスのクライオ電子顕微鏡マップ。



(21)の一部を変更した。

Fig. 0-6 T4SS の性線毛の合成。1. VirB2 (赤) が翻訳後修飾を受ける。2. VirB1 (青) によってペプチドグリカンが分解されつつ、VirB4 (黄) と VirB11 (緑) によって成熟した VirB2 がペリプラズムに移行し、性線毛が伸長する。

一方、R388 を含む多くのプラスミドの接合伝達遺伝子はトランスポゾン変異ライブラリー等の検討から 14 の必須遺伝子 (Dtr システムの 2 遺伝子+Mpf システムの 11 遺伝子+カップリングプロテイン遺伝子) で構成されると考えられているが、実際にこの 14 遺伝子のみで *oriT* を有するプラスミドの接合伝達が可能であるか実験的には検証されておらず、この 14 遺伝子以外にも接合伝達必須遺伝子が存在する可能性がある。

### **多様性に富んだ relaxase 群タンパク質**

relaxase 群タンパク質は多様性に富み、全ての relaxase の N 末端側領域には relaxase domain が保存されている一方で、C 末端側領域に helicase 活性を有するタイプや primase 活性を有するタイプなど、特異的な性質を持つものが知られている(7)。また、relaxase は同一レプリコン上の *oriT* 間の部位特異的組換えも触媒するが(23-27)、この活性が接合伝達依存的であるか非依存的であるかは relaxase によって異なる。ただし、この依存性の違いがどのようなメカニズムの違いから生じているのかは解明されていない。

nick の導入は全ての relaxase に共通した性質であり、その際にコファクターとして 2 価金属イオンを必要とする。in vitro での検討では、効果のある 2 価金属イオンの種類は relaxase によって異なっていた(Table 0-1)。ただし、in vivo においていずれの 2 価金属イオンを physiological コファクターとして利用しているかは不明であり、*nic site* の同定等の実験では、Mg<sup>2+</sup>か Mn<sup>2+</sup>のいずれかがコファクターとして用いられてきた。

### **プラスミドの接合伝達宿主域**

細胞が接合伝達でプラスミドを獲得する過程は、(i)プラスミドが供与菌から接合伝達装置を介して受容菌内に移入する段階と、(ii)受容細胞内でプラスミドが複製・維持される段階にわけて考えることができる。「接合伝達宿主域」は(i)の段階が可能な範囲を示す言葉である。移入したプラスミドが受容菌内で複製・維持されずとも受容細胞の遺伝形質に大きな影響を与えることは可能であり、接合伝達宿主域の理解は重要である。しかし、従来の「接合伝達」実験では、接合伝達しても複製維持されて接合伝達体としてコロニー形成できなければ、接合伝達したことが観察できない。すなわち、このような実験系ではプラスミドの複製・維持機構も考慮しなければならず、「接合伝達宿主域」自体の解析は進んでいない。接合伝達宿主域はプラスミドの接合伝達装置と受容菌側の遺伝形質に依存していると考えられるが、詳細は不明である。

### **環境汚染物質分解遺伝子と水平伝播**

人類は環境中で分解されにくい石油系芳香族化合物やハロゲン化合物などを化学的に大量合成し、環境に放出したが、これら環境汚染物質を分解・資化する細菌株が存在する(37)。分解菌が有する分解遺伝子群は互いに相同性が高く、遺伝子クラスター内のシンテニーが保存されている場合が多い(37)。これら分解遺伝子群は自己伝達性プラスミド上に見出される場合が多く、この

Table 0-1 各 relaxase の利用できる 2 価金属イオン

relaxase	plasmid	Metals used	Metals not used	Reference
TraI	F	Mg <sup>2+</sup>		(28)
TraI	RP4	Mg <sup>2+</sup>		(29)
TaxC	R6K	Mg <sup>2+</sup>		(30)
MobA	R1162	Mg <sup>2+</sup> 、Mn <sup>2+</sup> 、Ca <sup>2+</sup> 、Ba <sup>2+</sup>		(31)
TraA	pIP501	Mg <sup>2+</sup> 、Mn <sup>2+</sup>		(32)
NES	pLW1043	Ni <sup>2+</sup> 、Mn <sup>2+</sup> 、Co <sup>2+</sup> 、Cu <sup>2+</sup>	Mg <sup>2+</sup>	(33)
MdeA	ColE1	Mg <sup>2+</sup> 、Mn <sup>2+</sup> 、Ca <sup>2+</sup> 、Ba <sup>2+</sup>	Mn <sup>2+</sup>	(34)
MobM	pMV158	Mg <sup>2+</sup> 、Mn <sup>2+</sup> 、Ca <sup>2+</sup>	Ba <sup>2+</sup> 、Zn <sup>2+</sup>	(35)
TrwC	R388	Mg <sup>2+</sup> 、Mn <sup>2+</sup> 、Ca <sup>2+</sup> 、Zn <sup>2+</sup> 、Ni <sup>2+</sup> 、Cu <sup>2+</sup> 、Co <sup>2+</sup>		(36)

(<http://repositorio.unican.es/xmlui/handle/10902/7693>)

ようなプラスミドを保持した菌が存在する環境では、頻繁に分解遺伝子群の伝達が行われていると考えられている。分解遺伝子群を担う代表的な自己伝達性プラスミドとして、トルエン分解資化細菌 *Pseudomonas putida* mt-2 株由来の pWW0 とナフタレン分解資化細菌 *P. putida* G7 株由来の NAH7 があげられる。当該分解酵素遺伝子クラスターはこれら自己伝達性プラスミドのトランスポゾン内部に存在する。なお、これらプラスミドは全塩基配列が決定されている(38, 39)。

MOB<sub>F</sub>、MPF<sub>T</sub>、IncP-9 群のナフタレン分解プラスミド NAH7 に焦点を当てた本研究室での研究(40, 41)(Fig. 0-7) において、現在提唱されている接合伝達システムモデル上にない遺伝子群 *traDEF* オペロンの接合伝達における重要性が示された。すなわち、野生型 NAH7 は同属間のみならず、*P. putida* から大腸菌、大腸菌から *P. putida* にも伝達可能であるが、*traDEF* オペロンを欠失した NAH7 誘導(以下、NAH7Δ*traDEF*)は、同属間や *P. putida* から大腸菌には伝達可能であったが、大腸菌から *P. putida* には接合伝達が不可能であった。本オペロンは広宿主域性プラスミドで保存されており、接合伝達に関わる未知システムの存在が示唆された。しかし、NAH7 の *oriT* や *relaxase* 遺伝子は同定されておらず、本プラスミドの接合伝達を理解する上での基礎的知見が不足していた。

## 目的

接合伝達は全ての生物にとって重要であり、その機構解明は人類にとって大きな有益を生み出す可能性を秘めているが、上述のように未だ不明な点が多い。そこで、本研究では NAH7 を対象にプラスミドの接合伝達に関する普遍性の高い新規知見を得ることを目的とした。第 1 章および第 2 章では、NAH7 の接合伝達に関する基本因子の同定を目的とし、本プラスミドの *oriT* と *relaxase* 遺伝子の同定と解析を行なった。第 3 章では第 1 章で同定した *relaxase* を用いて、*nick* 導入配列の特異性という新たな観点から *relaxase* の *physiological* コファクターを同定した。第 4 章では広宿主域プラスミドで保存されている機能未知遺伝子群 *traDEF* オペロンの機能解明を目指し、本オペロンの転写制御機構に関する研究を行なった。第 5 章では NAH7 上の接合伝達に必要な全遺伝子の同定を試みた。第 6 章では NAH7 の接合伝達宿主域を評価し、NAH7 が多くのプロテオバクテリアに水平伝播可能であることを明らかにした。

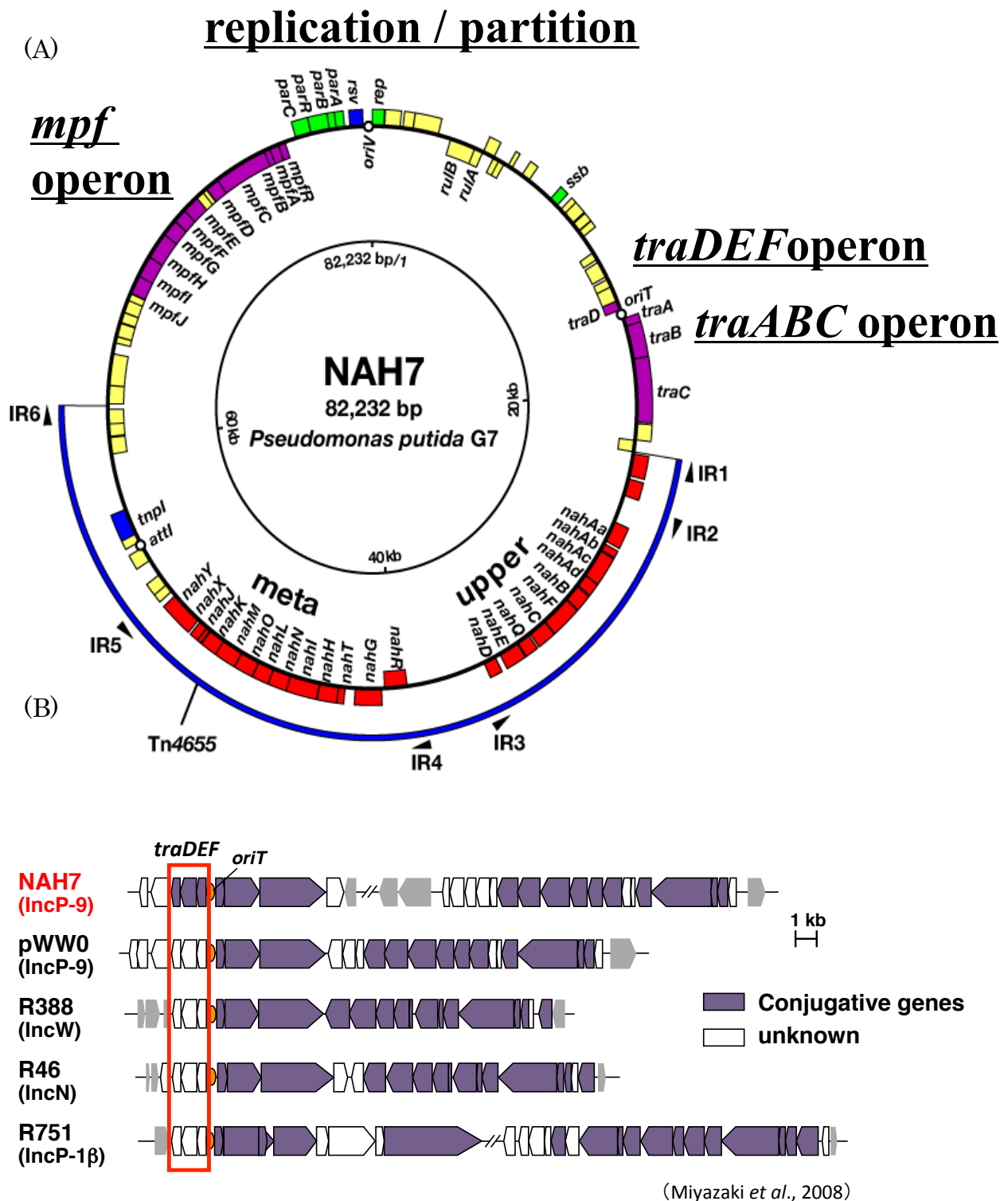


Fig. 0-7 (A) NAH7 のマップ。紫:接合伝達関連遺伝子、緑:複製維持関連遺伝子、赤:ナフタレン分解遺伝子、青:トランスポゾン関連遺伝子、黄色:機能未知遺伝子  
遺伝子の詳細は Table 0-2、Table 0-3 を参照。

(B)広宿主域性プラスミドで保存されている *traDEF* オペロン。



Table 0-2 NAH7 の全遺伝子(38)

Name	Position <sup>a</sup>	Estimated or determined function of the closest relative
<i>parA</i>	1-774	Putative plasmid partitioning protein ParA
<i>parB</i>	785-1,711	Putative plasmid partitioning protein ParB
<i>parR</i>	1,708-2,055	Putative partitioning gene repressor protein ParR
<i>parC</i>	2,052-2,468	Putative plasmid partitioning protein ParC
<i>rsv</i>	2,736-3,383	Putative resolvase
<i>oriV</i>	3,384-3,837	Vegetative origin of plasmid replication
<i>rep</i>	3,838-4,407	Plasmid replication-initiation protein Rep
<i>orf1</i>	4,447-5,208	Hypothetical protein
<i>orf2</i>	5,352-5,849	Hypothetical protein
<i>orf3</i>	5,859-7,127	Hypothetical protein
<i>rulB</i>	7,780-9,063C	Ultraviolet light resistance and DNA polymerase V
<i>rulA</i>	9,053-9,481C	Ultraviolet light resistance and DNA polymerase V
<i>orf4</i>	9,504-10,079	Hypothetical protein
<i>orf5</i>	10,076-10,372C	Hypothetical protein
<i>orf6</i>	10,369-10,671C	Hypothetical protein
<i>orf7</i>	10,883-11,101	Hypothetical protein
<i>orf8</i>	11,692-12,114	Hypothetical protein
<i>ssb</i>	13,489-13,938	Putative single strand binding protein Ssb
<i>orf9</i>	14,193-14,474	Hypothetical protein
<i>orf10</i>	14,471-15,052	Hypothetical protein
<i>orf11</i>	15,107-15,529	Hypothetical protein
<i>orf12</i>	15,553-15,882	Putative transcriptional regulator protein
<i>orf13</i>	16,764-17,129C	Hypothetical protein
<i>orf14</i>	17,273-18,058C	Putative zinc metalloprotease protein
<i>traF</i>	18,196-18,582C	Hypothetical protein
<i>traE</i>	18,586-19,305C	Hypothetical protein
<i>traD</i>	19,302-19,757C	Putative plasmid transfer protein TraD
<i>oriT</i>	19,758-20,187	Putative origin of plasmid transfer
<i>traA</i>	20,188-20,580	Putative plasmid transfer protein TraA
<i>traB</i>	20,573-22,132	Putative plasmid transfer protein TraB
<i>traC</i>	22,143-25,079	Putative plasmid transfer protein TraC
<i>orf17</i>	25,155-25,904	Hypothetical protein
<i>orf18</i>	25,934-26,467C	Putative Nudix hydrolase
IR1	26,470-26,507	IR of Tn4655 (Tn501-like)
<i>orf19</i>	26,564-27,592	Putative aldo/keto reductase protein
<i>orf20</i>	27,752-28,549	Putative dehydrogenase/reductase protein
IR2	28,676-28,711C	Tn21-like IR
----	28,712-29,339C	Highly homologous to <i>P. Putida</i> OUS82
----	29,260-29,359C	Tn501 remnant
----	29,408-29,630C	Partial sequence of IS <i>Ppu2</i>
<i>nahAa-nahY</i>	29,864-55,935	Naphthalene degradation gene
IR5	56,011-56,048	Tn4653-like IR
<i>orf21</i>	56,202-56,606	Hypothetical protein, truncated ORF41 of pWW0
<i>orf22</i>	56,603-57,187	Putative transcriptional regulator protein, ORF43 of pWW0
----	57,277-57,362	N-terminal sequence of pWW0 ORF44
----	57,363-57,880	C-terminal sequence of pCAR1 ORF76
<i>orf23</i>	57,999-58,694	Putative serine/theronine protein phosphatase
<i>attI</i>	58,833-58,951	Site-specific recombination site
<i>orf24</i>	59,010-59,417	Hypothetical protein
<i>tnpI</i>	59,414-60,661	Tyrosine recombinase TnpI
----	60,763-62,034C	pCAR1 ORF72 (broken)
----	62,124-62,846C	Partial sequence of pCAR1 <i>tnpAa</i>
----	62,850-62,999C	C-terminal sequence of pcar1 <i>tnpRa</i>
----	63,000-63,320C	N-terminal sequence of pWW0 ORF45
<i>orf25</i>	63,321-64,097C	Putative reductase protein, ORF44 of pWW0
<i>orf26</i>	64,158-64,742C	Putative transcriptional regulator protein, ORF43 of pWW0
<i>orf27</i>	64,739-65,419C	Hypothetical protein, ORF41 of pWW0
IR6	65,548-65,585	IR of Tn4655 (Tn4653-like)
<i>orf28</i>	65,681-66,532C	Hypothetical protein
<i>orf29</i>	66,544-68,031C	Putative sulfate permease protein
<i>orf30</i>	68,550-68,846C	Hypothetical protein
<i>orf31</i>	68,860-69,498C	Putative nuclease protein
<i>orf32</i>	69,546-70,028C	Hypothetical protein
<i>orf33</i>	70,043-70,648C	Putative nuclease protein
<i>orf34</i>	70,638-70,967C	Hypothetical protein
<i>mpfJ</i>	70,997-71,902C	Putative mating pair formation protein MpfJ
<i>mpfI</i>	71,886-72,914C	Putative mating pair formation protein MpfI
<i>mpfH</i>	72,924-74,207C	Putative mating pair formation protein MpfH
<i>mpfG</i>	74,210-75,001C	Putative mating pair formation protein MpfG

<i>mpfF</i>	75,026-75,691C	Putative mating pair formation protein MpfF
<i>mpfE</i>	75,695-76,558C	Putative mating pair formation protein MpfE
<i>orf35</i>	76,546-76,950C	Hypothetical protein
<i>orf36</i>	76,943-77,155C	Hypothetical protein
<i>mpfD</i>	77,183-77,866C	Putative mating pair formation protein MpfD
<i>mpfC</i>	77,866-80,550C	Putative mating pair formation protein MpfC
<i>mpfB</i>	80,537-80,830C	Putative mating pair formation protein MpfB
<i>mpfA</i>	80,834-81,295C	Putative mating pair formation protein MpfA
<i>mpfR</i>	81,312-81,659C	Hypothetical protein

---



**Table 0-3 NAH7 の推定接合伝達関連遺伝子**

Name	Position <sup>a</sup>	Sorce of protein in R388	Sorce of protein in Ti plasmid
<i>traF</i>	18,196-18,582C	StbC	-
<i>traE</i>	18,586-19,305C	StbB	-
<i>traD</i>	19,302-19,757C	StbA	-
<i>oriT</i>	19,758-20,187	<i>oriT</i>	<i>oriT</i>
<i>traA</i>	20,188-20,580	TrwA	-
<i>traB</i>	20,573-22,132	TrwB	VirD4
<i>traC</i>	22,143-25,079	TrwC	VirD2
<i>mpfJ</i>	70,997-71,902C	TrwN	VirB1
<i>mpfI</i>	71,886-72,914C	TrwD	VirB11
<i>mpfH</i>	72,924-74,207C	TrwE	VirB10
<i>mpfG</i>	74,210-75,001C	TrwF	VirB9
<i>mpfF</i>	75,026-75,691C	TrwG	VirB8
<i>mpfE</i>	75,695-76,558C	TrwL	VirB6
<i>orf35</i>	76,546-76,950C	-	-
<i>orf36</i>	76,943-77,155C	TrwH	VirB7
<i>mpfD</i>	77,183-77,866C	TrwJ	VirB5
<i>mpfC</i>	77,866-80,550C	TrwK	VirB4
<i>mpfB</i>	80,537-80,830C	TrwM	VirB3
<i>mpfA</i>	80,834-81,295C	TrwL	VirB2
<i>mpfR</i>	81,312-81,659C	-	-

# 第1章 NAH7の接合伝達開始領域 *oriT* と *relaxase* の同定と解析

## 1-1. 緒言

本章ではNAH7の接合伝達能に必須な基本因子に関する情報を得るためにNAH7の接合伝達開始領域 *oriT* と *relaxase* 遺伝子の同定と機能解析を行なった。*oriT* は一本鎖DNAを生成する際の切れ目である *nic site* と共に *relaxase* などの Dtr システム関連タンパク質が結合するためのリピート配列を含む領域であり、接合伝達に必須な塩基配列である。NAH7と同じ不和合性群に属する pWW0 の *oriT* は *traD-traA* 間に存在すると推定されている(42)が、実験的な検証はなされていない。また、分解プラスミドの *relaxase* 遺伝子に関する研究は皆無である。

MOB<sub>F</sub>に属する R388 の *relaxase* である TrwC は(i)接合伝達に必須であること、(ii) *nic site* に nick を導入すること、(iii)レプリコン上に同方向に存在する2つの *oriT* 間での部位特異的組換えを触媒することが明らかとなっている。NAH7の *traC* は推定 *relaxase* 遺伝子としてアノテートされており、*traC* を破壊したNAH7は接合伝達が不能になることが先行研究で示されているが、TraCは機能解析済みの *relaxase* 遺伝子中で相同性が最も高い TrwC とでさえ、アミノ酸レベルで48%の相同性しか示さない。

このような背景を鑑み、本章ではNAH7の *oriT* が *traD-traA* 間の430-bp領域にのみに存在することを示し、かつ本領域に存在する *nic site* を同定した。さらに *oriT* 内で接合伝達頻度に重要な影響を与える領域を deletion 解析から明らかにした。また、TraCが *nic site* に nick を導入すること、そして *oriT* 間で部位特異的組換えを触媒することを明らかとし、*traC* が *relaxase* 遺伝子であることを実験的に示した。

## 1-2. 材料及び方法

### 1-2-1. 使用菌株・プラスミド、培地及び培養条件

本章で使用した菌株とプラスミドをTable 1-1に示した。培地はLB、1/3LBまたはSOC培地を用いた。培地の組成はTable 1-2に示した。寒天平板培地を用いる場合には、寒天粉末を培地に対して1.5% (w/v)で添加した。選択培地には必要に応じてカナマイシン(Km)は25 µg/ml、テトラサイクリン(Tc)は20 µg/ml、ゲンタマイシン(Gm)は20 µg/ml、アンピシリン(Ap)は100 µg/mlとなるように添加した。また、必要に応じてisopropylthiogalactoside (IPTG)を終濃度0.5 mM、スクロースを10%となるように添加した。

培養は、特に断りがない限り *Pseudomonas* 属細菌については30°C、大腸菌については37°Cで行った。各種菌体を長期保存する際には、培養液に15%になるように glycerol を加え、-80°Cで保存した。

**Table 1-1. Bacterial strains and plasmids used in this chapter**

Strain or plasmid	Relevant characteristics <sup>a</sup>	Source or reference
<i>E. coli</i>		
DH5α	<i>recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 Δ(lacZYA-argF) Φ80lacZΔM15</i>	(44)
JM109	<i>recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 Δ(lac-proAB)(F<sup>+</sup> traD36 proAB<sup>+</sup> lacIqZΔM15)</i>	(45)
BL21(DE3)	<i>F ompT hsdSB (rBmB) gal ompT, λ (DE3)</i>	(46)
EC100	<i>mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) φ80d lacZΔM15 ΔlacX74 recA1 endA1 araD139 Δ(ara- leu)7697 galU galK rpsL nupG</i>	Epicentre Inc.
<i>P. putida</i>		
KT2440	Wild-type strain	ATCC47054
KT2440G	KT2440::TnMod-OGm ; Gm <sup>r</sup>	This study
G7	Wild-type strain, NAH7 carrier	(47)
G7(NAH7K2)	G7 derivative harboring NAH7K2 instead of NAH7, former designated G7K2	(48)
G7(NAH7K3)	G7 derivative harboring NAH7K3 instead of NAH7	This study
Plasmid		
NAH7	Tra <sup>+</sup> Nah <sup>+</sup> , Inc <sup>-</sup> P9	(Fau., 1973)
NAH7K2	NAH7Δ <i>nahAc</i> ; Km <sup>r</sup>	(48)
NAH7K3	NAH7Δ <i>nic</i> ; Km <sup>r</sup>	This study
pEX18Tc	pMB9 replicon; Tc <sup>r</sup> ; <i>sacB</i> ; suicide vector for gene replacement, carrying pUC18-derived multiple-cloning sites	(43)
pTnGm1	pUC57 derivative carrying Gm <sup>r</sup> gene	Laboratory stock
pET22b(+)	Ap <sup>r</sup> ; C-Terminal-His tag	Takara
pET22b292TraC	pET22b(+) derivative for overexpression of <i>traC</i> <sub>N292</sub>	This study
pUC18	Ap <sup>r</sup> ; <i>E. coli</i> vector	(45)
pUC18traC	pUC18 derivative carrying NAH7 <i>traC</i> gene	This study
pNIT6012	pVS1 derivative; shuttle vector, Mob <sup>+</sup> Tc <sup>r</sup>	(49)
pNIT101 to pNIT112	pNIT6012 derivatives carrying a 430-bp <i>oriT</i> region from NAH7 and its deletion fragments	This study
pNIT301	pNIT6012 derivative carrying <i>sacB</i> and Gm <sup>r</sup> genes flanked by two copies of <i>oriT</i> NAH7 region	This study

**Table 1-2. 培地組成**

---

<b>LB broth</b>	
per liter:	
Bacto tryptone	10 g
Bacto yeast extract	5 g
NaCl	5 g
pH 7.0	

---

---

<b>SOC medium</b>	
per liter:	
Bacto tryptone	20 g
Bacto yeast extract	5 g
NaCl	0.5 g
5N NaOH	0.2 ml
1M MgCl <sub>2</sub>	10 ml

---

---

<b>1/3LB broth</b>	
per liter:	
Bacto tryptone	3.3 g
Bacto yeast extract	1.7 g
NaCl	5 g
pH 7.0	

---

## 1-2-2. DNA の取り扱い

本研究で使用した制限酵素およびその他の酵素類は添付説明書の指示に従って用いた。

### プラスミド DNA の調製(Kit を用いた方法)

大腸菌からのプラスミドの回収は LaboPass™ Plasmid Mini (COSMO Genetech)を用いて、操作は添付の説明書に従った。

### プラスミドの迅速調製法

プラスミドのサイズを調べるだけを目的とした場合は簡単で迅速な以下の方法を用いた。

#### 試薬

STE buffer	10 mM Tris-HCl (pH 8.0)
	100 mM NaCl
	1 mM EDTA
PCI 溶液	phenol:chloroform:isoamylalcohol = 25:24:1
RNase A 溶液	10 mg/ml RNase A
	50 mM Acetate buffer (pH 5.0)

#### 操作

1. 滅菌爪楊枝の先に少量の菌体を取り、20  $\mu$ l の STE buffer に懸濁した。
2. 20  $\mu$ l の PCI 溶液を加え、ボルテックスを用いて攪拌した。
3. 遠心(15,000 rpm、室温、10 分間)を行った。
4. 水層に RNase A 溶液を加えた Dye を用いて電気泳動を行った。

### DNA の ligation

Takara Ligation kit Mighty Mix (Takara)を用いた。操作は添付の説明書に従って行った。

### Gibson Assembly kit (New England BioLabs)を用いたクローニング

操作は基本的に付属の説明書に従って行なった。

### Polymerase chain reaction (PCR)法

DNA polymerase は ExTaq (Takara)か KOD-Plus ver.2.0 (東洋紡)のいずれかを用い、操作は添付の説明書に従った。コロニーPCR の場合は、滅菌爪楊枝を用いてコロニー由来の微量の菌体を反応液に懸濁し、鋳型とした。また、本章で用いたプライマーは Table1-3 に示した。

**Table 1-3. Primers used in this study <sup>a</sup>**

Primer name	Sequence (5 to 3')	Purpose
XhoI_NAH7_oriT_F	GGGctcgagGGTGTTCCTCTCTGAGCCC	Cloning of <i>oriT<sub>N</sub></i> on pNIT6012
NheI_NAH7_oriT_R	GGGgctageTTTGCACCCTATCTGCACCC	Cloning of <i>oriT<sub>N</sub></i> on pNIT6012
XhoI_NAH7_oriT_-50_F	GGGctcgagTGCCGAAACAGTGTATAGC	Construction of pNIT102
XhoI_NAH7_oriT_-81_F	GGGctcgagCAAAAAGCTTGATTTTGCTG	Construction of pNIT103
XhoI_NAH7_oriT_-119_F	GGGctcgagTAATACATATGTATAGCGC	Construction of pNIT104
XhoI_NAH7_oriT_-139_F	GGGctcgagTAAAAACACCACTTTTCTCT	Construction of pNIT105
XhoI_NAH7_oriT_-161_F	GGGctcgagCAGGCCGCGCACAGCGCGCT	Construction of pNIT106
XhoI_NAH7_oriT_-183_F	GGGctcgaggTCACCTCCCCTAGGGGGGT	Construction of pNIT107
XhoI_NAH7_oriT_-206_F	GGGctcgaggTATTGTGTATTGAGACTTTG	Construction of pNIT108
NheI_NAH7_oriT_-328_R	GGGgctageGCATACCATCTGTGCTACC	Construction of pNIT109
NheI_NAH7_oriT_-242_R	GGGgctageGGGTCAAAGTCTCAATTCAA	Construction of pNIT110
NheI_NAH7_oriT_-217_R	GGGgctageCAATACACAATACGCACC	Construction of pNIT111
NheI_NAH7_oriT_-213_R	GGGgctageACACAATACGCACCCC	Construction of pNIT112
pNIT5041_FAM	[FAM]-CTGACACCCTCATCAGTGCCAA	Amplification of FAM-DNA
pNIT5041	CTGACACCCTCATCAGTGCCAA	Amplification of FAM-DNA
pNIT5548_FAM	[FAM]-GTGAGAAATCACCATGAGTGACG	Amplification of FAM- DNA
pNIT5548	GTGAGAAATCACCATGAGTGACG	Amplification of FAM- DNA
oriT_FAM_1 <sup>b</sup>	[FAM]-GACAGGTGTTTATAGCCTGCC	Amplification of FAM- <i>oriT1</i>
oriT_FAM_2 <sup>c</sup>	[FAM]-AATCAATGGCATCACCTGGCG	Amplification of FAM- <i>oriT2</i>
EcoRI_nic up_F	CGGgaattcGATGCTCCAACGTCGACCA	Construction of pEX18Tenicupdown
KpnI_nic_up_R	CGGggtaccGAATTGAGACTTTGACCC	Construction of pEX18Tenicupdown
KpnI_nic_down_F	CGGggtaccACGCACCCCCCTAGCG	Construction of pEX18Tenicupdown
BamHI_nic_down_R	CGCggtaccGCCATCCGGTTGAAGTCAT	Construction of pEX18Tenicupdown
Nde1_N292traC__F	GGGctcgagGCCGAACTCGATACCTAG	Cloning of <i>traC<sub>N292</sub></i> on pET22b(+)
Xho1_N292traC_R	GGAATTCcatagTTCAACGTTACCTCTATCAA	Cloning of <i>traC<sub>N292</sub></i> on pET22b(+)
nic_con_F	GATCGTGTCTGGCTTGCTGT	Confirmation of deletion of NAH7K3
nic_con_R	TTGCTCATCACTCGGATCG	Confirmation of deletion of NAH7K3
pNITGm_oriTN_F1	TACCCGGGAGCTCGATTGACCCCTATCTGCACC	Construction of pNIT301
pNITGm_oriTN_R1	GGGGTGACGCCAAAGGGTGTTCCTCTCTGAGCC	Construction of pNIT301
pNITGm_oriTN_F2	GATGTGTATAAGAGACAGTTTGCACCCTATCTGCACC	Construction of pNIT301
pNITGm_oriTN_R2	TGGCAAAGCTTCGAAGGTGTTCCTCTCTGAGCC	Construction of pNIT301

pNITGm_oriTSacB_F	CTTTGGCGTCACCCCTTAC	Construction of pNIT301
pNITGm_oriTSacB_R	CAGATGTGTATAAGAGACAGGCGGCATCAGAGCAGATTG	Construction of pNIT301
Gm1_F	CCATTCAGGCTGCGCAACTGTTG	Construction of pNIT301
Gm1_R	GCAGCGAGTCAGTGAGCGAG	Construction of pNIT301
SpeI_traC_F	TAA <i>actag</i> CCGGTCAAGCAGCAGCATAAC	Construction of of pUC18traC
XhoI_traC_R1	GGG <i>ctc</i> gagGCCTGGCCTATATTCTTC	Construction of pUC18traC

---

<sup>a</sup> Recognition sites for restriction enzymes are indicated by lower and italicized letters.

<sup>b</sup> The nucleotide sequence able to anneal to the NAH7 *traA* gene is located at the positions from 20276 to 20256 on the NAH7 map.

<sup>c</sup> The nucleotide sequence able to anneal to the strand of NAH7 *traD* gene is located at the positions from 19671 to 19691 on the NAH7 map.

### 1-2-3. プラスミドの作製

#### pNIT101 の作製

XhoI\_NAH7\_oriT\_F と NheI\_NAH7\_oriT\_R のプライマーセットを用いた PCR で NAH7 の *traD-traA* 間を増幅し、この断片を pNIT6012 の XhoI-NheI site にクローニングした(Fig. 1-1)。

#### pNIT102-112 の作製

Table1-3 に示した 11 種のプライマーと XhoI\_NAH7\_oriT\_F あるいは NheI\_NAH7\_oriT\_R のプライマーセットを用いた PCR で NAH7 の *traD-traA* 間の一部を増幅し、これら断片をそれぞれ pNIT6012 の XhoI-NheI site にクローニングした pNIT102-112 を作製した(Fig. 1-1, Fig. 1-10)。

#### pNIT301 の作製

pNITGm\_oriTN\_F1 と pNITGm\_oriTN\_R1 および pNITGm\_oriTN\_F2 と pNITGm\_oriTN\_R2 のプライマーセットで 2 種の *oriT* 断片、pNITGm\_oriTSacB\_F と pNITGm\_oriTSacB\_R のプライマーセットで pEX18Tc を鋳型に *sacB* 断片、Gm1\_F と Gm1\_R のプライマーセットで pTnGm1 を鋳型に Gm 耐性(Gm<sup>r</sup>)遺伝子を含む断片を PCR で増幅した。Gm<sup>r</sup> 遺伝子を含む断片を PvuII で処理後、これら 4 つの DNA 断片を pNIT6012 の EcoRI site に Gibson Assembly kit でクローニングした pNIT301 を作製した(Fig. 1-2)。2 つの *oriT* が同方向あり、その間に Gm<sup>r</sup> 遺伝子と *sacB* をクローニングしてある。Gm<sup>r</sup> 遺伝子と *sacB* が機能することを、このプラスミドを有する株が Gm 耐性、スクロース感受性になることで確認した。

#### pUC18traC の作製

SpeI\_traC\_F と XhoI\_traC\_R1 のプライマーセットを用いた PCR で NAH7 の *traC* 断片を増幅し、この断片を pUC18 の XbaI-SalI site に *traC* を IPTG 誘導可能なコンストラクトでクローニングした pUC18traC を作製した(Fig. 1-3)。

#### pET22b292traCN の作製

NdeI\_N292traC\_\_F、XhoI\_N292traC\_Rのプライマーセットを用いたPCRでNAH7の*traC*<sub>N292</sub>断片を増幅し、この断片をpET22bのNdeI-XhoI siteにクローニングしたpET22b292traCNを作製した(Fig. 1-4)。

#### pEX18Tnicupdownの作製

*sacB* 遺伝子をコードする pEX18Tc に NAH7K2 を鋳型に EcoRI\_nic up\_F と KpnI\_nic up\_R、KpnI\_nic\_down\_F と BamHI\_nic\_down\_R の 2 組のプライマーセットを用いて PCR により増幅した *nic* site 上流域と下流域を pEX18Tc の EcoRI-BamHI にクローニングし、pEX18Tnicupdown を作製した (Fig. 1-5)。



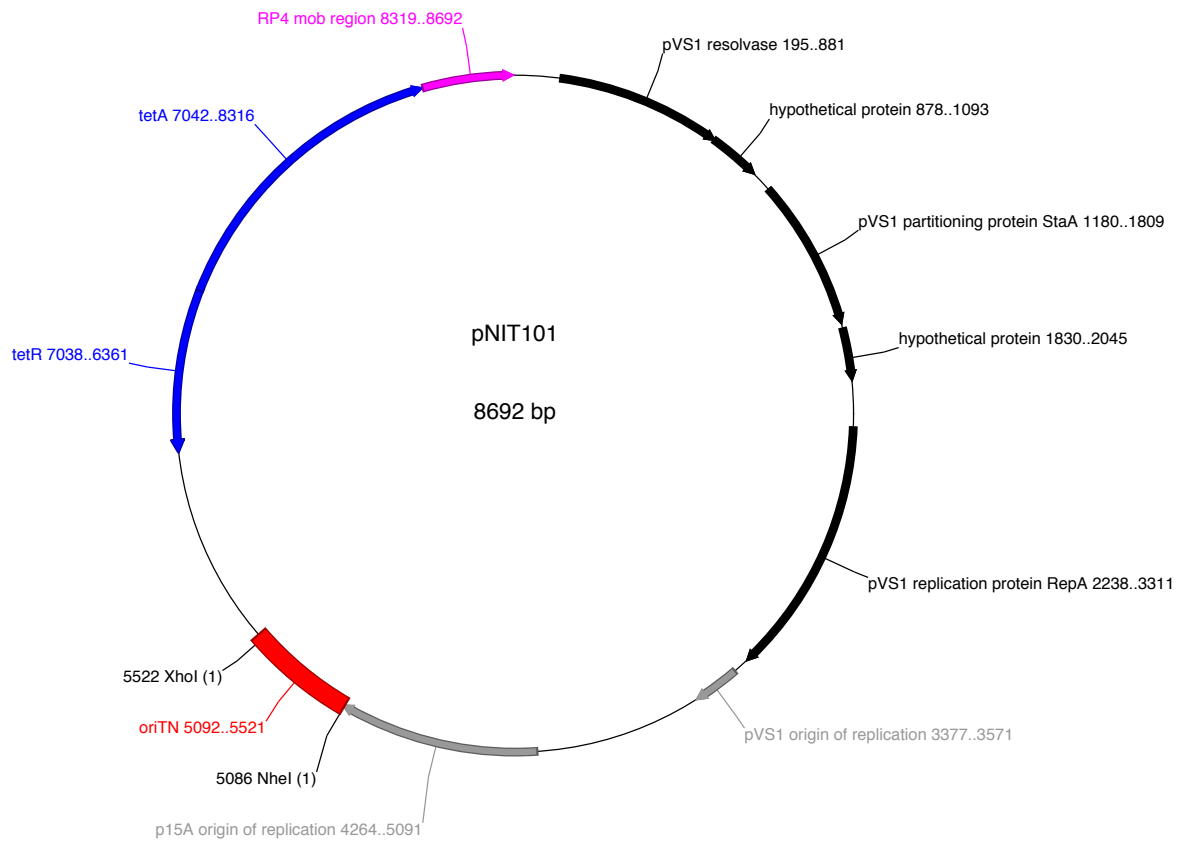


Fig. 1-1 pNIT101のマップ。赤色で示した領域がクローニングした領域を示す。pNIT102-pNIT112も同様のコンストラクトで、赤色領域がそれぞれFig. 1-10に示した領域をクローニングしている。

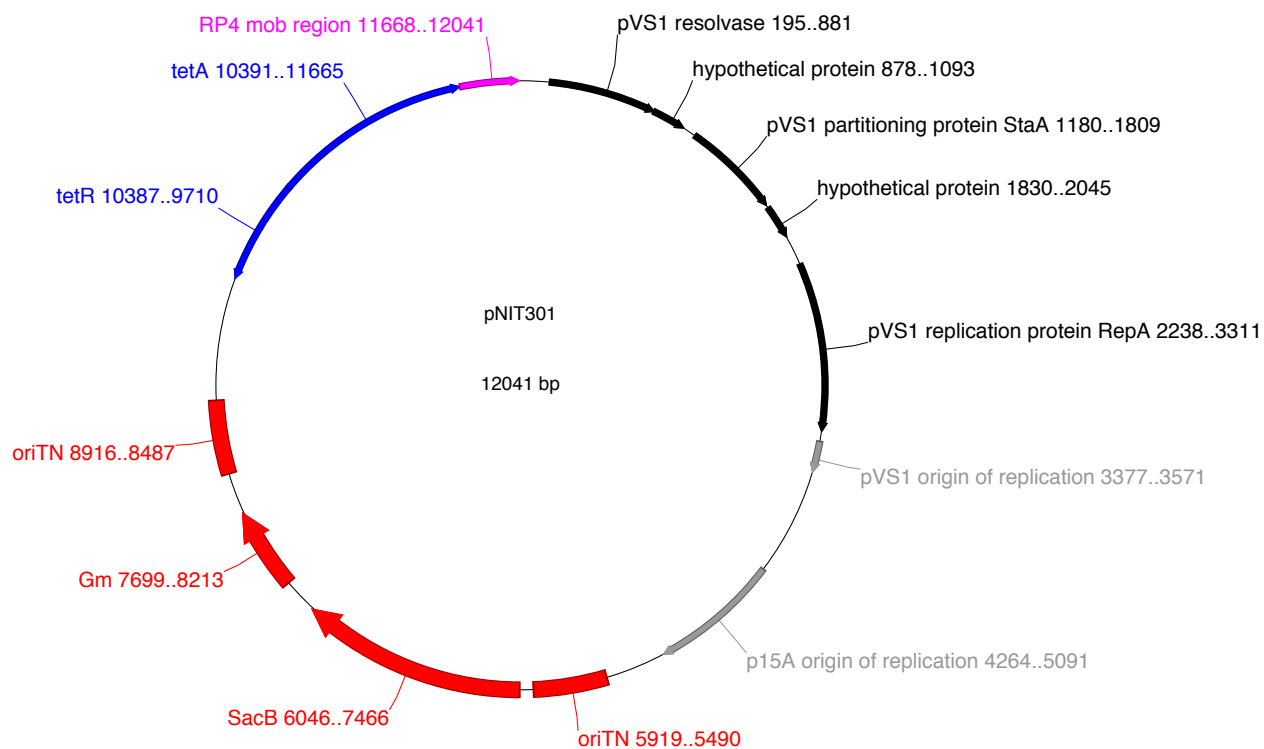


Fig. 1-2 pNIT301のマップ。赤色で示した領域がクローニングした領域を示す。

2つの*oriTN*は同方向にクローニングした。

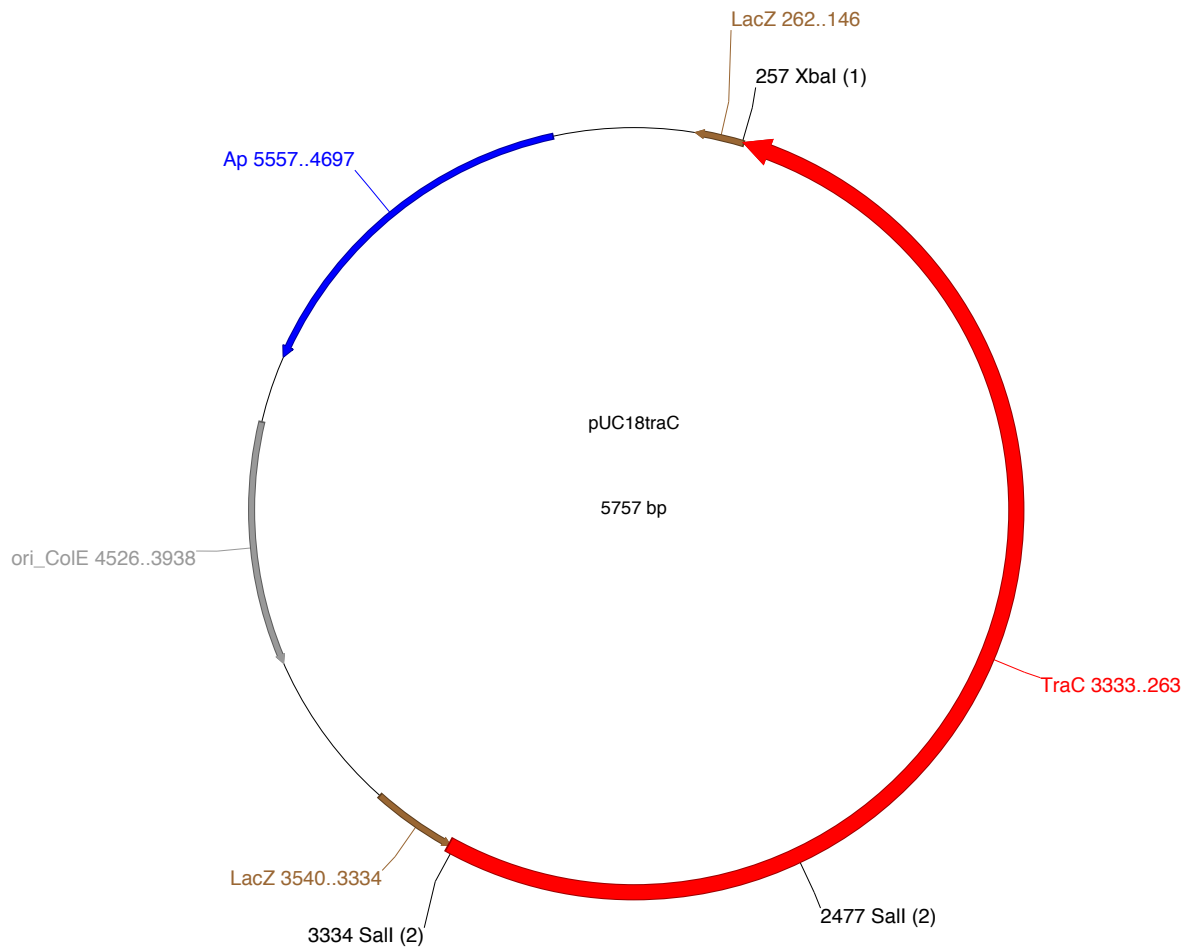


Fig. 1-3 pUC18traCのマップ。赤色で示した領域がクローニングした領域を示す。

TraCの転写がIPTG誘導で可能になるようにした。

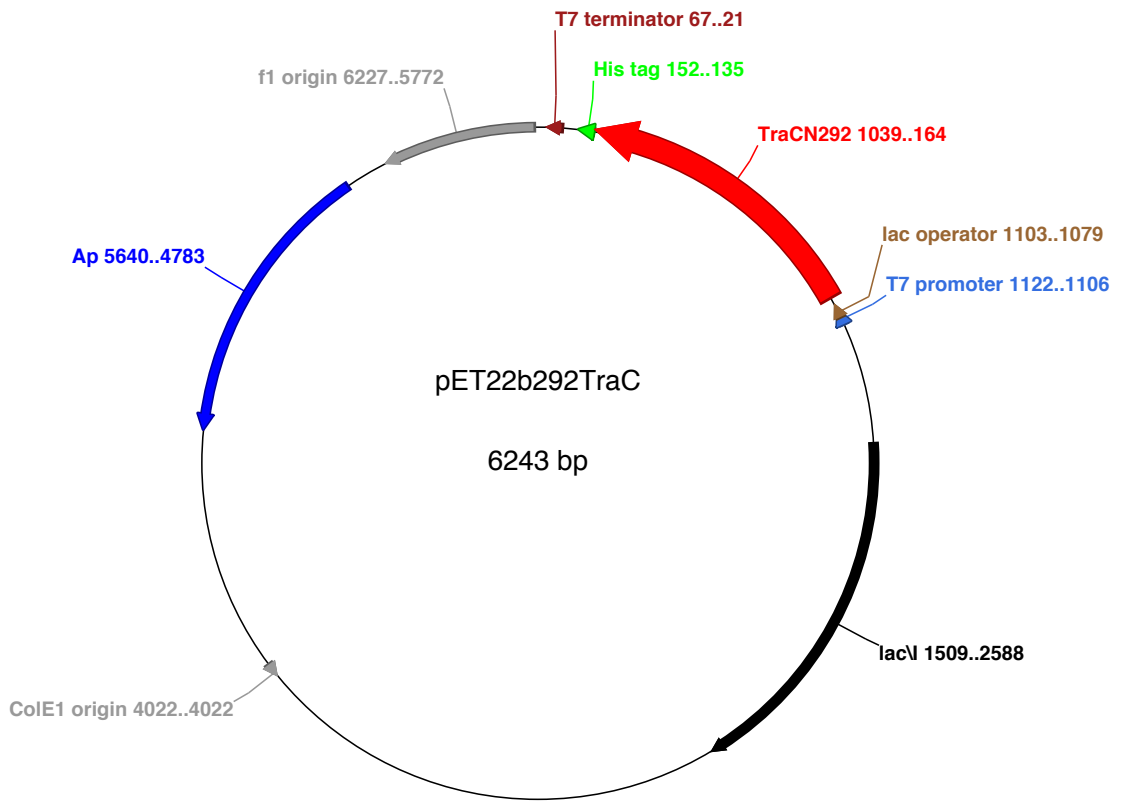


Fig. 1-4 pET22btraCN292のマップ。赤色で示した領域がクローニングした領域を示す。N末端にHis タグが付与されたTraC<sub>N292</sub>の転写がIPTGで誘導可能になるようにした。

