



Title	好熱性細菌由来薬剤耐性プラスミドの複製制御に関する研究
Author(s)	阿野, 貴司
Citation	大阪大学, 1986, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://hdl.handle.net/11094/2816
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

好熱性細菌由来薬剤耐性プラスミドの
複製制御に関する研究

1986年1月

阿野貴司

目 次

緒 論	1
第1章 好熱性細菌由来薬剤耐性プラスミド pTB19 上の2種の複製決定因子	7
第1節 緒 言	7
第2節 実験材料および方法	8
第3節 結 果	19
1. 宿主菌の性質	19
2. pTB90 と pTB19 との比較	22
3. pTB90 の複製決定因子	24
4. 小型プラスミドの作製	27
5. pTB90 とその派生プラスミドによる <u>Bacillus stearothermophilus</u> の形質転換	29
6. プラスミドのコピー数	31
第4節 考 察	33
第5節 要 約	37
第2章 好熱性細菌における <u>in vitro</u> DNA 合成	39
第1節 緒 言	39
第2節 実験材料および方法	39
第3節 結 果	42
1. FI および FII 画分による DNA 合成活性	42
2. <u>in vitro</u> DNA 合成活性の性質	45
第4節 考 察	47

第5節	要約	48
第3章	<u>Bacillus</u> 属プラスミド pUB110dB, pRBH1, およびそのコピー数変異プラスミドの塩基配列	51
第1節	緒言	51
第2節	実験材料および方法	52
第3節	結果	55
	1. 小型プラスミドの作製	55
	2. pRBH1 および pUB110dB の塩基配列決定	56
	3. プラスミド DNA 依存 <u>in vitro</u> 蛋白質合成	59
	4. コピー数変異プラスミドのコピー数とその変異部位	60
第4節	考察	61
第5節	要約	63
第4章	<u>Bacillus</u> プラスミド pRBH1 の RepB 蛋白質による負のコピー数制御	65
第1節	緒言	65
第2節	実験材料および方法	66
第3節	結果	69
	1. ループ構造への一塩基置換導入によるコピー数の変化	69
	2. プロモーター活性の <u>in vivo</u> における検出	72
	3. Pl プロモーターからの転写の <u>in vivo</u> における阻害	74
第4節	考察	76

第5節 要約	81
総括と展望	83
参考文献	87

緒 論

生物体の基本的性質の一つは、自己複製能があり、親細胞の遺伝情報(DNA)が娘細胞に分配されることである。従って、DNA複製反応機構の解析は生命現象の理解における最重要課題の一つであると言えよう。一般にDNA複製は多数の複製因子の関与により正確かつ秩序正しく遂行される複合酵素反応であることが明らかになりつつあるが^(1,2)、その制御機構についての基本概念は Jacob, Brenner, Cuzin により 1963 年に提唱されたレプリコン仮説⁽³⁾に溯ることができる。レプリコン仮説とはDNA分子を1つの複製単位とし、正の調節因子(イニシエーター)が分子の特定部位(レプリケーター)に作用することによりDNA複製が行なわれるというものである。仮説の提唱によりDNA複製を解明するための基本構想がもたらされ、以後20年間現在に至るまで複製研究はイニシエーターおよびレプリケーターの実証という形で進んで来たといえる。現在、レプリケーターは自律的複製に必須な最小DNA領域(複製開始点)として捉えられ大腸菌染色体他ファージやプラスミドにおいて数多く決定されつつある^(1,2)。しかしイニシエーターについては限られたファージやプラスミドにおいてのみ知られており大腸菌染色体においてもいまだその実体は全て明らかにされていない。

次に大腸菌系を中心にファージやプラスミドなどの小型レプリコンについて得られたDNA複製に関する基礎概念について述べてみたい。DNA複製は(i)複製開始点で

の開始反応 (ii) 伸長反応 (iii) 終結反応 に便宜上区分できる。 DNA 複製の制御機構を明らかにする上で最も重要な段階は (i) の開始反応であり最も複雑かつ多様性のある反応である。 実際、その開始反応には新しい蛋白とRNAの合成を必要とするのに対し、一旦開始した後のDNA鎖の伸長反応は、ほぼ一定速度で自動的に進行する⁽¹⁾。 この複製開始反応はレプリコン仮説におけるイニシエーターがレプリケーターに作用する際の複合体とも言えるものでイニシエーターを構成する蛋白質の種類や数が、またレプリケーターの塩基配列がその多様性を生じさせる源と言えよう。 例えば、プラスミドにおいてはこの複製開始の頻度を調節することにより細胞内の分子数(染色体当りではコピー数)が一定に保たれている。 この様に複雑な複製開始反応を解析することができる様になったのは、従来からの遺伝的研究に加えて (i) 制限酵素の発見に端を発する組み換えDNA 技術の応用 (ii) DNAの一次構造(塩基配列)決定法の開発 (iii) in vitro DNA合成系に基づく複製の生化学的研究が加わり、それらが有機的に結びついた実験系を組むことが可能となったからである。

プラスミドは、宿主染色体とは物理的に別個に存在して自律増殖するレプリコンである。 プラスミドDNAの複製は宿主菌染色体とプラスミド自身の遺伝子産物によりそれぞれ固有の調節を受けているが、プラスミドは染色体と比較して分子量が小さく取り扱い易いのでDNA複製開始とその調節機構を解析するために非常に有効なモデル系となり得る。 従来、これらの研究は主に大腸菌を宿主とす

るプラスミド ColE1⁽⁴⁾, R6K⁽⁵⁾, RI⁽⁶⁾, CloDF13⁽⁷⁾, mini-RI⁽⁸⁾, RscII⁽⁸⁾, oriC プラスミド⁽⁹⁾, pSC101⁽²⁾, RSF1010⁽¹⁰⁾, RSF1030⁽¹¹⁾, λdv⁽¹²⁾等についてなされて来ており, in vitro DNA 合成系の確立を含め多大の知見が得られている。他の菌種については, Saccharomyces cerevisiae の 2 μm DNA⁽¹³⁾ や Staphylococcus aureus 由来のプラスミド pT181⁽¹⁴⁾ などであり, 後者はグラム陽性細菌のプラスミドとしては最も解析が進んでいる。この様なプラスミド DNA の複製に関する研究が, 工業的利用価値の高い Bacillus 属細菌⁽¹⁵⁾ においても行なうことができれば基礎的見地のみならず応用面においても非常に意義のあることである。

大腸菌の染色体からは oriC プラスミド⁽²⁾ が単離され in vitro DNA 複製系の確立による詳細な生化学的研究が成されているのに対し, 大腸菌に次いで最も遺伝的解析が進んでいる枯草菌からの oriC プラスミドの単離⁽¹⁶⁾ は成功していない。このことから, 大腸菌と枯草菌における DNA 複製様式の質的相違が示唆される。そこで枯草菌内で複製可能なプラスミドを用いてその複製制御機構を解析することは枯草菌内での DNA 複製のモデルとして有効であろう。また遺伝子操作による物質生産を行う際のベクタープラスミドについてその複製制御機構を解析すれば, プラスミドのコピー数の外部因子(培養条件)による調節の可否やその安定性の増加等に関する基礎的知見が得られ効率の高い物質生産に結びつく事が期待される。

現在まで枯草菌 (Bacillus subtilis) 内でベクターとして用いられているものは, その多くが S. aureus 由来のもので

あり、中でも pE194⁽¹⁷⁾、pC194⁽¹⁷⁾、pUB110⁽¹⁷⁾ が多用されている。しかしその DNA 複製に関しては、塩基配列の決定並びに遺伝解析が pE194^(18,19)、pC194^(20,21) に関してなされてはいるものの具体的な制御機構については未解明のままである。そこで本研究では自然界より単離された好熱性 Bacillus 属細菌が保持する薬剤耐性プラスミド pTB19⁽²²⁾ が Bacillus stearo-thermophilus のみならず B. subtilis をも形質転換可能な性質に着目しこれら Bacillus 属細菌内で複製可能なプラスミドの複製制御機構について基礎的知見を得ることを目的とした。

第1章では、pTB19 上に2種の DNA 複製決定因子 repA および repB が存在することを種々の派生プラスミドとの比較により明らかにした。このうち repA は B. subtilis 内でのみ複製したが、repB は B. subtilis、B. stearo-thermophilus 両宿主菌内において複製可能であることを認めた。pTB19 より得られた repB を含む小型プラスミド pTB90 には B. stearo-thermophilus の潜在性プラスミド pBSO2 に由来する 1.0 × カルトン [MDa] EcoRI 断片が含まれていた。この断片は B. stearo-thermophilus に対する形質転換頻度を著しく増大させると共に同宿主内におけるプラスミドのコピー数調節にも関与していることを明らかにした。

第2章では、repB を含むプラスミド pTB93 を保持する B. stearo-thermophilus を用いて in vitro DNA 複製系の開発を試みたが、ATP を要求する熱安定な DNA ポリメラーゼによる DNA 合成 (ポリ dAT) 活性を認めたものの複製系の開発には至らなかった。

第3章では、pTB913の複製必須領域について塩基配列の決定を行い、複製必須領域の基本構造とその特徴を明らかにした。更にpUB110についても複製必須領域の塩基配列を決定し、その配列がほとんどpTB913のものと同様であることを発見した。

第4章では、repBのコピー数調節に逆方向繰り返し配列が関与しており、さらにこの領域がプラスミド上の遺伝子産物による影響を受けることを示すとともに、repBプラスミドのコピー数調節機構について考察を行った。

最後に本研究の結果を総括し、今後解決されなければならない問題点とともに Bacillus 属細菌プラスミドの複製制御に関して将来への展望を述べた。

第1章 好熱性細菌由来薬剤耐性 プラスミド pTB19上の2種の 複製決定因子

第1節 緒言

自然界より単離された好熱性 Bacillus 属細菌が保持する薬剤耐性プラスミド pTB19 は、カナマイシン耐性 (Km^r) およびテトラサイクリン耐性 (Tc^r) を示す 17.2 MDa からなる低コピー数プラスミドで、常温菌 Bacillus subtilis および好熱菌 Bacillus stearothermophilus の双方を形質転換可能である^(22, 23)。pTB19 より得られた小型プラスミドの中には pTB90 の如く、B. subtilis および B. stearothermophilus 共に形質転換可能なものも存在したが、pTB53 の様に B. subtilis のみを形質転換するものも認められた⁽²³⁾。これら形質転換能の差異が何に起因するかを解明することは、常温菌および好熱菌におけるプラスミドの複製、維持に関与する制御系の共通点や相違点を検討する上での重要な糸口を与えるものと考えられる。この様なプラスミドの小型化に伴い宿主域が変化する現象は、グラム陰性菌の広宿主域プラスミド RK2 においても Escherichia coli と Pseudomonas aeruginosa の間において認められており⁽²⁴⁾、プラスミドの進化、環境への適応等を考える上で興味を持たれている。本研究では、pTB19 に由来する小型プラスミドの DNA 複製に必須な部位の同定、また pTB90 を中心として、その小型プ

ラスミドの *B. subtilis* および *B. stearothermophilus* における性質の比較・検討を行った。

第2節 実験材料および方法

使用菌株およびプラスミド

使用した菌株とプラスミドのリストを表1-1に示す。

表1-1. 使用菌株およびプラスミド

Strain	Characteristics ^a	Origin or reference
<i>B. stearothermophilus</i> CU21	Sm ^r	(23)
<i>B. subtilis</i> MI113	<i>arg-15 trpC2</i> r _M ⁻ m _M ⁻	(22)

Plasmid	Mol. wt. (MDa)	Characteristics	Origin or reference
pTB19	17.2	Km ^r Tc ^r	(22)
pTB51	8.4	Km ^r	(22)
pTB52	7.0	Tc ^r	(22)
pTB53	11.2	Km ^r Tc ^r	(22)
pTB90	6.7	Km ^r Tc ^r	(23)
pBS02	19.5	-	This work

^a Sm^r: ストレプトマイシン耐性

B. stearothermophilus CU21 株は，元株が保持する潜在性プラスミド pBS01 を除去した菌株で形質転換の宿主として用いた。また CU21 株の中に低頻度ながらもプラスミド保持株が認められたので，このプラスミドを pBS02 とした。詳細については後述する。

好熱性 Bacillus 属細菌由来の pTB19 および，その派生プラスミドである pTB51, pTB52, pTB53, pTB90 を基本プラスミドとして用いた。これらプラスミドの制限酵素切断点地図を図1-1 に示す。

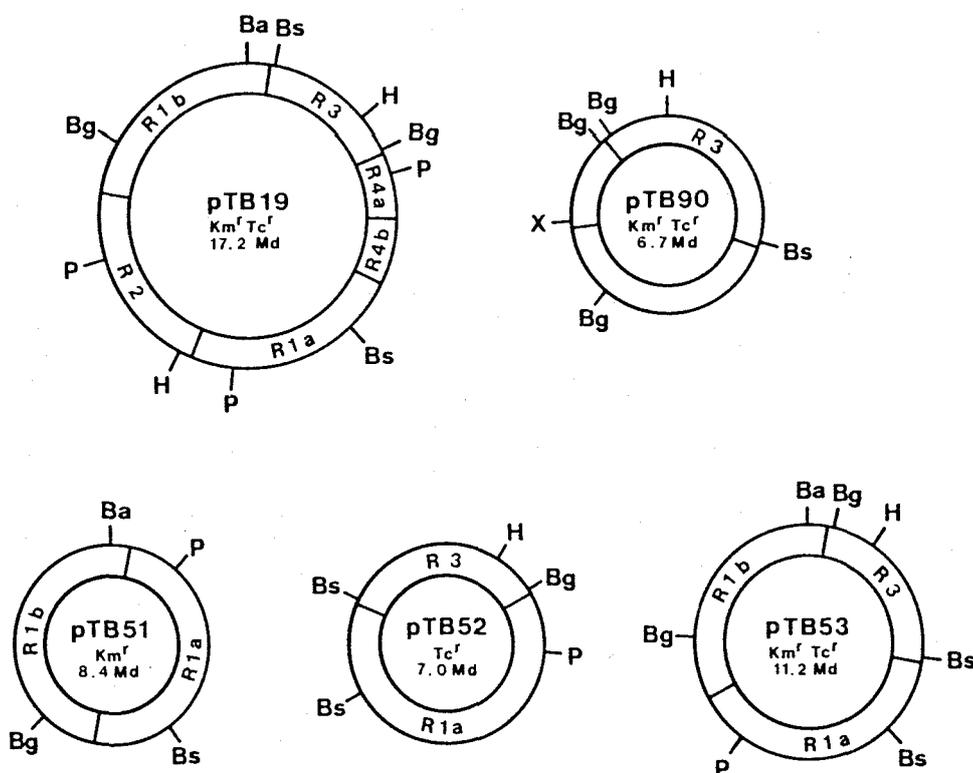


図1-1. pTB19 およびこれに由来する小型プラスミドの制限酵素切断点地図⁽²⁵⁾。各 EcoRI 断片を円内に示した。また，Ba, Bg, Bs, P, H, X は，それぞれ BamHI, BglII, BstEII, PstI, HindIII, XbaI 切断点を表わす。

培地および緩衝液

培養は全てL培地(トリプトン 10g, 酵母エキス 5g, NaCl 5g/l [pH7.3])を基本培地として行った。B. subtilisの場合は寒天1.5%を含有するものを,B. stearothermophilusに対しては寒天2.0%を含有するものを,それぞれ固形培地として用いた。L培地にグルコース(2.5g/l)を添加したものをLG培地, LG培地に0.15Mスクロースを加えたものをLGS培地として用いた。0.33Mスクロース, 0.02M $MgCl_2$ (別殺菌), 0.02M マレイン酸溶液 [pH6.5]をSMM緩衝液として用いた。SMM-LG培地は, 2倍濃度のSMM緩衝液およびLG培地を等量混合することにより調製した。B. stearothermophilusのプロトプラストの再生にはRGA寒天培地とRGTA寒天培地(上層用軟寒天)を用いた。RGA寒天培地 [pH7.3]は, ①700mlの2.86% [wt/vol]寒天, 1.43%トリプトン, 0.71%酵母エキス, 0.71% NaCl, ②200mlの1Mスクロース, ③50mlの7% K_2HPO_4 , 3% KH_2PO_4 , ④20mlの25%グルコース, ⑤10mlの1% カザミノ酸, ⑥10mlの2M $MgCl_2$, ⑦10mlの2%牛血清アルブミン(BSA)(フィルター [Millipore HA, 孔径 0.45 μm] で除菌)をそれぞれ滅菌後, 混合して調製した。RGTA寒天培地の場合には, ①の寒天濃度を0.857%に変更した。

DNAの調製

染色体DNAはImanakaら⁽²⁶⁾の方法に従い, リゾチーム処理後得られたザルコシル溶菌液について塩化セシウム

エチジウムブロミド平衡密度勾配超遠心を行い精製した。

プラスミド DNA の検出は、 Birnboim と Doly⁽²⁷⁾ のアルカリ抽出法を一部変更して以下の様に行った。 薬剤を含む L 培地 (5 ml) 中で 55 °C にて約 16 h 培養した B. stearo-thermophilus 培養液 1.5 ml (B. subtilis は 37 °C 培養液 0.5 ml) を、エッペンドルフ遠心管に移して遠心集菌し、得られた菌体を 100 μ l の 25 mM Tris-HCl [pH 8.0], 10 mM エチレンジアミン四酢酸ナトリウム塩 (EDTA), 50 mM グルコース, 1 mg/ml リゾチーム溶液に懸濁し、水中 30 min 静置した (B. subtilis は 5 mg/ml リゾチーム溶液に懸濁し、37 °C で 30 min 処理を行った後、0 °C で 5 min 保持した)。次に 0.1 N NaOH-1% SDS 溶液 200 μ l を加えて混合した。水中で 5 分間保った後 3 M 酢酸ナトリウム [pH 4.8] を 150 μ l 加えて混合後、水中で 1 h 静置後、10,000 \times g, 7 min 遠心分離を行った。遠心上澄液約 0.4 ml を別のエッペンドルフ遠心管に移し、これに冷エタノール 1 ml を加えて、-20 °C で 30 min 保った後 10,000 \times g, 5 min の遠心により DNA を沈殿区分に集めた。得られた DNA を、50 mM Tris-HCl [pH 8.0], 100 mM 酢酸ナトリウム溶液 100 μ l に溶解させた後、200 μ l の冷エタノールを添加して -20 °C に 10 min 保ち、遠心分離 (10,000 \times g, 5 min) によって再び DNA 沈殿を集め、エタノールリンスの後真空乾燥した。これを 100 μ g/ml リボヌクレアーゼ A (RNase A) を含む 35 μ l の TE 緩衝液 (10 mM Tris-HCl [pH 7.5], 0.1 mM EDTA) に溶解した。

プラスミド DNA を大量に調製する場合にも、アルカリ抽

出法をスケールアップして用い、得られた DNA 画分を塩化セシウム-エチジウムブロミド平衡密度勾配超遠心を行い精製した後、4°C で保存した。

Bacillus subtilis の形質転換

B. subtilis MI113 (arg-15 trpC2 $r_{H}^{-} m_{M}^{-}$) の competent cell は、Anagnostopoulos と Spizizen⁽²³⁾ の方法に従って調製した。5 ml の L 培地中 37°C で一夜培養した培養液 1 ml を、第 1 増殖培地 (K₂HPO₄ 14 g, KH₂PO₄ 6 g, (NH₄)₂SO₄ 2 g, クエン酸ナトリウム 1 g, グルコース 5 g, MgSO₄·7H₂O 0.2 g, L-アルギニン 50 mg, L-トリプトファン 50 mg, カザミノ酸 0.2 g/l) 20 ml に植菌し、37°C で培養した。対数増殖期をはずれてから 1 h 後に、その 4 ml を 36 ml の第 2 増殖培地 (K₂HPO₄ 14 g, KH₂PO₄ 6 g, (NH₄)₂SO₄ 2 g, クエン酸ナトリウム 1 g, グルコース 5 g, MgSO₄·7H₂O 0.2 g, L-アルギニン 5 mg, L-トリプトファン 5 mg, カザミノ酸 0.1 g/l) に植菌し、更に 1.5 h 培養することにより competent cell を得た。Competent cell 1 ml と DNA (約 1 μg) を混合した後、30 min 振盪し、5,000 × g, 5 min の遠心により菌体を集めた。これを 3 ml の L 培地に再懸濁し、37°C で 2 h 振盪培養を行った。この培養液を薬剤 (Km 5 μg/ml または Tc 25 μg/ml) を含む L 寒天培地に塗布し形質転換株を得た。

