



Title	放線菌プラスミドpSN22の複製機構の解析
Author(s)	鈴木, 市郎
Citation	大阪大学, 1997, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.11501/3129011
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

複製機構の解析

鈴木 市郎

大阪大学生物工学国際交流センター

1997 年

放線菌プラスミド pSN22 の複製機構の解析

目 次

序章 緒論	1
放線菌の遺伝子操作における宿主・ベクター系	2
ローリングサークル型複製	5
放線菌小型環状プラスミドの複製機構の研究	8
Single strand origin の機能	9
放線菌プラスミド pSN22 の構造と機能	12
本論文の概要	14
第一章 放線菌プラスミド pSN22 のラギング鎖複製開始点 <i>sso1</i> の同定	17
要旨	18
緒言	18
材料および方法	21
結果	28
pSN22 はリーディング鎖、ラギング鎖の両方に single strand origin 配列 を持つ	28
ラギング鎖複製開始点 <i>sso1</i> の位置	30
<i>sso1</i> と他の放線菌 RC 型プラスミドの single strand origin との比較	32
考察	34

第二章 pSN22 のラギング鎖に存在する single strand origin 配列 *sso2* および *sso3* の同定

	37
要旨	38
緒言	38
材料および方法	40
結果	43
pSN22 のラギング鎖上には 2 つの single strand origin 配列が存在する	43
<i>sso2</i> および <i>sso3</i> はステム・ループ構造上に 6 塩基の保存配列を持つ	46
<i>sso2</i> 領域は既知のグラム陽性菌由来ローリングサークル型プラスミドの single strand origin より非常に短い	47
考察	49

第三章 pSN22 のローリングサークル型複製におけるニッキング部位

要旨	54
緒言	54
材料および方法	57
結果	60
pSN22 のニッキング部位より下流の塩基配列は、pIJ101 の塩基配列と高い相同性を示す	60
ニッキング部位の塩基配列への突然変異の導入	62
変異プラスミドのコピー数の確認	62
考察	65

第四章 ローリングサークル型プラスミドの <i>Streptomyces lividans</i> における部位非特異的なセカンド鎖合成の、 <i>in vivo</i> および <i>in vitro</i> での解析	67
要旨	68
緒言	69
材料および方法	71
結果	76
<i>S. lividans</i> 内で single strand origin の有無は、pSN22 のコピー数に影響を与えない	76
リファンピシンは、 <i>S. lividans</i> 内での pSN22 由来プラスミドのセカンド鎖合成を阻害しない	77
<i>S. lividans</i> の無細胞系抽出液を用いたセカンド鎖合成の解析	77
<i>S. lividans</i> および <i>E. coli</i> 無細胞系抽出液を用いた <i>in vitro</i> セカンド鎖合成の比較	83
考察	85
終章 総論	89
参考文献	97
本研究に関連する論文	107
その他の関連する論文	107
謝辞	109

序章

緒 論

序章 結論

放線菌の遺伝子操作における宿主・ベクター系

遺伝子操作技術の発展によって、基礎生物学研究、医学研究、農林水産業や発酵工業における育種研究等において飛躍的な進歩が得られるようになった。遺伝子操作は生物の遺伝子を取り出し、人為的に改変したのち、再び細胞内に戻すという技術であり、従って各々の生物種の遺伝子操作には、目的に応じた固有の宿主・ベクター系の開発が不可欠である。現在、多種多様な生物に遺伝子操作技術を応用するために、優れた宿主・ベクター系の開発が盛んに行われ続けている。

放線菌群は、抗生物質を始めとする多種多様な二次代謝産物の生産菌として、工業的に広く利用されている。放線菌群は原核生物でありながら、孢子→出芽→基底菌糸形成→気中菌糸形成→孢子形成、といった複雑な形態分化を行うため、基礎生物学的な研究材料としても興味ぶかいだけでなく (Chater, 1993)、その形態分化が二次代謝産物の生産と密接に関わっていることが知られている (Beppu, 1995)。放線菌の形態分化や有用物質の生合成経路の研究においても、近年、遺伝子操作技術の応用による分子遺伝学的手法が盛んに用いられており、優れた宿主・ベクター系の開発は、放線菌群の研究に今や欠かせないものとなっている。

放線菌の基本的な遺伝子操作系は 1980 年代、D. A. Hopwood らを中心として、主に *Streptomyces coelicolor* および *Streptomyces lividans* を宿主として確立された (Hopwood *et al.*, 1985; Hopwood *et al.*, 1987; Baltz, 1995)。遺伝子操作に用いるベクターは、宿主内で複製し、安定に保持されることが必須条件である。そのための手法としては、

- (1) 染色体に組み込ませる、
 - (2) 宿主染色体の複製開始点 *oriC* をクローニングした *oriC* プラスミドを用いる、
 - (3) 宿主細胞内で自律的に複製するプラスミドあるいはウイルス・バクテリオファージを利用する、
- 等が挙げられる。宿主内でベクターを安定に保持させるためには、染色体に組み込む場合はその

組み込みの機構、プラスミドなどの自律的な複製を利用する場合はその複製の機構を解析する必要がある。例えば *Escherichia coli* では、富沢らによるプラスミド ColE1 の複製機構の詳細な研究を背景として (Tomizawa *et al.*, 1977, Eguchi *et al.*, 1991) 、この ColE1 を基にした pUC18 (Yanisch-Perron *et al.*, 1985) 等の数多くのプラスミドベクターが開発されるに至っているのは有名である。

放線菌において、(2) の手法については現在 *S. coelicolor* および *S. lividans* の *oriC* が単離されているものの (Calcutt and Schmidt, 1992; Zakrzewska-Czerwinska and Schrempf, 1992) 、その複製機構の研究はほとんど行われておらず、今のところベクターとして実用化はされていない。(1) については放線菌ファージ ϕ C31 (Lomovskaya *et al.*, 1980) やプラスミド pSAM2 (Pernodet *et al.*, 1984) 等の部位特異的な染色体への組み込みを応用したもの (Kuhstoss *et al.*, 1991; Smokvina *et al.*, 1990) 、トランスポゾン Tn4556 (Chung, 1987) や Tn5096 (Solenberg and Baltz, 1991) 等の部位非特異的な染色体への組み込みを応用したもの (Chung, 1988; Solenberg and Baltz, 1994) 、一本鎖 (single-stranded; ss) DNA による遺伝子ターゲティングを応用したもの (土居ら、1996) 等が挙げられる。 ϕ C31 や pSAM2 は、自身にコードされる *int* 遺伝子により染色体上の *attP* と呼ばれる塩基配列を持つ部位に組み込まれる (Boccard *et al.*, 1989; Kuhstoss *et al.*, 1989; Kuhstoss and Rao, 1991) 。トランスポゾンは部位非特異的に染色体 DNA 上に組み込まれるため、ランダムな挿入による遺伝子破壊や、一旦トランスポゾンを組み込み、それに対する相対的組み換えを利用して遺伝子を染色体に組み込む場合に利用される (Baltz, 1995) 。ssDNA を用いた系は、相対的組み換えを利用した遺伝子破壊 (ジーンターゲティング) 等に専ら利用される (土居ら、1996) 。破壊したい染色体上の遺伝子の全部または一部をベクターに組み込み、その内部にさらに抗生物質耐性遺伝子などの選択マーカーを挿入しておく。構築したベクターより ssDNA を調製し、宿主に導入すると、相同な遺伝子部分が部位特異的な組み換えを起こす。従って、抗生物質で選択を行うことにより、染色体上の特定遺伝子内部に選択マーカー断片が挿入された遺伝子破壊株が得られる。。この手法には宿主によっては直鎖状二本鎖 (double-stranded; ds) DNA、環状 dsDNA 等も用いられるが、放線菌では宿主の

持つ制限酵素によるベクターDNA の分断を回避するために、ssDNA を用いることが多い (Hillemann *et al.*, 1991; 土居ら、1996) 。

(3) は放線菌においても最もよく用いられる手法であり、放線菌プラスミド由来の多くのローリングベクター (Thompson *et al.*, 1982; Katz *et al.*, 1983; Lydiate *et al.*, 1985; Hopwood *et al.*, 1985; Hopwood *et al.*, 1987) 、遺伝子発現ベクター (Takano *et al.*, 1995) 、プロモーター検索ベクター (Horinouchi and Beppu, 1985; Ward *et al.*, 1986) 等が知られている。放線菌のプラスミドには数 kbp から十数 kbp の小型環状プラスミドと、数 kbp から数百 kbp に及ぶ大きさの直鎖状プラスミドが存在する。小型環状プラスミド由来のベクターとしては、*S. lividans* のプラスミド pIJ101 (Kieser *et al.*, 1982) を基に開発された pIJ702 (Katz *et al.*, 1983) 、pIJ486 (Ward *et al.*, 1986) 等の高コピー型プラスミドベクター、*S. coelicolor* のプラスミド SCP2* (Lydiate *et al.*, 1985) を基に開発された pIJ922 (Lydiate *et al.*, 1985) 等の低コピー型プラスミドベクターが広く利用されている。直鎖状プラスミドについては、現在一般的なベクターとして利用されていない。これは直鎖状プラスミドの大きさが一般的に百 kbp 以上と巨大であるため、試験管内での操作に適さないこと、複製機構がほとんど解析されていないこと (Shiffman and Cohen, 1992) 等、利用上の問題点があるのに対し、小型環状プラスミドはサイズが小さいことから試験管内での操作も行い易く、複製機構についても比較的よく研究されている (Kieser *et al.*, 1982; Deng *et al.*, 1988; Kendall and Cohen, 1989; Servín-González 1993; Zaman *et al.*, 1993b; Brasch and Cohen, 1995) ことによると考えられる。

放線菌由来の小型環状プラスミドは現在ほとんどがローリングサークル (rolling circle; RC) 型の複製を行うとされており (Deng *et al.*, 1988; Hagège *et al.*, 1993; Kataoka *et al.*, 1994b; Muth *et al.*, 1995; Servín-González *et al.*, 1995; Yokoyama *et al.*, 1996) 、唯一 Vrijbloed らが希少放線菌 *Amiclatopsis methanolica* 由来のプラスミド pMEA300 について、RC 型の複製が行われない可能性があるとして述べている (van J. W. Vrijbloed and L. Dijkhuizen、私信) 。前述のようにこれらの小型環状プラスミドの複製機構は、複製の基本的なメカニズムや複製必須領域などについては、直鎖状プラスミドよりもよく研究されている。しかしながら、ベクターとして

使えることをまず第一に考えられていたため、複製機構全体の理解はまだ十分であるとはいえず、それ故の問題点も存在する。そこで以下に RC 型複製の概要を説明し、放線菌小型環状プラスミドの RC 型複製機構研究の現状と、ベクターとしての利用における問題点について述べる。

ローリングサークル型複製

Escherichia coli のファージ M13 や ϕ X174 に代表される RC 型複製 (図 0-1) は、主にグラム陽性菌 *Staphylococcus* 属 (Gruss and Ehrlich, 1989; Novick *et al.*, 1989; Jannière *et al.*, 1993)、*Streptococcus* 属 (del Solar *et al.*, 1987)、*Bacillus* 属 (Gruss and Ehrlich, 1989; Jannière *et al.*, 1993)、*Lactococcus* 属 (Leenhouts *et al.*, 1991)、*Streptomyces* 属 (Deng *et al.*, 1988; Hagège *et al.*, 1993; Kataoka *et al.*, 1994b; Muth *et al.*, 1995; Servín-González *et al.*, 1995; Yokoyama *et al.*, 1996) や、シアノバクテリア等のグラム陰性菌 (Seery *et al.*, 1993; Yang and Mcfadden, 1994; Galli and LeBlanc, 1994; Zhang *et al.*, 1994) 由来のプラスミドに数多く見られる。

RC 型複製の機構はまず、プラスミド上にコードされている Rep タンパク質が複製開始点である double strand origin (DSO) を認識し、特定の一方の DNA 鎖に部位特異的に切れ目 (ニック) を入れる。ニックに生じた 3'-OH 末端から、宿主の DNA ポリメラーゼにより、ニックの入らなかったもう一方の鎖に相補的な新生 DNA 鎖が合成される (リーディング鎖の複製)。ニックの入った元の DNA 鎖は解かれて、環状の複製中間体 ssDNA を形成する。この複製中間体 ssDNA 上には、宿主の持つ因子によって認識され、複製のプライマー合成が行われる複製開始点 (single strand origin; SSO) が存在する。SSO 上で合成されたプライマーより相補鎖の合成が開始され、複製中間体 ssDNA は dsDNA へ変換されて (ラギング鎖の複製) プラスミドの複製が完了する。(RC 型複製におけるラギング鎖複製は、セカンド鎖合成とも呼ばれる。本文中では主に、「ラギング鎖複製」はプラスミドの複製の過程として、「セカンド鎖合成」は鋳型 ssDNA 上での相補鎖合成反応として、区別して使用する。)

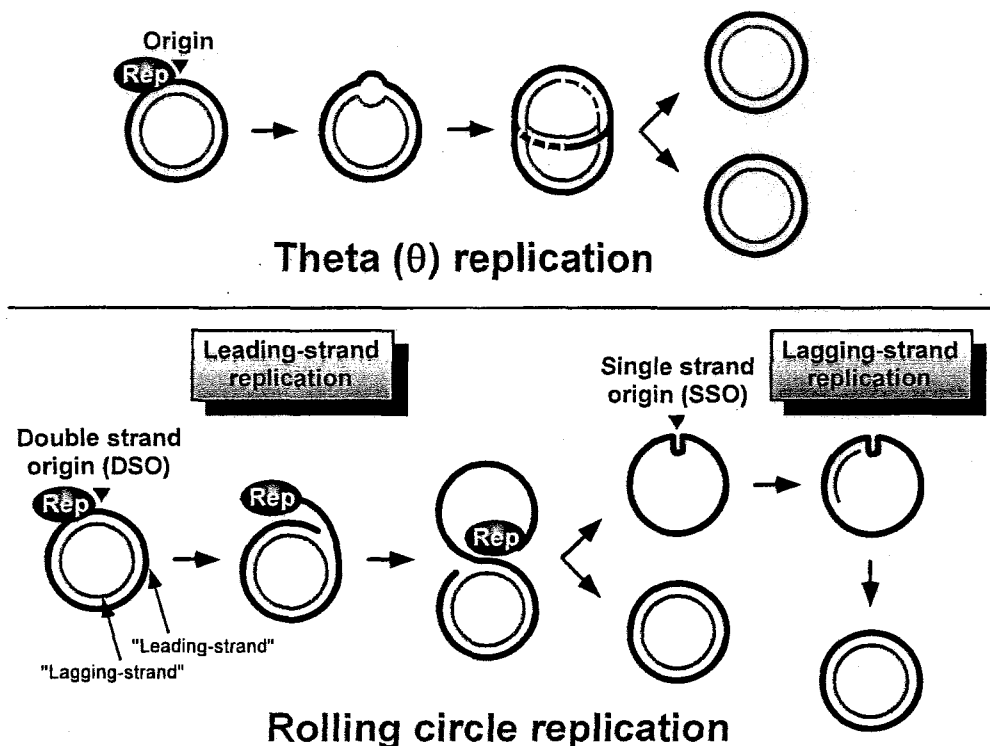


図 0-1. θ 型複製とローリングサークル型複製 (Kornberg and Baker, 1992 より改変)。θ 型複製では、プラスミド上にコードされる Rep タンパク質が複製開始点 (origin) を認識して二本鎖を開裂した後、複製フォークが両方向に展開してプラスミドの複製が行われる。ローリングサークル型複製では、プラスミド上にコードされる Rep タンパク質が double strand origin (DSO) と呼ばれる複製開始点を認識して“リーディング鎖”側にニックを入れることによって、まずリーディング鎖の複製が開始される。ニックにより生成した 3'-OH をプライマーとして新しいリーディング鎖が合成される同時に、古いリーディング鎖が解かれていく。解かれた古いリーディング鎖は、Rep タンパク質によって環状の複製中間体 ssDNA にされた後、single strand origin (SSO) と呼ばれる複製開始点より“ラギング鎖”の複製が行われる。

グラム陽性菌由来 RC 型プラスミドはその Rep タンパク質のアミノ酸配列および DSO の塩基配列に基づいて分類されており (Gruss and Ehrlich, 1989; Novick *et al.*, 1989; Jannière *et al.*, 1993; del Solar *et al.*, 1993)、現在 pT181 グループ、pC194 グループ、pE194 グループ、pSN2 グループ、pTKX-14 グループの 5 つが知られている。一方、これまでに知られている SSO はその DNA 塩基配列および予測されるステム・ループ構造より、*ssoA* 型、*ssoU* 型、*ssoT* 型、pVWO1 型の 4 タイプに分けられる (Gruss and Ehrlich, 1989; Novick *et al.*, 1989; Jannière *et al.*, 1993; Seegers *et al.*, 1995)。DSO および Rep タンパク質の構造によるプラスミドの分類と SSO のタ

イプによるプラスミドの分類は一致しないこともある（表 0-1）。DSO は同じプラスミド上にコードされた Rep タンパク質によって認識されるため、様々な宿主細胞内で機能し得るが、SSO の認識は宿主側の因子に依存しており、宿主によっては機能しない（del Solar *et al.*, 1987; van der Lelie *et al.*, 1989）。従って、DSO-*rep* 部分を含む RC 型レプリコンと、それぞれの宿主に特異的な SSO が組み合わされて、現在の様々な RC 型プラスミドが生み出されたと考えられる。

表 0-1. ローリングサークル型プラスミドおよびバクテリオファージの DSO および Rep タンパク質と、SSO の分類（Gruss and Ehrlich, 1989; Jannière *et al.*, 1993; Seery *et al.*, 1993 より改変）。DSO および Rep タンパク質の型と、各プラスミドの持つ SSO の型は一致しないことも多い。SSO の型が記載されていないものは、未報告。pIJ101 と pSN22 の SSO は未分類。

Plasmid	Size (kbp)	Original host	Type of DSO&Rep	Type of SSO
pT181	4.4	<i>Staphylococcus aureus</i>	pT181	<i>ssoA</i>
pHD2	2.1	<i>Bacillus thuringiensis</i>	pT181	
pC194	2.9	<i>Staphylococcus aureus</i>	pC194	<i>ssoA</i>
pUB110	4.5	<i>Staphylococcus aureus</i>	pC194	<i>ssoU</i>
pBAA1	6.8	<i>Bacillus subtilis</i>	pC194	<i>ssoT</i>
pCB101	6.0	<i>Clostridium butyricum</i>	pC194	
pIJ101	8.8	<i>Streptomyces lividans</i>	pC194	(<i>sti</i>)
pSN22	11.0	<i>Streptomyces nigrifaciens</i>	pC194	(<i>ssoI</i>)
�X174	5.3	<i>Escherichia coli</i>	pC194	
pE194	3.7	<i>Staphylococcus aureus</i>	pE194	<i>ssoA</i>
pMV158 (pLS1)	5.5	<i>Streptococcus agalactiae</i>	pE194	<i>ssoA</i>
pWVO1	3.3	<i>Lactococcus lactis</i>	pE194	pWVO1
pADB201	1.7	<i>Mycoplasma mycoides</i>	pE194	
pSN2	1.3	<i>Staphylococcus aureus</i>	pSN2	<i>ssoA</i>
pNE131	2.1	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	pSN2	
pIM13	2.1	<i>Bacillus subtilis</i>	pSN2	<i>ssoA</i>
pTKX-14	7.5	<i>Bacillus thuringiensis</i>	pTKX-14	<i>ssoT</i>

放線菌小型環状プラスミドの複製機構の研究

放線菌由来の RC 型プラスミドの複製および保持の機構の研究は、現在のところ四つの点に分けることができる。

1. 複製必須領域の解析およびそこに含まれる DSO-*rep* 領域の塩基配列の解析。
2. 複製必須領域とは独立して、プラスミドの形質転換能に影響を与える *kil-kor* システムの解析。
3. プラスミドの不和合性に関与する領域の解析。
4. SSO 領域の解析。

1 についてはプラスミド pIJ101、pSAM2、pSN22、pSG5、pJV1 において DSO-*rep* 部分の DNA 塩基配列が決定されており、これら全てが pC194 グループに属する *rep* および DSO を持っている (Kieser *et al.*, 1982; Kendall and Cohen, 1988; Hagège *et al.*, 1993a; 1994; Kataoka *et al.*, 1994; Muth *et al.*, 1995; Servín-González *et al.*, 1995)。DSO 内のニッキング部位は、Servín-González によって pIJ101 および pJV1 において決定された後 (Servín-González, 1993)、他のプラスミドもこれらのニッキング部位との比較によって、予測される位置が示されている (Muth *et al.*, 1995)。一方、Brasch と Cohen は pIJ101 の *rep* 遺伝子上流の必須領域の限定を行い、Servín-González が決定したニッキング部位を含まないプラスミドが、低いながらも *S. lividans* に対する形質転換能を持ち、複製することを示した (Brasch and Cohen., 1995)。従って、ニッキング部位の DNA 塩基配列についてはまだ議論の余地があるといえる。