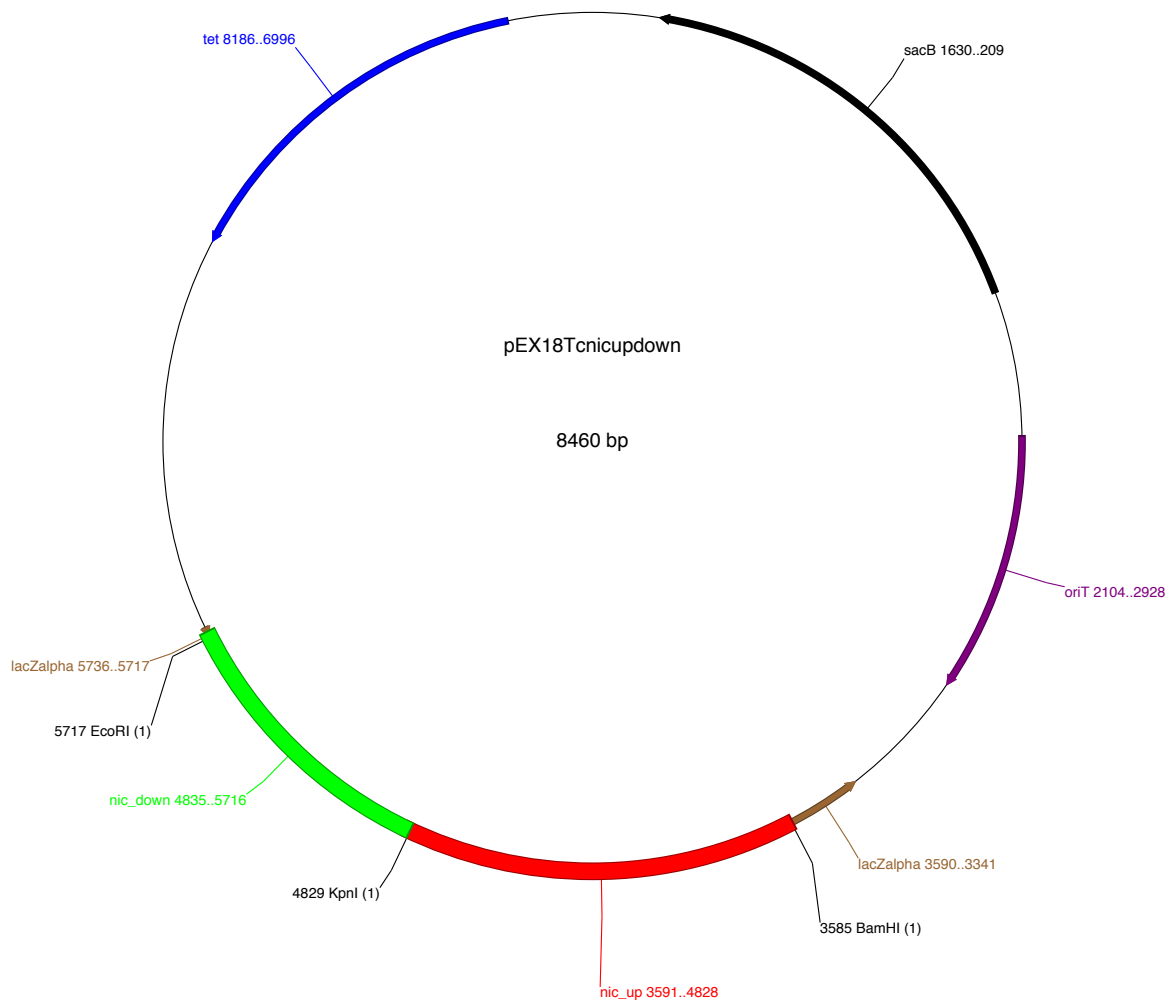


Fig. 1-5 pEX18Tcnicupdownのプラスミドマップ。赤色と緑色で示した領域がクローニングした領域を示す。*nic* siteの上流領域と下流領域をクローニングした。

#### 1-2-4. heat shock 法による大腸菌の形質転換法

##### コンピテントセルの作製(CaCl<sub>2</sub>法)

###### 試薬

LB

TF buffer	15 mM	CaCl <sub>2</sub> · H <sub>2</sub> O
	55 mM	MnCl <sub>2</sub> · H <sub>2</sub> O
	250 mM	KCl
	10 mM	PIPES (pH 6.7)

Dimethyl Sulfoxide (DMSO)

###### 操作

1. 400 ml の大腸菌の前培養液と 1 ml の 2 M MgCl<sub>2</sub> を 200 ml の LB に加えた。
2. 18°C、OD<sub>600</sub>=0.25 程度になるまで培養した(約 48 時間)。
3. 培養液を氷水で急冷し、そのまま 10 分間放置した。  
(これ以降の操作は全て 4°C で行った)
4. 2,700 × g、10 分間遠心集菌した。
5. 60 ml の氷冷した TF バッファーを加えて静かに菌を再懸濁し、再び 2,700 × g、10 分間遠心集菌する。この操作を 2 回繰り返した。
6. 16 ml の TF バッファーと 1.2 ml の DMSO を加え、菌を静かによく懸濁した。
7. 冷凍庫で予冷した 1.5 ml チューブに分注し、すぐに液体窒素で急凍した。
8. -80°C で保存し、形質転換に用いた。

###### 形質転換

###### 操作

1. 氷上で融解させたコンピテントセルに DNA 溶液を加え、氷上で 30 分間静置した。
2. 42°C で 45 秒間 heat shock を与え、氷上で 2 分間静置した。
3. SOC 培地を 1 ml 加えて、37°C で 60 分間培養した。
4. 選択培地のプレートに培養液を適量塗布し、37°C で一晩培養した。

#### 1-2-5. electroporation 法による形質転換法

GENE PULSER (BIO-RAD)を使用し、以下の手順で行なった。

###### 試薬

菌体洗浄用 buffer (1mM MOPS buffer)

3-Morpholinopropanesulfonic acid (MOPS)	42 mg
Glycerol	20 g
up to dH <sub>2</sub> O	200 ml

## 操作

1. 菌体を 30°C または 37°C で 3-5 時間液体培養した
2. 遠心集菌した。
3. 1 ml の氷冷した MOPS buffer で 3 回洗浄した。
4. DNA 溶液を加えた。
5. 氷冷したキュベットに DNA-菌懸濁液を入れた。
6. GENE PULSER にキュベットをセットし、1.8 V、200 Ω、25 μF でエレクトロポレーションを行った。
7. LB 培地を加えた。
8. 菌液をチューブに入れ、1 時間培養した。
9. 選択培地プレートに培養液を塗布して、一晚培養した。

### 1-2-6. DNA 塩基配列決定法

本研究における DNA 塩基配列の決定は、ABI PRISM Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (Applied Biosystems) と ABI PRISM 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) を用いた。操作は添付の説明書に従って行った。

### 1-2-7. *nic* site 欠失 NAH7 の作製

相同組換えを利用してマーカーレスの *nic* site 完全欠失 NAH7 作製を行なった。pEX18Tenicupdown をエレクトロポレーションにより G7K2 株に導入し、1/3LB 寒天培地で培養し Tc によって選択した。生育したコロニーに対して、コロニー PCR により pEX18Tenicupdown が NAH7K2 に組換えが起きたことを確認した後、10% スクロースを添加した 1/3LB 寒天培地で培養した。相同組換えにより *sacB* 遺伝子が失われた株は本培地上で生育することができる。生育したコロニーをシーケンスにより、*nic* site の破壊を確認した。

### 1-2-8. 接合伝達実験

接合実験は、0.45-μm-pore-size cellulose acetate filter (Advantec) を使用し寒天培地上で行った。本研究では NAH7 との接合伝達を行う際に、Km 耐性遺伝子を付与した NAH7K2 を使用し、Km 耐性を指標として接合伝達体の選択を行った。pNIT6012 誘導体の接合伝達を行う際には、Tc 耐性を指標として接合伝達体の選択を行った。供与菌は *P. putida* G7 株を使用し、受容菌は *P. putida*

KT2440 株に Gm 耐性を付与した KT2440G2 株を使用した。

接合伝達頻度の算出は、供与菌、受容菌、接合伝達体の抗生物質耐性を指標として colony-forming unit (CFU)を測定し、接合体/供与菌を算出した。なお、最終的な接合伝達頻度は 3 回以上の独立した実験から求めた。

#### 操作

1. 供与菌および受容菌を一晩液体培養した。
2. 1 ml の受容菌を遠心(10,000 rpm、室温、1 分間)し、菌体を集めた。
3. 1/3LB で 2 回洗浄した。
4. 集菌した受容菌に 1 ml の供与菌を加え、十分に混合した。
5. 遠心により菌体を集めた。
6. 1/3LB 寒天培地上に filter を置き、そこに 50  $\mu$ l 程度に濃縮した菌液をスポットした。
7. 30°C で 24 時間培養した。
8. 適宜希釈後、プラスミドを保持する受容菌を選択する培地に塗布した。接合伝達頻度を算出する際は適宜希釈し、接合伝達体および、供与菌、受容菌の選択培地に 10  $\mu$ l ずつスポットした。
9. 30°C で 1-2 日培養した。接合伝達頻度は供与菌当たりの接合伝達体の CFU で算出した。

#### 1-2-9. Resolution Assay

pNIT301 を用いた *oriT* 間の部位特異的相同組換えを行なった。なお、組換え頻度( $Tc^r$ かつスクロース<sup>r</sup>の CFU / $Tc^r$ の CFU)は 3 回以上の独立した実験から求めた。

#### 操作

1. *recA* strain である *E. coli* EC100(pNIT301)株をエレクトロポレーション法で pUC18traC あるいは pUC18 で形質転換し、Gm 及び Ap 含有培地で選択した。
2. これら形質転換体を Tc 及び Ap 含有 1/3LB 液体培地で一晩培養後、Tc 含有 1/3LB 培地と Tc、10%スクロース含有 1/3LB 培地で選抜した。
3. コロニーをカウントした。
4. つまようじを用いて Tc および 10%スクロース含有 1/3LB 培地中のコロニーを Gm 培地に植菌し、Gm 感受性を確認した。

#### 1-2-10. His タグを付与した TraC<sub>N292</sub> の大量発現と精製

His タグを付与した TraC<sub>N292</sub> の大量発現を以下の操作で行った。

#### 操作

1. pET22b292traC をエレクトロポレーションによって *E. coli* BL21(DE3)に導入し、Ap を含む LB



寒天培地上で、37°Cで一晩培養した。

2. LB寒天培地上に生育した菌体をかきとって100 µg/mlのApを含む100 mlのLB液体培地に懸濁し、OD<sub>660</sub>=0.6程度になるまで37°Cで培養した。
3. IPTGを終濃度0.5 mMとなるように加え、30°Cで9時間程度振とう培養を行ってタンパク質を大量発現させた。
4. 培養液を50 mlファルコンチューブに移し、4°C、10,000 rpmで5分間遠心した。遠心後、上清を廃棄した。
5. 直ちに本懸濁液から酵素の精製を行わない場合は、-80°Cにて保存した。

His タグを付与した TraC<sub>N292</sub>の精製を以下の試薬、操作で行った。

#### 試薬

- ・タンパク質洗浄用バッファー(pH 7.5、0.5 M NaCl、10 mM imidazole)

imidazole	0.68 g
NaCl	29.2 g
1 M K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 溶液	6.8 ml
1 M KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 溶液	3.2 ml

imidazole と NaCl を蒸留水に溶解させて 980 ml にメスアップ後、オートクレーブ滅菌を行った。その後、1 M K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 溶液と 1 M KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 溶液を加えて 1 L のタンパク質洗浄用バッファーとした。

- ・タンパク質溶出バッファー (pH 7.5、0.5 M NaCl、0.5 M imidazole)

imidazole	34 g
NaCl	29.2 g
1 M K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 溶液	16.8 ml
1 M KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 溶液	3.2 ml

imidazole と NaCl を蒸留水に溶解させて 980 ml にメスアップ後、オートクレーブ滅菌を行った。その後、1 M K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 溶液と 1 M KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 溶液を加えて 1 L のタンパク質溶出バッファーとした。

上記 2 種類の溶液を混合した後、蒸留水を加えて 100 ml にメスアップし、オートクレーブ滅菌した。

- ・タンパク質保存バッファー (pH7.5、20 mM Tris-HCl、5 mM MgCl<sub>2</sub>、100 mM NaCl、0.1mM EDTA)
- ・BD TALON Metal Affinity Resins (BD Bioscience)

#### 操作

1. 100 ml 分の集菌した大腸菌に対して大腸菌細胞溶解試薬 CellLytic B (Sigma-Aldrich)を 10 ml 加えた。
2. vortex を用いて、菌体が完全に溶解するまで懸濁し、粗酵素液を抽出した。
3. ROTATOR RT-50 (TAITEC)を用いて、4°C で 30 分程度混合した。10,000 rpm で 10 分間遠心し、上清画分を得た。
4. BD TALON Metal Affinity Resins (以下レジン)をタンパク質洗浄バッファーにて 3 回洗浄した。レジンの洗浄は以下のように行った。
  - 1)レジン 200  $\mu$ l を 2 ml 容チューブに添加して、4°C、700  $\times$  g で 1 分間遠心した。
  - 2)上清約 100  $\mu$ l を廃棄し、10 倍量(1 ml)のタンパク質洗浄用バッファーを加えて混合し、vortex を用いずに指でチューブをはじくようにして攪拌した。
  - 3)1)と同様に遠心後、上清を廃棄した。
  - 4)再度 1 ml のタンパク質洗浄バッファーをチューブに添加し、1)と同様に遠心後、上清を廃棄した。
  - 5)4)をもう一度繰り返した。
5. 約 200  $\mu$ l の洗浄済みレジンと上清画分を混合した。
6. ROTATOR RT-50 を用いて 4°C で 1 時間程度混合し、His タグを付与したタンパク質をレジンに吸着させた。
7. 4°C、700  $\times$  g で 1 分間遠心した。遠心後、レジンを吸い取らないように注意しながら上清をチューブから取り除いた。
8. 2 ml のタンパク質洗浄バッファーを加えて指でチューブをはじいて攪拌し、4°C、700  $\times$  g にて 1 分間遠心した。遠心後、レジンを吸い取らないように注意しながら上清をチューブから取り除いた。
9. 8.の操作をもう 2 回(計 3 回)繰り返した。
10. 予め氷冷しておいた 500  $\mu$ l のタンパク質溶出バッファーをレジンに添加して指ではじいて攪拌し、その後 20 分間 ROTATOR RT-50 を用いて混合した。
11. 4°C、700  $\times$  g で 1 分間遠心した。
12. 遠心後、上清 500  $\mu$ l をエッペンチューブに移した。
13. 10 の操作をもう一度行い、遠心してもう 500  $\mu$ l (計 1 ml)の精製タンパク質を得た。
14. Vivaspin (Sartorius)限外ろ過膜を使用して、タンパク質保存バッファーに置換した。方法は、添付の説明書に従った。
15. PCR チューブに 20  $\mu$ l ずつ分注し、液体窒素で瞬間凍結した後、-80°C で保存した。

### 1-2-11 タンパク質濃度の定量

プロテインアッセイキット(BIO-RAD)を用いてタンパク質濃度を定量した。標準試料には 0.1% BSA (Takara)を用いた。

#### 操作

1. 0.1% BSA が 0、0.1、0.2、0.3 mg/ml となるように蒸留水を用いて適宜希釈した。
2. 精製後のタンパク質溶液を 0.1-0.3 mg/ml の範囲の濃度となるようにタンパク質保存バッファーで希釈した。
3. プロテインアッセイキットを蒸留水で 5 倍に希釈した溶液を 35 タンパク質試料に加え、vortex で 5-10 秒混合した。
4. 96 穴プレートに 200  $\mu$ l ずつ分注した。
5. iMark™マイクロプレートリーダー (BIO-RAD)を用いて、595 nm の波長で吸光度を測定した。
6. 標準試料の検量線を 0.1-0.3 mg/ml の範囲で作製し、その検量線を用いてタンパク質濃度を算出した。

### 1-2-12 SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動(SDS-PAGE)

#### 試薬

泳動用バッファー (1L)	3 g	Tris
	14.4 g	Glycine
	1 g	SDS
染色液	0.05%	(w/v) Coomassie Brilliant Blue R-250
	50%	メタノール
	10%	酢酸
脱色液	25%	メタノール
	7%	酢酸

#### 泳動試料の作製

#### 操作

1. 2 × sample buffer (Bio-Rad)とタンパク質試料を等量ずつ、合わせて 20  $\mu$ l になるように混合した。
2. 5 分間、95°C で煮沸した。

#### 電気泳動と染色・脱色

#### 操作

1. 長寿ゲル(Wako)のウェルにタンパク質試料と分子量マーカートをアプライした。このとき、タンパク質試料は 10  $\mu$ l、分子量マーカール (BIO-RAD)は 3  $\mu$ l 用いた。
2. 20 mA で dye front がゲルの下端に到達するまで電気泳動を行った。

3. 染色液にゲルを沈め、数分間振とうした。
4. ゲルを蒸留水でよくすすぎ、染色液を落とした。
5. 脱色液と丸めたキムワイプをタッパー中に入れ、一晩穏やかに振とうしながらキムワイプに色素を吸着させて脱色した。

### 1-2-13. *nic site* の同定

6-carboxyfluorescein (以下 FAM) でラベルした *oriT* を含む DNA 断片と TraC<sub>N292</sub> を反応させた後、前途の 3130 Genetic Analyzer (キャピラリーシークエンサー) で FAM-DNA を検出した。

#### FAM ラベル付き *oriT* DNA 断片の作製

*oriT* の全長を含む DNA 断片のそれぞれの鎖の 5' 末端に FAM ラベルを付与した FAM-*oriT*1 と FAM-*oriT*2 を作製した。FAM-*oriT*1 は Fig. 1-6 (b) で示した鎖に FAM ラベルが付与してあり、FAM-*oriT*\_FAM1 と *NheI*\_*oriT*\_Rv のプライマーセットを用いた PCR で得た。一方、FAM-*oriT*2 はその相補鎖に FAM ラベルが付与してあり、*XhoI*\_*oriT*\_Fw と FAM-*oriT*\_FAM2 のプライマーセットを用いた PCR で得た。

pNIT112 を鋳型に FAM-pNIT5548 と pNIT5041、pNIT5548 と FAM-pNIT5041 のプライマーセットを用いた PCR で FAM-112-1 と FAM-112-2 を得た。

#### His-TraC<sub>N292</sub> の Nicking 活性

##### 操作

1. 10  $\mu$ l スケールで Nicking buffer (pH7.5、20 mM Tris-HCl、5 mM NaCl、0.1mM EDTA) 中に 25 ng の FAM ラベル DNA と 2.4  $\mu$ M His-TraC<sub>N292</sub> と 1  $\mu$ g salmon sperm DNA、5 mM MgCl<sub>2</sub> (終濃度) を混合した。
2. 30°C で 30 min インキュベートした。
3. BigDye X Terminator purification kit (Thermo Fisher Scientific) を用いて DNA 断片を精製した。
4. 精製物と GeneScan 500 LIZ standard (Life Technologies) を混合した後、95°C で 3 分 インキュベートした。
5. ABI PRISM 3130xl sequencer で FAM 及び standard のピークを検出した。
6. TraceViewer (<http://www.ige.tohoku.ac.jp/joho/traceviewer/>) で解析した。

#### G+A ladder の作製

基本的に Eckert の方法 (50) に従って行なった。

##### 操作

1. 10  $\mu$ l の FAM ラベル DNA 断片にギ酸を 25  $\mu$ l 加えた。
2. 25°C、5 分でインキュベートした。
3. Stop buffer (0.3M sodium acetate, 0.1mM EDTA) を 200  $\mu$ l 加え混合した。

4. この溶液をエタノール沈殿した。
5. 減圧乾燥後、70  $\mu$ l の 10%ピペラジンに溶解した。
6. 90°C、30 分間インキュベートした。
7. 減圧乾燥でピペラジンを完全に除いた。
8. ABI PRISM 3130xl sequencer で FAM 及び standard のピークを検出した。
9. TraceViewer で解析した。

#### 1-2-14. 塩基配列の解析及び DNA の高次構造の比較

MAFFT (<http://mafft.cbrc.jp/alignment/server/>)を用いて *oriT* (*traD-traA* 間)の塩基配列と relaxase のアミノ酸配列を比較した。また Mfold (51)を用いて *nic* site 周辺の高次構造を比較した。

### 1-3. 結果

#### 1-3-1. NAH7 の *oriT* の同定

トルエン分解プラスミド pWW0 の接合伝達関連遺伝子は NAH7 の当該遺伝子とアミノ酸レベルでおおよそ 74%の相同性を示す(41)。このように比較的高い相同性を示す pWW0 の *oriT* が *traD-traA* 間の領域に存在すると推定されている(42)ことから、NAH7 の *oriT* も *traD-traA* 間に存在する可能性が高いと考えた。実際、本領域には複数の特徴的な繰り返し配列が存在する(Fig. 1-6)。

*oriT* を有するプラスミドは、そのプラスミド上に接合伝達関連遺伝子が存在しなくても宿主細胞内に当該 *oriT* に作用し得る接合伝達関連遺伝子が共存すれば接合伝達可能である(Fig. 1-7)。そこで、汎用の広宿主域ベクター pNIT6012 (Tc<sup>r</sup> をコード)に NAH7 の推定 *oriT* 領域を含む *traD-traA* 間(NAH7 配列上の position 19758-20187)の 430 bp をクローニングしたプラスミド pNIT101 が、NAH7 にコードされた接合伝達関連遺伝子によって接合伝達可能であるかを検討した。pNIT101 と NAH7K2 (Km 耐性マーカーを付与した NAH7 誘導体)を保持する G7(NAH7K2)(pNIT101)株を供与菌、KT2440G2 株を受容菌として、pNIT101 と NAH7K2 それぞれの接合伝達頻度を測定した。ネガティブコントロールとしては供与菌 G7(NAH7K2)(pNIT6012)株から受容菌 KT2440G2 株への NAH7K2 および pNIT6012 の接合伝達頻度を測定した。

結果、供与菌 G7(NAH7K2)(pNIT101)株から受容菌 KT2440G2 株への pNIT101 の接合伝達が  $8.0 \times 10^{-5}$  の頻度で観察された(Table1-4)。Tc 耐性の接合伝達体コロニーのうちの 23%が Km 感受性であり、pNIT101 は NAH7 とは独立して接合伝達可能なことが強く示唆された。一方、供与菌を G7(NAH7K2)(pNIT6012)株とした場合には、NAH7K2 の接合伝達は観察されたが、pNIT6012 の接合伝達は観察されなかった。さらに KT2440(pNIT101)株を供与菌とした接合伝達試験から NAH7 非保持株は pNIT101 を接合伝達できないことが明らかとなった。

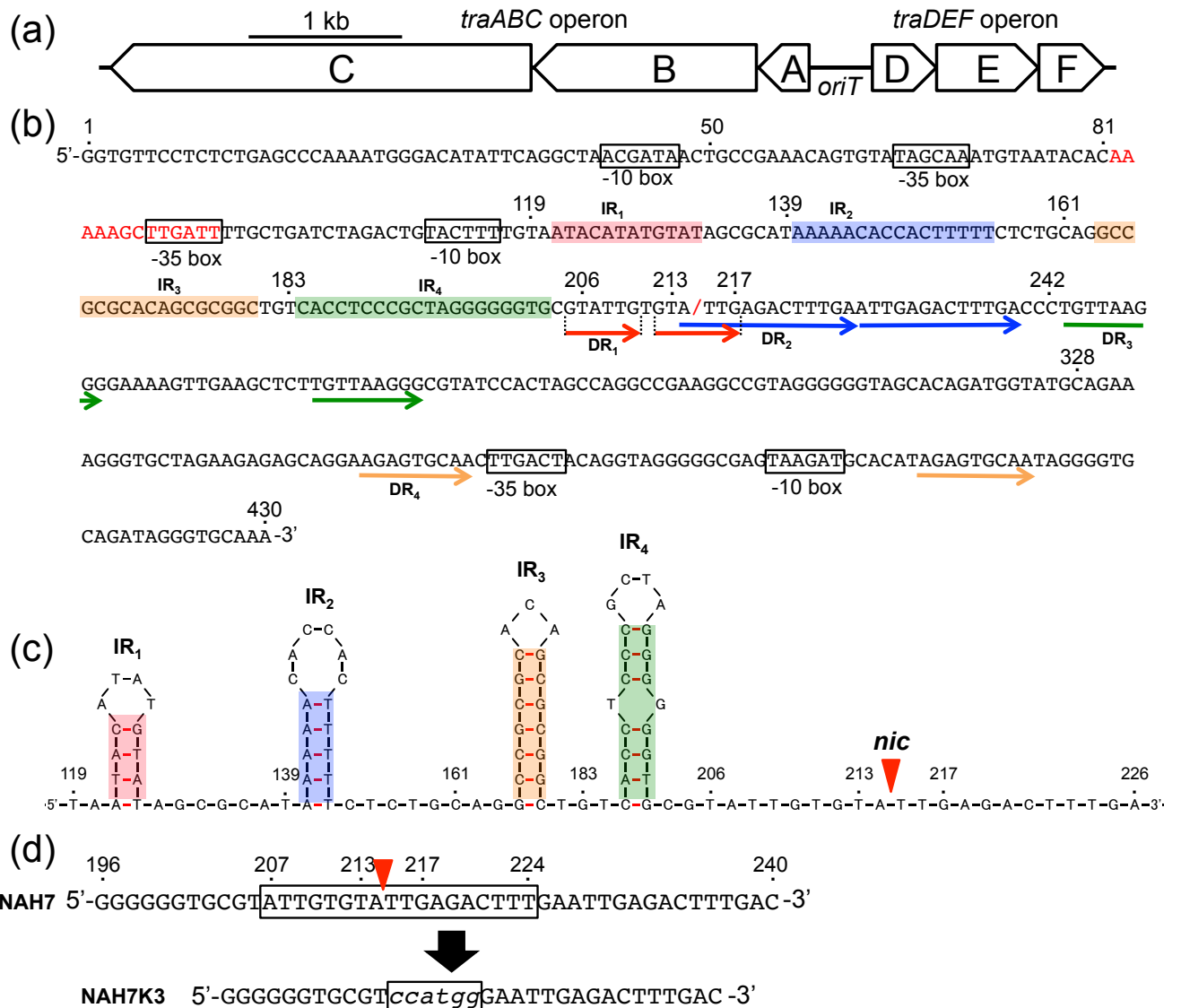
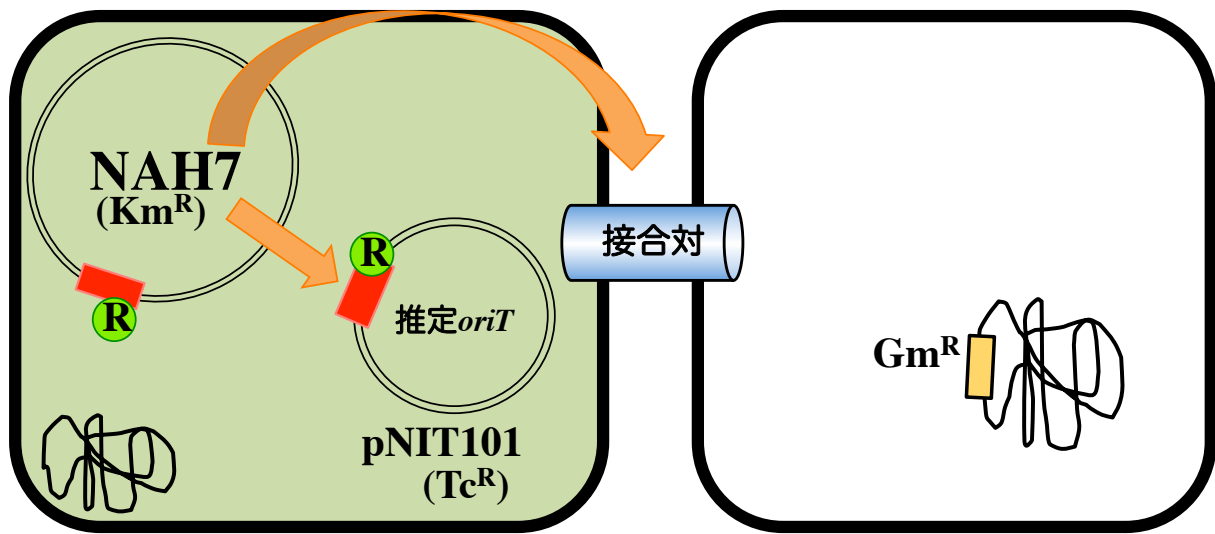


Fig. 1-6 (a) NAH7 の *oriT* (*oriT<sub>N</sub>*) とその周辺遺伝子。 *oriT<sub>N</sub>* は *traA* と *traD* の間に位置している。  
 (b) 430 bp の *oriT<sub>N</sub>* の塩基配列。 *traA* 側の末端を position 1 とした。この position は Fig. 1-10 にも対応している。推定 IHF 結合配列を赤、*nic* site を赤スラッシュ(/)で示した。 *traABC* と *traDEF* オペロンの推定プロモーターを四角枠で示した。ダイレトリプライトは矢印、インバトリプライトは網掛けで示した。  
 (c) *oriT<sub>N</sub>* の position 119 - 226 間の推定二次構造。 *nic* site は赤三角で示した。  
 (d) NAH7K3 の配列。 *nic* site を含む配列を KpnI の認識配列に置換した。

供与菌G7株 (TcKm耐性)

受容菌KT2440株 (Gm耐性)



pNIT101 : Tc耐性  
NAH7:Km耐性

Fig. 1-7 pNIT101 を用いた接合伝達試験の模式図。pNIT101 に接合伝達関連遺伝子を *trans* に供給し、pNIT101 の接合伝達能を指標に *oriT* の同定を行なった。

これらの結果に基づき、クローニングした領域は NAH7 の *oriT* (以後、この領域を *oriT<sub>N</sub>* と示す) を含んでいると結論づけた。

### 1-3-2. TraC による 2 つの *oriT<sub>N</sub>* 間の部位特異的組換え

TraC が同一レプリコン上で同方向に存在する 2 つの *oriT<sub>N</sub>* 間の部位特異的組換えを触媒するか検討した。この組換えを簡便に検出するために pNIT6012 に *oriT<sub>N</sub>-sacB-Gm<sup>r</sup>-oriT<sub>N</sub>* を導入した pNIT301 を作製した(Fig. 1-2)。また、pUC18 に *traC* を導入し、IPTG による *traC* の転写誘導が可能なプラスミド pUC18traC を作製した(Fig. 1-3)。

*recA* strain である *E. coli* EC100(pNIT301)株を pUC18traC あるいは pUC18 で形質転換し、Gm 及び Ap 含有培地で選択した。これら株を Tc と Ap 及び IPTG 含有 1/3LB 培地で一晚培養した後、Tc 及びスクロース含有 1/3LB 培地、Tc 含有 1/3LB 培地に塗布した。EC100(pNIT301)(pUC18traC)株の方が EC100(pNIT301)(pUC18)株に比べて Tc、スクロース耐性コロニーの出現率が 70 倍高かった(Table 1-4)。さらに、これらコロニーは調べた限り全てが Gm<sup>r</sup> であり、そのうちいくつかのコロニー由来の pNIT301 の *oriT<sub>N</sub>-sacB-Gm<sup>r</sup>-oriT<sub>N</sub>* 領域が *oriT<sub>N</sub>* のみになっていることをシーケンシングで確認した。この結果から TraC が *oriT<sub>N</sub>* 間の部位特異的組換えを触媒すると結論した。

### 1-3-3. NAH7 の *nic* site の同定

relaxase が二本鎖プラスミドを一本鎖化する開始点は *nic* site と呼ばれ、*oriT* 内に存在する接合伝達に必要な要素である。前項で TraC の relaxase 機能が判明したので、*in vitro* で *nic* site の同定を行なった。TraC の N 末端側の 292 アミノ酸領域に nicking 活性を担う relaxase\_domain が存在するとアミノ酸配列から推定できたため、本領域に His タグを付与したタンパク質(His-TraC<sub>N292</sub>)を用いて nicking Assay を行った。His-TraC<sub>N292</sub> を発現するプラスミド pET22b292TraC を作製し、*E. coli* BL21(DE3)に導入した。本株は IPTG 誘導により、His-TraC<sub>N292</sub> の推定分子量と良く一致する約 33 kDa のタンパク質を発現し、本タンパク質は His タグを利用した手法で精製可能であった(Fig.1-8)ことから、本タンパク質は His-TraC<sub>N292</sub> であると結論した。精製した His-TraC<sub>N292</sub> と FAM-*oriT1* を反応させ、キャピラリーシーケンサーで解析したところ、FAM-*oriT1* の全長より短いピークが出現した(Fig.1-9)。G+A ラダーと比較し、この短いピークは *oriT* 内の position 214 塩基の 3'側で切断されて生じる断片由来のピークであることが明らかとなった(Fig.1-9)。一方で TraC<sub>N292</sub> と FAM-*oriT2* を反応させた場合は明確なピークは出現しなかった(data not shown)。これらの結果より、NAH7 の *nic* site は position 214 塩基と 215 塩基の間(Fig. 1-6)であると結論した。

接合伝達関連遺伝子群のプロモーターを破壊せず、*nic* site を含む 18 bp を 6 塩基の配列(GGTACC: KpnI 認識配列)で置換した NAH7K3 を作製し(Fig. 1-6d)、本プラスミドの接合伝達能を検討することで、*traD-traA* 間に存在する *oriT* が NAH7 において唯一無二なのか検証した。その結果、供与菌 G7(NAH7K3)(pNIT101)株から受容菌 KT2440G2 株への NAH7K3 の接合伝達は観察されなかったが、pNIT101 の接合伝達は観察された(Table 1-3)。このことから NAH7K3 の接合伝



**Table 1-3. Conjugative transfer and mobilization of plasmids <sup>a</sup>**

Host	Plasmid	Transfer frequency		Mobilization frequency	
		Km <sup>r</sup> transconjugants	Tc <sup>s</sup> clones	Tc <sup>r</sup> transconjugants	Km <sup>s</sup> clones
G7	NAH7K2 + pNIT6012	1.2 x 10 <sup>-3</sup>	48/48	<1.2 x 10 <sup>-8</sup>	N.T.
G7	NAH7K2 + pNIT101	6.0 x 10 <sup>-5</sup>	37/48	8.0 x 10 <sup>-5</sup>	11/48
G7	NAH7K2 + pNIT201	1.4 x 10 <sup>-3</sup>	40/48	1.3 x 10 <sup>-3</sup>	8/48
G7	NAH7K3 + pNIT6012	<1.1 x 10 <sup>-8</sup>	N.T.	<1.1 x 10 <sup>-8</sup>	N.T.
G7	NAH7K3 + pNIT101	<5.1 x 10 <sup>-8</sup>	N.T.	5.3 x 10 <sup>-4</sup>	48/48
KT2440	pNIT6012	<1.4 x 10 <sup>-8</sup>	N.T.	<1.4 x 10 <sup>-8</sup>	N.T.
KT2440	pNIT101	<4.8 x 10 <sup>-8</sup>	N.T.	<4.8 x 10 <sup>-8</sup>	N.T.

<sup>a</sup> All the recipients used were KT2440G. The NAH7 derivatives and pMT1405 carry the Km<sup>r</sup> gene, and the pNIT series of plasmids the Tc<sup>r</sup> gene. The transfer and mobilization frequencies, which are the mean values from at least three independent experiments, are expressed by dividing the numbers of Km<sup>r</sup> and Tc<sup>r</sup> transconjugants, respectively, by the number of donor cells. The number of Tc<sup>s</sup> clones among 48 Km<sup>r</sup> transconjugants and that of the Km<sup>s</sup> clones along the 48 Tc<sup>r</sup> transconjugants shown in the fourth and sixth columns, respectively. N.T., not tested

**Table 1-4. Site-specific recombination between two copies of *oriT<sub>N</sub>*<sup>a</sup>**

Plasmid	Recombination frequency (Tc <sup>r</sup> /Tc <sup>r</sup> Sucrose <sup>r</sup> )		
	none	pUC18	pUC18traC
pNIT301	9.2 x 10 <sup>-6</sup> (48/48)	4.7 x 10 <sup>-6</sup> (48/48)	3.3 x 10 <sup>-4</sup> (48/48)

<sup>a</sup> The recombination frequency was calculated by dividing the number of Tc<sup>-</sup> and sucrose-resistant colonies by that of Tc<sup>r</sup> colonies. The mean value obtained from at least three independent experiments is shown. The number of Gm<sup>s</sup> clones per 48 Tc<sup>-</sup> and sucrose-resistant colonies is indicated in parentheses.