Bacillus stearothermophilus の形質転換

プラスミド DNA による B. stearothermophilus の形質転換

は、Imanakaら⁽²³⁾の方法に従いプロトプラスト法により行った。

i) プロトプラストの調製

B. stearothermophilus CU21 を L 培地中 55°C で一夜前培養し、その 0.5 ml を 50 ml の LGS 培地に加え 55°C にて振盪培養を行った。OD₆₆₀ の値が 0.4 付近になった時点で遠心集菌し (8,000 × g, 5 min, 4°C), 2 ml の SMM-LG 培地に再懸濁した。SMM-LG 培地に溶解したリゾチーム溶液 (50 μg/ml) を終濃度 1 μg/ml とする様に加え、48°C で約 20 min 穏やかに振盪した。プロトプラスト化の進行状況は、適宜顕微鏡観察で追跡した。生じたプロトプラストを 4,000 × g, 7 min (4°C) の遠心により回収し、2 ml の SMM-LG 培地で洗浄後、再度遠心分離した。これに 2 ml の SMM-LG 培地を加えてプロトプラスト懸濁液とした。

ii) ポリエチレングリコール処理

約 1 μg のプラスミド DNA を含む TE 緩衝液に等量の 2 倍濃度 SMM 緩衝液を加えた。これに 0.5 ml のプロトプラスト懸濁液 (48°C で保温) を添加後、1.5 ml の 40% ポリエチレングリコール 6,000 (PEG) を含む SMM 緩衝液 (48°C) を加えて、48°C で 2 min ゆっくりと振盪した。これに 5 ml の SMM-LG 培地 (48°C) を加え PEG を希釈し、4,000 × g, 10 min (4°C) の遠心によりプロトプラストを回収した。これを 0.01% BSA を含む SMM-LG 培地 1 ml に再懸濁し、48°C 1.5 h のゆるやかな振盪培養を行った。

iii) プロトプラストの再生

プロトプラスト試料を 0.01% BSA を含む SMM-LG 培地 (48 °C) で適当に希釈後, その 0.1 ml と 50 °C で保温した RGTA 寒天培地 3 ml を RGA 寒天培地に重層した。形質転換株を選択する場合には, RGA, RGTA 共に薬剤を添加した。選択濃度は Km 25 µg/ml, Tc 5 µg/ml とした。また再生培地を 48 °C で 5 日間保温した後に形質転換頻度を算出した。

制限酵素処理によるプラスミド DNA の切断

EcoRI, XbaI で切断する場合は, 50 mM Tris-HCl [pH7.4], 10 mM MgSO₄, 100 mM NaCl 溶液を, BglII, HindIII, BstEII では 10 mM Tris-HCl [pH7.4], 10 mM MgSO₄, 50 mM NaCl, 1 mM ジチオスレイトール (DTT) 溶液をそれぞれ用い 37 °C で 2 h (BstEII は 60 °C で 2 h) 反応させた。

小型プラスミドの作製

プラスミド DNA を EcoRI で切断後, エタノール沈殿により回収し, これを 66 mM Tris-HCl [pH7.6], 6.6 mM MgCl₂, 10 mM DTT, 0.5 mM ATP 溶液に溶解後 T4 DNA リガーゼ (0.1 単位) を添加し 8 °C 16 h 反応させた。この反応液を用いて B. subtilis MI113 の形質転換を行った。

アガロースゲル電気泳動

電気泳動は 0.7, 1.0% [wt/vol] アガロースを含む水平式スラブゲルを用いて行った。電気泳動用緩衝液として,

40 mM Tris, 20 mM 酢酸ナトリウム, 1 mM EDTA, 0.5 mg/l エチジウムブロミド [酢酸にて pH 8.0 に調整] を用いた。DNA 試料に色素溶液 (100 mM EDTA, 60 % [wt/vol] スクロース, 0.01 % ブロムフェノールブルー) を 1/5 量加え, これをアガロースゲル試料口に添加後, 1~2 V/cm の定電圧で約 12 h 電気泳動を行った。また λ CI857S7 DNA の HindIII 分解物を分子量マーカーとして用いた。

ニクトランスレーション

Amersham のニクトランスレーションキット (PB. 5025) を用いてニクトランスレーションを行いプローブを得た。

Southern 法

Maniatis⁽²⁹⁾ の方法に従い DNA のニトロセルロースフィルターへの移行およびプローブとのハイブリダイゼーションを行った。

i) DNA 断片のフィルターへの移行

各 DNA を制限酵素処理後, 電気泳動にかけゲルを切り出し写真撮影の後 0.5 N NaOH, 1.5 M NaCl 中で 20 min アルカリ変性を行った。次に 0.5 N Tris-HCl [pH 7.5], 1.5 M NaCl 中で 40 min 中和反応を行った後, 通常の方法に従ってニトロセルロースフィルター (Schleicher & Schuell BA85) 上に DNA をゲルから移行させた。真空デシケーター中にて 80 °C 2 h DNA のフィルター上での固定を行った。

ii) ハイブリダイゼーション

ビニル袋中にフィルターとプレハイブリダイゼーション緩衝

液 (6x SSC, 0.5% SDS, 5x Denhardt 溶液, 100 µg/ml 熱変性サケ精子 DNA (100°C 10 min 加熱後急冷した)) を入れ 68°C にて 2~4 h 保った。次にプローブを含むハイブリダイゼーション緩衝液 (6x SSC, 0.01 M EDTA, 5x Denhardt 溶液, 0.5% SDS, 100 µg/ml 熱変性サケ精子 DNA) と交換後 68°C にて 4~5 h 保った。フィルターを 2x SSC, 0.5% SDS 中で 5 min, 2x SSC, 0.1% SDS 中で 68°C 2 h の洗浄を 2 度行ったのち フィルターの水分をとりオートラジオグラフィーにかけた。なお SSC (0.15 M NaCl, 0.01 M クエン酸ナトリウム) および Denhardt 溶液 (Ficoll 0.2g, ポリビニルピロリドン 0.2g, BSA 0.2g/l) は, それぞれ 20 倍濃度, 50 倍濃度のものを調製し適宜希釈して用いた。

コピー数の推定

プラスミドのコピー数推定は, Kieser ら⁽³⁰⁾の方法を改変して以下の様に行った。まず, プラスミドを保持する B. stearothermophilus を薬剤 (Km 5 µg/ml または Tc 1 µg/ml (B. subtilis の場合は Km 5 µg/ml または Tc 25 µg/ml)) 含有 L 培地で 55°C (B. subtilis は 37°C) 一夜前培養し, この培養液 0.4 ml を 20 ml L 培地に加え OD₆₆₀ が約 0.4 になるまで培養を行った。3~6 OD 分を遠心集菌後, 1 mM EDTA を含む 50 mM Tris-HCl [pH 8.5] 緩衝液で洗浄後 1 ml の 50 mM Tris-HCl [pH 8.5], 50 mM EDTA, 15% スクロース, 1 mg/ml リゾチーム (B. subtilis の場合は 5 mg/ml) に懸濁し 0°C 30 min (B. subtilis の場合は 37°C 30 min) 保った。1 ml の 50 mM Tris-HCl [pH 8.5], 50 mM EDTA, 1% ギャルコシルを加

えることにより溶菌を起こした後 70℃で 5min 保った。
冷却後、フェノール抽出およびクロホルム抽出を行い水層中の DNA をエタノール沈殿後、14% スクロース、10mM EDTA、100 μg/ml RNaseA、0.1% フロムフェノールブルー からなる色素溶液で段階的に希釈し 37℃ にて 1h 保った。これらサンプルを 0.7% アガロースゲル電気泳動にかけた後、短波長 UV 照射を行いエチジウムブロミド (1 μg/ml) 溶液中で 1h 染色した。ゲルを水洗後ポラロイド、タイプ 665 フィルムを用い写真撮影後、ネガフィルムをデンシトメーター (Shimazu, PC 910) でスキャンすることにより染色体とプラスミドのピーク面積を求めた。DNA 量とデンシトメーターのピーク面積が比例関係に在る範囲内において染色体とプラスミドの DNA 量の比を求めることによりプラスミドのコピー数を推定した。なお *B. stearothermophilus* と *B. subtilis* の染色体 DNA の分子量は、いずれも 2.0×10^9 ダルトンとした⁽²³⁾。

プラスミドの安定性試験

プラスミドの安定性の測定は、Imanaka ら⁽²³⁾の方法に従って行った。プラスミドを保持する *B. stearothermophilus* を薬剤 (Km [5 μg/ml] または Tc [3 μg/ml]) を含む LG 寒天培地上で 48℃ にてコロニーを形成させた。生じた単一コロニーより同じ薬剤 (Tc は 1 μg/ml) を含む 20 ml の L 培地に植菌し、48℃ で約 10h 前培養を行った。これを LG 培地 (48℃) で希釈し、生菌数が約 100/ml となる様に 20 ml の LG 培地に加えて、一定温度 (55℃) で約 20 世代増殖させた後、LG 寒天培地上 48℃ でコロニーを形成

させた。100個の単一コロニーについて、種々の薬剤含有LG寒天培地にレプリカ後48℃で一夜保温し、薬剤耐性コロニー（プラスミド保持菌）を計数した。

膜結合実験

Sueokaら⁽³¹⁾の方法を改変しDNA断片と膜画分との in vitro における結合実験を行った。

i) 膜画分の調製

プロトプラストを調製（前述）した後に蒸留水中で激しく攪拌することにより破裂させ、遠心（30,000×g, 30 min）により集めた沈殿をTKE緩衝液（0.02 M Tris-HCl [pH 8.0], 0.06 M KCl, 0.001 M EDTA）に懸濁することにより B. stearothermophilus 膜画分⁽³²⁾を調製した。

ii) DNA断片と膜画分との結合

膜画分（0.2 ml）を48℃・10 minの予備保温の後、³²Pにより標識したDNA断片5μlを加え更に5 min保った。次に37℃にて20 min保温し水中で冷却した。この試料をスクロース密度勾配（64%のクッションの上に5~20%の勾配を持ち予備冷却したもの）上へのせ、日立RPS50ローターを用い33,000 rpm 30 minの遠心を行った後、約0.15 mlずつ分画した。各画分の放射能を測定し遠心管の底に近い画分に生じたピークを膜結合画分とした。

iii) 膜結合DNA断片の解析

膜結合画分を集め等量のTKE緩衝液を加え、同体積の水飽和フェールと1/10体積の10% SDS溶液を加えた。室温遠心の後生じた水層を取り1μgのtRNAと1/10体積の

3M 酢酸ナトリウムを加えた後エタノール沈殿を行いDNA断片を回収した。TE緩衝液に溶解の後、0.7% アガロースゲル電気泳動あるいは0.5% アガロースを含む3% ポリアクリルアミドゲル電気泳動を行い乾燥の後オートラジオグラフィーを行い、膜に結合したDNA断片を調べた。

第3節 結果

1. 宿主菌の性質

B. stearothermophilus IFO 12550 (ATCC 12980)より自然突然変異により得られたストレプトマイシン耐性株 S1 は、プラスミド pBS01 (18.3 MDa) を保持しているが、この派生株 CU21 株は pBS01 がプラスミド状態としては検出されなかった⁽²³⁾。しかしながら CU21 株よりプラスミドを保持するものが低頻度ながら生じることがわかったため、このプラスミドを pBS02 (19.5 MDa) とし pBS01 との比較を行った。pBS01, pBS02 の両プラスミドを塩化セシウム-エチジウムブロミド平衡密度勾配超遠心により調製した後に、EcoRI, HindIII, BamHI, SalI 処理を行った結果、それぞれ 8, 7, 4, 2 断片に切断を受けた。pBS02 の切断様式は図1-2 および図1-3 に1例を示す様に pBS01 のものと非常に類似していた。このことから pBS02 が CU21 株の染色体上に組み込まれていたことが示唆

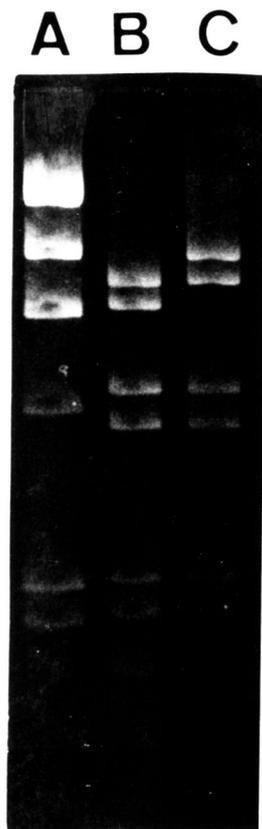


図1-2. プラスミドの制限酵素による比較⁽²⁵⁾。A, λ I857S7の HindIII 分解物 (分子量マーカー); B, pBSO1 (EcoRI 処理); C, pBSO2 (EcoRI 処理)。

されたので、pBSO2 をプローブとして Southern 法により解析を行った。プラスミドの検出されない CU21 株より塩化セシウム-エチジウムブロミド平衡密度勾配超遠心により調製した染色体 DNA を EcoRI で切断後アガロースゲル電気泳動にかけた。DNA バンドをニトロセルロースのフィルターに移行後、³²P でラベルした pBSO2 とのハイブリダイゼーションを行った。この結果 pBSO2 は CU21

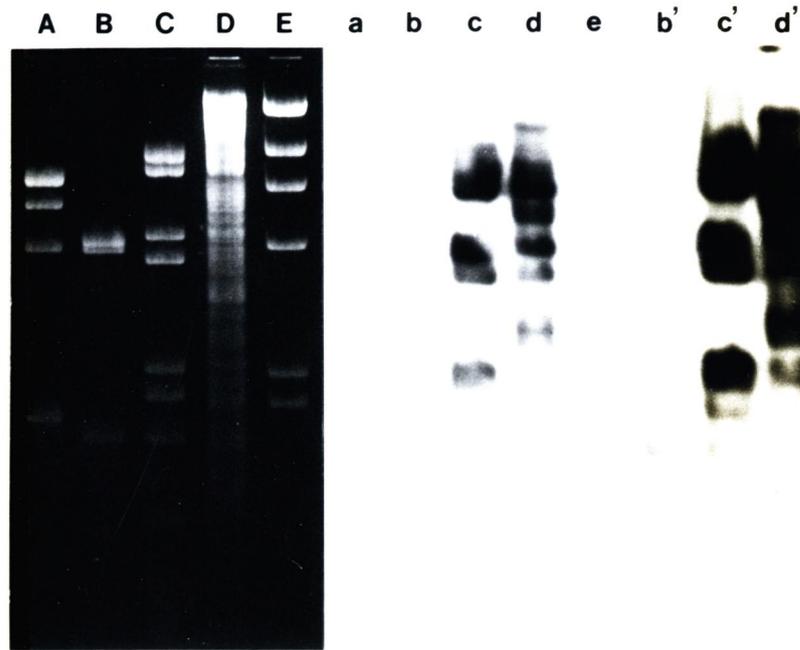


図1-3. Southern ハイブリダイゼーション⁽²⁵⁾。EcoRI 処理を行ったプラスミドをアガロースゲル電気泳動 (A~E) 後, ニトロセルロースフィルターに移行し ³²P で標識した pBSO2 とのハイブリダイゼーションを行った (a~e; b'~d' は感光時間を長くしたもの)。A, a, pTB19; B, b, b', pTB90; C, c, c', pBSO2; D, d, d', CU21 株染色体 DNA; E, e, λ cI857S7 の HindIII 分解物。

株の染色体とハイブリダイズ"することが示された (図1-3, D, d, d')。このことから pBSO2 は CU21 株の染色体上に組込まれて存在することが明らかになった。この様にプラスミド DNA が宿主染色体に組込まれる現象は B. subtilis (pE194) についても報告されている⁽³³⁾。

形質転換実験のさいには, pBSO2 がプラスミド状態として存在していない菌株を宿主として用いることにした。

2. pTB90 と pTB19 との比較

薬剤耐性プラスミド pTB19 は自然界より単離された好熱性細菌が保持するプラスミドで Km^r , Tc^r を有する 17.2 MDa からなるプラスミドで B. subtilis, B. stearothermophilus 共に形質転換可能である⁽²³⁾。この pTB19 を EcoRI-T4 DNA リガーゼ処理することにより B. subtilis 内で、小型プラスミド pTB51 (Km^r), pTB52 (Tc^r), pTB53 (Km^r Tc^r) が得られている⁽²²⁾ (図1-1)。これらのプラスミドの各 EcoRI 断片と pTB19 の EcoRI 断片とを比較することにより EcoRI 断片 R1a, R1b, R3 上にそれぞれ DNA 複製, Km^r , Tc^r がコードされていることが知られている⁽²²⁾。しかし、これら小型プラスミドは B. stearothermophilus を形質転換することはできなかつた⁽²³⁾。一方、同様の手法により B. stearothermophilus CU21 株内で得られた小型プラスミド pTB90 の場合 B. subtilis, B. stearothermophilus 共に形質転換可能であった。pTB90 は3つの EcoRI 断片 (2.9, 2.8, 1.0 MDa) からなるが、 Tc^r を担う 2.8MDa 断片のみが pTB19 の R3 断片と直接の対応がつくものの、2.9MDa および 1.0 MDa 断片は pTB19 上に認められなかつた⁽²³⁾。そこで pTB90 と pTB19 との対応関係を調べる為に、pTB90 をプローブとして Southern ハイブリダイゼーションを行った。pTB19 を EcoRI 処理後アガロースゲル電気泳動にかけ、ニトロセルロースフィルターに移行後、プローブの pTB90 とハイブリダイズさせた所、pTB90 は pTB19 の EcoRI 断片 R1, R2, R3 とハイブリダイズすることが認められた (図1-4, A, a)。R1 は R1a, R1b という

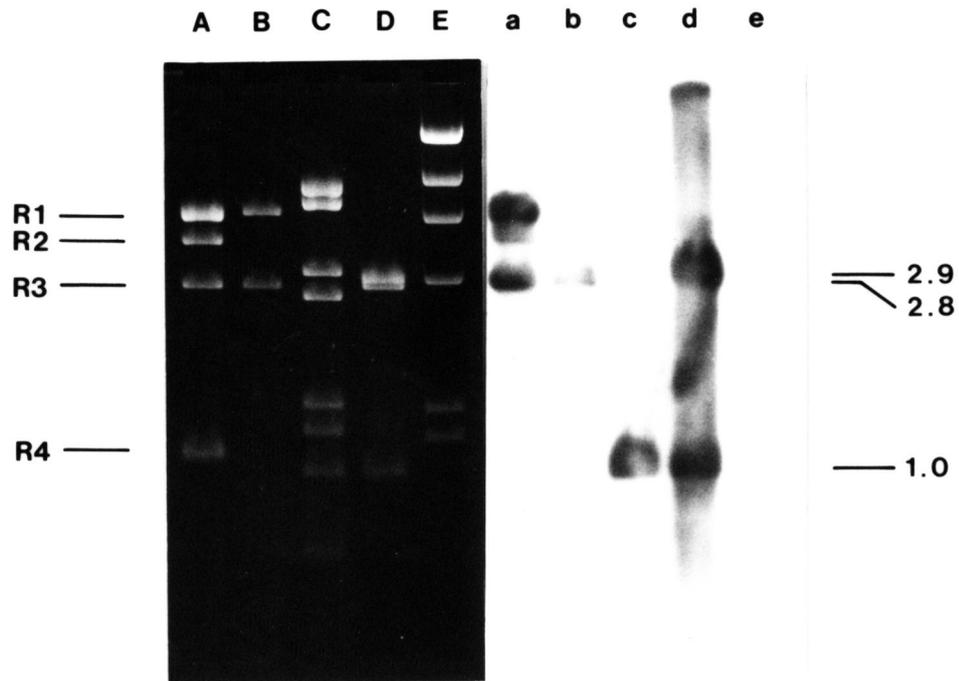


図1-4. Southern ハイブリダイゼーション⁽²³⁾. *EcoRI* 処理を行ったプラスミドをアガロースゲル電気泳動 (A~E) 後, ニトロセルロースフィルターに移行し³²Pで標識した pTB90 とのハイブリダイゼーションを行った (a~e)。A, a, pTB19; B, b, pTB52; C, c, pBS02; D, d, pTB90; E, e, λ CI 857S7 の *HindIII* 分解物。R1 から R4 までは pTB19 の *EcoRI* 断片 (図1-1) を示す。また右側の数字は対応する DNA の分子量 (MDa) を表す。

