



Title	放線菌プラスミドpSN22の接合伝達に必要なタンパク質TraRおよびTraBの分子生物学的解析
Author(s)	古園, さおり
Citation	大阪大学, 1996, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.11501/3110036
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

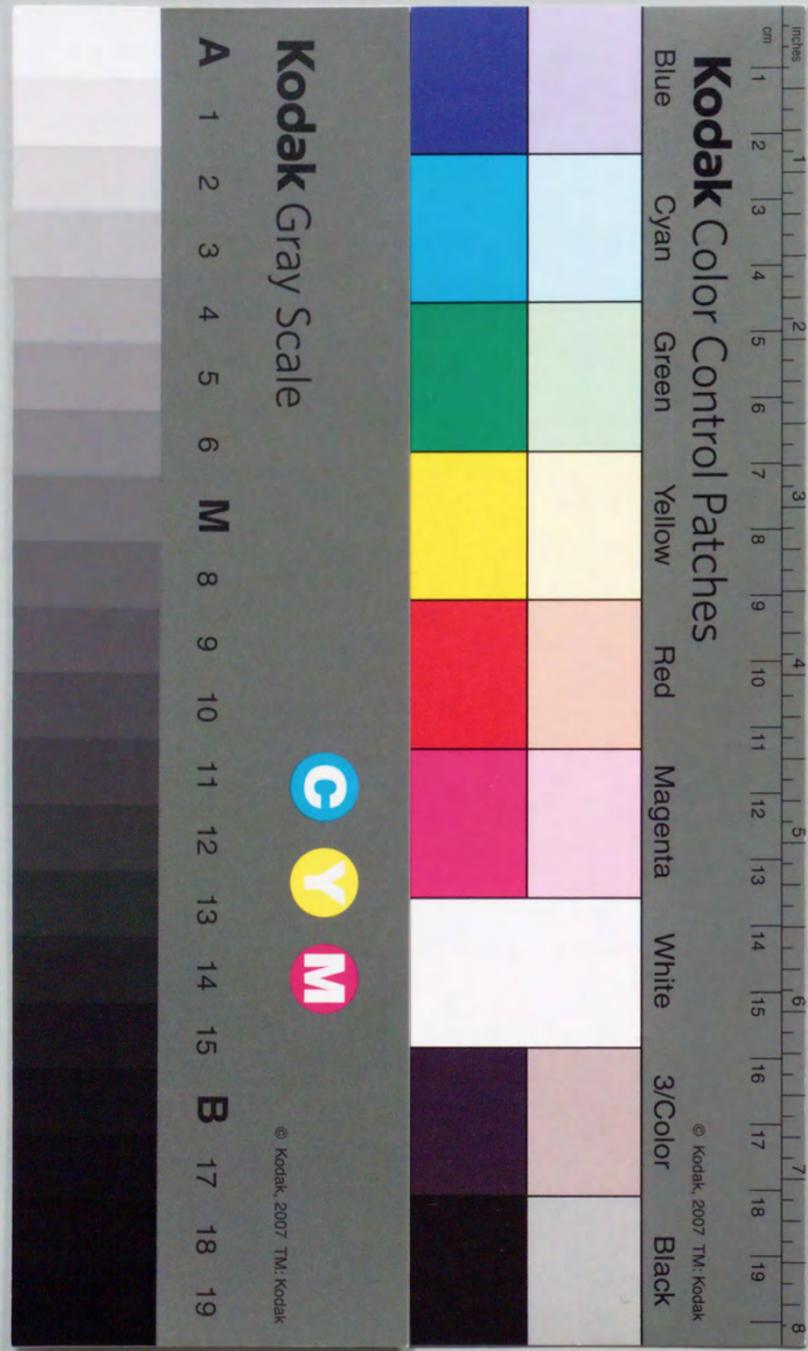
<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

放線菌プラスミド pSN22 の接合伝達に
必須なタンパク質 TraR および TraB の
分子生物学的解析

1996 年

古園 さおり



①

放線菌プラスミド pSN22 の接合伝達に
必須なタンパク質 TraR および TraB の
分子生物学的解析

1996 年

古園 さおり

目次

緒論.....	1
第1章 pSN22群の発現制御機構	
第1節 緒言.....	10
第2節 実験材料および方法.....	11
第3節 結果および考察	
第1項 伝達関連遺伝子転写制御領域 (Transfer-gene Regulating Element: TRE) の構造.....	23
第2項 遺伝子発現の負の制御における TraA 効果.....	26
第3項 制御タンパク質TraRとTRE間の結合解析.....	28
第4項 発現制御におけるTREbox4領域の役割.....	34
第5項 プラスミド伝達におけるTREbox4領域の役割.....	38
第6項 pSN22伝達関連遺伝子群の発現制御機構.....	39
第4節 要約.....	41
第2章 TraBタンパク質におけるNTP結合モチーフのDNA伝達における役割	
第1節 緒言.....	42
第2節 実験材料および方法.....	43
第3節 結果および考察	
第1項 プラスミド伝達と染色体移行における Walker Type-A 配列の関与.....	46
第2項 Walker Type-B 配列の同定.....	47
第3項 放線菌伝達性プラスミドの菌糸間伝達を支配する Tra タンパク質の構造.....	51
第4節 要約.....	55

第3章 TraBタンパク質の局在性	
第1節 緒言.....	56
第2節 実験材料および方法.....	56
第3節 結果および考察	
第1項 c-Myc 融合 TraB タンパク質 (TraBmB) の構築.....	60
第2項 TraBmB タンパク質の局在性.....	61
第3項 分化段階による TraB 発現制御の可能性.....	63
第4項 TraBタンパク質の菌糸内伝達への関与.....	64
第4節 要約.....	66
第4章 総合考察.....	67
参考文献.....	72
本研究に関する論文.....	80
その他の関係する論文.....	80
謝辞.....	81

緒論

プラスミドの研究は、1946-7年 Lederberg と Tatum が細菌にも性的交雑が起こることを発見し、引き続き数年間に、この役割が F 因子により担われることを明らかにしたところから始まる (Jacob & Wollman, 1961; 松原, 1976)。彼らは、大腸菌 K-12 株由来の 2 つの二重要求性変異株の混合培養から 10^6 の頻度で野生型コロニーが出現することを発見した (Lederberg & Tatum, 1946)。この現象は、細菌間の接合 (Conjugation) によりしかるべき遺伝情報が雄性細胞から雌性細胞へ転送されることによって起こることが明らかにされ、雄性を決定し稔性 (Fertility) を担う因子として F 因子が同定された。また、1950 年代の日本において赤痢菌の薬剤耐性が問題となっていたが、1959 年に秋葉朝一郎と落合国太郎は、4 剤耐性の大腸菌から感受性赤痢菌へ薬剤耐性因子が伝達されることを報告し、その後日本を中心として、多剤耐性遺伝子を伝達する R 因子に関する研究が華々しく展開された (松原, 1976; 吉川, 1995)。上記の 2 例は、細菌の栄養要求性や薬剤耐性等の形質獲得の機序として、突然変異と選択よりも、プラスミド性のもののほうがはるかに重要であったことを明確に示した例である。プラスミドという語は、1952 年、Lederberg によって細胞質で増殖する自己複製因子を総称するために提唱されたのが始まりであるが (Lederberg, 1952)、今日プラスミドに与えられる妥当な定義は、「細菌細胞内において、宿主染色体とは別個であるが協調するレプリコン (複製単位) として増殖し、細胞分裂を通して娘細胞に分配され、安定に維持される遺伝単位」とされている (松原, 1976)。

プラスミドの注目される側面の 1 つは、細菌の進化との関わりである (松原, 1976; Mazodier & Davies, 1991; Amabile-Cuevas & Chicurel, 1992)。進化の原動力は、基本的には突然変異の蓄積であると考えられているが、遺伝子交換現象もまた、ダイナミックな遺伝情報の変化を

もたらすプロセスとして進化に大きく貢献してきたと考えられる。有性生殖のある真核生物においては、遺伝子交換現象は、交雑を通して行なわれる。しかし、基本的に有性生殖のない細菌においてはそのような機会はなく、それに代わるものとして、プラスミドによる遺伝子の水平伝播 (Horizontal transfer) が細菌の遺伝的多様性を増すこと、ひいては細菌の進化に重要な役割を果たしてきたと言われている。プラスミドが関与する遺伝子交換反応には、2つの異なる機能があると考えられる (図 0-1)。第 1 は、遺伝子交換の際の運び屋 (ベクター) として機能することである (図 0-1, (1))。この点では、伝達性で広宿主域であるほど、ベクターとして働く可能性が高い。前述の F 因子と R 因子による接合伝達の例は、プラスミドの助けを借りた性的交雑と見ることができる。第 2 に、遺伝子交換における遺伝子プールとして機能することである (図 0-1, (2))。プラスミドゲノムにはウィルスのように殻に包込むためのサイズの制限がなく、多種の DNA が細胞内に長時間共存できる特性がある。このような状況は、宿主染色体をも含めたレプリコン間の遺伝子交換の機会を増やすことにつながる。

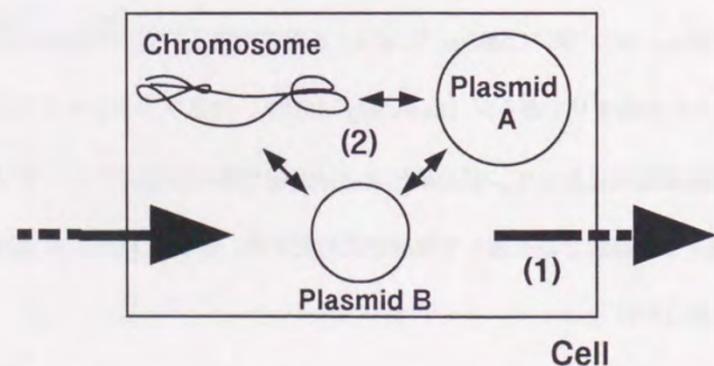


図 0-1 プラスミドによる遺伝子交換。

応用的側面では、遺伝子操作技術におけるベクターとしての利用が挙げられる。また接合伝達を利用した遺伝子導入方法は、(1)宿主の制限系、(2)コンピテント細胞の調製と再生の問題を回避できる点が有利である。放線菌を例にとれば、その高い有用性から遺伝子操作のための宿主ベクター系の確立が望まれながら、実際には限られた菌種でしかプロトプラストを経由する形質転換法は確立されていない。実際に、接合伝達による遺伝子導入法は、様々な細菌宿主に対して応用されており、良く知られている例としては、RK2由来プラスミドを利用した 3 者会合法による大腸菌から *Agrobacterium tumefaciens* へのバイナリーベクター導入が挙げられる (Figurski & Helinski, 1979)。

プラスミド伝達機構に関する研究は、大腸菌の F 因子をはじめとして、主にグラム陰性細菌の伝達性プラスミドについて行なわれてきた。その内容は、幾つかの優れた総説に総括されている (Ippen-Ihler & Minkley, 1986; Ippen-Ihler & Skurray, 1993; Guiney, 1993; Wilkins & Lanka, 1993; Farrand, 1993)。F 因子を例として要点のみを述べれば、プラスミド伝達の過程は、伝達される 1 本鎖 DNA (ssDNA) の生成と、ssDNA の細胞間輸送の 2 つのサブプロセスに分けられる。2 つのサブプロセスは、接合伝達型複製 (Conjugative replication) と呼ばれるローリングサークル型複製に似たメカニズムを通して連携している (図 0-2; Guiney, 1993; Waters & Guiney, 1993)。この時の複製起点は、通常の増殖において使用される起点 *oriV* (Origin of vegetative growth) とは異なる *oriT* (Origin of transfer) が使用される。接合伝達型複製は細胞膜上で行なわれ、生成した ssDNA は、ssDNA 結合タンパク質 (SSB) にコートされた状態で直ちに受容菌側へ移行する。DNA は、タンパク質性の輸送通路 (DNA translocation apparatus または membrane pore) を通して細胞間を移動し、この過程は ATP 加水分解とエネルギー共役していると考えられている。受容菌では移行された ssDNA を鋳型に相補鎖が合成され、2 本鎖のプラスミドが再現する (図 0-2)。一般に、移動性プラスミドには、伝達性

(Transmissible) と可動性 (Mobilizable) のものが存在し、前者は自己伝達能を有するが、後者は前者との共存により初めて可動化される。伝達性プラスミドの伝達機能を担う *tra* と呼ばれる遺伝子座は、ssDNA の生成と ssDNA 輸送の両方に必要な機能を備えているが、可動性プラスミド上の遺伝子座 *mob* は、ssDNA の生成に必要な機能のみを備えており、可動性プラスミドは、共存する伝達性プラスミドの *tra* 機能をかりて可動化すると考えられる。

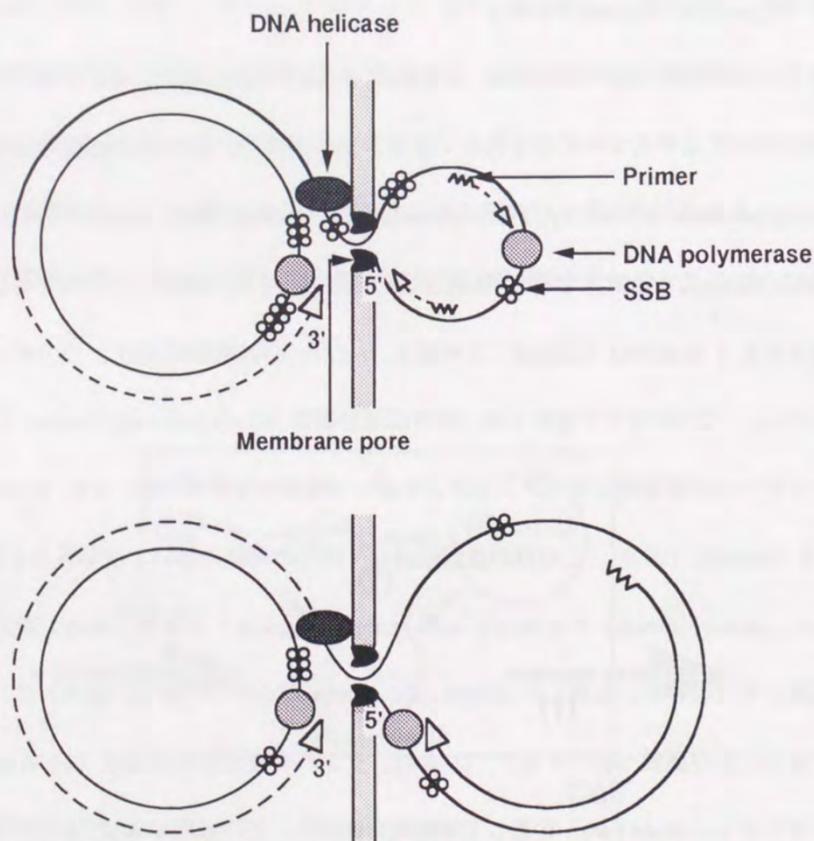


図0-2 グラム陰性細菌プラスミドの接合伝達モデル。

上記のような膜を介した DNA 分子の輸送系は、細菌の接合伝達以外にも存在する。例として、*A. tumefaciens* Ti プラスミドによる植物への T-DNA 移行、*Bacillus subtilis* の DNA 取り込み系、ファージゲノムの宿主細胞への挿入が挙げられる (Dubnau 1991; Citovski & Zambryski, 1993; Kado, 1994)。最近の研究では、これらの DNA 輸送メカニズムにおける類似性が指摘されており (Lessl *et al.*, 1992; Lessl & Lanka, 1994; Kado, 1994)、生物界における DNA 膜輸送に共通するコンセンサスが得られつつある (Dreiseikelmann, 1994)。

放線菌 (*Streptomyces* 属) は、カビに似た菌糸形態を有し、複雑な形態分化を特徴とするグラム陽性の菌群である。その多くは土壌より分離され、抗生物質や酵素阻害剤を初めとする多種多様な生理活性物質を生産することから高い実用的価値を有する菌株が数多く属しており、医薬産業分野において重要な位置を占める。放線菌の遺伝子操作技術は、Okamishi らによるプロトプラスト調製と再生系の確立 (Okamishi *et al.*, 1974)、Bibb らによるプラスミド DNA での *Streptomyces coelicolor* のプロトプラスト形質転換の成功 (Bibb *et al.*, 1978) を始めとして、その後、Hopwood を中心とした研究グループにより整備され、その中で放線菌プラスミドの研究も主にベクター開発を目的として進められた。

放線菌における接合伝達 (Hopwood & Kieser, 1993) は、Hopwood が *S. coelicolor* について報告したのが最初である (Hopwood, 1959)。接合伝達を担う因子としてプラスミドの存在が示唆され、Schrempf らが、初めてプラスミド SCP1 を物理的に単離した (Schrempf *et al.*, 1975)。放線菌の接合伝達は、多くの場合ボックスと呼ばれる増殖もしくは形態分化の遅延ゾーンの形成を伴うため、プラスミドの存在が容易に知られる。逆にこのような事情から、現在までに同定されている放線菌プラスミドはほとんどの場合伝達性である。

また高頻度 ($10^{-5} \sim 10^{-3}$) で非両親株 (組換え体) の出現が観察されるのも、放線菌の接合伝達の特徴である。*S. coelicolor* を用いた初期の遺伝学では、当時は具体的な機構が明らかに

されないまま、相補的な変異を持つ二株の交雑により得られる組換え体やヘテロクローンを
 用いて遺伝解析が進められた (Hopwood *et al.*, 1973)。Sermonti と Casciano は、一方向的に
 ノム (プラスミドではない) を可動させる稔性因子として R 因子 (Recombination) を想定して
 おり (Sermonti & Casciano, 1963)、前述の組換え体の出現にはプラスミドによる染色体移行
 が関与していたと考えられる。染色体移行能力 (Chromosome mobilizing ability (Cma);
 Holloway, 1979) は、放線菌の接合における DNA 伝達の 1 つの指標として用いられる。
 pSAM2 (Pernodet *et al.*, 1984) や SLP1 (Bibb *et al.*, 1981) のような染色体挿入型では、染色体移
 行のメカニズムは、宿主染色体へのプラスミド挿入および切り出しの過程で生じた Hfr 株と類
 似のメカニズムにより説明することが可能である。F⁺ と F⁻ の掛け合わせによる低頻度組換え
 が 10⁻⁶ で起こるのに対し、Hfr 株を用いた高頻度組換えでは 10⁻³ である。しかしながら、染色
 体への挿入が検出されていない pIJ101, SCP2*, pSN22 でも高頻度で染色体移行が起こる事実
 は、放線菌における接合伝達機構を理解する上で、興味深くかつ重要な話題を提供している。

菌糸状に生育する放線菌の接合伝達は、他の細菌のそれと少し異なる様相を呈する。Kieser
 らは、*Streptomyces lividans* より分離された高コピー型、広宿主域の伝達性プラスミド pIJ101
 において、プラスミド伝達に関与する transfer 機能と、ボックス形成に関与する spread 機能を
 担う領域を限定し、ボックス形成と菌糸内伝達との関連性を示唆した (Kieser *et al.*, 1982)。
 その後、Kendall と Cohen により、プラスミド伝達を支配する遺伝子座 *tra* とボックス形成を
 支配する *spdA*, *spdB* が同定された (Kendall & Cohen, 1987; 1988)。最近 Kataoka らは、
Streptomyces nigrifaciens より分離された高コピー型、高宿主域の伝達性プラスミド pSN22 の
 遺伝学的解析により、プラスミド伝達過程が供与菌株と受容菌株間の菌糸間伝達
 (Intermycelial transfer) と、受容菌株内の菌糸内伝達 (Intramyceial transfer) の 2 段階からなる
 ことを示唆した (Kataoka *et al.*, 1991a)。また彼らは、プラスミド伝達とボックス形成という

2 つの表現型が分離することを示し、この後より放線菌の接合伝達に関する研究は、ボックス
 形成よりはプラスミド伝達が主な表現型として取り扱われるようになる。Pettis らは菌糸間伝
 達を Transmission と呼び、菌糸間と菌糸内伝達を併せたプラスミド伝達の全体を意味する
 Transfer と区別した (Pettis & Cohen, 1994)。

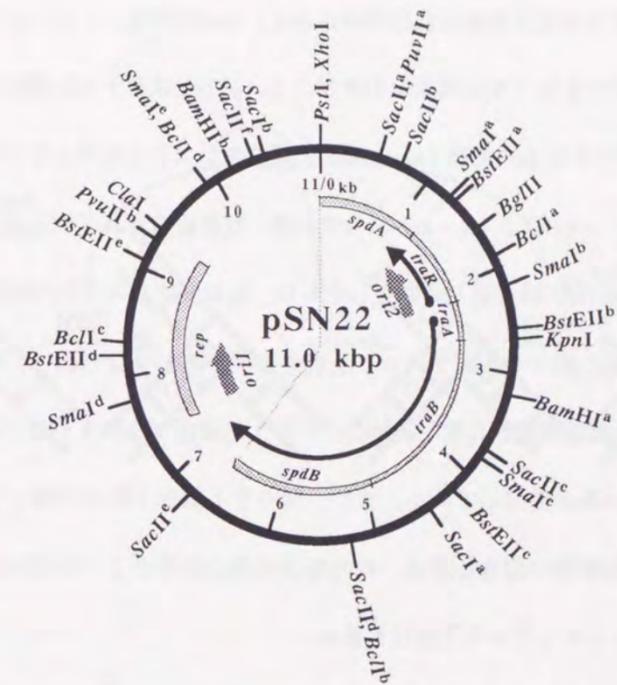


図 0-3 放線菌伝達性プラスミド pSN22 の構造。

pSN22 の接合伝達機能は、*spdA*, *traR*, *traA*, *traB*, *spdB* の 5 つの遺伝子に担われる
 (Kataoka *et al.*, 1991a)。rep は複製開始タンパク質をコードしており、Rep タンパク質が
 複製開始部位 *ori1* で + 鎖特異的に 1 本鎖を切断することによりローリングサークル型複製を
 開始する。*ori2* は 1 本鎖複製中間体より 2 本鎖プラスミドを形成する際の複製開始点である
 (Kataoka *et al.*, 1994b)。矢印は、*traR* と *traA*-*traB*-*spdB* (*tra*) オペロンの転写方向を示す。

プラスミド pSN22 は、*S. lividans* において安定に維持されることから、遺伝的背景が比較的明らかである *S. lividans* を宿主として解析が行なわれてきた。図 0-3 に示すように、pSN22 の伝達に関与する 5 つの遺伝子座 (*traR*, *traA*, *traB*, *spdA*, *spdB*) が同定されている。図 0-4 は、遺伝学的解析の結果より推定される pSN22 伝達の流れを示しており、菌糸間伝達は *traB* に、菌糸内伝達は *traA*, *spdB*, *spdA* に支配される。*traA* 変異は、ボックス形性能はマイナスであるが、プラスミド伝達能および染色体移行能はプラスという表現型を示し、現在のところ他の放線菌プラスミドには見られないユニークな存在である。この *traA* 変異の存在により、プラスミド伝達とボックス形成が分離された経緯がある。*traR* 変異は、しばしばプラスミドが放線菌に対して形質転換できなくなる現象を引き起こし、pSN22 はグラム陰性菌広宿主域伝達性プラスミド RK2 に存在する *kil (traB) - kor (traR)* に類似のシステムを有していることが明らかとなった (Kataoka *et al.*, 1991b)。*kil - kor* システムは、現在研究されている主要放線菌プラスミド pIJ101, pSAM2, pSN22 に共通して存在しており、放線菌プラスミドの特徴の 1 つとして挙げられる。接合伝達に関与するプラスミド由来の遺伝子数が少数であり、かつプラスミドおよび染色体 DNA の伝達頻度が比較的高いことから、放線菌プラスミドは、接合伝達を研究する上で解析しやすい系を提供している。また、関与する遺伝子数が少数であることは、系の単純性を暗示し、放線菌の接合伝達は、他の接合伝達の原型のように思われる。しかし、全く異なるメカニズムを有している可能性もある。