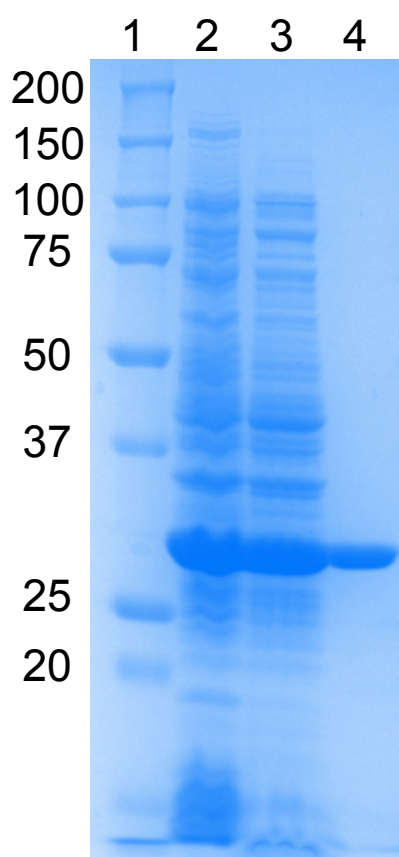


FIG. 1-8. His-TraC<sub>N292</sub> の大量発現と精製。BL21(DE3)(pET22b292TraC)株を用いて IPTG 誘導により His-TraC<sub>N292</sub> を大量発現し、His タグを用いて精製した。12.5%の SDS ポリアクリルアミドゲルで電気泳動し、CBB 染色した。レーン 1, サイズマーカー; レーン 2, トータル細胞; レーン 3, 粗酵素液; レーン 4, 精製画分。

達不全は、接合伝達関連遺伝子発現の健全性が失われたためではないことが確認され、*traD-traA* 間に存在する *oriT* が NAH7 の唯一無二の *oriT* であると結論した。

#### 1-3-4. *oriT* の deletion 解析

NAH7 の *oriT* 領域を Fig. 1-6 に示した。この領域には relaxase を含む Dtr システム関連タンパク質が結合すると推定されるリピート配列や、接合伝達関連遺伝子群のプロモーターと考えられる配列が存在していた。*oriT* として機能するために重要な領域をさらに絞り込むために、本領域の deletion 解析を行なった。すなわち、*traD-traA* 間の異なる 11 領域をそれぞれ含むプラスミド pNIT102 から pNIT112 (これらを総称して pNIT10X とする) を作製し (Fig. 1-10)、これらを NAH7K3 と共存させた G7(NAH7K3)(pNIT10X) 株から KT2440G2 株への pNIT10X の接合伝達頻度を測定した (Fig. 1-4)。

pNIT101 と比べて 49 bp 短い *oriT<sub>N</sub>* を有する pNIT102 は頻度に影響が無かったが、さらに切り詰めた pNIT103 から pNIT107 は頻度が 5 倍から 320 倍低下した。特に pNIT104 と pNIT105 を境に有意な頻度差あり、IR<sub>1</sub> が接合伝達に重要であることが示唆された。さらに、pNIT107 までは接合伝達体が得られていたが、IR<sub>4</sub> を欠失した pNIT108 では接合伝達体が得られなかった。一方で、下流側の欠失は頻度への影響が少なく、218 bp を欠失した pNIT111 も頻度に影響がなかった。*nic site* を欠失した pNIT112 もわずか 10 倍の頻度低下しか示さなかった。これらの結果から *oriT<sub>N</sub>* の *nic site* の上流側が接合伝達に重要なことが明らかとなった。

pNIT112 は同定した *nic site* (上述) を欠くにも関わらず、接合伝達可能であった。この場合には他の *site* に nick を導入していると考えられる。しかし、His-TraC<sub>N292</sub> と FAM-112-1、FAM-112-2 を反応させ、キャピラリーシークエンサーで解析しても FAM-112 の全長より短いピークは出現せず (Fig. 1-9c)、TraC が pNIT112 上のどの *site* に nick を導入しているのかは不明であった。

#### 1-4 考察

本研究で、NAH7 上の *traA* と *traD* の間の 430 bp が *oriT* として機能すること、さらに His-TraC<sub>N292</sub> を用いた *in vitro* nicking assay で position 214 塩基と 215 塩基の間に *nic site* があることが明らかとなった。これまでの *nic site* を同定する方法 (52, 53) では放射性ラベル付き *oriT* と relaxase を反応させたサンプルとシークエンスラダーをポリアクリルアミドゲルで電気泳動していた。本研究で用いた手法は、放射性ラベルの代わりに FAM ラベル、ポリアクリルアミドゲル電気泳動の代わりにキャピラリー電気泳動を用いた。本実験手法は新規かつより簡便な *nic site* 同定法である。

多くの接合伝達性プラスミドの *oriT* 内には複数の IR が存在しており、*nic site* は特定の IR の 8 から 10 塩基下流に位置する例が多かった (Fig. 1-11)。研究開始当初は、他のプラスミドとの比較から NAH7 の *nic site* は IR<sub>4</sub> の 10 塩基下流に位置すると推定していたが、実際には IR<sub>4</sub> の 11 塩基下流であった。*oriT<sub>N</sub>* 内には IR<sub>4</sub> の他に 3 つの IR が存在しており、IR<sub>4</sub> と IR<sub>1</sub> は効率的な接合伝達

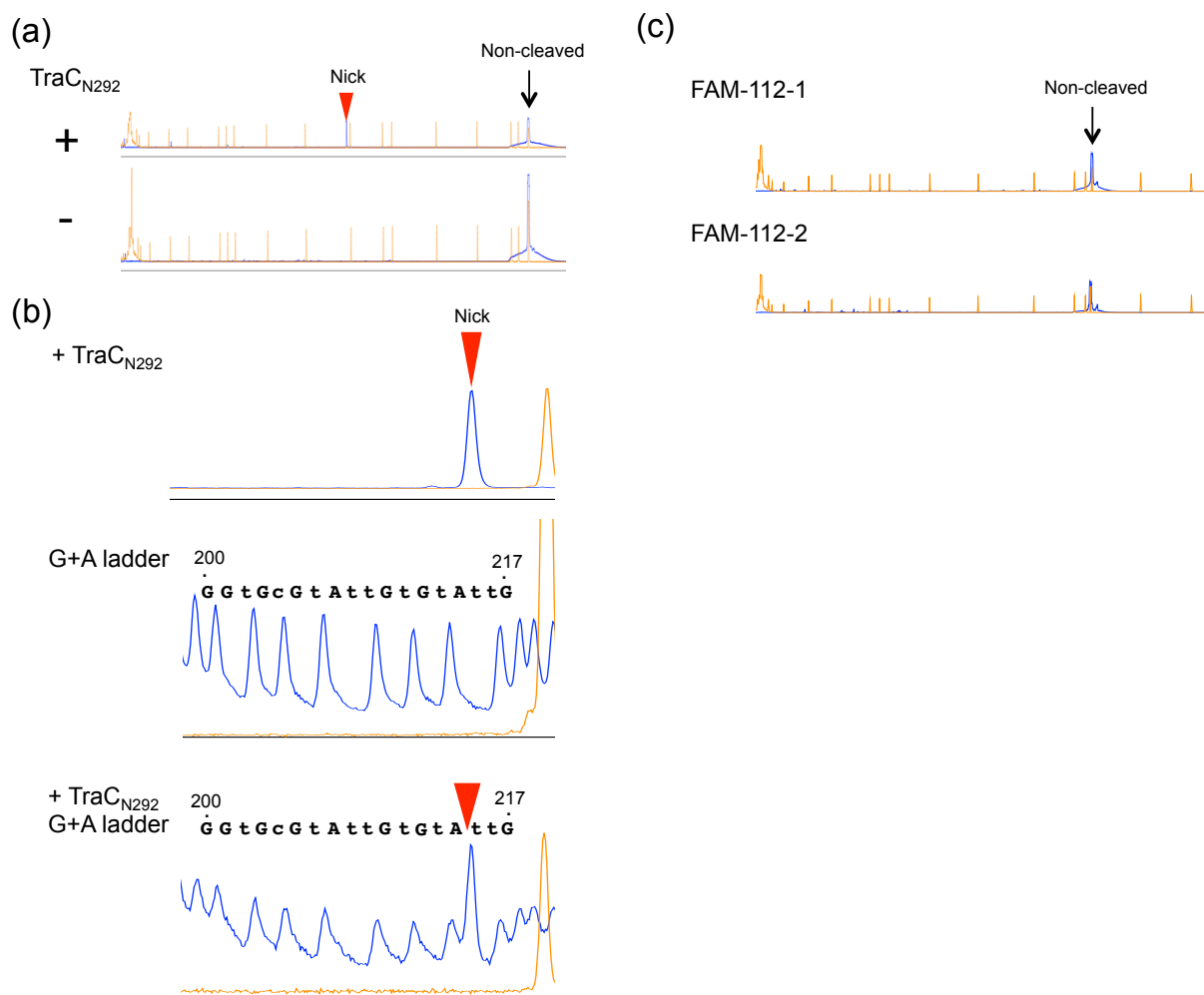


Fig. 1-9 *in vitro* アッセイによる NAH7 の *nic* site の同定。

(a) FAM-oriT1 に His-TraCN<sub>292</sub> を加えたサンプル(+)と加えないサンプル(-)の蛍光 peak パターンを示した。X 軸はフラグメントのサイズ、Y 軸は蛍光強度を示している。His-TraCN<sub>292</sub> を加えた場合に出現した peak を赤三角で示した。オレンジの peak は GeneScan 500 LIZ のスタンダードを示している。

(b) His-TraCN<sub>292</sub> を加えたサンプルと G+A ladder サンプルとその 2 つを混合したサンプルの蛍光 peak のパターンの拡大図。

(c) FAM-112-1 と FAM-112-2 に His-TraCN<sub>292</sub> を加えたサンプルの蛍光 peak パターンを示した。

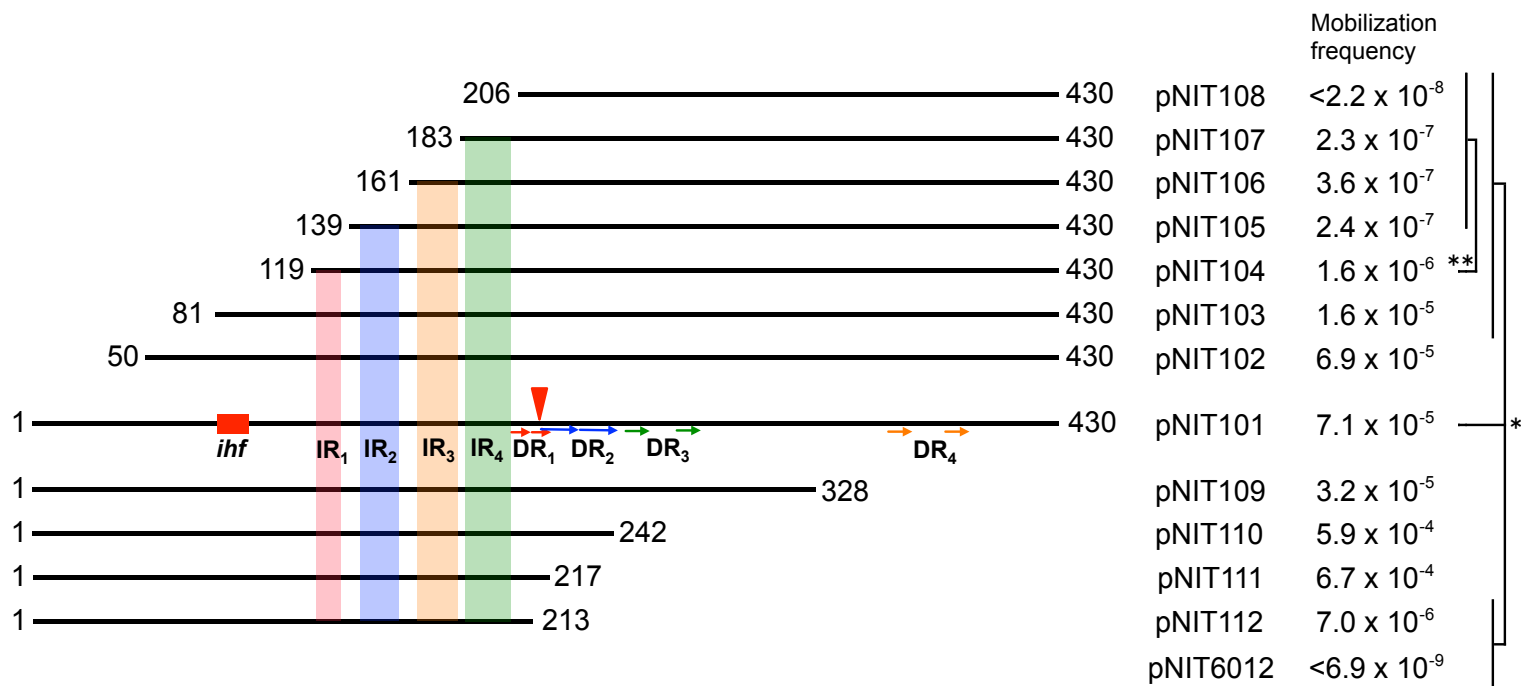


Fig. 1-10 pNIT101-pNIT112 の deletion 領域とその接合伝達頻度。それぞれの断片の両側の数字は  $oriT_N$  の塩基 position を示している。4つの IR は色付きのシャドウで示し、DR は矢印で示した。赤三角は *nic* site を表している。接合伝達頻度は供与菌のコロニー数当たりの接合伝達体のコロニー数で算出し、3回の独立した試験結果の平均値である。

t-検定で統計処理を行なった。\*は pNIT101 の値と、\*\*は pNIT104 と有意な差があることを示している ( $P < 0.05$ )。

に重要であることが deletion 解析から強く示唆された(Fig. 1-10)。R388 の研究で *nic site* の最も近傍に位置する IR は TrwC の結合と nick 導入に必須であることが明らかとなっている(54)。本研究でも *nic site* の最も近傍に位置する IR<sub>4</sub> を deletion した pNIT108 は接合伝達不能となった。これは、R388 と同様に IR<sub>4</sub> が TraC の機能に必須であることを意味すると考えている。また、IR<sub>1</sub> を含む position 1 から 138 塩基を deletion すると大きな接合伝達頻度の低下が観察されたことから、この領域に未同定のアクセサリータンパク質が結合し、この結合が接合伝達効率の上昇に繋がっている可能性が考えられた。R388 の接合伝達システムでは、TrwC と共に機能するアクセサリータンパク質である TrwA が知られている(Fig.1-11)。TrwA は *nic site* の上流に結合し、TrwC の nicking 活性を高める(55)。*trwA* は *trwABC* オペロンの先頭の遺伝子である。NAH7 上の *traABC* オペロンの先頭の遺伝子である *traA* も *trwA* と同じ役割をしている可能性が考えられたが、TraA と TrwA のアミノ酸配列は大きく異なっており、R388 の *oriT* (*oriT*<sub>R388</sub>) 上に存在する TrwA が結合する領域である *sbaA* や *sbaB* と相同性が高い領域も *oriT*<sub>N</sub> 上には見出されなかった。*oriT*<sub>N</sub> の position 1 から 138 塩基の役割を明らかにするには更なる解析が必要である。*oriT*<sub>N</sub> 上には推定 integration host factor (IHF)-binding site が見出され、この site を含んだ領域を deletion すると接合伝達頻度が低下した。*oriT*<sub>R388</sub> 上の *nic site* 近傍に 2 つの IHF binding site が存在し、IHF が relaxosome のアセンブリに重要な役割を果たしているという知見があるが(56)、*oriT*<sub>N</sub> の推定 IHF site は *nic site* と比較的離れた位置に存在していた。従って、実際に、この推定 IHF binding site に IHF が結合したとしても、R388 の接合伝達システムとは異なる機能を担っている可能性が高いと考えられる。*nic site* の下流には多くの DR が存在していたが、この下流領域を deletion しても接合伝達頻度にはあまり影響がなかった。pNIT112 にクローニングした *nic site* を含まない *oriT* (*oriT*<sub>112</sub>) 領域を有するものもわずか 10 倍の低下しか観察されなかった。この場合の *nic site* がどこであるか興味を持たれるが、His-TraCN<sub>292</sub> のみを用いた *in vitro* nicking assay では明確な peak は検出されなかった。*in vivo* ではアクセサリータンパク質の働きにより効率的に *oriT*<sub>112</sub> に nick を導入している可能性が考えられる。

TraC は接合伝達非依存的に同一レプリコン上の同方向に存在する 2 つの *oriT* 間で部位特異的組換えを触媒した(Table1-4)。また、先行研究で *traC* を破壊した NAH7(NAH 7 Δ*traC* とする)は接合伝達不能になり、G7(NAH 7 Δ*traC*)株に *traC* を相補した株は接合伝達能が回復した。これらの結果から、*traC* は relaxase としての性質を有すると結論した。TraC と TrwC のアミノ酸配列の比較を行ったところ、MOB<sub>F</sub> 属の relaxase domain の相同性は比較的高く、特に relaxase の機能に必要な求核置換反応を行うチロシン残基や金属イオンをキレートするヒスチジン残基などが保存されていた(Fig. 1-12)。しかし、NAH 7 Δ*traC* に *trwC* を相補した株では接合伝達能は回復せず、逆に *trwC* を破壊した R388 に *traC* を相補した株でも接合伝達能は回復しなかった(data not shown)。relaxase 含む接合伝達マシーナリーと *oriT* の間には、高い特異性があること知られていることから(57-59)。

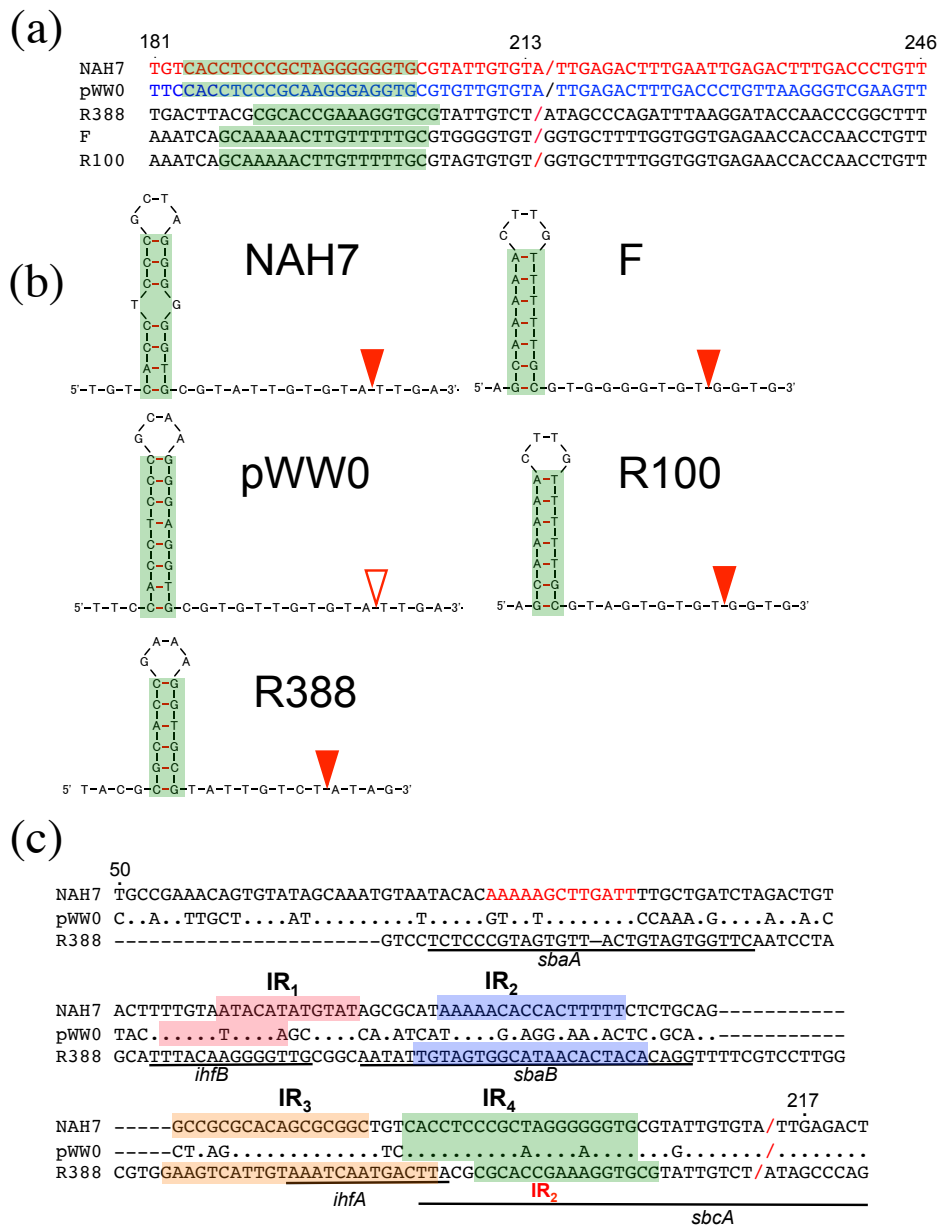


Fig. 1-11 *nic* site を含む *oriT* 領域の配列比較。(a) MOB<sub>F</sub> に属する 5 つのプラスミドを比較した。赤スラッシュは実験的に同定された *nic* site、青スラッシュは推定 *nic* site を示す。緑シャドウは IR。(b) 各プラスミドの *nic* site 周辺配列の推定二次構造。赤三角は実験的に同定されている *nic* site、赤枠白三角は推定 *nic* site を示している。(c) NAH7、R388、pWW0 の *nic* site、IR を含んだ *oriT* 配列の比較。position 番号は Fig. 1-6b と同じ。ドットは NAH7 と同一塩基、ハイフンは塩基がないことを示している。シャドウは IR を示す。*ihfA* と *ihfB* は IHF 結合領域、*sbaA* と *sbaB* は TrwA 結合領域、*sbcA* は TrwC 結合領域を示す。



R388 と NAH7 の relaxase に機能互換性がなかったのは、それぞれの relaxase が他の *oriT* に nick 導入ができなかった可能性が考えられる。

NAH7 の *oriT* と relaxase 遺伝子は IncP-9 群のプラスミド(pDTG1、pWW0、pNAH20) (60) でよく保存されており (data not shown)、本研究で NAH7 を対象に得た知見は他の IncP-9 群プラスミドにも反映することができると考えられる。pWW0 は、比較した IncP-9 群プラスミドのうち最も相同性が低かったが (Fig. 1-10, Fig. 1-11)、*oriT<sub>N</sub>* と pWW0 の *oriT* (*oriT<sub>w</sub>* と略す) は 63% の identity を示し、*oriT<sub>N</sub>* 上の IR<sub>1</sub> と IR<sub>4</sub> は *oriT<sub>w</sub>* 上にも保存されていた。特に、IR<sub>4</sub> から *nic site* までの配列はほぼ同一であり、pWW0 の *nic site* も推定できた (Fig. 1-11)。relaxase 遺伝子はアミノ酸レベルで 81% の identity を示した。第 2 章では NAH7 と pWW0 の接合伝達装置の機能互換性に関する実験を行った。

1  
 Motif 1  
 NAH7 MFNVTSIKGSNQYAAAGYYTA-ADDYAKESPG-EWQGIGAELGLAGPIDQKELAKLFDGKLPNGEVMPKTFDKETGNR  
 pWW0 .F...L...D... .FSN-... .A... .E.A... .R... .R.A... .T...  
 R388 .LSHMLVLRQDIGR..S..EDG... .DGDAS... .K...E...S.EV.S.RFRE.LA.NIGE.HRIMRSATRQDSKE

Motif 2  
 Motif 3  
 NAH7 RMGLDLTFSAPKSVSMQALIAGDKDVVAHRAVTKAMEHVEKLAQARRKEHGKSMLERTGNLIIGKFRHLSRAKDPQL  
 pWW0 .....M.....S.E.R..T.L.VN..T...S..V.....M.....M  
 R388 .I.....L...V...AEIIK.....ARTL.QA.AR...Q.IQ..TRI.T...V.....T..ER....

NAH7 HTHAVVMNATRREDGKWRRAIHNDIDFKIQPQIDAMYKGLAKELRELGYEIRVLDKDGNFELAHISRDIQIEAFSSRAKVI  
 pWW0 .....MT..S.....LR.....Y.....V.....I..Q...A.....NQ.....S...  
 R388 ....IL.M.K.S..Q...LK..E.V.RTRYLG.V.NA...H..QK...QL..-YG....D...D.Q...G..K.TEQ..

292  
 NAH7 EEALAKDGKTRSNATALEKQIIAMATRPKDERDRHLVKEYWVTKARDLGIEFGGRSQLDNQEYGRSESIHAEHNLP  
 pWW0 .D.....AD..P.....E...D..A..H...R..AP.NGG-P..YS..Q  
 R388 A.WY.AR.LDPNSVSLEQ...AAKVL.S.AK.TSV..EALRAE.QAT.KE...D.SR.EWSGREKG.SEKQA----.SFMP

NAH7 GITAGQAVVQYAINHLTEREQVVGESDLRATAALRAVGLASPSEVDDEIKRLVKQGTLESPTTYR--MATGK-DGAALS  
 pWW0 ...P.....N.....V.....T.DQ.N...R.....PN.DL.SPV..  
 R388 SDE.AKRA.R.....QS.MD.RE.VDT.MKH...A.RLEDIQK.LL.QTET.Y..REA.R..PGGQ..PT.EPGKT

473  
 NAH7 PAGWRALLKEQKQWSEKQYVVKMAINRGSVLEAEKRYTTQRAKREKAILAIERSGRGQVAPLLSKEQVAKALESSTL  
 pWW0 .....H.Q.L.....R..DK..K...EP.....K.....T...T..MT.....G...  
 R388 R.E.V.E.AA--MKQGA.RER.DN..KT.G..PI.P.....T..E...R..Q...D...A...VIAA.AARER.A.TN..

NAH7 SAGQYQAVEVIVSTSNRFVGIQGDAGTGTYSVDRAVKLIESVNNAMTERSTTTDAVFRVVALAPYGNQVTKNEGLDA  
 pWW0 .P..F.....N.....D...A..ATNNPQDITGY.....  
 R388 NQ..RE.A.L...AA..V..V..F.....SHML.T.KQM..G-----EGYH.R...A..S..K..RELNVE..

NAH7 HTLASFFHTKDKKLDERTIVVLDEAGVVGARQMEQLMRIIEQSGARLVQLGDTKQTEAIEAGKPPAQLQONGMQTARIKE  
 pWW0 .....N.G..AK...I.....R...E.....I.....S...  
 R388 N....LRA...NI.S..VL.I.....PT.L...TLKLA.KA...V.LM...A..K...R..D...AA...HMR..

670  
 NAH7 IQRQKNQELKIAVQHAADGNPGKSLEHVNHVEELREPGQRHQAIVRDYMSLTPQERKEVLIVAGTNKDRKQINAMTRESL  
 pWW0 .....DP...R...E..Q.T...LK...TASD.....A...DQ.....E..T.A.QA.  
 R388 .....P.....EL..AGKASS...RIKD.T.IKNHHE.RA.VAEA.IA.K.D..DRT...S...EA.RE..QIV..G.

NAH7 GLVNGKELPTLNRVDTTQAEERYAPSYYKGMIVQPEKDYIRAGLSRGELYTVDQALPGNVL-VVKDKNGNRVFEFNPRLK  
 pWW0 ..F.K...FE.....S.D.....Q...I.....K...V...V.....RS...F...QA  
 R388 .TA.K.I.FD..V.....HKN.QV.HVI...R..AKT..Q...R.VETG...R.T.IGEHD.Q.IQ.S.MTH

806  
 NAH7 TKLSVYNLEKPEFSVGDVLRITRNDQKLDLTNGDRMRVVGANGVIELASLKEKDGTPERVVALPTNRPLHLEHAYSATV  
 pWW0 .....K...LA...I..N.Q.P.....SIEG..VQ...VN.Q...T.S...K.....  
 R388 ..I...QP.RA.LA..TI.....KH...A.....K..AVEDRKVTVDG.-----N.E...DK...VD...AT..

914  
 NAH7 HSAQGLTNDRVMISINTKSLTTSQNLWYVAISRARHEARIYTDSIAGLPAAIANRYDKTTALSLSL-----QQARE  
 pWW0 .....L...R.....V.A...K...K.....E..  
 R388 ..S...S...L.DAHAE.R..RKDVY.....F...VF.NDRGK.....RENI.SA.HD.ADRGGRSAAAERQ..

NAH7 RQRNESIKPRTVLDGKELERKQRSALDGAGLGKSGV  
 pWW0 ...RD..Q...S..RA.....TG...PSS.NARI  
 R388 Q..ERERNRQ.QQPAHDRQKAA.E.ER.MEA.R---

Fig. 1-12 各 relaxase のアミノ酸配列の比較。アミノ酸残基番号の 15 から 292 が relaxase ドメイン、473 から 670 が ATPase ドメイン、806 から 914 が UvrD-like helicase ドメインである。

## 第2章 NAH7 と pWW0 の接合伝達システムの機能互換性解析

### 2-1. 緒言

これまでに多くの接合伝達性プラスミドが単離され、個々のプラスミドに関する解析がなされてきた(21)。一方で、異種プラスミド間の接合伝達システムの機能互換性については、relaxaseを含む接合伝達装置と *oriT*の間には高い特異性があることが報告されているが、知見は限られている。NAH7 と pWW0 の *oriT* は本研究と他グループの研究によって同定済み(42)であることから、本章ではこの2種のプラスミドを用いて、接合伝達システムの機能互換性に関する研究を実施した。具体的には、*oriT<sub>N</sub>* と *oriT<sub>W</sub>* を pNIT6012 にそれぞれ導入した pNIT101 と pNIT201 が、NAH7、pWW0 由来の接合伝達装置によって接合伝達可能であるか、また、同一レプリコン上に同方向に存在する *oriT<sub>N</sub>* と *oriT<sub>W</sub>* の間で部位特異的組換えを各プラスミド由来の relaxase が触媒可能かを検討した。

### 2-2. 材料及び方法

#### 2-2-1. 使用菌株・プラスミド、培地及び培養条件

本章で使用した菌株とプラスミドをTable 2-1に示した。培地はLB、1/3LBまたはSOC培地を用いた。寒天平板培地を用いる場合には、寒天粉末を培地に対して1.5% (w/v)で添加した。選択培地には必要に応じてカナマイシン(Km)は25 µg/ml、テトラサイクリン(Tc)は20 µg/ml、ゲンタマイシン(Gm)は20 µg/ml、アンピシリン(Ap)は100 µg/mlとなるように添加した。培養は、特に断りがないう限り *Pseudomonas* 属細菌については30°C、大腸菌については37°Cで行った。各種菌体を長期的に保存する場合は、培養液に15%になるようにglycerolを加え、-80°Cで保存した。

#### 2-2-2. DNA の取り扱い

遺伝子のクローニング全般、DNA塩基配列決定法は第1章に準じた。また、本章で用いたプライマーは、Table 2-2に示した。

#### 2-2-3. electroporation 法による形質転換法

GENE PULSER (BIO-RAD)を使用し、手順は第1章に準じた。

**Table 2-1. Bacterial strains and plasmids used in this chapter**

Strain or plasmid	Relevant characteristics <sup>a</sup>	Source or reference
<i>E. coli</i>		
DH5α	<i>recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 Δ(lacZYA-argF) Φ80lacZΔM15</i>	(44)
JM109	<i>recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 Δ(lac-proAB)(F<sup>r</sup> traD36 proAB<sup>+</sup> lacIqZΔM15)</i>	(45)
EC100	<i>mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) φ80dlacZΔM15 ΔlacX74 recA1 endA1 araD139 Δ(ara<sup>-</sup> leu)7697 galU galK rpsL nupG</i>	Epicentre Inc.
<i>P. putida</i>		
KT2440	Wild-type strain	ATCC47054
KT2440G	KT2440::TnMod-OGm <sup>r</sup> ; Gm <sup>r</sup>	This study
G7(NAH7K2)	G7 derivative harboring NAH7K2 instead of NAH7, former designated G7K2	(48)
Plasmid		
pMT1405	pWW0 derivative carrying Km <sup>r</sup> gene; Tol <sup>+</sup> Xyl <sup>+</sup>	(61)
pEX18Tc	pMB9 replicon; Tc <sup>r</sup> ; <i>sacB</i> ; suicide vector for gene replacement, carrying pUC18-derived multiple-cloning sites	(Hoang, 1998)
pTnGm1	pUC57 derivative carrying Gm <sup>r</sup> gene	Laboratory stock
pUC18	Ap <sup>r</sup> ; <i>E. coli</i> vector	(45)
pUC18traC	pUC18 derivative carrying NAH7 <i>traC</i> gene	This study
pNIT6012	pVS1 derivative; shuttle vector, Mob <sup>+</sup> Tc <sup>r</sup>	(49)
pNIT201	pNIT6012 derivative carrying <i>oriT</i> region from pWW0	This study
pNIT301	pNIT6012 derivative carrying <i>sacB</i> and Gm <sup>r</sup> genes flanked by two copies of <i>oriT</i> NAH7 region	This study
pNIT302 and pNIT303	pNIT6012 derivatives carrying <i>sacB</i> and Gm <sup>r</sup> genes flanked by <i>oriT</i> regions from NAH7 and pWW0	This study
pNIT304	pNIT6012 derivative carrying <i>sacB</i> and Gm <sup>r</sup> genes flanked by two copies of pWW0 <i>oriT</i> region	This study

**Table 2-2. Primers used in this study <sup>a</sup>**

Primer name	Sequence (5 to 3')	Purpose
XhoI_pWW0_oriT_F	GGG <i>ctc</i> gagGTTGTTCCCTCAAATCCCCT	Cloning of <i>oriT<sub>w</sub></i> on pNIT6012
NheI_pWW0_oriT_R	GGG <i>gct</i> ageTGCACCCTACCTGCACCTAC	Cloning of <i>oriT<sub>w</sub></i> on pNIT6012
pNITGm_oriTN_F1	TACCCGGGAGCTCGATTGACACCCTATCTGCACC	Construction of pNIT302
pNITGm_oriTN_R1	GGGGTGACGCCAAAGGGTGTTCCTCTCTGAGCC	Construction of pNIT302
pNITGm_oriTN_F2	GATGTGTATAAGAGACAGTTTGCACCCTATCTGCACC	Construction of pNIT303
pNITGm_oriTN_R2	TGGCAAAAGCTTCGAAGGTGTTCCCTCTCTGAGCC	Construction of pNIT303
pNITGm_oriTW_F1	TACCCGGGAGCTCGATGCACCCTACCTGCACCTAC	Construction of pNIT304 and pNIT303
pNITGm_oriTW_R1	GGGGTGACGCCAAAGGTGTTCCCTCAAATCC	Construction of pNIT304 and pNIT303
pNITGm_oriTW_F2	GATGTGTATAAGAGACAGTGCACCCTACCTGCACCTAC	Construction of pNIT304 and pNIT302
pNITGm_oriTW_R2	TGGCAAAAGCTTCGAAGTTGTTCCCTCAAATCCCCT	Construction of pNIT304 and pNIT302
pNITGm_oriTSacB_F	CTTTGGCGTCACCCCTTAC	Construction of pNIT302 to pNIT304
pNITGm_oriTSacB_R	CAGATGTGTATAAGAGACAGGCGGCATCAGAGCAGATTG	Construction of pNIT302 to pNIT304
Gm1_F	CCATTCAGGCTGCGCAACTGTTG	Construction of pNIT302 to pNIT304
Gm1_R	GCAGCGAGTCAGTGAGCGAG	Construction of pNIT302 to pNIT304
pNIT5548	GTGAGAAATCACCATGAGTGACG	Sequence of pNIT302 and pNIT303

<sup>a</sup> Recognition sites for restriction enzymes are indicated by lower and italicized letters.

### 2-2-3. プラスミドの作製

#### pNIT201 の作製

XhoI\_pWW0\_oriT\_F と NheI\_pWW0\_oriT\_R のプライマーセットを用いた PCR で pWW0 の *traD-traA* 間を増幅し、この断片を pNIT6012 の XhoI - NheI site にクローニングした(Fig. 2-1)。

#### pNIT302、pNIT303、pNIT304 の作製

pNIT301 (第 1 章) と同様の手法で、pNIT302 と pNIT303、pNIT304 を作製した。各プラスミドのマップは(Fig. 2-2)に示した。各 DNA 断片は Table 2-2 に示したプライマーセットを用い、pNIT6012 の EcoRI site に Gibson Assembly kit でクローニングした。

### 2-2-4. 接合伝達実験

接合実験は、0.45- $\mu$ m-pore-size cellulose acetate filter (Advantec)を使用し寒天培地上で行った。本研究では NAH7 と pWW0 の接合伝達を行う際に、Km 耐性遺伝子を付与した NAH7K2 と pMT1405 を使用し、Km 耐性及び Tc 耐性を指標として接合伝達体の選択を行った。pNIT6012 誘導体の接合伝達を行う際には、Tc 耐性を指標として接合伝達体の選択を行った。供与菌は *P. putida* G7 株あるいは *P. putida* KT2440 株を使用し、受容菌は KT2440G 株を使用した。

#### 操作

1. 供与菌および受容菌を一晩液体培養した。
2. 1 ml の受容菌を遠心 (10,000 rpm、室温、1 分間)し、菌体を集めた。
3. 1/3LB で 2 回洗浄した。
4. 集菌した受容菌に 1 ml の供与菌を加え、十分に混合した。
5. 遠心により菌体を集めた。
6. 1/3LB 寒天培地上に filter を置き、そこに 50  $\mu$ l 程度に濃縮した菌液をスポットした。
7. 30°C で 24 時間培養した。
8. 適宜希釈後、プラスミドを保持する受容菌を選択する培地に塗布した。接合伝達頻度を算出する際は適宜希釈し、接合伝達体および、供与菌、受容菌の選択培地に 10  $\mu$ l ずつスポットした。
9. 30°C で 1-2 日培養した。接合伝達頻度は供与菌当たりの接合伝達体の CFU で算出した。

### 2-2-5 Resolution Assay

*oriT* 間の部位特異的組換えを検討した。基本的に第 1 章の操作に準じて行なった。部位特異的組換え領域の配列を確認する際のシーケンシングはプライマー pNIT5548 を用いた。

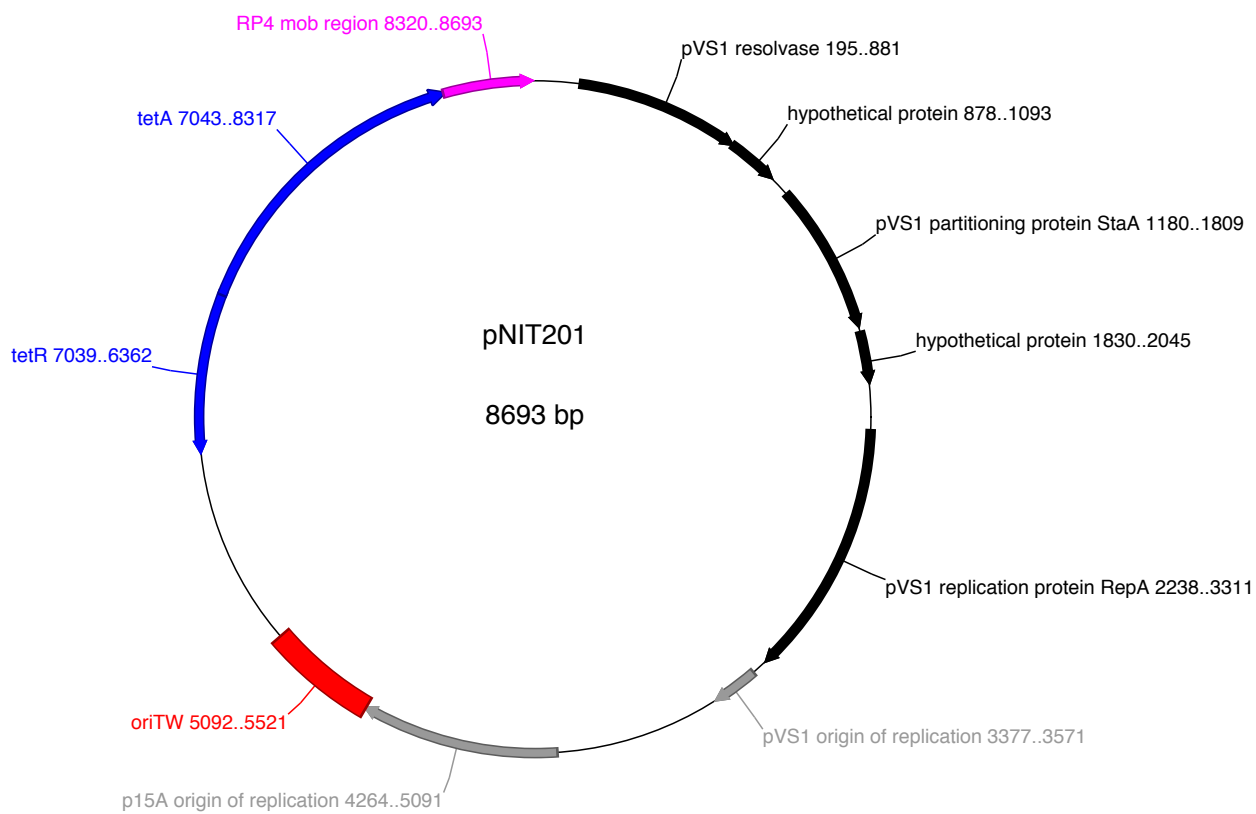


Fig. 2-1 pNIT201 のマップ。赤色で示した領域がクローニングした領域を示す。

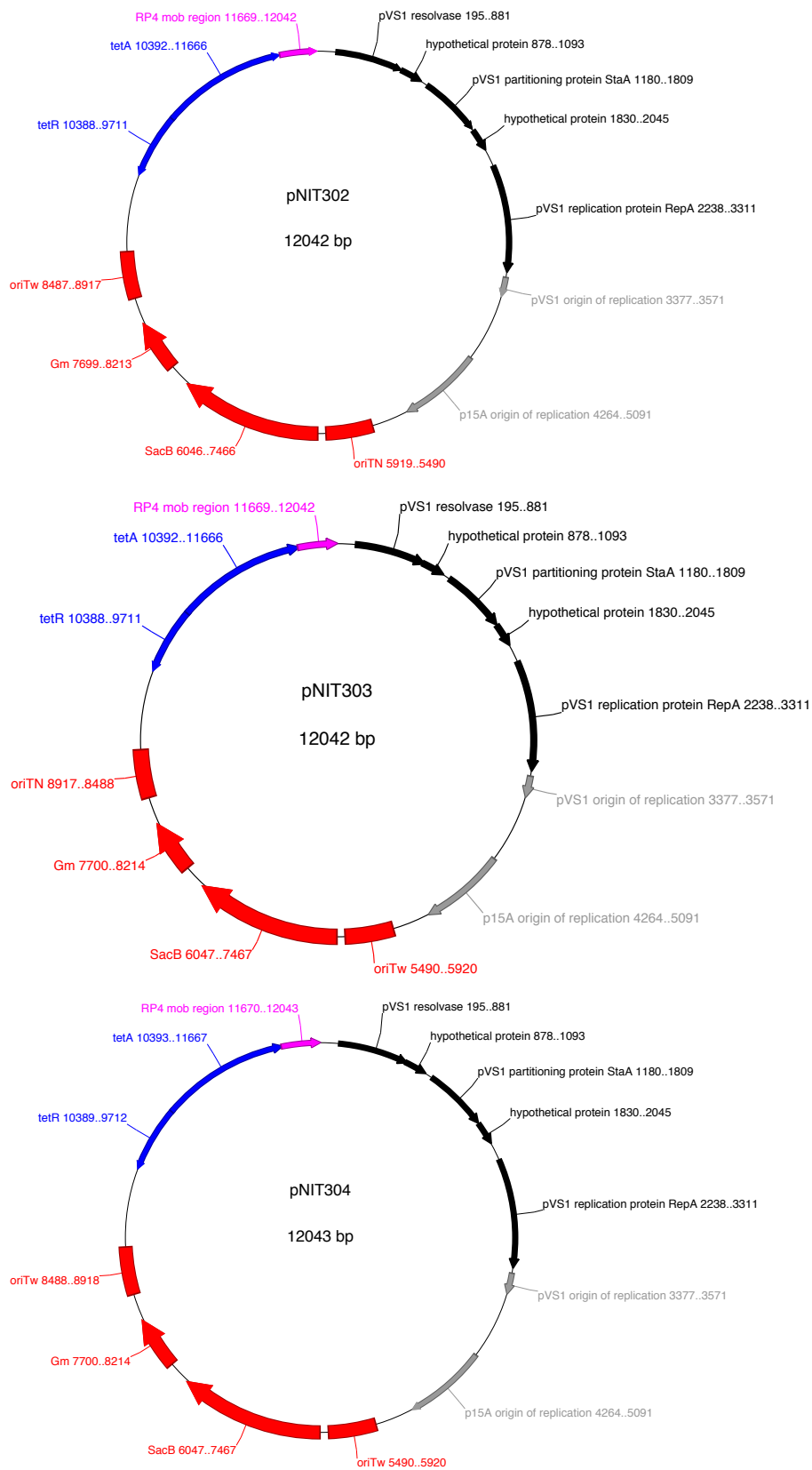


Fig. 2-2 pNIT302 - 304のマップ。赤色で示した領域がクローニングした領域を示す。

2つのoriTは同方向にクローニングした。



## 2-3. 結果

### 2-3-1. pWW0 の *traD-traA* 間は *oriT* として機能する

pWW0 の *oriT* は他グループによって同定済みであったが、極めて簡便な成果の記載に留まっていたため再確認を試みた(42)。pWW0 の *oriT* 領域を含む *traD-traA* 間の 431 bp を pNIT6012 にクローニングした pNIT201 を作製し(Fig. 2-1)、本プラスミドが pWW0 の共存で接合伝達可能か検討した。この際、pWW0 に Km 耐性遺伝子を付与した pMT1405 を用いた。KT2440(pMT1405)(pNIT201) 株を供与菌、KT2440G2 株を受容菌として、pMT1405 と pNIT201 それぞれの接合伝達頻度を測定した。ネガティブコントロールとして供与菌 KT2440(pMT1405)(pNIT6012)株を用いて同様に接合伝達頻度を測定した。その結果、前者の場合、pMT1405 が  $1.2 \times 10^{-3}$ 、pNIT201 が  $5.3 \times 10^{-2}$  の頻度で接合伝達が観察された。得られた Tc 耐性接合伝達体から LaboPass™ Plasmid Mini (COSMO Genetech)でプラスミドを精製し、アガロース電気泳動解析を行なった結果、pNIT201 と同じ大きさのバンドが検出された(Fig. 2-4)。後者のネガティブコントロールでは、pMT1405 が  $1.1 \times 10^{-3}$  及び pNIT6012 が  $2.8 \times 10^{-5}$  の接合伝達頻度が観察された(Table 2-3)が、Tc 耐性接合伝達体からは、前者接合伝達体のように pNIT6012 由来と思われるバンドは検出されなかった(Fig. 2-4)。従って、ネガティブコントロールで低頻度ではあるが TcGm 耐性株が現れたのは、pNIT6012 上に pWW0 の *oriT* として機能する領域があるためではなく、供与菌内の Tc 耐性遺伝子が受容菌へ移ったため、あるいは受容菌内の Gm 耐性遺伝子が供与菌に移ったためと考えられた。

### 2-3-2. NAH7 と pWW0 の接合伝達システムは機能互換性がある

NAH7とpWW0が他方の*oriT*を有するプラスミドを接合伝達可能か検討した。供与菌をG7(NAH7K2)(pNIT201)株あるいはKT2440(pMT1405)(pNIT101)株、受容菌をKT2440G2株として接合伝達試験を実施した。いずれの供与菌でも高頻度でTc耐性接合伝達体を得ることができた(Table 2-3)。また、供与菌KT2440(pMT1405)(pNIT101)株から得られたTc耐性接合伝達体からpNIT101由来と思われるバンドがアガロースゲル電気泳動で確認できた(Fig. 2-4)。NAH7とpWW0の接合伝達システムは共に両種*oriT*に機能可能と結論した。

### 2-3-3. NAH7 と pWW0 は両種プラスミドの *oriT* 間の部位特異的組換えを触媒する

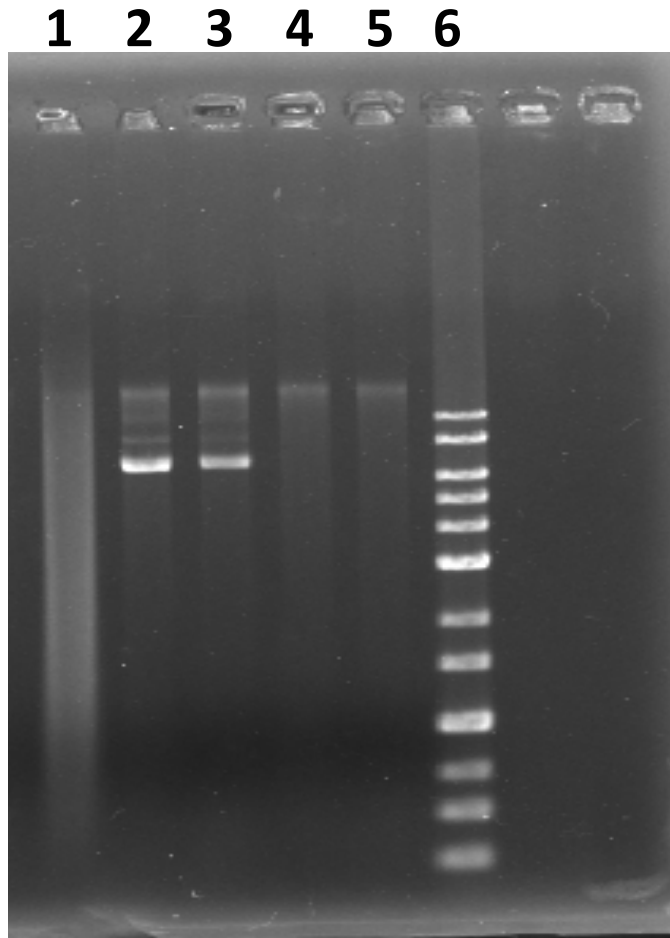
NAH7とpWW0のrelaxaseが両*oriT*間の部位特異的組換えを触媒可能であるか検討するために、pNIT301と類縁の3種のプラスミドを新たに作製した。pNIT302とpNIT303はpNIT301の片方の*oriT<sub>N</sub>*を*oriT<sub>W</sub>*に置換した構成で、pNIT302はTc<sup>r</sup>遺伝子側が*oriT<sub>W</sub>*、pNIT303は他方が*oriT<sub>W</sub>*である(Fig.2-2、 Fig. 2-5)。

**Table 2-3. Conjugative transfer and mobilization of plasmids <sup>a</sup>**

Host	Plasmid	Transfer frequency		Mobilization frequency	
		Km <sup>r</sup> transconjugants	Tc <sup>s</sup> clones	Tc <sup>r</sup> transconjugants	Km <sup>s</sup> clones
G7	NAH7K2 + pNIT6012	1.2 x 10 <sup>-3</sup>	48/48	<1.2 x 10 <sup>-8</sup>	N.T.
G7	NAH7K2 + pNIT101	6.0 x 10 <sup>-5</sup>	37/48	8.0 x 10 <sup>-5</sup>	11/48
G7	NAH7K2 + pNIT201	1.4 x 10 <sup>-3</sup>	40/48	1.3 x 10 <sup>-3</sup>	8/48
KT2440	pMT1405 + pNIT6012	1.1 x 10 <sup>-3</sup>	48/48	2.8 x 10 <sup>-5</sup> <sup>b</sup>	12/48 <sup>b</sup>
KT2440	pMT1405 + pNIT101	1.2 x 10 <sup>-3</sup>	3/48	5.3 x 10 <sup>-2</sup>	14/48
KT2440	pMT1405 + pNIT201	4.1 x 10 <sup>-4</sup>	13/48	3.9 x 10 <sup>-2</sup>	20/48

<sup>a</sup> All the recipients used were KT2440G. The NAH7 derivatives and pMT1405 carry the Km<sup>r</sup> gene, and the pNIT series of plasmids the Tc<sup>r</sup> gene. The transfer and mobilization frequencies, which are the mean values from at least three independent experiments, are expressed by dividing the numbers of Km<sup>r</sup> and Tc<sup>r</sup> transconjugants, respectively, by the number of donor cells. The number of Tc<sup>s</sup> clones among 48 Km<sup>r</sup> transconjugants and that of the Km<sup>s</sup> clones along the 48 Tc<sup>r</sup> transconjugants shown in the fourth and sixth columns, respectively. N.T., not tested.