同じ大きさの断片よりなるので両者を区別するために, R1a および R3 断片からなるプラスミド pTB52 と pTB90 の比較を Southern 法により行った。この結果, pTB90 は R3 断片とのみハイブリダイズすることが認められた (図1-4, B, b)。以上のことから pTB90 は, pTB19 の *EcoRI* 断片 R1b, R2, R3 とハイブリダイズすることが示された。

pTB90 の 1.0 MDa EcoRI 断片は XbaI により 1ヶ所切断を受けるが, pTB19 は XbaI により切断されない⁽²³⁾(図1-1)。このことは pTB90 の 1.0 MDa 断片は pTB19 に由来しないことを意味する。一方, pBS02 には 1.0 MDa 程度の EcoRI 断片が存在し XbaI 切断点を持つことが制限酵素解析により示された。このことから pTB90 の 1.0 MDa EcoRI 断片は pBS02 由来であることが示唆されたので, pBS02 をプローブとして pTB19, pTB90 との比較を行った。この結果 pBS02 は pTB19 とは全くハイブリダイズせず, pTB90 の 1.0 MDa EcoRI 断片とのみハイブリダイズすることが認められた(図1-3, A, a, B, b, b')。また逆に pTB90 をプローブとした場合にも pTB90 は pBS02 の 1.0 MDa EcoRI 断片とのみハイブリダイズした(図1-4, C, c)。以上のことから, pTB90 を構成する3つの EcoRI 断片のうち 2.8 MDa および 1.0 MDa 断片はそれぞれ pTB19 の R3 断片, pBS02 の 1.0 MDa EcoRI 断片由来であることが示された。従って 2.9 MDa 断片は pTB19 の R1b および R2 断片の一部よりなることがわかった。

3. pTB90 の複製決定因子

プラスミド pTB19 の自律的複製に関する遺伝子は, EcoRI 断片 R1a 上に存在することが既に報告されている⁽²²⁾。しかし, pTB19 とのハイブリダイゼーションの結果 pTB90 には pTB19 の R1a 断片は全く含まれていないことが示された。

このことは pTB90 には、R1a 上に存在する複製決定因子とは別のものが含まれていることを意味している。pTB90 の 2.9 MDa EcoRI 断片は pTB19 の R1b, R2 断片からなっていることがハイブリダイゼーションの結果示されたが、この断片はそれ自身で自律複製可能である(後述)。R1b 断片上には Km^r がコードされているので⁽²²⁾、pTB90 の複製決定因子は R2 断片上に存在するものと考えられる。また、R2, R1b 断片は pTB19 上で隣接している(図1-1)ので pTB90 の 2.9 MDa EcoRI 断片は、R2, R1b 断片の欠失により生じた可能性が考えられる。実際 pTB19 を保持する B. stearrowthermophilus を Km 存在下で培養後プラスミド DNA を抽出し、この DNA を用いて B. subtilis を形質転換した所 $Km^r Tc^s$ という形質を示す株が得られた。この形質を示す株からプラスミド DNA を抽出し EcoRI 処理の後アガロースゲル電気泳動を行った所、全て 2.9 MDa に相当する単一のバンドを示した。また、EcoRI と BglII あるいは HincII による2重処理による切断様式も pTB90 の 2.9 MDa EcoRI 断片のものと一致した。

これらの事からこの欠失プラスミドは pTB90 の 2.9 MDa EcoRI 断片と同一のものであると考えられ、pTB913 と命名された。以上の結果より pTB19 の R2 断片上に第2の複製決定因子が存在することが示され、pTB19 上には2つの複製決定因子がそれぞれ R1a および R2 上に存在することが明らかとなった。そこで pTB19 の R1a 断片上に存在する複製決定因子を repA, R2 上に存在するものを repB と命名した。以上のことから pTB90 は B. stearrowthermophilus

より調製された pTB19 と、この中に微量ながらも含まれていた pTB913, pBSO2 が *in vitro* において EcoRI-T4DNAリガーゼ処理を受けた結果、生成したプラスミドであり、このために pTB19 の repB が pTB90 に含まれていると考えられた(図1-5)。

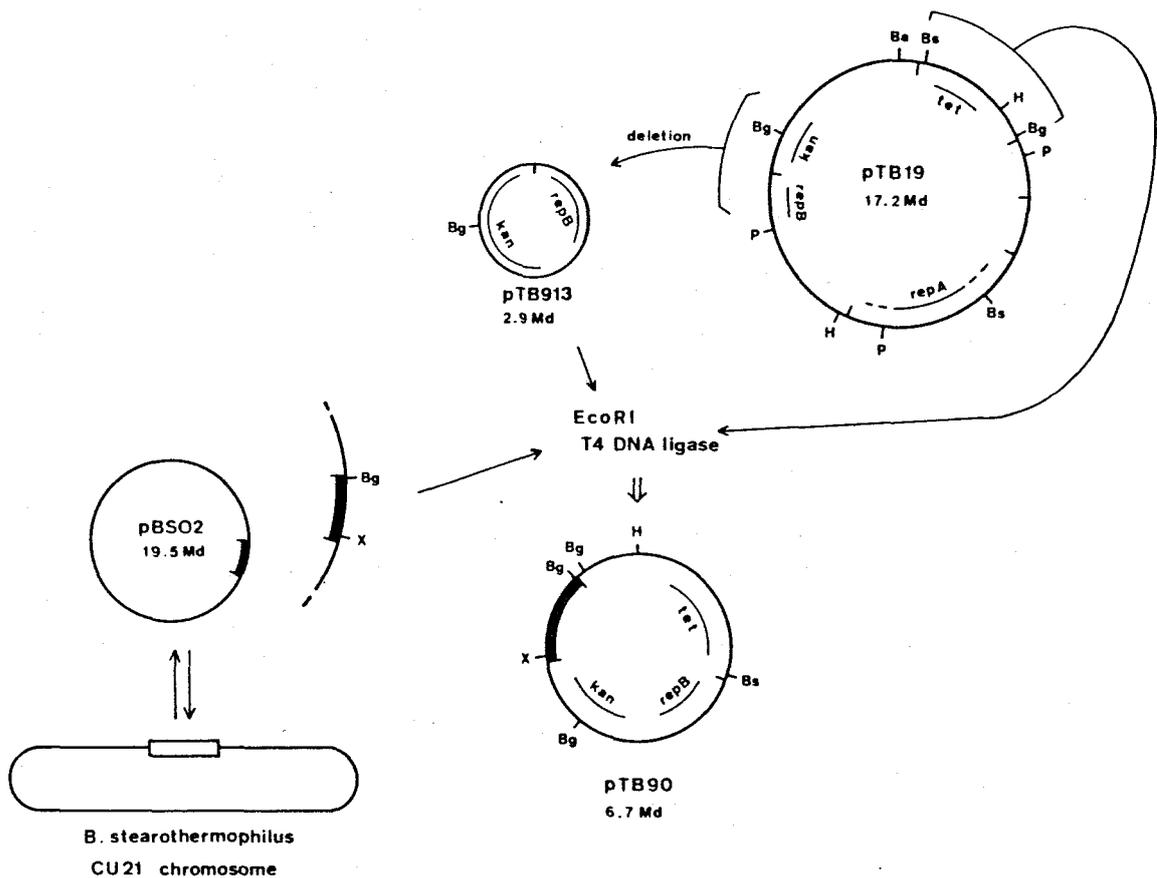


図1-5. pTB90 の各 EcoRI 断片の由来⁽²⁵⁾。pTB90 を構成する3つの EcoRI 断片 (2.9, 2.8, 1.0 MDa) がそれぞれ pTB913, pTB19, pBSO2 由来であることを示す。円内の切断点は EcoRI 部位を示す。また BamHI, BglII, BstEII, PstI, HindIII, XbaI 切断点はそれぞれ Ba, Bg, Bs, P, H, X で示した。黒塗りの部分は 1.0 MDa EcoRI 断片に相当する。

4. 小型プラスミドの作製

B. subtilis 内で得られた pTB19 の小型プラスミド pTB51, pTB52, pTB53 はいずれも B. stearothermophilus を形質転換することができなかった⁽²³⁾。一方 B. stearothermophilus 内で得られた小型プラスミド pTB90 は B. subtilis および B. stearothermophilus 共に形質転換可能であったが, pBS02 由来の 1.0 MDa EcoRI 断片を含むことが示された。このことから pTB90 の 1.0 MDa EcoRI 断片が B. stearothermophilus の形質転換, あるいは同菌内におけるプラスミドの複製, 維持に関して重要な役割を担っているのではないかと考えられた。そこで, この 1.0 MDa EcoRI 断片の B. stearothermophilus 内での役割を調べるために種々の欠失プラスミドを作製した。先ず, pTB90 を EcoRI-T4DNAリガーゼ処理後, B. subtilis M113 を形質転換した。その結果, $K_m^r T_c^s$, $K_m^r T_c^r$ を示す形質転換株が得られたが $K_m^s T_c^r$ を示す株は得られなかった。 $K_m^r T_c^s$ を示す株からプラスミド DNA を単離し EcoRI 処理の後アガロースゲル電気泳動により解析した。その結果 2.9 MDa EcoRI 断片のみからなる pTB913 と, 2.9 MDa と 1.0 MDa EcoRI 断片からなる分子量の大きいプラスミドが認められ, 後者を pTB919 と命名した。 $K_m^r T_c^r$ を示す株からは 2.9 MDa, 2.8 MDa 両 EcoRI 断片からなるプラスミドが 2 種得られその断片の組込み方向の違いにより, それぞれ pTB914, pTB916 とした (図 1-6)。また pTB916 からは T_c^r を示す欠失プラスミドが生じ pTB902 としたが, pTB914 からはこのような欠失プラスミドは生じなかった。更に

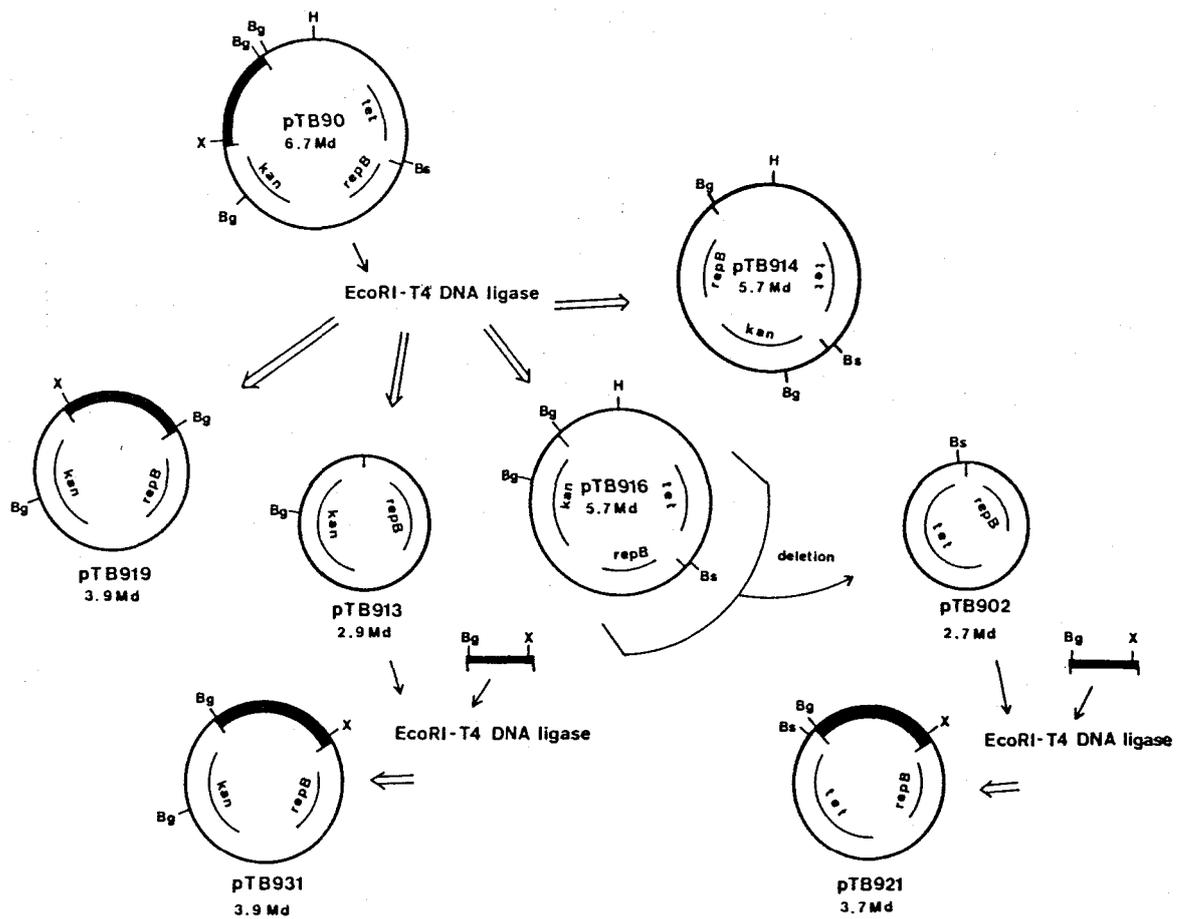


図1-6. pTB90およびこれに由来する小型プラスミドの作製と制限酵素切断点地図⁽²⁵⁾。BgII, Bs+EII, HindIII, XbaI切断点はそれぞれBg, Bs, H, Xで示した。またEcoRI切断点は円内に示した。黒塗りの部分は1.0MDa EcoRI断片に相当する。

pTB913 および pTB902 の EcoRI 切断部位にそれぞれ 1.0MDa EcoRI 断片を導入し pTB931, pTB921 を得た。pTB931 と pTB919 の 2 つの EcoRI 断片の組込み方向は異っていた。これらの制限酵素切断点地図を 図1-6 にまとめて示す。

5. pTB90 とその派生プラスミドによる Bacillus stearothermophilus の形質転換

pTB90 およびその小型プラスミドを用いて B. stearothermophilus CU21 株の形質転換を行った(表1-2)。形質転換実験に用いたプラスミド DNA は, B. subtilis より調製したが, 実験2 の pTB90 のみ Bst EII 切断点を修飾する為に B. stearothermophilus より調製した。形質転換実験1において, pTB90 は 1 μ g DNA 当り約 10^3 程度の形質転換株を生じたが pTB914 や pTB916 では形質転換株は得られなかった。実験2では 1.0 MDa EcoRI 断片を保持しないプラスミド pTB913 は, 1.0 MDa 断片を保持するプラスミド pTB919 や pTB931 に比べて B. stearothermophilus に対する形質転換頻度が約 10^4 倍程度低くなること が示された。1.0 MDa EcoRI 断片を保持しないプラスミド pTB914, pTB916, pTB913 において pTB913 のみから低頻度ながらも形質転換株が得られた。この差は pTB914, pTB916 上に B. stearothermophilus ATCC12980 が保持する制限酵素 Bst PI の isoschizomer である Bst EII 切断点が存在するのに対し pTB913 上には, それが存在しないことによるものと考えられる(図1-6)。実際 pTB914, pTB916 に関しても 10 μ g 程度の DNA を用いると形質転換株が数個得られることが別途確認された。形質転換実験1, 2 の結果より 1.0 MDa EcoRI 断片が存在することにより B. stearothermophilus に対する形質転換能が著しく高まること が示唆された。この点を確認する為に, Tc^r のみを示すプラスミド pTB902 と pTB921 につ

表1-2. プラスミドDNAによる *B. stearothermophilus* CU21 の形質転換⁽²⁵⁾

Experiment	Plasmid	<i>Bst</i> EII	1.0 MDa	Antibiotic ($\mu\text{g/ml}$)	Transformants per μg of DNA	Transformation frequency ^a per regenerant
1	pTB90	+	+	Km (25)	1.9×10^3	1.6×10^{-4}
	pTB90	+	+	Tc (5)	7.7×10^2	6.4×10^{-5}
	pTB914	+	-	Km (25)	< 1	$< 8 \times 10^{-8}$
	pTB914	+	-	Tc (5)	< 1	$< 8 \times 10^{-8}$
	pTB916	+	-	Km (25)	< 1	$< 8 \times 10^{-8}$
	pTB916	+	-	Tc (5)	< 1	$< 8 \times 10^{-8}$
2	pTB90	^b +	+	Km (25)	1.0×10^7	1.9×10^{-1}
	pTB913	-	-	Km (25)	4.6×10	8.8×10^{-7}
	pTB919	-	+	Km (25)	2.2×10^5	4.2×10^{-3}
	pTB931	-	+	Km (25)	5.2×10^5	1.0×10^{-2}
3	pTB90	+	+	Tc (5)	8.6×10^3	6.1×10^{-5}
	pTB902	+	-	Tc (5)	< 1	$< 7 \times 10^{-9}$
	pTB921	+	+	Tc (5)	1.8×10^4	1.3×10^{-4}

^a 実験1, 2, 3 の再生プロトプラスト数は, それぞれ 1.2×10^7 , 5.2×10^7 , 1.4×10^8 /ml であった。

^b *B. stearothermophilus* よりプラスミドを調製したので *Bst*PI 部位は修飾を受けている。

いて B. stearothermophilus に対する形質転換実験3を行った。その結果 1.0 MDa EcoRI 断片を保持しない pTB902 では形質転換株が得られなかったのに対し、1.0 MDa断片を保持する pTB921 では 1 μ g DNA 当り 1.8×10^4 の形質転換株が得られた。このことから 1.0 MDa EcoRI 断片の存在により B. stearothermophilus に対する形質転換頻度が著しく上昇することが再確認された。また高濃度(約 10 μ g)の pTB902 DNA を用いた場合には少数の形質転換株が得られた。pTB90 の形質転換頻度が各実験において異なるのは BsaEII 切断点の修飾の有無によると考えられる。

6. プラスミドのコピー数

1.0 MDa EcoRI 断片を保持するプラスミドは B. stearothermophilus に対する形質転換頻度が著しく高まることが示された。また、1.0 MDa断片を保持するプラスミドの B. stearothermophilus 内におけるコピー数は 1.0 MDa断片を保持しないプラスミドに較べ非常に低いという傾向が電気泳動的に認められた。この差を確かめるためにデンスリトメーターを用いて定量的にコピー数を算定した所、1.0 MDa EcoRI断片を保持するプラスミドのコピー数は保持しないものの約 10分の1であることが示された(表 1-3)。しかし、このような 1.0 MDa EcoRI断片の有無による顕著なコピー数の変化は B. subtilis 内においては認められなかった。

表1-3. 各種プラスミドの性質⁽²⁵⁾

Plasmid	Characteristics	rep	1.0 MDa	Transformation of <i>B. subtilis</i>	Copy number in <i>B. subtilis</i>	Transformation of <i>B. stearo- thermophilus</i>	Copy number in <i>B. stearo- thermophilus</i>
pTB19	Km ^r Tc ^r	A,B	-	+	1 ^a	+	1 ^a
pTB51	Km ^r	A	-	+	8	-	
pTB52	Tc ^r	A	-	+	9	-	
pTB53	Km ^r Tc ^r	A	-	+	8	-	
pTB90	Km ^r Tc ^r	B	+	+	11	+	5
pTB914	Km ^r Tc ^r	B	-	+	13	+ ^b	43
pTB916	Km ^r Tc ^r	B	-	+	15	+ ^b	- ^c
pTB913	Km ^r	B	-	+	25	+ ^b	39
pTB919	Km ^r	B	+	+	13	+	5
pTB931	Km ^r	B	+	+	14	+	4
pTB902	Tc ^r	B	-	+	24	+ ^b	60
pTB921	Tc ^r	B	+	+	13	+	7

^a 参考文献(22)より引用。

^b 形質転換頻度が低い。

^c 欠失プラスミドが高頻度に生じる。

第4節 考 察

自然界より単離された好熱性細菌が保持するプラスミド pTB19 上には、2種類の自律複製可能なDNA領域が存在した。このような複合レプリコンが Bacillus 属より単離されたのは初めての事であると思われる。また、B. stearothermophilus 内において pTB913 (Km^r) という欠失プラスミドが pTB19 ($Km^r Tc^r$) より生じることが示された(図1-5)が、B. subtilis 内においても同一の欠失プラスミド (Km^r , 2.9MDa) が pTB19 より得られた。さらに、B. subtilis 内ではこれとは別の欠失プラスミド (Tc^r , 約14MDa) が生じることが観察された。これらの結果から2種の欠失プラスミドは in vivo 組換えにより pTB19 より生じたものと考えられるが、逆に pTB19 自身が Km^r を示すプラスミドと Tc^r を示すプラスミドが組換えを起こしやすい場所を介して in vivo で融合することにより生じたプラスミドであるとも考えられる。一般に、腸内細菌より単離された多剤耐性を示すR因子の多くが複合レプリコンであると言われている^(34,35,36)。

pTB19 より得られた小型プラスミドの内 repA を含む pTB51, pTB52, pTB53 は B. subtilis 内でのみ複製可能であったが、repB を含む pTB19, pTB90 およびその派生プラスミドは、B. subtilis, B. stearothermophilus 両宿主菌内において複製可能であった。また、B. subtilis 中において repA を含むプラスミドのコピー数は repB を含むプラスミドのコピー数より低い傾向が認められた(表1-3)。これらのことからDNA複製を担う2つの決定因子 repA および repB が本質