本研究は、これまでに主に遺伝学的手法により解析された pSN22 の伝達機構を、分子レベルでより詳細に理解することを目的とした。特に、異種類細菌間の DNA 伝達である菌糸間伝達に注目し、その過程に必須であり、pSN22 伝達の最小遺伝的要素である TraR および TraB タンパク質を分子生物学的手法により解析した。第 1 章では、制御因子である TraR タンパク質の機能解析として、TraR タンパク質による伝達関連遺伝子群の発現制御について詳細に検討

し、pSN22 伝達を遺伝子発現の面から理解することを目指した。第 2 章および第 3 章では、菌糸間伝達を支配するプラスミド由来の唯一の因子である TraB タンパク質の特性として、ATP 結合モチーフの変異解析、および同タンパク質の局在性について調べ、TraB は ATP を加水分解しうる膜タンパク質である可能性を認めた。その過程で、TraB タンパク質は、菌糸間伝達だけでなく、菌糸内伝達にも関与することを示唆する知見が得られた。最後に、第 4 章では、本研究で得られた知見を総括し、放線菌の接合伝達機構について考察した。

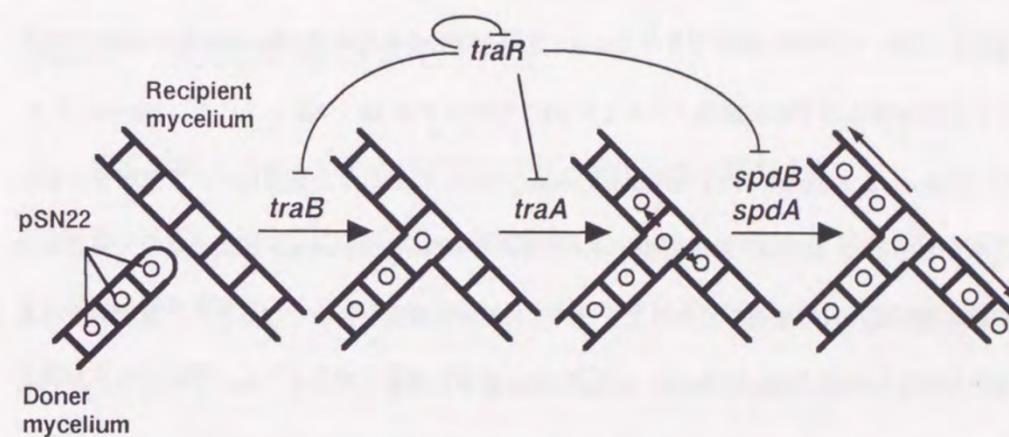


図 0-4 pSN22 の接合伝達の模式図 (Kataoka *et al.*, 1991a)。

pSN22 の伝達は、*traB* 遺伝子によって支配されるプラスミド保持菌と受容菌間の菌糸間伝達と、*traA*, *spdB*, *spdA* 遺伝子によって支配される菌糸内伝達と 2 段階で行なわれる。*traR* は制御因子をコードしており、*traR* 自身と *traB*, *traA*, *spdB* の発現を負に制御する。

第1章 pSN22伝達関連遺伝子群の発現制御機構 (TraRの機能解析)

第1節 緒言

pSN22 の *traR* 変異は、「プラスミドが *S. lividans* を対象とする形質転換能を失う」という表現型として分離された (Kataoka *et al.*, 1991a)。 *traR* 変異プラスミドは、完全長の *traR* 遺伝子をプラスミド上で保持する *S. lividans* に対しては形質転換できることから、 *traR* はトランスに作用することが示された (Kataoka *et al.*, 1991b)。当時すでに、同じ放線菌プラスミドである pJ101 において同様の表現型を与える *kil* 変異が報告されており (Kendall & Cohen, 1987)、グラム陰性細菌広宿主域伝達性プラスミド RK2 に存在する *kil - kor* システム (Figurski *et al.*, 1982; Pohlman & Figurski, 1983; Smith & Thomas, 1983) に類似した機構によって説明されていた。すなわち *traR* 変異は、致死遺伝子 *kil* を制御する *kor* (*ki*-override) 遺伝子座の欠損により *kil* 表現型が現われた結果、見かけ上プラスミドが形質転換できなくなるという表現型を与えたものと考えられた。pSN22 における *kil* 相当遺伝子を探索した結果、 *traB* であることが判明し、 *traA* もまた、致死とはならないが増殖阻害活性を有していることが明かとなった (Kataoka *et al.*, 1991b)。

pSN22 におけるプロモーター検索の結果、 *Bgl*III-*Sma*I^b 断片 (550bp, 図 0-3) は両方向にプロモーター活性を持つことが見いだされ、 *traR* および *traA-traB-spdB* (*tra*) オペロンのプロモーターであることが明かとなった (Kataoka *et al.*, 1991b)。両プロモーター活性は TraR の存在により 20% まで低下したことから、TraR は *traR* 自身、および *tra* オペロンの発現を負に制御する制御因子であることが示唆され、pSN22 における *kil - kor* システムの正体は、致死遺伝子

である *traB* を含む *tra* オペロンの TraR による発現制御として理解された (Kataoka *et al.*, 1991b)。

本章では、プラスミド伝達において主要な役割を有しながら毒性的活性を持つ *traB* および *traA* の性格を考慮し、いかに毒性的活性を制御しながらプラスミド伝達を達成させるかという問題を念頭に置きながら、遺伝子発現制御の側面から pSN22 の伝達機構を理解することを目的とした。伝達機能の発現に重要である TraR タンパク質と、 *traR* および *tra* オペロンのプロモーター領域間の相互作用を *in vitro* と *in vivo* の両面から検討し、伝達関連遺伝子群の発現制御機構を推定した。

第2節 実験材料および方法

(1) 使用菌株、ファージおよびプラスミド、使用培地と培養条件

放線菌プラスミドの宿主には *S. lividans* TK21 (SLP2⁻ SLP3⁻; Kieser *et al.*, 1982) を、プラスミド伝達試験の受容菌には *S. lividans* TKC244 (*str-6 thr-1* SLP2⁻ SLP3⁻; Kataoka *et al.*, 1991a) を用いた。大腸菌における遺伝子操作の宿主には、DH5 α (*supE44*, Δ *lacU169* (ϕ 80*lacZ* Δ M15), *hsdR17*, *recA1*, *endA1*, *gyrA96*, *thi-1*, *relA1*; Hanahan, 1983) あるいは JM109 (*recA1*, *endA1*, *gyrA96*, *thi*, *hsdR17*, *supE44*, *relA1*, Δ (*lac-proAB*)/F'*[traD36, proAB⁺, lacI^f, lacZ* Δ M15]; Vieira and Messing, 1982) を用いた。大腸菌における TraR タンパク質発現の宿主には、BL21 (DE3) (*hsdS*, *gal*(λ *cl857*, *ind1*, *Sam7*, *nir5*, *lacUV5-T7gene1*; Studier and Moffatt, 1986) を用いた。

実験に使用した放線菌プラスミドおよび大腸菌中間ベクターを、表 1-1 に示した。大腸菌でのクローニングベクターには pUC18 および 19 (Yanisch-Peron *et al.*, 1985) を、また塩基配列決定用の 1 本鎖 DNA 調製にはファージ M13mp18 および mp19 (Yanisch-Peron *et al.*, 1985) を

使用した。大腸菌における TraR タンパク質の生産には、大腸菌発現ベクター pKK223-3

(Pharmacia)、pMal-c2 (NEB; Guan *et al.*, 1988) を用いた。

大腸菌および放線菌の培養、形質転換と遺伝子操作は、それぞれSambrookら、およびHopwood らの標準プロトコールに従った (Sambrook *et al.*, 1989; Hopwood *et al.*, 1985)。放線菌の完全培地は、寒天培養には R2YE 培地 (103 g/L サッカロース, 0.25 g/L K₂SO₄, 10.12 g/L MgCl₂·6H₂O 10 g/L グルコース, 0.1 g/L カザミノ酸 (Difco), 2 ml/L 微量金属溶液*, 5 g/L Bacto™ 酵母エキス (Difco), 5.73 g/L TES をオートクレーブ後、100 ml の溶液に対して 1 ml の 0.5% KH₂PO₄, 0.4 ml の 5M CaCl₂·2H₂O, 1.5 ml の 20% L-プロリン, 0.7 ml の 1N NaOH を無菌的に添加した) を、液体培養には YEME 培地 (3 g/L Bacto™ 酵母エキス, 5 g/L Bacto™ ペプトン (Difco), 3 g/L 麦芽エキス, 10 g/L グルコース, 340 g/L サッカロース をオートクレーブ後、2 ml/L MgCl₂ [2.5M], 50 ml/L グリシン [10%] を添加した [括弧内は保存溶液の濃度]) を使用した。*微量金属溶液は、40 mg/L ZnCl₂, 200 mg/L FeCl₃·6H₂O, 10 mg/L CuCl₂, 10 mg/L MnCl₂·4H₂O, 10 mg/L Na₂B₄O₇·10H₂O, 10 mg/L (NH₄)₆Mo₇O₂₄·4H₂O とした。大腸菌の完全培地としては 2xTY 培地 (16 g/L Bacto™ トリプトン (Difco), 10 g/L Bacto™ 酵母エキス, 5 g/L NaCl) を使用し、固形培地には寒天を 1.5% となるように添加した。抗生物質は必要に応じてアンピシリン (明治製菓) 50 μg/ml、カナマイシン (明治製菓) 50 μg/ml、ストレプトマイシン (明治製菓) 50 μg/ml、チオストレプトン (藤沢薬品) 50 μg/ml を使用した。

遺伝子操作に使用する酵素およびポリヌクレオチドリンカーは、宝酒造あるいは東洋紡より購入し、それらの使用方法は購入会社より供給されたプロトコールに従った。

表 1-1. 実験に使用した放線菌プラスミド、および大腸菌中間ベクター

Plasmid	Description	Reference
pSN22	<i>S. nigricans</i> plasmid, Pock ⁺ , Tra ⁺ , Cma ⁺ .	Kataoka <i>et al.</i> , 1991a.
pMT911	Wild type derivative of pSN22, Tsr ^R .	Kataoka <i>et al.</i> , 1991a.
pESS500	Shuttle vector of pSN22 with pACYC177, Pock ⁺ , Tra ⁺ , Cma ⁺ , Tsr ^R .	Kataoka <i>et al.</i> , 1991a.
pESS551	pESS500 derivative which has a deletion of TREbox4 sequence, Tra ⁺ , Cma ⁺ , Tsr ^R .	
pFD7	pESS500 derivative which has a frame-shift at <i>traA</i> .	Kataoka <i>et al.</i> , 1991a.
pMT926	<i>spdB</i> derivative of pMT911.	Kataoka <i>et al.</i> , 1991a.
pMT6	Shuttle vector with pUC12 and pSN22 replicons, Ap ^R , Vio ^R .	Kataoka <i>et al.</i> , 1991b.
pMT62	<i>PvuII-KpnI</i> fragment of pSN22 (<i>traA</i> , <i>traR</i>) replaces pUC12 in pMT6.	Kataoka <i>et al.</i> , 1991b. 図 1-3.
pMT63	<i>SmaI-SmaI</i> fragment of pSN22 (<i>traR</i> with a small deletion at C terminus) replaces pUC12 in pMT6.	Kataoka <i>et al.</i> , 1991b. 図 1-3.
pMT64	<i>PvuII-KpnI</i> fragment of pSN22 with internal deletion in <i>traA</i> replaces pUC12 in pMT6.	図 1-3.
pMT65	<i>traR</i> ORF-TRE fragment replaces pUC12 in pMT6.	図 1-3.
pARCI	Promoter probe plasmid with promoterless <i>whiE</i> gene, Tsr ^R .	Horinouchi & Beppu, 1985.
pPT1	<i>BglII-SmaI</i> fragment (<i>traR</i> truncated) is cloned into pARCI, brown pigment production under control of <i>tra</i> promoter.	Kataoka <i>et al.</i> , 1991b. 図 1-3.
pPTD1	<i>traR</i> ORF-TRE fragment is cloned into pARCI.	図 1-7.
pPTD2	<i>traR</i> ORF-TRE fragment with a deletion up to 12 bp downstream of TREbox4 is cloned into pARCI.	図 1-7.
pPTD3	<i>traR</i> ORF-TRE fragment with a deletion downstream of TREbox4 is cloned into pARCI.	図 1-7.
pPTD4	<i>traR</i> ORF-TRE fragment with a deletion of TREbox4 is cloned into pARCI.	図 1-7.
pPTD5	TRE fragment (<i>traR</i> truncated) with a deletion up to 12 bp downstream of TREbox4 is cloned into pARCI.	図 1-7.
pPTD6	TRE fragment (<i>traR</i> truncated) with a deletion of TREbox4 is cloned into pARCI.	図 1-7.
pESK101	pESS500 derivative which has <i>traR</i> ORF-TRE fragment with a deletion up to 12 bp downstream of TREbox4.	図 1-7. 図 1-8.
pESK102	pESS500 derivative which has <i>traR</i> ORF-TRE fragment with a deletion downstream of TREbox4.	図 1-7. 図 1-8.
pESK103	pESS500 derivative which has <i>traR</i> ORF-TRE fragment with a deletion of TREbox4.	図 1-7. 図 1-8.
pMT11	A 4.5 kb <i>PstI-SacI</i> fragment is subcloned into pUC19.	第 2 節、(14).
pSK10	A 2.0 kb <i>BglII-BamHI</i> fragment is subcloned into pUC19 derivative which has a <i>BglII</i> site between <i>SacI</i> and <i>EcoRI</i> site.	図 1-8.

(2) 2本鎖 DNA シークエンス

2 ml の 2xTY 培地にて 37°C で一晩振とう培養した大腸菌菌体より、アルカリ変性法 (Birnboim & Doly, 1978) によってプラスミド DNA を回収した。50 µg/ml RNase A (Sigma) を含む TE 緩衝液 (10 mM トリス塩酸 [pH 8], 1 mM エチレンジアミン四酢酸 (EDTA)) 50 µl に溶解し、37°C で 30 分間保温して RNA を分解させた後、30 µl の 20% PEG6000-2.5 M NaCl 溶液を加えよく混合し、氷中で 30 分間から一晩放置した。遠心分離 (12,000 rpm、10 分間) により DNA を回収し、DNA 沈殿をエタノールでリンスし乾燥させた後、15 µl の TE 緩衝液に溶解させ、7 µl をシークエンス反応に使用した。

上記の方法により調製した 2 本鎖 DNA に、0.2 mM EDTA, 0.2 mM NaOH を加えて 20 µl とし、37°C で 10 - 15 分間保温しアルカリ変性させた。8 µl 酢酸アンモニウム [pH 4.8] と 100 µl エタノールを加えてエタノール沈殿した後、すみやかに 1 pmole のプライマーを変性した DNA と混合し、シークエンス反応を行なった。シークエンスは、Sanger らの方法 (Sanger *et al.*, 1977) に従い、BcaBEST™ ダイデオキシシークエンシングキット (宝酒造) を用いて行なった。

(3) *S. lividans* プロトプラストの調製法と形質転換法

S. lividans の孢子液 50 µl を 100 ml の YEME 培地に植菌し、対数増殖後期まで培養した後 (30°C、約 40 時間)、2 つの遠心管に 50 ml ずつ分注して、遠心分離 (12,000 rpm、10 分間) により集菌した。菌体を 4 ml の 10.3% ショ糖溶液で洗浄した後、5 ml の P (protoplast) 緩衝液 (103 g サッカロース, 0.25 g K₂SO₄, 2.02 g MgCl₂·6H₂O, 2 ml 微量金属溶液 (本節 (1) を参照) を 800 ml の蒸留水に溶かしてオートクレーブ滅菌したものに、10 ml の 0.5% KH₂PO₄, 100 ml の 3.68% CaCl₂·2H₂O, 100 ml の 5.73% TES 緩衝液 [pH 7.2] を加えた) に懸濁し、5

mg/ml リゾチーム (Sigma) を含む P 緩衝液 1 ml を加えてよく混合し、37°C で 1 時間保温し細胞壁を溶解させた。綿花を詰めて滅菌したガラス製の注射器を通して未溶解の菌糸を除去した後、遠心分離 (2,200 rpm、7 分間) によりプロトプラストを回収した。5 ml の P 緩衝液で 2 回洗浄した後、1 ml の P 緩衝液に懸濁し、これをプロトプラスト溶液として使用するまでマイナス 80°C で保存した。

形質転換を行なう時は、上記のプロトプラスト溶液を氷上でゆっくり解凍して使用した。乾燥したガラス試験管で 200 µl のプロトプラスト溶液と DNA 溶液を混合し、0.5 ml の T (transformation) 緩衝液 (2.5 ml/L サッカロース溶液 [10.3%], 0.02 ml/L 微量金属溶液, 0.1 ml/L K₂SO₄ [2.5%] をオートクレーブ滅菌後、93 ml の溶液に対して 2 ml の 5 M CaCl₂, 5 ml の トリス/マレイン酸 [pH 8] を加えたもの) を加えよく混合した後、1 分間以内に 5 ml の P 緩衝液をさらに加え、遠心分離 (2,200 rpm、7 分間) を行なった。上澄を少し残して捨て、残りの溶液にプロトプラストを懸濁し、R2YE 培地に緩やかに塗布して、30°C で 8 - 16 時間培養し細胞壁を再生させた。500 µg/ml チオストレプトンを含む 3 ml の重層寒天 (8 g/L Bacto™ 肉エキス (Difco)、5 g/L 寒天) を重層してさらに 2 - 3 日間培養し、形質転換体を得た。

(4) *S. lividans* からのプラスミド DNA の調製

Kieser の方法 (Kieser, 1984) に従った。*S. lividans* を 100 ml YEME 培地にて対数増殖後期まで培養後 (30°C、約 40 時間)、吸引濾過により集菌した。一白金耳分の菌体を、100 µl の Solution I (10.3% サッカロース, 25 mM トリス塩酸 [pH 8], 25 mM EDTA [pH 8], 10 µg/ml RNaseA (Sigma), 2 µg/ml リゾチーム) に懸濁し、37°C で 1 時間保温し溶菌させた。次に、200 µl の Solution II (0.2 N NaOH, 1% ドデシル硫酸ナトリウム (SDS), 25 mM EDTA) を加えよく混合した後、80°C で 15 分間保温した。さらに、150 µl の Solution III (3 M CH₃COONa) を加え混

合し、水中に5分間放置した。遠心分離後(12,000 rpm、3分間)、上澄をフェノール/クロロホルム/イソアミルアルコール(25:24:1)混合液で抽出しタンパク質を除去した後、エタノール沈殿を行なった。得られた沈殿を50 µg/ml RNase Aを含むTE緩衝液50 µlに懸濁し、37°Cで30分間保温してRNAを分解させ、プラスミドDNA溶液とした。

(5) 放線菌菌体からの全RNAの抽出

S. lividans を100 ml YEME培地にて対数増殖期まで培養後(30°C、約40時間)、吸引濾過により集菌した。回収菌体をPSE緩衝液(10%フェノール、2% SDS、0.1 M EDTA、50 mM トリス塩酸[pH 8.0])に懸濁し、ガラスビーズ(直径5 mm)を加えてボルテックスミキサー(4°C、3分間)によりホモゲナイズした。遠心分離後、CsClを上清1 mlに対して1 gの割合で加え、1 ml クッション緩衝液(5.7 M CsCl、0.1 M EDTA)に重層した。サンプルを遠心分離(120,000 xg、18°C、20時間)した後、沈殿を70%エタノールで洗浄し、適量のジチオピロカルボネート(DEPC, Sigma)処理した滅菌水に溶解させた。フェノール抽出、フェノール/クロロホルム/イソアミルアルコール(25:24:1)混合液で抽出後、エタノール沈殿によりRNAを回収した。RNAの量および純度は260 nm および280 nmにおける吸光度の比より検定した。

(6) ³²Pによるオリゴヌクレオチド標識

50 pmole オリゴヌクレオチド、50 mM トリス塩酸[pH 9.5]、10 mM MgCl₂、5 mM ジチオスレイトール(DTT)、0.1 mg/ml ウシ血清アルブミン(BSA)、 γ -³²P-ATP、10 units T4 ポリヌクレオチドキナーゼを加えて反応系を50 µlとし、37°Cで30分間保温した。反応後、滅菌蒸留水で100 µlに調製し、TE緩衝液で平衡化したニックカラム(Pharmacia)に供した。400 µlの

TE緩衝液でカラム中に拡散させ、次の400 µlのTE緩衝液でオリゴヌクレオチドを溶出させ、未反応の放射性³²Pを除去した。

(7) プライマー伸長法

McKnight と Kingsbury の方法(McKnight & Kingsbury, 1982)に従った。伸長プライマーにはオリゴヌクレオチド traRex および traex(図1-2)を使用した。本節の(5)に従って調製したRNAサンプル(10 µg)を γ -³²P-ATPで末端標識したオリゴヌクレオチド(10,000 cpm相当)と共にフェノール/クロロホルム/イソアミルアルコール抽出しエタノール沈殿させた後、反応緩衝液(5 mM トリス塩酸[pH 8]、50 mM KCl、10 mM MgCl₂)に溶解した。80°C、15分で変性後、直ちにハイブリダイゼーション用の設定温度($T_m=25+0.5[\%G+C]-500/n$, n: ハイブリダイズする二重鎖の長さ)に移し、2時間から一晩ハイブリダイズさせた。試料をフェノール/クロロホルム/イソアミルアルコール抽出し、エタノール沈殿を行なった後、0.01 M DTT、500 µM デオキシリボヌクレオシド 5'-三リン酸(dNTP)、200 units RNase 阻害剤(宝酒造)、200 units 逆転写酵素(BRL)を加えて37°C、0.5 - 1時間伸長反応を行なった。反応液をエタノール沈殿後、10 µl TE緩衝液に溶解し、6 µlのシークエンス用反応停止液を加えた後、試料を熱変性後(100°C、3分間)、8 M 尿素変性ポリアクリルアミドゲル(6%)で電気泳動した。

マーカーとするシークエンスは、TRE領域(BclI-SmaI断片、図1-2)をクローン化したM13mp18 および mp19を鋳型とし、伸長反応に使用した末端標識オリゴヌクレオチドをプライマーとして用いてサンガー法により行ない、試料の横に並べて泳動した。電気泳動は、トリス-ホウ酸-EDTA(TBE)緩衝液中で22 mA(電流一定)で行なった。