2 は、プラスミド上に存在し、宿主に対して致死性を示す *kil* 遺伝子と、同じくプラスミド上に存在し、この *kil* 遺伝子の活性を阻害する *kil-override* (*kor*) 遺伝子のことを指す。*kil-kor* システムの存在は pIJ101 (Kendall and Cohen, 1987)、pSN22 (Kataoka *et al.*, 1991a)、pSAM2 (Hagège *et al.*, 1993b)、pJV1 (Servín-González *et al.*, 1995) で明らかになっている。ベクターとして利用する際に *kor* 遺伝子を欠いてしまうと、プラスミドが宿主に対する致死性を示し、形質転換が行われなくなってしまう。この場合、*kil* 遺伝子を同定し、除去する必要がある。こ

のような致死性遺伝子とそれを阻害する遺伝子の組み合わせは一般的に、低コピープラスミドが自身を安定に分配させるための機構としてよく知られている (Jansen and Gerdes, 1995; Jansen *et al.*, 1995)。致死性遺伝子に比べその阻害遺伝子は失活が早いため、プラスミドが抜け落ちた細胞は致死性遺伝子により死滅する。ところが放線菌由来のこれらのプラスミドは、すべて高コピー数である。放線菌プラスミドの *kil-kor* システムは、元々プラスミドの接合伝達に関与する遺伝子群に見出されたものであり、プラスミドの安定な分配に対する影響は、今のところ研究されていない。

3 の不和合性については、pIJ101 上に存在する不和合性に関与する領域 (*strong incompatibility*; Sti; Deng *et al.*, 1988; Zaman *et al.*, 1993a) が知られている。Deng らは、*S. lividans* において pIJ101 の DSO-*rep* を持つ 2 つのプラスミドは共存できるが、一方に *sti* 遺伝子領域を持たせると、*sti* を持たないプラスミドは共存できなくなることを示した (Deng *et al.*, 1988)。Sti を持つプラスミドとしては、他に pJV1 が知られている (Servín-González *et al.*, 1995)。この *sti* は pIJ101 および pJV1 では SSO と重複することが知られているが、一方 pJV1 とプラスミドの構造が非常によく似ている pSN22 では、Sti 活性を持たないことが明らかとなっている (Kataoka *et al.*, 1994b)。Sti 活性と SSO の関係、*sti* 遺伝子による不和合性の機構については、全く明らかになっていない。

4 については、次項で詳しく述べる。

Single strand origin の機能

SSO は前述のように、RC 型複製の中間体である ssDNA プラスミドの相補鎖合成 (ラギング鎖複製・セカンド鎖合成) において、宿主側の因子により認識されプライマー合成が行われる複製開始点である。複製中間体 ssDNA は pSN22 の場合、*rep* 遺伝子のセンス鎖側の DNA 鎖 (リーディング鎖・ファースト鎖) によって形成される (Kataoka *et al.*, 1994b)。従って SSO もリーディング鎖側にのみ活性が存在し、SSO 領域を欠失、あるいは *dso-rep* 領域に対し逆方向に

挿入した場合は、効率よいセカンド鎖合成が行われなくなる。この結果として複製中間体 ssDNA が菌体内に蓄積される (Deng *et al.*, 1988; Pigac *et al.*, 1988; Zaman *et al.*, 1993a; Kataoka *et al.*, 1994b)。

SSO の欠損は、*Staphylococcus aureus* における RC 型プラスミドの複製には深刻な影響をもたらす。例えば pT181 では、*ssoA* を欠くとプラスミドのコピー数は野生型の 22 から 10 以下へと減少し、細胞分裂時にプラスミドの分配が均等に行われなくなるため、菌体内に安定に保持できなくなる (Gruss *et al.*, 1987)。一方、*Bacillus subtilis* 内では、pT181 のコピー数は *ssoA* 欠損によってもほぼ変化しないことが知られている (Gruss *et al.*, 1987)。SSO が存在しないにもかかわらずプラスミドが安定に保持される原因としては、宿主因子によって、プラスミドの複製中間体 ssDNA 上で部位非特異的なプライマー合成が行われていることが考えられる。

S. lividans における RC 型プラスミドの SSO の欠損は、*B. subtilis* と同様に、プラスミドの安定な保持には影響を与えない。例えば pIJ101 を基に作成されたクローニングベクター pIJ702 (Katz *et al.*, 1983) は SSO を持っていないが、野生型の pIJ101 のコピー数が *S. lividans* 内で 1 染色体当たり約 400 分子あるのに対し、1 染色体当たり約 100 分子以上とコピー数は 1/4 に減少するものの、細胞分裂時におけるプラスミドの分配には依然として影響がないため、安定に菌体内に保持される (Deng *et al.*, 1988; Zaman *et al.*, 1993a)。従って、pIJ702 等の SSO 欠損型ベクターでも *S. lividans* 内では多コピーで安定に保持されるためクローニングベクターとしては十分有用であり、SSO の有無は今まで多くの研究者には問題とされなかった。しかし、これを長期間細胞内に安定に保持させるためには、複製中間体 ssDNA の蓄積が問題となってくる。このような ssDNA は組み換えを起こし易く、自己と相長的組み換えを起こして high molecular weight (HMW) と呼ばれるマルチマーのプラスミドになったり、宿主染色体 DNA と非相長的組み換えを起こして染色体中に組み込まれたりする (図 0-2)。このような組み換えの結果、染色体上の遺伝子破壊等の可能性も出てくるため、構造的に不安定である SSO 欠損型の従来の放線菌 RC 型プラスミドベクターは、放線菌の育種には適当ではない。

そこで、構造的な意味で安定に RC 型のプラスミドを菌体内に保持させるために、ベクターに

SSO 部分を組み込むことが考えられる。現在放線菌プラスミドの SSO については、pIJ101 および *Streptomyces phaeochromogenes* 由来のプラスミド pJV1 において 600 bp 前後の領域が同定されているが (Deng *et al.*, 1988; Zaman *et al.*, 1993a; Servín-González *et al.*, 1995;)、まだ詳細な解析はされておらず、また SSO を認識する宿主側の因子についても全く調べられていない。

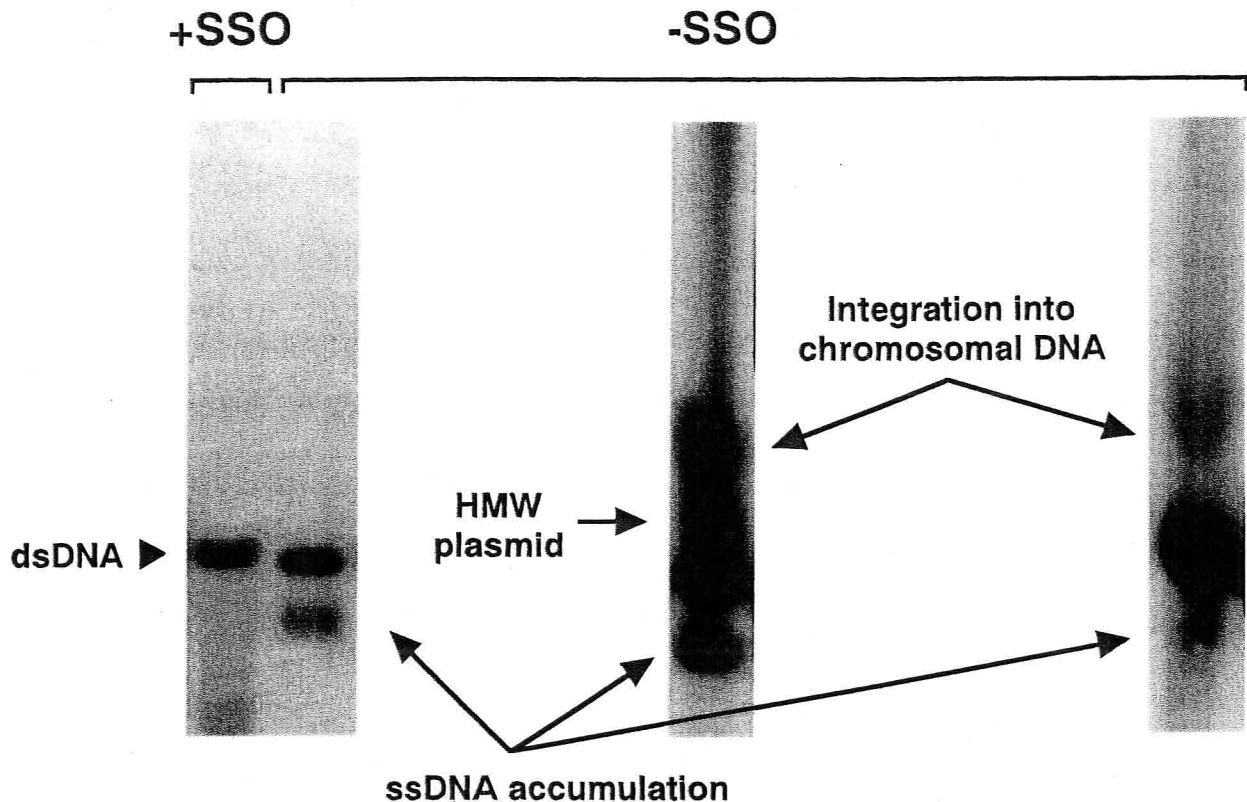


図 0-2. Single strand origin (SSO) 欠損による RC 型プラスミドの構造的不安定化。*S. lividans* 形質転換体より調製した全 DNA をアガロースゲル電気泳動後、サザンハイブリダイゼーション法 (Southern, 1975) によってプラスミドを検出した。SSO の欠損によりプラスミドは複製中間体 ssDNA を細胞内に蓄積する (レーン左から 2 番目) が、この ssDNA は組み換えを起こし易いため、プラスミド自身と組み換えを起こしてサイズが大きくなった high molecular weight (HMW) プラスミドや、染色体 DNA 上に組み込まれてしまったものがしばしば観察される。

放線菌プラスミド pSN22 の構造と機能

プラスミド pSN22 は、タイ土壌より分離された放線菌 *Streptomyces nigrifaciens* SN22 株より単離されたプラスミドである (Kataoka *et al.*, 1991a)。約 11.0 kbp から成るプラスミド上には、接合伝達に関与する遺伝子群と、複製に関与する遺伝子が存在する (図 0-3; Kataoka *et al.*, 1994c)。接合伝達に関与する遺伝子には、気菌系間伝達および宿主染色体の移行に関与する *traB*、菌系内伝達に関与する *traA*、菌系内伝達および伝達に伴う生育遅延ゾーン “pock” の形成に関与する *spdA*、*spdB* と、*traA-traB-spdB* オペロン (*tra* オペロン) の転写を負に調節する遺伝子 *traR*、*traR* 側および *tra* オペロンの両方向へのプロモーター活性を持ち、*traR* 遺伝子産物の結合により *tra* オペロンの転写を抑制する transfer gene regulating element (TRE) 領域が存在する (図 0-3; Kataoka *et al.*, 1991a; 1991b; 1994b; 1994c; Kosono *et al.*, 1996)。プラスミドの接合伝達を利用して、プラスミド保持株から非保持株への効率の良い形質転換を行うことができる。この手法を用いれば、プロトプラストの形質転換法が確立されていない放線菌株でも、容易にプラスミドで形質転換された株を取得できる。

pSN22 の複製に関与しているのは *rep*、DSO (*ori1*; Kataoka *et al.*, 1994b, c)、SSO (*ori2*; Kataoka *et al.*, 1994b, c) で、DSO-*rep* 領域と SSO 部分は、他のグラム陽性菌 RC 型プラスミドと同様お互いに離れた位置に存在している (図 0-3)。*rep* 領域は、*S. lividans* のプラスミド pIJ101 の *rep* 領域と DNA 塩基配列上で 92%、予測されるアミノ酸配列上で 95% の相同性を示しており (Kataoka *et al.*, 1994c)、このプラスミドも pC194 グループに属することが明らかとなっている。一方、SSO が存在する接合伝達遺伝子群領域は、pIJ101 の持つ接合伝達遺伝子群領域とは遺伝子の構造、塩基配列ともに全く異なり、前述したようにこのプラスミド pSN22 も原核生物間に広く存在する RC 型レプリコンと、宿主に特異的な SSO が組み合わされて出来たものであると推察される。pSN22 の SSO は、*traR*-TRE 部分を含む 548 bp の *BglII*-*SmaI*^b 断片に存在すると報告されている (図 0-3; Kataoka *et al.*, 1994b)。

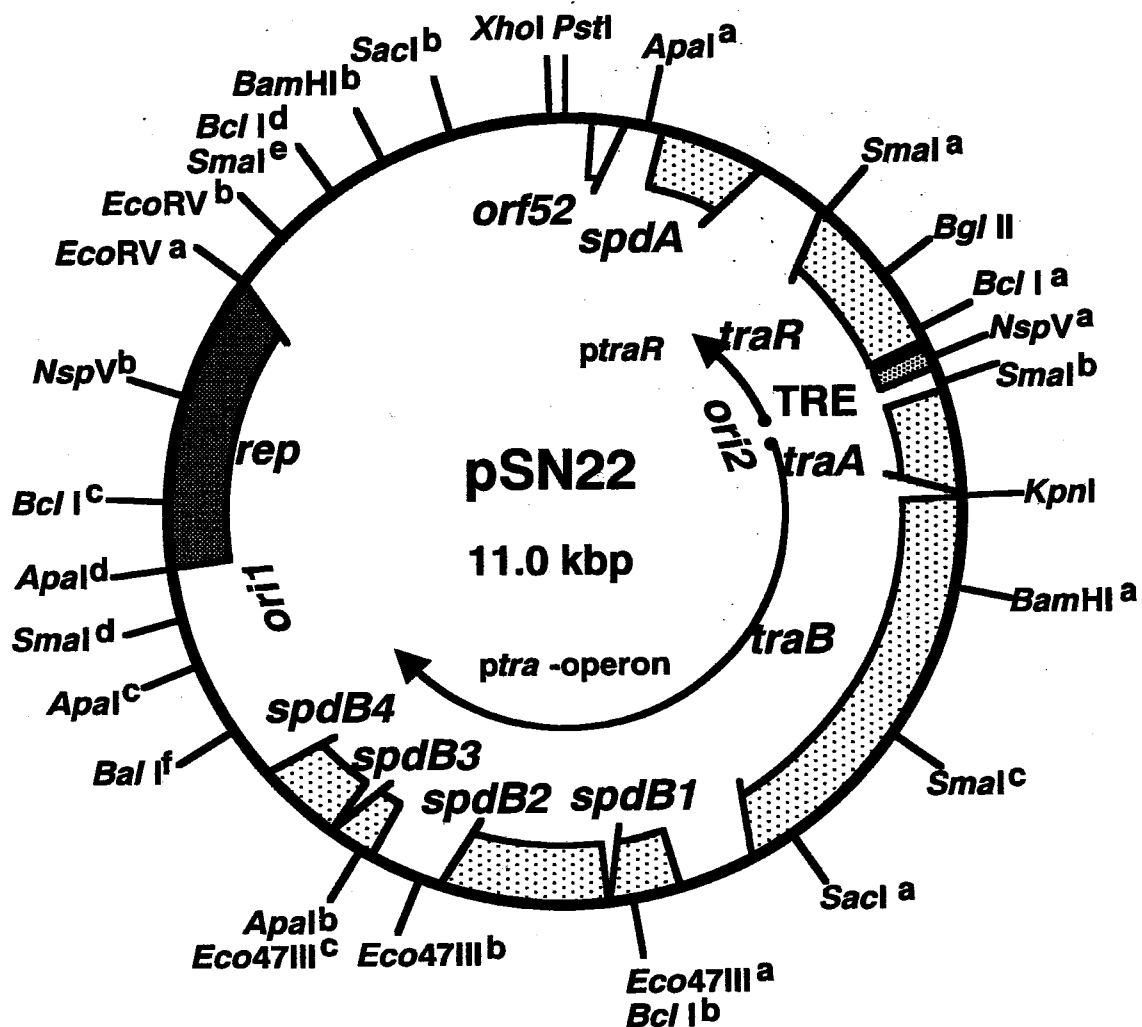


図 0-3. プラスミド pSN22 の構造 (Kataoka et al., 1994c より改変)。 *tra* (transfer) および *spd* (spread) 遺伝子は、プラスミドの接合伝達に関与する。Transfer gene regulating element (TRE) は、 *traR* および *traA-traB-spdB* オペロンの両方向へのプロモーター活性 (*ptrA* と *ptrB* operon) およびリプレッサーの結合部位を含む。 *ptrA* および *ptrB* operon の矢印は、転写の方向を示す。 *rep* はプラスミドの自律複製に必須な遺伝子； *ori1* はリーディング鎖の複製開始点である double strand origin (本論文での名称は *dso*)； *ori2* はラギング鎖の複製開始点である single strand origin。図に示した主な制限酵素認識部位のうち、複数存在するものは肩付きのアルファベットで区別した。 *orf52* の機能は不明。(第一章図 1-1A において、SSO についての最新の情報を加えた図を示す。)

本論文の概要

本論文では、放線菌細胞内において構造的・分配的に安定に保持される RC 型プラスミド由来のベクターを構築するために、プラスミドの複製機構についての情報を蓄積することを目的として、放線菌プラスミド pSN22 の複製機構、特に従来あまり注目されなかった SSO の構造、DSO の構造および複製中間体 ssDNA の形成から ds プラスミド分子への変換までの機構について解析を行った。

第一章では pSN22 の SSO である *sso1* の構造について述べる。pSN22 において SSO 活性を持つと報告されていた DNA 断片、*ori2* (Kataoka *et al.*, 1994b) について改めて解析を行った結果、この断片は *dso-rep* に対し本来の pSN22 上での向きとは逆に組み込まれないと SSO 活性を持たないことが明らかとなった。本研究では新たに pSN22 上で正しい向きで機能する SSO として、*sso1* を同定した。*sso1* と他の放線菌プラスミド、pIJ101 および pJV1 の SSO 領域との DNA 塩基配列の比較を行い、共通の DNA 塩基配列について述べた。

第二章では *ori2* 断片上に存在する SSO 領域の限定について述べる。この断片上には pSN22 上とは逆向きに挿入されると活性を持つ SSO が 2 つ存在した。この 2 つの SSO、*sso2* と *sso3* の DNA 塩基配列より予測される二次構造上を解析し、他のグラム陽性菌由来 RC 型プラスミドの SSO と比較した結果について述べた。

第三章では pSN22 の複製開始点である *dso* におけるニッキング部位について述べる。*dso* 領域の DNA 塩基配列の pIJ101 および pJV1 の DSO 領域との比較を行い、保存されている領域を調べた。pIJ101 との相同性が非常に高いニッキング部位に部位特異的突然変異を導入し、プラスミドの複製への影響を調べたところ、pIJ101 における報告とは異なり、ニッキング部位の DNA 塩基配列は厳密に決定されていることが示唆された。

第四章では *S. lividans* における、プラスミド pSN22 の SSO 欠損時のセカンド鎖合成、またセカンド鎖合成のプライマー合成への RNA ポリメラーゼの関与について、*in vivo* および *in vitro* での解析を行った。pSN22 においては SSO の欠損は *S. lividans* 内でのプラスミドのコピ

一挙に影響を与えず、複製中間体 ssDNA 上で宿主因子によって SSO 非依存のプライマー合成が行われていると考えられた。そこでプライマー合成を行うと考えられる RNA ポリメラーゼの阻害剤、リファンピシンによるプラスミド複製への影響を調べた。次に *S. lividans* の無細胞系抽出液を用いた *in vitro* でのセカンド鎖合成系を構築し、鋳型 ssDNA 上の SSO の有無による影響、リファンピシンによる影響を解析した。さらに、*E. coli* の無細胞系抽出液によるリファンピシン耐性、SSO 非依存のセカンド鎖合成である *general priming* との比較について述べた。

終章では同定した SSO の応用例について簡単に述べ、総括を行った。

第一章

放線菌プラスミド pSN22 のラギング鎖複製開始点

sso1 の同定

第一章

放線菌プラスミド pSN22 のラギング鎖複製開始点 *sso1* の同定

pSN22 のローリングサークル型複製におけるラギング鎖複製の開始点となる single strand origin (SSO) は、約 550 bp の *Bgl*II-*Sma*I 断片に含まれる *ori2* に存在すると報告されていた (Kataoka *et al.*, *Mol. Gen. Genet.* 242, 130-136, 1994)。この断片の SSO 活性を再確認した結果、SSO 活性はもとの pSN22 上での向きとは逆に組み込まれたときのみ示され、この SSO が本来のプラスミドのラギング鎖複製には用いられないことが明らかとなった。pSN22 のラギング鎖複製に用いられる SSO として新たに同定した *sso1* は、プラスミドの接合伝達に關与する *spdA* および *traR* 遺伝子の間の非コード領域に存在した。*sso1* 領域の DNA 塩基配列には、約 170 bp にわたって他の放線菌プラスミド、pIJ101 と pJV1 の SSO と非常に相同性の高い、SSO 活性に重要な機能を持つと考えられる配列が存在した。