的に異なるものであると考えられる。

repB を含む pTB90 には、特異的な断片 (1.0MDa; EcoRI 断片) が含まれており種々の小型プラスミドの性質を比較した結果、この 1.0MDa EcoRI 断片が存在することにより B. stearothermophilus に対する形質転換能が著しく (約 10^4 倍) 高まること、また同宿主内におけるコピー数が低下することが示された (表 1-2, 1-3)。形質転換頻度の上昇については 1.0MDa EcoRI 断片と B. stearothermophilus 染色体間に存在する相同部位を利用しての組換えによることも考えられる。この可能性について検討するために、pUB110 の EcoRI 切断点に 1.0MDa EcoRI 断片を組込んだ pUB111 を得た。このプラスミドを用いて形質転換実験を行なった結果、pUB111 の B. stearothermophilus に対する形質転換頻度は pUB110 と同程度であり、特別な頻度上昇は認められなかった。また Sueoka ら⁽³¹⁾ は、B. subtilis における pUB110 の複製・分配にプラスミドの特定部位と細胞膜との特異的な結合が重要な役割を果たしていることを報告している。そこで、この 1.0MDa EcoRI 断片も好熱菌 B. stearothermophilus の膜に特異的に結合することにより形質転換直後のプラスミド複製を容易にし、また DNase による分解活性からプラスミドを保護している可能性も考えられるので、Sueoka ら⁽³⁴⁾ の方法に準じて *in vitro* における膜画分との結合実験を行った (図 1-7)。その結果 pTB90 の 1.0MDa EcoRI 断片は他の断片と同程度に膜と結合することが示された。また pUB110 の MboI 分解物を用いた実験においても各断片の膜結合能は同程度であった (図 1-7)。即ち、B. subtilis の膜画分

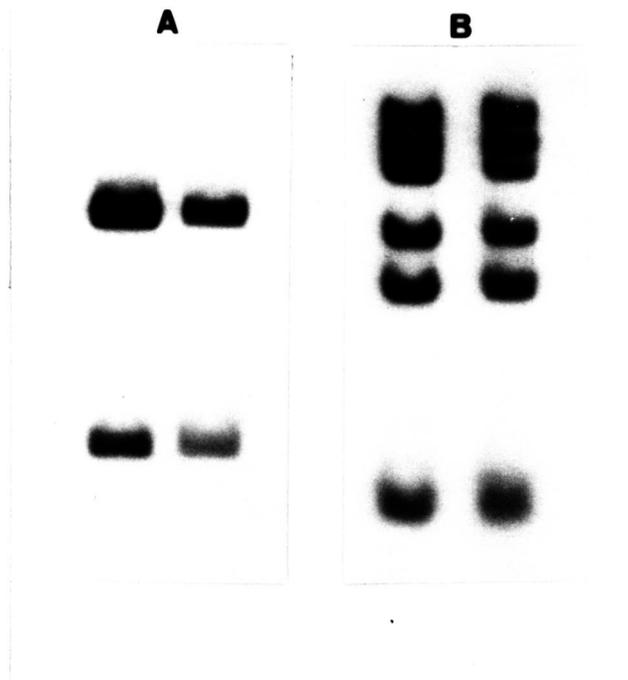


図1-7. DNA断片と膜画分との結合。 ^{32}P で標識したDNA断片と B. stearothermophilus の膜画分との結合実験を行った。スクロース密度勾配超遠心の後、膜画分からフェノール抽出によりDNA断片を回収後電気泳動を行った。Aでは1.0%アガロースゲルをBでは0.5%アガロースを含む3%ポリアクリルアミドゲルを用いた。レーン左は結合実験に用いたDNA断片を示し、レーン右は膜画分より回収したDNA断片を示す。A, pTB90 (EcoRI 処理); B, pUB110 (MboI 処理)。

においては pUB110 DNA断片の特異的膜結合が認められたが(31), B. stearothermophilus の場合は非特異的結合が観察された。従って, 1.0 MDa EcoRI断片による B. stearothermophilus の形質転換頻度の上昇は染色体との相同性あるいは膜結合能の増加によるものであるとは考えにくい。 B. stearothermophilus 内におけるコピー数は pUB110 と pUB111 についてほぼ同程度

であった。また、プラスミドが一旦 B. stearothermophilus 内に移入されると 1.0 MDa EcoRI 断片の有無に拘らず、いずれのプラスミドも安定に保持されていることが別途確認されている。以上の結果から pTB90 の 1.0 MDa EcoRI 断片は DNA 複製やコピー数調節において repB 機能の調節に関与していると考えられる。1.0 MDa EcoRI 断片にコードされている遺伝情報として次のような可能性があろう

- (i) プラスミド DNA の複製開始に対し負に働く蛋白質;
- (ii) ColEI や RI プラスミドにおいて知られている複製開始を阻害する低分子 RNA^(37, 38);
- (iii) B. subtilis 内では作動しないが B. stearothermophilus 内でのみ機能する複製開始点である。

L 培地中における B. subtilis (pUB111) の増殖速度は B. subtilis (pUB110) のそれに比べて 40% 程度低い。また L 寒天培地上に形成されるコロニーの大きさや形態は全く異っていることから 1.0 MDa EcoRI 断片からの遺伝子産物が宿主菌に対しストレスを与えている可能性も考えられる。しかし、このような差異は B. stearothermophilus (pUB111) と B. stearothermophilus (pUB110) 間においては認められなかった。これらの現象から 1.0 MDa EcoRI 断片の形質発現は、ベクタープラスミドと宿主菌の両方に大きく影響されていると言えよう。塩基配列の決定、遺伝子産物の解析等により中温菌および好熱菌におけるプラスミド DNA 複製の調節機構に関して新たな知見が得られることが期待される。

第5節 要 約

1. 自然界より単離された好熱性細菌由来の薬剤耐性プラスミド pTB19 は、2種の DNA複製決定因子 repA と repB を含む複合レプリコンであった。

2. 複製決定因子 repA は、B. subtilis 内でのみ機能したが repB を含むプラスミドは B. subtilis , B. stearothermophilus 両宿主菌内において複製可能であった。

3. pTB19 より得られた repB を含む小型プラスミド pTB90 には B. stearothermophilus の潜在性プラスミド pBS02 に由来する 1.0 MDa EcoRI 断片が含まれていた。

4. 1.0 MDa EcoRI 断片の存在により B. stearothermophilus に対する形質転換頻度が 10^3 から 10^4 倍に上昇すること、また同宿主内におけるプラスミドのコピー数がこの断片を持たないプラスミドの約10分の1に低下することが、pTB90 およびその派生プラスミド間の比較により明らかにされた。

第2章 好熱性細菌における in vitro DNA 合成

第1節 緒言

好熱性細菌のプラスミド DNA は、高温環境下における DNA 複製の有効なモデルとなり得る。また好熱性細菌からの薬剤耐性プラスミドの単離⁽²²⁾、B. stearothermophilus における形質転換系の開発⁽²³⁾により同宿主菌内におけるプラスミド DNA の複製調節に影響を与える特異的な DNA 断片の存在が明らかにされた⁽²⁵⁾。更に DNA 複製の反応機構を解析するためには細胞抽出液を用い、in vitro において複製反応を再現することが必要である。しかし、B. stearothermophilus に関しては、DNA ポリメラーゼについての報告^(39,40)があるのみで in vitro DNA 複製系は開発されていない。本研究ではプラスミド DNA の in vitro 複製系の開発を目的として、プラスミドを保持する B. stearothermophilus の細胞抽出液中に存在する DNA 合成活性について調べた。

第2節 実験材料 および 方法

使用菌株 および プラスミド

B. stearothermophilus CU21 およびその pTB913 (Km^r) 保持株を細胞抽出液の調製源として用いた。また、ファージ M13 mp11 および E. coli JM105 (Δlac-pro thi strA endA sbcB15 hsdR4 / F' traD36 proAB lacI^q lacZ ΔM15)⁽⁴¹⁾ をダイデオキシ法による DNA 塩基配列決定の際に用いた。

細胞抽出液の調製

細胞抽出液は Diaz と Staudenbauer⁽¹⁰⁾ の方法を基本として以下の様に調製した。細胞を 800 ml の LGS 培地中 (プラスミド保持株の場合は Km 5 μg/ml を含む) 55 °C にて OD₆₆₀ = 0.35 (対数増殖中期に相当) まで培養後, 500 g の細く砕いた氷に注いだ後菌体を遠心集菌した。菌体を 30 ml の緩衝液 (25 mM HEPES-KOH [pH 8.0], 100 mM KCl, 0.33 M スクロース, 1 mM DTT) にて洗浄後, 1 mg/ml のリゾチー4 を含む同緩衝液 40 ml に懸濁し水中 30 min 保った。4,000 × g, 7 min (4 °C) の遠心の後 25 mM HEPES-KOH [pH 8.0], 100 mM KCl, 1 mM DTT, 0.6 mM フェニルメチルスルホニルフルオリド (PMSF) 液中に 1 g の湿菌体当り 1 ml 緩衝液の割合いで懸濁した。

溶菌は凍結融解法⁽⁷⁾ によった。即ち, 液体窒素を用いて凍結し 7 °C にて融解の後 135,000 × g, 30 min (0 °C) の超遠心により上清 (フラクション (FI)) を得た。FI に飽和硫酸 0.83 体積分を 10 min かけて加えた後 30 min 0 °C にて穏やかに攪拌した。硫酸飽和 (0 - 45 %) の沈殿物を 27,000 × g, 15 min の遠心により回収し, 沈殿物を 0.5 ml の緩衝液 (10 mM HEPES-KOH [pH 8.0], 100 mM KCl, 1 mM DTT, 1 mM EDTA, 0.6 mM PMSF, 10 % エチレングリコール) に溶解した。

その後硫酸を除く為に 100 ml の同緩衝液に対し 3h 0°C にて透析した。透析後のサンプルをフラクション II (FII) とし液体窒素中に小分けにして保存した。また、さらに Pelham と Jackson の方法⁽⁴²⁾ によりマイクロコッカスエンドヌクレアーゼ処理を行ったものはフラクション IIM (FIIM) とし同様に保存した。

DNA 合成活性の測定

標準反応液 (120 μ l) (Diaz と Staudenbauer⁽¹⁰⁾ による) の組成 (終濃度) は以下に示す通りである: 40 mM HEPES-KOH [pH 8.0], 30 mM KCl, 10 mM 酢酸マグネシウム, 2 mM ATP, rGTP, rCTP, rUTP 各 0.4 mM, 0.1 mM NAD, 0.1 mM cAMP, 15 mM ホスホクレアチン, 0.1 mg/ml クレアチンキナーゼ, dATP, dCTP, dGTP, [³H]dTTP (New England Nuclear 社製), 各 0.025 mM, 2.5% ポリエチレングリコール 6,000, 細胞抽出液 40 μ l。 [³H]dTTP は未標識の dTTP により 700 cpm/pmol となる様に希釈して用いた。反応は通常 48°C で行い、経時変化を追う場合には 20 μ l ずつ反応液を採取し酸不溶性画分に取り込まれた放射能を測定した⁽⁵⁾。

DNA 塩基配列の決定

DNA 塩基配列は、M13 シークエンスキット (宝酒造(株)社製) を用いダイデオキシ法⁽⁴¹⁾ により決定した。

アガロースゲル電気泳動

アガロースゲル電気泳動については第 1 章第 2 節に述べ

た如く行った。

第3節 結果

1. FI および FII 画分による DNA 合成活性

B. stearothermophilus CU21 (pTB913) より調製した FI 画分を用い予備的に DNA 合成活性を測定した所、合成活性は低く約 10 min で反応は停止しその後急激な分解が認められた。E. coli や酵母の in vitro プラスミド DNA 複製系において、硫酸 45% 飽和以上の沈殿画分が DNA 合成を阻害する^(9,13)ことが知られているので、分解活性や阻害因子を取り除くために FI の硫酸分画 (0-45% 飽和) を行った。このようにして得られた FII を用いた所、10 min の遅延時間の後 90 min から 120 min に亘る DNA 合成が観察された (図 2-1a)。

好熱性細菌より調製した細胞抽出液を用いているので、DNA 合成活性の温度特性を調べた。その結果、48°C が最適温度であることが判明したが、合成反応自身は 60°C においても進行した。逆に、常温菌の in vitro DNA 合成系において通常用いられる 30°C^(9,10) においては、5 時間の後も全く DNA 合成は観察されなかった (図 2-1a)。この DNA 合成活性に細胞抽出液中に含まれている DNA が関与しているかどうかを調べるために FII についてミクロ

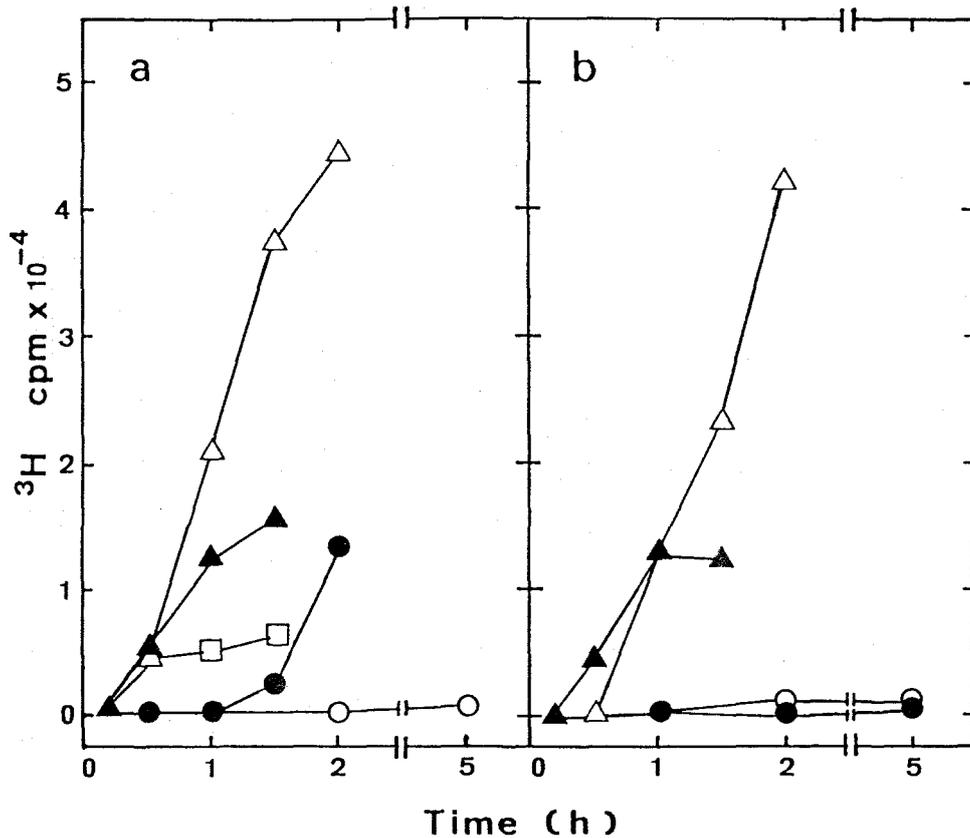


図2-1. FII(a)およびFII M(b)におけるDNA合成への温度の影響⁽⁹³⁾。
 反応は30°C(○), 37°C(●), 48°C(△), 55°C(▲), 60°C(□)にて
 行い, 各時間に20μずつ分取した。

コックスエンドヌクレアーゼ処理を行い FII M画分を得た。
 FII Mを用いて同様の実験を行った所, 遅延時間が30 minにな
 ることや, 37°Cにおいては5hの後もDNA合成が認めら
 れない等の変化は認められたが, 48°Cを至適温度とする
 DNA合成活性はヌクレアーゼ処理後も存在した。

48°Cにおける反応産物はデオキシリボヌクレアーゼI
 (DNase I) (50 μg/ml) による37°C, 30 minの処理により酸可

溶性画分に変換されること、またリボヌクレアーゼA (167 $\mu\text{g}/\text{ml}$) による同様の処理には耐性であることが電気泳動などにより確認された(図2-2)。この事とマイクロコッカスエンドヌクレアーゼによる切断を受けたDNAやRNAは3'-リン酸末端を有しDNA合成のプライマーになり得ないことから、このDNA合成反応は鋳型やプライマーに依存しないことを示

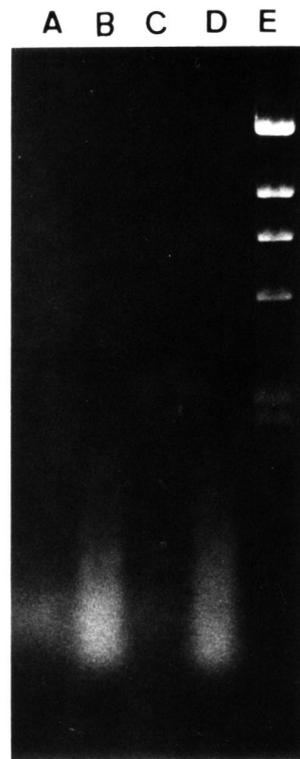


図2-2. FIIIMによる *in vitro* 合成産物のアガロースゲル電気泳動。⁽⁴³⁾標準反応液を用いてDNA合成を行なわせた。A, 反応前; B, 90 minの反応産物; C, 90 min 反応の産物をDNaseI処理を行ったもの; D, 90分反応の産物をRNaseA処理を行ったもの; E, λ cI 857S7 *Hind*III 分解物。

している。

2. in vitro DNA 合成活性の性質

in vitro DNA 合成活性の性質を除去試験により調べた (表2-1)。反応には、 Mg^{2+} と ATP およびその再生系が必須であったが rCTP, rGTP, rUTP は要求されなかった。FII, FIIM 画分共に dNTPs を要求したが、FIIM はより厳密に要求した。そこで FIIM を用いて dNTPs の要求性についてより詳細に調べた所、dATP と dTTP を要求するが dCTP, dGTP には依存しないことがわかった。また dATP, dTTP 存在下での DNA 合成量は標準反応系のものと同程度であった (表2-2)。そこでこの DNA 産物が、dAMP および dTMP が交互に並ん

表2-1. DNA 合成に必要な因子の解析⁽⁴³⁾

Omissions	Fraction II (%)	Fraction FIIM (%)
None	100	100
Mg-acetate	1.0	0.4
rCTP, rGTP, rUTP	105	103
dATP, dGTP, dCTP	27	1.6
ATP, creatinephosphate, creatine kinase	0.7	0.5

表2-2. in vitro DNA合成における
各 dNTP の要求性⁽⁴³⁾

Omissions	Activity (%)
None	100
dATP	6.7
dTTP*	0.5
dGTP	95
dCTP	114
dGTP, dCTP	105

* ³H-dTTPのみ加え未標識のdTTPは加えていない。

だものか、ポリA鎖とポリT鎖からなるホモポリマーか、dAMPとdTMPが不規則に並んだものかを調べるために塩基配列の決定を試みた。48°C 90 minの反応産物をフェニール抽出の後エタール沈殿により回収した。沈殿物をDNase I (50 µg/ml)を含む緩衝液(40 mM Hepes-KOH [pH 8.0], 30 mM KCl, 10 mM 酢酸マグネシウム)に溶解後17°C 5 minの処理を行った。小型化された反応産物を末端修復の後ファージM13上にクローン化することにより、塩基配列の決定を行った。その結果合成されたDNAはdAMPとdTMPが交互に並ぶポリdATであった(図2-3)。