(8) TraRタンパク質の大腸菌での生産および粗タンパク質溶液の調製

traR オープンリーディングフレーム (ORF) を含む DNA 断片を、オリゴヌクレオチド *traRT* (5'-GGGCTGCAGTCACTCGCCCATGGGCACCCG-3', 下線部は *PstI* 部位を示す) と *traRS* (5'-GGGGAATTCATGCCTTACAAGGCACCGGAG-3', 下線部は *EcoRI* 部位を示す) を用いて、PCR により増幅した。増幅断片を、*PstI*, *EcoRI* で二重消化した pUC19 にサブクローン化し、塩基配列をサンガー法により確認した後、pKK223-3 の *PstI*, *EcoRI* 部位に連結してプラスミド pKKTR を得た。また、pKKTR の *EcoRI*, *HindIII* 消化により *traR* ORF を切り出した後、pMal-c2 の *EcoRI*, *HindIII* に連結し、pMal-R を得た。

pKKTR および pMal-R をそれぞれ保持する大腸菌 JM109 および BL21 (DE3) を、100 ml 2xTY 培地に接種し、37°C で振とう培養を行なった。A₆₀₀ が 0.5 に達した時点で IPTG を 0.3 mM になるように添加し、さらに 2 時間培養を行なった。培養終了後、遠心分離 (5,000 rpm、5 分間) により集菌し、回収菌体を使用するまでマイナス80°Cで保存した。使用に際しては、40 µg/ml フェニルメチルスルホニルフルオリド (PMSF) を含む 2 ml カラム緩衝液 (10 mM トリス塩酸 [pH 7.5], 200 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM DTT) に懸濁し、超音波処理 (氷中で 30 秒間、10回) により溶液が透明になるまで菌体を破碎した後、遠心分離 (15,000 rpm、4°C、30 分間) を 2 回行ない、得られた上清を粗タンパク質溶液とした。

(9) *TraR* タンパク質の放線菌での発現および粗タンパク質溶液の調製

pMT911 を保持する *S. lividans* TK21 株を 100 ml の YEME 培地で対数増殖後期まで培養した後、吸引濾過により集菌した。40 µg/ml PMSF を含むカラム緩衝液 (本節 (8) を参照) に懸濁し超音波処理 (氷中で 30 秒間、10 回) により溶液が透明になるまで菌体を破碎した後、遠心分離を 2 回行ない、得られた上清を粗タンパク質溶液とした。

(10) *TraR* タンパク質の精製

ヘパリンカラムクロマトグラフィー: 調製した大腸菌および放線菌粗タンパク質溶液を DNA 結合緩衝液 (10 mM トリス塩酸 [pH 7.5], 50 mM KCl, 1 mM DTT, 5% グリセリン) に対して透析した。エコノパックヘパリンカートリッジ (BIO-RAD) を 60 ml の 2 M NaCl で洗浄し、60 ml の DNA 結合緩衝液で平衡化した。試料を重層した後、0.1 M KCl を含む DNA 結合緩衝液で未吸着タンパク質を洗浄した。*TraR* タンパク質を含む画分は、0.3 M KCl を含む結合緩衝液で溶出した。*TraR* タンパク質画分を 50% グリセロールを含む結合緩衝液で透析し、ゲル移動度試験に用いた。この精製過程を通して、*TraR* タンパク質は約 10 倍に濃縮された。

アミロースレジンカラムクロマトグラフィー: マルトース結合タンパク質 (MalE) との融合体として発現させた *TraR* タンパク質の精製は、供給会社 (NEB) のプロトコールに従った。融合タンパク質は、10 units の Factor Xa (宝酒造) で室温にて一晚消化した後、2 度目のカラムクロマトグラフィーにより MalE タンパク質を除去した。タンパク質量は、Bradford の方法 (Bradford, 1976) により、IgG を基準に検定した。

(11) ゲル移動度試験

Fried と Crothers の方法 (Fried and Crothers, 1981) に従った。結合プローブに用いた DNA 断片は、図 1-6C に示した。*TraR* タンパク質 と DNA 間の結合反応は、10 mM トリス塩酸 [pH 7.5], 50 mM KCl, 1 mM DTT, 5% グリセリン、0.1 mg/ml poly(dI-dC)、10,000 cpm 末端標識プライマー、*TraR* タンパク質を含む 20 µl の反応液中で行ない、氷中に 30 分間放置した後、5% ポリアクリルアミドゲルで電気泳動した。電気泳動は、トリス-酢酸-EDTA (TAE) 緩衝液中で、150 V (電圧一定) で行なった。

(12) DNase I フットプリント試験

Galas と Schmitz の方法 (Galas and Schmitz, 1978) を以下のように改変した。TRE 領域を、オリゴヌクレオチド traRex と traex (図 1-2) を用いて PCR により増幅した。この際、一方のオリゴヌクレオチドの 5' 末端を、本節 (6) に従って放射能標識した。片鎖のみ末端標識された増幅断片をアガロースゲル電気泳動により精製した後、遠心濾過チューブウルトラフリー C3HV (Millipore) を用いて、アガロースゲルから DNA 断片を回収した。TraR タンパク質と DNA 結合反応は、ゲルシフトと同じ条件下で行なった。試料を 25°C、1 分間前保温した後、2.8 units DNase I (宝酒造) を加えて 25°C、正確に 1 分間反応させた。100 μ l の反応停止液 (20 mM EDTA [pH 8], 0.2% SDS, 0.3 M NaCl, 2 mg/ml 酵母 tRNA) を加えた後、直ちに等量のフェノール/クロロホルム/イソアミルアルコール (25:24:1) で抽出し、エタノール沈殿を行なった。回収した乾燥試料を 4 μ l DNA 変性緩衝液 (80%(wt/vol) 脱イオン化ホルムアミド, 10 mM NaOH, 1 mM EDTA, 0.1% キシレンシアノール, 0.1% プロモフェノールブルー) に溶解し、熱変性後、8 M 尿素変性シーケンスゲル (6%) に供して、ゲル 1 枚当たり 22 mA (電流一定) で電気泳動した。マーカーとするシーケンスは、プライマー伸長の場合と同様に行ない、試料の横に並べて泳動した。

(13) 欠失 TRE を持つ pPTD1-6 および pESK501-503 の構築

pPTD1 - pPTD6 の構築は、以下のように行なった。オリゴヌクレオチド traRT (本節 (4) を参照) と traex, D1-D3 (図 1-2) を用いて、traR ORF および TRE 領域を含む 4 種類の DNA 断片を PCR により増幅した。アガロースゲル電気泳動により精製した増幅断片を、T4 DNA ポリメラーゼ、T4 ポリヌクレオチドキナーゼにより末端平滑化およびリン酸化した後、10-mer BamHI リンカーを T4 DNA リガーゼにより連結した。この断片を pUC19 の BamHI 部位に

サブクローン化し、プラスミド pUC19-TD1, TD2, TD3, TD4 を得た。シーケンスにより塩基配列を確認した後、pUC19-TD1, TD2, TD3, TD4 より切り出した BamHI 断片を、プロモーター検索用ベクター pARCI (Thio[®]; Horinouchi & Beppu, 1985) の BamHI 部位に連結し、*S. lividans* を形質転換し、プラスミドを回収した。PCR 増幅により断片の挿入方向を確認し、tra プロモーターがレポーターである褐色色素合成遺伝子 *whiE* に対して順方向に挿入されたクローンを、プラスミド pPTD1, pPTD2, pPTD3, pPTD4 とした。pPTD5 および pPTD6 は、pUC19-TD2, -TD4 より切り出した traR ORF の N 末側領域および TRE を含む BglII-BamHI 断片を、tra プロモーターが *whiE* 遺伝子に対して順方向となるように pARCI に挿入することにより得た。得られたプラスミドをチオストレプトンを含む R2YE 培地にストリークし、プレート上での褐色色素生産を指標にプロモーター活性を定性的に測定した。

pESK501 - pESK503 の構築の概略を、図 1-8 に示した。TRE 領域を含む 3 種類の DNA 断片を、オリゴヌクレオチド traRex、および D1-D3 (図 1-2) を用いて PCR により増幅した後、T4 DNA ポリメラーゼ、T4 ポリヌクレオチドキナーゼにより末端を平滑化およびリン酸化し、BclI で消化した。この PCR 産物を中間ベクター pMS10 の BclI、SmaI 部位に連結し、プラスミド pMS101-103 を得た。pMS101-103 の BglII, KpnI 断片を pESS500 の同断片と置換し、プラスミド pESK501-503 を得た。

(14) TREbox4 配列欠損プラスミド (pESS551) の構築

オリゴヌクレオチド traRex と D4 (5'-GGCCTGCAGGCCGACGCCACGAAG-3', 下線部は PstI 部位を示す)、traex と D5 (5'-GGCCTGCAGGTACCTCCCGCTGAC) の組合わせで、TREbox4 配列の上流および下流の領域を PCR により増幅した。得られた 2 つの PCR 産物を PstI で消化し、連結することにより、TREbox4 配列 (12 塩基) を PstI 部位 (6 塩基) で置換した。連結さ

れた断片を *Bcl*I, *Sma*I で消化後、中間ベクター pMT11 の同断片と置換した。さらに、得られた pMT11 誘導体の *Pst*I-*Sac*I 断片を pESS500 の同断片と置換し、pESS551 を得た。

(15) プラスミド伝達試験

Kataoka らの方法 (Kataoka *et al.*, 1991a) に従った。*S. lividans* TKC244 (Str^R) の孢子液を全体に塗布した R2YE 寒天培地に、プラスミド (Thio^R) を保持する *S. lividans* TK21 を線状にストリークした。30°C、7 日間培養し孢子形成させた後、ストレプトマイシン、チオストレプトンを含む R2YE 寒天培地へレプリカし、30°C で 3 日間培養した。選択培地上のコロニーの存在で菌糸間伝達を、ストリークした線に対して縦方向のコロニーの広がりにより菌糸内伝達効率を評価した。

第3節 結果および考察

第1項 伝達関連遺伝子転写制御領域 (Transfer-gene Regulating Element; TRE) の構造。

pSN22 の全塩基配列が決定され ORF 検索が行なわれた結果、*traR* と *traA-traB-spdB (tra)* オペロンは逆向きにコードされていることが判明し、*traR* と *traA* ORF 間に逆向きの 2 つのプロモーターが存在することが予想された (Kataoka *et al.*, 1994a)。この部分を含む *Bcl*I-*Sma*I 間領域 (260bp) は 4 つの主要な伝達関連遺伝子の発現を担う重要な領域であると推定され、この領域を伝達関連遺伝子群転写制御領域 (Transfer-gene Regulating Element: TRE) とした。

転写構造を明らかにする目的で、pPT1 (表 1-1; 図 1-3) を保持する *S. lividans* 菌体より調製した全 RNA 試料を用いて、プライマー伸長法により *traR* および *tra* オペロン mRNA の 5' 末端を決定した。その結果、図 1-1 に示すような単一バンドを検出し、その位置は、それぞれ *traR* の開始コドンより 31 塩基上流の G 残基、*traA* の開始コドンより 128 塩基上流の G 残基であると決定した。2 つの転写開始点の上流には大腸菌の $\sigma 70$ プロモーターに類似した配列 (Strohl, 1992) が存在し、*traR* および *tra* オペロンの -10 領域として TACCTT、*traR* の -35 領域として TACCTT、*tra* オペロンの -35 領域として TTGCTT の配列が存在した (図 1-2)。

TRE領域には、12 塩基からなる 4 つの繰り返し配列 (TREbox 配列) が存在していた。TREbox1 (AAGGTACATCAA), TREbox2 (AAGGTACATCCT), TREbox3 (AAGGTACATCAA; TREbox1と同配列で逆方向)は前述の3箇所のプロモーター領域と重なっており、一方、TREbox4 (AAGGTACGTTAA) は、*tra* オペロン転写開始点の下流に存在していた (図 1-2)。

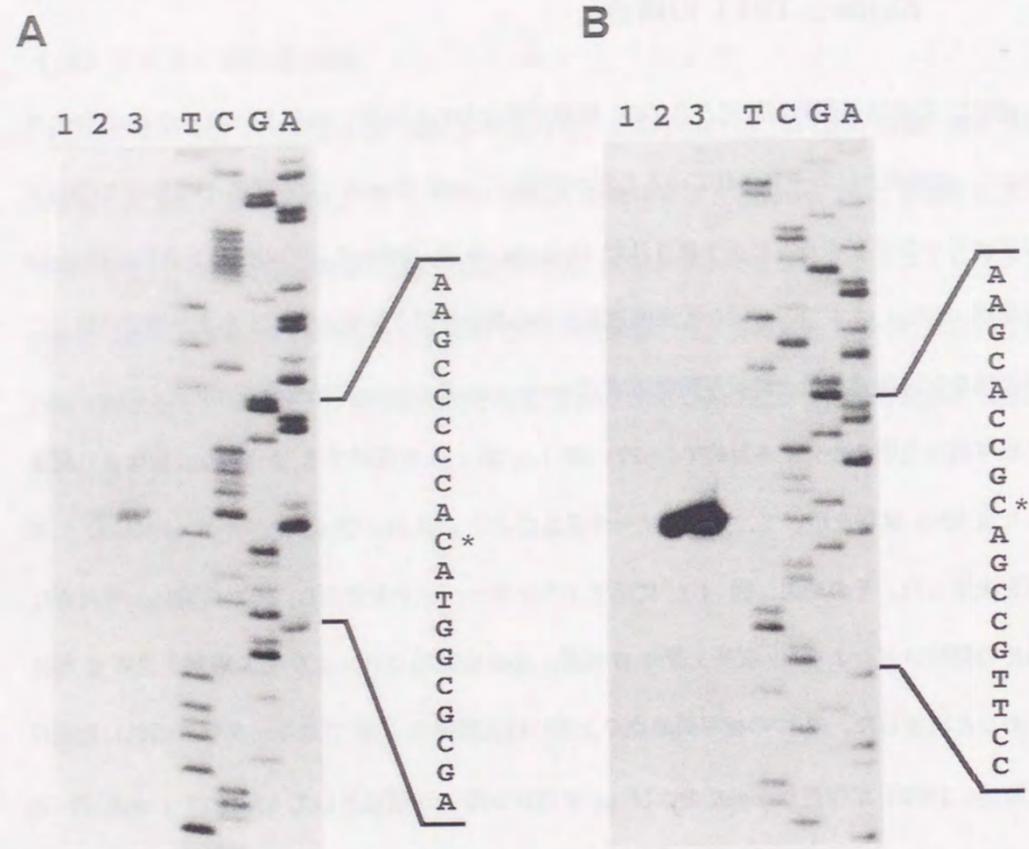


図 1-1. プライマー伸長法による *traR* および *tra* オペロン転写産物の 5' 末端の決定。

pPT1 と pMT62 (レーン 1), pPT1 と pMT63 (レーン 2), pPT1 のみ (レーン 3) を保持する *S. lividans* TK21 株より調製した全 RNA 試料 (10 µg) を用いた。*tra* 鎖 (A)、*traR* 鎖 (B) について、決定された mRNA 5' 末端の塩基配列上の位置を [*] で示した。伸長反応に用いたプライマーの詳細は図 1-2 に示した。マーカーとなる塩基配列は、伸長反応に用いたものと同じプライマー (*traRex*, *traex*) を用いてサンガー法により決定した。pMT62 および pMT63 の構造は図 1-3 に示した。

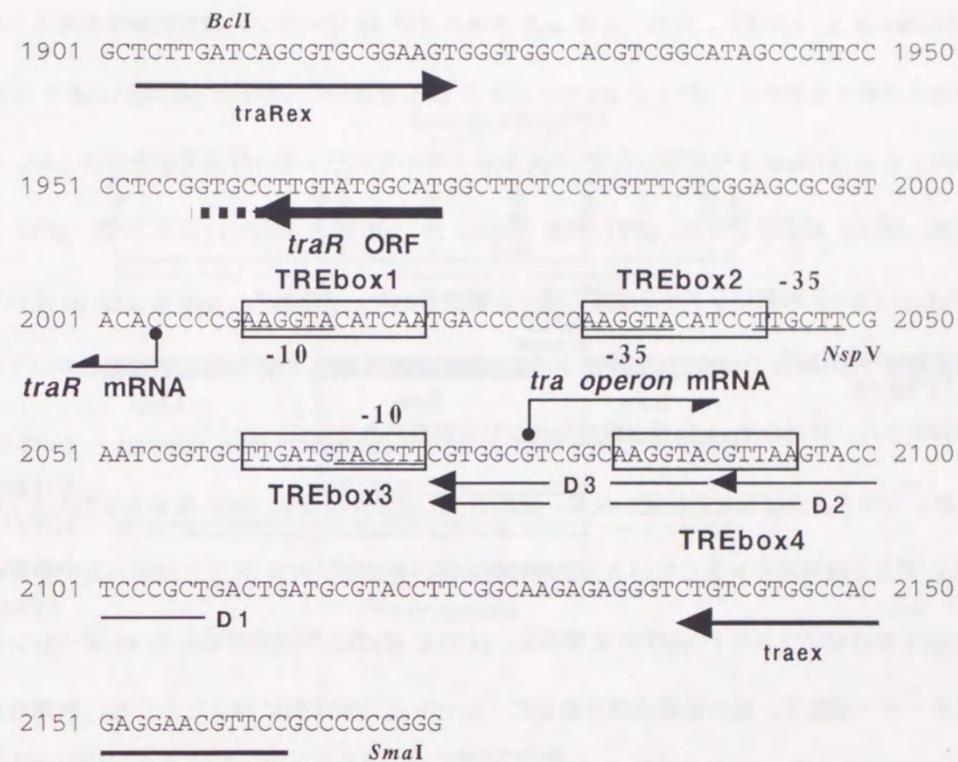


図 1-2. Transfer-gene Regulating Element (TRE, *BclI*-*SmaI* 領域) の構造。

プライマー伸長実験に使用したプライマー (*traRex*, *traex*) の位置を太矢印で、*traR* と *tra* オペロンの転写開始点の位置および転写の方向を細矢印で示した。-10, -35 配列を下線で、TREbox 配列を枠で示した。プライマー D1, D2, D3, は欠失 TRE 断片 (TRED1, TRED2, TRED3) の増幅に用いた (図 1-6C)。

第2項 遺伝子発現の負の制御における TraA 効果。

traR および *tra* オペロン発現のプロモーター活性は、TraR の存在により 20% まで低下するが、完全な抑制には TraA が必要であることが、以前の実験結果から示唆されていた (TraA 効果, Kataoka *et al.*, 1991b)。TraR による *traR* 自身および *tra* オペロンの発現制御を転写レベルで詳細に検討するために、pPT1 と pMT62 (*traR* と *traA* を含む)、pPT1 と pMT63 (*traR* を含む) を保持する *S. lividans* より調製した全 RNA 試料を用いてプライマー伸長実験を行なった。その結果、図 1-1 に示すように、pPT1 のみ (レーン 3)、pPT1 と pMT63 (レーン 2)、pPT1 と pMT62 (レーン 1) の順にシグナル強度の低下が観察された。すなわち、*traR* および *tra* オペロンの転写は TraR 単独では完全に抑制されないが、TraR と TraA の存在により検出限界以下にまで抑制され、前述の TraA 効果が転写レベルでも観察された。

しかしながら、全塩基配列決定の結果、pMT63 は完全長の *traR* ORF を含んでおらず、C 末側 6 アミノ酸残基を欠失していることが判明した。そこで、PCR により増幅した完全長の *traR* ORF を含むプラスミド pMT65 を構築し、pPT1 と pMT65 が共存する時の *tra* オペロンのプロモーター活性を、褐色色素合成を指標にプレート上で定性的に調べたところ、色素は肉眼では観察されなかった (図 1-3)。この結果は、完全長の TraR は単独でプロモーター活性を完全に抑制したことを示しており、前述の TraA 効果は、TraR の発現制御機能に重要であると考えられる C 末側の 6 アミノ酸が欠失したことに起因すると考えられた。C 末側の欠失により失われた TraR の機能を、どのようにして TraA が補ったかについては、現在のところ不明である。Stein と Cohen は、pJ101 の伝達関連遺伝子 *kilB* の発現を負に制御する KorB タンパク質が、その C 末側の 13 アミノ酸残基の欠失により、*kilB* プロモーター活性を完全に抑制することができなくなることを報告している (Stein & Cohen, 1990)。この現象は、上述した pSN22 の TraR の場合と類似しており、TraR タンパク質の C 末側領域が発現制御機能に重

要であるという考えを支持するものと思われる。

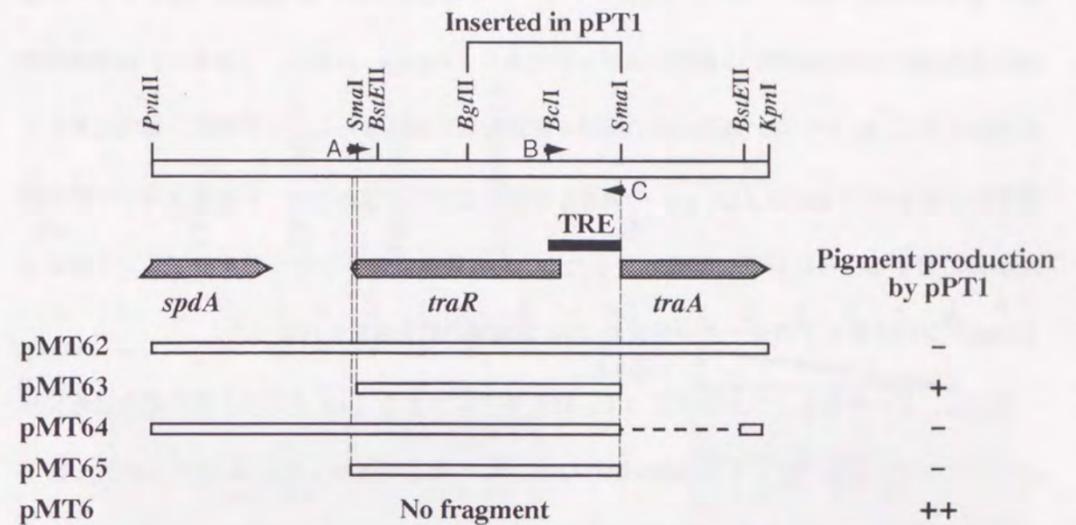


図 1-3. TraR による *tra* オペロンプロモーター活性の抑制。

pMT62-65 の構築には、挿入断片を *HincII*, *KpnI* 部位 (pMT62, 64) または *SmaI* 部位 (pMT63, 65) にサブクローニングした pUC19 誘導体より切り出した *PstI*-*EcoRI* 断片を、pMT6 の *PstI*-*EcoRI* 断片と連結した。pPT1 (*Thio*^R, *BglII*-*SmaI* 断片が *tra* プロモーターが *whiE* に対して順方向となるように *pARCI* にクローニングされている, Kataoka *et al.*, 1991b) を保持する *S. lividans* TK21 を pMT62-65 (*Vio*^R) で形質転換し、ピオマイシンとチオストレプトンを含む R2YE 培地上での褐色色素合成によりプロモーター活性を定性的に評価した。黒のバーは TRE 領域を、影矢印は ORF の位置と方向を示す。矢印 B (*traRex*), C (*traex*) は、プライマー伸長実験に使用したプライマーを示す。pMT65 の挿入断片の PCR 増幅には矢印 A (*traRT*) および C で示すプライマーを使用した (詳細は図 1-2 参照)。色素合成は、-, 検出限界以下、+, 弱い合成、++, 強い合成とした。

第3項 制御タンパク質 TraR と TRE 間の結合解析。

pSN22 全塩基配列決定の結果、*traR* は DNA 結合タンパク質に特徴的なヘリックスターンヘリックス (HTH) モチーフを持つタンパク質 (27kDa) をコードしていることが判明し (Kataoka *et al.*, 1994a)、また、*traR* 自身と *tra* オペロンの遺伝子発現を転写レベルで負に制御する事実から、TraR タンパク質はリプレッサーであることが予想された。TraR タンパク質は伝達機能の発現を調節する遺伝的スイッチであり (Ptashne, 1986)、(菌糸内) 伝達機能の発現のために *tra* オペロン発現の負の制御を解除しなければならないと同時に、宿主に対して毒性的活性を持つ *traB* および *traA* の発現を抑制しなければならない。伝達関連遺伝子群の発現制御に関するさらに詳細な知見を得るため、ゲル移動度シフト法、フットプリント法による TraR タンパク質とプロモーターを含む TRE 領域間の結合解析を行なった。