<sup>b</sup> Agarose gel electrophoresis analysis of the cleared lysates prepared from the Tc<sup>r</sup> transconjugants revealed no detection of the plasmids less than 20 kb in sizes, indicating no conjugative mobilization of intact 8.2-kb form of pNIT6012 itself. The mechanism(s) for the formation of the Tc<sup>r</sup> transconjugants are unknown



**Fig. 2-4** TcGm 耐性接合伝達体のプラスミド。0.8%のアガロースゲルで電気泳動し、EtBr 染色をした。レーン 1, KT2440Gm; レーン 2, KT2440(pMT1405)(pNIT201)株から得られた接合伝達体; レーン 3, KT2440(pMT1405)(pNIT101)株から得られた接合伝達体; レーン 4 とレーン 5, KT2440(pMT1405)(pNIT6012)株から得られた TcGm 耐性株; レーン 6 スタンダードマーカ。

pNIT304はpNIT301の両方の $oriT_N$ を $oriT_w$ に置換した構成を有する(Fig.2-2)。

EC100株、EC100(NAH7K2)株、EC100(pMT1405)株、EC100(pUC18)株、EC100(pUC18traC)株をpNIT301、302、303、304でそれぞれ形質転換した株を作製した。これら計20株をTc含有1/3LB液体培地で一晚培養した後、Tcとスクロースを含有する1/3LB培地及びTc含有1/3LB培地に塗布した。この結果、NAH7K2とpMT1405、pUC18traC保持株の方が非保持株より100倍以上の頻度でTc及びスクロース耐性コロニーを生成した(Table2-4)。この結果からNAH7とpWW0のrelaxaseは両プラスミドの $oriT$ 間の部位特異的組換えを触媒すると強く示唆された。

EC100(NAH7K2)(pNIT302)株及びEC100(NAH7K2)(pNIT303)株から得られたTc及びスクロース耐性コロニーの当該領域周辺DNAのシーケンス解析を行なった結果、両種の $oriT$ の間で共通な19-bpの配列(5'-TTGTGTA/TTGAGACTTTGA-3';スラッシュはNAH7の $nic$  site)を境にして $oriT_N$ と $oriT_w$ 由来配列からなるhybrid  $oriT$ が生じていた(Fig. 2-5)。この結果からpWW0の $nic$  siteもこの19 bp内に存在すると強く示唆された。

## 2-4 考察

供与菌 KT2440(pMT1405)(pNIT201)株と KT2440(pMT1405)(pNIT101)株から受容菌 KT2440G2 株への pNIT201 と pNIT101 の接合伝達が観察されたが、ネガティブコントロールであるKT2440(pMT1405)(pNIT6012)株からも TcGm 耐性株が現れた(Table 2-3)。この原因として、pWW0はTn3型トランスポゾンであるTn4651とTn4653を有していることから(39)、これらトランスポゾンを介してpWW0とpNIT6012の融合体が形成され、これが受容菌へ伝達された可能性が考えられる。他の可能性として、pWW0はretrotransfer(供与菌→受容菌→供与菌で接合伝達する現象)を行う特徴があり、この際、受容菌の染色体が供与菌へ移行する可能性があることから(62)、受容菌内のGm<sup>r</sup>遺伝子が供与菌へ移ったことが考えられる。いずれにせよ、pNIT201またはpNIT101保持株を用いた接合実験ではpNIT6012保持株を用いた場合よりも3桁ほど高い頻度でTcGm耐性コロニーが得られたことから、pWW0の接合伝達システムがpNIT201とpNIT101に対して機能することは確実と思われる。

接合伝達装置と $oriT$ には高い特異性があることが報告されている(57-59)。例えば、Enterococcus属細菌から単離された2つの接合伝達性プラスミドpAD1とpAM373の $oriT$ を含む接合伝達関連遺伝子は非常に高い相同性(>90%)を示しているにも関わらず、それらプラスミドは他方の $oriT$ を有するプラスミドを接合伝達することができない。また、大腸菌のプラスミドF-plasmidとR100も同様に、相同性の高い接合伝達関連遺伝子を有しているのにも関わらず、それらプラスミドは他方の $oriT$ を有するプラスミドを接合伝達しない。本研究では、これら例示したプラスミド間よりも相同性が低いNAH7とpWW0の接合伝達システムの機能互換性があるという新規性の高い知見を得ることができた。

**Table 2-4. Site-specific recombination between two copies of *oriT* regions from NAH7 and pWW0<sup>a</sup>**

Plasmid	Recombination frequency (Gm <sup>s</sup> /Tc <sup>r</sup> Sucrose <sup>r</sup> )				
	none	NAH7K2	pMT1405	pUC18	pUC18traC
pNIT301	9.2 x 10 <sup>-6</sup> (48/48)	5.9 x 10 <sup>-4</sup> (46/48)	3.7 x 10 <sup>-5</sup> (48/48)	4.7 x 10 <sup>-6</sup> (48/48)	3.3 x 10 <sup>-4</sup> (48/48)
pNIT302	3.3 x 10 <sup>-6</sup> (48/48)	3.1 x 10 <sup>-4</sup> (48/48)	3.9 x 10 <sup>-4</sup> (48/48)	4.6 x 10 <sup>-8</sup> (48/48)	2.2 x 10 <sup>-6</sup> (47/48)
pNIT303	5.1 x 10 <sup>-6</sup> (48/48)	1.2 x 10 <sup>-3</sup> (48/48)	4.5 x 10 <sup>-3</sup> (48/48)	7.3 x 10 <sup>-6</sup> (48/48)	1.3 x 10 <sup>-3</sup> (48/48)
pNIT304	5.4 x 10 <sup>-5</sup> (48/48)	1.4 x 10 <sup>-3</sup> (48/48)	6.8 x 10 <sup>-3</sup> (48/48)	8.7 x 10 <sup>-5</sup> (48/48)	4.4 x 10 <sup>-3</sup> (48/48)

<sup>a</sup> The *E. coli* EC100 derivative that carried a *traC*-containing plasmid and one of the pNIT series of plasmids with two copies of *oriT* regions was cultivated in Tc- and Km-containing or Tc- and Ap-containing 1/3 LB, and plated on 1/3LB agar plates supplemented with only Tc and Tc plus 10% sucrose. The recombination frequency was calculated by dividing the number of Tc- and sucrose-resistant colonies by that of Tc<sup>r</sup> colonies. The mean value obtained from at least three independent experiments is shown. The number of Gm<sup>s</sup> clones per 48 Tc- and sucrose-resistant colonies is indicated in parentheses.



## 第3章 relaxase の機能解析

### 3-1. 緒言

relaxase タンパク質は *oriT* 内の *nic* site のリン酸バックボーンに対して求核置換反応をすることで nick を導入する。この際、2 価金属イオンをコファクターとして用い、活性中心で金属イオンがリン酸基の酸素分子と配位結合することで、効率よく DNA を切断することができる。*in vitro* でコファクターの研究は詳細にすすめられており、検討された多くの relaxase は複数種の 2 価金属イオンを利用可能(反応系に加えることで nicking 活性が上昇)であった(Table 0-1)。だが、relaxase を含む HUH endonuclease superfamily のタンパク質が細胞内でどの金属イオンを physiological cofactor としているかは不明である(63)。

これまでの relaxase のコファクターの研究は、nick を導入する塩基配列の特異性について考慮されていなかったことが問題点として挙げられる。具体的には、反応基質として *nic* site を含む数十 mer の短い DNA 断片を用いて、nicking の向上だけを指標にコファクターとして機能するかどうかを検討していた。本研究では第1章でキャピラリーシークエンサーを利用した *nic* site 同定法を確立しており、長鎖の DNA 断片を基質として用いても簡便に *nic* site を同定可能である。本章は、NAH7 の relaxase を用いて、コファクターによる塩基配列特異性への影響を *in vitro* で明らかにすることを目的に研究を行なった。

### 3-2. 材料及び方法

#### 3-2-1. 使用菌株・プラスミド、培地及び培養条件

本章で使用した菌株とプラスミドをTable 3-1に示した。培地はLBを用いた。培地の組成は第1章に準じた。寒天平板培地を用いる場合には、寒天粉末を培地に対して1.5% (w/v)で添加した。選択培地には必要に応じてテトラサイクリン(Tc)は20 µg/ml、アンピシリン(Ap)は100µg/mlとなるように添加した。培養は37°Cで行った。各種菌体を長期的に保存する場合は、培養液に15%になるようにglycerolを加え、-80°Cで保存した。

#### 3-2-2. DNA の取り扱い

遺伝子のクローニング全般、DNA塩基配列決定法については第1章に準じた。また、本章で用いたプライマーは、Table 3-2に示した。

#### 3-2-3. electroporation 法による形質転換法

GENE PULSER (BIO-RAD)を使用し、手順は第1章に準じた。

**Table 3-1. Bacterial strains and plasmids used in this chapter**

Strain or plasmid	Relevant characteristics <sup>a</sup>	Source or reference
<i>E. coli</i>		
DH5 $\alpha$	<i>recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 <math>\Delta</math> (lacZYA-argF) <math>\Phi</math>80lacZ<math>\Delta</math>M15</i>	(44)
Rosseta(DE3)	<i>F<sup>-</sup> ompT hsdS<sub>B</sub>(r<sub>B</sub><sup>-</sup> m<sub>B</sub><sup>-</sup>) gal dcm (DE3) pRARE (Cm<sup>r</sup>)</i>	Novagen
Plasmid		
pET22btraC	pET22b(+) derivative for overexpression of <i>traC</i>	This study
pET19b	Ap <sup>r</sup>	Novagen
pET19b292traC	pET19b derivative for overexpression of <i>traC<sub>N292</sub></i>	This study



**Table 3-2. Primers used in this chapter**

Primer name	Sequence (5 to 3')	Purpose
XhoI_traC_Histag_R	GGG <i>ctcgag</i> CACGCCTGATTTACCTAA	Construction of pET22btraC
NdeI_traC_Histag_F	GGAATTC <i>ctcgag</i> TTCAACGTTACCTCTATCAA	Construction of pET22btraC
XhoI_traCN292_R	AGCCGGATCCTCGAGCTAGCCGAACCTCGATACCTAG	Construction of pET19b292traC
NeoI_traCN292_F	TTGTTTAACTTTAAGAAGGAGATATACCATGTTC AACGTTACCTCTATCAA	Construction of pET19b292traC
pNIT5041_FAM	[FAM]-CTGACACCCTCATCAGTGCCAA	Amplification of FAM-DNA
pNIT5548_FAM	[FAM]-GTGAGAAATCACCATGAGTGACG	Amplification of FAM- DNA
nic_nonmutation	CCTTAACAGGGTCAAAGTCTCAATTCAAAGTCTCAATACACAATACG	Amplification of FAM- DNA
nic_mutation1	CCTTAACAGGGTCAAAGTCTCAATTCAAAGTCTCAAcTACACAATACG	Amplification of FAM- DNA
nic_mutation2	CCTTAACAGGGTCAAAGTCTCAATTCAAAGTCTCAAgACACAATACG	Amplification of FAM- DNA
nic_mutation3	CCTTAACAGGGTCAAAGTCTCAATTCAAAGTCTCAATcCACAAATACG	Amplification of FAM- DNA
nic_mutation4	CCTTAACAGGGTCAAAGTCTCAATTCAAAGTCTCAATAaACAATACG	Amplification of FAM- DNA
nic_mutation5	CCTTAACAGGGTCAAAGTCTCAATTCAAAGTCTCAATACcCAATACG	Amplification of FAM- DNA
nic_mutation6	CCTTAACAGGGTCAAAGTCTCAATTCAAAGTCTCAATACAAaAATACG	Amplification of FAM- DNA

### pET22bTraC の作製

NdeI\_traC\_Histag\_F と XhoI\_traC\_Histag\_R のプライマーセットで NAH7 の *traC* 全長を増幅し、この断片を pET22b の NdeI-XhoI サイトにクローニングした(Fig. 3-1)。

### pET19b292TraC の作製

NcoI\_traCN292\_F と XhoI\_traCN292\_R のプライマーセットで TraC<sub>N292</sub> 領域+終止コドンを増幅し、この断片を pET19b の NcoI-XhoI サイトにギブソンアセンブリーキットでクローニングした(Fig. 3-2)。

#### **3-2-4. His タグを付与したタンパク質の大量発現と精製**

His タグを付与したタンパク質(His-TraCN292 と His-TraC)の精製は、「**1-2-10 His タグを付与した TraC<sub>N292</sub> の大量発現と精製**」に基本的に従った。His-TraC についてはプラスミドとして pET22btraC、宿主細胞として Rosseta(DE3)株を用いた。

#### **3-2-5. タグなし TraC<sub>N292</sub> の大量発現と粗酵素抽出**

##### タグなし TraC<sub>N292</sub> 大量発現

大量発現については、プラスミドとして pET19b292traC、宿主細胞として BL21(DE3)株を用い、操作は **1-2-8 His タグを付与した TraC<sub>N292</sub> の大量発現と精製**に従った。

##### 粗酵素抽出

##### 操作

1. TraC<sub>N292</sub> を発現誘導済みの菌体細胞を Nicking buffer (前途)で懸濁した。
2. 超音波破碎で菌体細胞を破碎した後、遠心により上澄み(S 画分)を回収した。
3. SDS-PAGE で目的タンパク質が S 画分に存在することを確認した。

#### **3-2-6. nicking assay**

FAM でラベルした DNA 断片と TraC 誘導体を反応させた後、ABI PRISM 3130 Genetic Analyzer キャピラリーシーケンサーで FAM-DNA を検出した。

##### FAM ラベル付き DNA の作製

FAM-101-1 と FAM-101-2 は *oriT* 全長を含む DNA 断片である。それぞれの DNA 断片は FAM-pNIT5548、pNIT5041 と FAM-pNIT5041、pNIT5548 のプライマーセットで pNIT101 を鋳型とした PCR で増幅した。FAM-101-1 は Fig. 3-6 (b)の top strand の 5'に FAM ラベルが付与してあり、その相補鎖の 5'に FAM ラベルが付与してある。

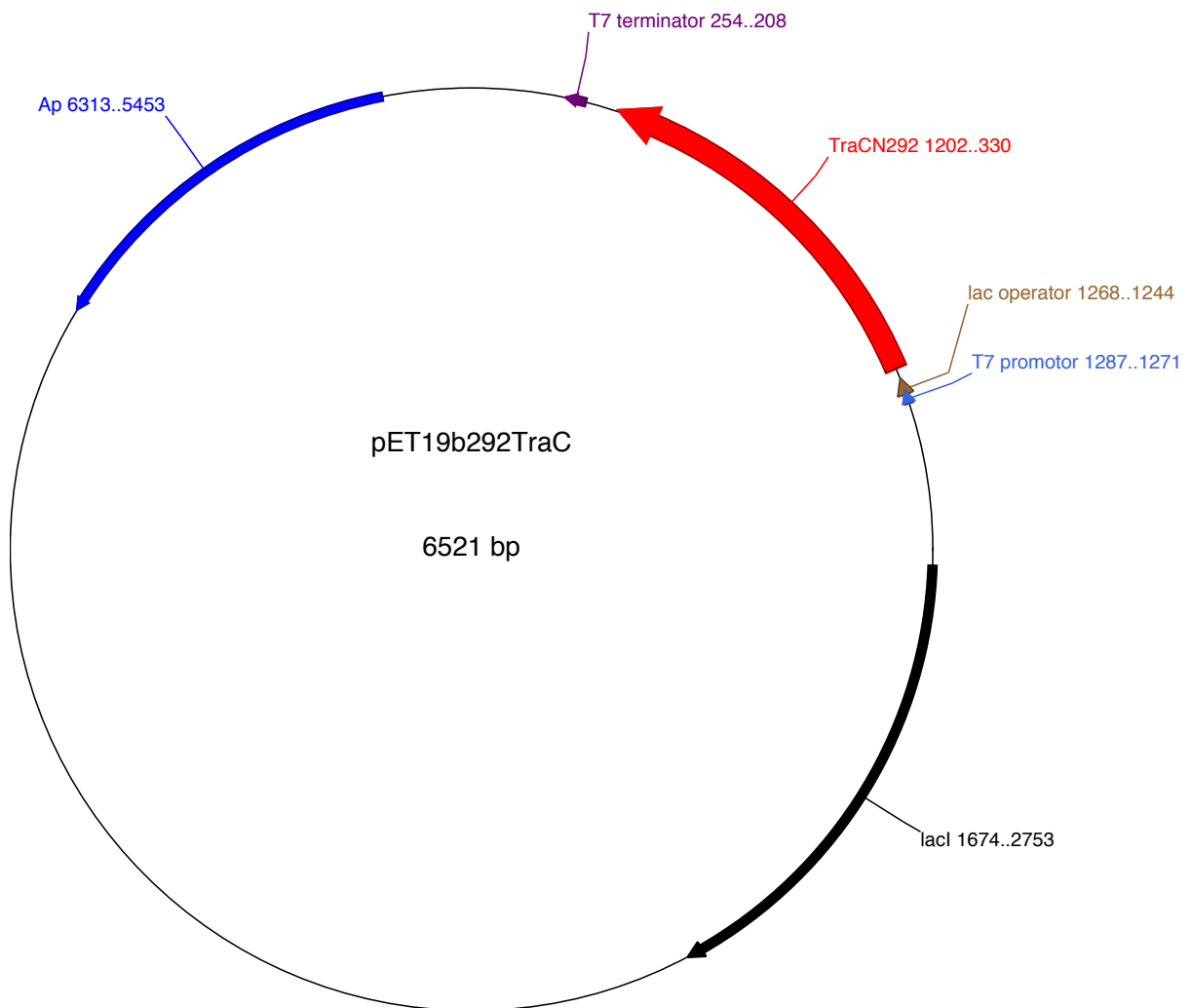


Fig. 3-1 pET19b292TraCのマップ。赤色で示した領域がクローニングした領域を示す。

*traC<sub>N292</sub>*をIPTGで転写誘導可能になるようにした。

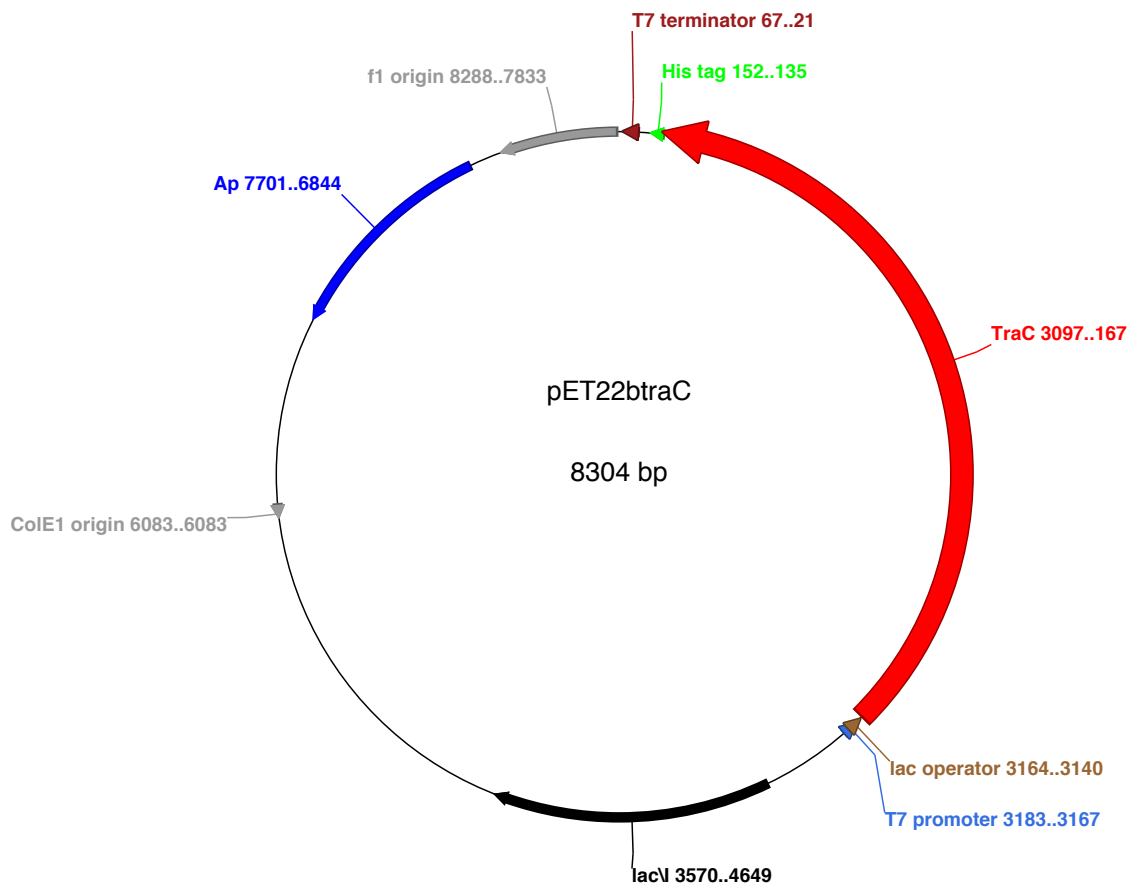


Fig. 3-2 pET22bTraCのマップ。赤色で示した領域がクローニングした領域を示す。

*traC*をIPTGで転写誘導可能になるようにした。

nic\_nonmutation と nic\_mutation-1~7 (Fig. 3-7)は、FAM-pNIT5548 と nic\_nonmutation 及び nic\_mutation1-7 で pNIT101 を鋳型とした PCR で増幅した。

FAM-112-1 と FAM-112-2 は *oriT* の position 1 から 213 を含む DNA 断片である(Fig. 3-6)。それぞれの DNA 断片は FAM-pNIT5548、pNIT5041 と FAM-pNIT5041、pNIT5548 のプライマーセットで pNIT112 を鋳型とした PCR で増幅した。

#### 精製した TraC 誘導体(His-TraC と His-TraC<sub>N292</sub>)の Nicking 活性

##### 操作

7. 10 µl スケールで Nicking buffer 中に 25 ng の FAM ラベル DNA と 2.4 µM TraC 誘導体と 1 µg salmon sperm DNA と共に 5 mM になるように二価金属塩化物(MgCl<sub>2</sub>、MnCl<sub>2</sub>、CoCl<sub>2</sub> 又は CaCl<sub>2</sub>)を混合した。
8. 30°C で 30 分インキュベートした。
9. BigDye X Terminator purification kit (Thermo Fisher Scientific)を用いて DNA 断片を精製した。
10. 精製物と GeneScan 500 LIZ Standard (Life Technologies)を混合した後、95°C で 3 分インキュベートした。
11. ABI PRISM 3130xl sequencer で FAM 及び standard のピークを検出した。
12. TraceViewer (<http://www.ige.tohoku.ac.jp/joho/traceviewer/>)で解析した。

#### BL21(DE3)(pET19btraC)株の粗酵素抽出液を用いた Nicking 活性

##### 操作

1. 10 µl スケールで抽出した粗酵素液に 25 ng の FAM ラベル DNA と 1 µg salmon sperm DNA と共に 5 mM になるように二価金属塩化物(MgCl<sub>2</sub> または MnCl<sub>2</sub>)を混合した。

これ以降の操作は精製した TraC 誘導体(His-TraC と His-TraC<sub>N292</sub>)の Nicking 活性と同様の操作を行った。

#### G+A ladder の作製

第 1 章に記載した方法に準じた。

### 3-3. 結果

#### 3-3-1. TraC は MnCl<sub>2</sub> 存在下で *nic* site 以外の部位に nick を導入する

*in vitro* の実験系で、TraC が添加する 2 価金属塩化物の種類によって nick を導入する塩基配列の特異性が変化するか検討した。第 1 章と同様に His-TraC<sub>N292</sub> を精製し、*oriT* 全長を含む FAM-101-1 を使い、MgCl<sub>2</sub>、MnCl<sub>2</sub>、CoCl<sub>2</sub>、CaCl<sub>2</sub> のいずれかを添加した条件、及びコントロールとして二価金属塩化物を添加しない条件(None)で nicking assay を実施した。解析は TraceViewer で行い、

LIZ-500 Standard で peak の面積サイズを標準化した結果を Fig. 3-3 に示した。第 1 章で同定した *nic* site で切断された時に生じる peak (赤枠)は、ネガティブコントロールで最も小さく、CaCl<sub>2</sub>、CoCl<sub>2</sub>、MgCl<sub>2</sub>、MnCl<sub>2</sub> 添加の順で大きかった。この結果は、これら 2 価金属塩化物が His-TraC<sub>N292</sub> の nicking を活性化することを示している。同様の結果は、R388 の TrwC でも報告されている(36)。一方で、MnCl<sub>2</sub> を添加したサンプルでは *nic* site 由来 peak より短いサイズの peak も検出された (図の青枠：以下、Star nick peak1)。Star nick peak1 の面積は *nic* site 由来 peak の 6.8 倍小さかった。また、His-TraC<sub>N292</sub> 非添加のコントロールとして BL21(DE3)(pET22b)株から His-TraC<sub>N292</sub> 精製時と同様の精製・buffer 置換を経て得た抽出液を用いた nicking assay を行なったところ、MgCl<sub>2</sub> と MnCl<sub>2</sub> のいずれかを加えた条件でも *nic* site 由来 peak、Star nick peak1 共に出現しなかった(Fig. 3-3)。この結果から、MnCl<sub>2</sub> と His-TraC<sub>N292</sub> が共存することで Star nick peak1 を生じる nick が導入されたと結論した。この本来の *nic* site 以外の箇所を切断する活性を star nick 活性と命名した。

次に His-Tag の影響を排除するため、タグなし TraC<sub>N292</sub> を用いて nicking assay を行なった。TraC<sub>N292</sub> を IPTG で発現誘導可能なプラスミド pET19b292traC を作製し、このプラスミドと pET19b で *E. coli* BL21(DE3) をそれぞれ形質転換した。pET19b292traC 保持株の粗酵素には TraC<sub>N292</sub> の推定分子量 32 kDa 周辺の位置に明確なバンドの誘導的発現が確認できた(Fig. 3-4)。この粗酵素を用いて nicking assay を行なったところ、His-TraC<sub>N292</sub> と同様に MgCl<sub>2</sub> 添加時は *nic* site 由来の peak のみ、MnCl<sub>2</sub> 添加時は *nic* site 由来の peak と Star nick peak1 の両方が確認できた(Fig. 3-5)。この結果から、TraC<sub>N292</sub> の金属イオンの違いによる nick 導入特性の変化は His-Tag の影響ではないと結論した。

TraC 全長も star nick 活性を有するかどうか検討した。His-TraC を IPTG で発現誘導可能なプラスミド pET22traC を作製した。*E. coli* Rosseta(DE3)(pET22traC)株から His-TraC の推定分子量 108 kDa 周辺の位置に明確なバンドの誘導的発現が確認でき、His タグを利用して His-TraC を精製した(Fig. 3-4)。本精製 His-TraC を用いて nicking assay を行なったところ、His-TraC<sub>N292</sub>、TraC<sub>N292</sub> の場合と同様に MgCl<sub>2</sub> 添加時は *nic* site 由来の peak のみ、MnCl<sub>2</sub> 添加時は *nic* site 由来の peak と Star nick peak1 の両方が確認できた(Fig. 3-5)。

Star nick peak1 の切断された site (Star *nic* site1) を G+A ladder と比較したところ、*oriT* の position 65 塩基と 66 塩基の間で切断されていた(Fig. 3-6)。Star *nic* site1 の周辺塩基配列を解析したところ、*nic* site の 5'末端側の 6 塩基と同一であった。

*oriT* 内の *nic* site がない方のストランドに *nic* site の 5'末端側の 8 塩基と同一の配列が存在していた(Fig. 3-6)。TraC がこの配列を認識して nick を導入するか検討するため、本鎖に対して FAM-101-2 を用いた nicking assay を実施した。その結果、MnCl<sub>2</sub> 存在下で大きい peak (Star nick peak2) が確認された。G+A ladder との比較から、Star nick peak2 は予想した position 75 塩基と 76 塩基との間での切断に由来するものであると結論した(Fig. 3-6)。これらのことから TraC は MgCl<sub>2</sub> と比べて MnCl<sub>2</sub> 存在下で nick を導入する塩基配列の特異性が低下すると強く示唆された。

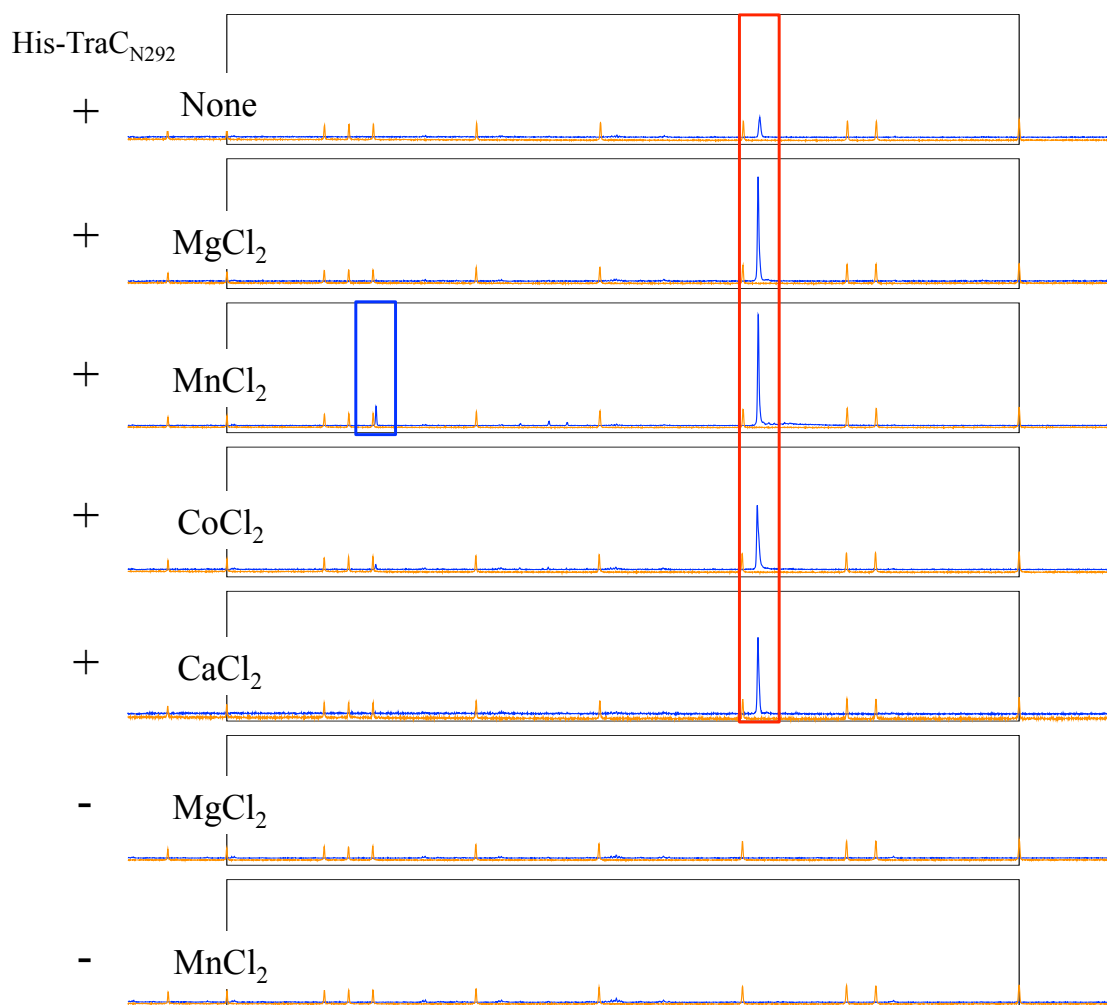
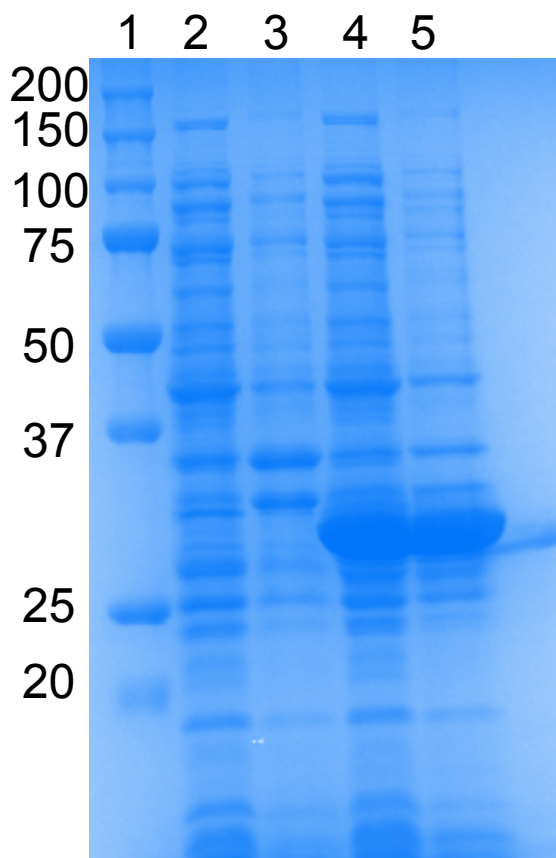


Fig. 3-3 FAM-101-1 を用いた nicking assay。第 1 章で明らかとなった *nic* site 由来の peak を赤枠で囲った。Star nick peak1 は青枠で囲った。FAM-DNA のピークを青色、サイズマーカーを橙色で示した。His-TraC<sub>N292</sub> 添加サンプルは+で、非添加サンプルは-で示した。各サンプルに添加した二価金属塩化物を記載した。

(a)



(b)

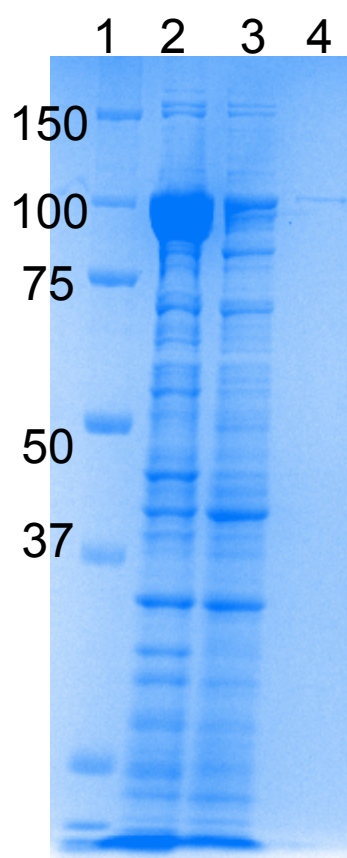
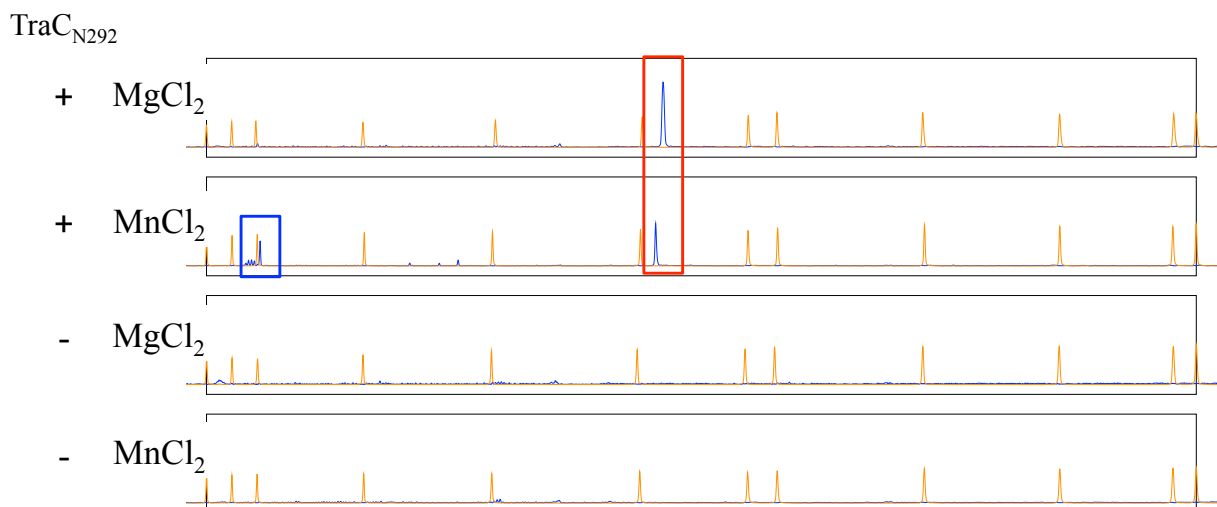


Fig. 3-4 (a) TraC<sub>N292</sub> の大量発現。BL21(DE3)(pET19b292traC)株と BL21(DE3)(pET19b)株を IPTG 誘導後、トータル細胞と粗酵素液を 12.5%の SDS ポリアクリルアミドゲルで電気泳動し、CBB 染色をした。レーン 1, サイズマーカー; レーン 2, BL21(DE3)(pET19b)株のトータル細胞; レーン 3, BL21(DE3)(pET19b)株の粗酵素液; レーン 4, BL21(DE3)(pET19b292traC)株のトータル細胞; レーン 5, BL21(DE3)(pET19b292traC)株の粗酵素液。

(b) His-TraC の大量発現と精製。BL21(DE3)(pET22btraC)株に IPTG 誘導して His-TraC を大量発現した。15%の SDS ポリアクリルアミドゲルで電気泳動し、CBB 染色をした。レーン 1, サイズマーカー; レーン 2, トータル細胞; レーン 3, 粗酵素液; レーン 4, 精製画分。



(a)



(b)

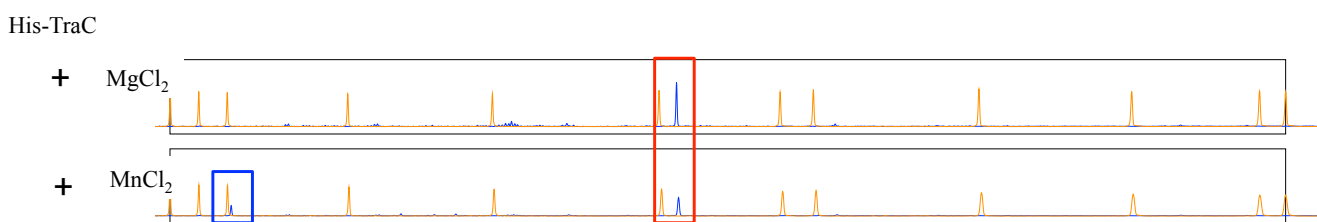
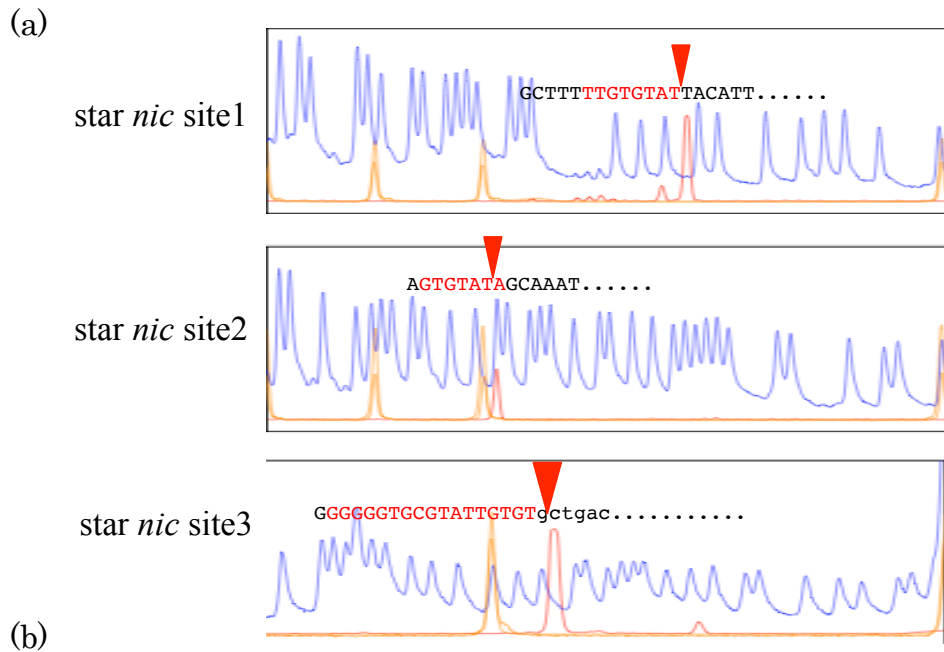


Fig. 3-5 (a) FAM-101-1 を用いた nicking assay。TraC<sub>N292</sub> を含む粗酵素液添加サンプルは+で示し、BL21(DE3)(pET19b)から調製した粗酵素液を添加したサンプルは-で示した。FAM-DNA のピークを青色、サイズマーカーを橙色で示した。(b) FAM-101-1 を用いた nicking assay。His-TraC 添加サンプルは+で示し、非添加のサンプルは-で示した。



(b)

1. *oriT*の配列

5'-GGTGTTCCTCTCTGAGCCCAAAATGGGACATATTCAGGCTAACGATAACTGCCGAAACAGTGTATAGCAAATGTAATACACAA  
3'-CCACAAGGAGAGACTCGGGTTTTACCCTGTATAAGTCCGATTGCTATTGACGGCTTTGTCCACATATCGTTTACATTTATGTGTT

AAAGCTTGATTTTGCTGATCTAGACTGTACTTTTGTAATACATATGTATAGCGCATAAAAAACCCACTTTTTCTCTGCAGGCC  
TTTCGAACATAAACGACTAGATCTGACATGAAAACATTATGTATACATATCGCGTATTTTGTGGTGAAAAAGAGACGTCGGC

213  
GCGCACAGCGCGGCTGTCACCTCCCGCTAGGGGGTGCGTATTGTGTA / TTGAGACTTTGAATTGAGACTTTGA.....  
(c) GCGTGTGCGCGCCGACAGTGGAGGGCGATCCCCCAGCATAACACAT AACTCTGAACTTAACTCTGAACT.....

pNIT112の配列1-213

.....GCGCGGCTGTCACCTCCCGCTAGGGGGTGCGTATTGTGtagc.....  
.....CGGCCGACAGTGGAGGGCGATCCCCCAGCATAACACAcgatcg.....