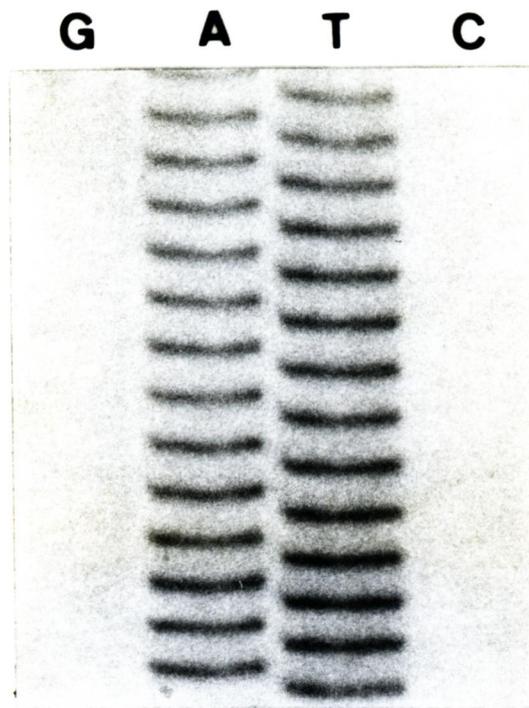


図2-3. *in vitro* で合成された DNA の塩基配列⁽⁴³⁾。
電気泳動は 8% ポリアクリルアミドゲルを用いた。

第4節 考察

E. coli, B. subtilis, Micrococcus luteus の DNA ポリメラーゼ I に
は dATP, dTTP, マグネシウムイオン存在下において, 鋳型 DNA
が存在しないにも拘らず, 様々な遅延時間の後にコポリ
マー (ポリ dAT) が合成されることが知られている^(1, 44, 45)。
本章において述べられた *in vitro* DNA 合成反応もこれら既
知の鋳型非依存性 de novo DNA 合成反応といくつかの共通
点を有している。しかし, B. stearothermophilus の DNA ポ

リメラーゼに関する報告^(39,40)ではこの de novo DNA 合成反応については述べられていない。 B. stearothermophilus (pTB913) の細胞抽出液中に認められた DNA ポリメラーゼの反応は、他の DNA ポリメラーゼとの類似点が存在するものの、至適温度が 48°C であることと ATP を要求する点が異っている。

プラスミド pTB913 を保持しない B. stearothermophilus より調製した FII での DNA 合成活性は極めて低く、ミクロコッカスエンドヌクレアーゼ処理を行うと [³H]dTTP の取り込みは全く認められなかった。このことから、プラスミド pTB913 およびプラスミド上にコードされている遺伝子産物が宿主の DNA ポリメラーゼ活性に影響を与えている可能性が示唆される。

Kornberg^(1,2) によって述べられている様に鋳型やプライマーの存在しない状態での de novo の dAMP, dTMP 交互繰り返し高分子合成反応の発見は、DNA ポリメラーゼの研究において最も驚くべきかつ予期しないでき事であった。ここで得られた好熱菌 DNA ポリメラーゼに関する結果も同様の範疇に属するものと考えられる。この ATP に依存する DNA 合成反応に関与する酵素を精製することにより好熱性細菌の DNA 合成に関して新しい知見が得られることが期待される。

第5節 要 約

1. 好熱性細菌 B. stearothermophilus (pTB913) より得られ

た細胞抽出液中に dATP, dTTP, マグネシウムイオン, ATP のみを要求する DNA 合成活性が認められた。

2. DNA 合成活性は, ミクロコッカスエンドヌクレアーゼ処理後も存在したことから鋳型 DNA やプライマーを必要としないと考えられた。

3. DNA 合成活性はプラスミド非保持株より得られた細胞抽出液中には認められなかった。

4. 合成された DNA は dAMP と dTMP が交互に並ぶポリ dAT であった。

5. DNA 合成活性は, E. coli, B. subtilis, M. luteus の DNA ポリメラーゼ I について知られている de novo DNA 合成と類似した反応であるが, 熱安定性および ATP 要求性において異っていた。

第3章 Bacillus 属 プラスミド pUB110dB, pRBH1, およびそのコピー数変異 プラスミドの塩基配列

第1節 緒言

自然界より単離された好熱性細菌が保持する薬剤耐性プラスミド pTB19 ($Km^r Tc^r$, 17.2 MDa) 上には2種の複製決定因子 repA および repB が存在し, その内 repA は B. subtilis 内でのみ機能するが, repB は B. subtilis, B. stearothermophilus 両宿主菌内で機能することを第1章で述べた。pTB913 (2.9 MDa, Km^r) は pTB19 より得られた小型プラスミドで repB のみを保持している⁽²⁵⁾。

常温菌 Staphylococcus aureus より単離された pUB110 (3.0 MDa, Km^r) は pTB19 と分離源が異なるにも拘らず B. subtilis および B. stearothermophilus 内で複製可能である。また pTB913, pUB110 上にコードされている Km 耐性遺伝子 (kan) (759 塩基対 (bp)) の塩基配列⁽⁴⁶⁾ は共に決定されており, 互いに1塩基のみ異なることが明らかとなっている。E. coli のプラスミドにおいてはその複製制御がかなり詳細に研究されている例もある⁽⁴⁷⁾ が, Bacillus 属のプラスミドにおいては, ほとんどなされていない。本研究では pTB913 および pUB110 の複製必須領域について塩基配列決定の後, 比較・検討することにより 枯草菌内におけるプラスミ

どの複製制御に関する基礎的知見を得る事を目的とした。

第2節 実験材料および方法

使用菌株およびプラスミド

B. subtilis MI113 (arg-15 trpC2 r_H⁻ m_H⁻)⁽²²⁾ を本実験を通じての宿主菌として用いた。また repB を含む最小プラスミド pTB913 (Km^r)⁽²⁵⁾ および pUB110 (Km^r)⁽²³⁾ を用いた。

プラスミド DNA の調製

プラスミド DNA の調製は、アルカリ抽出法または cleared lysate 法の後、塩化セシウム-エチジウムブロミド平衡密度勾配超遠心法により行った^(25, 46)。

エキソヌクラーゼによる DNA 鎖の切断

エキソヌクラーゼ Bal31 による反応⁽²⁹⁾は、20mM Tris-HCl [pH 8.0], 12 mM CaCl₂, 12 mM MgCl₂, 100 mM NaCl, 1mM EDTA 100 μl 中に DNA 5 μg と Bal31 1 単位を含む反応系で 25°C にて行った。反応は EGTA (エチレンジアミン四酢酸) を終濃度 20 mM となる様に加えて停止させ、68°C 10 min の熱処理により Bal31 を失活させた。

B. subtilis の形質転換

第1章第2節で述べた如く competent cell 法で行った。形質転換株は Km (5 µg/ml) を含む寒天培地上で直接選択を行った。

DNA 塩基配列の決定

DNA 塩基配列の決定は Maxam と Gilbert の方法⁽⁴⁸⁾あるいは第2章第2節で述べたダイデオキシ法により行った。

in vitro 蛋白合成

プラスミド DNA に依存する in vitro 蛋白合成は Zubay の方法⁽⁴⁹⁾により原核生物 DNA 依存性-翻訳キット N. 380 (Amersham) を用いて行った。5 µg の DNA と L-[³⁵S]メチオニンを反応系に加えた。37°C 45 min の反応の後、1 µg の RNase A を加え更に 15 min 保温した。

蛋白質のゲル電気泳動

in vitro で合成された蛋白質のゲル電気泳動は Laemmli⁽⁵⁰⁾の方法に従い、ゲル濃度は 15% とした。分子量マーカーはチトクロム C オリゴマー (オリエンタル酵母 (株)) を使用した。フルオログラフィーにはクーマシーブリリアントブルー R による染色の後、ゲルを 100 ml のエンハンス (New England Nuclear) に 3h 浸し、流水で 1h 洗浄した。その後ゲルを乾燥しフジ RX フィルムを用いて -80°C 3 day の感光の後現像した。

コピー数変異プラスミドの単離

プラスミドを保持する B. subtilis MI113 を L 培地中 37°C にて 8 h 培養後、40 µg/ml の N-メチル-N'-ニトロ-N-ニトロソグアニジン (NTG) を含む 5 ml L 培地に植菌後 終夜培養した。アルカリ抽出法によりプラスミド DNA を調製後、B. subtilis を形質転換した。Km (30 µg/ml ; 通常の 6 倍濃度) 含有 L 寒天培地上で増殖可能な形質転換体をコピー数変異プラスミド保持株の候補とした。

プラスミドのコピー数の推定

Km (5 µg/ml) を含む L 培養液よりアルカリ抽出法にてプラスミド DNA を抽出後 BglII 処理により直鎖状にした。この DNA 試料を 1% アガロースゲル電気泳動の後、DNA 量を第 1 章第 2 節で述べたデンストメーターを用いる方法により測定した。各プラスミドのコピー数は pTB913⁽²⁵⁾ を基準として算定した。

制限酵素によるプラスミド DNA の切断

BamHI による DNA の切断は 10 mM Tris-HCl [pH 8.0], 7 mM MgCl₂, 100 mM NaCl, 7 mM 2-メルカプトエタノールの緩衝液中で 30°C 2h, HhaI は 10 mM Tris-HCl [pH 7.5], 7 mM MgCl₂, 7 mM 2-メルカプトエタノール中 37°C 2h, また TaqI では 50 mM Tris-HCl [pH 8.0], 7 mM MgCl₂, 50 mM NaCl, 7 mM 2-メルカプトエタノール中 60°C 2h 反応させた。BglII については第 1 章第 2 節で述べた。

第3節 結果

1. 小型プラスミドの作製

pUB110 および pTB913 の制限酵素切断点地図を図3-1に示す。プラスミドDNAの複製必須領域を決定するた

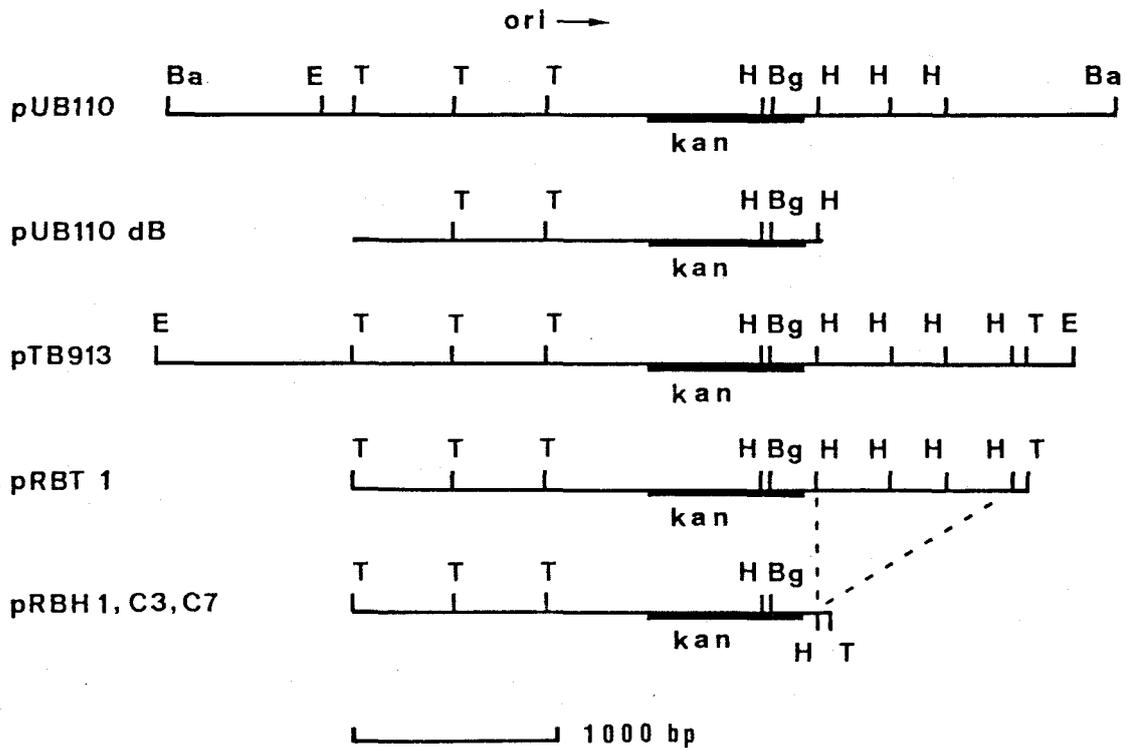


図3-1. pUB110, pTB913 とそれらの欠失プラスミドの制限酵素切断点地図⁽⁵¹⁾。プラスミド pUB110dB は pUB110 より作製され、pRBT1, pRBH1, pRBHC3, pRBHC7 は pTB913 に由来する。また pRBHC3, pRBHC7 は共に pRBH1 のコピー数変異プラスミドである。黒塗りの部分はカナマイシンスクレオチジルトランスフェラーゼ (KNT) の構造遺伝子 (*kan*) を示す。ori は pUB110 の複製開始点とその複製方向を示す⁽⁵²⁾。Ba, T, E, H, Bg はそれぞれ BamHI, TaqI, EcoRI, HhaI, BglII 切断点を示す。

めに小型プラスミドをそれぞれ作製した。pTB913より TagI-T4 DNAリガーゼ処理により pRBT1 (2.1 MDa) を得、更に HhaI-T4 DNAリガーゼ処理により pRBH1 (1.5 MDa) を B. subtilis 内で得た (図3-1)。pUB110は複製開始点と複製方向が Dubnau らにより決定されている⁽⁵²⁾ので BamHI 処理の後、エキソヌクレアーゼ Bal31により両方向から小型化を行った。このDNAのライゲーション混合物を用いて B. subtilis の形質転換を行い、得られた形質転換体が保持するプラスミドのうち最小のものを pUB110dB (1.5 MDa) とした (図3-1)。

2. pRBH1 および pUB110dB の塩基配列決定

pRBH1 および pUB110dB の塩基配列の決定を行った (図3-2)。図中カナマイシン不活化酵素の遺伝子 (kan) については既に決定されている⁽⁴⁶⁾。最も大きいオープンリーディングフレームは -297 から +705 塩基に亘る 1,002 塩基対から成っていた。相補鎖も含めた他の5つの読み取り枠についても調べたが、

図3-2. pRBH1 および pUB110dB の塩基配列⁽⁶⁾。pRBH1 の塩基配列を 図3-1 における左側の TagI 切断部位より示した。蛋白質のコード領域の第1番目の塩基を +1 とする。またこの領域のアミノ酸配列は塩基配列の下側に記した。SD 配列、RNAポリメラーゼ結合部位 (-35 および -10 領域) を示したが逆方向のものはイタリックを用いた。逆方向繰り返し配列は (—→←—) で表した。点の部分は対合していない事を、線の部分は対合部位であることを示している。pRBHC3, pRBHC7 における塩基置換部位は垂直の小矢印にて標記した。pUB110dB の塩基配列は pRBH1 のものと異なる所のみを下側に記した。

57

TaqI

pRBH1 5'CGAATGAGTGCTTTTTTTCGGTTTTGAGCGTAG
pUB110dB 5'AAAGCACCTGAAAAGGTGCTTTTTTTTGTAGTGG

-480 -420
CGAAAACGAGTTCTTTCTTTCTTGATACATATAGAAATAACGTCATTTTTATTTTAGTTGCTGAAAGTGCGCTTGAAGTGTGGTATGTATGTGTTTTAAAGTATTGAAAACCCCTAAA
TTTGAACITGTTCTTTCTTA
-35 region -10 region
-360 T (pUB110dB) -300 -10 region -35 region
ATTGGTTGCACAGAAAACCCCATCTGTTAAAGTTATAAGTGACCAACAAATAACTAAATAGATGGGGTTTCTTTTAATATTATGTGTCCTAATACTAGCATTATTTCAGATGAAAA
TATCAT. TT

-240 -180
AGTT
TCAAGGGTTTTAGTGGACAAGACAAAAGTGGAAAAGTGAGCCATGGAGAGAAAAGAAAATCGCTAATGTTGATTACTTTGAACTTTCGCATATCTTGAATTTAAAAAGGCTGAAAGA
-35 region -10 region

-120 -60 TaqI
GTAAAAGATTGCTGAAATATTAGACTATAACAAAATCGTGAAACAGCGGAAAGAAAGTTGTATCGAGTGTGGTTTTGTAATCCAGGCTTTGTCCAATGTGCAACTGGAGGAGACCA
SD region

1 60 -10 region 120
ATGAAACATGGCATTTCAGTCACAAAAGGTTGTTGCTGAAGTTATTAACAAAAGCCAAACAGTTTCGTTGGTTGTTTCTCACATTAACAGTTAAAAATGTTTATGATGGCCGAAGAATTAAT
MetLysHisGlyIleGlnSerGlnLysValValAlaGluValIleLysGlnLysProThrValArgTrpLeuPheLeuThrLeuThrValLysAsnValTyrAspGlyGluGluLeuAsn
ATTTA

-35 region A (C7) 180 240
T CGAGTT
AAGAGTTTGTGATATGGCTCAAGGATTTCGCCGAATGATGCAATATAAAAAATTAATAAAAACTTGTGGTTTTATCCGTCGCAACGGAAGTACAATAAATAAAGATAATCT
LysSerLeuSerAspMetAlaGlnGlyPheArgArgMetMetGlnTyrLysLysIleAsnLysAsnLeuValGlyPheMetArgAlaThrGluValThrIleAsnAsnLysAspAsnSer

300 360
TATAATCAGCACATGCATGATTGGTATGTGTGGAACCACTTATTTAAGAATACAGAAAACACTACGTAATCAAAAACAATGGATTCAATTTTGGAAAAGGCAATGAAATTAGACTAT
TyrAsnGlnHisMetHisValLeuValCysValGluProThrTyrPheLysAsnThrGluAsnTyrValAsnGlnLysGlnTrpIleGlnPheTrpLysLysAlaMetLysLeuAspTyr

TaqI 420 480
GATCCAAATGTAAGATTCAAATGATTCGACCGAAAAATAAATAAATCGGATATACAATCGGCAATGACGAAACTGCAAAAATATCCTGTAAAGGATACGGATTTTATGACCGATGAT
AspProAsnValLysValGlnMetIleArgProLysAsnLysTyrLysSerAspIleGlnSerAlaIleAspGluThrAlaLysTyrProValLysAspThrAspPheMetThrAspAsp

540 A (C3) 600
GAAGAAAAGAATTTGAAACGTTTGTCTGATTTGGAGGAAGGTTTACACCGTAAAAGGTTAATCTCCTATGGTGGTTTGTAAAAGAAATACATAAAAAATTAACCTTGATGACACAGAA
GluGluLysAsnLeuLysArgLeuSerAspLeuGluGluGlyLeuHisArgLysArgLeuIleSerTyrGlyGlyLeuLeuLysGluIleHisLysLysLeuAsnLeuAspAspThrGlu

660 720
GAAGCGGATTTGATTACATACAGATGATGACGAAAAAGCCGATGAAGATGGATTTTCTATTATTGCAATGTGGAATGGGAACGGAATAATTTTATTAAAGAGTAGTTCAACAAACGG
GluGlyAspLeuIleHisThrAspAspAspGluLysAlaAspGluAspGlyPheSerIleIleAlaMetTrpAsnTrpGluArgLysAsnTyrPheIleLysGlu***

780 840
GCCAGTTTGTGAAAGATTAGATGCTATAATTCTTATTAAGGATTGAAGGATGCTTAGGAAGACGAGTTATTAATAGCTGAATAAGAACGGTCTCTCCAAATATCTTATTAGAAAA

kan (759 bp) 1,680
GCAAACTCTAAAATTATCTGAAAAGGGAATGAGAATAGTGAATGGA.....ATACCATTTGAACGATGACCTCTAATAATGTTAATCATGTTGGTTACGTATT
MetAsnGly IleProPhe

HhaI 1,740 TaqI
TATTAACCTCTCCTAGTATTAGTAATTATCATGGCTGTATGGCGCCGATTTGTCATGACAAATTTCT
ATCAGGGAATGAGTTTATAAAAATAAAA

pRBH1
pUB110dB

終止コドンが数多く存在する為 100 アミノ酸以上の蛋白質に相当するものは存在しなかった。また B. subtilis 16S rRNA (HO-UCUUUCCUCCACUAG) の 3' 末端に相補的な配列が開始コドン (ATG) の上流 -17 から -4 塩基に存在し Shine-Dalgarno (SD) の配列として機能すると考えられた。このことと in vitro 蛋白質合成により分子量約 27 K の蛋白質 (後述) が認められたことから, 705 塩基対に 235 アミノ酸に相当する蛋白質 (分子量 27,803) がコードされていると推定した。

B. subtilis の RNA ポリメラーゼ (σ^{55} E) により認識されるプロモーターの共通配列である -35 領域 (TTGACA) および -10 領域 (TATAAT)⁽⁵³⁾ に類似した配列が 4 箇所 (-407 ~ -380, -170 ~ -143, -237 ~ -266, 144 ~ 116) で見つかリ (図 3-2), いずれもプロモーターとしての機能を有すると考えられた。構造遺伝子上流には 63 塩基よりなる一対の逆方向繰り返し配列が存在した。また構造遺伝子下流にも一対の逆方向繰り返し配列が存在しターミネーターとして機能すると推察された。pRBH1 と pUB110dB の塩基配列の比較を行った (図 3-2) 所, 両プラスミドには -460 から +1,726 塩基に亘り 2 箇所を除いて同一の塩基配列が存在した。塩基が異っていた位置は, 逆位繰り返し配列ループ中央 (-316 塩基) および kan 遺伝子⁽⁴⁶⁾ 中であつた。この同一領域には pUB110 の複製開始点 (ori)⁽⁵²⁾ が含まれているので pRBH1 においても ori 機能を有すると考えられた。