最初に、ゲル移動度シフト法によって、TRE 断片に対する TraR タンパク質の結合活性の検出を行なった。プローブとする DNA 断片には、PCR により増幅した TRE 断片 (260bp, 図 1-2) を使用した。その結果、野生型の伝達能を有するプラスミド pMT911 を保持する *S. lividans* より調製した粗タンパク質試料には、TRE 断片に対する結合によりゲル移動度シフトを生じるタンパク質が存在することが判明した (図 1-4A, レーン 4)。pKKTR (第 2 節 (8) を参照) を用いて *tac* プロモーター支配下で *traR* を発現させた大腸菌の粗タンパク質試料にも、TRE 断片に結合するタンパク質が存在することは確認されている (図 1-4A, レーン 8)。*traR* を保持しない菌体より調製した粗タンパク質試料を用いた対照実験 (図 1-4A, レーン 2, 6)、結合反応時に大過剰の非標識 TRE 断片を加えた競合実験 (図 1-4A, レーン 5, 9) ではゲル移動度シフトは観察されなかったことから、この結合は、TraR タンパク質および TRE 断片に特異的であることが示された。また、放線菌と大腸菌の粗タンパク質試料を用いた場合との間でゲル移動度に差が認められ、大腸菌の粗タンパク質試料を用いた場合の方がゲル移動度は小さか

った (図 1-4A, レーン 4, 8)。大腸菌で発現させた精製 TraR タンパク質を用いたゲルシフト解析では、タンパク質濃度を希釈していくと、移動度が増加していった事実 (図 1-4B) から、粗タンパク質試料における TraR タンパク質濃度差が、ゲル移動度の差の原因であったと考えられる。

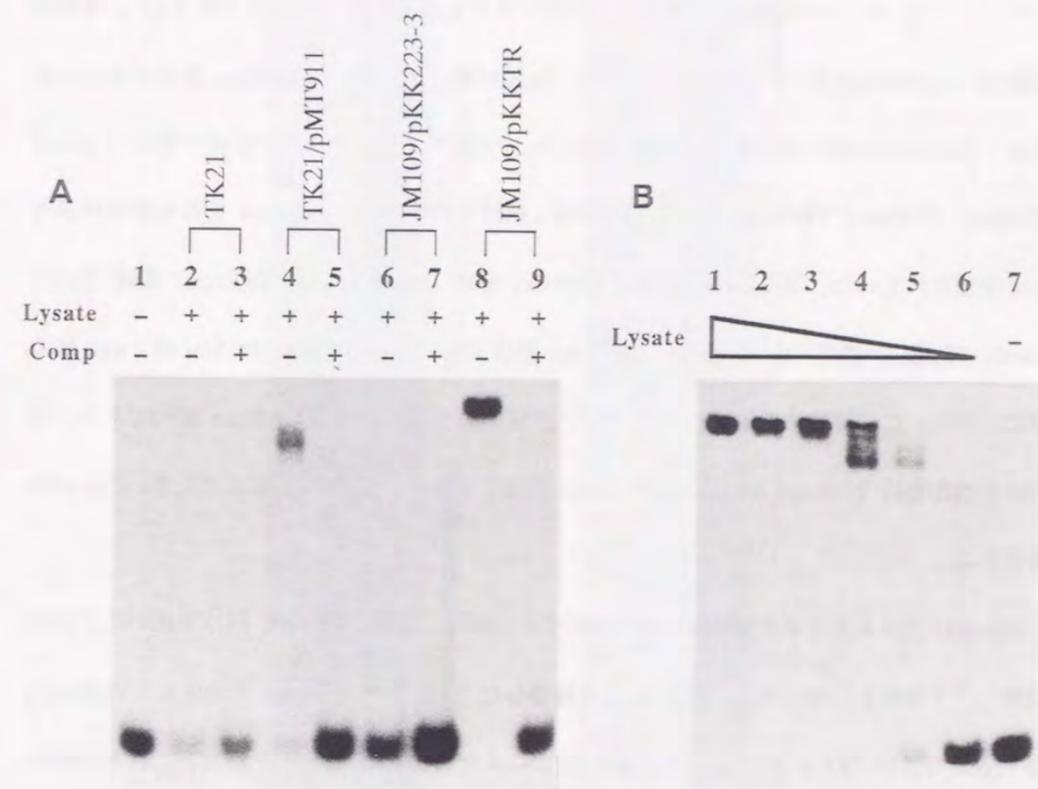


図1-4. (A) 粗タンパク質溶液を用いたゲル移動度試験。*S. lividans* TK21 株 (レーン 2, 3)、pMT911 を保持する *S. lividans* TK21 株 (レーン 4, 5)、pKK223-3 を保持する JM109 株 (レーン 6, 7)、pKKTR を保持する JM109 株 (レーン 8, 9) より調製した粗タンパク質溶液 1 μ g と 32 P で放射能標識した TRE 断片を用いて結合反応を行ない、5% ポリアクリルアミドゲルで電気泳動を行なった。競合実験 (Comp) では約 200 倍の非標識プローブを結合反応時に加えた。レーン 1 にタンパク質非存在下での結合プローブの移動度を示した。

(B) 精製 TraR タンパク質を用いたゲル移動度試験。MalE 融合タンパク質として発現させ、アフィニティー精製後、MalE 部分を取り外した TraR タンパク質を、200, 60, 20, 6, 2, 0.6 ng ずつ結合反応に使用した (レーン 1 から 6)。プローブは (A) と同じものを使用した。

TRE 領域における TraR タンパク質の詳細な結合部位を決定するため、DNase I フットプリント解析を行なった。解析に使用した TraR タンパク質は、MalE 融合体として大腸菌で発現させた後、アミロースレジンカラムでアフィニティー精製し、Factor Xa 消化により MalE 部分を取り外したものを使用した。ゲル移動度シフト法により、精製 TraR タンパク質の TRE 結合活性を確認した後(図 1-4B)、フットプリント解析に供した。得られたフットプリントパターンでは、4 つの保護領域と数箇所の超感受性切断部位が認められた(図 1-5)。その塩基配列上の詳細な位置を、図 1-5C に示した。保護領域は、いずれも TREbox 配列を含んでいたが、各部位への結合親和性に差が認められた。つまり、プロモーター領域と重なっている TREbox1, TREbox2, TREbox3 を含む領域は弱く保護されており、TREbox4 を含む領域が最も強く保護されていた。保護された領域は TREbox1 領域 (16, 18 bases)、TREbox2 領域 (15, 17 bases)、TREbox3 領域 (20, 21 bases)、TREbox4 領域 (26, 23 bases) であった (*tra* 鎖、*traR* 鎖の順に示す)。この実験結果より、TraR タンパク質の結合認識部位は TREbox 配列であり、その結合親和性は TREbox1, TREbox2, TREbox3 領域で小さく、TREbox4 領域で大きいことが示唆された。

DNase I フットプリント解析の結果を確認するために、分割した TRE 断片を用いてゲル移動度シフト解析を行なった。PCR により増幅した TRE 断片を *NspV* で消化し、TREbox1, TREbox2 を含む TRE-R 断片と、TREbox3, TREbox4 を含む TRE-A 断片を得た。これらの断片はいずれも TraR タンパク質の結合部位である TREbox 配列を 2 つずつ含んでいることから、両断片に対する結合の検出が期待されたが、TraR タンパク質の結合を調べた結果、TRE-A 断片への TraR の結合は検出できたが、TRE-R 断片への結合は検出できなかった(図 1-6A)。

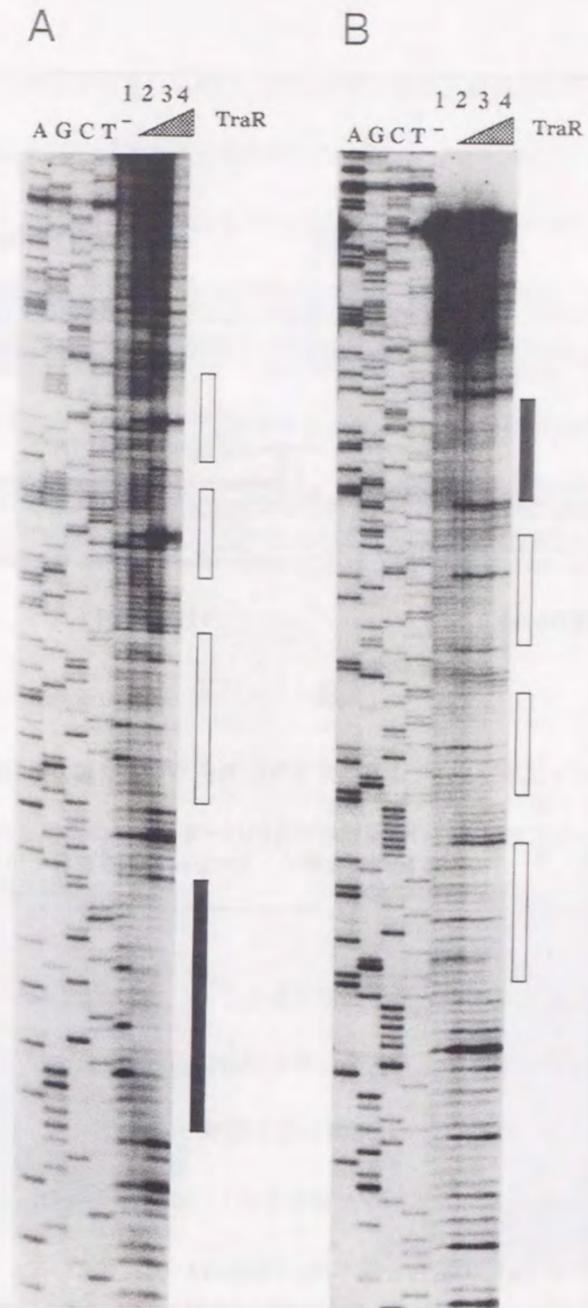


図1-5. DNase I フットプリント法による TRE における TraR タンパク質の結合領域の同定。

フットプリントパターンを *tra* 鎖 (A)、*traR* 鎖 (B) について示した。プローブとする DNA 断片は、プライマー *traRex* と *traex* を用いて PCR 増幅により得た。精製 TraR タンパク質を 0 (レーン 1)、1 (レーン 2)、3 (レーン 3)、10 (レーン 4) μg を用いて、ゲル移動度試験と同じ条件下で結合反応を行なった。4 つの保護領域が観察され、右側のバーで示した。黒のバーで示した保護領域は他よりも強く保護されており、TREbox4 を含んでいた。

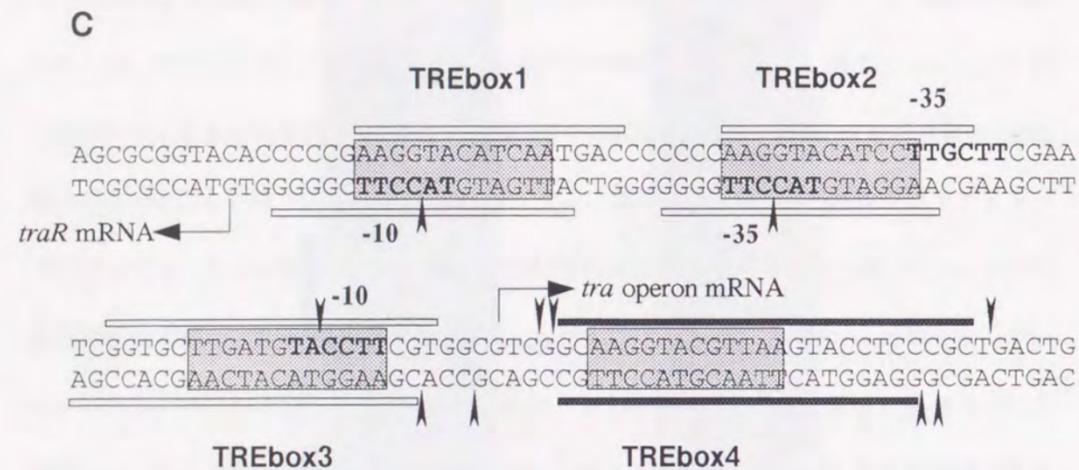


図1-5 (C) DNase I フットプリント法により同定された TraR タンパク質の結合領域。

フットプリントパターンにおける弱い保護領域を白のバーで、強い保護領域を黒のバーで、超感受性切断部位を矢印で示した。-10, -35 配列を太字で、TREbox 配列を影枠で示した。

TREbox4 領域は TraR の最も強い結合部位であることが、フットプリント解析結果から示唆されていたので、上記のゲルシフト解析の結果を詳細に調べるために、TREbox4 領域に注目して欠失解析を行なった。PCR により増幅した3種類の TRE 断片 TRED3 (TREbox4 を6塩基欠失)、TRED2 (TREbox4 およびその5'側を含む)、TRED1 (TREbox4 およびその3'側領域12bp までを含む) への TraR の結合を調べた。TREbox4 の3'側の12bp はフットプリントパターンにおいて保護されていた部分である。図1-6B に示すように、TraR は TRED1 には結合したが、TRED2, TRED3 には結合しなかった。

フットプリント解析結果と欠失 TRE 断片を用いたゲル移動度シフト解析の結果から、TraR の相互作用は TREbox4 領域で最も強く、TREbox1, TREbox2, TREbox3 領域との相互作用はゲ

ル移動度シフト法では検出できない微弱な相互作用であると推察された。TraR の相互作用の検出に関して、フットプリントとゲル移動度シフト解析との間で違いが生じたのは、結合反応の後、ゲルシフト解析では電気泳動を行なうために、微弱な相互作用の検出感が低くなるためであると考えられる。ただしこの時点では、TREbox4 領域を欠失した断片 TRED1, TRED2 に TraR は結合していない可能性も考えられた。つまり、TraR の結合は協調的であり、TREbox4 領域との相互作用が他の相互作用を促進するという可能性が考えられた。また、TRED1 と TRED2 の比較から、TraR の TREbox4 領域への結合には、TREbox4 配列の3'側の12bp が重要であることが明らかとなった(図1-6C)。

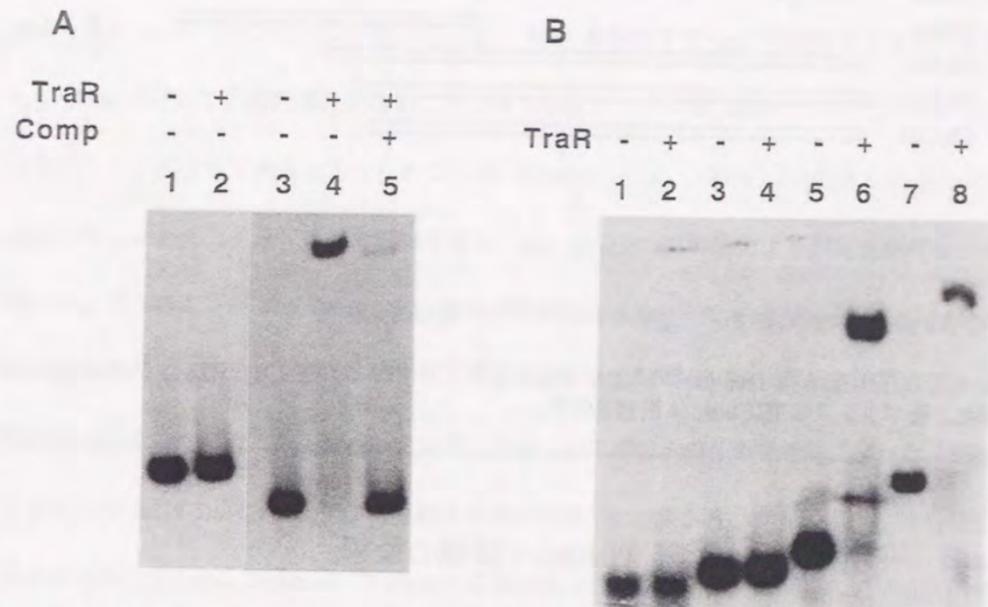


図1-6. ゲル移動度解析による欠失 TRE 断片に対する TraR の結合活性。

(A) ³²P で放射能標識した TRE-R (レーン1, 2)、TRE-A (レーン3, 4, 5) を200 ng の TraR タンパク質存在下(レーン2, 4, 5)、非存在下(レーン1, 3)で結合反応後、5% ポリアクリルアミドゲルで電気泳動を行なった。レーン5では、コンペティターとして大過剰の非標識プローブ存在下で結合反応を行なった。

(B) ³²P で放射能標識した TRED3 (レーン1, 2)、TRED2 (レーン3, 4)、TRED1 (レーン5, 6)、TRE (レーン7, 8) を200 ng の TraR タンパク質存在下(レーン2, 4, 6, 8)、TraR 非存在下(レーン1, 3, 5, 7)で結合反応を行ない、5% ポリアクリルアミドゲル電気泳動を行なった。

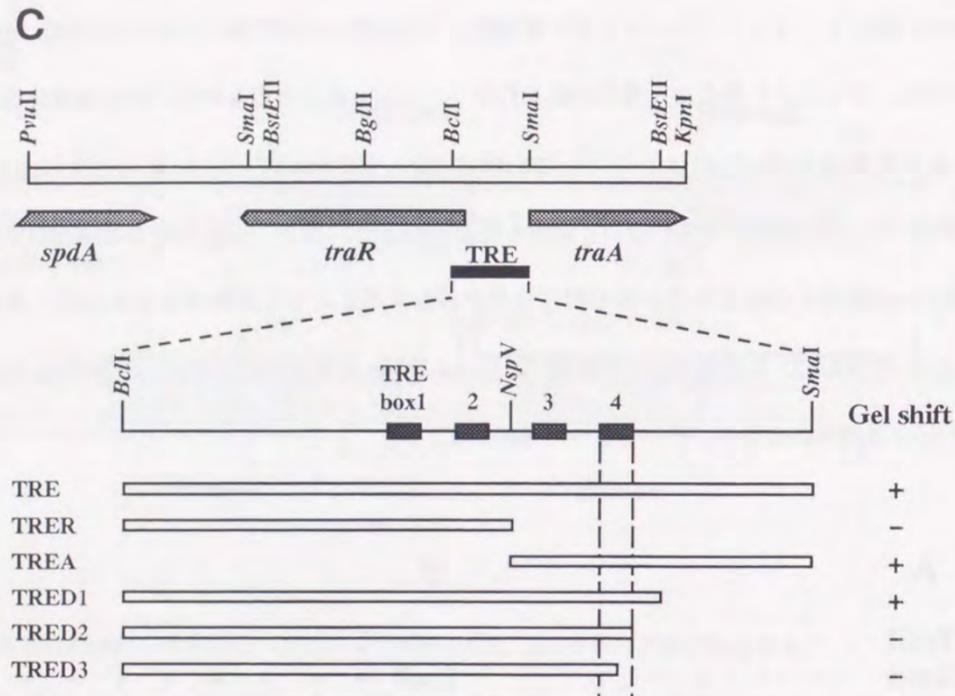


図1-6. (C) 様々な欠失 TRE 断片に対する TraR タンパク質の結合活性。

TRE-R および TRE-A は TRE 断片の *NspV* 消化により、TRED1, TRED2, TRED3 は PCR 増幅により得た。影ボックスは TREbox1-4 配列を示す。

第4項 発現制御における TREbox4 領域の役割。

前項において、TREbox4 領域は、*in vitro* における TraR タンパク質の TRE 領域への結合に重要であることが明らかとなった。そこで、この領域が発現制御においても主要な役割を有しているか否かを調べるために、TREbox4 領域欠失の発現制御に与える影響を調べた。

プラスミド pPTD1, pPTD2, pPTD3, pPTD4 は、*traR* ORF と TRE および TRED1~3 と同じ TRE 領域を持ち、その下流にレポーターである褐色色素合成遺伝子 *whiE* が連結された構造を

有している (図 1-7)。pPTD1 はネガティブコントロールであり、同じプラスミドより供給される TraR タンパク質が TRE 領域を介して下流に存在する *whiE* 遺伝子の発現を負に制御することにより、色素合成が抑制されることを確認した。pPTD2, pPTD3, pPTD4 における *whiE* 遺伝子の制御状態を寒天培地上での色素合成を指標に調べた結果、いずれにおいても色素は観察できなかった。この結果は、TraR と TREbox4 領域との相互作用が破壊されており、ゲル移動度シフト解析では TraR の結合が検出できなかった TRE 領域を持つ pPTD3 や pPTD4 において、下流遺伝子の負の制御が依然として行なわれたことを示している。この結果をさらに確認するために、TRED1~3 と同じ TRE 領域を有する pESS500 誘導体である pESK501, pESK502, pESK503 を構築した (図 1-8)。本来、TRE 領域は、菌糸間伝達を支配する遺伝子 *traB* を含む *tra* オペロンを負に制御している。TraR 非存在下で *traB* を保持するプラスミドは *S. lividans* に対して形質転換されないことから、TraB タンパク質は細胞に対して致死的な活性を有するタンパク質であると考えられている (Kataoka *et al.*, 1991a)。pESK501, pESK502, pESK503 における *tra* オペロンの制御状態を、*traB* 遺伝子の脱抑制による致死性発現を指標に調べた。プラスミドが *S. lividans* に対して形質転換ができない時、致死性は発現していると示した。pESK501 - 503 が *S. lividans* に対して形質転換できた結果は、*traB* 遺伝子の脱抑制による致死性が発現しなかったことを示しており、先の *whiE* 遺伝子の発現を指標に調べた実験結果を支持した (図 1-7)。以上の 2 つの実験系を用いて調べた結果から、ゲルシフト法では検出できなかった TREbox1, TREbox2, TREbox3 における TraR の相互作用は存在して下流遺伝子の発現を負に制御しており、この結果より TREbox4 領域が存在しなければ他の TREbox 領域に TraR が結合しないという可能性は否定された。

traR ORF 内の *BglII* 部位より後半部分を欠損しているプラスミド pPTD5 と pPTD6 の制御因子による色素合成抑制の解除はポジティブコントロールであり、TRED1 および TRED3 と同

じTRE領域を有している。pPTD5およびpPTD6におけるTraR欠失体は、ヘリックス/ターン/ヘリックスのDNA結合モチーフを保持している。pPTD5ではpPTD6よりも色素合成の抑制解除が小さかった(図1-7)。pPTD5とpPTD6を比較して、pPTD5はTraRタンパク質が結合しうるTREbox4領域を含んでいたことから、TREbox4領域とTraR欠失体におけるDNA結合モチーフとの相互作用が、下流遺伝子の発現に対して負に作用したためであると考えられた。