結 言

プラスミドの複製機構の研究は、染色体 DNA 複製のモデルとしてだけでなく、工業的に利用される微生物の分子育種や基礎生物学的研究のために、外来遺伝子を宿主細胞内に導入するベクターの開発にとっても重要な情報を提供している。グラム陽性菌群には *Bacillus* 属や *Lactococcus* 属、*Streptomyces* 属をはじめ、発酵工業において利用される菌群が数多く含まれている。ローリングサークル (rolling circle; RC) 型複製は、グラム陽性菌由来のおよそ 10 kbp 以下の小型環状プラスミドの多くに見られる複製機構である (Gruss and Ehrlich, 1989; Novick, 1989; Jannière *et al.*, 1993; del Solar *et al.*, 1993)。その特徴としては、複製途中に中間体とし

て特定の側の鎖が環状の一本鎖 (single-stranded; ss) DNA プラスミド分子を形成することが挙げられる (序章 図 0-1 参照)。この複製中間体 ssDNA から二本鎖 (double-stranded; ds) DNA プラスミド分子への変換 (セカンド鎖合成、あるいはラギング鎖複製) は、single strand origin (SSO) と呼ばれる複製開始点を宿主の RNA ポリメラーゼ等が認識して、プライマーを合成することにより開始される。SSO を欠損、あるいは逆向きに挿入すると ss プラスミドの ds への変換が効率よく行われなくなり、複製中間体 ssDNA が細胞内に蓄積する。宿主によっては SSO に依存しない部位非特異的なプライマー合成能が低いため、プラスミドのコピー数が減少する (Gruss *et al.*, 1987)。また、細胞内に蓄積した複製中間体 ssDNA はプラスミド自身や染色体 DNA との組み換えを起こし易い。このようなプラスミドの分配的、構造的な不安定化を防ぐため、RC 型プラスミドベクターには SSO を組み込む必要がある。

放線菌群は、前述のように抗生物質や酵素等の生産菌として、工業的に重要な微生物である。近年、放線菌においても各生産物の生合成経路の解析、育種に遺伝子工学的手法を用いるため、数々のベクターが開発されている。最も普及しているのは Hopwood らのグループによって開発された pIJ702 等の *Streptomyces lividans* より分離された RC 型プラスミド pIJ101 由来のベクター群である (Kieser *et al.*, 1982; Katz *et al.*, 1983; Hopwood *et al.*, 1985)。pIJ101 の SSO は、プラスミドの不和合性に関与する領域 (strong incompatibility; *sti*) に重複して存在することが明らかとなっている (Deng *et al.*, 1988; Zaman *et al.*, 1993a) が、詳細な領域限定はまだ行われていない。従って pIJ702 等には SSO は組み込まれておらず、菌体内に複製中間体 ssDNA を蓄積するので、クローニングベクターとしては有用であるものの、分子育種等の目的で宿主細胞内に長期間安定に保持させるには適さない。他の放線菌プラスミドの SSO としては *Streptomyces phaeochromogenes* 由来のプラスミド pJV1 の SSO 領域が知られている (Servín-González *et al.*, 1995)。

プラスミド pSN22 は放線菌 *Streptomyces nigrifaciens* SN22 株由来の伝達性 RC 型プラスミドである (Kataoka *et al.*, 1991a; 1994b)。pSN22 は pIJ101 と非常に相同性の高い *rep* 遺伝子を含む複製必須領域を持つが、接合伝達に関与する遺伝子群領域では pIJ101 と全く異なる構造

を持つ (Kataoka *et al.*, 1994b, c)。片岡らは pSN22 の接合伝達領域内の 548 bp の *Bgl*II-*Sma*I^b 断片が SSO 活性を持つことを示した。そこで本章では pSN22 の SSO 領域を限定し、他の放線菌由来 RC 型プラスミドの SSO と比較して、放線菌プラスミドの SSO に共通な DNA 塩基配列等の知見の取得を試みた。驚いたことに前述の *Bgl*II-*Sma*I^b 断片は、複製必須領域に対し pSN22 上での向きとは逆に挿入された場合のみ SSO 活性を示し、従って pSN22 の RC 型複製における SSO としては恐らく利用されていないことが明らかになった。そこで pSN22 上と同じ向きで活性を持つ SSO を新たに単離し、pIJ101、pJV1 の SSO 領域との比較を行った。

材料および方法

使用菌株、プラスミドおよび培地

Escherichia coli DH5 α 株 (*supE44* Δ *lacU169* (ϕ 80 *lacZ* Δ M15) *hsdR17* *recA1* *endA1* *gyrA96* *thi-1* *relA1*; Hanahan, 1983) 、JM109 株 (*recA1* *supE44* *endA1* *hsdR17* *gyrA96* *relA1* *thi* Δ (*lac-proAB*) F' [*traD36* *proAB*⁺ *lacI*⁺ *lacZ* Δ M15]; Yanisch-Perron *et al.*, 1985) 、GM33 株 (*dam*; Maniatis, 1973) をプラスミドベクター pUC18、pUC19 (Yanisch-Perron *et al.*, 1985) 、pBluescriptII SK+ (Stratagene, La Jolla, CA) の宿主として用いた。放線菌プラスミドの宿主としては *S. lividans* TK21 株 (SLP2⁻, SLP3⁻; Kieser *et al.*, 1982) を用いた。*E. coli* の培養には 2 x YT 培地 (Sambrook *et al.*, 1989) を用い、*S. lividans* の培養には R2YE 寒天培地あるいは YEME 液体培地 (Hopwood *et al.*, 1985) を用いた。

組み換え DNA 操作

E. coli からのプラスミドの抽出、試験管内の組み換え DNA 操作、*E. coli* の形質転換は、Sambrook らの方法に従った (Sambrook *et al.*, 1989) 。すべての組み換え DNA は *E. coli* の宿主・ベクター系を用いて構築し、*E. coli*-*S. lividans* シャトルベクターの形にした後、*S. lividans* のプロトプラストに形質転換法により導入した。*S. lividans* のプロトプラスト作製および形質転換は、Hopwood らの方法によった (Hopwood *et al.*, 1985) 。組み換え DNA 操作に用いた酵素は宝酒造 (滋賀) あるいは New England Biolabs (Beverly, MA) より購入し、供与元のプロトコルに従って用いた。

プラスミドの構築

プラスミド pRT1. pSN22 の *dso-rep* を含む 2.1 kbp の *BaI*^f-*EcoRV*^a 断片 (図 1-1A) を *Sma*I で切断した pUC19 に組み込んだ。pIJ6 (Thompson *et al.*, 1982) のチオストレプトン耐性遺伝子 (*tsr*) を含む 1.6 kbp の *Bst*EII-*Bam*HI 断片を切り出して、DNA 断片の末端を T4 DNA ポリメラーゼで平滑化した後、*Hinc*II で消化した上記のプラスミドに組み込んだ。作製されたプラスミドは、*dso-rep* および *tsr* の挿入された方向を DNA 塩基配列決定法 (後述) により確認し、*E. coli*-*S. lividans* シャトルベクター-pRT1 (図 1-1B) と名付けた。

プラスミド pSSO シリーズ. pSSO シリーズプラスミドは、SSO の領域限定に用いる pSN22 断片を、pBluescriptII SK+のマルチクローニングサイトに組み込むことにより構築した。

プラスミド pSSO030 は、pSN22 の 550 bp の *Bg*II-*Sma*I^b 断片を、pBluescriptII SK+の *Spe*I (T4 DNA ポリメラーゼで平滑化) -*Bam*HI 部位に組み込んで作製した。一方、pSSO031 は同じ *Bg*II-*Sma*I^b 断片を、pBluescriptII SK+の *Bam*HI-*Sma*I 部位に組み込んで作製した。従って、pSSO030 と pSSO031 では *Bg*II-*Sma*I^b 断片は異なる方向で pBluescriptII SK+に挿入されている (図 1-1B)。プラスミド pSSO010 は、pSN22 の 3.1 kbp の *Pst*I-*Bam*HI 断片を pBluescriptII SK+の *Bam*HI-*Pst*I 部位に組み込んで作製した。プラスミド pSSO020 は、pSN22 の 1.6 kbp の *Pst*I-*Bg*II 断片を pBluescriptII SK+の *Pst*I-*Bam*HI 部位に組み込んで作製した。一方 pSSO021 は、*Pst*I (T4 DNA ポリメラーゼで平滑化) -*Bg*II 断片を pBluescriptII SK+の *Spe*I (T4 DNA ポリメラーゼで平滑化) -*Bam*HI 部位に挿入して作製した。従って、pSSO020 と pSSO021 では *Pst*I-*Bg*II 断片は異なる方向で pBluescriptII SK+に組み込まれている。

プラスミド pSSO040 から pSSO111 までに組み込んだ pSN22 断片は、表 1-1 に示した合成オリゴヌクレオチドをプライマーとして用いた PCR 法 (Saiki *et al.*, 1988) によって作製した。PCR 法には Ex *Taq* DNA ポリメラーゼ (宝酒造) と、鋳型として pSSO020 あるいは pSSO021 を用いた。各 PCR 産物は断片の末端に付加された適当な制限酵素によって処理した後、

pBluescriptII SK+に組み込んだ。組み込まれた pSN22 断片の pBluescriptII SK+上での方向は、pSSO040、050、060、070、080、090、100、110 では、図 1-1A に示した pSN22 での時計回りの方向が、pBluescriptII SK+のマルチクローニングサイトの *Pst*I 部位から *Xba*I 部位への向きに合うように組み込まれている（図 1-1B の pSSO030 と同様）。一方、pSSO041、061、081、091、101、111 では逆に、*Xba*I 部位から *Pst*I 部位の方向に組み込まれている（図 1-1B の pSSO031 と同様）。

表 1-1. オリゴヌクレオチドプライマーの塩基配列。

Name	Nucleotide sequence ^a	Position ^b	Clone
M4	5'-GTTT CCCAG TCACG AC-3'		c
RV	5'-CAGGA AACAG CTATG AC-3'		d
0201	5'- <u>CCCGG ATCCG</u> GAGCC GTGAC CGTGC TCGCC-3'	201-221	pSSO080/081
0401	5'- <u>CCCGG ATCCC</u> CACTC GCCAC GCCAC GAGAC-3'	401-421	pSSO090/091
0601	5'-GGGGG <u>ATCCT</u> GCTCG GCGCG TACAT GAAGG-3'	601-621	pSSO100/101
0801	5'- <u>CCCGG ATCCC</u> GCCCG CTGCT GCCCC CCGCG-3'	801-821	pSSO110/111
0800R	5'-GGGTC <u>TAGAC</u> CGGCC TTTCG ACCGG GGCGC-3'	780-800	pSSO070
1000R	5'-GGGTC <u>TAGAT</u> CGCGG GGCTG GGCTG CGTG-3'	981-1000	pSSO060/061
1210R	5'-CCCTC <u>TAGAC</u> CCCAT TGAGC CCCC TCCG-3'	1191-1210	pSSO050
1400R	5'-CCCTC <u>TAGAC</u> GCACG GCAGG CGTCC CAGG-3'	1381-1400	pSSO040/041

^a 下線を施した配列は、クローニングのために付け加えた制限酵素認識部位。

^b pSN22 の *Pst*I 部位からのヌクレオチドの位置 (Kataoka *et al.*, 1994c)。

^c M13 Primer M4 (宝酒造) は pSSO040、050、060、070、081、091、101、111 の構築に用いた。

^d M13 Primer RV (宝酒造) は pSSO041、061、080、090、100、110 の構築に用いた。

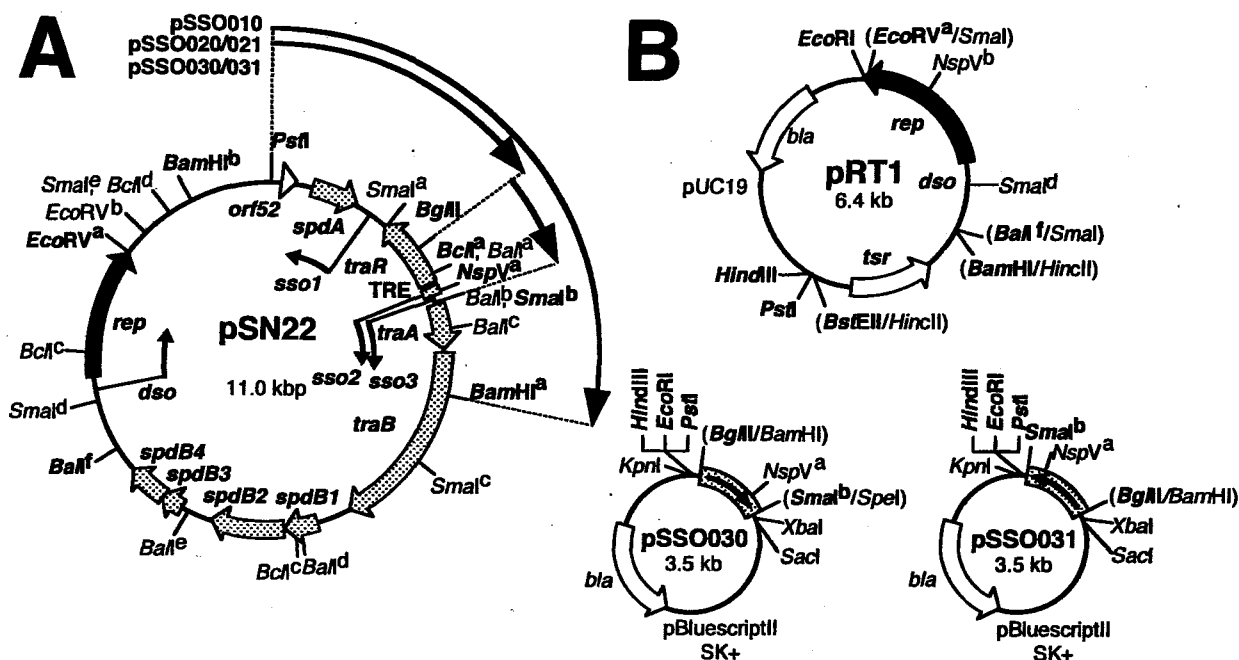
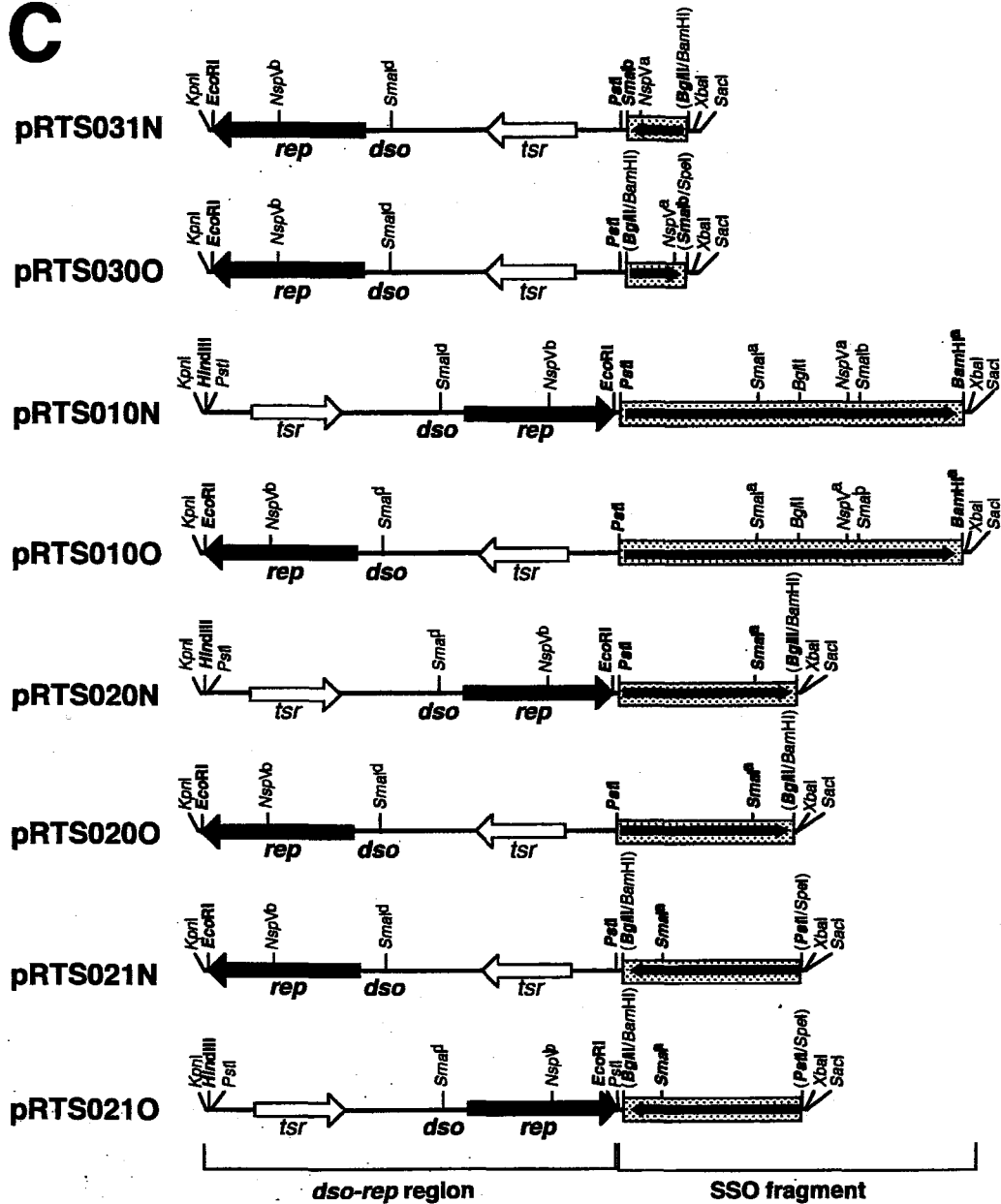


図 1-1. (A) プラスミド pSN22 の構造 (Kataoka et al., 1994c より改変)。tra (transfer) および spd (spread) 遺伝子は、プラスミドの接合伝達に関与する。Transfer gene regulating element (TRE) は、両方向へのプロモーター活性およびリプレッサーの結合部位を含む。rep はプラスミドの自律複製に必須な遺伝子；dso (double strand origin、第三章参照) はリーディング鎖の複製開始点；sso1-3 (single strand origin、本章および第二章参照) はラギング鎖の複製開始点。各 SSO から出た矢印は、各 SSO からの DNA の合成方向を表す。pSSO010、pSSO020/021 および pSSO030/031 と書かれた矢印は、それぞれのプラスミドに組み込まれた断片の位置および方向を示す。複数個存在する制限酵素認識部位については、アルファベットで区別した。orf52 の機能は不明。

(B) プラスミド pRT1、pSSO030 および pSSO031 の構造。使用した制限酵素認識部位、選択マーカーの抗生物質耐性遺伝子、および pSN22 の rep を図示した。矢印の書かれた領域は、クローニングされた pSN22 の断片およびその方向 (図 1-1A 参照) を表す。括弧内に示された制限酵素認識部位は、クローニング時に潰されたものを示す。

C



(C) *E. coli*-*S. lividans* シャトルプラスミド pRTS031N、pRTS030O、pRTS010N/O、pRTS020N/O、および pRTS021N/O の構造。pBluescriptII SK+ の部分 (*KpnI*-*SacI*) は示されていない。プラスミド名の “N” および “O” は、プラスミド上で pSN22 の *dso-rep* 部分と SSO 断片がもとの方向 (正向き、natural) に組み込まれているか、反対方向 (逆向き、opposite) に組み込まれているかを表している。ORF の向きは太い矢印で、組み込まれた SSO 断片の向きは細い矢印で示した。括弧内に示された制限酵素認識部位は、クローニング時に潰されたものを示す。クローニングに用いた制限酵素認識部位は、太字で示した。それぞれのプラスミドの *S. lividans* 細胞内における ssDNA 複製中間体の蓄積の有無を、右側に示した。+ : ssDNA を蓄積、- : ssDNA を蓄積しない。