3. プラスミド DNA 依存 in vitro 蛋白質合成

精製したプラスミド pRBT1 および pUB110 の DNA を用いて蛋白質合成を行った。L- ^{35}S メチオニンによりラベルされた合成産物を SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動の後、フルオログラフィーを行った。分子量約 30K の蛋白質が 2 種認められた (図 3-3) が、カナマイシンヌクレオチジルトランスフェ

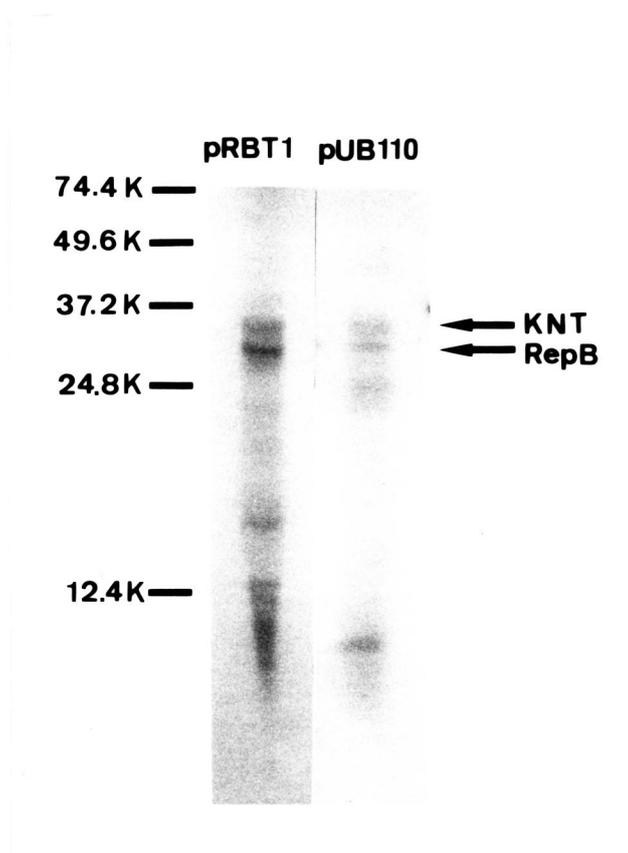


図 3-3. プラスミド pRBT1 および pUB110 の in vitro における転写および翻訳。転写・翻訳キットを用いプラスミド DNA 由来の産物を L- ^{35}S メチオニンにより標識後、ポリアクリルアミドゲル電気泳動を行いフルオログラムを得た。翻訳産物 KNT および RepB は矢印で示した。分子量マーカーとしてチトクロム C のモノマー (12.4 K) およびオリゴマー (24.8 K ~ 74.4 K) を用いた。

ラーゼ (KNT) (28.8K) の精製サンプル⁽⁴⁶⁾ との比較から分子量の大きいものが KNT に相当することが判ったので分子量の小さいものが塩基配列より推定された遺伝子産物 (27.8K) に相当すると考えられた。 pUB110 および pRBT1 より 27.8K の蛋白質がそれぞれ合成されることは、両プラスミドに存在する同一の塩基配列からも推定されることである。この蛋白質を RepB と命名した。また、*B. subtilis* のミニセルを用いて pUB110 由来の蛋白質を解析した所 in vivo においても分子量 26,000 あるいは 25,000 の蛋白質が合成されることが報告されている⁽⁵⁴⁾。

4. コピー数変異プラスミドのコピー数とその変異部位

NTG 処理により得られたコピー数変異プラスミド pRBHC3 および pRBHC7 のコピー数は表3-1に示すように元のプラスミド pRBH1 よりも高い。これらプラスミドについて塩基配列を決定した所、共に G から A への1塩基置換がそれぞれ RepB 蛋白質をコードしている領域の異なる場所に見出された (図3-2)。これより pRBHC3 の変異はグリニンからアスパラギン酸への置換を、pRBHC7 の変異はグリニンからグルタミン酸への置換をそれぞれ引き起こしていることが明らかとなった。このことから RepB 蛋白質がプラスミドの複製制御に関与していると考えられる。

表 3-1. プラスミドのコピー数⁽⁵¹⁾

Plasmid	Mol. wt. (MDa)	Copy number*
pUB110	3.0	48
pUB110dB	1.5	55
pTB913	2.9	25
pRBT1	2.1	35
pRBH1	1.5	42
pRBHC3	1.5	134
pRBHC7	1.5	202

* コピー数は 37°C にて推定した。

第4節 考 察

好熱菌由来の薬剤耐性プラスミド pTB913 および常温菌由来の pUB110 は、それぞれ分離源が異なるにも拘らずそれらの複製必須領域の塩基配列は逆方向繰り返し配列ループ中央の 1 塩基以外は同一であった (図 3-2)。この領域には、複製開始点、4つのプロモーター配列、SD 配列、逆方向繰り返し配列、そして RepB 蛋白質の構造遺伝子が含まれていた (図 3-2)。

pTB913 は B. subtilis および B. stearothermophilus を形質転換できる。一方 pUB110 は、S. aureus⁽⁵⁵⁾ の他 B. subtilis⁽²²⁾,

B. stearothermophilus⁽²³⁾, Bacillus licheniformis⁽²⁶⁾, Bacillus megaterium⁽⁵⁶⁾,
Bacillus pumilus⁽⁵⁵⁾ を宿主とすることができ。この様に宿
主域が広いことから、これらのプラスミドには広く Bacillus
属細菌内で機能する複製機構が備わっている可能性が示
唆される。

pRBH1より得られたコピー数変異プラスミド pRBHC3 およ
び pRBHC7 は RepB 構造遺伝子内の異なる所にそれぞれ1塩
基置換が起っていた。その変異はグリシンから酸性アミ
ノ酸即ち、pRBHC3 では アスパラギン酸, pRBHC7 では グルタミ
ン酸への置換を引き起こしていた。またこの置換によりプ
ラスミドのコピー数が増加(表3-1)したことから RepB 蛋白質
がプラスミドの複製制御に関与すると考えられた。こ
の様な複製制御蛋白質内の1アミノ酸置換によりコ
ピー数が上昇する例は E. coli のプラスミド R6K⁽⁵⁷⁾ や pSC101⁽⁵⁸⁾,
mini-Rts1⁽⁵⁹⁾ においても知られている。

pRBH1 は複製必須領域内の逆方向繰り返し配列内
ループ中央において pUB110dB と1塩基異なっている(図3-2)。
また pUB110dB のコピー数は pRBH1 よりも高い(表3-1)こ
から、この逆方向繰り返し配列がコピー数制御において重
要な役割を果たしている可能性が示唆される。しかし、
両プラスミドには塩基の異なる領域が他にも存在する
ので、これらの影響も無視できない。完全に1塩基置換
の関係にあるプラスミドを作製することにより、この領域
の役割がより明確になると考えられる。RepB蛋白質、逆
方向繰り返し配列、および4つのプロモーターそれぞれ、あ
るいは相互の機能を調べることにより、これらプラスミド

の複製制御機構が明らかになることが期待される。

第5節 要約

1. 好熱菌由来の薬剤耐性プラスミド pTB913 および常温菌由来の pUB110 をそれぞれ小型化し pRBH1 (Km^r, 1.5MDa), pUB110dB (Km^r, 1.5MDa) を得た。

2. pRBH1, pUB110dB の複製必須領域には 63 塩基からなる一対の逆方向繰り返し配列, RepB 蛋白質 (235 アミノ酸残基) 構造遺伝子を含むオープンリーディングフレーム, 4つのプロモーター配列, 複製開始点 (ori) が含まれていた。

3. pRBH1, pUB110dB の複製必須領域の塩基配列は約 1,300 塩基にわたって同一であったが, 逆方向繰り返し配列ループ中央において 1 塩基異なっていた。

4. コピー数変異プラスミド pRBHC3, pRBHC7 の変異部位は RepB 蛋白質構造遺伝子内の異なる位置に存在し, pRBHC3 はグリニンからアスパラギン酸へ, pRBHC7 はグリニンからグルタミン酸への置換を起こしていた。このことから RepB 蛋白質がプラスミドの複製制御に関与すると考えられた。

第4章 Bacillus プラスミド pRBH1 の RepB 蛋白質による負の コピー数制御

第1節 緒言

プラスミドDNAの複製に関する研究は、その制御機構に焦点が当てられ、多くの E. coli プラスミドを中心として進んでいる⁽⁴⁷⁾。しかし Bacillus 属のプラスミドについてはそれほど集中的におこなわれていないと言えよう。プラスミド pTB913 並びに pUB110 は、B. subtilis および B. stearothermophilus 内において複製可能なプラスミドであり^(23,25)、その両者の複製必須領域の塩基配列は1塩基を除き互に同一である⁽⁵¹⁾ことを第3章で述べた。この領域には図4-1に模式的に示した様に、複製開始点 (ori)、4つのプロモーター配列、SD配列、逆方向繰り返し配列、そして蛋白質 (RepB) の構造遺伝子が含まれている。特に RepB 蛋白質に関しては、変異プラスミドの解析から、コピー数調節に関与していることが示されている。

本研究では、逆方向繰り返し配列がコピー数制御領域の一つであり、RepB 蛋白質はプラスミドDNAの複製を負に調節することを確認した。また、E. coli プラスミド ColE1 の複製制御との類似性を比較することにより B. subtilis 内におけるプラスミド pRBH1 の複製制御に

ついて論じたい。

第2節 実験材料および方法

使用菌株およびプラスミド

使用した菌株とプラスミドを表4-1に示す。B. subtilis MI113をプラスミドの宿主菌として用いた。pRBHC3, pRBHC7はpRBH1より得られたコピー数の上昇した変異プラスミドで、その詳細については第3章第3節で述べた。pPF001はB. licheniformis 9945A株由来のペニシリナーゼ構造遺伝子とB. subtilis内でのベクターpC194を含むpHV14とから当研究室にて作製されたプロモーター検索用ベクターでありクローニング部位としてBamHI切断点を有している(図4-2)。

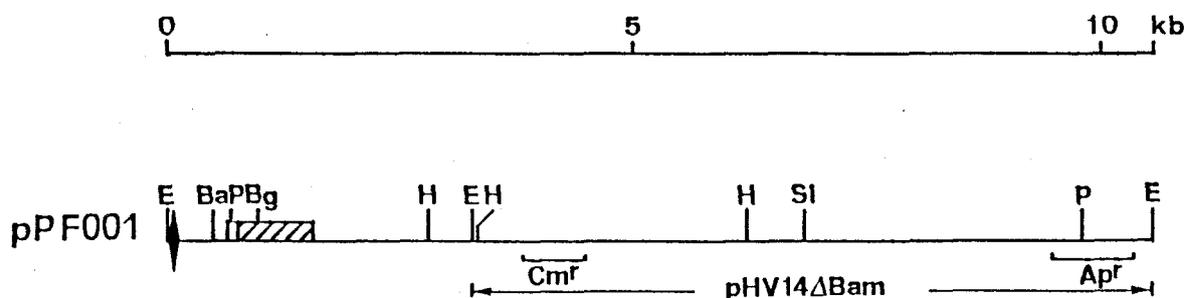


図4-2. プロモーター検索用ベクター pPF001 の構造。黒塗り部分は B. stearothermophilus α -アミラーゼ⁽⁶⁰⁾ に由来するターミネーターを、斜線部分はペニシリナーゼ構造遺伝子を示し、白抜き部分はそのシグナル配列を示す。Ba, P, SI はそれぞれ BamHI, BglII, EcoRI, HindIII, PstI, SalI を表す。

表 4-1. 使用菌株およびプラスミド⁽⁶²⁾

Strain	Characteristics		Reference
<i>Bacillus subtilis</i> MI113	<i>arg-15 trpC2</i>	$r_M^- m_M^-$	(22)

Plasmid	Molecular size (bp)	Characteristics	Reference
pUB110dB	2,266	Km ^r	(51)
pRBH1	2,262	Km ^r	(51)
pRBH1·IR	2,262	Km ^r	This work
pRBHC3	2,262	Km ^r	(51)
pRBHC3·IR	2,262	Km ^r	This work
pRBHC7	2,262	Km ^r	(51)
pRBHC7·IR	2,262	Km ^r	This work
pHV14	7,273	Cm ^r	(23)
pPF001		Cm ^r	This work
pPF301		Cm ^r	This work

B. subtilis の形質転換

第1章第2節で述べた方法に従い competent cell 法で行った。形質転換株は Km (5 µg/ml) または クロラムフェニコール (Cm, 30 µg/ml) を含む L 寒天培地上で選択した。

制限酵素によるプラスミド DNA の切断および末端修復

BstNI による DNA の切断は 10 mM Tris-HCl [pH 8.0], 7 mM

MgCl₂, 20mM KCl, 7mM 2-メルカプトエタノールの緩衝液中で 60℃ 2h, DraI は 10mM Tris-HCl [pH8.0], 10mM MgCl₂, 10mM NaCl 中 37℃ 2h, また NcoI は 6mM Tris-HCl [pH7.9], 6mM MgCl₂, 150mM NaCl 中 37℃ 2h 反応させることにより行った。他の制限酵素については第1章第2節および第3章第2節に述べた条件を用いた。

制限酵素処理後, 生じた粘着末端を修復するさいは DNA を 70mM Tris-HCl [pH8.0], 7mM MgCl₂, 7mM 2-メルカプトエタノール, dATP, dGTP, dTTP, dCTP 各 1mM を含む緩衝液に溶解し, DNA ポリメラーゼ I Klenow フラグメント 2 単位を加え室温で 30 min 反応させた。

アガロースゲルからの DNA 断片の回収

低融点アガロースゲルからの DNA 断片は Imanaka⁽⁶¹⁾の方法に従い以下の様に行った。電気泳動後目的とする断片を切り出し 68℃ でゲルを融解後, 2倍量の 50mM Tris-HCl [pH8.0], 0.5mM EDTA を加えた後, 等量の 70% エタノールを加える操作を 3 回繰り返すことによりアガロースを除いた。水飽和のジエチルエーテルにより残存するフェールを除去した後エタノール沈殿により DNA 断片の回収を行った。

ペニシリナーゼ生産菌の寒天培地上での検出

薬剤耐性を示す形質転換体を 0.75% ホリビニールアルコール [wt/vol] を含む寒天培地 (Cm 30μg/ml を含む) 上で増殖させた後, ヨード溶液 (0.08N I₂, 0.32N KI, 1% [wt/vol] 亜ウ酸ナトリウム) を加えて 30~60 秒間放置後, ヨード

溶液を除いた。これにペニシリンG溶液(20,000 U/ml, 0.1M リン酸カルウム緩衝液 [pH7.0] に溶解)を少量加え、ハローを形成する株をペニシリナーゼ生産菌とした。

ペニシリナーゼ活性の測定

ペニシリナーゼ活性は適当な薬剤を含む培地での培養液について Imanakaら⁽²⁶⁾の方法に従いヨード法で測定した。ペニシリナーゼ1単位は、30℃ 1h で 1 μ mol のペニシリンGを加水分解するのに必要な酵素量とした。

コピー数の推定

プラスミドのコピー数の推定方法は第3章第2節で述べた方法に従った。

第3節 結果

1. ループ構造への一塩基置換導入によるコピー数の変化

pRBH1 および pUB110dB の塩基配列を決定した所 RepB 蛋白質構造遺伝子上流に一村の逆方向繰り返し配列が見い出された(図3-2, 4-1)。この逆方向繰り返し配列の推定2次構造は図4-3に示す様に、63塩基中46塩基

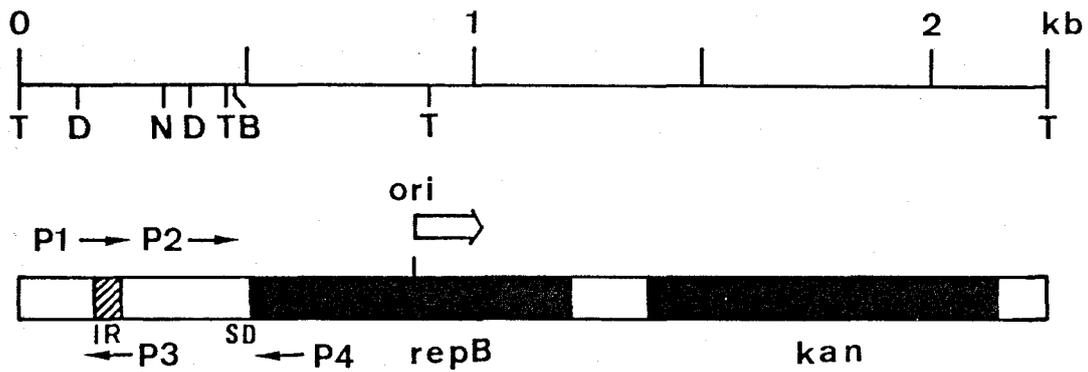


図4-1. pRBH1の構造⁽⁶²⁾。黒塗りの部分は *repB* および *kan* の構造遺伝子を示す。斜線で示した所は逆方向繰り返し配列 (IR) を表す。P, SD はそれぞれ RNAポリメラーゼとリボソームの結合部位を示す。矢印 \rightarrow および \Rightarrow はそれぞれ転写と複製の方向を示す。T, D, N, B はそれぞれ *TagI*, *DraI*, *NcoI*, *BstNI* 切断点部位を表す。

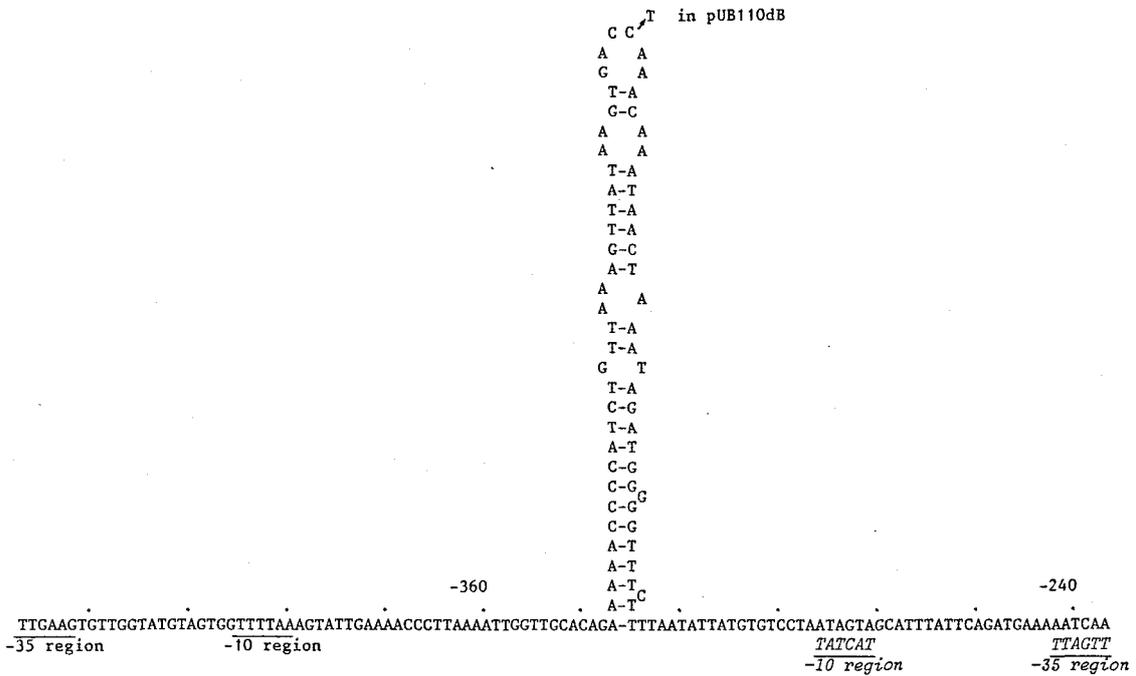


図4-3. 蛋白質構造遺伝子上流の逆方向繰り返し配列の推定二次構造⁽⁶²⁾。逆方向の -35, -10 領域はイタリックで示した。pUB110dB における pRBH1 との塩基の異なりは矢印で示した。RepB 蛋白質構造遺伝子の最初の塩基を +1 とした⁽⁵¹⁾。

が対を成している。-316塩基において pUB110dB は pRBH1 と一塩基置換の関係にある。この他にも塩基の異なりは存在するが、pUB110dB のコピー数が pRBH1 よりも高い(表3-1)ことから、このループ構造内の塩基置換によりコピー数の変化が生じたことが推察される。