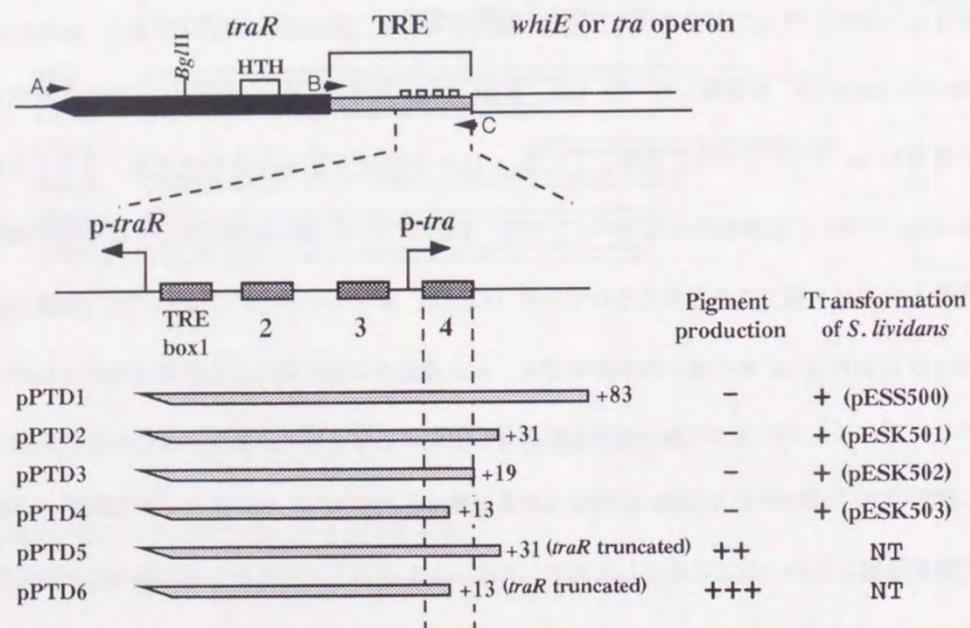


図1-7. 欠失TREを介した下流遺伝子の発現制御状態。

プライマーA (traRT) およびC (traex), D1-D3 (図1-2)を用いてPCRにより増幅したtraR-TRE断片にBamHIリンカー(10mer)を付加した後、pARCIのBamHI部位へクローン化し、pPTD1-4を得た。pPTD5-6は、pPTD2およびpPTD4におけるBglII-BamHI断片をpARCIのBamHI部位へクローン化することにより得た。pESS500誘導体(pESK501-503)の構築は、図1-8に示した。pPTD2, 3, 4はそれぞれTREbox1, 2, 3と同じTRE領域を有している(図1-6C)。HTHはTraRにおけるDNA結合モチーフを示した。色素合成; -, 検出限界以下, ++, 強い, +++, 非常に強い。放線菌に対する形質転換がプラス(+)の時、致死性は発現していないとした。NTは未試験であることを示す。

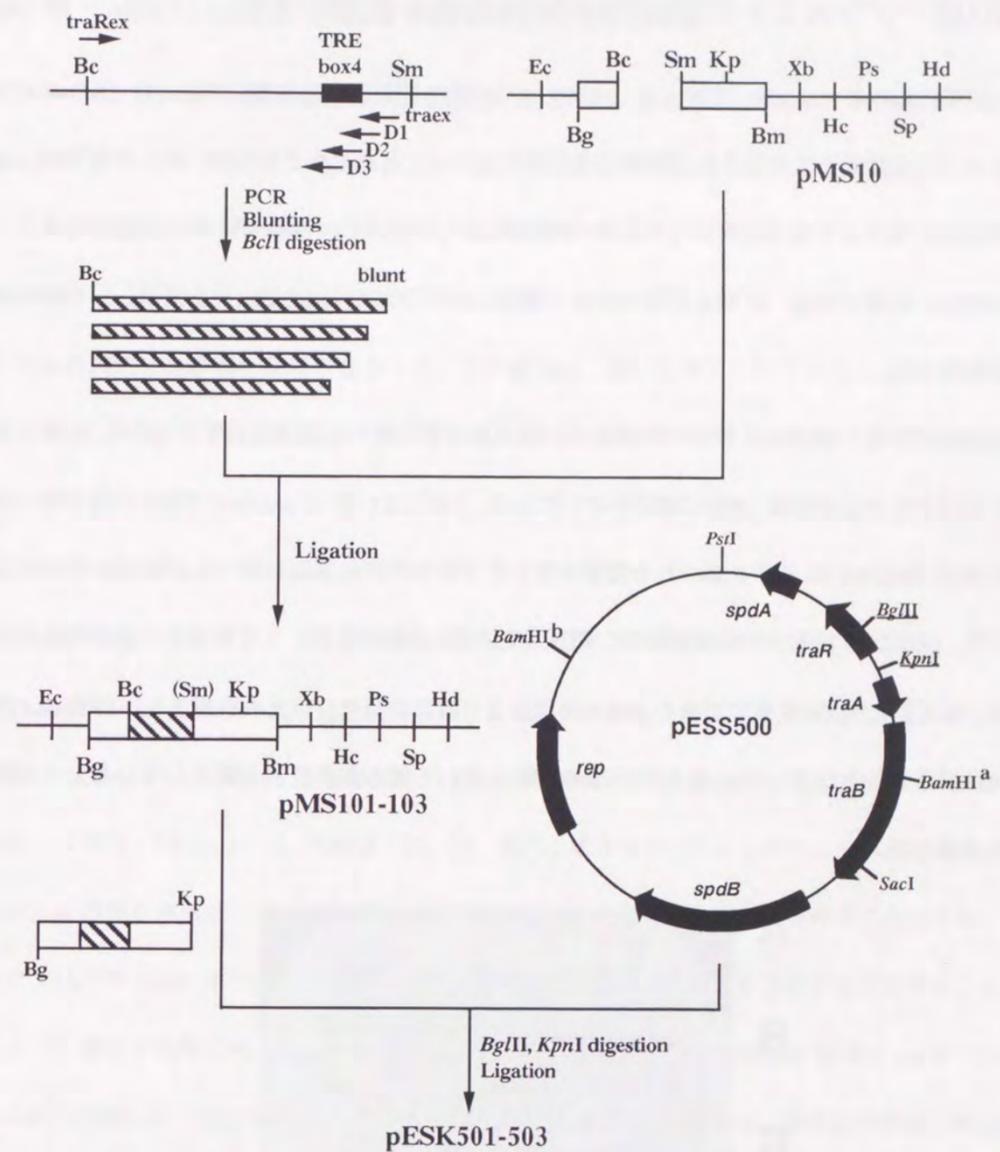


図1-8. 欠失TRE領域を有するpESS500誘導体(pESK501-503)の構築。

プライマーtraRexおよびD1-D3を用いてTRE領域を増幅した後、末端平滑化およびBclI消化を行ない、中間ベクターpMS10のBclI-SmaI断片を置換し、pMS101-103を得た。プラスミドpMS101-103より切り出されたBglII-KpnI断片をpESS500のそれと置換することにより、pESK501-503を得た。制限酵素部位略称は、Bc (BclI), Bg (BglII), Bm (BamHI), Ec (EcoRI), Hc (HincII), Hd (HindIII), Kp (KpnI), Sm (SmaI), Sp (SphI), Ps (PstI), Xb (XbaI)とした。黒ボックスはTREbox4配列を示す。斜線ボックスはPCRにより増幅された欠失TRE断片を示す。

第5項 プラスミド伝達における TREbox4 領域の役割。

前項において、*in vitro* において TraR タンパク質の最も強い結合部位であった TREbox4 領域は、下流遺伝子に対する負の制御には必須ではないことが明らかとなった。そこで TREbox4 領域がプラスミド伝達において何らかの役割を果たしているか否かを明らかにするために、TREbox4 配列 (12 bp) を *Pst*I 部位 (6 bp) で置換したプラスミド pESS551 を構築し、その伝達能を調べた。

pESS551 は、TREbox4 配列が欠損している以外は野生型の伝達能を有する pSN22 由来シャトルベクター pESS500 と同じ構造を有している。pESS551 を *S. lividans* TK21 へ導入し、*S. lividans* TKC244 株 (*str-6 thr-1*) を受容菌としてプラスミド伝達能を調べた。図 1-9 に示すように、pESS551 の菌糸内伝達効率は、野生型である pESS500 (A) よりは低く、菌糸内伝達効率が低下した *spdB* 変異型である pMT926 (C) よりは高かった。以上の結果より、TREbox4 配列はプラスミド伝達、特に菌糸間伝達の段階において何らかの役割を果たしていることが明らかとなった。



図1-9. pESS551 のプラスミド伝達効率。

pESS500 (野生型, A)、pFD7 (*traA* 変異型, B)、pMT926 (*spdB* 変異型, C)、pESS551 (Δ TREbox4, D) を保持する *S. lividans* TK21 株を受容菌である TKC244 株の胞子液を塗布した R2YE 培地上に線状にストリークし、1週間、30度で培養して胞子形成させた後、チオストレプトンとストレプトマイシンを含む R2YE 培地へレプリカした。この方法ではプラスミドが移行した受容菌のみが生育することができ、従ってコロニー幅からプラスミド (菌糸内) 伝達効率を定性的に評価した。

第6項 pSN22 伝達関連遺伝子群の発現制御機構。

本章では、pSN22 伝達関連遺伝子群の発現制御に関する知見を得るために、制御因子 TraR タンパク質と TRE 領域間の *in vitro* における結合解析と、TREbox4 領域欠損の発現制御とプラスミド伝達に与える効果について検討した結果を述べてきた。TREbox4領域は、*in vitro* においては TraR タンパク質の結合親和性が最も大きい部位でありながら、その欠損は下流遺伝子の負の制御には影響を及ぼさなかった。この事実は、弱いと考えられていた TREbox1~3 領域と TraR タンパク質との相互作用が *in vivo* で確かに起こっており、それが下流遺伝子の負の制御に十分であることを示している。また TraR タンパク質の欠失により引き起こされた下流遺伝子の脱抑制は、TREbox4 領域の存在により若干緩和された事実から、TREbox4 領域と TraR との相互作用もまた、下流遺伝子の発現に対して負の効果を持つことが示された。

TraR タンパク質による負の発現制御には、2種類のメカニズムが存在すると考えられる。1つは、TREbox1~3 が関与する転写装置の DNA への接近阻害 (Promoter hiding; Pittard & David, 1991) である。TREbox1~3 領域は -10, -35 配列と重なっていることから、それらの領域と TraR との相互作用は、ゲル移動度シフト解析では検出できない微弱な相互作用であっても、シグマ因子や RNA ポリメラーゼ等の転写に必要な因子の DNA に対する接近を阻害することにより、遺伝子発現に対して負の効果を持つと考えられる。一方、TREbox4 領域は *tra* オペロンの転写開始点の下流に存在し、この領域と TraR との強い相互作用は、転写因子の進行阻害 (Roadblock; Deuschle *et al.*, 1990) により下流遺伝子の発現に対して負の効果を持つと考えられた。

しかしながら、TREbox4 領域と TraR との相互作用は存在しなくても、下流遺伝子の負の制御は十分に行なわれた。それでは、この相互作用はどのような場面でその役割を果たすのであろうか。本研究で得られた知見を総括し、図 1-10 に示すような pSN22 伝達関連遺伝子群の

発現制御モデルを提案する。このモデルでは、接合伝達がおこる前、TraRタンパク質は TREbox1~4 領域の全てに結合している (Stage I)。接合伝達が起こると、接合点においてプラスミドが供与菌から受容菌へ移行する際に起こる TraR 分子濃度の半減が引き金となって、TraR と DNA 間の結合平衡にずれが生じることにより、TraR が DNA より解離し、*traR* および *tra* オペロンの一過的な転写が起こる (Stage II)。一過的に転写される *tra* オペロンはプラスミド伝達の第 2 段階である菌糸内伝達に必要な TraA, SpdB タンパク質を供給する (後に TraB も必要であることが判明する、第3章参照)。TraRの発現レベルが上昇してくると、TraR は最も強い結合部位である TREbox4 領域へ最初に結合し、転写装置進行阻害 (Roadblock) により *tra* オペロンの転写を優先的に抑制する (Stage III)。*tra* オペロンは毒性的活性を有する TraB や TraA タンパク質をコードしているので、*tra* オペロン転写の優先的な抑制は、菌の状態と調和のとれた効率の良いプラスミド伝達に貢献していると考えられた。

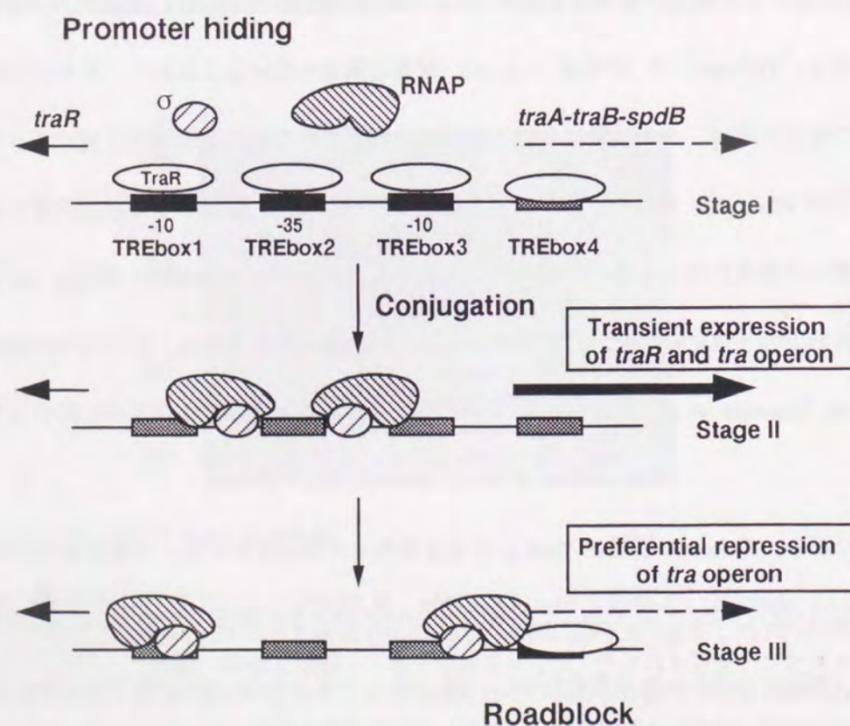


図1-10. pSN22 伝達関連遺伝子群の発現制御に関する推定モデル。

黒ボックスは TREbox1-4 を示す。矢印は *traR* および *tra* オペロンの転写方向と相対的強度を表わす。RNAP は RNA ポリメラーゼ、 σ はシグマ因子を表わす。-10, -35 の数字は、-10, -35 配列を示す。

第4節 要約

- (1) *traR*, *tra* オペロンの転写開始点を決定し、プロモーター構造を明かにした。
- (2) *tra* オペロンのプロモーター活性は、完全長の *traR* ORF により単独で抑制された。
- (3) TraR タンパク質の結合部位を同定した結果、いずれも TRE 領域内に存在する4つの繰り返し配列 (TREbox配列) を含んでいた。TraR タンパク質の結合親和性には部位によって差があり、TREbox4 領域への結合親和性が最も大きかった。
- (4) ゲル移動度シフト解析では、TREbox4領域に対する TraRの結合しか検出されず、TREbox1~3 領域に対する結合はゲルシフト法では検出されない非常に微弱な相互作用であると推定された。
- (5) *in vitro* で最も強い結合部位であった TREbox4 領域は下流遺伝子の負の制御には必須ではないことが明らかとなった。つまり負の制御には、弱いと考えられていた TREbox1~3 領域だけで十分であった。しかしながら TraR - TREbox4 領域間相互作用は遺伝子発現に対して負の効果を持つことが示唆された。
- (6) TraR タンパク質による遺伝子発現の負の制御には TREbox1~3 領域が関与する転写装置の DNA への接近阻害 (Promoter hiding) と TREbox4 領域が関与する転写装置の進行阻害 (Roadblock) の 2 種類があると考えられ、両方のメカニズムが効率よいプラスミド伝達には必要であると考えられる。

第2章 TraBタンパク質におけるNTP結合モチーフのDNA伝達における役割

第1節 緒言

放線菌プラスミドによる接合伝達では、プラスミド上にコードされる伝達関連遺伝子数が数個 (pSN22 では 5 遺伝子座, Kataoka *et al.*, 1991a) と、他の系 (F プラスミドでは 30 遺伝子座以上, Ippen-Ihler & Skurray, 1993) に比べて極めて少ないことが特徴的である。特に、他細菌プラスミドの接合伝達に相当する異種類細胞間の菌糸間伝達は、4つの主要な放線菌プラスミド pIJ101 (Tra; Kendall & Cohen, 1988), pSN22 (TraB; Kataoka *et al.*, 1991a), pSAM2 (TraSA; Hagege *et al.*, 1993), SCP2* (TraA; Brolle *et al.*, 1993) において 1 因子により支配されると考えられている (括弧内にその因子を示す)。菌糸間伝達に関与するタンパク質は、TraA を除いて、いずれも *kil - kor* システムの *kil* に相当することが明らかにされているが (Kendall & Cohen, 1987; Kataoka *et al.*, 1991a; Hagege *et al.*, 1993)、表現型としての致死性とプラスミド伝達におけるタンパク質の役割との関連については全く解明されていない。また、これらのタンパク質群は、共通して Walker NTP 結合モチーフ (Walker *et al.*, 1982) を保持している。同じモチーフを持ち接合伝達に関与するタンパク質としては、F プラスミドの TraI や Ti プラスミドの VirD2 に代表される ssDNA の生成に関与するものと (Abdel-Monem *et al.*, 1983; Yanofski *et al.*, 1986)、F プラスミドの TraD や Ti プラスミドの VirB4, VirB11 に代表される輸送通路の構成因子としてDNA輸送に直接関与するものが知られている (Ward *et al.*, 1991; Panicker & Minkley, 1992; Berger & Christie, 1993; Dreiseikelmann, 1994)。またこの NTP 結合モチーフは ATP 加水分解酵素の間で良く保存されていることから、TraD, TraI, VirB4, VirB11, VirD タンパク質の機

能に ATP が要求されることが示唆されており、また実際にATPase活性の検出が報告されている (Abdel-Monem *et al.*, 1983; Christie *et al.*, 1989; Panicker & Minkley, 1992; Shirasu *et al.*, 1994)。

本章では、pSN22 の接合伝達における TraB タンパク質の機能に ATP が関与する可能性を知るために、Walker NTP 結合モチーフの部位特異的変異解析を行ない、本モチーフがプラスミド伝達と染色体移行の両方に必須であることを明らかにした。また、類似した機能を有しながら、アミノ酸配列とサイズにおいて多様性を見せる Tra, TraB, TraSA, TraA タンパク質の間において、NTP 結合モチーフの配置について類似性を見いだした。

第2節 実験材料および方法

本章で用いた実験材料および実験方法のうち、第 1 章において記述した以外のものについて記述する。

(1) 使用菌株、ファージおよびプラスミド、ならびに使用培地と培養条件

染色体移行頻度 (Chromosome mobilizing ability: Cma) 算出のための遺伝的交雑およびプラスミド伝達試験における受容菌には、*S. lividans* TKC244 (*str-6 thr-1 SLP2 SLP3*; Kataoka *et al.*, 1991a) を用いた。部位特異的変異導入のための大腸菌宿主には、SDM (*supE44, mcrAB, recA1, hsdR17, Tef Δ(lac-proAB)/F'[traD36, proAB⁺, lacI⁺, lacZΔM15]*) を用いた。

実験に使用した放線菌プラスミドおよび大腸菌中間ベクターを、表 2-1 に示した。大腸菌での部位特異的変異導入のための 1 本鎖 DNA 調製には M13mp18 および mp19 (Yanisch-Peron *et al.*, 1985) を使用した。

表 2-1. 実験に使用した放線菌プラスミド、および大腸菌中間ベクター

Plasmid	Description	Reference
pSN22	<i>S. nigricans</i> plasmid, Tra ⁺ , Pock ⁺ , Cma ⁺ .	Kataoka <i>et al.</i> , 1991a.
pMT911	Wild type derivative of pSN22, Tsr ^R .	Kataoka <i>et al.</i> , 1991a.
pESS500	Shuttle vector of pSN22 with pACYC177, Tra ⁺ , Pock ⁺ , Cma ⁺ , Tsr ^R .	Kataoka <i>et al.</i> , 1991a. 図 2-2.
pESS531 -pESS539	pESS500 derivative which has single mutation in Walker Type-A sequence of <i>traB</i> .	図 2-1. 図 2-2B.
pESS541 -pESS542	pESS500 derivative which has multiple mutation in Walker Type-B sequences of <i>traB</i> .	図 2-2.
pFD7	pESS500 which has a frame-shift in the <i>traA</i> gene.	Kataoka <i>et al.</i> , 1991a. 図 2-2B.
pMT926	<i>spdB</i> ⁻ derivative of pMT911.	Kataoka <i>et al.</i> , 1991a. 図 2-2B.
pMT11	A 4.5 kb <i>Pst</i> I- <i>Sac</i> I fragment of pSN22 is subcloned into pUC19.	第 2 節 (2), (3).