プラスミド pRTS シリーズ。 *E. coli-S. lividans* シャトルプラスミド pRTS シリーズは、プラスミド pRT1 の *dso-rep* および *tsr* を含む断片をプラスミド pSSO シリーズに組み込むことにより構築した。*dso-rep* 領域を組み込む際に、元の pSSO シリーズに組み込まれていた pSN22 断片 (SSO 断片) と *dso-rep* の向きが pSN22 上と同じであるものを、pRTSxxxN (xxx はプラスミドの番号、例 ; pRTS010N、“N” は “natural” を意味する) と名付けた。一方、*dso-rep* と SSO 断片の向きが pSN22 上とは反対のものを、pRTSxxxO (例 ; pRTS010O、“O” は “opposite” を意味する) と名付けた。

pRTSxxxN シリーズの構築は以下のようにして行った。プラスミド pRT1 の *tsr-dso-rep* を含む 3.7 kbp の *HindIII-EcoRI* 断片を切り出し、pSSO シリーズのうち SSO 断片が *PstI* 部位から *XbaI* 部位の方向に組み込まれているもの (例 ; pSSO020) を *HindIII* および *EcoRI* で切断したところに組み込んだ。従って、構築されたプラスミドの *dso-rep* と SSO 断片の向きは、pSN22 上と同じになっている (例 ; 図 1-1C の pSSO020N)。あるいは、pRT1 の 3.7 kbp の *tsr-dso-rep* 領域を *EcoRI* と *PstI* で切り出して、pSSO シリーズのうち SSO 断片が *PstI* 部位から *XbaI* 部位への方向とは逆に組み込まれているもの (例 ; pSSO021) を *EcoRI* および *PstI* で切断したところに組み込んだ。従って、構築されたプラスミドの *dso-rep* と SSO 断片の向きは、これも pSN22 上と同じになっている (例 ; 図 1-1C の pSSO021N)。

pRTSxxxO シリーズの構築は以下のようにして行った。pSSO シリーズのうち SSO 断片が *PstI* 部位から *XbaI* 部位の方向に組み込まれているもの (例 ; pSSO020) を *EcoRI* および *PstI* で切断し、pRT1 の *tsr-dso-rep* を含む 3.7 kbp の *EcoRI-PstI* 断片を組み込んだ。従って、構築されたプラスミドの *dso-rep* と SSO 断片の向きは、pSN22 上とは反対になっている (例 ; 図 1-1C の pRTS020O)。あるいは、*PstI* 部位から *XbaI* 部位の方向とは逆に SSO 断片が組み込まれている pSSO シリーズ (例 ; pSSO021) を *HindIII* および *EcoRI* で切断し、pRT1 の *tsr-dso-rep* を含む 3.7 kbp の *HindIII-EcoRI* 断片を組み込んだ。従って、構築されたプラスミドの *dso-rep* と SSO 断片の向きは、pSN22 上とは反対になっている (例 ; 図 1-1C の pRTS021O)。

ssDNA の検出

S. lividans の形質転換体を対数増殖後期まで培養し、Hopwood らの方法に基づいて全 DNA を抽出した (Hopwood *et al.*, 1985)。1.6 μ g の全 DNA を 1% アガロースゲル電気泳動で分画した後、te Riele らの方法に従いアルカリ変性を行わずに DNA をナイロン膜 (Hybond-N, Amersham, Bucks, UK) にブロッティングした (te Riele *et al.*, 1986a)。この操作により、細胞内に存在する ssDNA のみがナイロン膜に固定される。ssDNA の検出は、サザンハイブリダイゼーション法 (Southern, 1975) により行った。プローブとしては、DIG DNA labeling kit (Boehringer Mannheim, Mannheim, Germany) によりジゴキシゲニン (digoxigenin; DIG) -dUTP ラベルした pBluescriptII SK+を用い、DIG luminescent detection kit (Boehringer Mannheim) によってプラスミドを検出した。

DNA 塩基配列の解析

DNA 塩基配列の決定は、チェンターミネーション法 (Sanger *et al.*, 1977) によった。鋳型としてアルカリ法で調整したプラスミドの dsDNA を用い、FITC ラベルした M4 および RV-M プライマー (宝酒造) と Thermo Sequenase fluorescent labeled primer cycle sequencing kit (Amersham) を使用した。サイクルシーケンスの方法は、Amersham 社のプロトコルに従った。反応が終了したサンプルは、ALF DNA sequencer II (Pharmacia, Uppsala, Sweden) によって DNA 塩基配列を決定した。

SSO 領域の DNA 塩基配列の他の放線菌プラスミドの SSO 領域との比較、および SSO 領域の核酸二次構造の予測には、PC9801 コンピューター (NEC、東京) および GENETYX 遺伝情報処理ソフトウェア (ソフトウェア開発、東京) を用いた。

結 果

pSN22 はリーディング鎖、ラギング鎖の両方に single strand origin 配列を持つ

SSO を欠失、あるいは逆向きに挿入したプラスミドは、*S. lividans* の菌体内で複製中間体 ssDNA を蓄積する (Deng *et al.*, 1988; Pigac *et al.*, 1988; Zaman *et al.*, 1993a; Kataoka *et al.*, 1994b)。片岡らは pSN22 の 550 bp の *Bgl*II-*Sma*I^b 断片 (図 1-1A) が、方向性を持つ SSO 断片 (*ori*2) であることを示した (Kataoka *et al.*, 1994b)。そこで、この *Bgl*II-*Sma*I^b 断片を pSN22 の *dso-rep* と共に組み込んだ *E. coli*-*S. lividans* シャトルプラスミド、pRTS031N と pRTS0300 を構築し、上記の pSN22 断片の持つ SSO 活性の確認を試みた。プラスミド pRTS031N (“N” は “natural” を意味する) は、*Bgl*II-*Sma*I^b 断片と *dso-rep* の向きが pSN22 と同じ (正向き) になっており、一方、pRTS0300 (“O” は “opposite” を意味する) の *Bgl*II-*Sma*I^b 断片の向きは、*dso-rep* と逆になっている (図 1-1C)。各プラスミドをプラスミド非保持株である *S. lividans* TK21 株のプロトプラストに導入し、形質転換体を 50 µg/ml のチオストレプトンを含む R2YE 平板培地上で選択した。得られた形質転換体を 5 µg/ml のチオストレプトンを含む YEME 液体培地で 30°C で振とう培養し、対数増殖終期の菌体を集めた。全 DNA を調製した後、1.6 µg の DNA を 1%アガロースゲル電気泳動で分画し、アルカリ変性を行わないでナイロン膜にブロッキングすることにより、菌体内の ssDNA のみをナイロン膜上に固定した。なお、各全 DNA 溶液中の染色体 DNA 量および ds のプラスミド分子の量については、電気泳動後のアガロースゲルの臭化エチジウム染色によって、ほぼ等しいことを確認した (データ不掲載)。それぞれの形質転換体の ssDNA の蓄積をサザンハイブリダイゼーション法によって確認したところ、*dso-rep* と *Bgl*II-*Sma*I^b 断片の向きが pSN22 と同じである pRTS031N を持つ形質転換体において、複製中間体 ssDNA の蓄積が見られた (図 1-2、レーン 2)。ところが、pRTS0300 の形質転換体では ssDNA の蓄積は見られなかった (図 1-2、レーン 1)。この結果は *Bgl*II-*Sma*I^b 断片の

SSO 活性が、本来の pSN22 の RC 型複製では使われないラギング鎖（図 0-1 参照）の側に存在することを示しており、従って片岡らの報告（Kataoka *et al.*, 1994b）とは一致しないことが明らかとなった。そこでこれを再度確認するために、*Bgl*II-*Sma*I^b 断片より大きな領域である 3.1 kbp の *Pst*I-*Bam*HI^a 断片を pSN22 よりクローニングし、*dso-rep* を正向き、逆向きに組み込んだ *E. coli*-*S. lividans* シャトルプラスミド pRTS010N、pRTS010O を構築した（図 1-1C）。各形質転換体より全 DNA を調製し、ssDNA の蓄積を確認したところ、pRTS010N、pRTS010O どちらのプラスミドの形質転換体も複製中間体 ssDNA の蓄積を示さなかった（図 1-2、レーン 3、4）。即ち、pSN22 の *Pst*I-*Bam*HI^a 断片上には、リーディング鎖側とラギング鎖側の両方の鎖に SSO が存在することが示唆された。

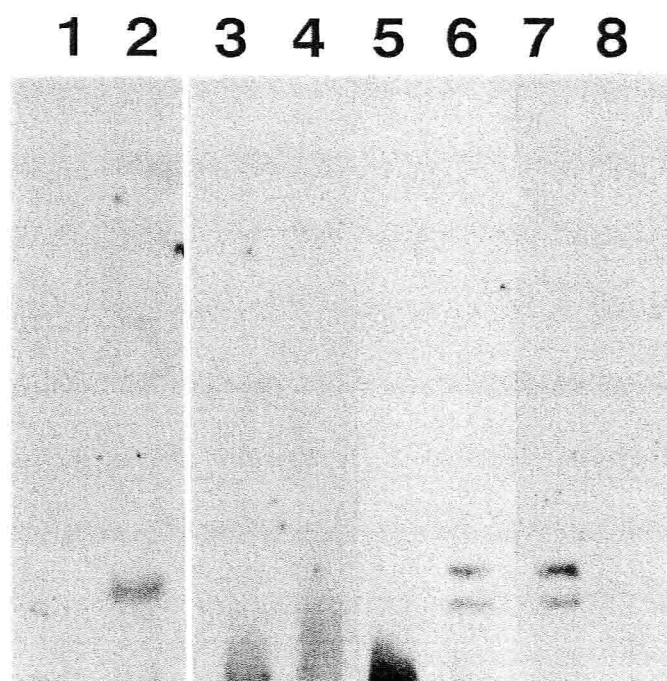


図 1-2. 各 SSO 断片を含むプラスミドの *S. lividans* 細胞内における ssDNA 複製中間体の蓄積。直鎖状あるいは環状の ssDNA プラスミド分子を、サザンハイブリダイゼーション法によって検出した。レーン 1、pRTS030O；2、pRTS031N；3、pRTS010N；4、pRTS010O；5、pRTS020N；6、pRTS020O；7、pRTS021O；8、pRTS021N。

ラギング鎖複製開始点 *sso1* の位置

pSN22 の 1.6 kbp の *Pst*I-*Bgl*II 断片をクローニングし、*E. coli*-*S. lividans* シャトルプラスミド pRTS020N、pRTS020O、pRTS021N、pRTS021O を構築した (図 1-1C)。各形質転換体より全 DNA を調製した後、複製中間体 ssDNA の蓄積を調べた。*Pst*I-*Bgl*II 断片を *dso-rep* に対し正方向で持っている pRTS020N および pRTS021N の形質転換体では複製中間体 ssDNA の蓄積は見られなかった (図 1-2、レーン 5、8) が、*Pst*I-*Bgl*II 断片を *dso-rep* に対し逆方向で持っている pRTS020O および pRTS021O の形質転換体では ssDNA の蓄積が見られた (図 1-2、レーン 6、7)。従って、*Pst*I-*Bgl*II 断片のリーディング鎖側には、本来の pSN22 の RC 型複製におけるラギング鎖複製に用いられる SSO が存在することが明らかとなった。この SSO を *sso1* と名付けた。

sso1 の位置をさらに詳細に限定するために、図 1-3A に示した一連の *E. coli*-*S. lividans* シャトルプラスミドを、表 1-1 に示したプライマーを用いた PCR 法により作製した。pRTSxxxN (xxx はプラスミドの番号) と名付けたプラスミドでは、クローニングした SSO 断片に対し *dso-rep* が正方向に組み込まれており、一方、pRTSxxxO と名付けたプラスミドでは、クローニングした SSO 断片とは逆方向に *dso-rep* が組み込まれている (図 1-1C に示した pRTS シリーズと同様)。これらの組み換え体プラスミドを導入した *S. lividans* 形質転換体より全 DNA を調製し、各 pSN22 断片の SSO 活性を調べた。図 1-3 に示した結果より、*sso1* はヌクレオチド (nt) 801-1210 (pSN22 の *Pst*I 認識部位から時計回りの方向でのヌクレオチドの番号) の約 0.4 kbp に位置することが示唆された。

この領域は pSN22 の接合伝達に関与する遺伝子、*spdA* と *traR* の間の非コード領域に重なっている。*spdA* はプラスミドの接合伝達時にできる生育遅延ゾーン “pock” の大きさに関する遺伝子 (Kataoka *et al.*, 1991a; 1994c) で、*traR* は同じく接合伝達に関与する *traA*-*traB*-*spdB* オペロン (*tra* オペロン) の転写を不に調節するタンパク質をコードしている (Kataoka *et al.*, 1994a, c)。

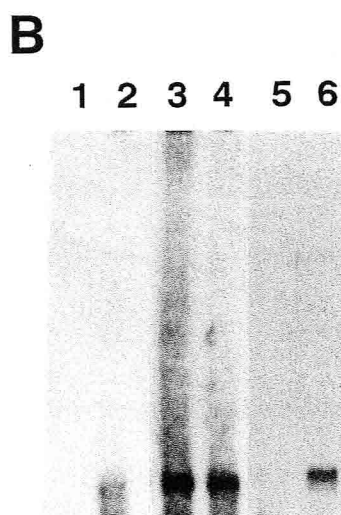
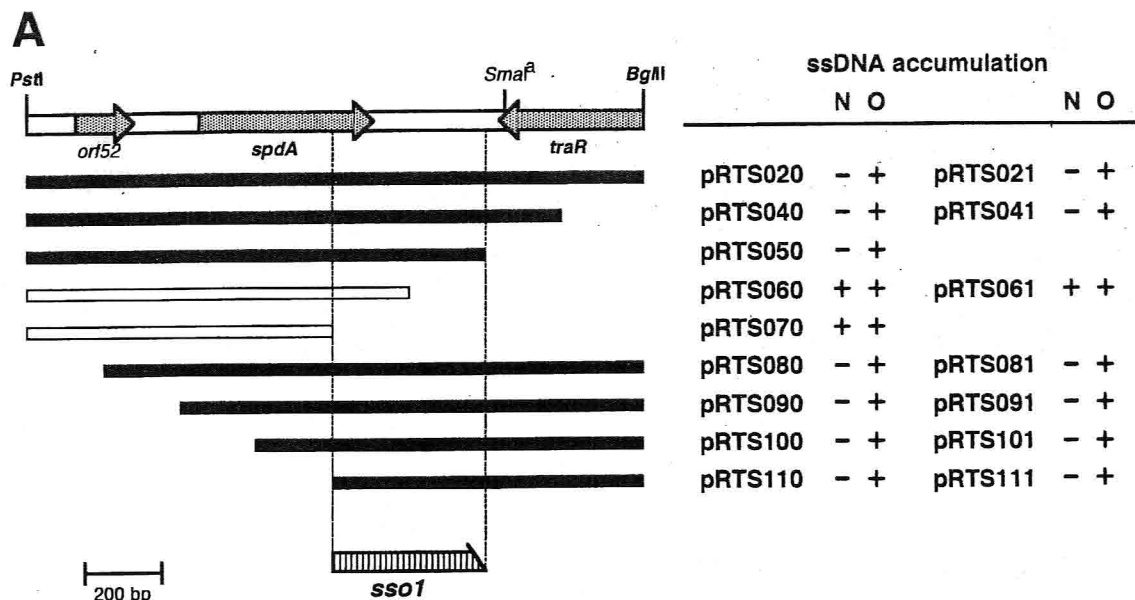


図 1-3. (A) *sso1* の領域の限定。最も上に示したバーは、pSN22 の *Pst*I-*Bgl*II 領域を示す。各断片は表 1-1 に示したオリゴヌクレオチドをプライマーとして、PCR 法によって作製し、pBluescriptII SK+に 2 種類の方向に組み込んだ。pRT1 の *tsr-dso-rep* を含む 3.7 kbp の *Hind*III-*Eco*RI または *Eco*RI-*Pst*I 断片を、それぞれ構築したプラスミドに組み込み、図に示した各プラスミドを作製した。それぞれのプラスミドの *S. lividans* 細胞内における ssDNA 複製中間体の蓄積の有無を、右側に示した。+ : ssDNA を蓄積、- : ssDNA を蓄積しない。図中の黒いバーは正向き (N) に組み込んだときに SSO 活性を持つ断片を、白抜きバーは SSO 活性を持たない断片を表す。図の最も下に示した矢印は、限定された *sso1* の領域を表す。

(B) 各 SSO 断片を含むプラスミドの *S. lividans* 細胞内における ssDNA 複製中間体の蓄積。ssDNA プラスミド分子を、サザンハイブリダイゼーション法によって検出した。レーン 1、pRTS050N ; 2、pRTS050O ; 3、pRTS60N ; 4、pRTS60O ; 5、pRTS110N ; 6、pRTS110O。

sso1 と他の放線菌 RC 型プラスミドの single strand origin との比較

sso1 は pSN22 の接合伝達に関与する遺伝子群領域内に存在する。片岡らは、pSN22 の DNA 塩基配列および遺伝子の構造を *S. lividans* 由来の伝達性プラスミド pIJ101 と比較し、pSN22 の接合伝達関連遺伝子群領域は塩基配列、構造ともに pIJ101 との相同性は見られないことを報告した (Kataoka *et al.*, 1994c)。一方、Servín-González らの研究により、*Streptomyces phaeochromogenes* 由来の伝達性プラスミド pJV1 が pSN22 と非常に近い DNA 塩基配列、遺伝子構造を持つことが明らかとなっている (Servín-González *et al.*, 1995)。これら 2 つのプラスミドの SSO は既にその位置がほぼわかっており、pIJ101 の SSO はプラスミドの不和合性に関与する遺伝子領域 (strong incompatibility; *sti*; Deng *et al.*, 1988; Zaman *et al.*, 1993a) と重なる 0.53 kbp の *SpeI*-*SacII* 断片に、pJV1 の SSO は pSN22 の *sso1* と同じく *spdA* と *traR* の間の非コード領域に重なる 0.66 kbp の *ScaI*-*NcoI* 断片に存在する (Servín-González *et al.*, 1995)。*sso1* と他の 2 つの放線菌 RC 型プラスミドの SSO の DNA 塩基配列を比較した結果、170 bp の非常に相同性の高い領域が見いだされた (図 1-4、pSN22 の nt 908-1080)。この 170 bp の領域における DNA 塩基配列の相同性は、*sso1* に対して pIJ101 で 75.7%、pJV1 で 77.2% であった。

RC 型プラスミドの SSO は複製中間体 ssDNA 上でステム・ループ構造をとり、その構造を宿主側の因子、RNA ポリメラーゼ等が認識してプライマーを合成すると考えられている (del Solar *et al.*, 1987; Dempsey *et al.*, 1995)。そこで pSN22 の *sso1*、pIJ101 の SSO、pJV1 の SSO について、それぞれこの 170 bp の保存された領域より予測される二次構造を調べた。しかし、*sso1* と pJV1 の SSO についてはこの保存された領域から予測される二次構造もよく似た形であったが、pIJ101 の SSO における保存された領域より予測された二次構造は他の 2 つの二次構造とは異なっており、共通のステム・ループ構造は見られなかった (図 3-4)。

pSN22	801	CGCCCGCTGCTGCCCCCGCGCCGGGCGTGACGCGGGAGACGCTCCCGCTGTT-CGGCGAC
pIJ101	7751	GCCCGC*G--GATAG**GTC*CGGTCGAG*T*CGCC*GTT-CCGCCG*CATC*TGCCAC*
pJV1	7156	AAGGTG*CGGCGCCT**GAA*GAACAGCC*C*GCGT*GGCAGGGGAT*GGGT*GTGGTGA*
pSN22	861	GACGACACGCAGCCCG--GCCCCCTCGATGGCCGCGCCGACACGGAGTGACCACGACGGCC
pIJ101	7695	ACGATCGG**A*CCG*ATGA**GGCCACGACGGAGC*GCACGGCTGACC*G*T***G***
pJV1	7217	GGCGGATC**CGGAC*CGTG**CCGGGACGGCC-CG*AGCGCTGGGATC*G*T***T***
pSN22	920	GTCACCCCATCGCGGCAGCAGCCCGCTCCCCATCGACCGAGACGGGCGGTGCGGTCGCCT
pIJ101	7636	GCCA**T*****C*****-GT*****AG*AA***AC*****GCTCAG*****
pJV1	7277	TTAG**A*****T*****-CT*****CT*AG***GA*****CGGTGC*****
pSN22	981	CACGCAGCCCAGCCCCG-CGACGGCGGGGGTACGGGGGGTCCGGCGACTCCTGGCCCGCCA
pIJ101	7578	*****G**T*AG*ACC*-*****C*CTC*GGGAGG**GACA*G*GCT**
pJV1	7337	*****-**C*GT*TTGG*T*****C*CCC*GCCCA**CCCG*G*CGC**
pSN22	1041	GACGGCCGCACAGAGCCGCCGACCCCCACCCCTCCCCGCCAGCCG-----TCGGCG-A
pIJ101	7520	*****CGT**G**GCGAGTC*****C**-TG*C-----CTG*CG----G
pJV1	7397	*****TTT**C***CGTGA-----**CGT*AGCCGCCTT*GCCCGCC
pSN22	1094	CGCGCACAACGACGATGCCCCGGCGCCGGGTGACGGCCCGCCATGTAAACCGCTCAGGGAT
pIJ101	7466	**A**ACAA**GC*AT**CCGCA*T*G*C*GAG*A*-GCGCC*C*T*AACC*CC*ACCGA*
pJV1	7455	**A**GGCC**CA*CC**GCACC*G*C*T*CCA*G*AGGATT*C*G*CCTT*GG*-GCCC*
pSN22	1155	GCCGCTC-GT-GGGCAG---CAGAAAGCCCCCGCCGGGTCTCGGACGGGGGCTCAATGGGG
pIJ101	7413	G***CC*CCGTC*TGTGCGCGGGCCGGT*GG**G*CG*GC-***AGC*****GAAGACA*G
pJV1	7514	C***TA*GGTCG*AGAGCGTGAAGAAGC*CC**C*AC*GCC***-CG*****GGCGTAT*T