Fig. 3-6 (a) G+A ladder と各 Star *nic* peak。各 Star *nic* site の peak を赤色、G+A ladder を青色、サイズマーカーを橙色で示した。G+A ladder に対応する塩基配列を記し、各 Star *nic* site を赤三角で示した。

(b) *oriT* 配列と Star *nic* site。各 star *nic* site を赤三角で、*nic* site を赤スラッシュ(/)で示した。赤色の塩基は本来の *nic* site 周辺領域と相同性が高い。

(c) pNIT112 にクローニングした *oriT* 領域と Star *nic* site。Star *nic* site3 を赤三角で示した。小文字は NheI site を示す。

### 3-3-2. 金属コファクターの違いによる性質変化の解析

TraC が  $MnCl_2$  存在下で nick 導入でき、 $MgCl_2$  存在下では nick 導入できない配列を明らかにすることは金属コファクターによる塩基配列特異性の低下を理解に繋がると考えられた。そこで *nic* site 周辺領域に似た様々な配列を基質 DNA として nicking assay を実施した。

*nic* site 周辺領域に 1 塩基変異導入した 7 種の FAM-DNA 断片(FAM-Mnic1 - 7 とした)を作製した(Fig. 3-7)。この DNA 断片は *oriT* の position 1 から 252 の塩基配列を有している。これら DNA 断片を用いて nicking assay を行なった(Fig. 3-7)。FAM-Mnic3 と 5 を使用した場合、 $MnCl_2$  と  $MgCl_2$  のいずれの存在下でも目立った peak が確認できなかったが、これら以外の DNA 断片を用いた場合には  $MnCl_2$  と  $MgCl_2$  のいずれの存在下でも *nic* site 由来 peak と同位置に比較的大きい peak が確認された。一方で、本来の *nic* site を含まない *oriT* の position 1-213 塩基がクローニングされている pNIT112 を鋳型に FAM-DNA 断片(FAM-112-1 および FAM-112-2)を作製し (Fig. 3-6)、nicking assay を行なったところ、 $MnCl_2$  存在条件のみで *nic* site 由来 peak とほぼ同位置に peak が確認された(Fig. 3-8)。この peak は  $\cdot\cdot GCGTATTGTGTg/ctagc$  のスラッシュ部分での切断によるものであり、*oriT* 外の *NheI* site 内に *nic* が導入されたことになる。

### 3-4. 考察

金属イオンをコファクターとして用いる酵素では、コファクターである金属イオンの種類によって反応特性に違いが生じる(64)。例えば、(i) DNA polymerase は  $Mn^{2+}$  をコファクターとすると  $Mg^{2+}$  を用いた場合より DNA 合成の正確性が低下する。また、(ii) DNaseI は  $Mg^{2+}$  存在下では二本鎖 DNA にランダムに nick を導入し、 $Mn^{2+}$  存在下では二本鎖 DNA の同時切断が起こる。さらに、(iii) II 型制限酵素は  $Mg^{2+}$  以外の金属イオン存在下で塩基配列特異性の変化と緩和(Star 活性)起こることが知られている。このような金属イオンコファクターの研究はバイオテクノロジーに大きく貢献しており、ランダム突然変異導入法である error prone PCR はその代表的な応用例である。一方で、生体内では多くの金属イオンが細胞内プロセスに必要とされ、生育に必須である。 $Mn^{2+}$  は微生物を含むあらゆる生物種にとって生育必須元素であり(65)、細菌細胞中には低濃度( $Mg^{2+}$  の 1000 分の 1 以下)で存在している(66)。

HUH endonuclease superfamily には relaxase の他に DAN 複製に関連する Rep や可動性遺伝因子の transposase が属している(63)。HUH endonuclease はチロシン残基によって DNA の切断を触媒し、この反応時に特定の His 残基に結合した 2 価金属イオンを利用する。コファクターとして多種の 2 価金属イオンを利用できることが *in vitro* 解析で明らかとなっている。relaxase でも 2 価金属イオンを反応系に加えることで nicking が向上することが示され、2 価金属イオン存在下での立体構造解析も行われている(31, 36)。

relaxase の種類によってコファクターとできる 2 価金属イオンに違いがある。ほとんどの relaxase

(a)

nic_nonmutation	FAM.....CGTATTGTGTA/TTGAGACTTTGAATTGAGACTTTGACCCTGTTAAGG
nic_mutation1	FAM.....CGTATTGTGTA/ <b>g</b> TTGAGACTTTGAATTGAGACTTTGACCCTGTTAAGG
nic_mutation2	FAM.....CGTATTGTG <b>Tc</b> /TTGAGACTTTGAATTGAGACTTTGACCCTGTTAAGG
nic_mutation3	FAM.....CGTATTGTG <b>gA</b> /TTGAGACTTTGAATTGAGACTTTGACCCTGTTAAGG
nic_mutation4	FAM.....CGTATTGT <b>tTA</b> /TTGAGACTTTGAATTGAGACTTTGACCCTGTTAAGG
nic_mutation5	FAM.....CGTATTG <b>g</b> GTA/TTGAGACTTTGAATTGAGACTTTGACCCTGTTAAGG
nic_mutation6	FAM.....CGTATT <b>t</b> TGTA/TTGAGACTTTGAATTGAGACTTTGACCCTGTTAAGG
nic_mutation7	FAM.....CGTAT <b>g</b> GTGTA/TTGAGACTTTGAATTGAGACTTTGACCCTGTTAAGG

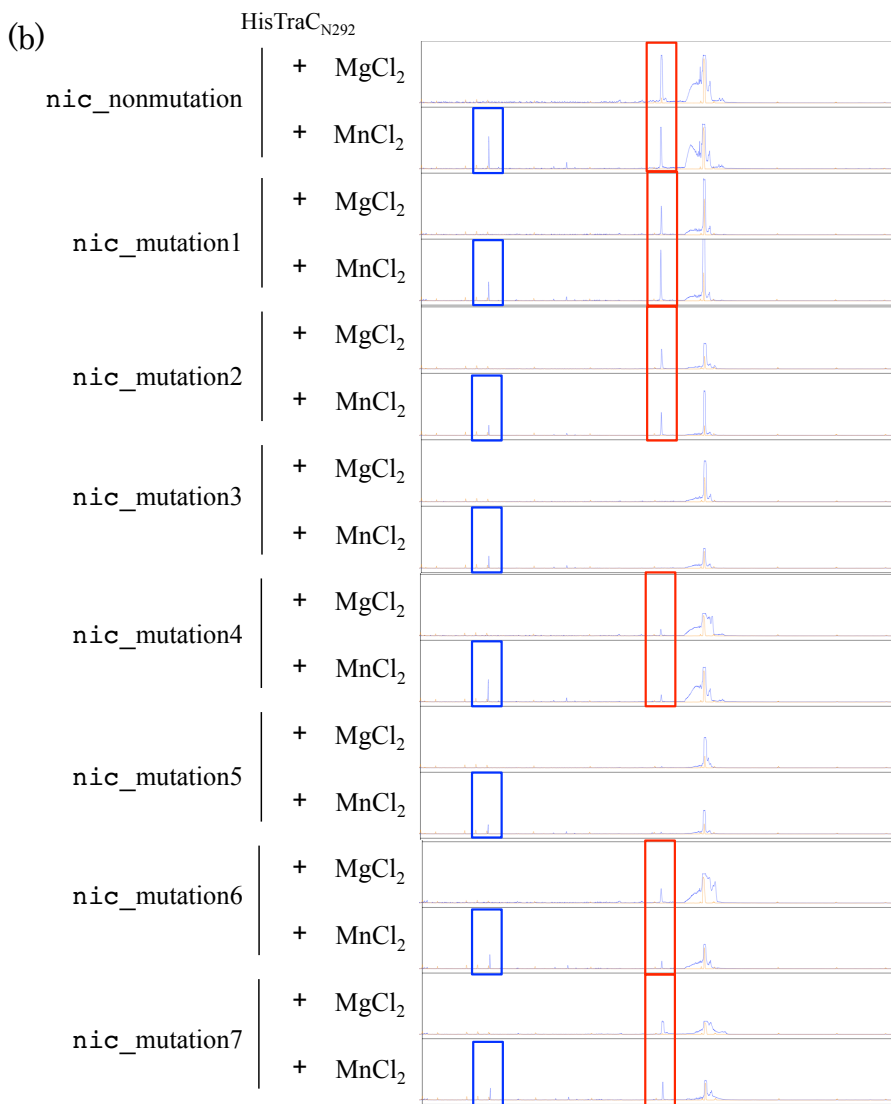


Fig. 3-7 (a) 各 FAM-DNA 断片の塩基配列。スラッシュは *nic* site、赤の小文字は点変異置換した塩基を示す。

(b) *nic\_mutation* を導入した FAM-DNA 断片を用いた nicking assay。 *nic* site 由来の peak と Star *nic* peak1 をそれぞれ赤枠と青枠で囲った。

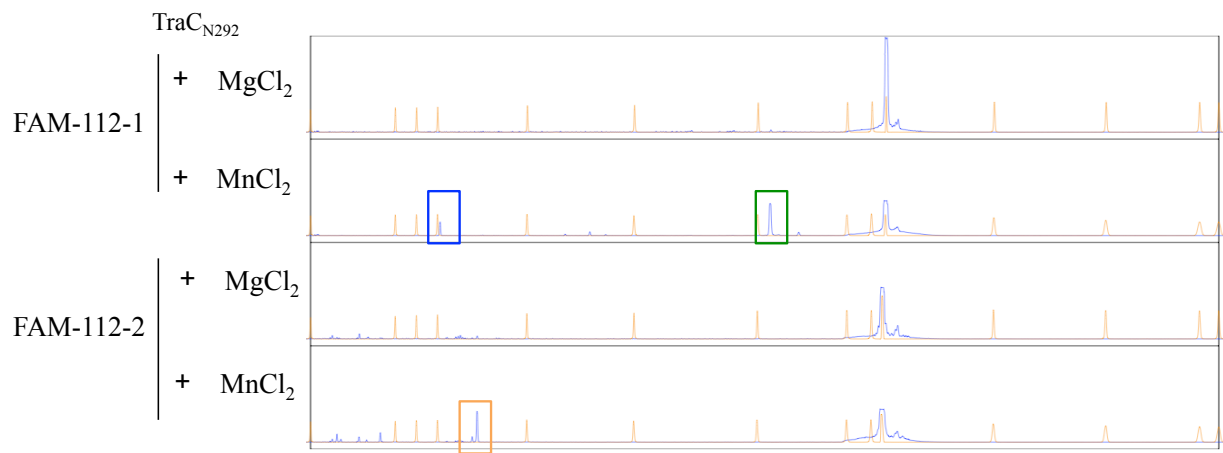


Fig. 3-8 FAM-112 を用いた nicking assay。Star nic peak1、peak2、peak3 を青枠、橙枠、緑枠でそれぞれ囲った。FAM-DNA のピークを青色、サイズマーカーを橙色で示した。

が多種の 2 価金属イオンをコファクターにできるが、 $\text{Ni}^{2+}$ 、 $\text{Mn}^{2+}$ 、 $\text{Co}^{2+}$ 、 $\text{Cu}^{2+}$ は利用できるが、 $\text{Mg}^{2+}$ を利用できない relaxase も存在する(Table 0-1)。このような relaxase は細胞内に  $\text{Mg}^{2+}$ と比較して微量にしか存在しない 2 価金属イオンを利用して nick を導入していると考えられた。一方で、relaxase も II 型制限酵素のように金属コファクターの種類によって切断する塩基配列特異性が変化することが考えられるが、これまでこのような研究に着手した例は皆無であった。その理由として切断された塩基配列を同定する手法が確立されていなかったことが挙げられる。本研究では、第 1 章でキャピラリーシーケンサーを利用した *nic site* 同定法を確立し、長鎖の DNA 断片に対しても簡便に *nic site* を同定できた。

本章では、TraC の nick を導入する塩基配列特異性が  $\text{MgCl}_2$  存在下と  $\text{MnCl}_2$  存在下で異なることを示した。 $\text{MnCl}_2$  存在下では  $\text{MgCl}_2$  存在下と比べて、塩基配列特異性が低下したことを強く示唆する結果が得られた。このような変化はコファクターとした金属イオンによる TraC の立体構造変化に起因する可能性がある。3 種の Star *nic site* を同定することができ、いずれも本来の *nic site* の 5'末端側と相同性の高い配列であった(Fig. 3-6)。*nic site* 周辺に点変異を施した *nic\_mutation1-7* には  $\text{MnCl}_2$  存在時のみで nick が導入される配列は存在しなかったが、*nic site* の 5'末端側の 2 塩基目と 4 塩基目の T は nick 導入に必須であることが示されたことは(Fig. 3-7)、今後の解析に重要な知見であると考えている。一方で、pNIT112 は *nic site* の 5'側と 3'側の両塩基に点変異があり、 $\text{MnCl}_2$  存在下でのみ nick 導入が起きた。より具体的な塩基配列特異性の変化を解明するためにはより網羅的な解析が必要である。

relaxase は *oriT* のみを認識して受容菌へ DNA を輸送していると考えられているが、本研究で示した relaxase の塩基配列特異性の低下は relaxase が *oriT* 以外の配列を認識して受容菌へ DNA を輸送できる可能性を示唆している。*nic site* の 5'末端側と類似の配列は、NAH7 の *oriT* 以外の領域や *P. putida* KT2440 株の染色体上に存在していた。relaxase が  $\text{Mn}^{2+}$ をコファクターとした場合に、これらの領域から接合伝達を開始できるのかもしれない。これら可能性の検証には *in vivo* 系の実験が必要である。

## 第4章 *traDEF* オペロンの転写制御機構の解明

### 4-1. 緒言

NAH7に関する先行研究で、*traDEF* オペロンの接合伝達効率への寄与が示されている(40)。本オペロンはシンテニーを含めて広宿主域性プラスミドに保存されており(Fig. 0-6)、他プラスミドでも当該オペロン構成遺伝子の接合伝達頻度への寄与が報告されている。ただし、*traD* およびそのホモログの破壊が接合伝達頻度に与える影響はプラスミドごとに異なっている。NAH7の*traD*破壊は接合伝達頻度の24倍程度の低下をもたらし、RP4の*traD*のホモログ*traK*破壊では接合伝達不能になった(67)のに対して、R388の*traD*ホモログ*stbA*破壊では、接合伝達頻度が50倍程度上昇した(68)。このようにシンテニーを含めて保存されたオペロンの構成遺伝子の破壊による効果がプラスミドによって大きく異なることは、その機能の重要性と複雑性を意味している。

本章では*traDEF* オペロンの機能解明を目的として、特にTraDの機能解析を実施し、ゲルシフトアッセイとフットプリント解析でTraDが*oriT*領域に結合すること、そして自身のプロモーター活性を制御することを明示した。

### 4-2. 材料及び方法

#### 4-2-1. 使用菌株・プラスミド、培地及び培養条件

本章で使用した菌株とプラスミドをTable 4-1に示した。培地はLB、1/3LBまたはSOC培地を用いた。寒天平板培地を用いる場合には、寒天粉末を培地に対して1.5% (w/v)で添加した。選択培地には必要に応じてカナマイシン(Km)は25 µg/ml、テトラサイクリン(Tc)は20 µg/ml、ゲンタマイシン(Gm)は20 µg/ml、アンピシリン(Ap)は100 µg/ml、クロラムフェニコール(Cm)は20 µg/mlとなるように添加した。培養は、特に断りがない限り*Pseudomonas*属細菌については30°C、大腸菌については37°Cで行った。各種菌体を長期保存する場合には、培養液に15%になるようにglycerolを加え、-80°Cで保存した。また、必要に応じてisopropyl β-thiogalactoside (IPTG)を終濃度0.5 mMで添加した。

#### 4-2-2. DNAの取り扱い

遺伝子のクローニング全般、DNA塩基配列決定法については第1章に準じた。また、本章で用いたプライマーは、Table 4-2に示した。

**Table 4-1. Bacterial strains and plasmids used in this chapter**

Strain or plasmid	Relevant characteristics	Source or reference
<i>E. coli</i>		
DH5 $\alpha$	<i>recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 <math>\Delta</math> (lacZYA-argF) <math>\Phi</math>80lacZ<math>\Delta</math>M15</i>	(44)
JM109	<i>recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 <math>\Delta</math> (lac-proAB)(F<sup>+</sup> traD36 proAB<sup>+</sup> lacIqZ<math>\Delta</math>M15)</i>	(45)
BL21(DE3)	F <sup>+</sup> <i>ompT hsdSB (rB<sup>-</sup> mB<sup>-</sup>) gal ompT, <math>\lambda</math> (DE3)</i>	(46)
<i>P. putida</i>		
KT2440G	KT2440::Tn <i>Mod</i> -OGm ; Gm <sup>r</sup>	This study
KTPtraD	KT2440 derivative carrying miniTn7Gm::TPtraDLZT in its chromosome	(40)
Plasmid		
NAH7K2	NAH7 $\Delta$ <i>nahAc</i> ; Km <sup>r</sup>	(48)
NAH7 $\Delta$ D2	NAH7K2 $\Delta$ <i>traD</i>	This study
pEX18Gm	pMB9 replicon; Gm <sup>r</sup> ; <i>sacB</i> ; suicide vector for gene replacement, carrying pUC18-derived	(43)
pEX18GmtraDupdown	pEX18Gm derivative	This study
pET22b(+)	Ap <sup>r</sup> ; C-Terminal-His tag	Takara
pET22bTraD	pET22b(+) derivative for overexpression of <i>traD</i>	Labo stock
pNIT6012	pVS1 derivative; shuttle vector, Mob <sup>+</sup> Tc <sup>r</sup>	(49)
pNITTraD	NIT6012 derivative carrying <i>traD</i>	Labo stock
pNIT901	pNIT6012 derivative carrying <i>oriT<sub>N</sub></i> 270 – 430 bp region	This study
pHSG398	Cm <sup>r</sup>	Takara



**Table 4-2. Primers used in this chapter**

Primer name	Sequence (5' to 3')	Purpose
TraD_markerless_Fw	CGACGGCCAGTGCCAAGCTTAAACAGCGTGGCGTACAC	Construction of pEX18GmtraDupdown
TraD_markerless_Rv	CAGATAGGGTGCAAAAAAATCGCAGTAGTCAATTTC	Construction of pEX18GmtraDupdown
TraD_markerless_Fw2	TTTGACCCTATCTGCACC	Construction of pEX18GmtraDupdown
TraD_markerless_Rv2	CCTGCAGGCATGCAAGCTTCTGCAGAATCGACTTCTCT	Construction of pEX18GmtraDupdown
TraD_markerless_checkfw	GGATTCTGAAGTTCATCTGCG	Conformation of NAH7 $\Delta$ D2
TraD_markerless_checkrv	ATTCCTGGTACTGCTCGCCTC	Conformation of NAH7 $\Delta$ D2
LacZF	CCGCCGTTTGTCCACGGA	qRT-PCR
LacZR	CCATCACCGCGAGGCGGTTT	qRT-PCR
DnaEF	CATCAAACCGATCTGCGGTG	qRT-PCR
DnaER	GTTTCGGTGAGGTTGCGA TAG	qRT-PCR
NheI_430_Fw	GGGGCTAGCTTTGCACCCTATCTGCACCC	Cloning of <i>oriT<sub>N</sub></i> on pNIT6012
HindIII_320_Rv	GGGAAGCTTATGGTATGCAGAAAAGGGTGC	Cloning of <i>oriT<sub>N</sub></i> on pNIT6012
pNIT5041_FAM	[FAM]-CTGACACCCTCATCAGTGCCAA	Amplification of FAM-DNA
pNIT5548_FAM	[FAM]-GTGAGAAATCACCATGAGTGACG	Amplification of FAM- DNA
400_Fw	GAGTGCAATAGGGGTGCAG	Amplification of <i>oriT <math>\Delta</math> 1</i>
380_Fw	GGGCGAGTAAGATGCACATAG	Amplification of <i>oriT <math>\Delta</math> 2</i>
360_Fw	GCAACTTGACTACAGGTAG	Amplification of <i>oriT <math>\Delta</math> 3</i>
340_Fw	TAGAAGAGAGCAGGAAGAGTGC	Amplification of <i>oriT <math>\Delta</math> 4</i>
320_Fw	ATGGTATGCAGAAAAGGGTGC	Amplification of <i>oriT <math>\Delta</math> 5</i>
320_Rv	CTGTGCTACCCCCCTAC	Amplification of <i>oriT <math>\Delta</math> 6</i>
340_Rv	AGCACCTTTCTGCATAACC	Amplification of <i>oriTA7</i>
360_Rv	CACTCTTCCTGCTCTCTTC	Amplification of <i>oriTA8</i>
380_Rv	CCCTACCTGTAGTCAAGTTG	Amplification of <i>oriTA9</i>
400_Rv	CTATGTGCATCTTACTCGC	Amplification of <i>oriTA10</i>
430_Rv	TTTGACCCTATCTGCACCC	Amplification of <i>oriTA11</i>
traD_TSS_F	CTTTGACTCAGGCCCTACCG	Identification of TSS
traD_TSS_FF	CCATCAGTGCATTTCGTTAG	Identification of TSS
traD_TSS_R	GGCAGCGAAAATACGCCAG	Identification of TSS
traD_TSS_RR	ATTGAGCAACAACCTAAGCGC	Identification of TSS
RT_traD_TSS_primer	[PHO]-TTCAACACATCCAGG	Identification of TSS
clone_traD_TSS_F	GCGCTTAGTTGTTGCTCAATGAATTCGAGCTCGGTACC	Identification of TSS

clone\_traD\_TSS\_R

CGAATGCACTGATGGGTAATCATGGTCATAGCTG

Identification of TSS

---

### 4-2-3. プラスミドの作製

#### pEX18GmtraDupdown の作製

pEX18GmにNAH7K2を鋳型にTraD\_markerless\_FwとTraD\_markerless\_Fw、TraD\_markerless\_Fw2とTraD\_markerless\_Fw2の2組のプライマーセットを用いてPCRにより増幅した*traD*上流域と下流域をGibson Assembly kitでクローニングし、pEX18GmtraDupdownを作製した(Fig. 4-1)。

#### NAH7ΔD2 の作製

G7K2株にpEX18GmtraDupdownを導入し、NAH7Δ2を作製した。一連の方法は**1-2-4. *nic* site 欠失 NAH7 の作製**に準じた。

#### pNIT901 の作製

NheI\_430\_Fw と HindIII\_270\_Rv のプライマーセットを用いた PCR 増幅断片を pNIT6012 の NheI-HindIII site にクローニングして pNIT901 を作製した(Fig. 4-2)。

### 4-2-4. 接合伝達試験

接合実験は寒天培地上で行った。本研究では NAH7 と NAH7ΔD2 のカナマイシン耐性を指標として接合伝達体の選択を行った。供与菌は *P. putida* G7 株、受容菌は KT2440G2 株を使用した。最終的な接合伝達頻度は少なくとも 3 回の独立した実験から求めた。

方法の詳細は **1-2-8. 接合伝達実験** に準じた。

### 4-2-5. LacZ 活性の測定

先行研究で作製されていた KTPtraD 株に pNIT6012 または pNITtraD を保持した株の LacZ 活性を測定した。この株は *traD* の上流 430 bp と promoter-less の *lacZ* 遺伝子を連結した DNA 断片を Tn7 を利用して KT2440 染色体に導入した株である。

#### 試薬

Z buffer (per liter)	16.1 g	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O
	5.5 g	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> · H <sub>2</sub> O
	0.75 g	KCl
	0.246 g	MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O
	2.7 ml	β -mercaptoethanol

#### 操作

1. KTPtraD(pNIT6012)株と KTPtraD(pNITtraD)株を 1/3LB 培地で一晚培養した。

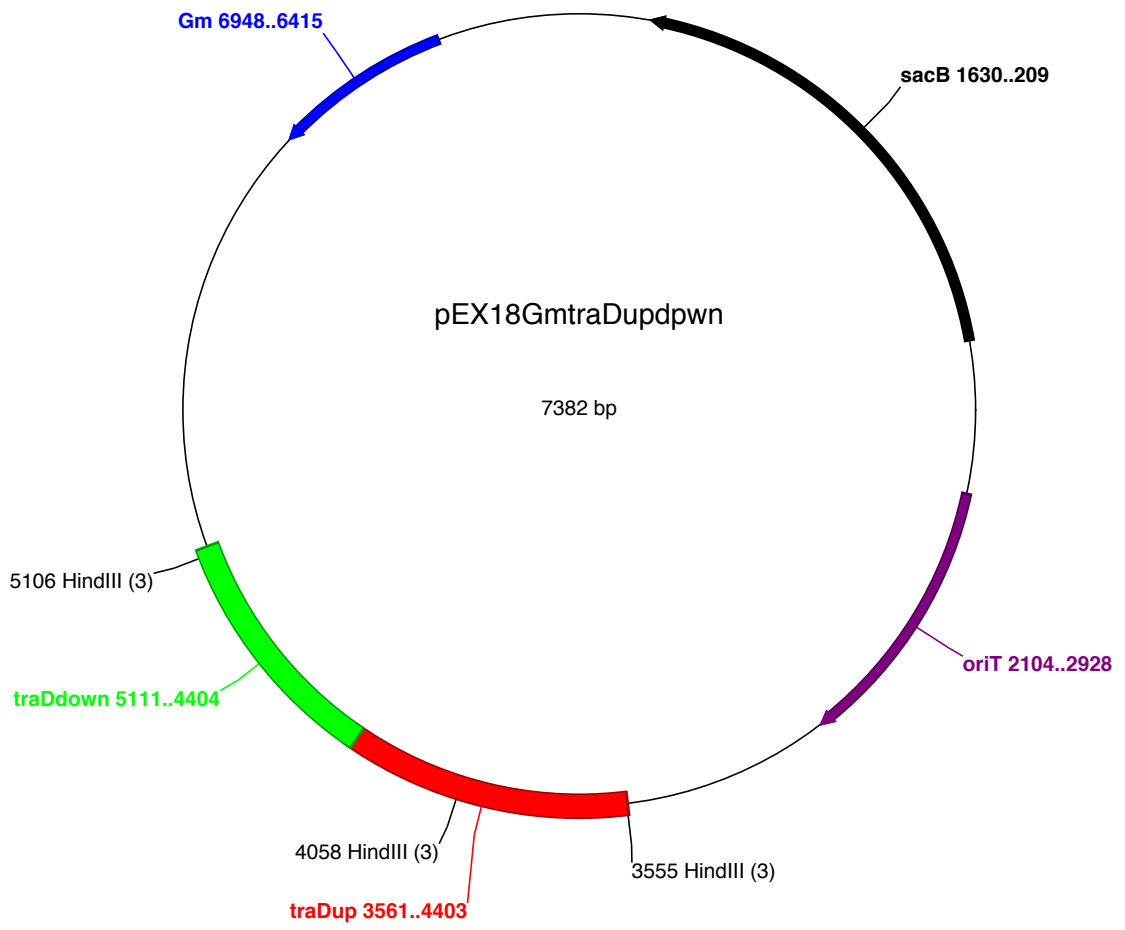


Fig. 4-1 pEX18GmtraDupdown のマップ。

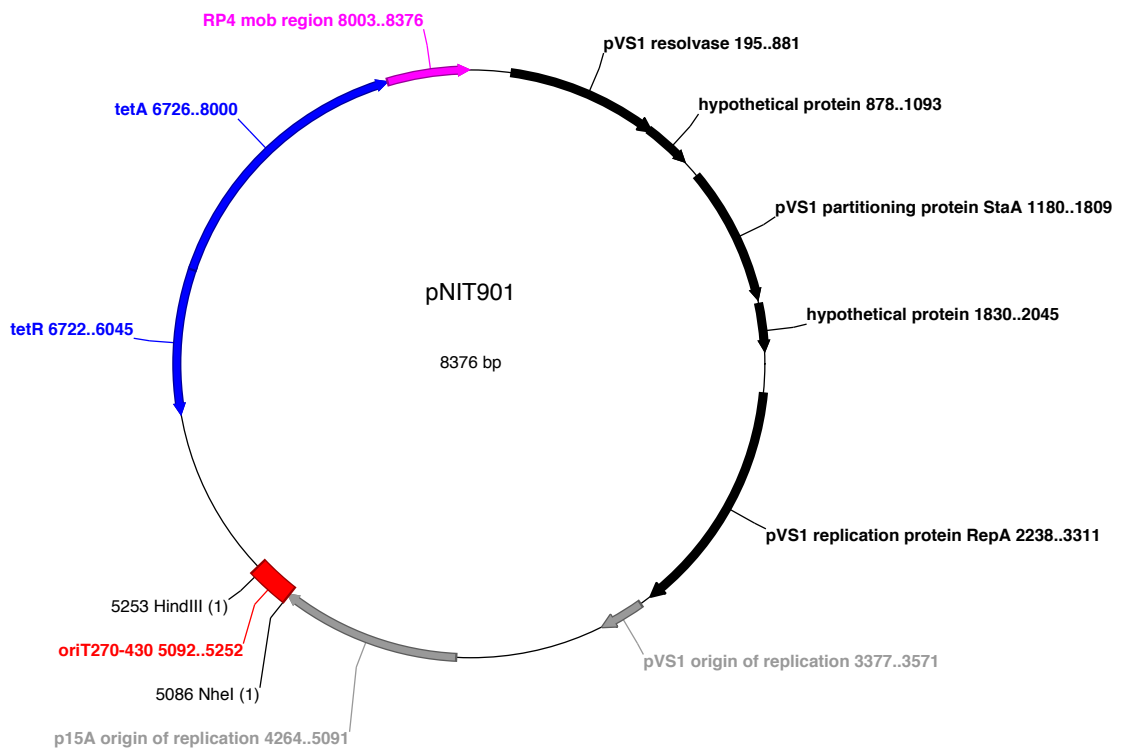


Fig. 4-2 pNIT901 のマップ。

2. 1.の培養液 100  $\mu$ l を 5 ml の 1/3LB 培地に植菌し、バイオフィトレコーダーで培養した。
3. 初期増殖期、中期増殖期、定常期に集菌した。
4. Z buffer を 250  $\mu$ l 加え、菌体を超音波破碎した。
5. 細胞破碎液を遠心し、上清 250  $\mu$ l を抽出した。
6. 96-well plate を使用し 50  $\mu$ l ずつ 4 つの well に分注した。
7. time 0 の well に 1M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> を 25  $\mu$ l 添加した。
8. 全ての well に ONPG (4 mg/ml in Z buffer) を 50  $\mu$ l 添加した。
9. 黄色に変色するまでの時間を測定した。
10. time 0 以外の well に 1M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> を 25  $\mu$ l 添加し、反応を止めた。
11. OD<sub>405</sub> をマイクロプレートリーダーで測定した。

LacZ 活性は以下に示す数式に基づいて算出した。

$$\text{LacZ activity (unit/mg)} = \Delta \text{OD}_{405} \cdot V \cdot 1000 / 21300 \cdot P \cdot V2 \cdot T \cdot H$$

V : volume of reaction solution ( $\mu$ l)

V2 : volume of enzyme solution (ml)

P : protein concentration (mg / ml)

T : time of reaction (minutes)

H : height of reaction solution (cm)

#### 4-2-6. 菌体からの RNA の調製

RNA の調製は対数増殖期の菌体から RNeasy mini kit (QIAGEN) を用い、説明書に従って行なった。ゲノム DNA の除去は DNaseI (Takara) を用い、アガロース電気泳動でゲノム DNA の消失を確認した。調製した RNA を短期間保存する場合は、-80°C で保存した。

#### 4-2-7. 逆転写反応による cDNA の調製

ReverTra Ace (Toyobo) を用い、使用法は添付の説明書に従って行なった。反応条件は以下に示した。

#### 4-2-8. 定量リアルタイム PCR

SYBERPremix ExTaq (Takara) を用い、基本的操作は説明書に準じた。反応液の組成および反応条件は以下に示した。

cDNA	1 $\mu$ l
SYBER Premix ExTaq	25 $\mu$ l

DMSO	2.5 $\mu$ l
Each Primers	2.5 $\mu$ l
DW	16.5 $\mu$ l
	50 $\mu$ l

#### 反応条件

95°C	30 sec
40 cycles	
95°C	5 sec
60°C	10 sec

#### Plate read

Melt curve from 65°C to 95°C, every 0.5°C

*lacZ* 遺伝子の転写量はハウスキーピング遺伝子である *dnaE* 遺伝子の転写量を内部標準とした相対値で算出した。反応に用いたプライマーセットは Table 6-2 に示した。また、アガロース電気泳動によって、単一かつ適正なサイズの大きさの DNA 断片が PCR 増幅されていることを確認した。

#### 4-2-9. His タグを付与した TraD の大量発現と精製

pET22bTraD を用い、His タグを付与した TraD の大量発現と精製を行なった。基本的操作は 1-2-8 His タグを付与した TraC<sub>N292</sub> の大量発現と精製に準じた。TraD を保存する場合は P-buffer (1 x PBS、10%グリセロール)に置換し、4°C で静置した。

#### 4-2-10. FAM-DNA 断片の作製

PtraD を含む FAM-*oriT<sub>N</sub>* を FAM-pNIT5548 と FAM-pNIT5041 をプライマーセットとして用いて pNIT101 を鋳型にした PCR で増幅した(Fig. 4-6)。

フットプリンティングで使用した 2 つの DNA 断片 FAM-901-1 と FAM-901-2 はプライマーセットとしてそれぞれ FAM-pNIT5041、pNIT5548 と pNIT5041、FAM-pNIT5548 を用い、pNIT901 を鋳型に PCR で増幅した。

#### 4-2-11. ゲルシフトアッセイ

##### TraD と FAM-DNA 断片の反応

3 条件で実施し、反応組成を以下に示した。

Fig. 4-6 (a) の反応組成

50 nM FAM- <i>oriT<sub>N</sub></i>	1.8 $\mu$ l
75 nM TraD	0 – 6.7 $\mu$ l

0.1 M DTT	0.2 $\mu$ l
<u>P-buffer</u>	<u>up to 10 <math>\mu</math>l</u>
	10 $\mu$ l

Fig. 4-6 (b) の反応組成

50 nM FAM- <i>oriT<sub>N</sub></i>	1.8 $\mu$ l
75 nM TraD	2.7 $\mu$ l
0.1 M DTT	0.2 $\mu$ l
900 ng/ $\mu$ l Salmon sperm DNA (SSDNA)	1.0 – 5.0 $\mu$ l
<u>P-buffer</u>	<u>up to 10 <math>\mu</math>l</u>
	10 $\mu$ l

Fig. 4-6 (c) の反応組成

50 nM <i>oriT</i> $\Delta$ 1 - 11	1.8 $\mu$ l
75 nM TraD	2.7 $\mu$ l
0.1 M DTT	0.2 $\mu$ l
900 ng/ $\mu$ l SSDNA	2.0 $\mu$ l
<u>P-buffer</u>	<u>3.3 <math>\mu</math>l</u>
	10 $\mu$ l

これらを混合後、30°Cで3分インキュベートした。

### ポリアクリルアミド電気泳動と FAM-DNA の検出

#### 試薬

泳動用 buffer (per liter)	Glycine	14.41 g
	Tris(トリスヒドロキシメチルアミノメタン)	3.025 g

#### 操作

1. 15%または12.5%の SuperSep<sup>TM</sup> Ace (Wako)にゲルシフトアッセイサンプルをアプライした。
2. 200 V、60 mM で85分程度電気泳動した。
3. FLA-T1500 (FujiFilm)で FAM-DNA を検出した。

#### 4-2-12. フットプリンティング

##### TraD と FAM-DNA 断片の反応

TraD と FAM-DNA 断片を混合後、DNaseI 処理を行なった。なお、反応は PCR チューブ内で行い、



温度調整はサーマルサイクラーを用いた。

1. 下記に示す反応液を 30°C で 3 分インキュベートした。なお、コントロールとして 375 nM TraD の代わりに P-buffer を加えた反応液を用いた。

20 ng/ul FAM-901oriT1 (2)	3 μl
375 nM TraD	0.5 μl
5 x buffer(12.5mM MgCl <sub>2</sub> 、2.5mM CaCl <sub>2</sub> )	2 μl
900 ng/ul salmon sperm DNA	0.5 μl
0.1 M DTT	0.2 μl
P-buffer	2.8 μl
	9 μl

2. 5120 倍希釈した DNaseI (Takara) を 1 μl 添加し、30°C で 2 分インキュベートした。
3. DNaseI を失活するため、95°C で 10 分処理した。

#### キャピラリー電気泳動

1. BigDye X Terminator purification kit (Thermo Fisher Scientific) を用いて DNA 断片を精製した。
2. 精製物と GeneScan 500 LIZ standard (Life Technologies) を混合した後、95°C で 3 分インキュベートした。
3. ABI PRISM 3130xl sequencer で FAM 及び standard のピークを検出した。
4. TraceViewer (<http://www.ige.tohoku.ac.jp/joho/traceviewer/>) で解析した。

#### G+A ladder の作製

FAM-902oriT1(2) を用いて作製した。操作は、第 1 章の G+A ladder の作製 に準じた。

#### **4-2-13. 転写開始点の同定**

5'-Race 法を用いて、TraD の転写開始点を同定した。概略図を Fig. 4-3 として示した。

#### 逆転写反応・RNaseH 処理

ReverTra Ace (Toyobo) を用い、使用法は添付の説明書に従って行なった。調製した RNA を鋳型に、5'末端がリン酸化されているプライマー RT\_TraD\_TSS を用いた。このプライマーは *traD* 上にアニーリングして開始コドンの方向に伸長するように設計した。得られた cDNA に対して、RNaseH 処理で RNA を分解した。

#### T4 RNA ligase 処理

T4 RNA ligase (Takara)を用い、操作は添付の説明書に従って行なった。下記に示す反応液を 16°C で 16 h 反応させることで環状化あるいはコンカテマー化した産物を得た。

600 ng/μl cDNA	3 μl
0.1% BSA	3 μl
50% PEG6000	25 μl
10xbuffer	5 μl
T4 RNA ligase	1 μl
DW	13 μl
	50 μl

### インサートの調製

環状化とコンカテマー化した産物を鋳型に 1st PCR primers (traD\_TSS\_F および traD\_TSS\_R)で PCR した。得られた PCR 産物を生成後、鋳型にして 2nd PCR primers (traD\_TSS\_FF および traD\_TSS\_RR)で再度 PCR した。

### ギブソンアセンブリーキットを用いた ligation

pHSG398 の全長を PCR で増幅した。この PCR に使用したプライマー(clone\_traD\_TSS\_F と clone\_traD\_TSS\_R)には、増幅産物とインサートをギブソンアセンブリーキットでクローニングを可能にする配列を付与した。PCR で増幅したベクターとインサートを反応させ、JM109 に導入した。