この効果を明確にするために pRBH1 の逆方向繰り返し配列ループ中央に一塩基置換(C→T)を導入し、この塩基のみ pRBH1 と異なるプラスミドを作製した。また比較のためコピー数変異プラスミド pRBHC3, pRBHC7 にも同様の塩基置換を導入した。まず逆方向繰り返し配列(IR)を含む DraI 断片(246塩基対)(図4-1)を pUB110dB より切り出しこの断片を一塩基置換の供与DNAとした。次に pRBH1 を同様に DraI 処理した後に分子量の大きい方の断片を取り出し、pUB110dB 由来の DraI 小断片と結合することにより組換えプラスミド pRBH1·IR を得た。同様にして、pRBHC3, pRBHC7 より pRBHC3·IR, pRBHC7·IR をそれぞれ作製した。これらのプラスミドについてコピー数を測定した結果一塩基置換を導入したプラスミドはいずれの場合も元のプラスミドよりも高いコピー数を示した(表4-2)。これらの結果から、この逆方向繰り返し配列はプラスミド pRBH1 のコピー数制御領域の一つであることが判明した。

表 4-2. 一塩基置換を導入したプラスミドのコピー数⁽⁶²⁾

Plasmid	Copy number [*]
pRBH1	42
pRBH1·IR	134
pRBHC3	134
pRBHC3·IR	214
pRBHC7	202
pRBHC7·IR	214

* コピー数は 37℃にて推定した。

2. プロモーター活性の in vivo における検出

pRBH1 の複製必須領域内には 4 つのプロモーター配列が存在することが塩基配列の決定 (図 3-2) により示されていたが, これらの配列が実際に B. subtilis 内においてプロモーターとして機能することをプロモーター検索用ベクター pPF001 を用いて調べた。プロモーター配列を含む 3 つの断片, 即ち TagI - NcoI 断片 (プロモーター P1 および P3 を含む), NcoI - TagI 断片 (プロモーター P2 を含む), TagI - TagI 断片 (プロモーター P4 を含む) を pRBH1 より単離した (図 4-1)。各断片を DNA ポリメラーゼ Klenow フラグメントにより末端修復後, BamHI 処理の後末端修復を行った pPF001 と結合した。このライゲーション混合

物を用いて B. subtilis を形質転換した。得られた C_m^r を示す形質転換体についてプレート上でペニシリナーゼ生産の有無を検定した。

ペニシリナーゼ陽性を示す形質転換体が図4-4に示す様に各ライゲーション混合物より得られた。TagI-NcoI断片にはプロモーター P1 および P3 が含まれているが、得られた形質転換体について断片の挿入方向を調べたところ全て P1 プロモーターの活性を示す方向に挿入されており逆方向に挿入されたものは見出されなかった。このことから、プ

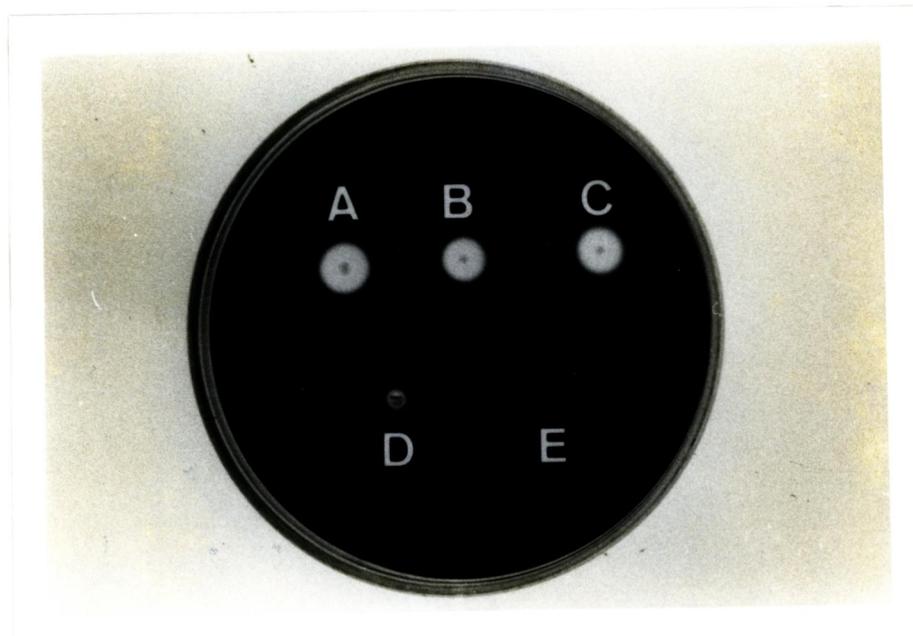


図4-4. ポリビニルアルコール含有プレートにおけるペニシリナーゼ活性の検定⁽²⁾。37℃にて約7h培養後活性の検定を行った。ペニシリナーゼ陽性を示すコロニーA, B, Cは in vivo において機能するプロモーターの存在を示す。B. subtilis に保持されている各プラスミドは A, pPF001-P1 ; B, pPF001-P2 ; C, pPF001-P4 ; D, pPF001 ; E, pHV14 である。

ロモーター P1, P2, P4 が B. subtilis 内において機能することが示されたので、各プロモーターを含むプラスミドもそれぞれ pPF001-P1, pPF001-P2, pPF001-P4 と命名した。P3 プロモーターの活性を示す株は得られなかったが、P1 から P4 までの 4 つのプロモーターの塩基配列は互いに相同性が高い (図 3-2) ので P3 プロモーターが in vivo において機能している可能性は十分予想し得る。この事から P3 プロモーターの活性を示すクローンが得られないのは、後述する様に転写終結によるものと考えられる。

3. P1 プロモーターからの転写の in vivo における阻害

P1 プロモーターは pRBH1 の複製開始点の上流に存在するので P1 プロモーターからの転写産物が DNA 複製のプライマーとして利用される可能性がある。この場合、P1 プロモーターからの転写がプラスミド上にコードされた遺伝子産物により影響を受けることが考えられるので、この可能性について以下の如く実験を行った。まず、プロモーター P1 の活性を検定する際の pBR322 による影響を最小限に止めるために、pPF001-P1 に含まれている E. coli 中のベクター pBR322 の除去を行い得られたプラスミドを pPF301-P1 とした。次に pPF301-P1 を保持する B. subtilis を pRBH1 やその派生プラスミドを用いて形質転換を行い両プラスミドの共存状態を得た。形質転換体を Cm (30 µg/ml) および Km (5 µg/ml) 含む L 培地にて培養後 ペニシリンase 活性

を検定した(表4-3)。 酵素の生産は pRBH1 や他のいずれのプラスミドが共存した場合にも強く抑制を受けた。プラスミドの共存状態において pPF301-P1 のコピー数は約50%の減少を示したが、酵素活性は数%にまで減少していることから、この顕著な抑制は pPF301-P1 のコピー数の減少によるものではない。従って共存しているプラスミド上の遺伝子産物がトランスに作用することにより、P1プロモーターからの転写が、抑制されたと考えられる。pRBH1上には Km 不活化酵素と RepB 蛋白質のみがコードされていることが全塩基配列の決定により既に明らかとなっている(図3-2, 図4-1)。以上のことから、トランスに作用することにより P1プロモーターからの転写を抑制したプラスミド上の遺伝

表4-3. P1プロモーターによる pen^P 遺伝子の発現におよぼす共存プラスミドの影響⁽⁶²⁾

Plasmids	Penicillinase activity		Relative copy number of pPF301-P1
	Units/OD ₆₆₀	Ratio in %	
pPF301-P1	5,600	100	1
pPF301-P1 + pRBH1	87	2	0.5
pPF301-P1 + pRBH1·IR	200	4	0.8
pPF301-P1 + pRBHC3	330	6	0.5
pPF301-P1 + pRBHC3·IR	290	5	0.6
pPF301-P1 + pRBHC7	310	6	0.5
pPF301-P1 + pRBHC7·IR	370	7	0.5

子産物は RepB 蛋白質であると考えられる。

第4節 考 察

プラスミド pRBH1 の複製開始領域には RepB 蛋白質がコードされており、この蛋白質内に起こったアミノ酸置換によりコピー数が増加したことから RepB 蛋白質がプラスミドのコピー数調節に関与していることを既に示した(第3章第3節)。本章では RepB 構造遺伝子上流に位置する逆方向繰り返し配列もまたコピー数制御に関与していることを明らかにした(表4-2)。この構造は逆方向の2つのプロモーター P1 および P3 によって囲まれており、P1 プロモーターからの転写が RepB 蛋白質により抑制されたことから RepB 蛋白質が逆方向繰り返し配列を認識している可能性がある。また、P1 プロモーターが複製開始点(ori)の上流に存在することから、P1 プロモーターからの転写産物(RNAI)がプラスミド DNA の複製のプライマーとして機能していると仮定すると RepB 蛋白質により DNA 複製の開始が負に調節されていることになる。この場合、通常の mRNA とは異なり高次構造をも含めた In situ での RNAI が重要であると考えられる。逆方向繰り返し配列ループ中央に一塩基置換が生じただけで pRBH1 のコピー数が3倍以上にも増加した(表4-2) 事実も RNAI の変化と考えれば上記の仮説と矛盾しない。

また、pRBHIにはプロモーターPIとRepB蛋白質のSD配列との間に NcoI と BstNI の切断点がそれぞれ1箇所存在している(図4-1)。pRBHIを NcoI により切断後DNAポリメラーゼI Klenowフラグメントによる末端修復を行った後のリガーゼ処理混合物により B. subtilis を形質転換したが形質転換体は得られなかった。同様の処理を BstNI についても行ったが、この場合も形質転換体は得られなかった。これらの結果もRNAIが一定の高次構造をとることによりプラスミドDNAの複製における重要な役割を果たすことができるという考え方を示唆するものであり、RNAIがRepB蛋白質のmRNAであるという仮定からは複製能の欠損を説明することはできない。

RNAIがプラスミドDNAの複製のプライマーとして働き、この合成がRepB蛋白質による負の調節を受けていると仮定したが同様の現象が E. coli のプラスミド ColE1 について2つの研究グループにより報告されている。一つは Tomizawa ら⁽⁶³⁾ によるプライマープロモーターからの転写がプラスミド上の遺伝子産物である63アミノ酸からなるRom蛋白質により抑制されるという報告である。もう一つは Cesareni ら⁽⁶⁴⁾ によるもので、Tomizawa らが galK 遺伝子を用いているのに対し彼らは lacZ 遺伝子の発現が ColE1 のプライマープロモーター下に置かれた系を用いて同様の抑制現象を観察しており、63アミノ酸からなる蛋白質がプライマー合成のリプレッサーではないかと推論している。

もし、RepB蛋白質がリプレッサー機能を持つならばDNAと結合すると考えられるので、多くのDNA結合蛋白質におい

て認められている共通配列⁽⁶⁵⁾ (Ala-N-N-N(疎水性)-Gly-N(疎水性)-N-N-N-N-Val (Ile)) を RepB 蛋白質中に求めた所、カルボキシル末端からアミノ末端 (73-54) にかけて (Thr-Val-Glu-Thr-Ala-Arg-Met-Phe-Gly-Val-Leu-Asn-Lys-Asn-Ile-Lys-Lys-Tyr-Gln-Met) という配列が存在した。このことは、RepB 蛋白質がプライマー RNA 合成のリポリクターであるという仮説の1つの傍証であると言えよう。

ColEI の DNA 複製開始点上流 400-555 塩基がコピー数調節に関与する領域であることが Tomizawa⁽⁶⁶⁾ により示されている。この領域には逆方向繰り返し配列が含まれており、プライマー RNA 前駆体の一部が一方の鎖に、他方の鎖には低分子 RNA がコードされている。そして、ColE1 DNA の複製開始はこの低分子 RNA がプライマー RNA 前駆体の相補的な配列に結合することにより阻害されること、更には Rom 蛋白質により相補的な RNA 間の結合が高められ結果として DNA 複製開始が著しく阻害されることが知られている⁽⁶⁷⁾。

pRBH1 のコピー数制御領域にも逆方向繰り返し配列が存在し逆方向のプロモーターにより囲まれている。この pRBH1 と ColE1 の構造上の類似性より RNA 分子による DNA 複製の制御という機構上の類似性が示唆される。また Rom 蛋白質はその構造と機能が詳細に調べられているので、RepB 蛋白質のアミノ酸配列と Rom 蛋白質のそれとの比較を行った。その結果、相同性の高い領域が RepB 蛋白質中に見箇所存在した (図4-5)。1つの領域は RepB 蛋白質のアミノ末端側 (7-65) に認めら

RepB SQKVVAEVIKQKPTVRWLFLLTLTKV-NVYDGE---LNKSLSDMAQGFRMMQYKKINKNLVG (7 - 65)
 = * * = == = = * = * = = = = *

Rom MTKQEKTALNMARFIRSQTLTLLEKLNELDADEQADICESLHDHADELYRSCLARFGDDGQNL (1 - 63)

RepB LSDLEE-GLHRKRLISYGGLLKEIHKLNLDDEEG-DLIHTDDDEKADEDFSIIAMWNWERKNY (168 - 231)
 ** = = = = = * == = * = * = = = = * * * =

Rom MTKQEKTALNMARFIRSQTLT--LLEKLNELDADEQADICESLHDH-ADELYRSCLARFGDDGQNL (1 - 63)

図4-5. RepB蛋白質とRom蛋白質間のアミノ酸配列の比較⁽⁶²⁾
 同一のアミノ酸は(=)で示し、同一グループ内のアミノ酸は(*)で示した。アミノ酸のグループ内置換は(D, E), (K, R), (S, T), (F, Y, W), (I, L, V, M)内で判断した。一文字標記による各アミノ酸の記号は A, アラニン; C, システイン; D, アスパラギン酸; E, グルタミン酸; F, フェニルアラニン; G, グリシン; H, ヒスタジン; I, イソロイシン; K, リジン; L, ロイシン; M, メチオニン; N, アスパラギン; P, プロリン; Q, グルタミン; R, アルギニン; S, セリン; T, スレオニン; V, バリン; W, トリアプトファン; Y, チロシンを用いた。

れ約30%の相同性を示し、もう一方はカルボキシル末端(168-231)で約41%の相同性を示した。このような相同性が存在することからRepB蛋白質もRom蛋白質の如く相補的なRNA分子の結合を高める機能を有していると推定される。

以上のことからプラスミド pRBH1 のコピー数調節機構に関する推論を図4-6に示す如くまとめることができる。プラスミドDNAの複製のプライマーとなるRNAIの合成が負の調節因子であるRepB蛋白質により逆方向繰り返し配

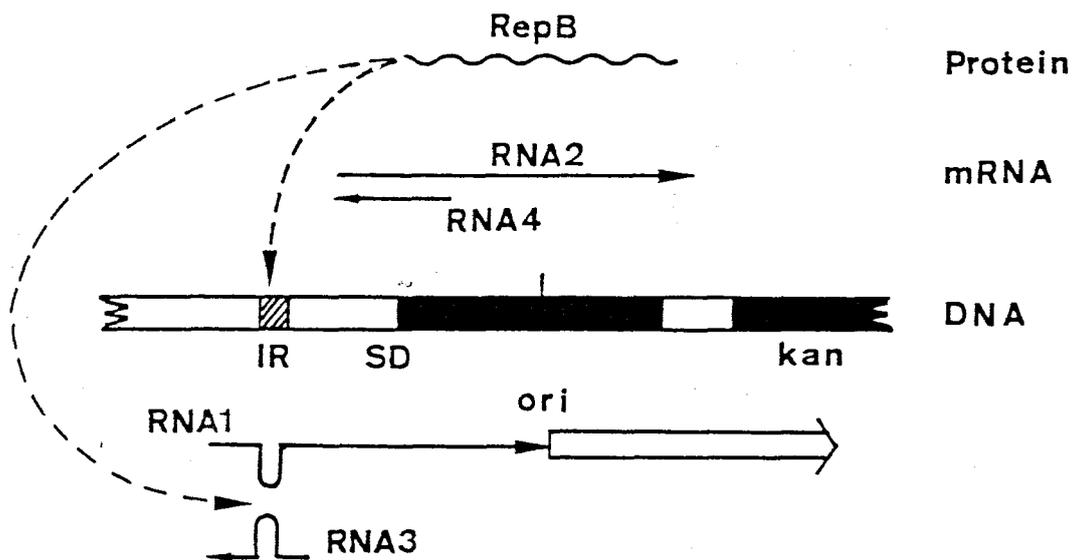


図4-6. pRBH1の複製制御に関する推定⁽⁶²⁾。pRBH1のDNA複製の推定図式を示す。プロモーターP1からP4よりの転写産物をそれぞれRNA1からRNA4とする。RNA1は複製開始上流で合成されDNA複製のプライマーとなるが相補的な低分子RNA3によりその形成を阻害される。RepB蛋白質はRNA2より翻訳される。そしてその合成は相補的な低分子RNA4により調節を受ける。RepB蛋白質は逆方向繰り返し配列(IR)に結合しリプレッサーとして機能する場合もあるがRom蛋白質様の機能によりRNA1とRNA3の結合を増す。

列(IR)の位置において抑制される。さらに相補的な低分子RNA3がIRを介してRNA1に作用することによりColEIと同様の機構⁽⁶⁶⁾によりDNA複製が阻害される。このRNA3による阻害効果はRepB蛋白質のRom蛋白質様の機能⁽⁶⁷⁾により強められる。またRepB蛋白質の合成は、そのmRNAであるRNA2のSD配列が相補的な低分子RNA4により覆われることにより翻訳レベルでの調節を受ける。

この調節により RepB 蛋白質の細胞内濃度が適当なレベルに保たれる。この様なリボソームの mRNA への結合を阻害することによる蛋白質合成の調節は E. coli の OmpC⁽⁶⁸⁾ 蛋白質や R1 プラスミドの repA⁽⁶⁹⁾ 蛋白質において実証されている。pUB110 の転写産物⁽⁷⁰⁾ は E. coli や B. subtilis の RNA ホリメラーゼを用いた in vitro 転写実験により解析されており、2種の低分子 RNA (80 塩基 および 250 塩基) の存在が報告されている。80 塩基からなる RNA 分子が RNA3 に、250 塩基のものが RNA4 にそれぞれ対応する可能性が考えられる。プロモーター検索用ベクターを用いた実験において RNA3 の活性が検出されなかったのは、RNA3 が低分子すぎるためにペニシリナーゼの構造遺伝子にまで至らなかったものと考えられる。

第5節 要約

1. RepB 蛋白質構造遺伝子上流に存在する逆方向繰り返し配列ループ中央に一塩基置換を導入するとコピー数が増加したことから、この領域がコピー数調節に関与することが示された。

2. プロモーター検索用ベクターを用いることによりプロモーター P1, P2, P4 が in vivo で機能することが判明した。

3. P1プロモーターからの転写が RepB 蛋白質により抑制されたことからプラスミド DNA の複製開始反応が負に調節されていることが示唆された。

4. RepB 蛋白質中に、DNA 結合蛋白質に認められる共通配列が認められた。

5. RepB 蛋白質のアミノ末端側とカルボキシル末端側に ColE1 の Rom 蛋白質と相同性が高い部分が存在した。

6. pRBH1 のコピー数調節に関し得られたデータと E. coli のプラスミド ColE1 との類似性からプラスミド DNA のコピー数調節機構について考察を行った。

総括と展望

遺伝子操作技術の発展に伴い有用物質の生産を行わせる際のベクタープラスミドの役割は非常に重要である。しかしこれまでに成された研究の多くは大腸菌のものについてであり工業的に有用な Bacillus 属細菌内におけるプラスミドの複製制御に関する研究はほとんど成されていない。従って、Bacillus 属細菌において有効なベクターについての複製制御について基礎的知見を得ることは非常に重要であるとの観点から本研究を行った。自然界より単離された好熱性 Bacillus 属細菌が保持していた薬剤耐性プラスミド pTB19 およびその派生プラスミドを用いて成された本研究の結果は以下の様に総括できる。

第1章では、pTB19 上に2種の複製決定因子 repA および repB が存在することも示し、repA が B. subtilis 内でのみ複製するのに対し repB は B. subtilis, B. stearothermophilus 両宿主菌内において複製可能であることを明らかにした。pTB19 より得られた repB を含む小型プラスミド pTB90 には B. stearothermophilus の潜在性プラスミドに由来する 1.0 MDa EcoRI 断片が含まれており、B. stearothermophilus に対する形質転換頻度を著しく増大させると共に同宿主内でのコピー数を低下させる因子であることを示した。