図 1-4. pSN22 の *sso1* および pIJ101、pJV1 の SSO 領域における保存配列。GENETYX 遺伝子情報処理ソフトウェアを用いて、DNA 塩基配列を比較した。ヌクレオチドの位置を示す番号は、pSN22 は Kataoka らの (Kataoka *et al.*, 1994c)、pIJ101 (相補鎖) は Kendall と Cohen の (Kendall and Cohen., 1988)、pJV1 は Servín-González らの (Servín-González *et al.*, 1995) 報告による。3 つの DNA 塩基配列がすべて一致したヌクレオチドを *印で示した。pSN22 の nt 908-1080 までの約 170 bp は、他の二つの SSO の塩基配列でもよく保存されている。この 170 bp の保存配列内において予測される二次構造のステム部分を矢印で示した。矢印内の点線部分は、相補する塩基配列の無いものを表す。pSN22 と pJV1 のステム構造の位置は似ているが、pIJ101 はこれらと異なる構造が予測された。

考 察

pSN22 の RC 型複製において複製中間体 ssDNA の相補鎖合成、すなわちラギング鎖複製の開始点となる SSO は、プラスミドの接合伝達に関与する遺伝子 *spdA* および *traR* の間の非コード領域に重なって存在した。この SSO、*sso1* 領域内の 170 bp は同じ放線菌の RC 型プラスミド、pIJ101 および pJV1 の SSO と非常に高い相同性を示した。

pSN22 の SSO は以前、*BglII-SmaI*^b 断片に存在すると報告された (*ori2*, Kataoka *et al.*, 1994b)。しかし、本研究においてこの SSO 活性はプラスミドのラギング鎖側に存在し、従って複製中間体 ssDNA のラギング鎖複製には用いられないことが明らかになった。同じ報告ではさらに、*PstI-BglII* 断片を含むプラスミド pMT314 が SSO 活性を持たないことが述べられている (Kataoka *et al.*, 1994b)。この報告において SSO 活性を調べるために用いられたプラスミドは、pSN22 の *dso-rep* を含むプラスミド pESS507 を基に構築されている。彼らの結果と本研究の結果が異なる原因は、当時のプラスミドが全て失われているためはつきりとは分らないが、pESS507 の *dso-rep* 領域は恐らく報告とは逆向きに挿入されていたと考えられる。プラスミド pMT311 (*PstI-BamHI*^a)、pMT314、pMTE321 (*BglII-SmaI*^b を活性を持つ方向で含む)、pMTE322 (*BglII-SmaI*^b を活性を持たない方向で含む) らはそれぞれ、pESS507 あるいはそれを基にしたプラスミド pMTE3 に pSN22 の断片を組み込む形で作られており、野生型の pSN22 から DNA 断片を直接欠失させたものではない (Kataoka *et al.*, 1994b)。この仮説を間接的にはあるが支持する事実として、本研究でも用いられているプラスミド pRT1 の *dso-rep* の向きを間違えて認識していたということが挙げられる。つい最近まで pRT1 の *dso-rep* は図 1-1B に示した方向とは逆向きに挿入されていると考えられており、我々はそれを用いて *BglII-SmaI*^b 断片中の SSO 活性を、正しい pSN22 の SSO として解析していた。この *BglII-SmaI*^b 断片中の SSO 活性については、第二章で述べる。

Servín-González らは pSN22 と pJV1 が DNA 塩基配列、遺伝子の構造が非常に近いことを指

摘しており (Servín-González *et al.*, 1995)、本研究で明らかになった *sso1* の位置も pJV1 の SSO の位置と同じ、*spdA* と *traR* の間の非コード領域に重なっている。この 170 bp の相同性の高い領域の外側、*spdA* 側 250 bp および *traR* 側 250 bp について相同性を調べたところ、*traR* 側は約 67% だったのに対し、*spdA* 側は約 52% と低い値を示した。pJV1 の *spdA* は pSN22 の *spdA* との相同性が低く、遺伝子破壊による接合伝達あるいは *pock* の大きさへの影響が見られないため、機能していない ORF と考えられている (Servín-González *et al.*, 1995)。その *spdA* 領域に隣接する SSO の 170 bp の領域が 2 つのプラスミドにおいて保存されているということは、この 170 bp の DNA 塩基配列が SSO の活性に重要な役割を持つ可能性を示唆している。

一方、pSN22 と pIJ101 の接合伝達関連遺伝子群が存在する領域には、DNA 塩基配列、遺伝子構造に相同性はほとんど見られない (Kataoka *et al.*, 1994c)。pIJ101 の SSO が存在する位置は、その接合伝達に関与する遺伝子の一つ *kilB* (Kendall and Cohen, 1987) の転写を不に調節する遺伝子、*korB* (*kil*-override; Kendall and Cohen, 1987; Zaman *et al.*, 1992; Tai and Cohen, 1994) の上流の非コード領域である (Deng *et al.*, 1988; Zaman *et al.*, 1993a)。従って *sso1* と pIJ101 の SSO は、*traR* と *korB* というどちらもリプレッサータンパク質をコードする遺伝子の近傍に在るとはいえるものの、一方はその下流、他方はその上流に位置し、それぞれ異なる起源を持つ SSO であると考えられる。従って、その 2 つの SSO 領域において保存されている 170 bp の領域は、やはり SSO の活性に重要な役割を持つと考えられる。

SSO は、複製中間体の ssDNA の状態においてステム・ループ構造を形成し、その二次構造をシグナルとして、RNA ポリメラーゼ等の宿主側の持つ因子がこれを認識してプライマー合成を行うという、RC 型複製のラギング鎖複製開始点として機能すると考えられている (Gruss and Erlich, 1989)。E. coli の RC 型 ssDNA フェージ、M13 や ϕ X174 の SSO (M13 では minus ori、 ϕ X174 では primosome assembly site; *pas* と呼ばれる) では、複製中間体 ssDNA に single stranded DNA binding protein (SSB) が結合し、ss 部分をコートすることによって、ds である SSO の二次構造が現れ、プライマーを合成する因子に認識される (Kornberg and Baker, 1992)。従って *sso1* や他の 2 つの SSO で保存された 170 bp の領域についても、共通のステム・

ループ構造を取ることが期待された。Zaman らは pIJ101 の SSO 領域内に、いくつかの *Staphylococcus* や *Streptococcus* 由来の RC 型プラスミドの SSO に共通に見られる 6 ヌクレオチドから成る保存配列を持つ、ステム・ループ構造が存在することを指摘した (Zaman *et al.*, 1993a)。しかしこのステム・ループ構造を作る領域は 170 bp の保存された領域外に存在し (pIJ101 の nt 7310-7385)、この部分に相当する pJV1 および pSN22 の DNA 塩基配列にはそのようなステム・ループ構造および 6 ヌクレオチドの保存配列は見られず、*sso1* の活性に必要な領域はこの部分を欠いている (pRTS050N)。3 つの SSO で保存されている 170 bp の領域の二次構造の予測を行った結果、*sso1* と pJV1 の SSO の 170 bp の領域は類似した二次構造が見られたものの、pIJ101 の SSO の同領域から予測された二次構造は、他の 2 つと共通のステム・ループ構造が見られなかった。ただし、コンピューターによる二次構造予測は選択した DNA 塩基配列の領域によって大きく変わることがあるので、SSO の最小領域についての知見が増えれば共通の二次構造が発見できる可能性がある。

第二章

pSN22 のラギング鎖に存在する

single strand origin 配列 *sso2* および *sso3* の同定

第二章

pSN22 のラギング鎖に存在する single strand origin 配列 *sso2* と *sso3* の同定

第一章に示したように、pSN22 の約 550 bp の *Bgl*II-*Sma*I 断片は、pSN22 上とは逆向きに挿入されたときにのみ、ローリングサークル (RC) 型複製における複製中間体一本鎖 DNA のラギング鎖複製の開始点 (single strand origin; SSO) としての活性を示す。この断片上には 2 つの SSO が存在した。*sso2* の位置は、プラスミドの接合伝達の関与する *tra* 遺伝子のプロモーター・オペレーター領域である transfer gene regulating element (TRE) と重複していた。もう一方の SSO、*sso3* は、*tra* オペロンの転写開始点下流の非コード領域に位置していた。二次構造の予測より、これらの SSO はそのステム・ループ上に、*Staphylococcus* 等の RC 型プラスミドの SSO における 6 塩基の保存配列に類似した配列を持つことが明らかになった。*sso2* は既知のグラム陽性菌由来 RC 型プラスミドの SSO に比べて非常に小さい、52 bp の断片に限定されることを示した。

緒 言

ローリングサークル型複製において複製中間体として産出される環状一本鎖 (single-stranded; ss) DNA プラスミド分子では、single strand origin (SSO) と呼ばれる複製開始点が二次構造を作ることによってプライマー合成を行う因子に認識され、セカンド鎖の合成 (ラギング鎖複製) が開始される。RC 型プラスミドに限らず、プラスミドの両鎖にこのような SSO が存在する例はいくつか知られている。*Escherichia coli* の伝達性プラスミド RSF1010 では、複製開始点の両鎖に single-stranded DNA initiation signal (*ssi*) と呼ばれる SSO が存在する

(Honda *et al.*, 1988)。複製開始点で二本鎖 (double-stranded; ds) DNA が開裂した後、開始点近傍の両鎖に存在する *ssi* がそれぞれ二次構造を形成し、複製が開始される。従ってこの RSF1010 の複製様式は、RC 型でなく θ 型 (序章 図 0-1 参照) である。また、*Staphylococcus* 由来の RC 型プラスミド pLS1 には 5 個の SSO の保存配列が存在するが、そのうち 2 個は RC 型複製の中間体 ssDNA とは逆の鎖に存在する (del Solar *et al.*, 1987)。但し、pLS1 ではこの逆鎖上の SSO 保存配列の機能は明らかにはなっていない。

第一章で述べたように、pSN22 の *Bgl*II-*Sma*I^b 断片 (Kataoka *et al.*, 1994b) は、複製必須領域に対し pSN22 上とは逆向きに挿入されないと SSO 活性を持たない。従って、この断片上の SSO は pSN22 の RC 型複製には恐らく利用されない。しかし、*Bgl*II-*Sma*I^b 断片を活性を持つ方向に挿入した場合、細胞内の複製中間体 ssDNA の蓄積が全く見られない (第一章 図 1-2 参照) ことから、同断片には *sso1* と同等の SSO 活性が維持されていると考えられる。放線菌 RC 型プラスミドの SSO については、pSN22 の *sso1* および pIJ101 (Deng *et al.*, 1988; Zaman *et al.*, 1993a)、pJV1 (Servín-González *et al.*, 1995) の合計 3 つの SSO の領域が限定されているだけである。そこで本章では放線菌細胞内で機能する RC 型プラスミドの SSO についての情報をさらに得るために、この *sso1* と同等の活性を持つ *Bgl*II-*Sma*I^b 断片の SSO についても領域限定を行い、放線菌および他のグラム陽性菌由来の RC 型プラスミドの SSO の DNA 塩基配列および予測される二次構造との比較を試みた。

材料および方法

使用菌株、プラスミドおよび培地

第一章の同項目と同様の菌株、プラスミドを用いた。

組み換え DNA 操作

第一章の同項目と同様に行った。

プラスミドの構築

プラスミド pSSO シリーズ。 pSSO シリーズプラスミドは第一章と同様に、SSO の領域限定に用いる pSN22 断片 (SSO 断片) を pBluescriptII SK+のマルチクローニングサイトに組み込むことにより構築した。

プラスミド pSSO210 (*Bgl*II-*Bcl*I^a)、pSSO220 (*Bcl*I^a-*Sma*I^b)、pSSO250 (*Bcl*I^a-*Nsp*Va)、pSSO260 (*Nsp*Va-*Sma*I^b) に組み込まれた SSO 断片は、それぞれ適当な制限酵素で pSN22 より切り出し、pBluescriptII SK+にクローニングした。プラスミド pSSO230、240、270、280、290、300、310、410、420、430、440 に組み込んだ SSO 断片は、pSSO030 を鋳型とし、表 2-1 に示した適当な組み合わせの合成オリゴヌクレオチドプライマーと Ex *Taq* DNA polymerase (宝酒造) を用いた PCR 法 (Saiki *et al.*, 1988) により作製した。各 PCR 産物は断片の末端に付加された適当な制限酵素によって処理した後、pBluescriptII SK+に組み込んだ。組み込まれた pSN22 断片の pBluescriptII SK+上での方向は、全て pBluescriptII SK+のマルチクローニングサイトの *Pst*I 部位から *Xba*I 部位への向きに合うように組み込まれている (第一章 図 1-1B のプラスミド pSSO030 と同様)。

表 2-1. オリゴヌクレオチドプライマーの塩基配列。

Name	Nucleotide sequence ^a	Position ^b	Clone
M4	5'-GTTT CCCAG TCACG AC-3'		pSSO230/240
RV	5'-CAGGA AACAG CTATG AC-3'		pSSO260/430/440
1995	5'-GGGCT GCAGC GCGGT ACTTA ACG-3'	1995-2009	pSSO280
2008	5'-GGGGG ATCCC GAAGG TACAT CAATG ACC-3'	2008-2026	pSSO300
2023	5'-AAAGG ATCCG ACCCC CCCAA GGTAC ATCCT-3'	2023-2043	pSSO290
2050	5'-CCCGG ATCCG AATCG GTGCT TGATG TACCT-3'	2050-2070	pSSO270/410/420
2081	5'-GGGGG ATCCG GCAAG GTACG TTAAG TACCT-3'	2081-2101	pSSO430
2111	5'-GGGGG ATCCT GATGC GTACC TTCGG CAAGA-3'	2111-2131	pSSO440
2059R	5'-GGGTC TAGAG CACCG ATTCG AAGCA AGGAT-3'	2039-2059	pSSO300
2074R	5'-CCCTC TAGAA CGAAG GTACA TCAAG-3'	2059-2074	pSSO290/310
2089R	5'-CCCTC TAGAT ACCTT GCCGA CGCCA CG-3'	2072-2089	pSSO240/270
2095R	5'-CTCGA GTTAA CGTAC CTTCG CGACG CCAC-3'	2073-2095	pSSO280
2105R	5'-CTCGA GCGGG AGGTA CTTAA CG-3'	2090-2105	pSSO230
2110R	5'-CGCTC TAGAG TCAGC GGGAG GTACT TAACG-3'	2090-2110	pSSO420
2140R	5'-CGCTC TAGAC AGACC CTCTC TTGCC GAAGG-3'	2120-2140	pSSO410
TRE1-3	5'-CCCGG ATCCC GAAGG TACAT CAATG ACCCC- CCCGC TTCGA ATCGG TGCTT GATGT ACCTT-3'	2008-2071 ^c	pSSO310
TRE1-3R	5'-CCCTC TAGAA CGAAG GTACA TCAAG CACCG-3'	2054-2074	pSSO310

^a 下線を施した配列は、クローニングのために付け加えた制限酵素認識部位。

^b pSN22 の *Pst*I 部位からのヌクレオチドの位置 (Kataoka *et al.*, 1994c)。

^c オリゴヌクレオチド TRE1-3 は TRE box 2 (nt 2032-2043) の配列が除去されている。

プラスミド pRTS シリーズ。 *E. coli*-*S. lividans* シャトルプラスミド pRTS シリーズの構築は第一章に示したのと同様に、プラスミド pRT1 の *dso-rep* および *tsr* を含む断片をプラスミド pSSO シリーズに組み込むことにより行った。*dso-rep* 領域を組み込む際に、元の pSSO シリーズに組み込まれていた pSN22 断片 (SSO 断片) と *dso-rep* の向きが pSN22 上と同じであるものを、pRTSxxxN (xxx はプラスミドの番号、例 ; pRTS210N、“N” は “natural” を意味する) と名付けた。一方、*dso-rep* と SSO 断片の向きが pSN22 上とは反対のものを、pRTSxxxO (例 ; pRTS210O、“O” は “opposite” を意味する) と名付けた。

pRTSxxxN シリーズの構築は第一章と同様に、プラスミド pRT1 (第一章を参照) の *tsr-dso-rep* を含む 3.7 kbp の *HindIII-EcoRI* 断片を切り出し、pSSO シリーズを *HindIII* および *EcoRI* で切断したところに組み込んで構築した。従って、構築されたプラスミドの *dso-rep* と SSO 断片の向きは、pSN22 上と同じになっている。

pRTSxxxO シリーズの構築は第一章と同様に、プラスミド pSSO シリーズを *EcoRI* および *PstI* で切断し、pRT1 の *tsr-dso-rep* を含む 3.7 kbp の *EcoRI-PstI* 断片を組み込んで構築した。従って、構築されたプラスミドの *dso-rep* と SSO 断片の向きは、pSN22 上とは反対になっている。

プラスミド pRT19-290N および pRT19-290O。 プラスミド pSSO290 の *sso2* を含む 52 bp の *BamHI-XbaI* 断片を、pUC19 に異なる方向に組み込んだ。pSN22 の *dso-rep* を含む 2.9 kbp の *BalI^f-BamHI^b* 断片を、構築したそれぞれのプラスミドの *SmaI* および *BamHI* 部位の間に挿入した。プラスミド pRT1 の *tsr* を含む 1.6 kbp の *BamHI-PstI* 断片を、T4 DNA ポリメラーゼを用いて平滑化した後 *EcoRI* リンカーをつなぎ、構築したそれぞれのプラスミドの *EcoRI* 部位に組み込んで、*E. coli-S. lividans* シャトルプラスミド pRT19-290N および pRT19-290O を得た (図 2-4A)。

ssDNA の検出

第一章の同項目と同様にして行った。

DNA 塩基配列の解析

第一章と同様に、SSO 領域の DNA 塩基配列の他の放線菌プラスミドの SSO 領域との比較、および SSO 領域の核酸二次構造の予測には、PC9801 コンピューター (NEC、東京) および GENETYX 遺伝情報処理ソフトウェア (ソフトウェア開発、東京) を用いた。

結 果

pSN22 のラギング鎖上には 2 つの single strand origin 配列が存在する

第一章で示したように、pSN22 の *Bgl*II-*Sma*I^b 断片の持つ SSO 活性は、*dso-rep* に対して pSN22 上とは逆向きに挿入した場合に活性を持つ。この断片上の SSO 活性の位置をさらに詳細に限定するため、この断片の幾つかの部分に pBluescriptII SK+ にクローニングし、プラスミド pRT1 の *tsr-dso-rep* 断片をそれぞれ異なる方向で組み込んで、*E. coli*-*S. lividans* シェトルプラスミド pRTS シリーズを構築した。各プラスミドは *S. lividans* のプロトプラストに導入し、形質転換体を 50 µg/ml のチオストレプトンを含む R2YE 平板培地上で選択した。得られた形質転換体を 5 µg/ml のチオストレプトンを含む YEME 液体培地で 30°C で振とう培養し、対数増殖終期の菌体を集めた。全 DNA を調製した後、1.6 µg の DNA を 1% アガロースゲル電気泳動で分画し、アルカリ変性を行わないでナイロン膜にブロッティングすることにより、菌体内の ssDNA のみをナイロン膜上に固定した。なお、各全 DNA 溶液中の染色体 DNA 量および ds のプラスミド分子の量については、電気泳動後のアガロースゲルの臭化エチジウム染色によって、ほぼ等しいことを確認した（データ不掲載）。それぞれの形質転換体の ssDNA の蓄積をサザンハイブリダイゼーション法によって確認し、結果を図 2-1A に示した。