### 転写開始点のためのシーケンス

得られた形質転換体に対して RV-M4 をプライマーとしたコロニーPCR・シーケンスを行なった。

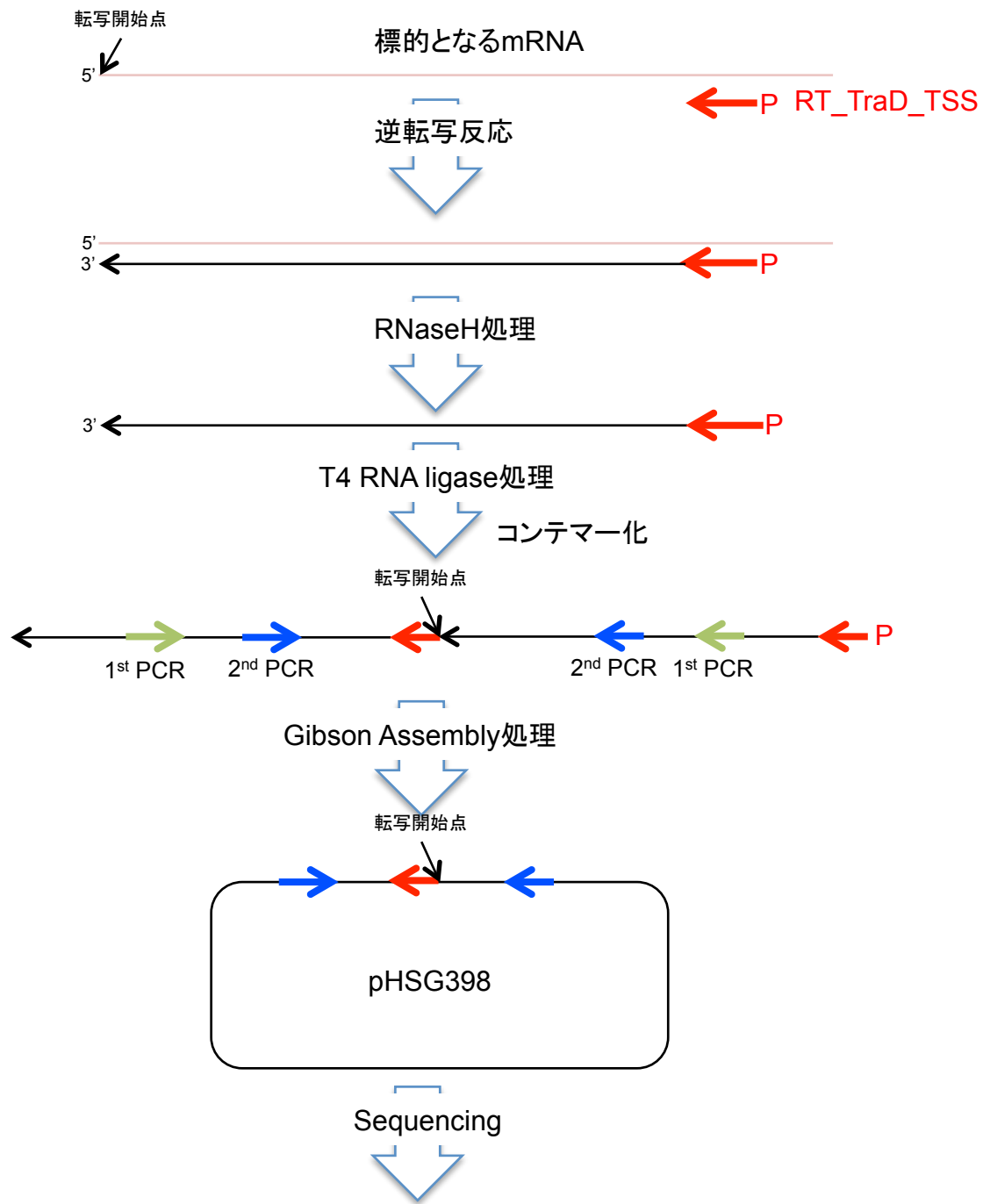


Fig. 4-3 5' Race 法の概略図。T4 RNA ligase 後の環状化の Figure は割愛した(5'-full RACE Core Set (Takara)の説明書の 1 部を改変した)。

### 4-3. 結果

#### 4-3-1. NAH7 $\Delta$ D2 の接合伝達能

*traD* を Km 耐性遺伝子で破壊したプラスミド NAH7  $\Delta$  D が作製されていた(40)が、Km 耐性遺伝子による極性効果の影響が *traE* と *traF* に及んでいる可能性が考えられた。そこで、pEX18GmtraDupdown を用いて、G7(NAH7K2)株から *traD* の CDS のみを欠失させた G7(NAH7  $\Delta$  D2)株を作製した。G7(NAH7  $\Delta$  D2)株と G7(NAH7K2)株を供与菌、KT2440Gm 株を受容菌として接合伝達試験を行なった。それぞれの接合伝達頻度(独立した 3 回の実験の平均値)は、NAH7K2 で  $4.2 \times 10^{-5}$ 、NAH7  $\Delta$  D2 で  $9.6 \times 10^{-7}$  であった。

#### 4-3-2. TraD による自己転写制御機構

TraD のホモログである R388 の StbA は転写制御因子として機能する(71)。そこで TraD による Ptrad (*traD* のプロモーター)の転写制御を LacZ レポーター解析で検討した。Ptrad とプロモーター欠失した *lacZ* とを連結したレポーターを持つ KTPtraD 株を pNIT6012 と pNITTraD で形質転換した。得られた 2 株をバイオフィトレコーダーで培養し、初期対数増殖期と中期対数増殖期、定常期の 3 点で集菌し、LacZ 活性を測定した。その結果、3 点全てで pNITTraD 保持株の方が pNIT 保持株より LacZ 活性が 2 倍以上低かった(Fig. 4-4)。さらに、この 2 株を用いて *lacZ* 遺伝子の転写量を定量 RT-PCR で測定した。その結果、LacZ 測定の結果と同様に、pNITTraD 保持株の方が pNIT 保持株より転写量が低かった(1.7 倍差)。これらの結果から TraD が Ptrad の転写を抑制することが強く示唆された。

#### 4-3-3. ゲルシフトアッセイを用いた TraD の DNA 結合能の検討

前項から TraD は Ptrad に結合することで *traDEF* オペロンの転写を抑制することが示唆された。そこで、ゲルシフトアッセイで TraD の Ptrad への結合を検討した。His タグを付与した TraD (His-TraD) を発現するプラスミド pET22btraD で *E. coli* BL21(DE3)を形質転換した。この株は IPTG 添加により、His-TraD の推定分子量 17 kDa 程度の大きさのタンパク質を高発現し、本タンパク質は His タグを利用した手法で精製できた(Fig. 4-5)ため、本タンパク質を His-TraD として用いた。Ptrad を含む *oriT<sub>N</sub>* 領域に FAM を付与した FAM-*oriT<sub>N</sub>* と His-TraD を混合し、ポリアクリルアミドゲルで電気泳動解析した結果、His-TraD の濃度の上昇に伴い free probe の減少と shift band の増加が確認された(Fig. 4-6)。次に、競合 DNA として salmon sperm DNA (SS-DNA)を添加してゲルシフトアッセイを行なった結果、FAM-*oriT<sub>N</sub>* の 132 倍の SS-DNA を添加した場合でもシフトバンドの減少は僅かであった(Fig. 4-6)。以上の結果から、His-TraD は本 DNA 断片に特異的に結合すると結論した。

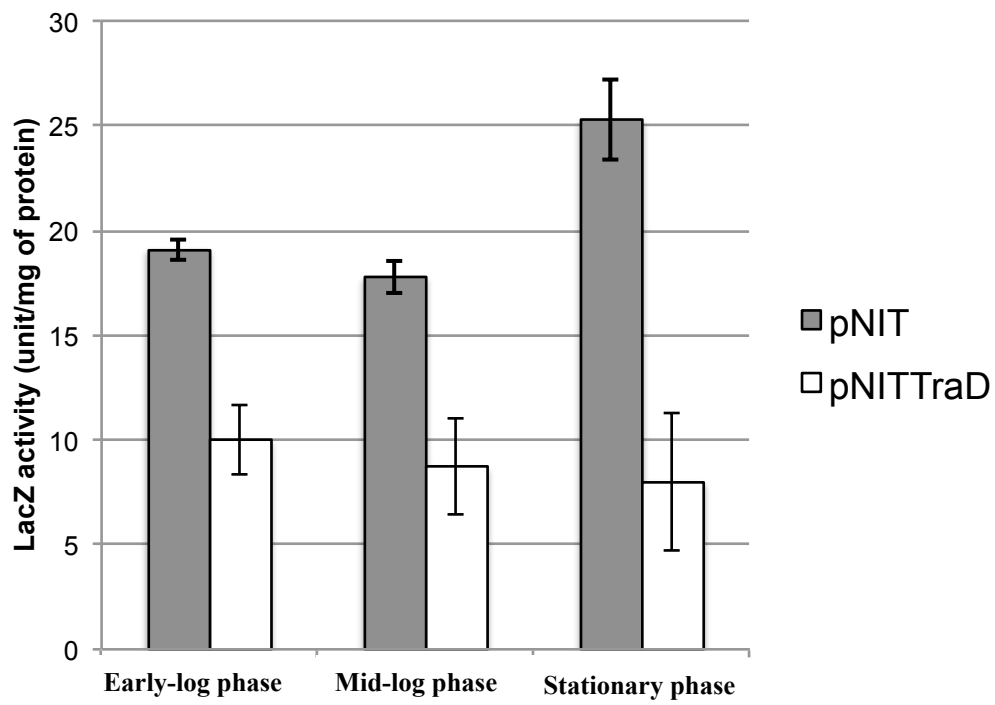


Fig. 4-4. KTPtraD(pNIT6012)株と KTPtraD(pNITTraD)株の LacZ 活性。Early-log phase は  $OD_{660}=0.2$ 、Mid-log phase は  $OD_{660}=1.1$ 、Stationary phase は  $OD_{660}=1.6$ 。エラーバーは SD を示す。

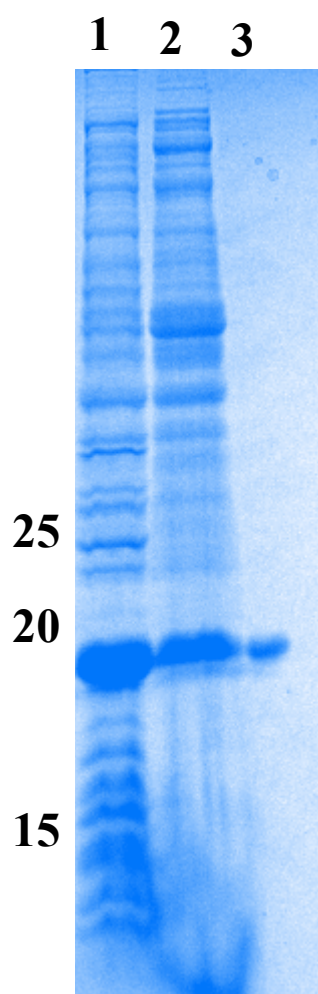


Fig. 4-5 His-TraD の大量発現と精製。BL21(DE3)(pET22bTraD)株を用いて His-TraD の大量発現と精製を行った。15%の SDS ポリアクリルアミドゲルで電気泳動し、CBB 染色をした。レーン 1, トータル細胞; レーン 2, 粗酵素液; レーン 3, 精製画分。

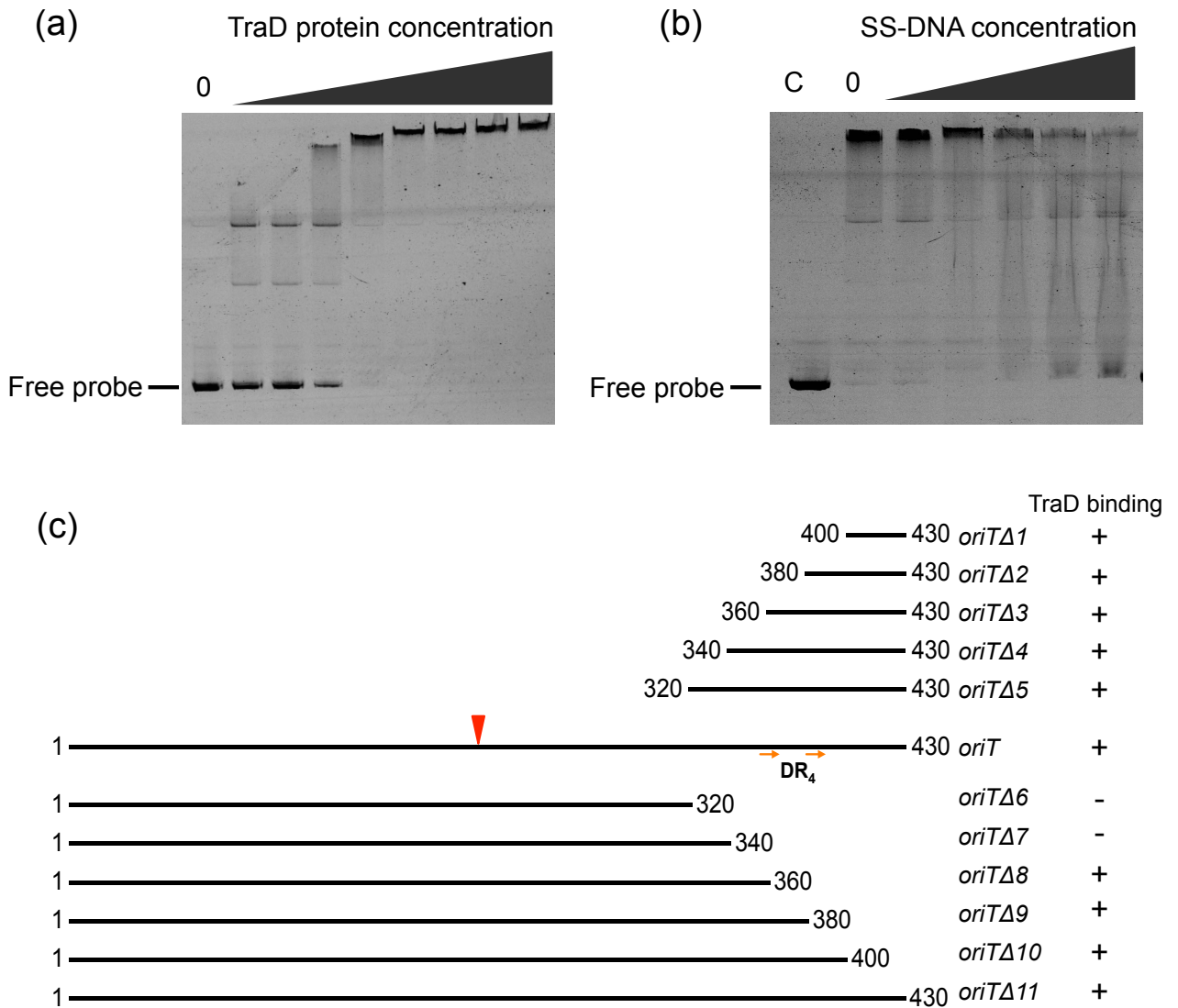


Fig. 4-6 各種 FAM-DNA 断片のゲルシフトアッセイ。反応組成の詳細は材料と方法に記載した。

(a) FAM-*oriT<sub>N</sub>* のゲルシフトアッセイ。左のレーンから 0 nM、1.3 nM、2.5 nM、5.0 nM、10 nM、20 nM、30 nM、40 nM、50 nM の濃度になるように His-TraD を添加した。12.5% のポリアクリルアミドゲル電気泳動を行なった。

(b) 競合 DNA 存在下での FAM-*oriT<sub>N</sub>* のゲルシフトアッセイ。左端の C は His-TraD 非添加のサンプル。20 nM の濃度になるように His-TraD を添加し、左から 2 番目のレーンから 0 ng、900 ng、1800 ng、2700 ng、3600 ng、4500 ng の SS-DNA を添加した。12.5% のポリアクリルアミドゲル電気泳動を行なった。

(c) *oriTΔ1-11* のゲルシフトアッセイ。TraD binding の+は明確なシフトバンドが確認できたこと、-はそれが確認できなかったことを示す。赤逆三角形は *nic* site。DR<sub>4</sub> は第 1 章を参照。

#### 4-3-4. TraD の結合部位の特定

具体的な結合部位を明らかにするために、*oriT<sub>N</sub>* を様々な長さに削った DNA 断片(*oriTΔ1* – *oriTΔ11*)を用いてゲルシフトアッセイを行なった(Fig. 4-6)。*oriTΔ6*、*oriTΔ7*以外の DNA 断片は shift band が確認された。*oriTΔ6*、*oriTΔ7*はそれぞれ *oriT<sub>N</sub>* の position 321 – 430 と 341 – 430 の領域を削った DNA 断片である。TraD は *traD* 遺伝子近傍のこれら領域への結合が判明した。

さらに具体的な結合部位を明らかにするために、フットプリンティング解析を行った。まず、フットプリンティング解析用の DNA 断片増幅用プラスミド pNIT901 を作製した。本プラスミドはゲルシフトアッセイから明らかになった TraD の結合領域を含む *oriT<sub>N</sub>* の position 270 – 430 領域をクローニングしたプラスミドである。次に、本プラスミドを鋳型に PCR で FAM-901-1 と FAM-901-2 を得た。これら DNA 断片に対する His-TraD のフットプリンティング解析の結果、*oriT<sub>N</sub>* 内の position 320-430 のほぼ全領域の両鎖が His-TraD によって保護されていた(Fig. 4-7)。Fig. 4-7a は TraceViewer によるフットプリントの解析結果であり、His-TraD 添加条件の peak を赤、非添加条件の peak を青で示し、この 2 種の peak を重ね合わせてある。赤 peak が青 peak より著しく小さい領域を His-TraD によって保護された領域と判断した。G + A ラダーを元に結合領域の配列を特定し、当該配列を Fig. 4-7 (b)において赤色で示した。

#### 4-3-5. *traD* の転写開始点(TSS)の同定

TSS を同定することでおおよそのプロモーター領域の推定が可能となることから、5'-Race 法で *traD* の TSS の同定を行なった。2<sup>nd</sup> PCR で、4 種の主要なバンドが得られたため、これら DNA 断片をそれぞれ pHSG398 にクローニングし、これら pHSG398 誘導体を保持する大腸菌株コロニーを鋳型として PCR 増幅した当該 DNA 断片領域のシーケンス解析を行なった。コンカテマー(環状)化した際に RT\_TraD\_TSS 由来配列の 5'末端と結合した配列は転写開始点を含んでいる可能性が高い (Fig. 4-3)。4 配列(配列 A~D)の RT\_TraD\_TSS 由来配列の 5'末端側に結合した配列を調べたところ、配列 A には *oriT* の position 118 から *traD\_TSS\_FF* 由来の配列が含まれていた。配列 B には *oriT* の position 329 から *traD\_TSS\_FF* 由来の配列が含まれていた。配列 C には *oriT* の position 329 から *traD\_TSS\_FF* 由来の配列が含まれていたが、配列 C には本来存在しない配列も含まれていた。配列 D には非特異的な *oriT* 領域には存在しない配列が含まれていた。以上、配列 A と B の結果から *traD* の TSS は position 118 と 329 であると結論した(Fig. 4-7)。

#### 4-4 考察

一般的に接合伝達には保存性の高い遺伝子や共通した機構が多く存在するが、接合伝達宿主域や接合伝達頻度はプラスミドごとに異なり、このような違いは保存性の低い機能未知遺伝子に由来すると示唆されている。本章では機能未知遺伝子群 *traDEF* オペロンにコードされた TraD が *traD* の開始コドン上流領域に結合して転写抑制することをゲルシフトアッセイと LacZ 活性、RT-



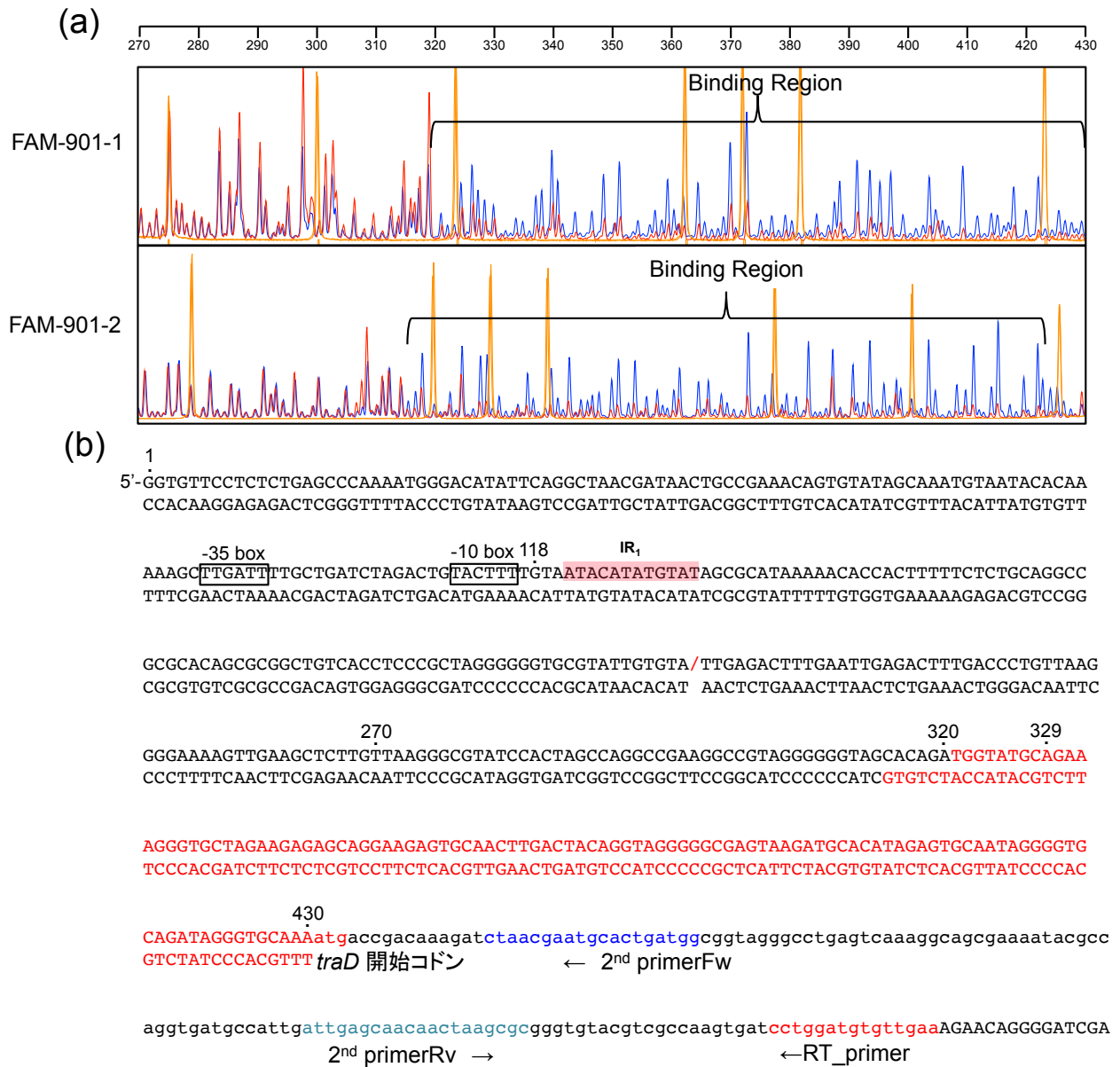


Fig. 4-7 (a) FAM-901-1 と FAM901-2 を用いたフットプリント解析の結果。最上部の数字は各 G + A ladder から得られた情報から *oriT<sub>N</sub>* の position 270 -430 の塩基番号を示した。FAM-901-1 は(b)の配列の上部の鎖に FAM ラベル、FAM-901-2 は下部の鎖に FAM ラベルが付与している。FAM-901-2 の結果は左右反転をしている。

His-TraD 添加条件の peak を赤、His-TraD 非添加条件の peak を青で示し、この 2 種の peak を重ね合わせて表示した。黄色は Liz Standard マーカーを示す。(b)フットプリント解析の結果と TSS を示した。大文字は *oriT<sub>N</sub>* を小文字は *traD* の CDS 領域を示す。赤字の塩基配列はフットプリント解析(a)で His-TraD が結合すると結論した領域である。TSS 同定に使用した各プライマーの矢印は伸長方向を示している。IR<sub>1</sub> は第 1 章を参照。Position 118 と 329 を *traD* の TSS と判断した。

定量 PCR から示唆した。先行研究で TraD は細胞質に局在することが示されており、細胞内でも TraD は *traD* の開始コドン上流領域に結合していることが強く示唆された。TraD は 4 つの  $\alpha$  ヘリックスを構成していると推測されており、こうした構造が DNA binding 能に寄与していると考えられる(68)。TraD のホモログの StbA は自身のプロモーターだけでなく、R388 上の 7 つのプロモーターを制御していることが示唆されているが(71)、StbA のこれらプロモーター領域への結合は検討されていないため、直接的に制御するかは不明である。TraD がプラスミド上や染色体上の他プロモーターを制御するかは未検討であり更なる解析が必要である。

ゲルシフトアッセイで複数のシフトバンドが確認された (Fig. 4-6)。その原因として、TraD が *oriT<sub>N</sub>* の複数箇所に結合する可能性や、*oriT<sub>N</sub>* 上で TraD 同士が複合体を形成する可能性が考えられる。しかし、先行研究でのタンパク質相互作用の解析では TraD 同士の結合は確認されておらず、複数のシフトバンドは、TraD の *oriT<sub>N</sub>* への複数箇所の結合の可能性が高い。実際、フットプリント解析では TraD は *oriT<sub>N</sub>* の position 320 から 430 の比較的広い領域をほぼ一様に DNaseI から保護していた。TraD を低濃度にした解析でも、結合領域を狭めることはできなかった(data not shown)。1 分子の TraD がどの程度の長さの DNA 領域を DNaseI から保護できるのかは不明であるが、約 110 bp の領域に複数の TraD 分子が結合していることが Deletion 解析から明らかとなった。DNA 複製開始に関わる DnaA も DnaA box と呼ばれる配列に連なって結合することが知られており(72)、TraD も *oriT* から開始される DNA 複製に関与している可能性も考えられる。

5'-Race 法により *traD* の転写開始点が *oriT* の position 118 と 329 と同定された。通常、-10 box は TSS の 10 塩基上流にあるが、position 118 の 2 塩基上流に-10 box が見出された (Fig. 4-7 (b))。これは、IR<sub>1</sub> の影響で TSS が通常より手前になったのではないかと推測している。一方、position 329 の上流領域は KT2440 株の網羅的な TSS 解析から明らかになった TSS 上流領域で保存された配列と高い相同性を示した(Fig. 4-8) (73)。これらのことから、今回同定した 2 点は *traD* の TSS として妥当であると結論した。

フットプリント解析から TraD は position 329 を含むような結合が示されたが、position 118 周辺領域はゲルシフトアッセイでも TraD の結合は観察されなかった。両 TSS の転写頻度の違いや使い分け、およびそれらと TraD との関係性は今後の重要な課題である。

NAH7  $\Delta$  D2 は NAH7K2 と比べて 43 倍接合伝達頻度が低下した。一方で、第 1 章では TraD の結合領域を欠失した pNIT109 や pNIT110 は pNIT101 と比較して頻度の差がなかった。これらの結果から TraD 結合が直接的に接合伝達頻度に影響しているとは考えにくい。NAH7  $\Delta$  D2 の示した接合伝達頻度低下は *traE* と *traF* の発現への影響による可能性が考えられる。

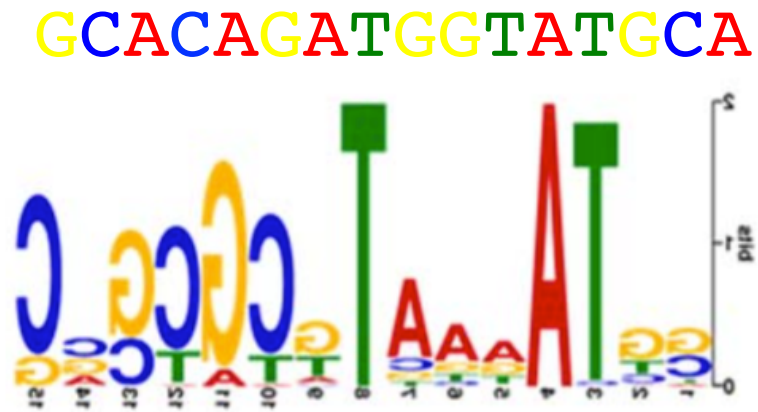


Fig. 4-8 転写開始点 Position 329 の上流領域と KT2440 株の TSS 上流領域で保存配列の比較(73)。

## 第 5 章 NAH7 の全接合伝達関連遺伝子の同定

### 5-1. 緒言

自己伝達性プラスミドの接合伝達装置は Dtr システムと Mpf システムから成り立つと考えられており(74)、各種の接合伝達性プラスミドでこれらシステムに関連する 14 遺伝子が保存されている。しかし、これら 14 遺伝子が *oriT* を有するプラスミドの接合伝達に十分な因子であるかは検証されておらず、他の必須遺伝子の存在も考えられる。実際、接合伝達研究が最も進んでいる IncW プラスミド R388 ではこれら 14 遺伝子以外の *stbB* が接合伝達必須遺伝子として同定されている(68)。また、NAH7 でも *traF* が接合伝達必須遺伝子として同定されており(40)、接合伝達に関わる未知のシステムが存在する可能性が考えられた。そこで、本章では接合伝達システムの包括的理解を目指し、NAH7 上の接合伝達関連遺伝子を全て同定することを目的とした研究を行なった。

### 5-2. 材料及び方法

#### 5-2-1. 使用菌株・プラスミド、培地及び培養条件

本章で使用した菌株とプラスミドを Table 5-1 に示した。培地は LB、1/3LB または SOC 培地を用いた。培地の組成は第 1 章に準じた。寒天平板培地を用いる場合には、寒天粉末を培地に対して 1.5% (w/v) で添加した。選択培地には必要に応じてカナマイシン(Km)は 25 µg/ml、テトラサイクリン(Tc)は 20 µg/ml、ゲンタマイシン(Gm)は 20 µg/ml、アンピシリン(Ap)は 100 µg/ml、トリメトプリム(Tp)は 25 µg/ml、ナリジクス酸(Nal)は 10 µg/ml、X-gal は 30 µg/ml になるように添加した。培養は、特に断りがない限り *Pseudomonas* 属細菌については 30°C、*E. coli* については 37°C で行った。各種菌体を長期的保存する場合には、培養液に 15% になるように glycerol を加え、-80°C で保存した。

#### 5-2-2. DNA の取り扱い

遺伝子のクローニング全般、DNA 塩基配列決定法については第 1 章に準じた。また、本章で用いたプライマーは、Table 5-1 に示した。

#### 5-2-3. electroporation 法による形質転換法

GENE PULSER (BIO-RAD) を使用し、手順は第 1 章に準じた。

**Table 5-1. Bacterial strains and plasmids used in this chapter**

Strain or plasmid	Relevant characteristics <sup>a</sup>	Source or reference
<i>E. coli</i>		
DH5 $\alpha$	<i>recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 D (lacZYA-argF) <math>\Phi</math>80lacZ<math>\Delta</math>M15</i>	(44)
EC100	<i>mcrA <math>\Delta</math>(mrr-hsdRMS-mcrBC) <math>\phi</math>80dlacZ<math>\Delta</math>M15 <math>\Delta</math>lacX74 recA1 endA1 araD139 <math>\Delta</math>(ara- leu)7697 galU galK rpsL nupG</i>	Epitentre Inc.
Plasmid		
pNIT6012	pVS1 derivative; shuttle vector, Mob <sup>+</sup> Tc <sup>r</sup>	(49)
pKKO1	pNIT6012 derivative carrying <i>traF-traC</i> and <i>mpf operon</i> .	This study
NAH7	Tra <sup>+</sup> Nah <sup>+</sup> , Inc-P9	(75)
NAH7K2	NAH7 $\Delta$ <i>nahAc</i> ; Km <sup>r</sup>	(48)
pKD46	Ap <sup>r</sup> , $\lambda$ -Red recombinase expression plasmid	(76)
pTnTp1	Tp <sup>r</sup>	Labo stock
pTnGm1	Gm <sup>r</sup>	Labo stock
NAH7Tp	NAH7 $\Delta$ <i>nahAc</i> ; Tp <sup>r</sup>	This study
NAH7 $\Delta$ 1-14	NAH7 $\Delta$ orf1-orf14; Gm <sup>r</sup>	This study
NAH7 $\Delta$ 17-29	NAH7 $\Delta$ orf17-orf29; Tp <sup>r</sup>	This study
NAH7 $\Delta$ 17-34	NAH7 $\Delta$ orf17-orf34; Tp <sup>r</sup>	This study
NAH7 $\Delta$ 30	NAH7 $\Delta$ orf30; Tp <sup>r</sup>	This study
NAH7 $\Delta$ 31	NAH7 $\Delta$ orf31; Tp <sup>r</sup>	This study
NAH7 $\Delta$ 32	NAH7 $\Delta$ orf32; Tp <sup>r</sup>	This study
NAH7 $\Delta$ 33	NAH7 $\Delta$ orf33; Tp <sup>r</sup>	This study
NAH7 $\Delta$ 34	NAH7 $\Delta$ orf34; Tp <sup>r</sup>	This study
pUC18	Ap <sup>r</sup> ; <i>E. coli</i> vector	(45)
pUC18orf30-34	pUC18 derivative carrying NAH7 <i>orf30-orf34</i>	This study
pUC18orf30	pUC18 derivative carrying NAH7 <i>orf30</i>	This study
pUC18orf31	pUC18 derivative carrying NAH7 <i>orf31</i>	This study

pUC18orf32	pUC18 derivative carrying NAH7 <i>orf32</i>	This study
pUC18orf33	pUC18 derivative carrying NAH7 <i>orf33</i>	This study
pUC18orf34	pUC18 derivative carrying NAH7 <i>orf34</i>	This study
pUT18	Plasmid for BACTH system for cloning T18 on C-terminus of protein	Euromedex
pKTN25	Plasmid for t BACTH system for cloning T25 on C-terminus of protein	Euromedex
pUT18Czip	Plasmid for positive control in BACTH system, zinc finger linked to T25	Euromedex
pKTzip	Plasmid for positive control in BACTH system, zinc finger linked to T18C	Euromedex
pUT18orf34	pUT18 derivative carrying <i>orf34</i>	This study
pUT18traC	pUT18 derivative carrying <i>traC</i>	This study
pUT18traB	pUT18 derivative carrying <i>traB</i>	This study
pUT18mpfC	pUT18 derivative carrying <i>mpfC</i>	This study
pUT18mpfF	pUT18 derivative carrying <i>mpfF</i>	This study
pUT18mpfH	pUT18 derivative carrying <i>mpfH</i>	This study
pUT18mpfI	pUT18 derivative carrying <i>mpfI</i>	This study
pUT18mpfJ	pUT18 derivative carrying <i>mpfJ</i>	This study
pKTN25orf34	pKTN25 derivative carrying <i>orf34</i>	This study
pKTN25traC	pKTN25 derivative carrying <i>traC</i>	This study
pKTN25traB	pKTN25 derivative carrying <i>traB</i>	This study
pKTN25mpfC	pKTN25 derivative carrying <i>mpfC</i>	This study
pKTN25mpfF	pKTN25 derivative carrying <i>mpfF</i>	This study
pKTN25mpfH	pKTN25 derivative carrying <i>mpfH</i>	This study
pKTN25mpfI	pKTN25 derivative carrying <i>mpfI</i>	This study
pKTN25mpfJ	pKTN25 derivative carrying <i>mpfJ</i>	This study

---

**Table 5-2. Primers used in this study**

Primer name	Sequence (5 to 3')	Purpose
Nhe1_NAH7_traF_C_F	GGGGCTAGCTGTAATTCGTGGGGAAGC	Cloning of <i>traF-traC</i> on pNIT6012
Xho1_NAH7_traF_C_R	GGGCTCGAGGCCTGGCCTATATTCTTC	Cloning of <i>traF-traC</i> on pNIT6012
GAK_mpf_R	CGAGCTCCCGGGTACGGGTATTCTCCGGTGAGCGCTGATTTGTG	Cloning of <i>mpf</i> operon on pNIT6012
GAK_mpf_Sca1_F	GATGCATGCCATGGTACAGTACTTCGCGTCCGGGGTGATGAAG	Cloning of <i>mpf</i> operon on pNIT6012
GAK_mpf_Mlu1_F	TGCATGCCATGGTACAGTACGCGTGAGCCATGAGGAACG	Cloning of <i>mpf</i> operon on pNIT6012
GAK_mpf_Sca1_R	CACCCCGGACGCGAAGTACTTC	Cloning of <i>mpf</i> operon on pNIT6012
GAK_mpf_Mlu1_R	CCGTTCTCATGGCTCACGCGTAG	Cloning of <i>mpf</i> operon on pNIT6012
GAK_mpf_F4	GCCATGGTACAGTACGCGTGGGATCTCCTTTTCTC	Cloning of <i>mpf</i> operon on pNIT6012
nahAc_deletion_Fw	TTGAGCGGAGAGTTTTAATAGGAGGTACCCCGGACCCTAGCGCGTCGCACGAACCCAGTTGAC	Construction of NAH7Tp
nahAc_deletion_Rv	CCAGCTTGTCTTCTTGAATATTGATCATCATGGTCGACTCGTCTGCTCGAGTTAGGCCACACGTT	Construction of NAH7Tp
orf17-34_deletion_Tp_Fw	CCGGTATTGCCGGAACCTTTTCGCATTTAGATGACAGGATTTTTCGCACGAACCCAGTTGAC	Construction of NAH7Δ17-34 and NAH7Δ17-29
orf17-34_deletion_Tp_Rv	GATAATTAATTGATTTCTCGCATGCGAGAAAAGGAGATCCCACCTCGAGTTAGGCCACACGTT	Construction of NAH7Δ17-34
orf17-29_deletion_Tp_Rv	ATTCCCTTGGCGTGCGCGATGCTTTGCCTTGGATATTTCTCTCGAGTTAGGCCACACGTT	Construction of NAH7Δ17-29
orf1-orf14_deletion_Gm_Fw	TGAACCCTTGACCCACTAACGGCAATTAGGCGGAAACGAATCTCGCACGAACCCAGTTGAC	Construction of NAH7Δ1-14
orf1-orf14_deletion_Gm_Rv	CAGGCTTTGGGGGGTTCTCGCATGCGAGAAAAGGAGTCTTACGAGTTAGGTGGCGGTAAGTTG	Construction of NAH7Δ1-14
orf30_deletion_Tp_Fw	TTGATCGGCAGATATCGCCCGGAAAAGGGCAACTCTCGTTCTCGAGTTAGGCCACACGTT	Construction of NAH7Δ30
orf30_deletion_Tp_Rv	GGGATTCGGCGGCATGGGCCGCGTTTGAGGGAGCTAAAATCTCGCACGAACCCAGTTGAC	Construction of NAH7Δ30
orf31_deletion_Tp_Fw	TCGAGCTTGTGATTCGAAAATAGACATGATTTTAGCTCCCCTCGAGTTAGGCCACACGTT	Construction of NAH7Δ31
orf31_deletion_Tp_Rv	TCAATTGCTGCAGATCTAGGACAGATAAAAAGGATTAGGACTCGCACGAACCCAGTTGAC	Construction of NAH7Δ31
orf32_deletion_Tp_Fw	CTAATCCTTTTATCTGTCTTAGATCTGCAGCAATTGAACGCGGTCTCGAGTTAGGCCACACGTT	Construction of NAH7Δ32

orf32_deletion_Tp_Rv	GCAAAGCTTTCAAACCGCAGTATTGAGCGAGGGTCTACCATCGCACGAACCCAGTTGAC	Construction of NAH7Δ32
orf33_deletion_Tp_Fw	TCCATTGGGTTTTTCGCTTTTTCCATTGGTAGACCTCGCCTCGAGTTAGGCCACACGTT	Construction of NAH7Δ33
orf33_deletion_Tp_Rv	CAGCGCCAAAGAAGCAAACGATAAGTGGGGAGGCTCGCGCTTCGCACGAACCCAGTTGAC	Construction of NAH7Δ33
orf34_deletion_Tp_Fw	GAGAAGGCCAAAAAGCGGACGGCGTGCAACTTAGAAAACCATCTCGAGTTAGGCCACACGTT	Construction of NAH7Δ34
orf34_deletion_Tp_Rv	GATAATTAATTGATTTCTCGCATGCGAGAAAAGGAGATCCCATCGCACGAACCCAGTTGAC	Construction of NAH7Δ34
BamH_orf30_F	CGGGGATCCAGAAATATCCAAGGCAAAG	Construction of pUC18orf30 and pUC18orf30-34
Kpn_orf30_R	GGGGGTACCGGGAGCTAAAATCATGTCTATTTTC	Construction of pUC18orf30
BamH_orf31_F	CGGGGATCCGATTTTAGCTCCCTCAAACGCG	Construction of pUC18orf31
Kpn_orf31_R	GGGGGTACCACCGCGTTCAATTGCTGCAG	Construction of pUC18orf31
BamH_orf32_F	CGGGGATCCGTCCTAATCCTTTTATCTG	Construction of pUC18orf32
Kpn_orf32_R	GGGGGTACCGCGAGGGTCTACCAATGGAAA	Construction of pUC18orf32
BamH_orf33_F	CGGGGATCCTGGTAGACCTCGCTCAATAC	Construction of pUC18orf33
Kpn_orf33_R	GGGGGTACCATGGTTTCTAAGTTGCACG	Construction of pUC18orf33
BamH_orf34_F	CGGGGATCCTTAGAAAACCATAGCGCGAGC	Construction of pUC18orf34
Kpn_orf34_R	GGGGGTACCTTTCTCGCATGCGAGAAAAG	Construction of pUC18orf34, pUC18orf30-34
orf34-mpfJ_Fw	CCGCAAGCATCCTCATCGCTG	Confirmation of transcription unit
orf34-mpfJ_Rv	GTCAGGCGTTAGCACAGGCAC	Confirmation of transcription unit
pKTN25-pUT18-orf34_Fw	CCTGATTACGCCAAGCTTGATGCGCAAACAAGTTTATG	Bacterial Adenylate Cyclase Two-Hybrid system
pKTN25-pUT18-orf34_Rv	GCAGGCATGCAAGCTTGGGAAACCATAGCGCGAG	Bacterial Adenylate Cyclase Two-Hybrid system
pKTN25-pUT18-TraC_Fw	CCTGATTACGCCAAGCTTGATGTTCAACGTTACCTCTATC	Bacterial Adenylate Cyclase Two-Hybrid system
pKTN25-pUT18-TraC_Rv	GCAGGCATGCAAGCTTGGCACGCCTGATTTACCTAAGC	Bacterial Adenylate Cyclase Two-Hybrid system
pKTN25-pUT18-TraB_Fw	CCTGATTACGCCAAGCTTGATGCATAAAAAGAGAAGTCGATTC	Bacterial Adenylate Cyclase Two-Hybrid system
pKTN25-pUT18-TraB_Rv	GCAGGCATGCAAGCTTGGTGCTGCTGCTTGACCGTAAG	Bacterial Adenylate Cyclase Two-Hybrid system



pKTN25-pUT18-MpfC_Fw	CCTGATTACGCCAAGCTTGATGCGCCTCGTTGATAAAGCTTT	Bacterial Adenylate Cyclase Two-Hybrid system
pKTN25-pUT18-MpfC_Rv	GCAGGCATGCAAGCTTGGTCTGAATCGCCTTCAAGTTGTGG	Bacterial Adenylate Cyclase Two-Hybrid system
pKTN25-pUT18-MpfF_Fw	CCTGATTACGCCAAGCTTGATGGACAAGGAATTAAGAAAAG	Bacterial Adenylate Cyclase Two-Hybrid system
pKTN25-pUT18-MpfF_Rv	GCAGGCATGCAAGCTTGGCTGGCGGCTCAGTTCTTCACTC	Bacterial Adenylate Cyclase Two-Hybrid system
pKTN25-pUT18-MpfH_Fw	CCTGATTACGCCAAGCTTGATGGCGAAGGAACCTAACCAACC	Bacterial Adenylate Cyclase Two-Hybrid system
pKTN25-pUT18-MpfH_Rv	GCAGGCATGCAAGCTTGGGTAAATGAATTTACGCCGCC	Bacterial Adenylate Cyclase Two-Hybrid system
pKTN25-pUT18-Mpfl_Fw	CCTGATTACGCCAAGCTTGATGTCTGAGATTGCTTCGTTCC	Bacterial Adenylate Cyclase Two-Hybrid system
pKTN25-pUT18-Mpfl_Rv	GCAGGCATGCAAGCTTGGGGCAGCTTTTGCATATTGCAC	Bacterial Adenylate Cyclase Two-Hybrid system
pKTN25-pUT18-MpfJ_Fw	CCTGATTACGCCAAGCTTGATGCAAAAAGCTGCCTAAAATTCG	Bacterial Adenylate Cyclase Two-Hybrid system
pKTN25-pUT18-MpfJ_Rv	GCAGGCATGCAAGCTTGGATTAATTATCTGTACGAACGATG	Bacterial Adenylate Cyclase Two-Hybrid system