(2) 変異オリゴヌクレオチドを用いた部位特異的変異導入

Type-A 配列への変異導入は、Vandeyar らの方法に従い、T7-GEN™ in vitro mutagenesis kit (USB) を用いて行なった (Vandeyar *et al.*, 1988)。Type-A 配列を含む *traB* ORF 内の *Bam*HI-*Sac*I 断片をクローン化した M13mp18 誘導体を、変異導入のための鋳型として使用した。使用した変異オリゴヌクレオチドは、図 2-1B に示した。シーケンスにより塩基配列を確認した後、変異を含む *Bam*HI-*Sac*I 断片を pMT11 の同断片と置換し、得られた pMT11 誘導体の *Pst*I-*Sac*I 断片を pESS500 の同断片と置換し、pESS531-pESS539 を得た。

(3) PCR を用いた部位特異的変異導入

pESS541 の構築には、プライマー A (5'-GCCGGATCCGACTCGGAC-3', 下線部は *Bam*HI 部位を示す) と B1-2、B1-1 と C (5'-GAGGAGCTCGCGGCCTC-3', 下線部は *Sac*I 部位を示す) の組み合わせにより、Type-B 類似配列である B1 より上流および下流の領域を PCR により増幅し

た (図 2-2A)。変異を含む B1-1、B1-2 プライマーは、384、385 位の Glu コドンを Ala コドンに変換すると同時に、B1 配列を *Pst*I 部位に変換した。PCR 産物をアガロース電気泳動により精製した後、*Pst*I 消化し、T4 DNA リガーゼにより連結した。ライゲーション反応液の一部を鋳型として、プライマー A と C によりヘテロ連結体を PCR で増幅した。*Bam*HI、*Sac*I で消化した後、pUC18 にサブクローン化し、シーケンスにより塩基配列を確認した。変異を含む *Bam*HI-*Sac*I 断片を pMT11 の同断片と置換し、得られた pMT11 誘導体の *Pst*I-*Sac*I 断片を pESS500 の同断片と置換し、pESS541 を得た。pESS542 の構築には、B1-1、B1-2 の代わりに B2-1、B2-2 プライマー (図 2-2A) を使用した。

(4) 染色体移行頻度 (Cma) 算出のための遺伝的交雑

プラスミド (Thio^R) を保持する *S. lividans* TK21 株 (供与菌) と受容菌である TKC244 株 (Str^R, *thr*) の胞子をほぼ同数 (10⁶-10⁷) で混合し、R2YE 培地上へ塗布した。30 °C で約 1 週間培養し、胞子を形成させた後、3 ml の 20% グリセリンで胞子を回収した。蒸留水で適当な濃度に希釈した胞子液をストレプトマイシンを含む MM 培地 (プレート A)、スレオニンを追加した MM 培地 (プレート B) 上に塗布した。Cma は、プレート A に生育したコロニー数 (組換え体数) / プレート B に生育したコロニー数 (両親株数) より算出した。

第3節 結果および考察

第1項 プラスミド伝達と染色体移行における Walker Type-A 配列の関与。

Walker NTP 結合モチーフには 2 種類存在し、そのうち Type-A 配列は、GxxxxGKT/S という明確なコンセンサスを有する (Walker *et al.*, 1982)。TraB タンパク質における Type-A 配列 (270-GMTGSGKT-277) のプラスミド伝達と染色体移行への関連性を調べるために、オリゴヌクレオチドを用いた部位特異的変異導入により、9 つの変異プラスミド pESS531~pESS539 を作成した (図 2-1)。変異導入は、*traB* ORF 内の *Bam*HI-*Sac*I 断片 (1.1 Kb) 上で行った。変異の内容は、類似残基と非類似残基への置換を含み、保存性の高い残基 (275G, 276K) とそうでない残基 (273G, 274S) に対して置換を行なった。

既知の ATP 加水分解酵素における Type-A 配列の比較 (Gorbalenya *et al.*, 1989; Linder *et al.*, 1989; Saraste *et al.*, 1990; Lessl *et al.*, 1992) から、最もよく保存されていた 276 位の Lys 残基を、非類似残基である Met 残基 (pESS536)、Glu 残基 (pESS537)、または停止コドン (pESS538) に置換した。酵母の RAD3 タンパク質、あるいは *Salmonella typhimurium* の MutS タンパク質の変異解析 (Sung *et al.*, 1988; Haber & Walker, 1991) において、Lys 残基の置換は、ATP 結合あるいは加水分解を低下させるが、完全には欠損させなかった事実を考慮して、残存活性を持たない完全な欠損変異体を取得するために、275, 276, 277 位の Gly, Lys, Thr 残基を欠失させた変異体 (pESS539) を作成した。次いで、2 番目に保存性の高い 275 位の Gly 残基を、類似残基である Ala 残基 (pESS534) と非類似残基である Ser 残基 (pESS535) に置換した。

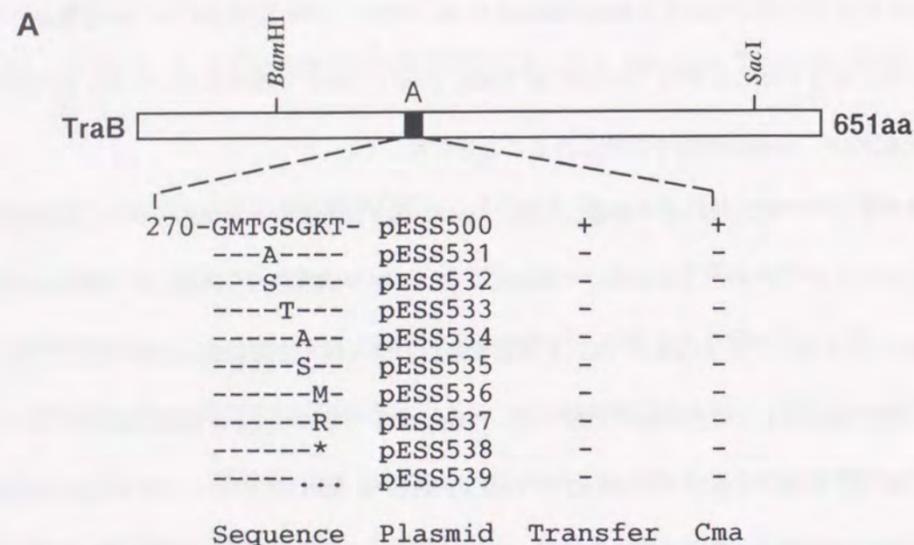
残存活性を持つ変異体を得る目的で、保存性が比較的低い 273 位の Gly 残基を、Ala 残基 (pESS531) または Ser 残基 (pESS532) に、274 位の Ser 残基を Thr 残基 (pESS533) にそ

れぞれ置換した。273 位の Gly → Ser 置換によって得られた Type-A 配列 (AAGKT) は大腸菌の RecA のものと同じであり (Abdel-Monem *et al.*, 1983)、274 位の Ser → Thr 置換はヘリカーゼによく見られることから (GTGKT/S; Linder *et al.*, 1989)、置換によって得られた新しい Type-A 配列が、TraB の機能を保持しうることを期待した。

変異点をシーケンスにより確認した後、*Bam*HI-*Sac*I 変異断片を中間ベクター pMT11 を経由してシャトルベクター pESS500 へ連結し、pESS531~pESS539 を構築した (図 2-1A)。この 9 つのプラスミドで *S. lividans* TK21 を形質転換し、得られた形質転換体を供与菌として、プラスミド伝達能および染色体移行を調べた。作成したすべての Type-A 配列変異プラスミドは両方の能力を欠損しており (図 2-1A)、TraB の Type-A 配列は、プラスミド伝達および染色体移行における TraB タンパク質の機能に必須であることが明らかとなった。また、9 つの Type-A 配列変異プラスミドが全て DNA 伝達能を欠損し、残存活性を持つ変異体が得られなかったことから、この配列が突然変異に対して厳しい規約を受けていることが示唆される (Kimura, 1968; Kimura & Ohta, 1973)、この配列を含むドメインが他のドメインと相互作用している可能性が考えられる。

第2項 Walker Type-B 配列の同定。

Walker NTP 結合モチーフのうち Type-B 配列 (R/K-x-x-x-x-G-x-x-x-L-h-h-h-h-D, h は疎水性残基; Walker *et al.*, 1982) は弱い制約を有するモチーフで、ヘリカーゼの間で良く保存されている「DEAD box」 (V/I-L-D-E-A-D-x-M/L-L-x-x-G-F; Linder *et al.*, 1989) と呼ばれるモチーフに周道的に一致する。変異解析によるこのモチーフの重要性を示した例は知られていないが、タンパク質の 3 次元構造解析から Mg-ATP の結合に関与することが示唆されている (Fry *et al.*, 1986; Jurnak, 1988; Taylor & Green, 1989)。



B

	3500	3520
pESS500	GGGATGACCGGCTCGGGCAAGACCGAGGGCGCCGTGGAC	
	G M T G S G K T E G A V D	
pESS531	GGGATGACCGCCTCGGGCAAG	
pESS532	GGGATGACCAAGCTCGGGCAAG	
pESS533	ATGACCGGCAAGACCG	
pESS534	ACCGGCTCGGCAAGACCGAG	
pESS535	ACCGGCTCGAGCAAGACCGAG	
pESS536	GGCTCGGGCATGACCGAGGGC	
pESS537	GGCTCGGGCGAGACCGAGGGC	
pESS538	GGCTCGGGCTAGACCGAGGGC	
pESS539	GGGATGACCGGCTCG.....GAGGGCGCCGTGGAC	

図2-1. TraB タンパク質における Walker Type-A 配列 (A) に対する部位特異的変異導入とプラスミド伝達および染色体移行に関する表現型 (B)。

(A) 部位特異的変異を導入した残基と変異の内容と、その表現型。[.] は欠失残基、[*] は終始コドンを表わし、置換された残基のみを表示した。プラスミド伝達 (Transfer) はプレート上でのプラスミド伝達試験 (第1章、第2節 (15)) により調べた。染色体移行頻度 (Cma) は、 $<10^{-7}$ をマイナス、 10^5 をプラスとした。Cma の算出方法は、本章の第2節 (4) を参照。

(B) 部位特異的変異導入に用いた変異オリゴヌクレオチドの塩基配列。太字は変異導入残基、[.] は欠失残基を示す。

Type-B 配列は、多くの場合 Type-A 配列の下流に見いだされることを考慮し、「hhhhDEAD」からなるモチーフをもとに TraB タンパク質における Type-B 類似配列を検索した結果、B1 (380-LTWFEAAA-) および B2 (536-QMLLDDDG-) の2つの配列を見出した。これらの配列と、プラスミド伝達ならびに染色体移行との関連を調べるために、配列 B1 および B2 において Mg-ATP の2価カチオンの安定化に関与すると考えられる連続した複数の酸性アミノ酸残基 (384, 385 位の Glu 残基と 520, 521, 522 位の Asp 残基) を、PCR 法を用いて同時に疎水性である Ala 残基に置換した。塩基配列を確認後、変異プラスミド pESS541 および pESS542 を構築した (図 2-2A)。

第2項と同様に、pESS541 および pESS542 で *S. lividans* TK21 株を形質転換し、得られた形質転換体を供与菌としてプラスミド伝達および染色体移行能を調べた結果、pESS541 は両方の能力を欠損したが、pESS542 は菌糸間、菌糸内伝達および染色体移行ともに野生型と同等の表現型を示した (図 2-2B)。この結果より、配列 B1 は、Type-A 配列と同様に、プラスミド伝達および染色体移行に必須であることが明らかとなった。

図2-2. Walker Type-B 配列 (B1, B2) に対する部位特異的変異導入 (A) とプラスミド伝達および染色体移行に与える影響 (B)。

(A) B1, B2 配列に対する部位特異的変異導入。配列 B1 に対する変異導入に際しては、プライマー A, B1-1, B1-2, C を用いて2つの断片を PCR により増幅し、PstI 消化後、2つの PCR 断片を連結した。B1-1, B1-2 プライマーは、384, 385 位の Glu コドンを変換すると同時に、B1 配列を PstI 部位に変換した。pESS542 の構築には B1-1, B1-2 の代わりに B2-1, B2-2 プライマーを使用した。

(B) 上から pESS500 (野生型, A)、pFD7 (*traA* 変異型, B)、pMT926 (*spdB* 変異型, C)、pESS533 (Type-A 配列変異, D)、pESS541 (B1 配列変異, E)、pESS542 (B2 配列変異, F) のプラスミド伝達、および染色体移行に関する表現型。プラスミド伝達および染色体移行頻度 (Cma) の測定方法は、第1章、第2節 (15) および本章、第2節 (4) に記載した。Tra は菌糸間伝達を表わす。Spd は菌糸内伝達であり、++ はコロニー幅 6-8 mm、+ はコロニー幅 3-4 mm、- はコロニー幅なしとした。NA: not applicable. NC: not counted.

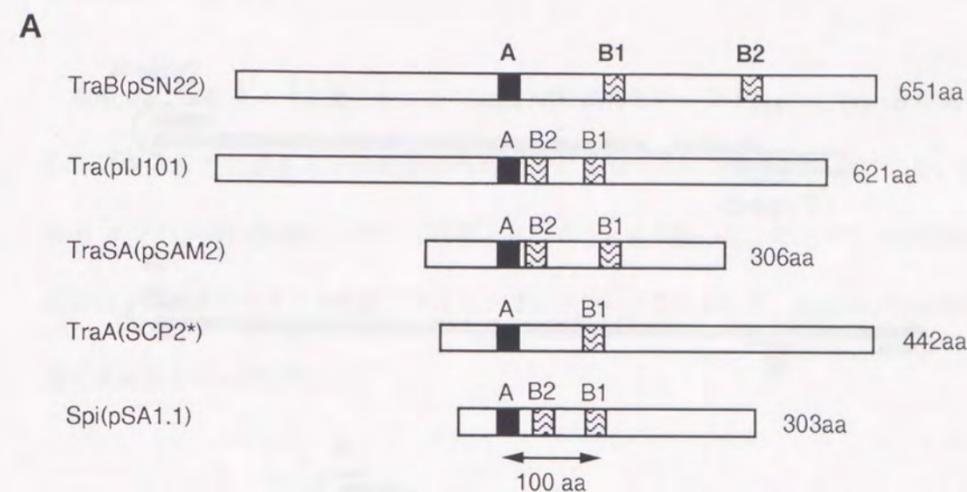
る傾向と良く一致した。また、Tra, TraSA, Spi に関しても、図 2-4 における B1 配列が、Type-B 配列として機能している可能性が考えられる。

一定の間隔を保存した Type-A および Type-B 配列の配置は、放線菌 Tra タンパク質の 2 次構造、あるいは 3 次構造上の類似性をもたらしている可能性があると考えられる。そこで、上記 5 タンパク質の Type-A と B1 配列間の部分的 2 次構造を、Chou-Fasman 理論 (Chou & Fasman, 1974) に基づきコンピューターで予測した。その結果を図 2-5 に示した。いずれのタンパク質も Type-A 配列周辺領域はターンを形成した。Type-A, Type-B 配列の間には 3 つないしは 4 つの α ヘリックスが存在し、 α - β - α - β - α という弱い共通構造が認められ、3 次構造上の類似性を反映している可能性が考えられる。

TraB					
Tra	20.4				
TraSA	22.2	24.0			
TraA	17.9	18.6	27.2		
Spi	26.8	22.8	52.3	20.4	
	TraB	Tra	TraSA	TraA	Spi

図2-3. 放線菌プラスミド Tra タンパク質間の相同性。

% を省略して表示した。相同性の検索には GENETYX-MAC 6.0.1 のプログラム Homology 2.2.0 を使用した。



B

Proteins	Motif A	Motif B1	Motif B2
TraB (pSN22)	270-GMTGSGKT-	380-LTWFEAAA-	536-QMLLDDDG-
Tra (pIJ101)	290-GTSGSGKS-	376-TVFIDEGA-	316-LVVVDPKR-
TraSA (pSAM2)	78-GATESGKS-	180-VVLVDEVA-	102-LVGIDCKQ-
TraA (SCP2*)	62-GAPGSGKS-	150-ILTMDEIN-	
Spi (pSA1.1)	43-GANHSGKS-	134-VVLVDEVA-	77-LVGIDCKR-
	-GxxxxGKS-	hhhhDEAD	hhhhDEAD
	T		

図2-4. 放線菌プラスミドの菌糸間伝達を支配する Tra タンパク質における Walker NTP 結合モチーフの位置と配列 (Kendall & Cohen, 1988; Kataoka *et al.*, 1994b; Hagege *et al.*, 1993, Brolle *et al.*, 1993; Tomura *et al.*, 1993; Doi *et al.*, 1995)。

(A) Walker NTP 結合モチーフの位置。黒ボックスは Type-A 配列を、波線ボックスは Type-B 配列を示す。Type-B 配列は、Type-A 配列より 109 (TraB), 85 (Tra), 101 (TraSA), 87 (TraA), 90 (Spi) アミノ酸残基下流に存在するものを B1、そうでないものを B2 とした。

(B) Walker NTP 結合モチーフのアミノ酸配列。数字は表記されている配列の最初のアミノ酸残基を示す。検索に用いたモチーフを最下段に示した。h は疎水性残基を示す。各タンパク質のアミノ酸配列において、検索に用いたモチーフに一致した残基を太字で示した。

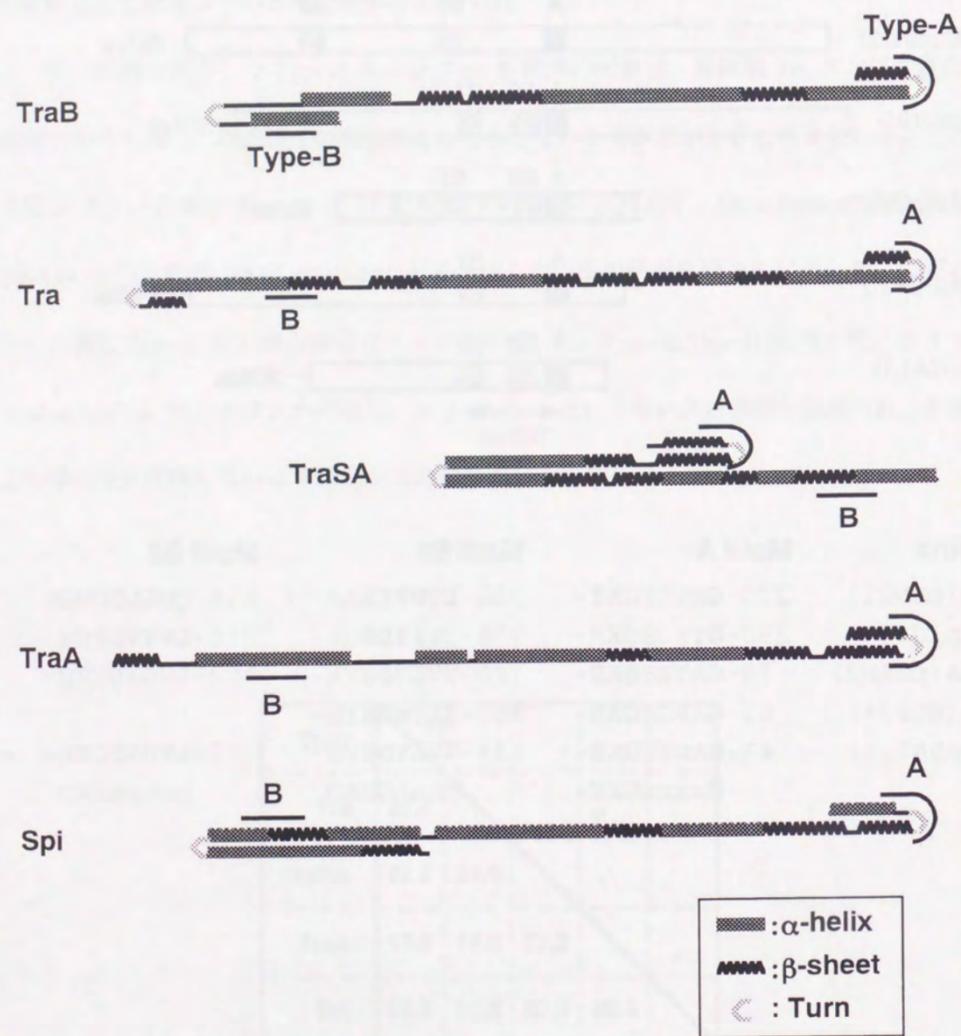


図2-5. 放線菌プラスミド Tra タンパク質の2次構造。

各タンパク質の Walker Type-A, B1 配列 (図 2-4) 間領域の2次構造を、Chou-Fasman の理論に基づき GENETYX-MAC 6.0.1 のプログラムを用いて予測した。

第4節 要約

本章では TraB タンパク質における Walker NTP 結合モチーフ (Type-A, Type-B 配列) を同定し、プラスミド伝達および染色体移行の両方に必須であることを明らかにした。これより TraB タンパク質の機能に、ATP が必要とされることを示唆した。またアミノ酸配列とサイズにおいて多様性を有する放線菌プラスミド Tra タンパク質において、Type-A, Type-B 配列の配置に共通性を見いだした。

第3章 TraBタンパク質の局在性

第1節 緒言

接合伝達は、本質的には細胞膜を介した DNA 輸送である。F、RK2 そして Ti プラスミドの DNA 伝達モデルでは、細胞膜上に存在する多くのタンパク質により、1 本鎖 DNA の生成や DNA 輸送が行なわれる (Wilkins and Lanka, 1993; Dreiseikelmann, 1994)。これに対し、pSN22 の伝達では TraB タンパク質が菌糸間伝達を支配する唯一の因子であることから、TraB は複数の役割を担う膜タンパク質であることが期待される。Kyte と Doolittle の理論 (Kyte & Doolittle, 1982) に基づいて求められた TraB タンパク質の疎水性プロットでは、膜を貫通しうる領域が 3 箇所存在していた (W57-A72, I90-L104, L256-M271; Kataoka *et al.*, 1994a)。同様に、TraSA (pSAM2) および Spi (pSA1.1) では、膜を貫通しうる領域が1 箇所報告されている (Hagege *et al.*, 1993; Doi *et al.*, 1995)。しかしながら、これらの観察事実は、膜局在性に対しては弱い推定を与えるに過ぎない。本章では、エピトープタグを用いて TraB タンパク質の膜局在性を明らかにした。

また、局在性を調べるために、TraBタンパク質のN末端ヘタグペプチドを付加したところ、プラスミドの菌糸内伝達に変化が認められ、TraBタンパク質の菌糸内伝達への関与を示唆する結果が得られた。

第2節 実験材料および方法

本章で用いた実験材料および実験方法のうち、第 1 章と第 2 章において記述した以外のものについて記述する。

(1) プラスミド

本章の実験に使用した放線菌プラスミドおよび大腸菌中間ベクターを、表 3-1 に示した。

表 3-1. 実験に使用した放線菌プラスミド、および大腸菌中間ベクター

Plasmid	Description	Reference
pSN22	<i>S. nigricans</i> plasmid, Tra ⁺ , Pock ⁺ , Cma ⁺ .	Kataoka <i>et al.</i> , 1991a.
pMT911	Wild type derivative of pSN22, Tsr ^R .	Kataoka <i>et al.</i> , 1991a.
pESS500	Shuttle vector of pSN22 with pACYC177, Tra ⁺ , Pock ⁺ , Cma ⁺ , Tsr ^R .	Kataoka <i>et al.</i> , 1991a. 図 3-4.
pESS500mB	pESS500 which expresses the c-myc tagged protein instead of the wild TraB protein.	図 3-1. 図 3-2. 図 3-3.
pFD7	pESS500 which has a frame-shift in the <i>traA</i> gene.	Kataoka <i>et al.</i> , 1991a. 図 3-4.
pMT926	<i>spxB</i> derivative of pMT911.	Kataoka <i>et al.</i> , 1991a. 図 3-4.
pMT11	A 4.5 kb <i>Pst</i> I- <i>Sac</i> I fragment is subcloned into pUC19.	図 3-2.