*Bcl*I^a 部位からヌクレオチド (nt ; pSN22 の *Pst*I 認識部位から時計回りの方向でのヌクレオチドの番号) 2089 までを *dso-rep* に対し反対方向に含むプラスミド pRTS2400 の形質転換体は、複製中間体 ssDNA の蓄積を示さなかった。しかし、*Bcl*I^a-*Nsp*V^a 断片を含むプラスミド pRTS2500 を含む菌体の全 DNA 中には複製中間体 ssDNA の蓄積が観察され、SSO 活性を示さなかった。一方、*Nsp*V^a-*Sma*I^b 断片を含む pRTS2600 は SSO 活性を示したことから、プラスミド pRTS2400 と pRTS2600 に重複する *Nsp*V^a-nt 2089 領域内に SSO 活性が存在すると考えられた。

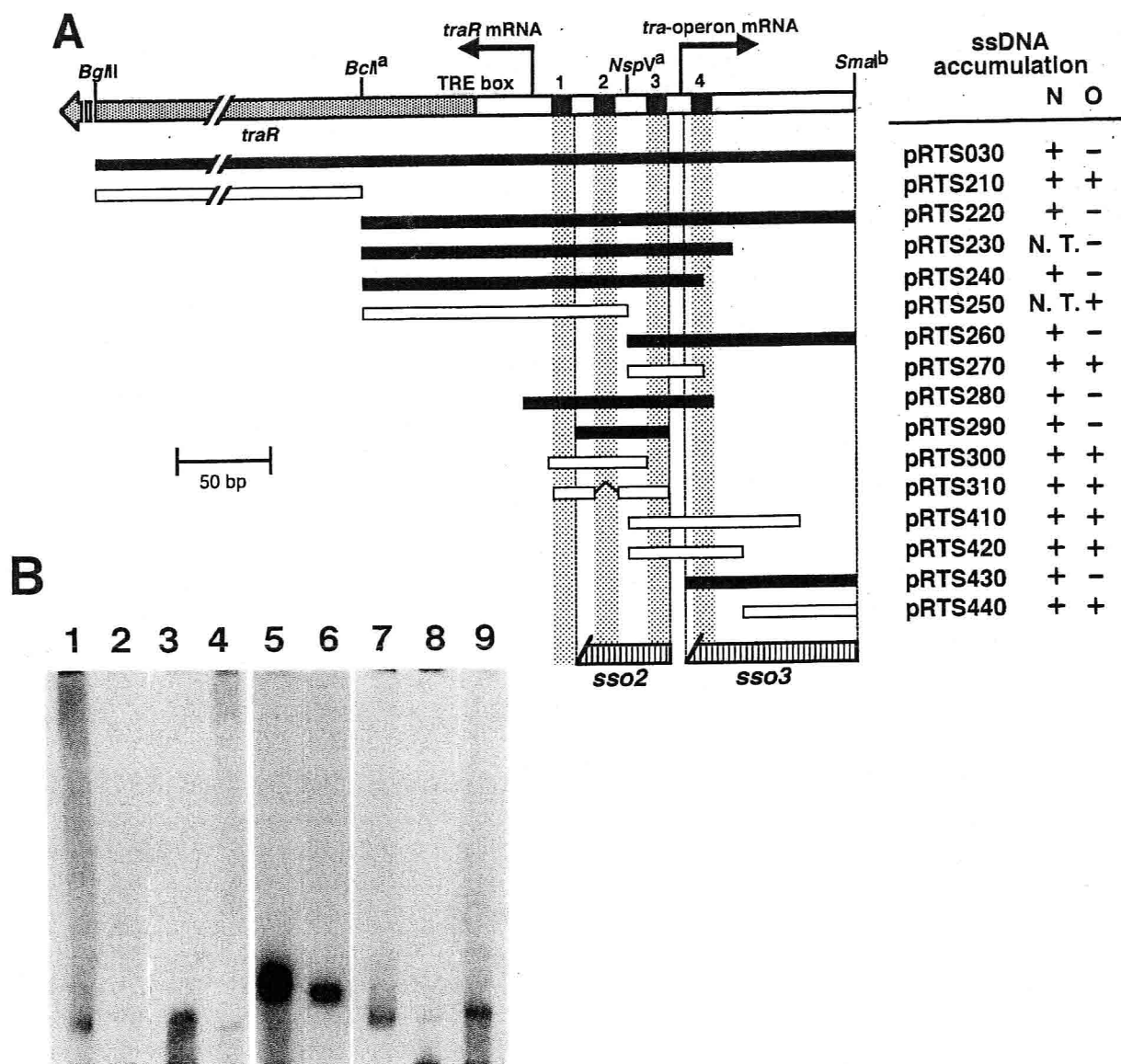


図 2-1. (A) *sso2* および *sso3* の領域の限定。最も上に示したバーは、pSN22 の 550 bp の *Bgl*II-*Sma*I^b 領域およびその内部に含まれる 4 つの TRE box (黒く塗りつぶした部分) を表す。それぞれのプラスミドの *S. lividans* 細胞内における ssDNA 複製中間体の蓄積の有無を、右側に示した。+ : ssDNA を蓄積、- : ssDNA を蓄積しない、N. T. : 調査せず。図中の黒いバーは逆向き (O) に組み込んだときに SSO 活性を持つ断片を、白抜きのバーは SSO 活性を持たない断片を表す。図の最も下に示した矢印は、限定された *sso2* および *sso3* の領域を表す。

(B) 各 SSO 断片を含むプラスミドの *S. lividans* 細胞内における ssDNA 複製中間体の蓄積。ssDNA プラスミド分子を、サザンハイブリダイゼーション法によって検出した。レーン 1、pRTS280N ; 2、pRTS280O ; 3、pRTS290N ; 4、pRTS290O ; 5、pRTS300O ; 6、pRTS310O ; 7、pRTS410O ; 8、pRTS430O ; 9、pRTS440O。

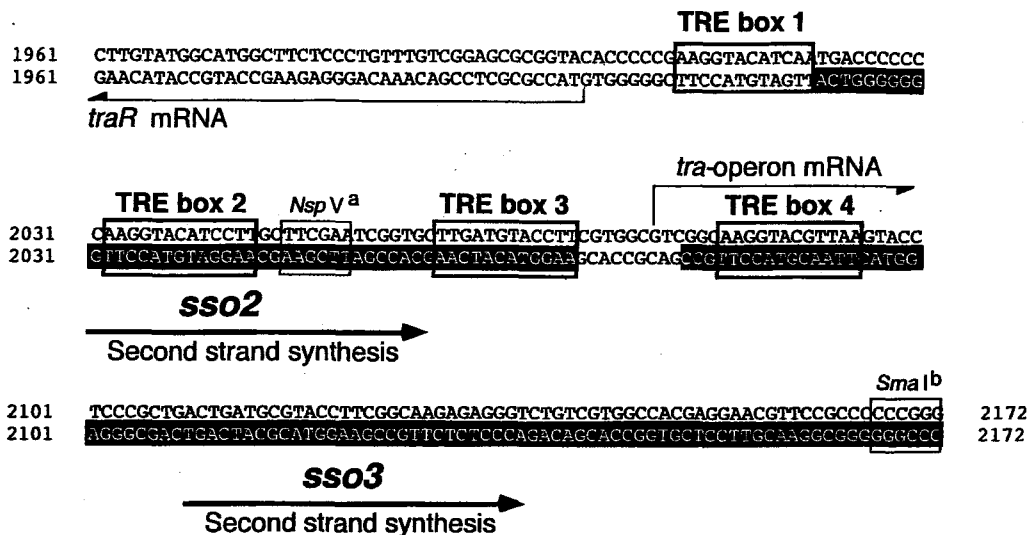


図 2-2. Transfer gene regulating element (TRE) の構造 (Kataoka *et al.*, 1994a より改変)。12 塩基対からなる TRE box の保存配列 (5'-AAGGTACATCAA-3') を囲んで示した。 *traR* および *tra* オペロンの、転写開始点からの転写の方向を矢印で示した。 pSN22 のラギング鎖側に存在する *ss2* および *ss3* の領域を、白抜きの塩基配列で示した。その下の矢印は、セカンド鎖合成の方向を示す。

しかし、この *NspV^a*-nt 2089 断片を持つプラスミド pRTS2700 の形質転換体は、複製中間体 ssDNA の蓄積を示した。以上の結果から、この transfer gene regulating element (TRE; Kataoka *et al.*, 1994a) と呼ばれる接合伝達関連遺伝子のプロモーター・オペレーター領域と重複する部分に、*BclI^a*-nt 2089 側と *NspV^a*-*SmaI^b* 側の 2 つの SSO が存在することが示唆された。すなわち、pSN22 の RC 型複製では複製中間体 ssDNA となるリーディング鎖側とは反対のラギング鎖上に、SSO 活性を示す領域が 2 ヶ所も存在していることになる。

この領域に存在する第一の SSO、*ss2* は、プラスミド pRTS2900 に含まれる 52 bp の nt 2023-2074 断片に限定された (図 2-1A および 2-1B、レーン 4)。この断片は、TRE box と呼ばれる AAGGTACATCAA の 12 塩基から成るくり返し配列 (Kataoka *et al.*, 1994a) の内、TRE box 2 と TRE box 3 の 2 つを含んでいる (図 2-2)。TRE は *traA*-*traB*-*spdB* オペロン (*tra* オペロン) および *traR* の両方向へのプロモーター活性を持ち、TRE box はこの TRE 領域内に存在して、TraR タンパク質と結合して *tra* オペロンおよび *traR* の転写を負に調節する機能を持つと考えられている (Kataoka *et al.*, 1994a)。

一方、この領域に存在する第二の SSO、*sso3* は、プラスミド pRTS4300 に含まれる 90 bp の nt 2081-2170 断片に限定された (図 2-1A および 2-1B、レーン 8)。すなわちこの断片は、*tra* オペロンの転写開始点 (Kataoka *et al.*, 1994a) よりも下流に位置していた (図 2-2)。

sso2 および *sso3* はステム・ループ構造上に 6 塩基の保存配列を持つ

これら 2 つのラギング鎖上に存在する SSO と、既に明らかになった *sso1* および放線菌 RC 型プラスミド pIJ101、pJV1 の SSO 領域との DNA 塩基配列の比較を行ったが、有為な相同性はまったく見られなかった。また、第一章でも述べたように pSN22 と pJV1 の DNA 塩基配列および遺伝子の構造は非常に近いが、Servín-González らは pSN22 の *Bgl*II-*Sma*I^b に相当する pJV1 上の断片には、*dso-rep* に対してどちらの方向に挿入しても SSO 活性は見られなかったと述べている (Servín-González *et al.*, 1995)。

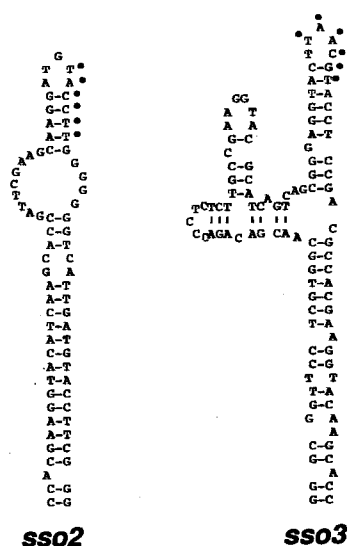


図 2-3. *sso2* および *sso3* の DNA 塩基配列より予測されるステム・ループ構造。二次構造の予測は、GENETYX 遺伝情報解析ソフトウェアを用いて行った。核酸のステム・ループ構造の安定性を示す、Tinoco らのパラメーター (Tinoco *et al.*, 1973) を用いた最小自由エネルギー (ΔG) は、*sso2* (nt 2004-2079) で $-49 \text{ kcal mol}^{-1}$ 、*sso3* (nt 2051-2170) で $-57 \text{ kcal mol}^{-1}$ であった。ループ付近の傍点は、*Staphylococcus* および *Streptococcus* のいくつかの SSO で保存されている保存配列 TAGCGT に類似した配列を示す。

sso2 および *sso3* の DNA 塩基配列より予測される二次構造を調べたところ、興味深いことに、これらのステム・ループ上に 6 塩基から成る保存配列が存在することが分かった (図 2-3)。この 6 塩基の配列 (コンセンサス配列は TAGCGT) は *Staphylococcus* や *Streptococcus* 由来の RC 型プラスミドの幾つかの SSO でよく保存されており (del Solar *et al.*, 1987)、この部分に変異を導入すると SSO の活性が失われることが知られている (Kramer *et al.*, 1995)。*sso2* では、この配列は TRE box 2 の内部に存在する。この TRE box 2 (nt 2032-2043) を欠失する形で作成した DNA 断片を合成オリゴヌクレオチドを用いて作成し、*E. coli-S-lividans* シャトルプラスミド pRT310N および pRTS310O を構築した。このプラスミドを持つ形質転換体はどちらも複製中間体 ssDNA を蓄積し (図 2-1A、および 2-1B、レーン 6)、TRE box 2 に含まれる DNA 塩基配列が SSO 活性に必要であることを示した。また、*sso3* ではこの 6 塩基の保存配列は nt 2089-2094 に存在し、この領域を欠くプラスミド pRTS440O は SSO 活性を示さなかった (図 2-1A および 2-1B、レーン 9)。なお、この 6 塩基の保存配列は、第一章で述べた *sso1* および pIJ101、pJV1 の SSO において保存されている 170 bp の DNA 塩基配列内には見られなかった。

sso2 領域は既知のグラム陽性菌由来ローリングサークル型プラスミドの single strand origin より非常に短い

sso2 の最小領域は 52 bp の DNA 断片に限定されたが、これは既知のグラム陽性菌由来 RC 型プラスミドの SSO のサイズ、130 bp から 220 bp (Gruss and Ehrlich, 1989) に比べて非常に小さい。ただし、この SSO 活性が pRTS290O の持つ断片だけでなく、pBluescriptII SK+ のマルチクローニングサイト (MCS) の挿入断片近傍の DNA 塩基配列の影響によって得られている可能性も否定できない。そこで、pRTS290 の 52 bp の *sso2* 断片を、pBluescriptII SK+ とは MCS の DNA 塩基配列の異なる pUC19 に、異なる方向に組み込んだ。pSN22 の *dso-rep* と *tsr* 遺伝子を構築したプラスミドにそれぞれ組み込み、*E. coli-S. lividans* シャトルプラスミド pRT19-290N および pRT19-290O を得た (図 2-4A)。各プラスミドの形質転換体における複製中間体

ssDNA の蓄積を調べたところ、52 bp の断片はこのプラスミド上でも *dso-rep* とは逆方向に組み込まれた場合に SSO 活性を示した (pRT19-2900 ; 図 2-4B、レーン 2)。

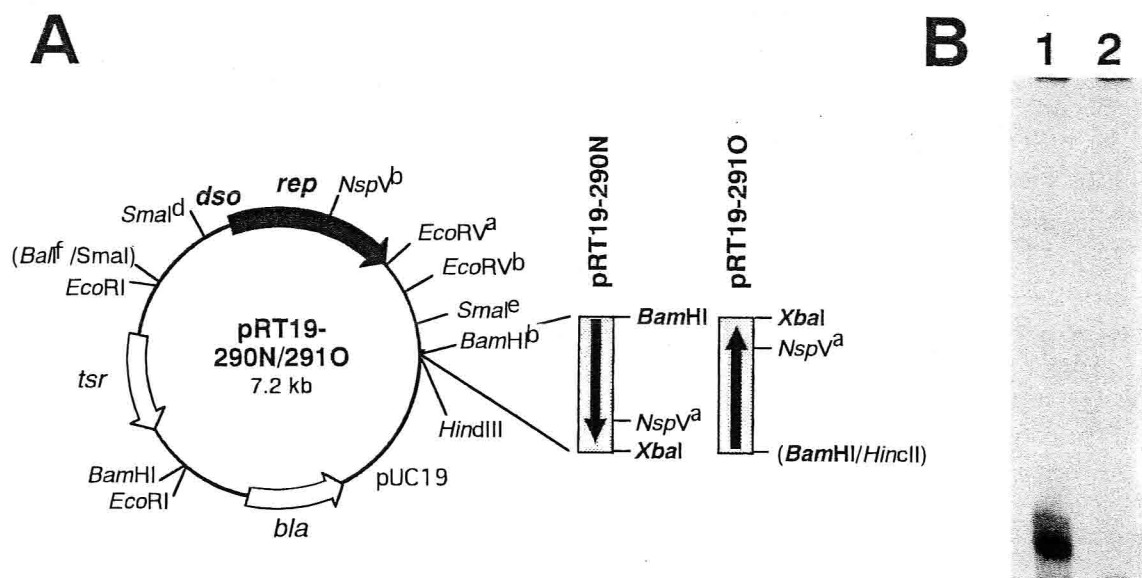


図 2-4. (A) *E. coli*-*S. lividans* シャトルプラスミド pRT19-290N および pRT19-291O の構造。pRTS2900 に含まれる 52 bp の *sso2* の最小領域を、pBluescriptII SK+ とマルチクローニングサイトの DNA 塩基配列が異なる pUC19 に組み込んで、SSO 活性を再確認した。ORF は太い矢印で、組み込んだ *sso2* 断片の pSN22 上での向きは細い矢印で示した。

(B) 両プラスミドの *S. lividans* 細胞内における ssDNA 複製中間体の蓄積。ssDNA プラスミド分子を、サザンハイブリダイゼーション法によって検出した。レーン 1、pRT19-290N ; 2、pRT19-2900。

考 察

放線菌プラスミド pSN22 上には 3 つの SSO が存在した。前章で述べた *sso1* は、プラスミドの RC 型複製における複製中間体 ssDNA のラギング鎖複製に用いられる、リーディング鎖上に存在する SSO であった。一方、*sso2* および *sso3* はラギング鎖上に存在し、pSN22 の *dso-rep* とはプラスミド上に存在する向きとは逆に挿入されない限り、プラスミドの RC 複製では活性を持たない。

このようなラギング鎖に存在する SSO の機能は何であろうか。ラギング鎖を鋳型とする RC 型複製におけるリーディング鎖の合成は、Rep タンパク質によって *dso* のニッキング部位に生じる 3'-OH 末端をプライマーとして開始されるため、リーディング鎖複製のためには SSO は必要でない。もちろんプラスミドのリーディング鎖複製の途中で挿入塩基のミスマッチなど何らかの事故のために複製が停止した場合、SSO から複製が再開される、という機構が考えられる。*E. coli* 染色体 DNA 上には ϕ X174 の *pas* 部位と同じ DNA 塩基配列が多数存在し、*oriC* からの複製が中断された場合に、この機構を利用していると考えられている (Kornberg and Baker, 1992)。しかしこの機構は染色体 DNA のような長大な、しかも一回の細胞周期に一度の厳密に制御された複製をするレプリコンでは安全装置として有用であるが、10 kbp 前後の大きさの、一つの細胞内に複数のコピー数が存在するプラスミドの複製に必要であるとは考えにくい。サイズが小さければ、複製が停止するような事故の可能性も低くなり、また、一細胞内に複数個存在すれば、一分子の複製に事故が起きても他のプラスミドの複製によって補うことができる。また第 3 章で述べるように、実は *S. lividans* は SSO 非依存的に ssDNA の相補鎖合成を行うことができるため、前述のような事故の際でも SSO 非存在下で複製を完了することが可能である。

第二の可能性としては、プラスミドの接合伝達時にこの SSO 活性が利用されていることが考えられる。*E. coli* のプラスミドの接合伝達や *Agrobacterium tumefaciens* の Ti プラスミドの T-DNA の植物細胞への移行は、ssDNA の状態で行われることが知られている (Wilkins and Lanka, 1993; Yusibov *et al.*, 1994)。従って、放線菌プラスミドの接合伝達においてもプラスミ

ドの ssDNA が移行している可能性が考えられる。ssDNA が移行した後、宿主細胞内で複製する際にこの SSO が機能すれば、速やかに dsDNA へ変換されることができる。接合伝達において ssDNA を産生するためのニッキング部位 (*oriT*) は、一般的に *dso* とは異なる部位であると考えられている。Servín-González らは最近 pSN22 とよく似たプラスミド pJV1 について、*oriT* の機能を持つと考えられる部位が *traB* と *spdB* の間の非コード領域に存在することを報告している (Servín-González, 1996)。*oriT* から生じる ssDNA がどちらの鎖かは今のところ明らかになっていないが、*dso* からの RC 複製とは逆にラギング鎖側が利用されることも有り得る。ただし Servín-González らは、pSN22 では *sso2* および *sso3* が存在する TRE 領域内では、pJV1 はどちらの鎖にも SSO 活性を持たないと述べている (Servín-González *et al.*, 1995)。pJV1 の接合伝達にラギング鎖側の SSO が不要でないならば、pSN22 の *sso2* および *sso3* は接合伝達には関係無いということも考えられる。