---

#### 5-2-4. プラスミドの作製

##### pKKO1 の作製

###### 操作

1. NAH7 の *traC* から *traF* までを増やすプライマーである NheI\_NAH7\_traF\_C\_F と XhoI\_NAH7\_traF\_C\_R を用いて PCR を行った。
2. この PCR 産物を pNIT6012 の NheI - XhoI サイトにクローニングしたプラスミド(pNIT::dtr)を作製した(Fig. 5-1)。
3. pNIT::dtr の KpnI サイトに GAK\_mpf\_R と GAK\_mpf\_ScaI\_F のプライマーセットで増幅した *mpfR* 上流のプロモーター領域から *mpf* オペロンの ScaI サイトまでの領域を Gibson Assembly kit でクローニングした。
4. 3.から得られたプラスミドの ScaI サイトに GAK\_mpf\_MluI\_F と GAK\_mpf\_ScaI\_R のプライマーセットで増幅した MluI サイトまでの領域を同様にクローニングした。
5. 4.から得られたプラスミドの MsluI サイトに GAK\_mpf\_MluI\_R と GAK\_mpf\_F4 のプライマーセットで *mpfJ* までの領域を同様にクローニングした。得られたプラスミドを pKKO1 とした (Fig. 5-1)。

##### λ-Red recombination 法を用いた特定領域を破壊した NAH7 誘導体の作製

NAH7Tp, NAH7Δ1-14, NAH7Δ17-29, NAH7Δ17-34 等は、λファージの Red recombinase を用いた系(76)で作製した。本系で用いた Red recombinase 発現プラスミド pKD46 は温度感受性の複製開始タンパク質を保持するので、本プラスミドを保持する大腸菌の培養は 30°C で行なった。

###### 操作

1. 遺伝子破壊用 DNA 断片を作製した。Table 5-2 に示した各破壊用プライマーで pTnTp1 または pTnGm1 由来の各薬剤耐性遺伝子+破壊遺伝子の上流下流 40 bp 断片を PCR 増幅した。
2. *E. coli* EC100(NAH7K2)に pKD46 をエレクトロポレーションで導入し、ApKm でセレクションした。
3. EC100(NAH7K2)(pKD46)を OD<sub>660</sub>=0.1 時にアラビノースを 10 mM になるように加えて、OD<sub>660</sub>=0.4 まで再培養し、遺伝子破壊用 DNA 断片をエレクトロポレーションで導入した。
4. 各薬剤培地で目的遺伝子が薬剤耐性遺伝子で組換えられたコロニーを選択し、check 用プライマーでコロニーPCR とシーケンシングを行い、破壊株を得た。
5. pKD46 を脱落した株を得るため、37°C で Ap を含まない液体培地で 2-6 h ほど培養して再度薬剤セレクションし、Ap<sup>S</sup>株を選抜した。

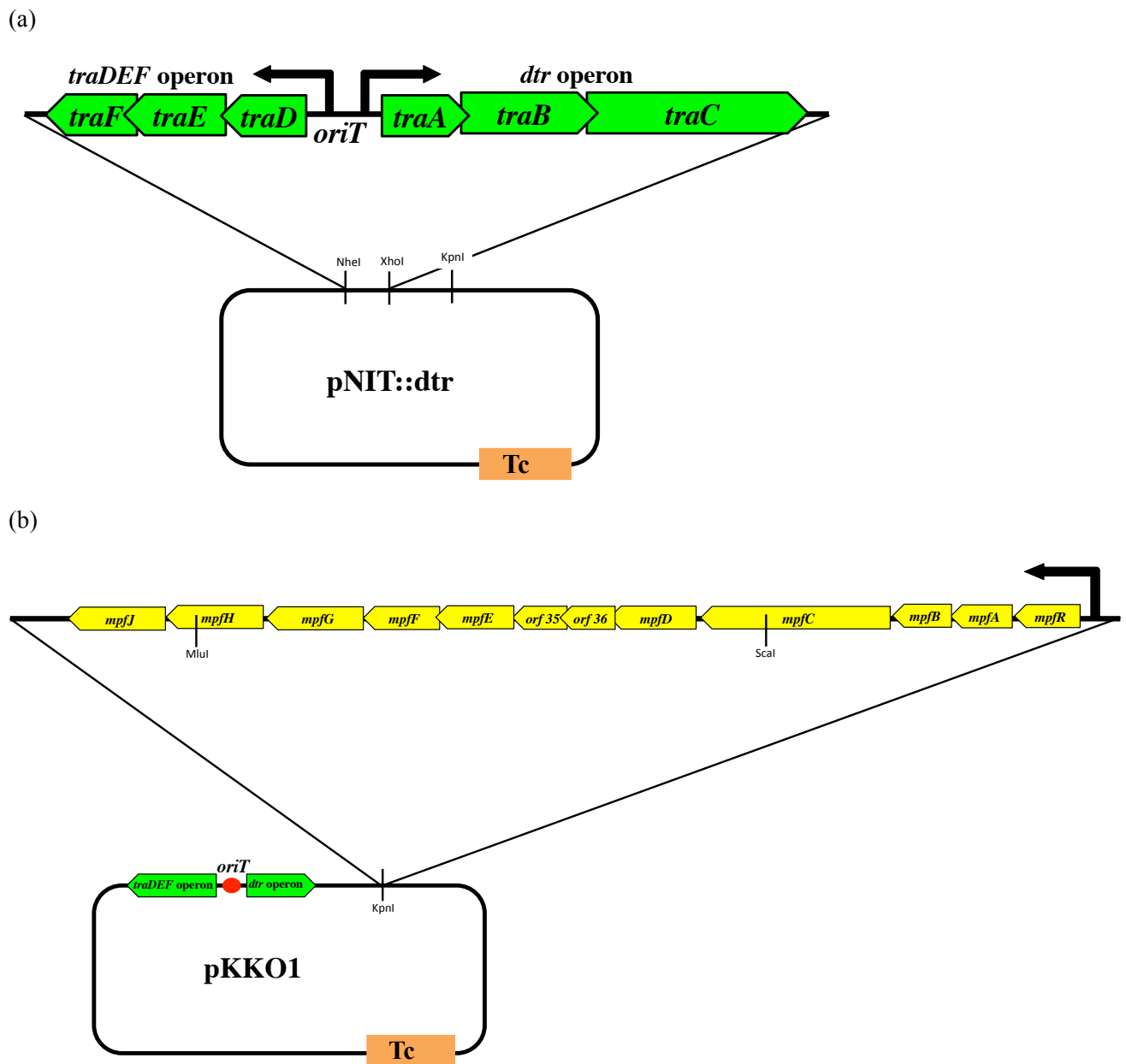


Fig. 5-1 (a) pNIT::dtr のマップ。(b) pKKO1 のマップ。

### **pUC18orf30-34 および pUC18orf30、31、32、33、34 の作製**

Table 5-2 に示した各プライマーセットを用いた PCR で NAH7 の *orf30-34*、*orf30*、*orf31*、*orf32*、*orf33*、*orf34* 断片を増幅し、この断片を pUC18 の BamHI-KpnI サイトに各断片を IPTG 誘導可能なコンストラクトでクローニングした 6 つのプラスミドを作製した。

### **pUT18 誘導体及び pKTN25 誘導体の作製**

Table 5-2 に示した各プライマーセットを用いた PCR で *orf34*、*traC*、*traB*、*mpfC*、*mpfF*、*mpfI*、*mpfJ*、*mpfH* の断片を増幅し、この断片を pUT18 及び pKTN25 の HindIII サイトに Gibson Assembly Kit でクローニングした。

#### **5-2-5. 接合伝達実験**

接合実験は、寒天培地上で行った。本研究では Tp 耐性遺伝子あるいは Gm 耐性遺伝子を付与した NAH7 誘導体を使用し、薬剤耐性を指標として接合伝達体の選択を行った。供与菌は *E. coli* EC100 株を使用し、受容菌は *E. coli* DH5 $\alpha$  株を使用した。

接合伝達頻度の算出は、供与菌、受容菌、接合伝達体の抗生物質耐性を指標として colony-forming unit (CFU) を測定し、接合体/供与菌を算出した。なお、最終的な接合伝達頻度は少なくとも 3 回の独立した実験から求めた。

#### **操作**

1. 供与菌および受容菌を一晩液体培養した。
2. 1 ml の受容菌を遠心 (10,000 rpm、室温、1 分間) し、菌体を集めた。
3. LB で 2 回洗浄した。
4. 集菌した受容菌に 1 ml の供与菌を加え、十分に混合した。
5. 遠心により菌体を集めた。
6. LB 寒天培地上に 50  $\mu$ l 程度に濃縮した菌液をスポットした。供与菌が pUC18 誘導体を保持している場合は、0.5 mM の IPTG を含む LB 寒天培地上で行なった。
7. 30°C で 6 時間培養した。
8. 適宜希釈後、プラスミドを保持する受容菌を選択する培地に塗布した。接合伝達頻度を算出する際は適宜希釈し、接合伝達体および、供与菌、受容菌用の選択培地に 10  $\mu$ l ずつスポットした。
9. 30°C で 1-2 日培養した。接合伝達頻度は供与菌当たりの接合伝達体の CFU で算出した。

#### **5-2-6. プラスミドの安定性試験**

NAH7Tp は Tp 耐性遺伝子が組み込まれている。宿主内で NAH7Tp の安定性は Tp 非添加培地で、宿主の Tp 耐性能がどれだけ維持されるかによって評価した。操作は以下の通り行なった。

1. EC100(NAH7Tp)(pUC18)株と EC100(NAH7Tp)(pUC18orf34)株を、Tp 及び Ap を添加した LB 液体培地で一晚培養した。
2. 培養液を適当に希釈し、100  $\mu$ l を LB および Tp を添加した LB 寒天培地に塗布し、培養した。
3. 2.と同一の培養液を LB で希釈し、50  $\mu$ l を 5 ml の Ap を添加した LB 培地に接種し、30°C で一晚培養した。
4. 2.の操作を再度行った。寒天培地で生育したコロニーをカウントし、Tp 耐性コロニーの割合を求めた。

#### 5-2-7. タンパク質の *in vivo* 相互作用試験

細胞内におけるタンパク質の相互作用は BACTH system kit (Bacterial Adenylate Cyclase Two-Hybrid System Kit) (EUROMEDEX)を用いて解析した。各操作は Kit の説明者に従い、X-gal を含む LB 寒天培地上でコロニーの青色になることを指標にタンパク質相互作用を検出した。

#### 5-2-8. 転写単位の解析

##### RNA の精製および cDNA の作製

*P. putida* G7 株から total RNA を精製した。この total RNA を鋳型、mpfJ-orf34\_Rv をプライマーとして cDNA を合成した。操作は第 4 章に準じた。

##### 転写単位の解析

ExTaq を用いて、得られた cDNA を鋳型に mpfJ-orf34\_Fw、mpfJ-orf34\_Rv のプライマーセットで PCR した。これらプライマーはそれぞれ *mpfJ* と *orf34* の CDS 上にアニーリングする。ポジティブコントロールとして鋳型を total DNA、ネガティブコントロールとして鋳型を RNA とした。

#### 5-2-9. orf34 のシグナル配列の推測

SignalIP (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalIP/>)、SOSui<sub>MP1</sub> (<http://harrier.nagahama-i-bio.ac.jp/sosui/mp1/>)、Signalblast (<http://sigpep.services.came.sbg.ac.at/signalblast.html>)を用いて、*orf34* 産物の推定シグナル配列と推定細胞内局在を推測した。

### 5-3. 結果

#### 5-3-1. NAH7 の接合伝達関連遺伝子群の推定機能

NAH7 の 3 つの接合伝達関連オペロン内の遺伝子がコードするアミノ酸配列に対して Blastp で相同性検索を行い、*traABC* オペロンと *traDEF* オペロンは R388 を元に、*mpf* オペロンは Ti-plasmid と R388 を元に接合伝達関連遺伝子群に対して機能予測した(Table 0-3)。*orf35* と *mpfR* 以外の遺伝子は相同性から機能予測ができた。NAH7 は、各種の接合伝達性プラスミドで保存されている 14

遺伝子を全て有していた。

### 5-3-2. pKKO1 の接合伝達能

NAH7 の *traABC* オペロン、*traDEF* オペロン及び *mpf* オペロンに接合伝達必須遺伝子が全て含まれているかどうかを検討するために、これら 3 オペロンをクローニングした pKKO1 を作製した。供与菌を EC100(pKKO1)株、受容菌を DH5 $\alpha$  株として接合伝達試験を行なったが、接合伝達体は得られなかった。この結果、NAH7 上にはクローニングした 3 オペロン以外にも接合伝達に必要な領域が存在することが示唆された。

### 5-3-3. 大規模欠失 NAH7 誘導体の接合伝達能

前項より *traABC*、*traDEF*、*mpf* オペロン上の遺伝子以外の接合伝達必須遺伝子の存在が示唆された。そこで、NAH7 上のこれらオペロン以外の領域を  $\lambda$ -Red recombination 系で薬剤耐性遺伝子に置き換えて、大規模欠失させた NAH7 誘導体(NAH7 $\Delta$ 1-14、NAH7 $\Delta$ 17-34、NAH7 $\Delta$ 17-29)を作製した。NAH7 $\Delta$ 1-14 は複製・維持関連遺伝子 *rep* から *traF* 間の *orf1* から *orf14* を Gm 耐性遺伝子で、NAH7 $\Delta$ 17-34 は *traC* から *mpfJ* の間の *orf17* から *orf34* を Tp 耐性遺伝子で、NAH7 $\Delta$ 17-29 は *traC* から *orf30* の間の *orf17* から *orf24* を Tp 耐性遺伝子で置き換えた NAH7 誘導体である(Table 0-2)。また、接合伝達試験を行う際のポジティブコントロールとして、Tp 耐性遺伝子を NAH7 に付与した NAH7Tp を作製した。

ポジティブコントロールを含む 4 プラスミドをそれぞれ保持した EC100 株を供与菌、DH5 $\alpha$  株を受容菌として接合伝達試験を行なった結果、NAH7Tp の頻度と比べて、NAH7 $\Delta$ 17-29 はほぼ同等の頻度、NAH7 $\Delta$ 1-14 は 55 倍程度低い頻度で接合伝達された(Table 5-5)。NAH7 $\Delta$ 1-14 の欠失領域には *ssb* が存在し、本遺伝子欠失により接合伝達時に生成される ssDNA が不安定になり、接合伝達頻度の低下に至った可能性が考えられた。一方、NAH7 $\Delta$ 17-34 は接合伝達能を示さなかった。NAH7 $\Delta$ 17-29 が接合伝達可能で、NAH7 $\Delta$ 17-34 が接合伝達不能であることから NAH7 $\Delta$ 17-34 のみで欠失している *orf30-34* の接合伝達への関与が示唆された。

NAH7 $\Delta$ 17-34 が *orf30-orf34* の相補で接合伝達可能になるか検討するために、pUC18*orf30-34* を作製した。上記と同様の接合伝達試験を行なった結果、EC100(NAH7 $\Delta$ 17-34)(pUC18::*orf30-34*)株を供与菌とした場合に接合伝達体を得られた(Table 5-5)。これらの結果から *orf30*、*orf31*、*orf32*、*orf33*、*orf34* のいずれかあるいは全ての接合伝達への関与が判明した。

### 5-3-4. *orf34* は接合伝達必須

*orf30-34* のうちの接合伝達に必要な遺伝子の同定を試みた。pUC18*orf30*、pUC18*orf31*、pUC18*orf32*、pUC18*orf33*、pUC18*orf34* を作製し、これらプラスミドで EC100(NAH7 $\Delta$ 17-34)を形

質転換した。得られた 5 株を供与菌、DH5 $\alpha$  株を受容菌として接合伝達試験を行なった結果、EC100(NAH7 $\Delta$ 17-34)(pUC18orf34)株を供与菌とした場合のみ、接合伝達体が得られた。その頻度は NAH7Tp を有した株を供与菌とした場合とほぼ同等であった(Table 5-5)。

*orf30-34* のうちの 1 遺伝子を欠失させた NAH7 誘導體(NAH7 $\Delta$ 30、NAH7 $\Delta$ 31、NAH7 $\Delta$ 32、NAH7 $\Delta$ 33、NAH7 $\Delta$ 34)を作製した。これら 5 つの NAH7 誘導體を保持した EC100 株を供与菌として接合伝達試験を行なった結果、NAH7 $\Delta$ 30、NAH7 $\Delta$ 31、NAH7 $\Delta$ 32 保持株の場合は、NAH7Tp 保持株の場合とほぼ同等の頻度で接合伝達体が得られた(Table 5-5)が、NAH7 $\Delta$ 33 で約 10 倍の頻度低下が観察され、NAH7 $\Delta$ 34 では接合伝達体が得られなかった。この 2 プラスミドを有する株をそれぞれ pUC18orf33、pUC18orf34 で形質転換し、得られた株を供与菌として接合伝達試験を行なった結果(Table 5-5)、EC100(NAH7 $\Delta$ 34)(pUC18orf34)株を供与菌とした場合に伝達頻度の十分な回復が見られたため、*orf34* は接合伝達に必須であると結論した。一方で、EC100(NAH7 $\Delta$ 33)(pUC18orf33)株を供与菌とした場合は伝達頻度の回復が見られなかったため、以降は *orf34* に焦点を当てた実験を行なった。

pKKO1 が接合伝達能を示さないのは *orf30-orf34* を有していないためと考えられたので、EC100(pKKO1)(pUC18orf30-*orf34*)株を供与菌とした接合伝達試験を行なったが、接合伝達体は得られなかった(Table 5-5)。

### 5-3-5. Orf34 の配列情報の解析

Orf34 の機能予測をするため Orf34 のアミノ酸配列をクエリとして blastP で相同性検索を行った。Orf34 は TrbM superfamily のドメインの一部を有していた。この superfamily に属するタンパク質をコードする遺伝子の多くは接合伝達関連遺伝子近傍に存在していたが、機能解析は全く行われていない。また、Orf34 は Killer protein の KikA ホモログと比較的高い相同性を有していた。このようなホモログの中で最も研究が進んでいる pCU1 の KikA は *Klebsiella* 属細菌内で発現すると生育阻害を引き起こすこと、*kikA* を破壊した pCU1 は *Klebsiella* 属細菌への接合伝達頻度が 100 倍程度低下することが報告されている(77, 78)。

複数のシグナル配列解析ソフトで Orf34 のシグナル配列を検索した。全ての解析ソフトでシグナル配列が検出され、ペリプラズムへの局在、あるいは細胞外への分泌が予測された。

### 5-3-6. *orf34* は *mpfJ* と単一転写単位

*orf34* は *mpf* オペロンの直下流に存在している。G7(NAH7)株から RNA を回収し、逆転写 PCR により転写単位を検討したところ、*orf34* と *mpfJ* (*mpf* オペロンの一番下流に存在する遺伝子)が同一転写単位であることが明らかとなった(Fig. 5-2)。

**Table 5-4 NAH7 誘導体の接合伝達頻度**

Plasmid	Transfer frequency
NAH7Tp	$1.5 \times 10^{-4}$
NAH7 $\Delta$ 17-29	$1.4 \times 10^{-4}$
NAH7 $\Delta$ 17-34	$< 10^{-8}$
NAH7 $\Delta$ 1-14	$1.4 \times 10^{-5}$
NAH7 $\Delta$ 17-34 + pUC18	$< 10^{-8}$
NAH7 $\Delta$ 17-34 + pUC18orf30-34	$1.7 \times 10^{-3}$

供与菌株として EC100、受容菌として DH5  $\alpha$  を用いた。なお、Transfer frequency は独立した 3 回の実験の平均値とした。



**Table 5-5 NAH7 誘導体の接合伝達頻度**

Plasmid	Transfer frequency
NAH7Tp	$9.3 \times 10^{-4}$
NAH7 $\Delta$ 17-34 + pUC18	$< 10^{-8}$
NAH7 $\Delta$ 17-34 + pUC18orf30	$< 10^{-8}$
NAH7 $\Delta$ 17-34 + pUC18orf31	$< 10^{-8}$
NAH7 $\Delta$ 17-34 + pUC18orf32	$< 10^{-8}$
NAH7 $\Delta$ 17-34 + pUC18orf33	$< 10^{-8}$
NAH7 $\Delta$ 17-34 + pUC18orf34	$3.9 \times 10^{-3}$
NAH7 $\Delta$ 30	$2.5 \times 10^{-3}$
NAH7 $\Delta$ 31	$1.9 \times 10^{-3}$
NAH7 $\Delta$ 32	$2.4 \times 10^{-3}$
NAH7 $\Delta$ 33	$1.1 \times 10^{-4}$
NAH7 $\Delta$ 34	$< 10^{-8}$
NAH7 $\Delta$ 33 + pUC18	$1.3 \times 10^{-5}$
NAH7 $\Delta$ 33 + pUC18orf33	$4.2 \times 10^{-5}$
NAH7 $\Delta$ 34 + pUC18	$< 10^{-8}$
NAH7 $\Delta$ 34 + pUC18orf34	$3.5 \times 10^{-3}$
pKKO1 + pUC18orf30-orf34	$< 10^{-8}$
pKKO1 + pUC18	$< 10^{-8}$

供与菌として EC100、受容菌として DH5  $\alpha$  を用いた。なお、Transfer frequency は独立した 3 回の実験の平均値とした。

M 1 2 3

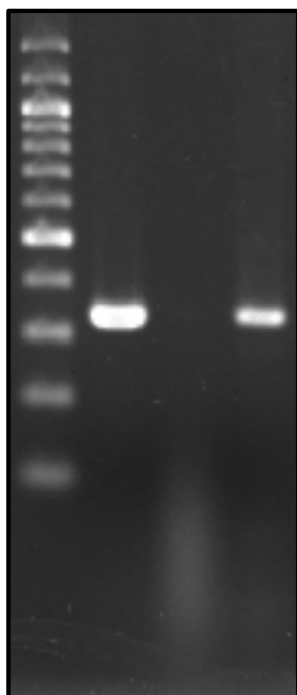


Fig. 5-2 *orf34* は *mpfJ* と同一転写単位。異なる鋳型で PCR して得られた産物を 2.0%アガロースゲル電気泳動後、EtBr 染色した。それぞれの鋳型はレーン 1, G7 株の total DNA; レーン 2, G7 株の total RNA; レーン 3, cDNA。

### 5-3-7. *orf34* 発現に伴う宿主細胞の生育への影響

接合伝達試験を実施した際、EC100(NAH7Δ34)(pUC18orf34)株の生育が他菌株と比べて著しく遅いことが観察されていた。この現象を明確にするため、EC100(pUC18)株、EC100 (pUC18orf34)株、EC100(NAH7Tp)(pUC18)株、EC100(NAH7Tp)(pUC18orf34)株を用いて生育試験を実施した。その結果、EC100(NAH7Tp)(pUC18orf34)株のみで生育の遅延が認められた。EC100 (pUC18orf34)株では生育遅延が観察されなかったことから、*orf34* と NAH7 上の何らかの遺伝子が協働して生育遅延がおきていると考えられた(Fig. 5-3)。そこで、EC100(NAH7Δ1-14)株、EC100(NAH7Δ17-34)株、EC100(NAH7ΔF-C)株、EC100(NAH7ΔF-CΔmpf)株、EC100(NAH7ΔF-mpf)株に pUC18 と pUC18orf34 をそれぞれ保持させた株を用いた生育試験を行ない、pUC18orf34 を保持しても生育遅延が起こらない株が存在するか検討した。しかし、これら 5 株全てで生育遅延が認められた(data not shown)。

### 5-3-8. *orf34* の発現に伴う NAH7 の安定性試験

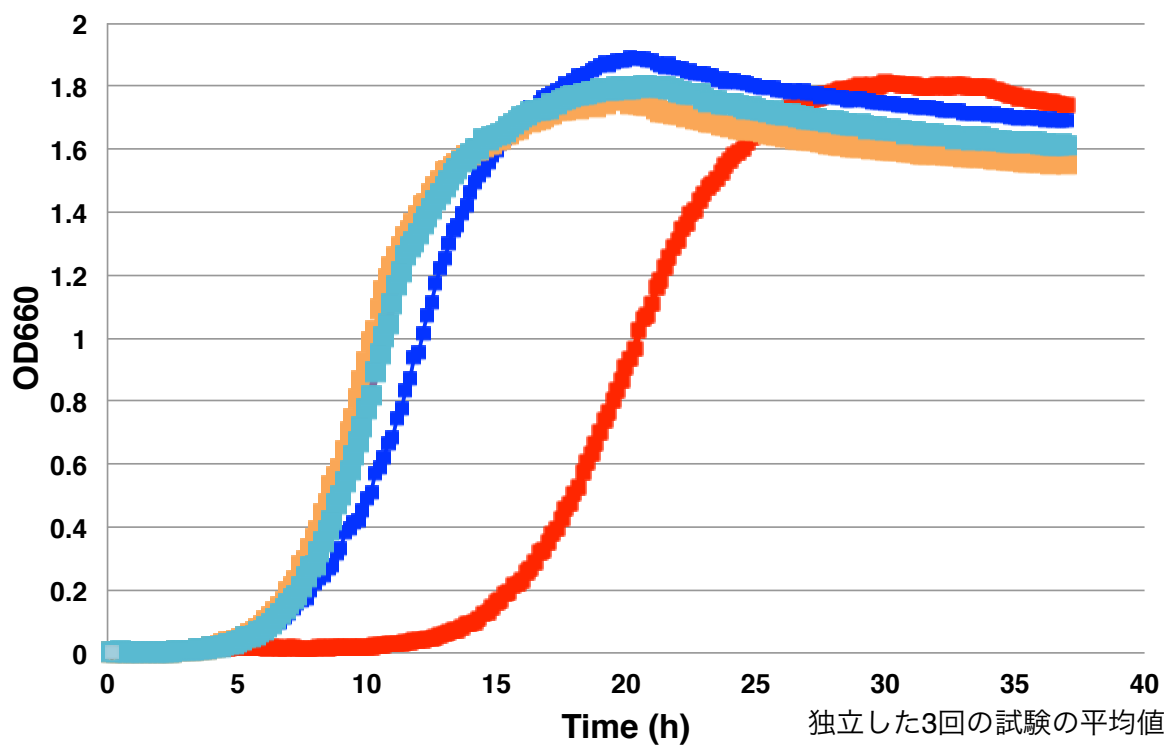
前項の結果より pUC18orf34 が NAH7 の複製・維持に何らかの影響を与えて生育遅延が起きる可能性が考えられた。そこで、NAH7 の安定性試験を行なった。EC100(NAH7Tp)(pUC18)株、EC100(NAH7Tp)(pUC18orf34)株をそれぞれ Ap 及び Tp 含有液体培地で一晚培養後、培養液を希釈して Ap 含有液体培地で一晚培養し、LB 培地及び Tp 含有培地に塗布して CFU を測定した。その結果、EC100(NAH7Tp)(pUC18)株由来の Tp 耐性コロニーは  $10^9$  CFU/ml あたり  $10^8$  CFU/ml であったのに対して、EC100(NAH7Tp)(pUC18orf34)株由来の Tp 耐性コロニーは  $10^8$  CFU/ml あたり  $<10^1$  CFU/ml であり、EC100(NAH7Tp)(pUC18orf34)株の NAH7Tp は非常に不安定であることが明らかとなった。

### 5-3-9. Orf34 の *in vivo* 相互作用

Orf34 と既知の接合伝達関連タンパク質との相互作用を検討すれば、Orf34 の機能に関する何らかの情報が得られると考え、Bacterial Adenylate Cyclase Two-Hybrid system (EUROMEDEX)を用いて、*in vivo* 相互作用解析を行った。Orf34、Relaxase (TraC)、Coupling protein (TraB)、T4SS components (MpfF、MpfH、MpfI、MpfC、MpfJ)の計 8 タンパク質の遺伝子領域を含む DNA 断片を pUT18 と pKTN25 にクローニングした。Orf34 自身を含むこれら 8 タンパク質と Orf34 との相互作用を青コロニーの割合で検出することを試みたが、ポジティブコントロールを除く全ての組み合わせで青コロニーの出現は観察されなかった(data not shown)。

## 5-4. 考察

本章では *orf34* を新たな接合伝達必須遺伝子として同定し、本遺伝子の機能解析を行なった。



**Fig. 5-3** 生育曲線。赤は EC100(NAH7Tp)(pUC18orf34)株、青は EC100(NAH7Tp)(pUC18)株、橙色は EC100(pUC18orf34)株、薄青色は EC100(pUC18)株を示す。

NAH7  $\Delta$  34 は接合伝達能を消失し、pUC18orf34 と NAH7  $\Delta$  34 保持株を供与菌とした場合に NAH7  $\Delta$  34 が接合伝達可能であったことから *orf34* は接合伝達必須遺伝子と結論した。また、NAH7  $\Delta$  33 も NAH7Tp と比べて 10 倍程度の頻度低下をしていたが、pUC18orf33 と NAH7  $\Delta$  33 保持株を供与菌とした場合でも NAH7  $\Delta$  33 の接合伝達頻度は上昇しなかった。これは、*orf33* の欠失が *orf34* の発現に影響を与え、頻度低下を生じさせた可能性が考えられる。一方、NAH7  $\Delta$  1-14、NAH7  $\Delta$  17-29 は野生型と同頻度の接合伝達能を有していたことから、これらプラスミドの破壊領域には接合伝達必須遺伝子が存在しないことが明らかとなり、3 つの接合伝達関連オペロン以外の NAH7 上の接合伝達必須遺伝子は、*orf34* の 1 遺伝子のみであると示唆された。しかし、3 つの接合伝達関連オペロンを有する pKKO1 と pUC18orf30-*orf34* を保持する株を供与菌とした場合には pKKO1 が接合伝達しなかった。この理由として、pKKO1 の接合伝達関連遺伝子が正常に発現していない可能性が考えられた。これを検証するためには、3 つの接合伝達関連オペロンを破壊した NAH7 と pKKO1 保持株を供与菌とした接合伝達試験を実施する必要がある。この供与菌から pKKO1 が接合伝達不能であれば、pKKO1 上の接合伝達関連遺伝子が正常に発現していないと結論できる。

pUC18orf34 と NAH7 誘導體保持株は生育遅延が起きた。この生育遅延機構の解析は *orf34* の接合伝達時の機能の解明にも繋がると考えられたが、様々な領域を破壊したいずれの NAH7 誘導體でも pUC18orf34 の共存で生育遅延がおきたことから、*orf34* は NAH7 の複製・維持に直接的に悪影響を与えていると示唆された。今後、NAH7 の複製・維持関連遺伝子のみをクローニングしたプラスミドと pUC18orf34 保持株の生育試験や BACTH system で Orf34 と複製維持関連タンパク質の相互作用試験を実施予定である。

*orf34* と *mpfJ* は同一転写単位であったが、BACTH system では Orf34 と T4SS 関連タンパク質との相互作用は認められなかった。Orf34 が Mpf system と Dtr system のいずれに関与しているか、あるいは別の必須システムが存在するのかを明らかにするには更なる検討が必要である。

*orf34* は IncP-9 群のプラスミドでは高度に保存されており (Fig. 5-5)、本プラスミド群での重要性が示唆される。また、*orf34* の tblastn 検索を行なったところ、*orf34* ホモログが  $\alpha$ -、 $\beta$ -、 $\gamma$ -、 $\epsilon$ -プロテオバクテリアのプラスミドに存在していた (Fig. 5-6)。これらのうち分類できたプラスミドは全て MPF<sub>T</sub> 属であったため、*orf34* は Mpf システムと共に機能することが示唆された。pCU1 の *kikA*(78) および R388 の T4SS 関連遺伝子の直下流に存在する *kikA*(79) とも低い相同性を示すことから、多くのプラスミドで接合伝達に関わる重要な因子である可能性もある。ただし、pCU1 の KikA とは、(i) N 末端に分泌シグナルペプチド配列を有している、(ii) 接合伝達に関連するという共通性がみられる一方で、(i) *kikA* 領域には 2 つの CDS が含まれている点、(ii) KikA は pCU1 非存在下でも *Klebsiella* 属細菌の生育遅延をもたらすという相違点もみられることから、プラスミドによって機能が多様化している可能性が高い。

```

(A)
NAH7_orf34      MRKQVLAFLATLAFAGVAQAGAQPPTDLSYGENSDEDACGATLC---LLGMSRDGDGCDK
pCU1_kikA      MKKLLIPLIAAGSLLYL PASHA-----EDPCKVIMCMAGKLTGDSGGSECNS
                *:* :*:*:*: * :. : *                **.* . :* * * * ..*:*.

NAH7_orf34      YLKRYFSIVKFKHGNFSPSRTAAARGDFVAQCVD-----AQDSAKEANDKWGGSRYGF
pCU1_kikA      AEAAFFNIVKKNKHGFLPNHTKDARKAFLNECPDNGEGGSNQSMISQIISKYGKVR--L
                :*.*** :. .* *.* * * * * : * *                *. .: .*:* * :

(B)
NAH7_orf34      MRKQVLAFLATLAFAGVAQAGAQPPTDLSYGENSDEDACGATLCL---LGMSRDGDGCDKY
R388_kikA      MNRKMTVVSASLVGA-----LSLFSQTAKADDWGCQVLLCLSDPRGPTTESECKPP
                *.:*: . *:*.* *                : :* :*: . * . *** * : :*:*.

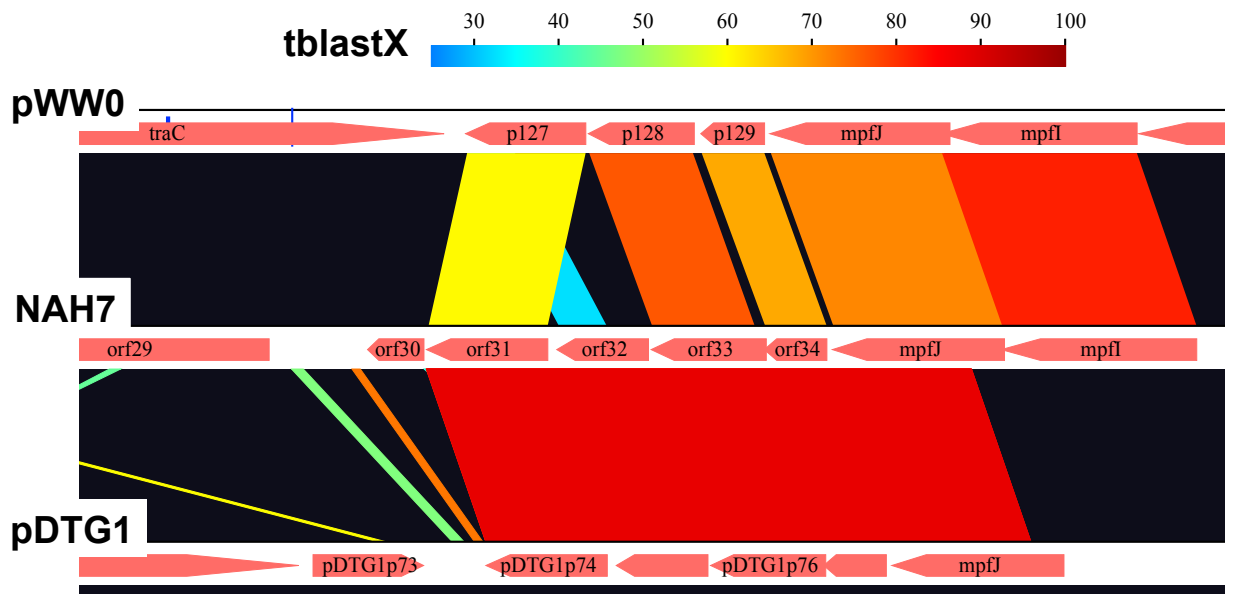
NAH7_orf34      LKRYFSIVKFKHGNFSPSRTAA----ARGDFVAQCVDQAQDSAKEANDKWGG-----
R388_kikA      IHKLWD--HLRKGKPFPSCAMATNSRTGKRSYAQLVYDPYDPCPDGTPAGGYIAQSQSA
                ::: . . :*:*: * * : *                .: .:. *.*.. :... **

NAH7_orf34      -----
R388_kikA      DRKDWRRLQYAFSTHGRRYDSGGAWNMYEGNGPRACVGNHLSYSVYRGNDDSNISVQVY

NAH7_orf34      -----SRYGF
R388_kikA      DQVVWQQPQNPRVIDVFIDEAFHHRVRY
                * :

```

Fig. 5-4 NAH7 の Orf34 と pCU1 の KikA (A)、R388 の KikA (B) のアミノ酸配列の比較。赤字部分は推定シグナル配列。



Software:GenomeMatcher

Fig. 5-5 IncP-9 群プラスミドの orf34 周辺配列の比較

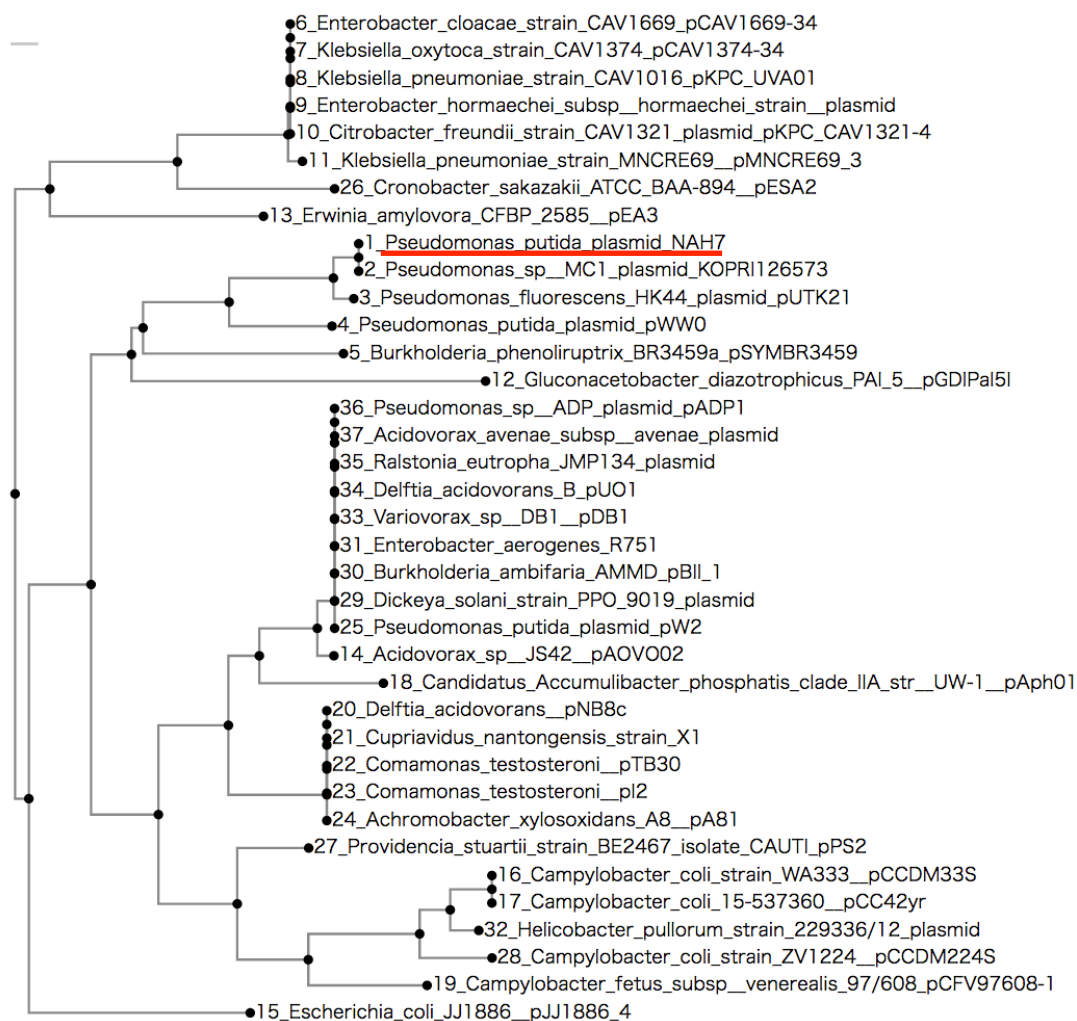


Fig. 5-6 orf34 ホモログの系統樹



## 第 6 章 pNIT101 を用いた NAH7 の接合伝達能の評価

### 6-1. 緒言

細菌細胞がプラスミドを獲得する過程は、(i)供与菌からプラスミド接合伝達装置を介して受容菌内に移入する段階と、(ii)受容菌内でプラスミドが複製・維持される段階にわけて考えることができる。しかし、「複製・維持」できなくとも、「接合伝達」によりプラスミドが一過的にでも受容菌内に存在すれば、相同組換えやトランスポゾンの転移などを介して受容菌の遺伝形質に大きな影響を与えることが可能である。すなわち、細菌が新規遺伝子を獲得する機構を理解する上では、「接合伝達」を正しく評価することが重要である。ところが、従来の実験系では接合伝達体のコロニー形成を指標に「接合伝達」を検出していたために、「接合伝達」しても「複製・維持」されて接合伝達体としてコロニー形成できなければ「接合伝達」が観察できなかった。そこで、本章では複製維持能を考慮せずに、接合伝達能のみを評価することを目的として、広宿主域性プラスミドの複製維持装置を持つベクタープラスミドから作製し、*oriT* 配列を有するために接合伝達能をトランスに供給することで接合伝達可能な pNIT101 を用いて「接合伝達」の検討を行った。具体的には、G7(NAH7K3)(pNIT101)株を供与菌とし、 $\alpha$ -、 $\beta$ -、 $\gamma$ -proteobacteria に属する様々な細菌株を受容菌とした場合の pNIT101 の接合伝達を検討した。本系により複製維持機能を考慮せずに NAH7 の「接合伝達宿主域」の解明が可能になると考えられる。

### 6-2. 材料及び方法

#### 6-2-1. 使用菌株・プラスミド、培地及び培養条件

本章で使用した菌株とプラスミドを Table 6-1 に示した。培地は LB、1/3LB または SOC 培地を用いた。培地の組成は第 1 章に準じた。寒天平板培地を用いる場合には、寒天粉末を培地に対して 1.5% (w/v) で添加した。選択培地には必要に応じてカナマイシン(Km)は 25  $\mu\text{g/ml}$ 、ゲンタマイシン(Gm)は *Burkholderia cenocepacia* に対しては 30  $\mu\text{g/ml}$ 、その他の株に対しては 20  $\mu\text{g/ml}$ 、テトラサイクリン(Tc)は *B. cenocepacia* に対しては 150  $\mu\text{g/ml}$ 、*P. fluorescens*、*P. aeruginosa*、*B. multivorans*、*B. vietnamiensis* に対しては 50  $\mu\text{g/ml}$ 、*E. coli*、*P. putida*、*Sphingobium* に対しては 20  $\mu\text{g/ml}$ 、*Sinorhizobium meliloti* に対しては 10  $\mu\text{g/ml}$ 、*Ralstonia solanacearum* に対しては 2.5  $\mu\text{g/ml}$ 、ストレプトマイシン(Sm)は *S. meliloti* に対して 500  $\mu\text{g/ml}$  となるように添加した。培養は、30°C で行った。各種菌体を長期的に保存する場合には、培養液に 15% になるように glycerol を加え、-80°C で保存した。