第2章では、repB を含む多コピー数プラスミド pTB913 を用い B. stearothermophilus における in vitro DNA 複製系の開

発を試みたが、ATPを要求する熱安定なポリdAT合成活性という興味ある反応は認められたがDNA複製には至らなかった。

第3章では、pTB913 および pUB110 の複製必須領域について塩基配列の決定を行い、両者の塩基配列がほとんど同一であることを発見すると共に、領域内に逆方向繰り返し配列、RepB蛋白質の構造遺伝子、プロモーター配列を見出した。さらにコピー数変異プラスミドの解析から RepB 蛋白質が複製調節に関与していることが示された。

第4章では、逆方向繰り返し配列もまたコピー数調節に関与していることを示すと共に、プロモーター活性の *in vivo* での検出並びに RepB 蛋白質による P1 プロモーター活性の抑制作用を明らかにすると共に、*E. coli* のプラスミド ColEI との類似性よりプラスミドのコピー数調節が RNA 分子間の相互作用により行われているとの考察を行った。

以上のことから、repB プラスミドの複製制御に関する知見は *B. subtilis* においての多コピー数ベクターである pUB110 にも適用可能であり、pUB110 が広く *Bacillus* 属細菌を宿主とできる⁽⁵⁵⁾ことを考え合わせると、このレプリコンには *Bacillus* 属細菌で一般的に通用する基本型が含まれている可能性がある。pUB110 に関しては、数多くの *dna Ts* 変異株を用いた研究⁽⁷¹⁾により、DNAポリメラーゼ I を必要とせ

ず DNA ポリメラーゼ III をその複製に必要とすることが知られているが、他の因子については未解明のままであり宿主側の因子の同定が待たれる。また repB プラスミドのコピー数調節機構が ColE1 と類似点を有しておりそれに関与している蛋白質にも相同性があることを認めたと、S. aureus のプラスミド pTI81⁽⁷²⁾ においてもそのコピー数調節機構が ColE1 と類似していることが示されており E. coli で得られた知見がグラム陽性菌のプラスミドにおいても適用される点に興味深い。

E. coli のプラスミドの複製機構は大きく分けて 2 つに分類できる。一つは低分子 RNA が複製制御の中心的役割を担っている ColE1 に代表されるグループで IncFII⁽⁴⁷⁾ に含まれる RI, NRI (RI00), R6-5 などが含まれる。もう一つは、R6K に代表される同方向繰り返し配列が複製制御領域に存在することにより Rep 蛋白質を中和することによる複製制御機構を持つプラスミドで比較的低コピー数の F⁽⁴⁷⁾, PI⁽⁴⁷⁾, pSC101⁽²⁾, RtsI⁽⁷³⁾ などが含まれる。この分類が Bacillus 属のプラスミドにも適用可能とすれば pTB913, pUB110, pTI81 の如く比較的高いコピー数の高いプラスミドが ColE1 との類似性から前者に属するのは明らかである。逆に repA を保持する pTB53 (コピー数 = 約 8) の様な比較的低コピー数の低いプラスミドが後者のグループの様に同方向繰り返し配列を含んでいるか否かという点は複製制御機構の普遍性という点からも興味深いと言えよう。

Bacillus 属細菌におけるプラスミド DNA 複製制御

機構の解明について今後更に検討されなければならない最重要課題は in vitro 複製系の開発である。これ無くしては複製蛋白質の精製も難しく従ってその作用機作の解明も困難であると言えよう。開発に際しては、より詳細な宿主およびプラスミドの遺伝解析、各必須因子の分画・精製が必要とされるであろう。また B. subtilis の場合はヌクレアーゼ活性が E. coli に較べて高い事が示されている⁽⁴⁵⁾ のでこの活性に対する阻害剤の検討も有効であると考えられる。in vitro 複製系は最終的には精製された宿主因子を加えた再構成系に成る必要がある。しかし、これは緒論で述べた如く複製開始反応あるいはその後の伸長反応についての解析手段としてのみ有効であると言える。in vivo においてプラスミドのコピー数は、複製開始の頻度において調節されているもののそれにく、DNAの分配問題などにもプラスミドが安定に保持される上での重要な問題が含まれている。このことは常に in vivo での複製様式を考慮に入れる必要があることを意味している。Bacillus 属プラスミドの複製研究は緒に着いたばかりであるとも言え今後の生化学的研究並びに新しい実験技術の開発が望まれると共により一層の発展が期待される興味ある研究対象であると考えられる。

参 考 文 献

1. Kornberg, A. 1980. DNA Replication, W.H. Freeman, Co. San Francisco.
2. Kornberg, A. 1982. Supplement to DNA replication, W.H. Freeman, Co. San Francisco.
3. Jacob, F., S. Brenner, and F. Cuzin. 1963. On the regulation of DNA replication in bacteria. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 28, 329 - 348.
4. Sakakibara, Y., and J. Tomizawa. 1974. Replication of colicin E1 plasmid DNA in cell extract. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 71, 802 -806.
5. Inuzuka, M., and D.R. Helinski. 1978. Replication of antibiotic resistance plasmid R6K DNA in vitro. Biochemistry 17, 2567 -2573.
6. Diaz, R., and K. Nordström. 1981. Plasmid R1 DNA replication dependent on protein synthesis in cell-free extracts of E. coli. Nature(London) 289, 326 - 328.
7. Staudenbauer, W.L. 1976. Replication of small plasmids in extracts of Escherichia coli. Mol. Gen. Genet. 145, 273 - 280.
8. Bezanson, G.S., and W. Goebel. 1979. In vitro system for the replication of the mini R1 factor Rsc11. Mol. Gen. Genet. 170, 49 - 56.
9. Fuller, R.S., J.M. Kaguni, and A. Kornberg. 1981. Enzymatic replication of the origin of the Escherichia coli chromosome.

- Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 78, 7370 - 7374.
10. Diaz, R., and W.L. Staudenbauer. 1982. Replication of the broad host range plasmid RSF1010 in cell-free extracts of Escherichia coli and Pseudomonas aeruginosa. Nucleic Acids Res. 10, 4687 - 4702.
 11. Conrad, S.E., and J.L. Campbell. 1979. Characterization of an improved in vitro DNA replication system for Escherichia coli plasmids. Nucleic Acids Res. 6, 3289 - 3304.
 12. Tsurimoto, T., and K. Matsubara. 1982. Replication of λ dv plasmid in vitro promoted by purified λ O and P proteins. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 79, 7639 - 7643.
 13. Kojo, H., B.D. Greenberg, and A. Sugino. 1981. Yeast 2- μ m plasmid DNA replication in vitro : origin and direction. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 78, 7261 - 7265.
 14. Khan, S.A., S.M. Carleton, and R.P. Novick. 1981. Replication of plasmid pT181 DNA in vitro : requirement for a plasmid-encoded product. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 78, 4902 - 4906.
 15. Priest, F.G. 1977. Extracellular enzyme synthesis in the genus Bacillus. Bacteriol. Rev. 41, 711 - 753.
 16. Moriya, S., N. Ogasawara, and H. Yoshikawa. 1985. Structure and function of the region of the replication origin of the Bacillus subtilis chromosome. III. Nucleotide sequence of some 10,000 base pairs in the origin region. Nucleic Acids Res. 13, 2251 - 2265.
 17. Dubnau, D. 1983. Molecular cloning in Bacillus subtilis. In Experimental manipulation of gene expression. (ed. M. Inouye), pp. 33 - 51, Academic Press, New York.

18. Horinouchi, S., and B. Weisblum. 1982. Nucleotide sequence and functional map of pE194, a plasmid that specifies inducible resistance to macrolide, lincosamide, and streptogramin type B antibiotics. *J. Bacteriol.* 150, 804 - 814.
19. Gryczan, T.J., J. Hahn, S. Contente, and D. Dubnau. 1982. Replication and incompatibility properties of plasmid pE194 in Bacillus subtilis. *J. Bacteriol.* 152, 722 - 735.
20. Horinouchi, S., and B. Weisblum. 1982. Nucleotide sequence and functional map of pC194, a plasmid that specifies inducible chloramphenicol resistance. *J. Bacteriol.* 150, 815 -825.
21. Iordanescu, S., and M. Surdeanu. 1983. Isolation and complementation of temperature-sensitive replication mutants of Staphylococcus aureus plasmid pC194. *Mol. Gen. Genet.* 191, 201 - 206.
22. Imanaka, T., M. Fujii, and S. Aiba. 1981. Isolation and characterization of antibiotic resistance plasmids from thermophilic bacilli and construction of deletion plasmids. *J. Bacteriol.* 146, 1091 - 1097.
23. Imanaka, T., M. Fujii, I. Aramori, and S. Aiba. 1982. Transformation of Bacillus stearothermophilus with plasmid DNA and characterization of shuttle vector plasmids between Bacillus stearothermophilus and Bacillus subtilis. *J. Bacteriol.* 149, 824 - 830.
24. Thomas, C.M., A.A.K. Hussain, and C.A. Smith. 1982. Maintenance of broad host range plasmid RK2 replicons in Pseudomonas aeruginosa. *Nature(London)* 298, 674 - 676.
25. Imanaka, T., T. Ano, M. Fujii, and S. Aiba. 1984. Two replication

- determinants of an antibiotic-resistance plasmid, pTB19, from a thermophilic bacillus. J. Gen. Microbiol. 130, 1399 - 1408.
26. Imanaka, T., T. Tanaka, H. Tsunekawa, and S. Aiba. 1981. Cloning of the genes for penicillinase, penP and penI, of Bacillus licheniformis in some vector plasmids and their expression in Escherichia coli, Bacillus subtilis, and Bacillus licheniformis. J. Bacteriol. 147, 776 - 786.
27. Birnboim, H.C., and J. Doly. 1979. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. Nucleic Acids Res. 7, 1513 - 1523.
28. Anagnostopoulos, C., and J. Spizizen. 1961. Requirements for transformation in Bacillus subtilis. J. Bacteriol. 81, 741 - 746.
29. Maniatis, T., E.F. Fritsch, and J. Sambrook. 1982. In Molecular Cloning, a Laboratory Manual, pp. 136 - 139, 382 - 389. Cold Spring Harbor Laboratory, New York.
30. Kieser, T., D.A. Hopwood, H.M. Wright, and C.J. Thompson. 1982. pIJ101, a multi-copy broad host-range Streptomyces plasmid : functional analysis and development of DNA cloning vectors. Mol. Gen. Genet. 185, 223 - 238.
31. Tanaka, T., and N. Sueoka. 1983. Site-specific in vitro binding of plasmid pUB110 to Bacillus subtilis membrane fraction. J. Bacteriol. 154, 1184 - 1194.
32. Card, G.L., C.E. Georgi, and W.E. Miltzer. 1969. Phospholipids from Bacillus stearothermophilus. J. Bacteriol. 97, 186 - 192.

33. Hofemeister, J., M. Israeli-Reches, and D. Dubnau. 1983. Integration of plasmid pE194 at multiple sites on the Bacillus subtilis chromosome. Mol. Gen. Genet. 189, 58 - 68.
34. Danbara, H., J.K. Timmis, R. Lurz, and K.N. Timmis. 1980. Plasmid replication functions : two distinct segments of plasmid R1, RepA and RepD, express incompatibility and are capable of autonomous replication. J. Bacteriol. 144, 1126 - 1138.
35. Perlman, D., and R.H. Rownd. 1976. Two origins of replication in composite R plasmid DNA. Nature (London) 259, 281 - 284.
36. Yoshikawa, M. 1974. Identification and mapping of the replication genes of an R factor, R100-1, integrated into the chromosome of Escherichia coli K-12. J. Bacteriol. 118, 1123 - 1131.
37. Tomizawa, J., and T. Itoh. 1981. Plasmid ColE1 incompatibility determined by interaction of RNAI with primer transcript. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 78, 6096 - 6100.
38. Stougaard, P., S. Molin, and K. Nordström. 1981. RNAs involved in copy-number control and incompatibility of plasmid R1. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 78, 6008 - 6012.
39. Stenesh, J., and B.A. Roe. 1972. DNA polymerase from mesophilic and thermophilic bacteria. I. Purification and properties of DNA polymerase from Bacillus licheniformis and Bacillus stearothermophilus. Biochim. Biophys. Acta 272, 156 - 166.
40. Kaboev, O.K., L.A. Luchkina, A.T. Akhmedov, and M.L. Bekker. 1981. Purification and properties of deoxyribonucleic acid polymerase from Bacillus stearothermophilus. J. Bacteriol. 145, 21 - 26.
41. Messing, J. 1983. New M13 vectors for cloning. Methods in Enzymology 101, 20 - 78.

42. Pelham, H.R.B., and R.J. Jackson. 1976. An efficient mRNA-dependent translation system from reticulocyte lysates. *Eur. J. Biochem.* 67, 247 - 256.
43. Ano, T., T. Imanaka, and S. Aiba. 1985. De novo synthesis of poly(dAT) by the cell extract of a thermophile Bacillus stearothermophilus carrying a plasmid pTB913. *FEMS Microbiol. Lett.* 26, 131 - 134.
44. Burd, J.F., and R.D. Wells. 1970. Effect of incubation conditions on the nucleotide sequence of DNA products of unprimed DNA polymerase reactions. *J. Mol. Biol.* 53, 435 - 459.
45. Okazaki, T., and A. Kornberg. 1964. Enzymatic synthesis of deoxyribonucleic acid. XV. Purification and properties of a polymerase from Bacillus subtilis. *J. Biol. Chem.* 239, 259 - 268.
46. Matsumura, M., Y. Katakura, T. Imanaka, and S. Aiba. 1984. Enzymatic and nucleotide sequence studies of a kanamycin-inactivating enzyme encoded by a plasmid from thermophilic bacilli in comparison with that encoded by plasmid pUB110. *J. Bacteriol.* 160, 413 - 420.
47. Scott, J. R. 1984. Regulation of plasmid replication *Microbiol. Rev.* 48, 1 - 23.
48. Maxam, A.M., and W. Gilbert. 1980. Sequencing end-labeled DNA with base-specific chemical cleavages. *Methods Enzymol.* 65, 499 - 560.
49. Zubay, G. 1973. In vitro synthesis of protein in microbial systems. *Ann. Rev. Genet.* 7, 267 - 287.

50. Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature (London)* 227, 680 - 685.
51. Muller, R.E., T. Ano, T. Imanaka, and S. Aiba. 1986. Complete nucleotide sequences of Bacillus plasmids pUB110dB, pRBH1 and its copy mutants. *Mol. Gen. Genet.* " in press ".
52. Scheer-Abramowitz, J., T.J. Gryczan, D. Dubnau. 1981. Origin and mode of replication of plasmids pE194 and pUB110. *Plasmid* 6, 67 - 77.
53. Takagi, M., T. Imanaka, and S. Aiba. 1985. Nucleotide sequence and promoter region for the neutral protease gene from Bacillus stearothermophilus. *J. Bacteriol.* 163, 824 - 831.
54. Shivakumar, A.G., J.Hahn, D. Dubnau. 1979. Studies on the synthesis of plasmid-coded proteins and their control in Bacillus subtilis minicells. *Plasmid* 2, 279 - 289.
55. Keggins, K.M., P.S. Lovett, and E.J. Duvall. 1978. Molecular cloning of genetically active fragments of Bacillus DNA in Bacillus subtilis and properties of the vector plasmid pUB110. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 75, 1423 - 1427.
56. Brown, B.J., and B.C. Carlton. 1980. Plasmid-mediated transformation in Bacillus megaterium. *J. Bacteriol.* 142, 508 - 512.
57. Stalker, D.M., M. Filutowicz, and D.R. Helinski. 1983. Release of initiation control by a mutational alteration in the R6K π protein required for plasmid DNA replication. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 80, 5500 - 5504.

58. Armstrong, K.A., R. Acosta, E. Ledner, Y. Machida, M. Pancotto, M. McCormick, H. Ohtsubo, and E. Ohtsubo. 1984. A 37×10^3 molecular weight plasmid-encoded protein is required for replication and copy number control in the plasmid pSC101 and its temperature-sensitive derivative pHS1. *J. Mol. Biol.* 175, 331 - 347.
59. Kamio, Y., A. Tabuchi, Y. Itho, H. Katagiri, and Y. Terawaki. 1984. Complete nucleotide sequence of mini-Rts1 and its copy mutant. *J. Bacteriol.* 158, 307 - 312.
60. Nakajima, R., T. Imanaka, and S. Aiba. 1985. Nucleotide sequence of the Bacillus stearothermophilus α -amylase gene. *J. Bacteriol.* 163, 401 - 406.
61. Imanaka, T., T. Himeno, and S. Aiba. 1985. Effect of in vitro DNA rearrangement in the NH₂-terminal region of the penicillinase gene from Bacillus licheniformis on the mode of expression in Bacillus subtilis. *J. Gen. Microbiol.* 131, 1753 - 1763.
62. Ano, T., T. Imanaka, and S. Aiba. 1986. Copy number of Bacillus plasmid pRBH1 is negatively controlled by RepB protein. *Mol. Gen. Genet.* " in press ".
63. Som, T., and J. Tomizawa. 1983. Regulatory regions of ColE1 that are involved in determination of plasmid copy number. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 80, 3232 - 3236.
64. Cesareni, G., M.A. Muesing, and B. Polisky. 1982. Control of ColE1 DNA replication : The rop gene product negatively effects transcription from the replication primer promoter. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 79, 6313 - 6317.

65. Pabo, C.O., and R.T. Sauer. 1984. Protein-DNA recognition. *Ann. Rev. Biochem.* 53, 293 - 321.
66. Tomizawa, J. 1984. Control of ColE1 plasmid replication : The process of binding of RNAI to the primer transcript. *Cell* 38, 861 - 870.
67. Tomizawa, J., and T. Som. 1984. Control of ColE1 plasmid replication : Enhancement of binding of RNAI to the primer transcript by the Rom protein. *Cell* 38, 871 - 878.
68. Mizuno, T., M.-Y. Chou, M. Inouye. 1984. A unique mechanism regulating gene expression : Translation inhibition by a complementary RNA transcript (micRNA). *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 81, 1966 - 1970.
69. Light, J., and S. Molin. 1983. Post-transcriptional control of expression of the repA gene of plasmid R1 mediated by a small RNA molecule. *EMBO J.* 2, 93 - 98.
70. Brückner, R., E. Zyprian, and H. Matzura. 1984. Expression of a chloramphenicol-resistance determinant carried on hybrid plasmids in gram-positive and gram-negative bacteria. *Gene* 32, 151 - 160.
71. Shivakumar, A.G., and D. Dubnau. 1978. Plasmid replication in dna Ts mutants of Bacillus subtilis. *Plasmid* 1, 405 - 416.
72. Kumar, C.C., and R.P. Novick. 1985. Plasmid pT181 replication is regulated by two countertranscripts. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 82, 638 - 642.
73. Terawaki, Y., and Y. Itoh. 1985. Copy mutant of mini-Rts1 : Lowered binding affinity of mutated RepA protein to direct repeats. *J. Bacteriol.* 162, 72 - 77.

謝 辞

本研究を行うに際し、終始御懇篤なる御指導と御鞭撻を賜わりました大阪大学工学部・合葉修一教授に深甚なる感謝の意を表します。また、本研究を遂行する過程において適切なる御助言をもって御指導いただきました大阪大学工学部・今中忠行助教授に深謝いたします。

本論文を作成する際に、有益なる御助言、御教示を賜わりました大阪大学工学部・大嶋泰治教授、岡田弘輔教授、田口久治教授に感謝の意を表します。

本研究の過程において御協力並びに実りある討論をしていただきました藤井幹夫博士、Robert E. Muller 博士に感謝いたします。さらに、様々な研究の便宜を図っていただきました大阪大学工学部・松岡正佳博士、現島根大学・小泉淳一助教授をはじめとする教室員の方々、本研究に御協力下さいました水谷充宏氏、石川裕一氏に感謝の意を表します。

本論文に關係ある報告

1. Two replication determinants of an antibiotic-resistance plasmid, pTB19, from a thermophilic bacillus
Journal of General Microbiology, 130, 1399 - 1408
(1984).
2. De novo synthesis of poly(dAT) by the cell extract of a thermophile *Bacillus stearothermophilus* carrying a plasmid pTB913
FEMS Microbiology Letters, 26, 131 - 134 (1985).
3. Complete nucleotide sequences of *Bacillus* plasmids pUB110dB, pRBH1 and its copy mutants
Molecular and General Genetics, " in press " (1986).
4. Copy number of *Bacillus* plasmid pRBH1 is negatively controlled by RepB protein
Molecular and General Genetics, " in press " (1986).