SSO が RC 型複製のラギング鎖に存在する理由の最も可能性の高い仮説として、SSO 活性を持つ DNA 断片が他のプラスミドと組み換えを起こして pSN22 を生み出したときに、その SSO が活性を持たない方向で組み込まれてしまった、ということが考えられる。片岡らや Servín-González らが述べているように、pSN22 は複製必須領域と接合伝達領域の二つの起源の異なる領域から成り立っていると考えられる (Kataoka *et al.*, 1994c; Servín-González *et al.*, 1995)。pSN22 の *rep* 遺伝子は pIJ101 と相溶性が高く、一方接合伝達領域は pJV1 と相溶性が高い。従って、pIJ101 型の複製必須領域と pJV1 型の接合伝達領域が結合したときに、それまで活性を持っていた *sso2* および *sso3* は逆方向で組み込まれてしまい、その後 pSN22 では活性が残っているが、pJV1 ではさらに塩基置換が進んで活性が失われてしまったということが推測される。しかし、この場合もなぜ pSN22 の *sso2* および *sso3* の活性がプラスミドの複製に不要になった現在も残っているのか、という疑問は残る。*sso2* および *sso3* の機能についてはさらに詳細な解析が必要である。

*Bgl*II-*Sma*I^b 断片には 2 つの SSO が存在することが明らかとなった。この 2 つの SSO は予測されるステム・ループ構造に見られる 6 塩基の保存配列以外では、DNA 塩基配列は全く異なる。

この6塩基の保存配列は *Staphylococcus* や *Streptococcus* 由来の RC プラスミドの SSO に見られ (del Solar *et al.*, 1987; Kramer *et al.*, 1995)、*sso2* および *sso3* でもこの6塩基を含む領域を欠失すると SSO 活性を示さなくなることから、この6塩基は活性に重要な機能を持つと考えられる。しかしこの6塩基の保存配列だけが SSO 活性に必要なのではなく、恐らく SSO 領域の形成する二次構造も重要な機能を持つと考えられる。6塩基の保存配列を含んでいる pRTS3000 や pRTS4100、pRTS4200 は SSO 活性を示さないが (図 2-1)、これらの予測される二次構造は SSO 活性を持つ pRTS2900 や pRTS4300 の二次構造とは異なる (データ不掲載)。この6塩基の保存配列と二次構造の両方が SSO 活性に必要であるという仮説によって、プラスミド pJV1 の *sso2* および *sso3* に相当する領域に SSO 活性が無い理由が説明できる。pJV1 の *sso2* に相当する領域の TRE box 2 (Servín-González *et al.*, 1995) には pSN22 の *sso2* と同じ6塩基の保存配列が存在するが、この領域の DNA 塩基配列から予測された二次構造は pSN22 の *sso2* とは異なり、この6塩基はループ上には現れない (データ不掲載)。一方 *sso3* に相当する領域には6塩基の保存配列が見られない (データ不掲載)。

前述のように、このラギング鎖上に存在する2つの SSO の役割については確定的な結論は得られていないが、これらの SSO は非常にサイズが小さいので、ベクターに組み込むことを考えた場合には有利である。実際に、竜田によって作成された pSN22 由来の放線菌温度調節型発現ベクター pSNT107 に、この *sso2* 領域が組み込まれた (竜田, 1996)。これについては終章で述べる。

第三章

pSN22 のローリングサークル型複製における ニッキング部位

第三章

pSN22 のローリングサークル型複製におけるニッキング部位

pSN22 のローリングサークル (RC) 型複製におけるニッキング部位を、他の放線菌 RC 型プラスミドの DNA 塩基配列との比較により推定した。複製開始点である double strand origin の DNA 塩基配列を、放線菌 RC 型プラスミド pIJ101 および pJV1 と比較した結果、pSN22 は予測されたニッキング部位下流より、pIJ101 と非常によく似た DNA 塩基配列を示すことが明らかとなった。予測されたニッキング部位に点突然変異を導入したところ、プラスミドの形質転換能が激減し、ニッキング部位の塩基配列が Rep タンパク質によって厳密に認識されていることが示唆された。

緒 言

Streptomyces 属の遺伝子操作系における有用なプラスミドベクター開発を目的として、多くの *Streptomyces* 属由来の小型環状プラスミドについて複製機構の解析が行われている。現在のところこれらのすべての小型環状プラスミドはローリングサークル (rolling circle; RC) 型複製を行うことが知られている (Deng *et al.*, 1988; Pigac *et al.*, 1988; Hagège *et al.*, 1993; Servín-González, 1993; Kataoka *et al.*, 1994b; Muth *et al.*, 1995; Yokoyama *et al.*, 1996)。RC 型複製は double strand origin (DSO; del Solar *et al.*, 1993) と呼ばれる複製開始部位の特定の鎖に、プラスミド上にコードされる Rep タンパク質がニックを入れることによって開始される。このニックより一方の鎖がほどけて、複製中間体である一本鎖 (single-stranded; ss) DNA プラスミドが形成される。

Streptomyces 属由来の RC 型プラスミドにおける DSO のニッキング部位の位置は、Servín-González によって *Streptomyces lividans* のプラスミド pIJ101 と *Streptomyces phaeochromogenes* のプラスミド pJV1 の組み換え体を用いて決定された (Servín-González, 1993)。pIJ101 の DSO および *rep* 遺伝子と pJV1 の DSO および *rep* 遺伝子を結合し、*S. lividans* 内に導入すれば、プラスミド上の 2 個所にニックが入る。それぞれが環状化されると、ニッキング部位の上流と下流で由来の異なるキメラプラスミドが得られる。そこで、得られたプラスミドの DSO の DNA 塩基配列を解析し、pIJ101 由来の配列から pJV1 由来の配列へと代わる点を同定した。一方、Hagège らは、*Staphylococcus aureus* 由来の RC 型プラスミド、pC194 グループ (Gruss and Ehrlich, 1989; Jannière *et al.*, 1993; Seery *et al.*, 1993; del Solar *et al.*, 1993) において保存されているニッキング部位の DNA 塩基配列が、*Streptomyces ambofaciens* 由来のプラスミド pSAM2 においても保存されていることを示し、この部分がニッキング部位であると予測している (Hagège *et al.*, 1993)。pSMA2、pIJ101、pJV1 などこれら *Streptomyces* 属由来の RC 型プラスミドはその Rep タンパク質および DSO の配列から、今のところすべて上記の pC194 グループに属することが明らかとなっている。予測されるニッキング部位の配列は Muth らの報告にまとめられている (Muth *et al.*, 1995; Fig. 3) が、この部分が他の pC194 グループの RC 型プラスミドでは非常によく保存されているのに対し、*Streptomyces* 属由来の RC 型プラスミドにおいてはあまりよく保存されていない (図 3-1 参照)。この原因が、プラスミド由来の Rep タンパク質によるニッキング部位の配列の認識が緩やかなためか、それとも各 Rep タンパク質は厳密にそれぞれのニッキング部位の配列を認識しているのかは明らかにはなっていない。

pSN22 は既に述べたようにプラスミド pJV1 と遺伝子構造、DNA 塩基配列が非常に近いプラスミドであるが、興味深いことに *rep* 領域だけは pIJ101 と非常に相溶性が高い (DNA 塩基配列で 92%、予測されるアミノ酸配列で 95% ; Kataoka *et al.*, 1994c)。そこで本章では、pSN22 の DSO 領域をさらに詳細に pIJ101 および pJV1 の DSO 領域と比較した。そして、予測されるニッキング部位にいくつかの点突然変異を導入し、プラスミドの複製への影響を調べた。

Putative nicking site		
	↓	
pSN22	CGCGC CTTG GGA	<i>Streptomyces nigrifaciens</i>
pIJ101	AACAC CTTG GGA	<i>Streptomyces lividans</i>
pJV1	GACGC CTAG GTA	<i>Streptomyces phaeochromogenes</i>
pSAM2	CGGGC CTTG ATG	<i>Streptomyces ambofaciens</i>
pSG5	CGCAG CATG CCG	<i>Streptomyces ghanaensis</i>
Consensus	CTTG ATA	
φX174	CCCA ACTTG ATA	<i>Escherichia coli</i>
pC194	CTTAT CTTG ATA	<i>Staphylococcus aureus</i>
pUB110	CTTAT CTTG ATA	<i>Staphylococcus aureus</i>
pBAA1	CTTAT CTTG ATA	<i>Bacillus subtilis</i>
pCB101	TCTAT CTTG ATA	<i>Clostridium butyricum</i>
pLP1	CTTAT CTTG ATA	<i>Lactobacillus plantarum</i>

図 3-1. 放線菌由来プラスミドおよび RC 型プラスミド pC194 グループにおけるニッキング部位の配列。Seery *et al.*, 1993 および Muth *et al.*, 1995 より改変。放線菌由来の RC 型プラスミドでは、他の pC194 グループのプラスミドで完全に保存されている 5'-CTTGATA-3' (太字) が、あまり保存されていない。図の右側に、各プラスミドおよびバクテリオファージが単離された宿主を示した。

材料および方法

DNA 塩基配列の解析

DSO 領域の DNA 塩基配列の他の放線菌プラスミドとの相同性の解析およびアラインメントは、GENETYX 遺伝情報処理ソフトウェア（ソフトウェア開発、東京）によって行った。

使用菌株、プラスミドおよび培地

宿主として用いた *Escherichia coli* および *Streptomyces lividans*、*E. coli* のクローニングベクター、培地は、第一章の同項目と同じものを使用した。

組み換え DNA 操作

第一章の同項目と同様にして行った。

部位特異的突然変異の導入

予測されるニッキング部位への点突然変異の導入は、PCR 反応を用いた部位特異的変異導入法 (Picard *et al.*, 1994) を改変して行った。表 3-1 に示した各オリゴヌクレオチドと M13 M4 プライマー（宝酒造、滋賀）それぞれ 10 pmol を用い、後述するニッキング部位をマルチクローニングサイトにクローニングした pBluescriptII SK+を鋳型として、PCR 法 (Saiki *et al.*, 1988) を 15 サイクル行った。PCR 法には Ex Taq DNA ポリメラーゼ（宝酒造）を用いた。その後、各チューブに 50 pmol の M13 RV プライマー（宝酒造）を加え、さらに 15 サイクル PCR を行った。最後に各チューブに 50 pmol の M13 M4 プライマーを加え、15 サイクル PCR を行い、

変異 DSO 断片を取得した。

DSO 変異プラスミドの構築

DSO 部分に点突然変異を持つプラスミドの構築は、以下のように行った。まず、予測されるニッキング部位を含む 226 bp の *SmaI*-*ApaI* 断片 (図 3-2、nt 7781-8006) を、pBluescriptII SK+にクローニングした。この断片を鋳型として、前述の方法で予測されるニッキング部位へ点突然変異を導入した。得られた変異断片を再び pBluescriptII SK+の *ApaI*-*SmaI* 部位に組み込み、後述する DNA 塩基配列決定法によって導入された突然変異配列を確認した。次に *E. coli*-*S. lividans* シャトルプラスミド pRT1 (第一章参照) より pSN22 の *rep* を含む 1.4 kbp の *ApaI*-*KpnI* 断片を切り出し、構築した各変異 DSO 断片を含むプラスミドの *ApaI*-*KpnI* 部位に挿入した。この各プラスミドより切り出した 1.6 kbp の *SmaI*-*KpnI* 断片を、プラスミド pBRV1 (pRT1 と同様に pUC19 の *SmaI* 部位に pSN22 の *dso-rep* を含む *Bam*^I-*EcoRV*^a 断片が挿入されているが、pRT1 と異なりチオストレプトン耐性遺伝子 *tsr* は持たない) の *SmaI*-*KpnI* 切断部に組み込み、変異 *dso-rep* 部分を完成した。最後に、*tsr* 遺伝子を含むプラスミド pRT1 の 1.6 kbp の *Bam*HI-*Pst*I 断片を各プラスミドの *Bam*HI-*Pst*I 部位に組み込み、*dso* 変異 *E. coli*-*S. lividans* シャトルプラスミド pRT シリーズとした。

DNA 塩基配列の決定

DNA 塩基配列の決定は第一章と同様に、Termo Sequenase fluorescent cycle sequencing Kit (Amersham, Bucks, UK) を用いたチェーントーミネーション法 (Sanger *et al.*, 1977) によってサイクルシーケンス反応を行い、ALF II DNA Sequencer (Pharmacia, Uppsala, Sweden) を用いて DNA 塩基配列を決定した。

プラスミド DNA 量の確認

細胞内のプラスミド DNA 量を染色体 DNA 量と比較するために、サザンハイブリダイゼーション法 (Southern, 1975) を用いた。染色体 DNA のマーカーとして、*S. lividans* のキシロースイソメラーゼ遺伝子の一部を PCR 法 (Saiki *et al.*, 1988) によって増幅し、pUC19 に組み込んだプラスミド pXISL1 (Y. Talawanich、鈴木、関、未発表データ) を用いた。PCR 法に用いたオリゴヌクレオチドは、*Streptomyces rubiginosus* (Wong *et al.*, 1991) および *Streptomyces violaceoniger* (Drocourt *et al.*, 1988) のキシロースイソメラーゼ遺伝子において保存された配列より設計した。オリゴヌクレオチドの塩基配列は 5'-CTGTGGACCGTCGGCTGG-3' と 5'-GGCTTGGGCTCGATGGCG-3' で、それぞれ *S. rubiginosus* のキシロースイソメラーゼ遺伝子の 1741-1758 塩基および 2232-2249 塩基 (Wong *et al.*, 1991 参照) に相当する。Ex Taq DNA ポリメラーゼを用いて増幅した 510 bp の断片を pUC19 にクローニングし、プラスミド pXISL1 を構築した。pRT シリーズは pUC19 を含むため、pXISL1 は染色体上のキシロースイソメラーゼ遺伝子と同時にプラスミドを検出するプローブとして用いることができる。

プラスミド DNA およびキシロースイソメラーゼ遺伝子の検出は、以下のようにして行った。*S. lividans* の形質転換体より Hopwood らの方法に基づいて全 DNA を抽出した (Hopwood *et al.*, 1985)。1.6 μ g の全 DNA を 1% アガロースゲル電気泳動で分画した後、アルカリ変性を行い DNA をナイロン膜 (Hybond-N, Amersham) にブロッティングした。プローブとしては、DIG DNA labeling kit (Boehringer Mannheim, Mannheim, Germany) によりジゴキシゲニン (digoxigenin; DIG) -dUTP ラベルした pXISL1 を使い、DIG luminescent detection kit (Boehringer Mannheim) によってプラスミド DNA およびキシロースイソメラーゼ遺伝子を検出した。また、プラスミドのコピー数の測定は、 $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{dCTP}$ および Random primer labeling kit (宝酒造) を用いて標識した pXISL1 をプローブに用いて同様にサザンハイブリダイゼーションを行い、オートラジオグラフィーで観察した後、バンド部分を切り取って、各クローン毎に 4 サンプルずつ液体シンチレーションカウンターで測定した。

結 果

pSN22 のニッキング部位より下流の塩基配列は、pIJ101 の塩基配列と高い相同性を示す

pSN22 の *dso* 領域を pIJ101 および pJV1 のニッキング部位 (Servín-González, 1993)、pSAM2 の予測されるニッキング部位 (Hagège *et al.*, 1993) と比較した結果、*Staphylococcus* のプラスミド pC194 グループでよく保存された配列とよく似た配列が存在した (図 3-2、太字で示された 5'-CTTGGGA-3')。そこで、pSN22 と遺伝子の構造が非常に似ているプラスミド pJV1 および、pSN22 と *rep* 遺伝子の相同性が非常に高いプラスミド pIJ101 の、DSO 領域の DNA 塩基配列との詳細な比較を行った。GENETYX 遺伝情報処理ソフトウェアを用いて、pSN22 の *dso* を含む、予測されるニッキング部位の前後 250 bp の領域の DNA 塩基配列を、pIJ101 および pJV1 のそれぞれ相当する領域の DNA 塩基配列と比較した結果、3 ヵ所の DNA 塩基配列の相同性が高い領域を発見した (図 3-2)。このうち pSN22 のヌクレオチド (nt ; pSN22 の *Pst*I 認識部位、から時計回りの方向でのヌクレオチドの番号、Kataoka *et al.*, 1994c) 7823-7869 に存在する 2 番目の保存領域は、pIJ101 との相同性が最も高い領域であるが、この領域は予測されるニッキング部位の配列から始まっていた。この領域は 47 塩基にわたって、pIJ101 における塩基配列と完全に一致していた。この領域の下流、nt 7949-8033 には 3 番目の保存領域が存在した。この領域は各プラスミドの Rep タンパク質の予測される開始コドンを含んでいる (Kendall and Cohen, 1988; Kataoka *et al.*, 1994c; Servín-González *et al.*, 1995)。この保存領域の下流の塩基配列は、pIJ101 とは非常に高い相同性を示すが (Kataoka *et al.*, 1994c)、pJV1 とは全く異なっていた (データ不掲載)。1 番目の保存領域は、予測されるニッキング部位の上流、nt 7660-7763 に存在した。この領域は pSN22 では複製の必須領域に含まれており、nt 7778 の *Sma*I 部位より上流を欠失するとプラスミドは形質転換能を失う (Kataoka *et al.*, 1994b)。この 3 つの保存領域の pSN22 の塩基配列の相同性は、pIJ101 とはそれぞれ 73%、100% および 96%、pJV1 とはそれぞれ 67%、68% および 66% であった。pJV1 との相同性はどの保存領域もほぼ同じであ

ったが、pIJ101 との相同性は、2 番目および 3 番目の保存配列に比べて、1 番目の保存配列で著しく低い値を示し、ニッキング部位の下流から急に pSN22 と pIJ101 の塩基配列の相同性が高くなる傾向が明らかとなった。

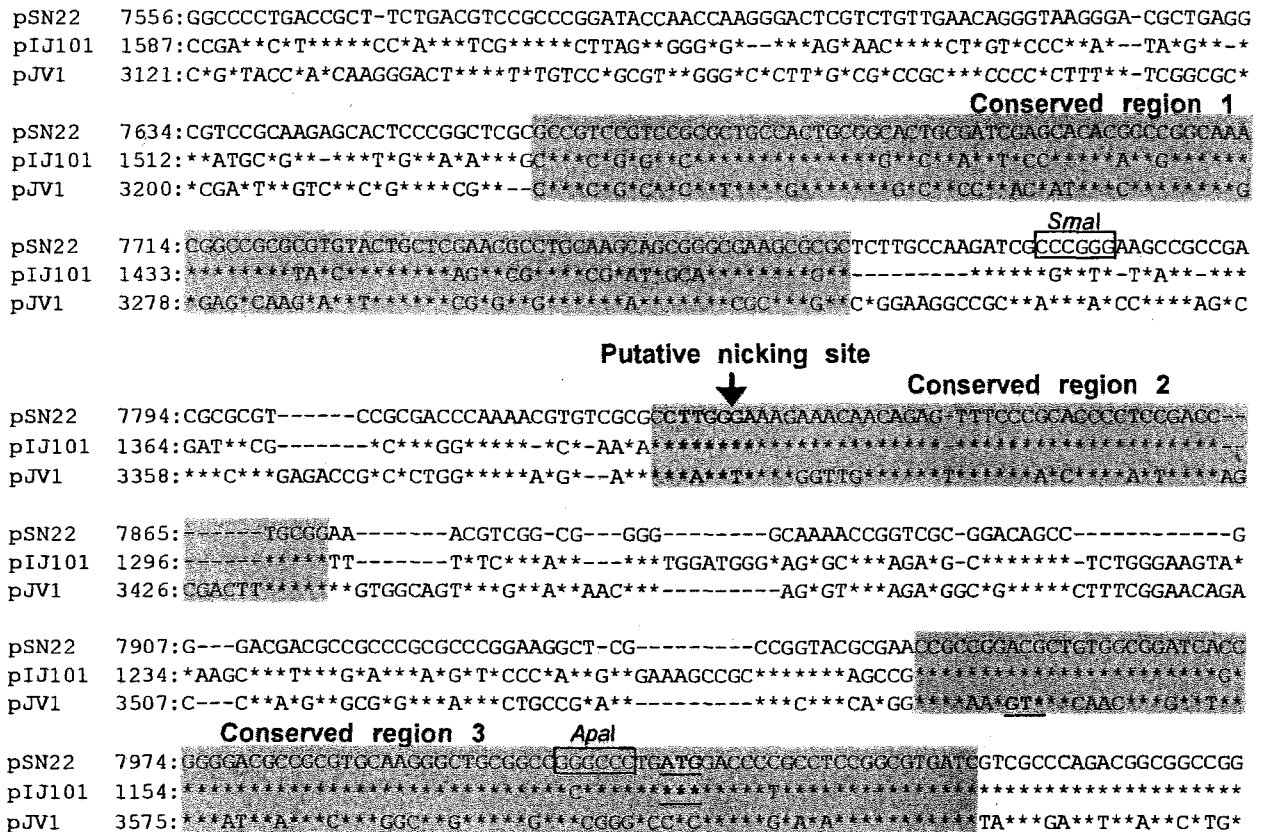


図 3-2. 放線菌プラスミド pSN22、pIJ101 および pJV1 の DSO 領域の DNA 塩基配列の比較。ヌクレオチドの位置を示す番号は、pSN22 は Kataoka らの (Kataoka *et al.*, 1994c)、pIJ101 は Kendall と Cohen の (Kendall and Cohen., 1988)、pJV1 は Servín-González らの (Servín-González *et al.*, 1995) 報告によった。pIJ101 および pJV1 の DNA 塩基配列のうち、pSN22 と同一なものは*印で示されている。ニッキング部位の保存配列は太字で示し、予測されるニックの入る場所を矢印で示した。DSO 中の保存された領域の塩基配列は、影をつけて示されている。プラスミド pRT シリーズの作製に用いた *SmaI* および *ApaI* 認識部位は、四角で囲んで示した。*rep* 遺伝子の予測される開始コドンはそれぞれ、下線を施した太字で示した。