**Table 6-1. Bacterial strains and plasmids used in this chapter**

Strain or plasmid	Relevant characteristics <sup>a</sup>	Source or reference
<i>γ- proteobacteria</i>		
<i>E. coli</i>		
DH5α	<i>recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 D (lacZYA-argF) Φ80lacZΔM15</i>	(44)
JM109	<i>recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 D(lac-proAB)(F' traD36 proAB<sup>+</sup> lacIqZDM15)</i>	(45)
<i>P. putida</i>		
KT2440G	KT2440::TnMod-OGm ; Gm <sup>r</sup>	This study
G7(NAH7K3)	G7 derivative harboring NAH7K3 instead of NAH7	This study
<i>P. fluorescens</i>		
Pf-5G	Pf-5::TnMod-OGm; Gm <sup>r</sup>	(80)
<i>P. aeruginosa</i>		
KG2512Gm	Km-sensitive and Gm-resistant derivative of PAO1	(80)
<i>β- proteobacteria</i>		
<i>Burkholderia</i>		
ATCC 17616	Wild-type strain; Gm <sup>r</sup>	(81)
<i>B. vietnamiensis</i>		
G4	Wild-type strain	(82)
G4Gm	G4::TnMod-OGm; Gm <sup>r</sup>	This study
<i>B. cenocepacia</i>		
J2315	Wild-type strain	(83)
J2315Gm	J2315::TnMod-OGm; Gm <sup>r</sup>	This study
<i>Ralstonia solanacearum</i>		
RS1085	Wild-type strain	(84)
RS1085Gm	RS1085::TnMod-OGm; Gm <sup>r</sup>	This study
<i>α- proteobacteria</i>		
<i>Sphingobium japonicum</i>		

UT26	Wild-type strain	(85)
UT26Gm	UT26::TnMod-OGm; Gm <sup>r</sup>	This study
<i>Sphingobium</i> sp.		
MI1205	Wild-type strain	(86)
MI1205Gm	MI1205::TnMod-OGm; Gm <sup>r</sup>	This study
TKS	Wild-type strain	(87)
TKSGm	TKS::TnMod-OGm; Gm <sup>r</sup>	This study
<i>Sinorhizobium meliloti</i>		
1021	Wild-type strain; Sm <sup>r</sup>	(88)
Plasmid		
NAH7K3	NAH7 $\Delta$ <i>nic</i> ; Km <sup>r</sup>	This study
pTnMod-OGm	pMB1 replicon, Tn5 inverted repeat; Gm <sup>r</sup>	(89)
pNIT6012	pVS1 derivative; shuttle vector, Mob <sup>+</sup> Tc <sup>r</sup>	(49)
pNIT101	pNIT6012 carrying a 430-bp <i>oriT</i> region from NAH7	This study

---

## プラスミド DNA の調製 (Kit を用いた方法)

大腸菌からプラスミドを回収する場合は LaboPass<sup>TM</sup> Plasmid Mini (COSMO Genetech) を用いて、添付の説明書に従って行った。

## プラスミドの迅速調製法

基本的な操作は第 1 章の方法に準じた。

### **6-2-2. electroporation 法による形質転換法**

第 1 章の electroporation 法と同じ操作を行なった。

### **6-2-3 受容菌株への Gm 耐性遺伝子の付与**

各種菌株に electroporation 法で pTnMod-OGm を導入し、Gm 含有培地で耐性株を選択した。

### **6-2-4. 接合伝達実験**

接合実験は、0.45- $\mu$ m-pore-size cellulose acetate filter (Advantec) を使用し寒天培地上で行った。本研究では pNIT6012 誘導体の接合伝達を行う際には、Tc 耐性を指標として接合伝達体の選択を行った。供与菌は G7(NAH7K3)(pNIT101)株および G7(NAH7K3)(pNIT6012)株を使用し、受容菌は Pf-5G 株、KG2512Gm 株、ATCC 17616 株、G4Gm 株、J2315Gm 株、RS1085Gm 株、UT26Gm 株、MI1205Gm 株、TKSGm 株、1021 株とした。

接合伝達頻度の算出は、供与菌、受容菌、接合伝達体の抗生物質耐性を指標として colony-forming unit (CFU) を測定し、接合体/供与菌を算出した。なお、最終的な接合伝達頻度は少なくとも 3 回の独立した実験から求めた。

#### **操作**

1. 各株が full-growth に達するまで培養した。なお、UT26Gm、MI1205Gm、TKSGm はプレート上で培養し、その他の株は液体培養した。
2. 受容菌を遠心 (10,000 rpm、室温、1 分間) し、菌体を集めた。
3. 1/3LB で 2 回洗浄した。
4. 集菌した受容菌に 1 ml の供与菌を加え、十分に混合した。
5. 遠心により菌体を集めた。
6. 1/3LB 寒天培地上に filter を置き、そこに 50  $\mu$ l 程度に濃縮した菌液をスポットした。
7. 30°C で 24 時間培養した。
8. 適宜希釈後、プラスミドを保持する受容菌を選択する培地に塗布した。接合伝達頻度を算出する際は適宜希釈し、接合伝達体および、供与菌、受容菌の選択培地に 10  $\mu$ l ずつスポットした。

9. 30°C で数日間培養した。接合伝達頻度は供与菌当たりの接合伝達体の CFU で算出した。

### 6-3. 結果

#### 6-3-1 pNIT101 の複製維持能の評価

pNIT101 は広宿主域性ベクタープラスミド pNIT6012 に *oriT<sub>N</sub>* をクローニングしたプラスミドである。pNIT101 は pVS1 の複製起点 *oriV* を有しており、多くのプロテオバクテリア (*Pseudomonas*、*Agrobacterium*、*Rhizobium*、*Burkholderia*、*Aeromonas*、*Comamonas*) で複製維持できる(49)。NAH7 の接合伝達能の評価に先立ち、受容菌として用いる  $\alpha$ -、 $\beta$ -、 $\gamma$ -proteobacteria のいずれかに属する計 11 株 (Table 6-2) で pNIT101 が複製維持可能か検討した。electroporation 法で各株に pNIT101 を導入し、Tc を添加した 1/3LB 培地で培養した。その結果、検討したすべての株が Tc 含有培地でコロニーを形成した。また、各株由来の Tc 耐性株が pNIT101 を保持していることをプラスミド精製およびアガロースゲル電気泳動で確認した。

#### 6-3-2 NAH7 の接合伝達能の評価

前項で pNIT101 が複製維持可能であることを確認した 11 株を受容菌として、供与菌 G7(NAH7K3)(pNIT101)株からの pNIT101 の接合伝達頻度を測定した。またネガティブコントロールとして供与菌を G7(NAH7K3)(pNIT6012)株とした場合の pNIT6012 の接合伝達頻度も検討した (Table 6-2)。その結果、TKSGm 株以外の受容菌株で接合伝達体を得られたが、ネガティブコントロールでは全ての受容菌株で接合伝達体は得られなかった。得られた接合伝達体が pNIT101 を保持していることをプラスミド精製およびアガロースゲル電気泳動で確認した。

### 6-4. 考察

#### 6-4-1. NAH7 の接合伝達能の検討

自己伝達性プラスミドは自然生態系でおこる水平伝播の代表的な機構のひとつとして、生物の多様な環境への適応進化において重要な役割を担うと提唱されているが、接合伝達宿主域の評価は不十分である。評価が行われた例においても、従来の実験系では接合伝達後の複製・維持機能も含む宿主域が評価されている場合が多く、受容菌内に接合伝達されても複製できないプラスミドも見出されていることを考慮すると、接合伝達宿主域が正しく評価されているとは言い難い。

プラスミドがその複製・維持システムが機能しない菌体細胞内に接合伝達した場合、娘細胞にプラスミドが分配されず、一過的にだけ細胞内に存在することになる。しかし、たとえ一過的であっても受容菌細胞内に存在すれば、受容菌の遺伝形質に大きな影響を与えることが可能である。例えば、プラスミド上のトランスポゾンの転移や、プラスミドとゲノム間の相同組換えによって、プラスミド上の遺伝子の一部あるいは全部が、受容菌ゲノム中に組み込まれている可能性が

ある。また、Retrotransfer を行うことができるプラスミドの場合は受容菌ゲノムから遺伝情報を獲得した後に、供与菌に transfer されることで供与菌側の遺伝形質に大きな影響を与える。実際に、接合伝達性を有するが、複製維持システムが狭宿主域であるプラスミドは多く存在し、これらプラスミドは芳香族化合物分解遺伝子や抗生物質耐性遺伝子等をトランスポゾン上に有していることがある(90)。

これらのことから、「接合伝達宿主域」を「複製・維持」と切り離して理解することは細菌が新規遺伝子を獲得する機構を理解する上で重要である。また、プラスミドの接合伝達性宿主域はプラスミドごとに異なる(91, 92)が、この宿主域を規定している因子はプラスミド(供与菌)側と受容菌側の両者共に不明であり、このような因子の解明のためにも純粋な「接合伝達宿主域」を評価できる系の構築が必要である。そこで本章では、NAH7 の *oriT* を広宿主域性の複製・維持能を持つベクターにクローニングしたプラスミド pNIT101 を用いて「接合伝達宿主域」を「複製宿主域」と区別して評価する系を構築した。

NAH7 は  $\gamma$ -proteobacteria 間で接合伝達される一方で、 $\beta$ -proteobacteria と  $\alpha$ -proteobacteria への接合伝達は確認されていなかった(40)が、本研究で NAH7 の接合伝達装置を介して pNIT101 が TKSGm 株を除く  $\alpha$ -、 $\beta$ -、 $\gamma$ -proteobacteria に属する多くの細菌株への接合伝達が観察された。この結果は、NAH7 の「接合伝達宿主域」が広宿主域であることを示すと共に、これまで NAH7 の  $\alpha$ -、 $\beta$ -proteobacteria への「接合伝達」が観察されなかった理由が、その「複製宿主域」の狭さに起因することを強く示唆する。

TKSGm 株は electroporation で導入した pNIT101 を複製維持可能であったが、接合実験では接合伝達体が得られず、NAH7 の接合伝達装置が TKSGm 株に機能しないことが示唆された。一方で、pNIT101 は RP4 の接合伝達装置を介して TKSGm 株へと接合伝達された(data not shown)。この現象を司る機構として現段階では様々な可能性が考えられるが、例えば、TKS 株が(i) NAH7 の接合伝達に必要な因子を欠損している、(ii) NAH7 の接合伝達を阻害する因子を発現している可能性がある。これら因子を同定するためには、受容菌側からのアプローチとして、(a) TKS 株のトランスポゾン挿入突然変異ライブラリーから受容可能な株を取得すること、(b) TKS 株と類縁かつ受容可能な株である UT26 株のゲノムライブラリーを導入した TKS 株集団から受容可能な株を取得すること、また、NAH7 側からのアプローチとして、NAH7 上へトランスポゾン等により突然変異を導入し、TKS 株へ接合伝達可能になった NAH7 誘導体を取得することが考えられる。このようにして同定される因子は、個別的な事例に留まらず、接合伝達宿主域を規定する普遍性の高い因子である可能性が高く、自然環境での水平伝播機構の飛躍的理解に繋がると期待できる。

**Table 6-2 Mobilization of pNIT101 to various bacterial strains<sup>a</sup>**

Recipient strain	Mobilization frequency	
	pNIT6012	pNIT101
<i>P. putida</i> KT2440Gm	<1.1 x 10 <sup>-8</sup>	3.6 x 10 <sup>-3</sup>
<i>P. fluorescens</i> Pf-5G	<4.0 x 10 <sup>-8</sup>	4.8 x 10 <sup>-4</sup>
<i>P. aeruginosa</i> KGG	<3.5 x 10 <sup>-8</sup>	1.4 x 10 <sup>-4</sup>
<i>B. multivorans</i> ATCC17616	<3.5 x 10 <sup>-8</sup>	5.8 x 10 <sup>-4</sup>
<i>B. vietnamiensis</i> G4Gm	<3.6 x 10 <sup>-8</sup>	1.5 x 10 <sup>-4</sup>
<i>B. cenocepacia</i> J2315Gm	<3.6 x 10 <sup>-8</sup>	7.6 x 10 <sup>-5</sup>
<i>R. solanacearum</i> RS1085Gm	<3.8 x 10 <sup>-8</sup>	3.8 x 10 <sup>-6</sup>
<i>S. japonicum</i> UT26Gm	<2.9 x 10 <sup>-8</sup>	1.0 x 10 <sup>-6</sup>
<i>Sphingobium sp.</i> MI1205Gm	<3.3 x 10 <sup>-8</sup>	2.4 x 10 <sup>-5</sup>
<i>Sphingobium sp.</i> TKSGm	<4.3 x 10 <sup>-9</sup>	<4.4 x 10 <sup>-9</sup>
<i>Sinorhizobium meliloti</i> 1021	<5.6 x 10 <sup>-8</sup>	1.4 x 10 <sup>-3</sup>

<sup>a</sup> Mobilization of pNIT6012 and pNIT101 from *P. putida* G7(NAH7K3) to the recipient strain was investigated by selecting the Tc<sup>r</sup>Gm<sup>r</sup> or Tc<sup>r</sup>Sm<sup>r</sup> transconjugants. Mobilization frequency is expressed by the number of transconjugants per donor cell, and the mean value was obtained from at least three independent experiments.

## 総合考察

プラスミドの接合伝達は自然生態系で起こる水平伝播の代表的な機構のひとつとして、生物の多様な環境への適応進化の重要な役割を担い、新規機能が細菌コミュニティに素早く行き渡るためにも重要な機能を果たしていると考えられる。これまでの接合伝達の研究で、特定のプラスミドに関して ssDNA の生成過程や接合対の構造などに関して多くの研究が行われてきた(21)。一方で、プラスミドの接合伝達開始シグナルや接合伝達宿主域を規定する因子などは未だ不明であり、接合伝達の鍵酵素である relaxase の機能も十分に解明されているとは言い難い。そもそも、接合伝達に必要な全遺伝子が同定されてはおらず、未知の必須遺伝子の存在も示唆されている。NAH7 においても、本研究に先立ち、現在提唱されている接合伝達システムモデル上にない遺伝子群 *traDEF* オペロンが接合伝達に重要なことが示されていた(40)。

本研究では NAH7 の接合伝達機能に関する包括的理解を目指し、まず、NAH7 の接合伝達の基本因子である *oriT* と relaxase の同定と解析を行なった。次に、機能未知だが接合伝達に重要な *traDEF* オペロンの転写制御機構に関する研究を行なった。これら結果を踏まえて NAH7 の全接合伝達関連遺伝子の解明を目指した研究を行い、新規接合伝達必須遺伝子を見出した。さらに、NAH7 の「複製・維持」と区別した「接合伝達宿主域」を評価し、NAH7 が多くのプロテオバクテリアに水平伝播可能なことを明らかにした。

第 1 章と第 2 章では、NAH7 の *oriT* と relaxase の同定と解析を行なった。配列情報の既知情報との比較から *traA-traD* 間が *oriT*、*traC* が relaxase 遺伝子と推定し、それぞれが当該機能を有していることを実験的に示した。*oriT<sub>N</sub>* の deletion 解析や *nic* site の同定から得られた知見を基に、*oriT<sub>N</sub>* と *oriT<sub>R388</sub>* の比較を行なったところ、これら 2 つのプラスミドは同じ MOB<sub>F</sub> 群に属するにも関わらず、相同性が低く、*oriT<sub>R388</sub>* に存在する接合伝達関連タンパク質結合領域も *oriT<sub>N</sub>* には保存されていなかった。また、*nic* site も一塩基のズレがあった。TraC は同一レプリコン上の同方向に存在する 2 つの *oriT<sub>N</sub>* 間で部位特異的組換えを触媒する性質を有しており、加えて *oriT<sub>N</sub>* と塩基配列がかなり異なる pWW0 由来の *oriT<sub>W</sub>* 間の部位特異的組換えも触媒した。さらに、*oriT<sub>N</sub>*、*oriT<sub>W</sub>* をそれぞれ有する pNIT101 と pNIT201 は、NAH7、pWW0 いずれの接合伝達関連遺伝子によっても接合伝達可能であった。これまで、接合伝達システムの機能互換性については relaxase を含む接合伝達装置と *oriT* の間には高い特異性があるとされていたが、本研究では相同性が比較的低い(アミノ酸配列レベルで 74%程度) NAH7 と pWW0 の接合伝達システムの機能互換性があるという新規性の高い知見を得た。

第 3 章では、第 1 章で relaxase として同定した TraC がコファクターとして用いる金属イオン



の種類によって、nick を導入する塩基配列の特異性が変化することを本研究で確立した nicking assay 法で示した。TraC の塩基配列特異性は  $Mn^{2+}$  をコファクターとした際に低下し、本来の nic site 以外に nick を導入する Star nick 活性を示したが、この特異性の緩みは relaxase が *oriT* 以外の配列を認識して受容菌へ DNA を輸送できる可能性を提示している。実際、nic site の 5' 末端側とよく似た配列は、NAH7 の *oriT* 以外の領域や *P. putida* KT2440 株の染色体上に存在しており、relaxase が  $Mn^{2+}$  をコファクターとした場合にこれらの領域から接合伝達を開始できるのかもしれない。R388 の relaxase である TrwC は nick の導入に 2 つのチロシン残基を用いることが知られており、TraC のアミノ酸配列にもこの 2 つのチロシン残基が保存されていた。このような活性中心付近の構造変化を検討することで、TraC が示した Star nick 活性の機構解明が可能であると考えられる。また、この Star nick 活性が TraC 以外の relaxase および HUH endonuclease family タンパク質で普遍的な現象であるかを明らかにする必要がある。

第 4 章では、TraD が *traDEF* オペロンの転写を抑制することを明らかとした。TraD は *traDEF* オペロンの *traD* の開始コドン上流領域の約 100 bp の領域に結合したので、この結合が本オペロンの転写を抑制していると示唆された。TraD がこの 100 bp のどの領域により強く結合するかを明らかにすることはできなかったが、開始コドン直上流の領域に優先的に結合し、TraD の分子数が増えるにつれて上流の転写開始点方向に向かうように結合しているのではないかと考えている。このような結合様式の場合、翻訳量が一定レベルを超えなければ、転写が抑制されない。*traDEF* オペロンのプロモーターは他の接合伝達関連オペロンのものと比べて高いプロモーター活性を有することが先行研究で判明しており(40)、接合伝達を効率的に行うためには比較的多くの TraD や TraE、TraF が必要なかもしれない。一方で、TraE と TraF の機能は未知である。これらタンパク質についても生化学的な解析などを実施したが、理解を進める結果は得られなかった。

第 5 章では、新規接合伝達必須遺伝子 *orf34* を同定し、その解析を行った。 $\lambda$ -Red recombination system を用いて既知の 3 つの接合伝達関連オペロン以外を大規模欠失した NAH7 誘導体を複数作製し、これらの接合伝達能を検討した。その結果と相補実験の結果を併せて、新たな接合伝達必須遺伝子として *orf34* を同定した。*orf34* のホモログは NAH7 が属する IncP-9 群プラスミドで高度に保存されているのみならず、相同性は低いものの他のいくつかのプラスミドでも保存されており、様々なプラスミドの接合伝達に共通した重要な役割を担っている可能性がある。*orf34* は *mpf* オペロンの直下流に存在し、*mpf* 遺伝子群と同一の転写単位である結果も得られたが、タンパク質間の相互作用を検出する BACTH system では Orf34 と検討した T4SS 関連タンパク質とに相互作用は認められなかった。Orf34 が Mpf システムと Dtr システムのどちらで機能しているのか、あるいはこれら以外の接合伝達に必須なシステムが存在するのか、更なる解析が必要である。例え

ば、NAH7  $\Delta$  34 保持株で TriP 解析を行えば、Orf34 が不在の場合に ssDNA が T4SS のどのコンポーネントまで輸送されるか判明し、Orf34 の機能解明に繋がるかもしれない。

第 6 章では、NAH7 の「接合伝達宿主域」を「複製宿主域」と区別して評価する系を構築した。本研究以前の研究では、NAH7 は  $\gamma$ -proteobacteria 株間で接合伝達される一方で、 $\beta$ -proteobacteria と  $\alpha$ -proteobacteria 株への接合伝達は確認されていなかったが、本系を用いることで、NAH7 の *oriT* を有する pNIT101 が NAH7 の接合伝達装置を介して  $\alpha$ -と  $\beta$ -proteobacteria に属する多くの株へ接合伝達可能であることが示された。さらに、 $\alpha$ -proteobacteria に属する近縁の 2 株で、一方が pNIT101 を接合伝達で受容するが、他方ができない現象を見出した。本現象の機構を解明することで、接合伝達の宿主域決定機構に関する重要な知見が得られると期待できる。

以上の研究から、(i) NAH7 の *oriT* と *relaxase* を同定し、さらに、異種プラスミド間で接合伝達関連因子の相互置換が可能であることを示した。また、*relaxase* はコファクターとする金属イオンの種類によって塩基配列特異性が変化する、という新たな知見を提示した。(ii) *traDEF* オペロンの転写が *TraD* の *traD* 上流配列への結合によって抑制されていることを示した。さらに、(iii) NAH7 の新規接合伝達必須遺伝子を見出した。本遺伝子ホモログは他のプラスミドにも存在し、接合伝達に関わる新規システムの存在が示唆された。また(iv)「接合伝達宿主域」を「複製宿主域」と区別して評価する系を構築し、NAH7 が従来考えられていたより多様な細菌細胞に水平伝播可能であることを提示した。

## Reference

1. **Soucy SM, Huang J, Gogarten JP.** 2015. Horizontal gene transfer: building the web of life. *Nat Rev Genet* **16**:472-482.
2. **Meyer R.** 2009. The r1162 mob proteins can promote conjugative transfer from cryptic origins in the bacterial chromosome. *J Bacteriol* **191**:1574-1580.
3. **Lacroix B, Citovsky V.** 2016. Transfer of DNA from Bacteria to Eukaryotes. **7**.
4. **Springael D, Top EM.** 2004. Horizontal gene transfer and microbial adaptation to xenobiotics: new types of mobile genetic elements and lessons from ecological studies. *Trends Microbiol* **12**:53-58.
5. **Smillie C, Garcillan-Barcia MP, Francia MV, Rocha EP, de la Cruz F.** 2010. Mobility of plasmids. *Microbiol Mol Biol Rev* **74**:434-452.
6. **Garcillan-Barcia MP, Francia MV, de la Cruz F.** 2009. The diversity of conjugative relaxases and its application in plasmid classification. *FEMS Microbiol Rev* **33**:657-687.
7. **de la Cruz F, Frost LS, Meyer RJ, Zechner EL.** 2010. Conjugative DNA metabolism in Gram-negative bacteria. *FEMS Microbiol Rev* **34**:18-40.
8. **Gonzalez-Perez B, Lucas M, Cooke LA, Vyle JS, de la Cruz F, Moncalian G.** 2007. Analysis of DNA processing reactions in bacterial conjugation by using suicide oligonucleotides. *Embo Journal* **26**:3847-3857.
9. **Low HH, Gubellini F, Rivera-Calzada A, Braun N, Connery S, Dujeancourt A, Lu F, Redzej A, Fronzes R, Orlova EV, Waksman G.** 2014. Structure of a type IV secretion system. *Nature* **508**:550-553.
10. **Fronzes R, Schafer E, Wang L, Saibil HR, Orlova EV, Waksman G.** 2009. Structure of a type IV secretion system core complex. *Science* **323**:266-268.
11. **Cascales E, Christie PJ.** 2004. Definition of a bacterial type IV secretion pathway for a DNA substrate. *Science* **304**:1170-1173.
12. **Ilangovan A, Connery S, Waksman G.** 2015. Structural biology of the Gram-negative bacterial conjugation systems. *Trends Microbiol* **23**:301-310.
13. **Chandran V, Fronzes R, Duquerroy S, Cronin N, Navaza J, Waksman G.** 2009. Structure of the outer membrane complex of a type IV secretion system. *Nature* **462**:1011-1015.
14. **Fullner KJ, Lara JC, Nester EW.** 1996. Pilus assembly by *Agrobacterium* T-DNA transfer genes. *Science* **273**:1107-1109.
15. **Shirasu K, Koukolikova-Nicola Z, Hohn B, Kado CI.** 1994. An inner-membrane-associated virulence protein essential for T-DNA transfer from *Agrobacterium tumefaciens* to plants exhibits ATPase activity and similarities to conjugative transfer genes. *Mol Microbiol* **11**:581-588.
16. **Wallden K, Williams R, Yan J, Lian PW, Wang L, Thalassinou K, Orlova EV, Waksman G.** 2012. Structure of the VirB4 ATPase, alone and bound to the core complex of a type IV secretion system. *Proc*

- Natl Acad Sci U S A **109**:11348-11353.
17. **Savvides SN, Yeo HJ, Beck MR, Blaesing F, Lurz R, Lanka E, Buhrdorf R, Fischer W, Haas R, Waksman G.** 2003. VirB11 ATPases are dynamic hexameric assemblies: new insights into bacterial type IV secretion. *Embo j* **22**:1969-1980.
  18. **Lai EM, Chesnokova O, Banta LM, Kado CI.** 2000. Genetic and environmental factors affecting T-pilin export and T-pilus biogenesis in relation to flagellation of *Agrobacterium tumefaciens*. *J Bacteriol* **182**:3705-3716.
  19. **Gomis-Ruth FX, Moncalian G, Perez-Luque R, Gonzalez A, Cabezon E, de la Cruz F, Coll M.** 2001. The bacterial conjugation protein TrwB resembles ring helicases and F1-ATPase. *Nature* **409**:637-641.
  20. **Christie PJ.** 2016. The Mosaic Type IV Secretion Systems. *EcoSal Plus* **7**.
  21. **Cabezon E, Ripoll-Rozada J, Pena A, de la Cruz F, Arechaga I.** 2015. Towards an integrated model of bacterial conjugation. *FEMS Microbiol Rev* **39**:81-95.
  22. **Yeo HJ, Yuan Q, Beck MR, Baron C, Waksman G.** 2003. Structural and functional characterization of the VirB5 protein from the type IV secretion system encoded by the conjugative plasmid pKM101. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**:15947-15952.
  23. **Draper O, Cesar CE, Machon C, de la Cruz F, Llosa M.** 2005. Site-specific recombinase and integrase activities of a conjugative relaxase in recipient cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**:16385-16390.
  24. **Paterson ES, Iyer VN.** 1997. Localization of the *nic* site of IncN conjugative plasmid pCU1 through formation of a hybrid *oriT*. *J Bacteriol* **179**:5768-5776.
  25. **Meyer R.** 1989. Site-specific recombination at *oriT* of plasmid-R1162 in the absence of conjugative transfer. *J Bacteriol* **171**:799-806.
  26. **Cesar CE, Machon C, de la Cruz F, Llosa M.** 2006. A new domain of conjugative relaxase TrwC responsible for efficient *oriT*-specific recombination on minimal target sequences. *Mol Microbiol* **62**:984-996.
  27. **Llosa M, Bolland S, Grandoso G, de la Cruz F.** 1994. Conjugation-independent, site-specific recombination at the *oriT* of the IncW plasmid R388 mediated by TrwC. *J Bacteriol* **176**:3210-3217.
  28. **Matson SW, Nelson WC, Morton BS.** 1993. Characterization of the reaction product of the *oriT* nicking reaction catalyzed by *Escherichia coli* DNA helicase I. *J Bacteriol* **175**:2599-2606.
  29. **Pansegrau W, Schroder W, Lanka E.** 1993. Relaxase (TraI) of IncP alpha plasmid RP4 catalyzes a site-specific cleaving-joining reaction of single-stranded DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**:2925-2929.
  30. **Nunez B, Avila P, de la Cruz F.** 1997. Genes involved in conjugative DNA processing of plasmid R6K. *Mol Microbiol* **24**:1157-1168.
  31. **Monzinger AF, Ozburn A, Xia S, Meyer RJ, Robertus JD.** 2007. The structure of the minimal relaxase

- domain of MobA at 2.1 Å resolution. *J Mol Biol* **366**:165-178.
32. **Kurenbach B, Grothe D, Farias ME, Szewzyk U, Grohmann E.** 2002. The *tra* region of the conjugative plasmid pIP501 is organized in an operon with the first gene encoding the relaxase. *J Bacteriol* **184**:1801-1805.
  33. **Edwards JS, Betts L, Frazier ML, Pollet RM, Kwong SM, Walton WG, Ballentine WK, 3rd, Huang JJ, Habibi S, Del Campo M, Meier JL, Dervan PB, Firth N, Redinbo MR.** 2013. Molecular basis of antibiotic multiresistance transfer in *Staphylococcus aureus*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **110**:2804-2809.
  34. **Varsaki A, Lucas M, Afendra AS, Drainas C, de la Cruz F.** 2003. Genetic and biochemical characterization of MbeA, the relaxase involved in plasmid ColE1 conjugative mobilization. *Mol Microbiol* **48**:481-493.
  35. **Guzman LM, Espinosa M.** 1997. The mobilization protein, MobM, of the streptococcal plasmid pMV158 specifically cleaves supercoiled DNA at the plasmid *oriT*. *J Mol Biol* **266**:688-702.
  36. **Boer R, Russi S, Guasch A, Lucas M, Blanco AG, Perez-Luque R, Coll M, de la Cruz F.** 2006. Unveiling the molecular mechanism of a conjugative relaxase: The structure of TrwC complexed with a 27-mer DNA comprising the recognition hairpin and the cleavage site. *J Mol Biol* **358**:857-869.
  37. **Masataka Tsuda YO, Hirokazu Yano.** 2014. Mobile Catabolic Genetic Elements in Pseudomonads, pp 83-103. *In* Hideaki Nojiri MT, Masao Fukuda, Yoichi Kamagata (ed), *Biodegradative Bacteria*. Springer, Tokyo.
  38. **Sota M, Yano H, Ono A, Miyazaki R, Ishii H, Genka H, Top EM, Tsuda M.** 2006. Genomic and functional analysis of the IncP-9 naphthalene-catabolic plasmid NAH7 and its transposon Tn4655 suggests catabolic gene spread by a tyrosine recombinase. *J Bacteriol* **188**:4057-4067.
  39. **Greated A, Lambertsen L, Williams PA, Thomas CM.** 2002. Complete sequence of the IncP-9 TOL plasmid pWW0 from *Pseudomonas putida*. *Environ Microbiol* **4**:856-871.
  40. **Miyazaki R, Ohtsubo Y, Nagata Y, Tsuda M.** 2008. Characterization of the *traD* operon of naphthalene-catabolic plasmid NAH7: a host-range modifier in conjugative transfer. *J Bacteriol* **190**:6281-6289.
  41. **Inoue K, Miyazaki R, Ohtsubo Y, Nagata Y, Tsuda M.** 2013. Inhibitory effect of *Pseudomonas putida* nitrogen-related phosphotransferase system on conjugative transfer of IncP-9 plasmid from *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol Lett* **345**:102-109.
  42. **Lambertsen LM, Molin S, Kroer N, Thomas CM.** 2004. Transcriptional regulation of pWW0 transfer genes in *Pseudomonas putida* KT2440. *Plasmid* **52**:169-181.
  43. **Hoang TT, Karkhoff-Schweizer RR, Kutchma AJ, Schweizer HP.** 1998. A broad-host-range Flp-FRT recombination system for site-specific excision of chromosomally-located DNA sequences: application for

- isolation of unmarked *Pseudomonas aeruginosa* mutants. *Gene* **212**:77-86.
44. **Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T.** 1989. *Molecular cloning: a laboratory manual* Cold Spring Harbor Laboratory Press., N. Y.
  45. **Yanisch-Perron C Fau - Vieira J, Vieira J Fau - Messing J, Messing J.** 1985. Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors. *Gene* **33**:103-119.
  46. **Studier FW, Moffatt BA.** 1986. Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *J Mol Biol* **189**:113-130.
  47. **Dunn NF, Gunsalus IC.** 1973. Transmissible plasmid coding early enzymes of naphthalene oxidation in *Pseudomonas putida*. *J Bacteriol* **114**:974–979.
  48. **Ono A, Miyazaki R, Sota M, Ohtsubo Y, Nagata Y, Tsuda M.** 2007. Isolation and characterization of naphthalene-catabolic genes and plasmids from oil-contaminated soil by using two cultivation-independent approaches. *Appl Microbiol Biotechnol* **74**:501-510.
  49. **Heeb S, Itoh Y, Nishijyo T, Schnider U, Keel C, Wade J, Walsh U, O'Gara F, Haas D.** 2000. Small, stable shuttle vectors based on the minimal pVS1 replicon for use in gram-negative, plant-associated bacteria. *Mol Plant Microbe Interact* **13**:232-237.
  50. **Eckert RL.** 1999. DNA sequencing by the chemical method current protocols in molecular biology, vol 7. John Wiley & Sons, Inc, New York.
  51. **Zuker M.** 2003. Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction. *Nucleic Acids Res* **31**:3406-3415.
  52. **Francia MV, Clewell DB, de la Cruz F, Moncalian G.** 2013. Catalytic domain of plasmid pAD1 relaxase TraX defines a group of relaxases related to restriction endonucleases. *Proc Natl Acad Sci U S A* **110**:13606-13611.
  53. **Llosa M, Grandoso G, de la Cruz F.** 1995. Nicking activity of TrwC directed against the origin of transfer of the IncW plasmid R388. *J Mol Biol* **246**:54-62.
  54. **Lucas M, Gonzalez-Perez B, Cabezas M, Moncalian G, Rivas G, de la Cruz F.** 2010. Relaxase DNA binding and cleavage are two distinguishable steps in conjugative DNA processing that involve different sequence elements of the *nic* site. *J Biol Chem* **285**:8918-8926.
  55. **Moncalian G, Grandoso G, Llosa M, de la Cruz F.** 1997. *oriT*-processing and regulatory roles of TrwA protein in plasmid R388 conjugation. *J Mol Biol* **270**:188-200.
  56. **Moncalian G, Valle M, Valpuesta JM, de la Cruz F.** 1999. IHF protein inhibits cleavage but not assembly of plasmid R388 relaxosomes. *Mol Microbiol* **31**:1643-1652.
  57. **Cendron L, Zanotti G.** 2011. Structural and functional aspects of unique type IV secretory components in

- the *Helicobacter pylori* cag-pathogenicity island. FEBS J **278**:1223-1231.
58. **Fekete RA, Frost LS.** 2000. Mobilization of chimeric *oriT* plasmids by F and R100-1: role of relaxosome formation in defining plasmid specificity. J Bacteriol **182**:4022-4027.
  59. **Francia MV, Clewell DB.** 2002. Transfer origins in the conjugative *Enterococcus faecalis* plasmids pAD1 and pAM373: identification of the pAD1 *nic* site, a specific relaxase and a possible TraG-like protein. Mol Microbiol **45**:375-395.
  60. **Sevastyanovich YR, Krasowiak R, Bingle LE, Haines AS, Sokolov SL, Kosheleva IA, Leuchuk AA, Titok MA, Smalla K, Thomas CM.** 2008. Diversity of IncP-9 plasmids of *Pseudomonas*. Microbiology **154**:2929-2941.
  61. **Tsuda M, Iino T.** 1988. Identification and characterization of Tn4653, a transposon covering the toluene transposon Tn4651 on TOL plasmid pWW0. Mol Gen Genet **213**:72-77.
  62. **Szipirer C, Top E, Couturier M, Mergeay M.** 1999. Retrotransfer or gene capture: a feature of conjugative plasmids, with ecological and evolutionary significance. Microbiology **145 ( Pt 12)**:3321-3329.
  63. **Chandler M, de la Cruz F, Dyda F, Hickman AB, Moncalian G, Ton-Hoang B.** 2013. Breaking and joining single-stranded DNA: the HUH endonuclease superfamily. Nat Rev Microbiol **11**:525-538.
  64. **Yang W.** 2008. An equivalent metal ion in one- and two-metal-ion catalysis. Nat Struct Mol Biol **15**:1228-1231.
  65. **Emsley J.** 2013. Manganese the protector. Nat Chem **5**:978.
  66. **Finney LA, O'Halloran TV.** 2003. Transition metal speciation in the cell: insights from the chemistry of metal ion receptors. Science **300**:931-936.
  67. **Ziegelin G, Pansegrau W, Lurz R, Lanka E.** 1992. TraK protein of conjugative plasmid RP4 forms a specialized nucleoprotein complex with the transfer origin. J Biol Chem **267**:17279-17286.
  68. **Guynet C, Cuevas A, Moncalian G, de la Cruz F.** 2011. The *stb* operon balances the requirements for vegetative stability and conjugative transfer of plasmid R388. PLoS Genet **7**:e1002073.
  69. **Kvitko BH, McMillan IA, Schweizer HP.** 2013. An improved method for *oriT*-directed cloning and functionalization of large bacterial genomic regions. Appl Environ Microbiol **79**:4869-4878.
  70. **Kovach ME, Elzer PH, Hill DS, Robertson GT, Farris MA, Roop RM, 2nd, Peterson KM.** 1995. Four new derivatives of the broad-host-range cloning vector pBBR1MCS, carrying different antibiotic-resistance cassettes. Gene **166**:175-176.
  71. **Fernandez-Lopez R, Del Campo I, Revilla C, Cuevas A, de la Cruz F.** 2014. Negative feedback and transcriptional overshooting in a regulatory network for horizontal gene transfer. PLoS Genet **10**:e1004171.
  72. **Messer W.** 2002. The bacterial replication initiator DnaA. DnaA and *oriC*, the bacterial mode to initiate DNA replication. FEMS Microbiol Rev **26**:355-374.

73. **D'Arrigo I, Bojanovic K, Yang X, Holm Rau M, Long KS.** 2016. Genome-wide mapping of transcription start sites yields novel insights into the primary transcriptome of *Pseudomonas putida*. *Environ Microbiol* **18**:3466-3481.
74. **Lawley T, Wilkins BM.** 2004. Bacterial conjugation in Gram-negative Bacteria., p 203-226. *In* Funnel BEaP, G.J. (ed), *Plasmid biology*. ASM press, Washington, D.C.
75. **Yen KM, Gunsalus IC.** 1982. Plasmid gene organization: naphthalene/salicylate oxidation. *Proc Natl Acad Sci USA* **79**:874-878.
76. **Datsenko KA, Wanner BL.** 2000. One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**:6640-6645.
77. **Holcik M, Iyer VN.** 1996. A novel plasmid gene involved in bacteriophage PRD1 infection and conjugative host-range. *Plasmid* **35**:204-210.
78. **Holcik M, Iyer VN.** 1996. Structure and mode of action of *kikA*, a genetic region lethal to *Klebsiella oxytoca* and associated with conjugative antibiotic-resistance plasmids of the IncN group. *Plasmid* **35**:189-203.
79. **Fernandez-Lopez R, Garcillan-Barcia MP, Revilla C, Lazaro M, Vielva L, de la Cruz F.** 2006. Dynamics of the IncW genetic backbone imply general trends in conjugative plasmid evolution. *FEMS Microbiol Rev* **30**:942-966.
80. **Yano H, Miyakoshi M, Ohshima K, Tabata M, Nagata Y, Hattori M, Tsuda M.** 2010. Complete nucleotide sequence of TOL plasmid pDK1 provides evidence for evolutionary history of IncP-7 catabolic plasmids. *J Bacteriol* **192**:4337-4347.
81. **Stanier RFP, N. J., Palleroni Nj Fau - Doudoroff M, Doudoroff M.** 1966. The aerobic pseudomonads: a taxonomic study. *J Gen Microbiol* **43**:159-271.
82. **Newman LM, Wackett LP.** 1995. Purification and characterization of toluene 2-monooxygenase from *Burkholderia cepacia* G4. *Biochemistry* **34**:14066-14076.
83. **Wang H, Sun H, Wei D.** 2013. Discovery and characterization of a highly efficient enantioselective mandelonitrile hydrolase from *Burkholderia cenocepacia* J2315 by phylogeny-based enzymatic substrate specificity prediction. *BMC Biotechnol* **13**:14.
84. **Mukaihara T, Tamura N, Murata Y, Iwabuchi M.** 2004. Genetic screening of Hrp type III-related pathogenicity genes controlled by the HrpB transcriptional activator in *Ralstonia solanacearum*. *Mol Microbiol* **54**:863-875.
85. **Imai R, Nagata Y, Senoo K, Wada H, Fukuda M, Takagi M, Yano K.** 1989. Dehydrochlorination of gamma-hexachlorocyclohexane (gamma-BHC) by gamma-BHC-assimilating *Pseudomonas paucimobilis*. *Agric Biol Chem* **53**:2015 - 2017.



86. **Ito M, Prokop Z, Klvana M, Otsubo Y, Tsuda M, Damborsky J, Nagata Y.** 2007. Degradation of beta-hexachlorocyclohexane by haloalkane dehalogenase LinB from gamma-hexachlorocyclohexane-utilizing bacterium *Sphingobium sp.* MI1205. Arch Microbiol **188**:313-325.
87. **Tabata M, Ohhata S, Kawasumi T, Nikawadori Y, Kishida K, Sato T, Ohtsubo Y, Tsuda M, Nagata Y.** 2016. Complete genome sequence of a gamma-hexachlorocyclohexane degrader, *Sphingobium sp.* strain TKS, isolated from a gamma-hexachlorocyclohexane-degrading microbial community. Genome Announc **4**:e00247-00216.
88. **Meade HM, Long SR, Ruvkun GB, Brown SE, Ausubel FM.** 1982. Physical and genetic characterization of symbiotic and auxotrophic mutants of *Rhizobium meliloti* induced by transposon Tn5 mutagenesis. J Bacteriol **149**:114-122.
89. **Dennis JJ, Zylstra GJ.** 1998. Plasposons: modular self-cloning minitransposon derivatives for rapid genetic analysis of gram-negative bacterial genomes. Appl Environ Microbiol **64**:2710-2715.
90. **Tsuda M, Ohtsubo Y, Yano H.** 2014. Mobile catabolic genetic elements in pseudomonads, vol Springer, tokyo.
91. **Encinas D, Garcillan-Barcia MP, Santos-Merino M, Delaye L, Moya A, de la Cruz F.** 2014. Plasmid conjugation from *Proteobacteria* as evidence for the origin of xenologous genes in *Cyanobacteria*. J Bacteriol **196**:1551-1559.
92. **Shintani M, Matsui K, Inoue J, Hosoyama A, Ohji S, Yamazoe A, Nojiri H, Kimbara K, Ohkuma M.** 2014. Single-cell analyses revealed transfer ranges of IncP-1, IncP-7, and IncP-9 plasmids in a soil bacterial community. Appl Environ Microbiol **80**:138-145.

## 謝辞

東北大学生命科学研究科生態システム生命科学専攻遺伝情報動態分野 津田雅孝教授には本研究の遂行にあたり、素晴らしい研究環境と研究テーマを与えてくださると共に、厳しく、かつ暖かくご指導をくださいました。サイエンスの面白さを身に染みて感じることができました。深く感謝いたします。微生物進化機能開発分野 永田裕二教授には研究に限らず、生活面などにおいて素晴らしい御指導をいただき、常に暖かいご配慮をいただきました。特に食に関する指導は私の人生を豊かにしていただきました。心から感謝いたします。遺伝情報動態分野 大坪嘉行准教授には研究生活全般や遊びを通し、人生の先輩として良きアドバイスをくださいました。ご教えたアドバイスは今後の人生でも必ず役立つと確信しています。深く感謝申し上げます。微生物進化機能開発分野 加藤広海助教授には研究についての議論を幾度となくさせて頂き、より考えながら研究を進められることができました。心から感謝いたします。5年間という期間、4人の先生方のもとで楽しく研究を行うことができたことを幸せに思います。

本論文を御校覧頂き、最終試験の審査を勤めてくださいました東北大学大学院生命科学研究科生態システム生命科学専攻地圏共生遺伝生態分野 南澤究教授、並びに最終試験の審査を務めて下さいました同研究科 ゲノム継承システム分野 東谷篤教授に深く感謝申し上げます。

本研究の遂行にあたりご指導とご助言を下さいました多くの先輩方に心から感謝致します。特に井上慧博士、田端理朗博士、永山浩史博士、瀬谷学人氏には様々な実験手法に関するノウハウを教えていただき、私の実験の基礎となっております。心から感謝申し上げます。

同期生として研究生活を共にし、研究や私生活において刺激しあった佐藤拓哉氏、長縄英朗氏に心から感謝致します。これからも定期的に会い、お酒を飲みましょう。

研究室生活を明るく楽しいものにしてくれた多くの後輩と **Tim Lucas** に感謝致します。ソフトボール大会、ラボ旅行、芋煮など楽しい思い出がいっぱいです。

遠く離れているのも関わらず、仙台に遊びにきてくれたり、私が地元へ帰省時に楽しく飲んでくれた友人達に感謝いたします。みんなのおかげでメリハリのある研究生活を送ることができました。

最後に、本研究を進めるにあたり支えとなり常に暖かく見守ってくれた家族に深く感謝し、この論文の結びとさせていただきます。