(2) 放線菌菌体の細胞分画

Gramajo らの方法 (Gramajo *et al.*, 1991) を改変した。*S. lividans* 菌体を R2YE 培地で 48 時間あるいは 100 ml の YEME 培地で対数増殖中期まで培養した後、吸引濾過により集菌した。菌体をリゾチーム (5 mg/ml) を含む P (protoplast) 緩衝液 (第1章、第2節 (3)) 5 ml に懸濁し、30 °C で 1 時間保温してプロトプラストを生成させた。綿花を詰めたガラス製注射器を通して菌糸を除去した後、遠心分離 (2,200 rpm, 7 分間) によりプロトプラストを回収した。5 ml P 緩衝液で 1 回洗浄した後、2 ml の緩衝液 A (50 mM トリス塩酸 [pH 8], 0.2 mM DTT, 0.2 M KCl, 0.1 M PMSF) に懸濁した。そのうち 1 ml の細胞懸濁液を氷上で穏やかな超音波破碎により溶菌させた。ポアサイズ 0.45 μm のフィルター (Millipore) を通して未破碎細胞を除去し、

微量限外濾過ユニット (Millipore) を用いて 100 μ l にまで濃縮したものを、全細胞抽出液とした。膜画分は、残りの 1 ml の細胞懸濁液より調製した全細胞抽出液に対して遠心分離 (260,000 x g、2 時間) 行ない、得られた沈殿を 100 μ l の緩衝液 A に懸濁して調製した。また、遠心分離により得られた上澄を微量限外濾過ユニットを用いて限外濾過を行ない、100 μ l にまで濃縮したものを細胞質画分とした。

細胞表層画分の調製は、Guijarro らの方法 (Guijarro *et al.*, 1988) を改変して行なった。上記の全細胞抽出液の調製に使用したものと等量の菌体を、緩衝液 B (50 mM トリス塩酸 [pH 9.5], 1%(wt/vol) SDS, 50 mM DTT, 2mM PMSF) に懸濁し、時々混合しながら 37 $^{\circ}$ C で 1.5 時間保温した。室温で遠心分離 (10,000 xg、10 分間) した後、上澄に最終濃度が 12%(wt/vol) となるようにトリクロロ酢酸 (TCA) を添加した。氷中で 30 分間から一晩放置した後、抽出されたタンパク質を遠心分離 (10,000 xg、10 分間) により回収した。抽出タンパク質を 5% TCA で洗浄した後、100 μ l の緩衝液 A に懸濁し細胞表層画分とした。タンパク質の定量は Bradford の方法 (Bradford, 1976) に従った。

気中菌糸の回収は Kataoka らの方法 (Kataoka *et al.*, 1991a) に従った。R2YE 培地上に滅菌した 0.45 μ l メンブレン (Millipore) を置き、その上から孢子液を塗布し、30 $^{\circ}$ C で約 48 時間培養した。メンブレン上に生育した気中菌糸をスパチュラでかきとり、細胞分画に供した。

(3) ウェスタンブロット

細胞分画によって得られたタンパク質試料を、SDS ポリアクリルアミドゲル (12%) 電気泳動により分離した。電気泳動後、ゲルをブロッティング緩衝液 (20% メタノール, 5.8 g/L トリス, 2.9 g/L グリシン, 0.37 g/L SDS) に浸した後、あらかじめ同じ緩衝液に浸しておいた濾紙 2 枚、ゲル、ニトロセルロースメンブレン (0.45 μ l, Schleicher & Schuell)、濾紙 2 枚の順

にセミドライブロッティング装置 (BIO-RAD) の上へのせ、ゲル 1 cm^2 当たり 1.5 mA で 1 時間電気泳動を行なった。ブロッティング緩衝液は、10x 保存溶液 (58 g/L トリス, 29 g/L グリシン, 3.7 g/L SDS) を、使用直前にメタノールと混合して調製した。タンパク質のメンブレンへの移行は Prestained protein marker (NEB) の移行により確認した。

イムノブロットは室温で行なった。ブロットされたメンブレンを 5% (wt/vol) スキムミルクを含む PBS 緩衝液 (8 g/L NaCl, 0.2 g/L KCl, 2.9 g/L Na_2HPO_4 , 0.2 g/L KH_2PO_4) 中で 1 時間 (4 $^{\circ}$ C なら一晩) 処理した後、 10^{-4} に希釈した抗ヒト c-Myc ペプチドモノクローナル抗体 (5D4) を含む PBS 緩衝液中で 2 時間処理した (4 $^{\circ}$ C なら一晩)。抗体は、ヒト c-Myc 部分ペプチド (410-EQKLISEEDL-419; Evans *et al.*, 1985) を抗原として免疫したマウスよりハイブリドーマを作成し、ハイブリドーマより調製したモノクローナル抗体を Protein A sepharose カラム (Pharmacia) を用いて精製したものを、三菱化学生命研究所の高橋正身先生より譲り受けた。メンブレンを、0.05% Tween 20 を含む PBS (TPBS) 緩衝液で 3 回洗浄した後、ペルオキシダーゼを結合したウサギ由来抗マウス IgG 抗体を含む 5% (wt/vol) スキムミルク-PBS 緩衝液中で処理した。TPBS 緩衝液で 3 回洗浄した後、シグナルの可視化は POD イムノステインキット (和光純薬) を用いて行なった。

この結果と、第2章において NTP 結合モチーフを同定した結果から、TraB は ATP を加水分解しうる膜タンパク質であることが示唆された。

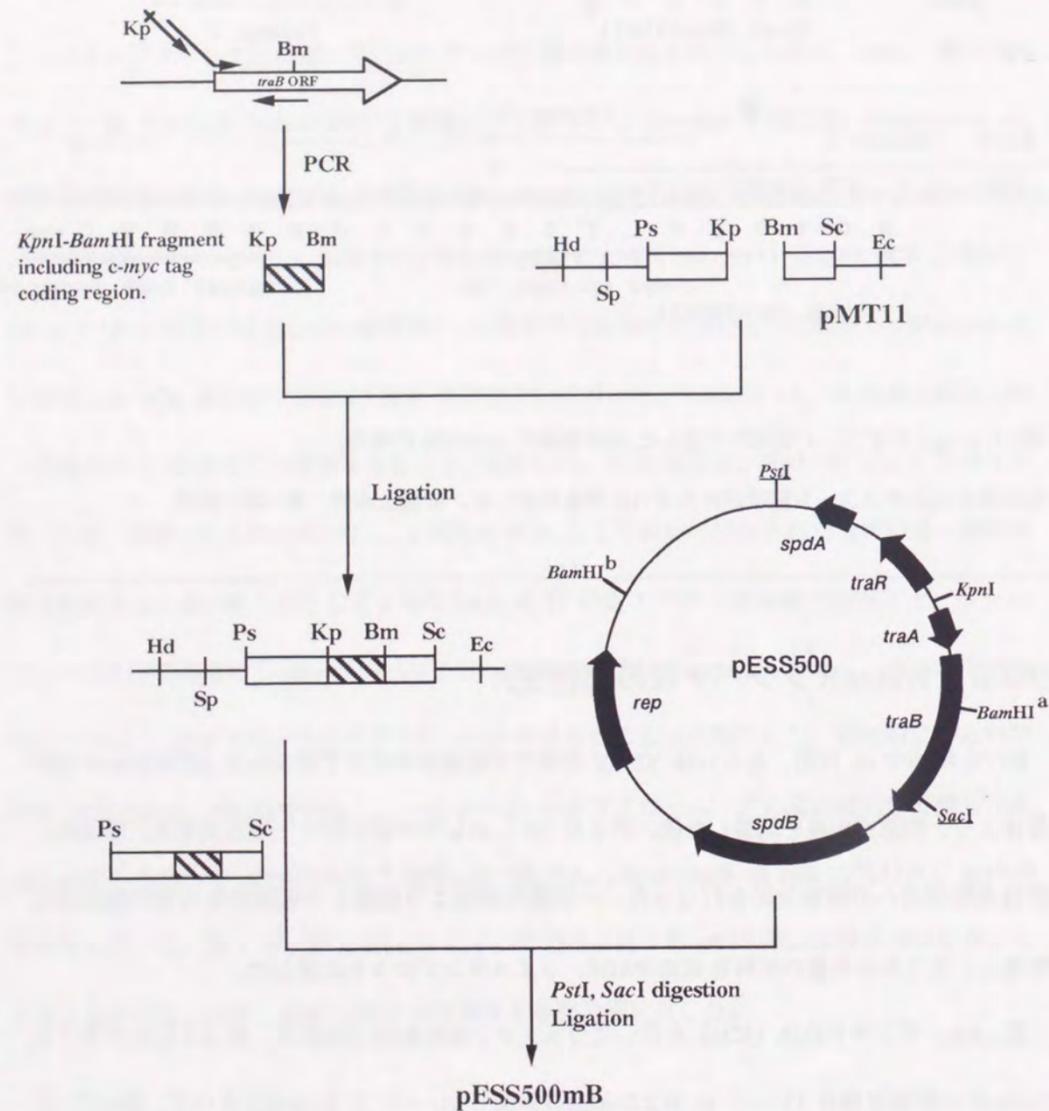


図3-2. pESS500mB の構築。

2段階のPCRにより得られたDNA断片をKpnI, BamHIで消化し、一旦pUC18へサブクローン化した後、中間ベクターpMT11のKpnI, BamHIと置換した。得られたpMT11誘導体のPstI, SacI断片をpESS500のそれと置換することにより、pESS500mBを得た。制限酵素部位略称は、Bc (BclI), Bg (BglII), Bm (BamHI), Ec (EcoRI), Hc (HincII), Hd (HindIII), Kp (KpnI), Sm (SmaI), Sp (SphI), Ps (PstI), Xb (XbaI)とした。

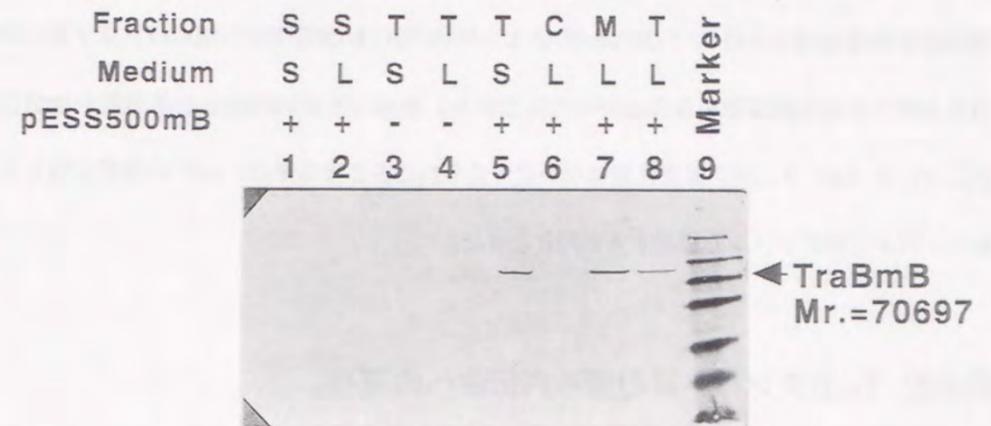


図3-3. TraBmB タンパク質の局在性を調べたウエスタンブロット。

pESS500mB を保持 (+) あるいは保持しない (-) *S. lividans* TK21 株を、YEME 液体培地 (L で表示) あるいは R2YE 固形培地 (S で表示) で培養した。TraBmB タンパク質の検出は、抗 Myc ペプチドモノクローナル抗体 (5D4) を用いて行ない、POD イムノステインキット (和光) で染色した。細胞画分は、S、細胞表面画分、T、全細胞抽出液、C、細胞質画分、M、膜画分とした。レーン1と2、レーン5と8は、タンパク質量を揃えて SDS-PAGE に供した。レーン9は分子量マーカー (上から順に、175, 83, 62, 47.5, 32.5, 25, 16 kDa)。

第3項 分化段階による TraB 発現制御の可能性。

tra オペロンの発現を調べたノザン解析において、寒天培養から回収した気菌糸菌体と、液体培養した菌体より調製した RNA 試料では、前者の方が強いシグナルが検出された (Kataoka *et al.*, 1991b)。液体培養では菌糸の分化段階は基底菌糸に留まると考えられていることから、この結果は、*traB* を含む *tra* オペロンの発現レベルは基底菌糸よりも気中菌糸で高く、分化段階による制御を受けていること示唆すると考えられた。ノザン解析の結果を確認するために、同じ方法により回収した2種類の菌体より調製した全タンパク質試料を用いて、TraBmB タン

パク質の発現量を翻訳レベルで調べた。2種類の菌体より調製した全細胞抽出液および細胞表面層画分を、同画分間でタンパク量を揃えて、SDS-PAGE に供してウェスタン解析を行った。その結果(図 3-3)、レーン 5 (R2YE 培地) とレーン 8 (YEME 培地) の間にはシグナルの強度で見ると量的な差は認められなかったことから、少なくとも気中菌糸と基底菌糸の分化段階における TraB タンパク質量に差はないと考えられた。この結果は、*traB* の発現に関して、転写レベルと翻訳レベルで相反するものとなった。

第4項 TraBタンパク質の菌糸内伝達への関与。

pESS500mB のプラスミド伝達能を寒天培地上でのプラスミド伝達試験により調べた。図 3-4 は、選択培地にレプリカされたコロニーの生育状況を示している。pESS500mB のプラスミド伝達能(図 3-4D) は、菌糸間伝達に関しては保持されていたが、菌糸内伝達効率が野生型(図 3-4A) に比べ低下しており、*spdB* 変異型(図 3-4C) とほぼ同じ表現型を示した。この結果は、Myc タグ付加に伴う TraB タンパク質の N 末側修飾が菌糸内伝達に影響を及ぼしたことを示している。この結果から、TraB タンパク質は、菌糸間伝達だけでなく、菌糸内伝達にも関与することが示唆された。また、染色体移行は接合点でのみ観察されることから、染色体移行頻度は菌糸間の DNA 伝達を評価する指標として用いられる。pESS500mB の染色体移行頻度は 0.7×10^{-5} であり、野生型プラスミド pESS500 (2.5×10^{-5}) と比べてわずかに低いながらもほぼ同程度であったことは、pESS500mB の菌糸間伝達能は損なわれていないことを示しており、pESS500mB を用いたウェスタン解析結果の信頼性を支持すると考えられる。

TraB タンパク質への Myc タグ付加によりもたらされた表現型が、*spdB* 変異型と同じであったことは、その修飾が *spdB* の機能を阻害したと考えられる。*spdB* 遺伝子座は 4 つの ORF を含んでおり、予想されるタンパク質の疎水性プロットは、いずれも高い疎水性を示すことか

ら、細胞膜への局在性が予想される。また本章、第 2 項において、TraB タンパク質も膜局在性を示すことが明かにされており、両者が細胞膜上で相互作用している可能性は十分考えられる。従って、TraB タンパク質の N 末側修飾により *SpdB* タンパク質(群)の機能が失われたことは、TraB の N 末側を介した *SpdB* との相互作用が失われたことに起因すると考えられる。

	Phenotype		
	Tra	Spd	Cma
A	+	++	2×10^{-5}
B	+	-	+(NC)
C	+	+	+(NC)
D	+	+	0.7×10^{-5}

図 3-4. pESS500mB のプラスミド伝達能。

上から順に、pESS500 (野生型, A)、pFD7 (*traA* 変異型, B)、pMT926 (*spdB* 変異型, C)、pESS500mB (*traBmB*, D) のプラスミド伝達の表現型および染色体移行頻度(Cma)を示した。プラスミド伝達および Cma の測定方法は、第 1 章、第 2 節(15) および第 2 章、第 2 節(4)に記載した。Tra は菌糸間伝達を表わす。Spd は菌糸内伝達であり、++ はコロニー幅 6-8 mm、+ はコロニー幅 3-4 mm、- はコロニー幅なしとした。NC は、未算出であることを示す。

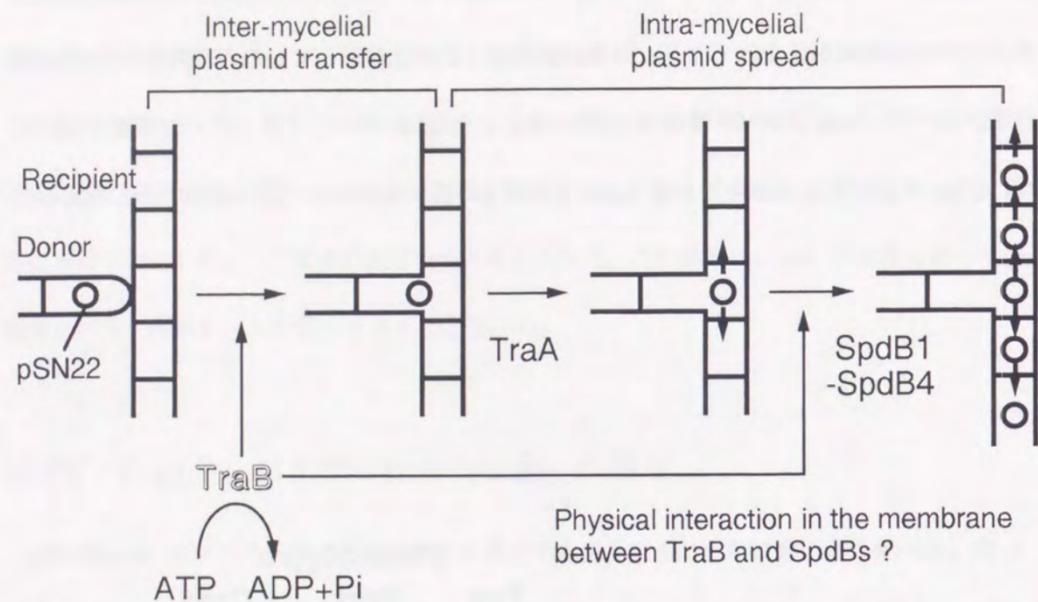


図3-5. pSN22 接合伝達における TraB タンパク質の多面的関与。

第4節 要約

TraB タンパク質の局在性を調べるために *c-myc* タグコード領域を付加した *traBmB* 遺伝子を構築した。ウエスタン解析により、TraBmBタンパク質は膜画分に局在することを明らかにした。TraBmBタンパク質の発現量は、気中菌糸と基底菌糸の間では差はないことを示し、TraB タンパク質の発現は、分化段階による制御は受けていないと考えられた。

菌糸間伝達を支配する TraB タンパク質は、その下流の現象である菌糸間伝達にも関与し、その作用点は TraB タンパク質の N 末側を介する SpdB タンパク質（群）との相互作用であると考えられる。

第4章 総合考察

本研究では以下のことに関する知見を得た。

- (1) TraR による2つの制御メカニズムと pSN22 伝達関連遺伝子群の発現制御。
- (2) TraB における ATP 結合モチーフは、菌糸間 DNA 伝達を支配する TraB の機能発現に必要である。
- (3) TraB は膜画分に局在する。
- (4) TraB は菌糸間伝達だけでなく、菌糸内伝達にも関与する。

第1章では、TraB および TraA の毒性的活性を制御しつつ、いかにプラスミド伝達が行なわれているかという問題を考えながら、発現制御の側面から pSN22 伝達を理解することを目指した。TRE は 5 つの伝達関連遺伝子うち、主要な 4 つの発現制御を担う重要な領域であり、TRE に結合して遺伝子発現を制御する TraR タンパク質は、pSN22 伝達機能の発現において鍵となる分子である。TRE における TraR の結合部位は、その配置と TraR の結合親和性によって2種類に分けられ、負の制御メカニズムにも2種類あることが示唆された。TREbox1, TREbox2, TREbox3 が関与する転写因子の DNA への接近阻害 (Promoter hiding) と TREbox4 が関与する転写因子の進行阻害 (Roadblock) である。菌の状態と調和的な効率のよいプラスミド伝達の実現には、両方のメカニズムが必要であると考えられる。図 1-10 に示した発現制御モデルでは、プラスミドが受容菌へ移行する時に起こる TraR 分子濃度の低下が *tra* オペロンの発現において重要な要素となっている。後述のように、pSN22 の伝達機構は具体的にはまだ明らかにされておらず、少なくとも 2 つのメカニズムが考えられているが、そのいずれであっても、現象を説明することはできる。

完全長の *traR* は単独で *tra* オペロンの発現を完全に抑制した事実から、負の制御に TraR と TraA の両方が必要であるという仮説 (TraA 効果、第 1 章、第 3 節、第 2 項) は否定され、TraR による遺伝子発現制御系はプロモーター、オペレーター、リプレッサーからなる単純な系であることが明かとなった。また宿主由来の因子は RNA ポリメラーゼやシグマ因子等しか関与せず、応用に際してプラスミド以外の要素を考慮する必要がない。こうした理由から、*traR* - TRE 領域を利用した温度感受性の発現制御系を取得し、これを利用した温度調節型の発現ベクターの開発を現在進めている。放線菌における誘導性プロモーターにはチオストレプトンにより誘導される *tipA* プロモーター (Murakami *et al.*, 1988; Kuhstoss & Rao, 1991) が知られているが、このプロモーターの活性化には宿主由来の因子が必要であり (Holmes *et al.*, 1993)、必然的に宿主域が狭くなることが予想される。エピゾーム (寄生因子) 由来の発現制御系を利用した温度調節型の発現ベクターは、基本的にはプラスミドにおいて自己完結している系であることから、遺伝子発現の誘導が容易であるとともに利用できる宿主の範囲も広いと考えられる (Kataoka *et al.*, 投稿中)。

PCR 法を用いた *traR* - TRE 断片に対するランダム変異導入により、遺伝子発現が高温 (37°C) でオン、低温 (28°C) でオフとなるような温度感受性を示す断片 *ts107*, *ts110* が取得された。この断片の塩基配列が調べられた結果、いずれの断片も *traR* ORF 内の DNA 結合モチーフ近傍と TRE 領域内の 2 箇所に変異が導入されていることが明らかにされた。*traR* ORF 内の変異は、*ts107*, *ts110* において 1 つないしは 2 つのアミノ酸置換を生じ、コドンの読み枠には影響しなかった。TRE 領域内の変異は、TRE_{box4} 配列より下流の TRE_{box} 類似配列 (AAGGTACGCATC) 内に存在していた。2 種類の変異のうち片方だけでは高温、低温ともに十分な遺伝子発現が起こらないことから、両方の変異が温度感受性には必要である。本研究では明らかにされなかったが、pSN22 伝達関連遺伝子の発現におけるこの TRE_{box} 類似配列の

役割を調べることは、今後の課題の 1 つとされるだろう。

第 2 章および第 3 章では、放線菌菌糸間の DNA 伝達メカニズムについての知見を得るために、TraB タンパク質の ATP 結合モチーフの同定と膜局在性を明らかにした。TraB タンパク質は、その機能発現に ATP を要求する膜タンパク質であると考えられるが、同じ性格を持ち接合伝達に関与するタンパク質には、(1) ヘリカーゼ活性を持つ TraI (F, RK2), VirD (Ti) や、(2) DNA 輸送通路を構成すると考えられている TraD (F), TrbB (RK2), VirB4 と VirB11 (Ti) の大きく分けて 2 つのグループが知られている (Dreiseikermann, 1994)。そしてこれらのタンパク質が関与する DNA 輸送は、1 本鎖 DNA として細胞膜上のタンパク質によって構成される輸送通路を介して行なわれる。TraB が上記のいずれかのタンパク質に類似した機能を有するのか、全く異なる機能を有するのかを判断する決定的な証拠は現在のところ見つかっていない。pSN22 の接合伝達は、プラスミド由来因子が少数であることより単純な系が予想される。また pSN22 はローリングサークル型の複製を行なうことから (Kataoka *et al.*, 1994b)、ヘリカーゼや *oriT* は、Rep や *ori1* が代替しうると考えられる (Waters & Guiney, 1993)。上記の 2 点を考慮すると、消去法的に、TraB タンパク質は (2) のグループに近い機能を持つという仮説が得られ、DNA 輸送に直接関与し ATP をその輸送エネルギーに利用していると考えられる。

放線菌における接合伝達機構に関しては、現在のところ妥当なモデルが提案されていない。Kataoka ら (1991a) は (1) pSN22 が挿入型ではないこと、(2) 高い染色体移行が観察されること、(3) pSN22 の共存により非伝達性プラスミドが可動化されること、の 3 点を説明するために、細胞間融合モデルを提案した (Kataoka *et al.*, 1991a)。このモデルでは DNA 輸送通路のようなものは存在せず、細胞間融合によりプラスミドや染色体が直接移行すると考えられ、挿入型ではない pSN22 において観察される高い染色体移行頻度を説明しやすい利点がある。また一般に、放線菌の接合伝達はプラスミド由来の因子が少数であり、他の接合伝達に関して提

案されているような多くの(膜)タンパク質が関与する機構を構築するのは難しいと思われるが、細胞間融合モデルはこの問題を容易にクリアできる。ここで TraB タンパク質は膜融合を引き起こすような役割を有し、その反応に ATP が使われる可能性が考えられる。膜融合活性は放線菌プラスミド Tra タンパク質に共通する Kil 活性の説明につながるかも知れない。TraB の誘導発現時における菌体の状態を観察することにより、TraB タンパク質の *in vivo* 的活性に関する情報を得ようとする試みが現在進行中であるが、これが成功すれば、TraB タンパク質が膜融合活性を持つ可能性の検証に役立つと思われる。

最近、John Innes Centre の Xiao ら (1994) は、SCP2* による非伝達性 pIJ101 由来プラスミドの可動化メカニズムとしてプラスミド間組換えを示唆した (Xiao *et al.*, 1994)。彼らによると非伝達性プラスミドの可動化は、プラスミド間組換え体 (Co-integrate) の形成が行なわれた後、SCP2* に特異的な輸送通路を介して行なわれ、効率の良い Co-integrate の形成には最低 112 bp の一致配列が必要であるとされている。以前に報告された pSN22 による非伝達性プラスミドの可動化では 500 bp 以上の一致配列が存在していたことが後に判明し、当時サザン解析で Co-integrate は検出されなかったが (データ未掲載)、Co-integrate が非常に不安定であって、プラスミド間の組換えが一過的に起こっていた可能性は否定できない。Xiao らが示唆するメカニズムでは DNA 伝達は SCP2* に特異的な輸送通路を介して行なわれ、他の接合伝達モデルに近いものであるが、SCP2* の染色体への挿入はまだ証明されておらず、高い染色体移行頻度を説明するのが難しいと思われる。

いずれにしてもプラスミド由来の因子が少数であることは、解析が容易である利点とともに、系が比較的単純であることが予想され、放線菌の接合伝達は他の接合伝達の原型であるか、もしくは全く異なるメカニズムを有していると想像される。

第 3 章では、TraB タンパク質が、菌糸間伝達だけでなく菌糸内伝達にも関与することを示

した。TraB タンパク質の N 末側への c-Myc タグ付加が *spdB* 変異型と同じ表現型をもたらした事実から、TraB タンパク質の修飾は、SpdB タンパク質 (群) の機能を阻害したと考えられる。TraB タンパク質は膜画分に局在することが第 3 章で明らかにされ、SpdB タンパク質 (群) もまた疎水性プロットより細胞膜への局在性が予想されることから、細胞膜上で 2 つのタンパク質が相互作用する可能性は十分考えられる。しかしながら、*spdB* 遺伝子座を殆ど欠損する pMT926 でも菌糸間伝達は行なわれることから、この相互作用の必要性は菌糸内伝達に特異的である。また pESS500mB の染色体移行頻度が野生型に近い値を示した事実は菌糸間伝達能が損なわれていないことを支持する。TraB タンパク質は単独で菌糸間伝達を支配し、SpdB タンパク質と協調して菌糸内伝達にも関与する多面的な役割を有するタンパク質と考えられる。この TraB タンパク質の機能をより詳細に解析してゆくことにより、pSN22 の伝達だけでなく、ユニークな位置を占める放線菌の接合伝達機構が解明されることが期待される。本研究で得られた知見を基礎として、その全貌が明らかになる日が来ることを切に願う。

参考文献

- Abdel-Monem, M., Taucher-Scholz, G., and Klinkert, M.-Q. (1983) Identification of *Escherichia coli* helicase I as the *tral* gene product of the F sex factor. *Proc Natl Acad Sci USA* **80**: 4659-4663.
- Amabile-Cuevas, C.F., and Chicurel, M.E. (1992) Bacterial plasmids and gene flux. *Cell* **70**: 189-199.
- Berger, B.R. and Christie, P.J. (1993) The *Agrobacterium tumefaciens virB4* gene product is an essential virulence protein requiring an intact nucleoside triphosphate-binding domain. *J Bacteriol* **175**: 1723-1734.
- Bibb, M.J., Ward, J.M., and Hopwood, D.A. (1978) Transformation of plasmid DNA into *Streptomyces* at high frequency. *Nature* **274**: 398-400.
- Bibb, M.J., Ward, J.M., Kieser, T., Cohen, S.N., and Hopwood, D.A. (1981) Excision of chromosomal DNA sequences from *Streptomyces coelicolor* forms a novel family of plasmids detectable in *Streptomyces lividans*. *Mol Gen Genet* **184**: 230-240.
- Birnboim, H.C. and Doly, J. (1979) A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nuc Acids Res* **7**: 1513-1523.
- Bradford, M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**: 248-254.
- Brolle, D.-F., Pape, H., Hopwood, D.A., and Kieser, T. (1993) Analysis of the transfer region of the *Streptomyces* plasmid SCP2*. *Mol Microbiol* **10**: 157-170.
- Chou, P.Y. and Fasman, G.D. (1974) Conformational parameters for amino acids in helical, β -sheet, and random coil regions calculated from proteins. *Biochemistry* **13**: 211-245.
- Christie, P.J., Ward, J.E., Gordon, M.P., and Nester, E.W. (1989) A gene required for transfer of T-DNA to plants encodes an ATPase with autophosphorylation activity. *Proc Natl Acad Sci USA* **86**: 9677-9681.
- Citovski, V. and Zambryski, P. (1993) Transport of nucleic acids through membrane channels: snaking through small holes. *Annu Rev Microbiol* **47**: 167-197.
- Deuschle, U., Hipskind, R.A., and Bujard, H. (1990) RNA polymerase II transcription blocked by *Escherichia coli* Lac repressor. *Science* **248**: 480-483.
- Doi, K., Yokoyama, E., Nakano, Y., Tokunaga, S., and Ogata, S. (1995) Transfer function of *spi* gene in plasmid pSA1.1 of *Streptomyces azureus* ATCC14921. *Actinomycetol* **9**: 44-48.
- Dreiseikermann, B. (1994) Translocation of DNA across bacterial membranes. *Microbiol Rev* **58**: 293-316.
- Dubnau, D. (1991) Genetic competence in *Bacillus subtilis*. *Microbiol Rev* **55**: 395-424.
- Evan, G.I., Lewis, G.K., Ramsay, G., and Bishop, J.M. (1985) Isolation of monoclonal antibodies specific for human *c-myc* proto-oncogene product. *Mol Cell Biol* **5**: 3610-3616.
- Farrand, S.K. (1993) Conjugal transfer of *Agrobacterium* plasmids. In *Bacterial Conjugation*. Clewell, D.B. (ed). New York: Plenum Press, pp. 255-291.
- Figurski, D.H. and Helinski, D.R. (1979) Replication of an origin-containing derivative of plasmid RK2 dependent on a plasmid function provided in *trans*. *Proc Natl Acad Sci USA* **76**: 1648-1652.
- Figurski, D.H., Pohlman, R.F., Bechhofer, D.H., Prince, A.S., and Kelton, C.A. (1982) Broad host range plasmid RK2 encodes multiple *kil* genes potentially lethal to *Escherichia coli* host cells. *Proc Natl Acad Sci USA* **79**: 1935-1939.
- Fried, M and Crothers, D.M. (1981) Equilibria and kinetics of *lac* repressor-operator interactions by polyacrylamide gel electrophoresis. *Nuc Acids Res* **9**: 6505-6525.
- Fry, D.C., Kuby, S.A., and Mildvan, A.S. (1986) ATP-binding site of adenylate kinase: mechanism implications of its homology with *ras*-encoded p21, F1-ATPase, and other nucleotide-binding proteins. *Proc Natl Acad Sci USA* **83**: 907-911.
- Galas, D.J. and Schmitz, A. (1993) DNase footprinting: a simple method of the detection of protein-DNA binding specificity. *Nuc Acids Res* **5**: 3157-3170.
- Gorbalenya, A.E., Koonin, E.V., Donchenko, A.P., and Blinov, V.M. (1989) Two related superfamilies of helicases involved in replication, recombination, repair and expression of DNA and RNA genomes. *Nuc Acids Res* **17**: 4713-4730.
- Guan, C., Li, P., Riggs, P.D., and Inoue, H. (1988) Vectors that facilitate the expression and purification of foreign peptides in *Escherichia coli* by fusion to maltose-binding protein. *Gene* **67**: 21-30.
- Guiney, D. G. (1993) Broad host range conjugative and mobilizable plasmids in Gram-negative bacteria. In *Bacterial Conjugation*. Clewell, D.B. (ed). New York: Plenum Press, pp. 75-103.

- Haber, L.T. and Walker, G.C.** (1991) Altering the conserved nucleotide binding motif in the *Salmonella typhimurium* MutS mismatch repair protein affects both its ATPase and mismatch binding activities. *EMBO J* **10**: 2707-2715.
- Hagege, J., Pernodet, J-L., Sezonov, G., Gerbaud, C., Friedmann, A., and Guerineau, M.** (1993) Transfer functions of the conjugative integrating element pSAM2 from *Streptomyces ambofaciens*: characterization of a *kil-kor* system associated with transfer. *J Bacteriol* **175**: 5529-5538.
- Hanahan, D.** (1983) Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol* **166**: 557-580.
- Holloway, B.H.** (1979) Plasmids that mobilize bacterial chromosome. *Plasmid* **2**: 1-19.
- Holmes, D.J., Caso, J.L., and Thompson, C.J.** (1993) Autogenous transcriptional activation of a thiostrepton-induced gene in *Streptomyces lividans*. *EMBO J* **12**: 3183-3191.
- Hopwood, D.A.** (1959) Linkage and the mechanism of recombination in *Streptomyces coelicolor*. *Ann NY Acad Sci* **81**: 887-898.
- Hopwood, D.A., Chater, K.F., Dowding, J.E., and Vivian, A.** (1973) Advances in *Streptomyces coelicolor* Genetics. *Bacteriol Rev* **37**: 371-405.
- Hopwood, D.A., Kieser, T., Wright, H.M., and Bibb, M.J.** (1983) Plasmids, recombination and chromosome mapping in *Streptomyces lividans* 66. *J Gen Microbiol* **129**: 2257-2269.
- Hopwood, D.A., Bibb, M.J., Chater, K.F., Kieser, T., Bruton, C.J., Kieser, H.M., Lydiate, D.J., Smith, C.P., Ward, J.M., and Schrempf, H.** (1985a) Genetic manipulation of *Streptomyces*: A Laboratory Manual. Norwich: The John Innes Foundation.
- Hopwood, D.A., Lydiate, D.J., Malpartida, F., and Wright, H.M.** (1985b) Conjugative sex plasmids of *Streptomyces*. In *Plasmids in Bacteria*. Helinski, D.R., Cohen, S.N., Clewell, D.B., Jackson, D.A. and Hollaender, A. (eds). New York: Plenum Press, pp. 615-634.
- Hopwood, D.A. and Kieser, T.** (1993) Conjugative plasmids of *Streptomyces*. In *Bacterial Conjugation*. Clewell, D.B. (ed). New York: Plenum Press, pp. 293-311.
- Horinouchi, S. and Beppu, T.** (1985) Construction and application of a promoter-probe plasmid that allows chromogenic identification in *Streptomyces lividans*. *J Bacteriol* **162**: 406-412.

- Ippen-Ihler, K. and Skurray, R.A.** (1993) Genetic organization of transfer-related determinants on the sex factor F and related plasmids. In *Bacterial Conjugation*. Clewell, D.B. (ed). New York: Plenum Press, pp. 23-52.
- Jacob, F. and Wollman, E.L.** (1961) Sexuality and the genetics of bacteria. New York: Academic Press. (邦訳「細菌の性と遺伝」 (1963) 富沢純一、小関治男訳 岩波書店)
- Johannes, L., Arnheiter, H., and Meier, E.** (1993) Switch in antiviral specificity of a GTPase upon translocation from the cytoplasm to the nucleus. *J Virol* **67**: 1653-1657.
- Jurnak, F.** (1988) The three-dimensional structure of c-H-ras p21: implications for oncogene and G protein studies. *Trends Biochem Sci* **13**: 195-198.
- Kado, I.** (1994) Promiscuous DNA transfer system of *Agrobacterium tumefaciens*: role of the *virB* operon in sex pilus assembly and synthesis. *Mol Microbiol* **12**: 17-22.
- Kataoka, M., Seki, T., and Yoshida, T.** (1991a) Five genes involved in self-transmission of pSN22, a *Streptomyces* plasmid. *J Bacteriol* **173**: 4220-4228.
- Kataoka, M., Seki, T., and Yoshida, T.** (1991b) Regulation and function of the *Streptomyces* plasmid pSN22 genes involved in pock formation and inviability. *J Bacteriol* **173**: 7975-7981.
- Kataoka, M., Kiyose, Y. -M., Michisuji, Y., Horiguchi, T., Seki, T., and Yoshida, T.** (1994a) Complete nucleotide sequence of the *Streptomyces* plasmid, pSN22; genetic organization and correlation with genetic properties. *Plasmid* **32**: 55-69.
- Kataoka, M., Kuno, N., Horiguchi, T., Seki, T., and Yoshida, T.** (1994b) Replication of a *Streptomyces* plasmid pSN22 through single-stranded intermediates. *Mol Gen Genet* **242**: 130-136.
- Kataoka, M., Kosono, S., Seki, T., and Yoshida, T.** (1994c) Regulation of the transfer genes of *Streptomyces* plasmid pSN22: in vivo and in vitro study of the interaction of TraR with promoter regions. *J Bacteriol* **176**: 7291-7298.
- Kendall, K.J. and Cohen, S.N.** (1987) Plasmid transfer in *Streptomyces lividans*: Identification of a *kil-kor* system associated with the transfer region of pIJ101. *J Bacteriol* **169**: 4177-4183.
- Kendall, K.J. and Cohen, S.N.** (1988) Complete nucleotide sequence of the *Streptomyces lividans* plasmid pIJ101 and correlation of the sequence with genetic properties. *J Bacteriol* **170**: 4634-4651.
- Kieser, T., Hopwood D.A., Wright, H.M., and Thompson C.J.** (1982) pIJ101, a multicopy broad host-range *Streptomyces* plasmid: functional analysis and development of DNA cloning vectors. *Mol Gen Genet* **185**: 223-238.

Kieser, T. (1984) Factors affecting the isolation of cccDNA from *Streptomyces lividans* and *Escherichia coli*. *Plasmid* **12**: 19-36.

Kimura, M. (1968) Evolutionary rate at the molecular level. *Nature* **217**: 624-626.

Kimura, M. and Ohta, T. (1973) Mutation and evolution at the molecular level. *Genetics* **73**: 19-35.

Kuhstoss, S. and Rao, R.N. (1991) A thiostrepton-inducible expression vector for use in *Streptomyces* spp. *Gene* **103**: 97-99.

Lederberg, J. (1952) Cell genetics and hereditary symbiosis. *Physiol Rev* **32**: 403-430.

Lederberg, J. and Tatum, E.L. (1946) Gene recombination in *E. coli*. *Nature* **158**: 558.

Lessel, M., Balzer, D., Pansegrau, W., and Lanka, E. (1992) Sequence similarities between the RP4 Tra2 and the Ti VirB region strongly support the conjugation model for T-DNA transfer. *J Biol Chem* **267**: 20471-20480.

Lessel, M., Pansegrau, W., and Lanka, E. (1992) Relationship of DNA-transfer system: essential transfer factors of plasmids RP4, Ti and F share common sequences. *Nuc Acids Res* **20**: 6099-6100.

Lessel, M. and Lanka, E. (1994) Common mechanisms in bacterial conjugation and Ti-mediated T-DNA transfer to plant cells. *Cell* **77**: 321-324.

Linder, P., Lasko, P.F., Ashburner, M., Leroy, P., Nielsen, P.J., Nishi, K., Schnier, J., and Slonimski, P.P. (1989) Birth of the D-E-A-D box. *Nature* **337**: 121-122.

松原謙一 (1976) プラスミド. 講談社サイエンティフィック.

Marinus, M.G. (1973) Location of DNA methylation genes on the *Escherichia coli* K-12 genetic map. *Mol Gen Genet* **127**: 47-55.

McKnight, S.L. and Kingsbury, R. (1982) Transcriptional control signals of an eukaryotic protein-coding gene. *Science* **217**: 316-324.

Murakami, T. Holt, T.G., and Thompson, C.J. (1989) Thiostrepton-induced gene expression in *Streptomyces lividans*. *J Bacteriol* **171**: 1459-1466.

Okanishi, M., Suzuki, K., and Umezawa, H. (1974) Formation and reversion of streptomycete protoplasts: cultural conditions and morphological study. *J Gen Microbiol* **80**: 389-400.

Panicker, M.M. and Minkley, E.G. (1992) Purification and properties of the F sex factor TraD protein, an inner membrane conjugal transfer protein. *J Biol Chem* **267**: 12761-12766.

Pernodet, J-L., Simonet, J-M. and Guerineau, M. (1984) Plasmids in different strains of *Streptomyces ambofaciens*: free and integrated form of plasmid pSAM2. *Mol Gen Genet* **198**: 35-41.

Pettis, G.S. and Cohen, S.N. (1994) Transfer of the pIJ101 plasmid in *Streptomyces lividans* requires a *cis*-acting function dispensable for chromosomal gene transfer. *Mol Microbiol* **13**: 955-964.

Pittard, A.J. and David, B.E. (1991) TyrR protein of *Escherichia coli* and its role as repressor and activator. *Mol Microbiol* **5**: 1585-1592.

Pohlman, R.F. and Figurski, D.H. (1983) Essential genes of plasmid RK2 in *Escherichia coli*: *trfB* region controls a *kil* gene near *trfA*. *J Bacteriol* **156**: 584-591.

Ptashne, M. (1986) A genetic switch: gene control and phage λ . Cell and Blackwell Scientific Publications Ltd., Oxford.

Sambrook, J., Fritsch, E.F., and Maniatis, T. (1989) Molecular Cloning: a Laboratory Manual. 2nd edn, Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Sancar, A., Stachelek, C., Konigsberg, W., and Rupp, W.D. (1980) Sequences of the *recA* gene and protein. *Proc Natl Acad Sci USA* **77**: 2611-2615.

Sanger, F., Nicklen, S., and Coulson, A.R. (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA* **74**: 5463-5467.

Saraste, M., Sibbald, P.R., and Wittinghofer, A. (1990) The P-loop - a common motif in ATP- and GTP-binding proteins. *Trends Biochem Sci* **15**: 430-434.

Schrempf, H., Bujard, H., Hopwood, D.A., and Goebel, W. (1975) Isolation of covalently closed circular deoxyribonucleic acid from *Streptomyces coelicolor*. *J Bacteriol* **121**: 416-421.

Sermonti, G. and Casciano, S. (1963) Sexual polarity in *Streptomyces coelicolor*. *J Gen Microbiol* **33**: 293-301.

Shirasu, K., Koukolikova-Nicola, Z., Hohn, B., and Kado C.I. (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.

Smith, C.A. and Thomas, C.M. (1983) Deletion mapping of *kil* and *kor* functions in the *trfA* and *trfB* regions of broad host range plasmid RK2. *Mol Gen Genet* **190**: 245-254.

Smokvina, T., Bocard, F., Pernodet, J.-L., Friedmann, A., and Guerineau, M. (1991) Functional analysis of the *Streptomyces ambofaciens* element pSAM2. *Plasmid* **25**: 40-52.

Stein, D.S. and Cohen, S.N. (1990) Mutational and functional analysis of the *korA* and *korB* gene products of *Streptomyces* plasmid pIJ101. *Mol Gen Genet* **222**: 337-344.

Strohl, W.R. (1992) Compilation and analysis of DNA sequence associated with apparent streptomycete promoters. *Nuc Acids Res* **20**: 961-974.

Studier, F.W. and Moffatt, B.A. (1986) Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *J Mol Biol* **189**: 113-130.

Sung, P., Higgins, D., Prakash, L., and Prakash, S. (1988) Mutation of lysine-48 to arginine in the yeast RAD3 protein abolishes its ATPase and DNA helicase activities but not the ability to bind ATP. *EMBO J* **7**: 3263-3269.

Taylor, W.R. and Green, N.M. (1989) The predicted secondary structures of the nucleotide-binding sites of six cation-transporting ATPases lead to a probable tertiary fold. *Eur J Biochem* **179**: 241-248.

Tomura, T., Kishino, H., Doi, K., Hara, T., Kuhara, S., and Ogata, S. (1993) Sporulation-inhibitory gene in pock-forming plasmid pSA1.1 of *Streptomyces azureus*. *Biosci Biotech Biochem* **57**: 438-443.

Vandeyar, M.A., Weiner, M.P., Hutton, C.J., and Batt, C.A. (1988) A simple and rapid method for the selection of oligodeoxynucleotide-directed mutants. *Gene* **65**: 129-133.

Vieira, J. and Messing, J. (1982) The pUC plasmids and M13mp7 derived system for insertion mutagenesis and sequencing with synthetic universal primers. *Gene* **19**: 259-268.

Walker, J. E., Saraste, M., Runswick, M.J., and Gay, N.J. (1982) Distantly related sequences in the a- and b-subunits of ATP synthase, myosin kinases and other ATP-requiring enzymes and a common nucleotide binding fold. *EMBO J* **1**: 945-951.

Ward, J.E., Dale, E.M., and Binns, A.N. (1991) Activity of the *Agrobacterium* T-DNA transfer machinery is affected by *virB* gene products. *Proc Natl Acad Sci USA* **88**: 9350-9354.

Waters, V.L. and Guiney, D.G. (1993) Processes at the nick region link conjugation, T-DNA transfer and rolling circle replication. *Mol Microbiol* **9**: 1123-1130.

Wilkins, B. and Lanka, E. (1993) DNA processing and replication during plasmid transfer between Gram-negative bacteria. In *Bacterial Conjugation*. Clewell, D.B. (ed). New York: Plenum Press, pp. 105-136.

Xiao, J., Melton, R.E., and Kieser, T. (1994) High-frequency homologous plasmid-plasmid recombination coupled with conjugation of plasmid SCP2* in *Streptomyces*. *Mol Microbiol* **14**: 547-555.

Yanisch-Perron, C., Vieira, J., and Messing, J. (1985) Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors. *Gene* **33**: 103-119.

吉川昌之介 (1995) 細菌の逆襲. 中公新書.

本研究に関する論文

Kataoka, M., Kosono, S., Seki, T., and Yoshida, T.

Regulation of the transfer genes of *Streptomyces* plasmid pSN22: in vivo and in vitro study of the interaction of TraR with promoter regions. *J Bacteriol* **176**: 7291-7298.

Kataoka, M. と Kosono, S. は、本報文に対して同等に貢献したとの記載がある。

Kosono, S., Kataoka, M., Seki, T., and Yoshida, T.

The TraB protein, which mediates the intermycelial transfer of *Streptomyces* plasmid pSN22, has functional NTP binding motifs and is localized in the cytoplasmic membrane.

Mol Microbiol In press.

その他の関係する論文

Kataoka, M., Tatsuta, T., Suzuki, I., Kosono, S., Seki, T., and Yoshida, T.

Development and characterization of a thermal inducible promoter system for *Streptomyces* genetics. In submission.

謝辞

本研究の遂行にあたり、終始御指導を賜りました大阪大学生物工学国際交流センター、吉田敏臣教授、関達治教授に心から感謝致します。本論文の作成にあたり、有益な御助言と御教示を賜りました大阪大学大学院工学研究科、大嶋泰治教授、山田靖宙教授、菅健一教授、今中忠行教授、卜部格教授、塩谷捨明教授、室岡義勝教授、小林昭雄教授、金谷茂則教授、ならびに大阪大学産業科学研究所、二井将光教授に感謝の意を表します。

研究の内容および姿勢に関して終始御助言と御講評を頂きました大阪大学生物工学国際交流センター、藤山和仁博士、ならびに高木睦博士に感謝致します。

本研究に際し、直接懇切なる指導を賜りました国立小児病院小児薬理研究センター（以前は三菱化学生命科学研究所）、片岡正和博士に深く感謝の意を表します。氏には筆者の研究に対する興味を引き出すだけでなく、筆者が研究の世界へ踏み込む機会を与えて下さいましたことに対しても、篤く御礼申し上げます。また独断になりがちな研究に対して、有益なる討論を通して御助言を頂きましたJohn Innes Centre, T. Kieser博士に深く感謝の意を表します。

日々の研究を共にし、研究の内外を問わず、いろいろな面でご協力を頂きました生物工学国際交流センター、鈴木市郎氏に深く感謝致します。本論文における伝達関連遺伝子群の発現制御の応用的側面を広げ、また発現制御に関しても新たな知見を見い出してくれました童田敏行氏に深く感謝致します。終始有益なる助言と激励を頂きました（財）発酵研究所、上田久美子氏に篤くお礼申し上げます。併せて、研究以外の面で細やかな御気遣いと御激励を頂きました沢住文子氏、永井敏子氏、五条久美子氏に篤くお礼申し上げます。特に、沢住文子氏のHospitalityに溢れた精神は、筆者にとって良い御手本となりました。研究室の皆様方に常に明るく研究に取り組む姿勢のおかげで有意義な研究生活が送れました。皆様方に感謝致しますとともに、皆様方の研究のより一層の発展を心からお祈り申し上げます。

最後に、本研究を最後まで遂行できたのは、絶えず励まし、健康に気遣ってくれた両親の精神的、経済的援助によるものであることを付記します。