ニッキング部位の塩基配列への突然変異の導入

この予測されたニッキング部位がプラスミドの複製において機能していることを確認するため、ニッキング部位の保存配列に部位特異的に突然変異を導入し、プラスミドの形質転換能への影響を調べた。構築したプラスミドを *S. lividans* TK21 株のプロトプラストに形質転換法を用いて導入し、50 µg/ml のチオストレプトンを含む R2YE プレート上で形質転換体を選択した。表 3-1 に示したように、保存配列の内部 (nt 7824-7829) に導入した変異はすべて、プラスミドの形質転換能を失わせるか、減少させた。ニッキング部位の保存配列の外側、nt 7823 の C 残基を T に変えた pRT7823 のみが、野生型のプラスミド pRT1 (第一章参照) とほぼ同じ形質転換能を示した。pRT7827 (nt 7827 の G 残基を A に変更) および pRT7829 (nt 7829 の G 残基を T に変更) では数個の形質転換体を得られたが、これらの形質転換体の増殖速度は低く、通常なら一日半で見られる大きさのコロニーに生育するまでに約三日を要した。pRT194 (保存配列 5'-CTTGGA-3'を pC194 型の 5'-CTTGATA-3'に変更)、pRT194M (pRT194 と同じオリゴヌクレオチドを使用、但しさらに nt 7818 の T 残基が C へ変異)、pRT7826 (nt 7826 の T 残基を G に変更)、pRT7826M (pRT7826 と同じオリゴヌクレオチドを使用、但しさらに nt 7832 の A 残基が欠失)、および pRT7829M (pRT7829 と同じオリゴヌクレオチドを使用、但しさらに nt 7818 の T 残基が G へ変異、nt 7819 の C 残基が欠失) では全く形質転換体は得られなかった。

変異プラスミドのコピー数の確認

得られた形質転換体中でプラスミドが自律的に複製しているかどうかを確認するため、サザンハイブリダイゼーション法を用いてプラスミドの検出を行った。pRT1、pRT7823、pRT7827 および pRT7829 によってそれぞれ形質転換された *S. lividans* を、5 µg/ml のチオストレプトンを含む YEME 液体培地中で対数増殖終期まで培養し、全 DNA を抽出した。1.6 µg の全 DNA を 1%アガロースゲル電気泳動で分画し、アルカリ変性を行った後にナイロン膜にブロッティング

した。プラスミドの量を染色体 DNA 量と比較するために、プローブとしては pUC19 に *S. lividans* のキシロースイソメラーゼ遺伝子の一部をクローニングしたプラスミド pXISL1 を用いた。

表 3-1. 点突然変異の導入によるプラスミドの形質転換効率への影響。pSN22 のニックング部位の保存配列は、太字で示した。ヌクレオチドの位置を示す番号は、Kataoka らの報告によった (Kataoka *et al.*, 1994c)。各プラスミドの DNA 塩基配列のうち、変更されたもののみを示し、変更されなかったものは*印で示した。PCR 法を利用した部位特異的変異の導入に用いたオリゴヌクレオチドの塩基配列は、下線で示した。但し、pRT194M、pRT7826M および pRT7829M はそれぞれ pRT194、pRT7826 および pRT7829 とおなじオリゴヌクレオチドを用いて作成されたが、変異導入の過程でさらに表中に示された変異が起こったものである。N.D.、検出されず。

Clone	Nucleotide sequence	Relative efficiency of transformation	Growth	Copy number
pRT1	7811 AAACGTGTCG CGCCTTGGGA AAGAAACAAC 7840	1.00 ^a	Normal	43±3
pRT194	***** <u>*****AT*</u> *****	0	-	-
pRT194M	*****C** <u>*****AT*</u> *****	0	-	-
pRT7823	***** <u>**T*****</u> *****	1.20	Normal	50±5
pRT7826	***** <u>*****G*****</u> *****	0	-	-
pRT7826M	***** <u>*****G*****</u> *-*****	0	-	-
pRT7827	***** <u>*****A*****</u> *****	0.02>	Slow	N.D.
pRT7829	***** <u>*****T*****</u> *****	0.01>	Slow	N.D.
pRT7829M	*****G-* <u>*****T*****</u> *****	0	-	-

^a pRT1 の形質転換効率は 2.5×10^4 transformant/mg DNA。

pRT7823 は pRT1 とほぼ同じか、若干高いコピー数を示した (表 3-1、および図 3-3、レーン 1 および 2) 。しかし、pRT7827 および pRT7829 の形質転換体では染色体 DNA の位置のシグナルしか確認できず (図 3-3、レーン 3 および 4) 、これらのプラスミドは染色体に組み込まれていると考えられた。

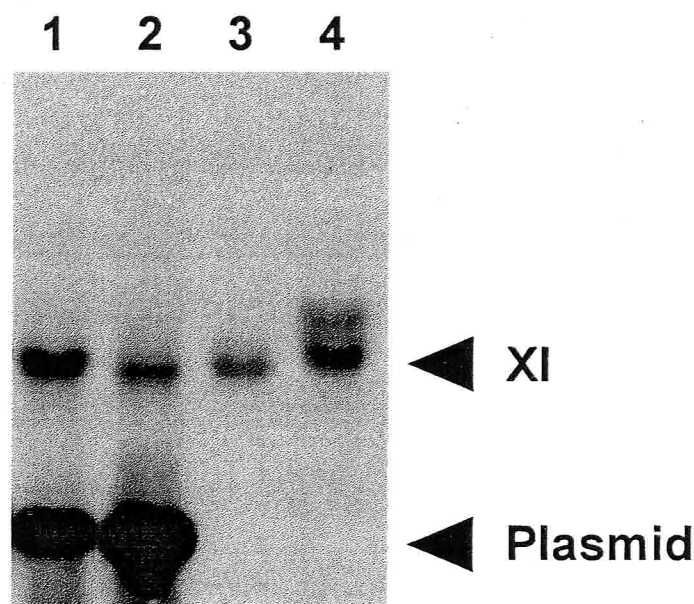


図 3-3. *S. lividans* 形質転換体中のプラスミド DNA の検出。1.6 μ g の全 DNA を *Eco*RI (プラスミド上には一認識部位、キシロースイソメラーゼ遺伝子上のプロープに用いた領域内には認識部位は無し) で処理してプラスミドを直鎖化したのち、1%アガロースゲル電気泳動で分画した。プラスミド分子および染色体 DNA 上のキシロースイソメラーゼ遺伝子の検出は、本文中で述べた方法により行った。レーン 1、野生型 pRT1 ; レーン 2、pRT7823 ; レーン 3、pRT7827 ; レーン 4、pRT7829。XI は染色体 DNA 量の参照となるキシロースイソメラーゼ遺伝子。

考 察

突然変異の導入の結果、5'-CTTGGGA-3'から成る pSN22 の保存配列はプラスミドの複製に重要な機能、恐らく RC 型複製におけるニッキング部位としての機能を持つと考えられた。

Streptomyces 由来の RC 型プラスミドのニッキング部位の塩基配列は、図 3-1 に示したように他の pC194 グループのプラスミドに比べてあまりよく保存されていない。しかし突然変異の導入の結果、一塩基の変異導入もプラスミドの複製能を減少させることが明らかとなった。従って、各プラスミドの Rep タンパク質は、それぞれのニッキング部位の塩基配列を厳密に認識していると考えられる。

pRT7823 は、野生型の pRT1 よりも高いコピー数を持つことが示された。pRT7823 は形質転換の効率も野生型を上回っているが、放線菌 RC 型プラスミドのコピー数制御機構の研究はまだ全く行われていないため、このコピー数が増加した原因となる機構は不明である。pRT7827 および pRT7829 は数個の形質転換体が取れたものの、プラスミド分子は確認できなかった。これらのプラスミドは *S. lividans* 内ではもともと複製できないか、できても非常に不安定なため、染色体 DNA 上に組み込まれたもの以外は失われたと考えられる。これらの形質転換体では、チオストレプトンを含む培地での増殖速度が低かったが、これは細胞内の *tsr* 遺伝子のコピー数が減少したためと考えられる。プラスミド pRT7829 が形質転換体中に検出できなかったのは、意外なことであった。なぜならば pRT7829 の塩基配列 5'-CTTGGTA-3'は、Servín-González の報告における pIJ101 と pJV1 のキメラプラスミドと同じ配列であり、このプラスミドは *S. lividans* 内で複製できたからである (Servín-González, 1993)。従って、この 5'-CTTGGTA-3'の配列は、pJV1 由来の Rep では認識できるが、pSN22 由来の Rep では認識できないという仮説が考えられる。興味深いことに、Brasch と Cohen は pIJ101 において、ニッキング部位の領域を欠いたプラスミドが複製できることを示した (Brasch and Cohen, 1995)。pIJ101 と pNS22 の Rep タンパク質のアミノ酸配列は再度述べてきたように非常に近いが、彼らの結果と今回の結果とは非常に異なっている。この原因は明らかではないが、pIJ101 上には第二のニッキング部位とな

る配列があったという可能性も考えられる。

pSN22 のニッキング部位から下流が、急に pIJ101 と相同性の高い配列になっていることから、このプラスミドが pIJ101 型のプラスミドと pJV1 型のプラスミドの組み換えによって誕生したという仮説が考えられる。pIJ101 型のプラスミドと pJV1 型のプラスミドが融合し、その後それぞれの Rep タンパク質によってニッキング部位から pSN22 の元となるプラスミドが切り出される。この結果、ニッキング部位より下流の塩基配列は pIJ101 と高い相同性を示すが、pJV1 との相同性は他の領域に比べて低いプラスミドが生成する (図 3-4)。この仮説によれば、pSN22 と pIJ101 のニッキング部位下流の塩基配列の不自然なほどに高い相同性を説明できる。但しこの仮説の問題点は、2 番目の保存領域と 3 番目の保存領域の間に、pIJ101 とは全く異なる配列が存在することである。この配列の起源は全く分っていない。

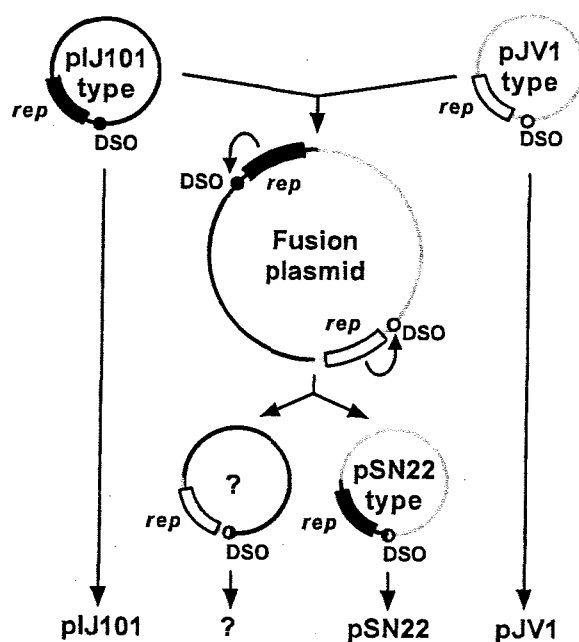


図 3-4. プラスミド pSN22 の生り立ち (仮説)。pIJ101 および pJV1 の原型となるプラスミドが組み換えにより融合した後、それぞれの Rep タンパク質が DSO 上のニッキングサイトよりプラスミド 1 ユニット分を切り出し、pSN22 の原型となるプラスミドが誕生したと想像される。この仮説によれば、?印のタイプのプラスミドもどこかに存在するかもしれない。

第四章

ローリングサークル型プラスミドの *Streptomyces*
lividans における部位非特異的なセカンド鎖合成の、
in vivo および *in vitro* での解析

第四章

ローリングサークル型プラスミドの *Streptomyces lividans* における部位非特異的なセカンド鎖合成の、*in vivo* および *in vitro* での解析

放線菌 *Streptomyces lividans* において、ローリングサークル型複製を行うプラスミドは、複製中間体一本鎖 (ss) DNA からの二本鎖 DNA への変換反応 (セカンド鎖合成) の開始点である single strand origin (SSO) を欠損しても安定に保持される。プラスミド pSN22 において SSO 活性の有無は、*S. lividans* 中でのプラスミドのコピー数に影響を与えず、SSO 非存在化においても複製中間体 ssDNA 上で部位非特異的な複製のプライマー合成が行われていると考えられた。プライマー合成に関与すると考えられる RNA ポリメラーゼの阻害剤であるリファンピシンを添加したところ、プラスミドの複製には影響が見られなかった。*S. lividans* の無細胞系抽出液を調製した *in vitro* でのセカンド鎖合成は、鋳型 ssDNA、4 種の dNTP とたった 1 種の rNTP、および Mg^{2+} を要求し、リファンピシンによる阻害を受けなかった。SSO を持たない鋳型 ssDNA においても、SSO を持つ鋳型と同様のセカンド鎖合成が観察され、*S. lividans* が ssDNA に対し部位非特異的なプライマー合成能を持つことが確認された。興味深いことに、定常期の細胞から調製した抽出液はセカンド鎖合成反応に rATP あるいは他の rNTP を要求したのに対し、対数増殖期の細胞からの抽出液は rNTP 非存在下においてもセカンド鎖の合成が可能であった。*S. lividans* の *in vitro* でのセカンド鎖合成を、*E. coli* の *in vitro* での部位非特異的、リファンピシン耐性のセカンド鎖合成である “general priming” と比較した結果、*S. lividans* の無細胞系抽出液は rNTP の要求性が低いことが示された。

緒 言

ローリングサークル (rolling circle; RC) 型複製を行なうプラスミドおよびバクテリオファージのセカンド鎖合成は、染色体 DNA のラギング鎖複製機構の研究の良いモデルとなる。グラム陽性菌には多くの RC 型プラスミドが知られている (Gruss and Ehrlich, 1989; Novick 1989; Jannière *et al.*, 1993; del Solar *et al.*, 1993)。RC 型複製はプラスミドの複製途中に一本鎖 (single-stranded; ss) の環状の複製中間体を産出することがその特徴である (te Riele *et al.*, 1986b)。セカンド鎖合成、すなわち複製中間体 ssDNA から二本鎖 (double-stranded; ds) のプラスミド分子への変換は、single strand origin (SSO) と呼ばれる部位より開始される。これらの SSO には特異的な宿主においてのみ働くものがあり (del Solar *et al.*, 1987; van der Lelie *et al.*, 1989)、RC 型プラスミドの分配的、構造的な安定性はその SSO が宿主内で活性を持つかどうかによる。SSO の欠損や SSO 部位を逆向きに挿入することによる不活化は、宿主細胞内に多量の複製中間体 ssDNA を蓄積させる (te Riele *et al.*, 1986a, b)。しかし、宿主細胞が SSO 非依存の部位非特異的なプライマー合成を行うことにより、ds のプラスミド分子のコピー数が維持されることがある。Gruss らは、*Staphylococcus* 由来のプラスミド pUB110 の SSO を欠損させると、*Staphylococcus aureus* 内では ds のプラスミド分子のコピー数が減少するが、*Bacillus subtilis* 内では複製中間体 ssDNA が蓄積するものの、ds プラスミド分子のコピー数に変化が無いことを示した (Gruss *et al.*, 1987)。*Staphylococcus* の RC 型プラスミド pUB110、pC194 (Boe *et al.*, 1989)、pT181 (Birch and Khan, 1992)、pE194 および pSN2 (Dempsey *et al.*, 1995) のセカンド鎖合成のプライマーは、宿主の RNA ポリメラーゼによって合成される。*S. aureus* および *B. subtilis* において、複製中間体 ssDNA から ds プラスミドへの変換は、RNA ポリメラーゼの阻害剤であるリファンピシンを加えることで阻害される (Boe *et al.*, 1989)。また、*S. aureus* の無細胞系抽出液を用いた *in vitro* の実験でも、リファンピシンによるセカンド鎖合成の阻害が認められている (Birch and Khan, 1992; Dempsey *et al.*, 1995)。一方、*Lactococcus lactis* のプラスミド pWVO1 のセカンド鎖合成は、*in vivo* および *in vitro* において

部分的なリファンピシン耐性を示すことが知られている (Leenhouts *et al.*, 1991; Seegers *et al.*, 1995)。

Streptomyces lividans は、放線菌における遺伝子操作の宿主菌としてよく用いられ、研究されている (Kieser *et al.*, 1982; Hopwood *et al.*, 1985)。放線菌由来の小型環状プラスミドの複製機構については *S. lividans* を宿主として、pIJ101 (Kieser *et al.*, 1982; Zaman *et al.*, 1993a, b; Brasch and Cohen, 1995)、pSN22 (Kataoka *et al.*, 1994b)、pSAM2 (Hagège *et al.*, 1993; 1994)、pJV1 (Servín-González, 1993; Servín-González *et al.*, 1995)、pSG5 (Muth *et al.*, 1995)、pSA1.1 (Yokoyama *et al.*, 1996) 等多数のプラスミドについて解析が行われている。これらのプラスミドは、全て RC 型の複製を行う。プラスミドの SSO については、pIJ101 (Deng *et al.*, 1988; Zaman *et al.*, 1993a)、pJV1 (Servín-González *et al.*, 1995) および第一、二章で示した pSN22 においてその領域が限定されている。SSO の欠損は *S. lividans* 内において組み換えの基質になり易い複製中間体 ssDNA の蓄積を招く結果、構造的に不安定になる (Lee *et al.*, 1986; Pigac *et al.*, 1988; Deng *et al.*, 1988)。一方、ds のプラスミド分子のコピー数は、SSO が欠損していてもかなり高い。プラスミド pIJ101 由来のクローニングベクター pIJ702 (Katz *et al.*, 1983) は SSO を含まないが、細胞内に一染色体 DNA あたり 100 コピー以上が存在する (Zaman *et al.*, 1993a)。これは *B. subtilis* と同じような SSO 非依存の部位非特異的なプライマー合成が、*S. lividans* でのセカンド鎖合成においても行われているためと考えられる。本章では *S. lividans* において、RC 型プラスミドのセカンド鎖合成への SSO およびリファンピシンや rNTP の影響を、pSN22 を用いて *in vivo* および *in vitro* で解析した。*In vitro* での実験のために、プラスミド非保持株である *S. lividans* TK21 より無細胞系抽出液を調製し、SSO 非依存の部位非特異的なセカンド鎖合成の特性の解析を行った。

材料および方法

使用菌株、プラスミドおよび培地

Escherichia coli JM105 株 (*endA1 supE sbcB15 thi rpsL Δ(lac-proAB) F' [traD36 proAB⁺ lac⁺ lacZΔM15]*; Yanisch-Perron *et al.*, 1985) および JM109 株 (*recA1 supE44 endA1 hsdR17 gyrA96 relA1 thi Δ(lac-proAB) F' [traD36 proAB⁺ lac⁺ lacZΔM15]*; Yanisch-Perron *et al.*, 1985) を *E. coli* ベクター pUC19, M13mp18, M13mp19 (Yanisch-Perron *et al.*, 1985) および pBluescriptII SK+ (Stratagene, La Jolla, CA) の宿主として用いた。また、*E. coli* BL21 株 (*E. coli* B F⁻ *dcm ompT hsdS(r_B⁻ m_B⁻) gal*; Studier and Moffatt, 1986) を、無細胞系抽出液 (fraction II) の調製に用いた。*S. lividans* TK21 株 (SLP2⁺, SLP3⁺; Kieser *et al.*, 1982) は、*Streptomyces* のプラスミドの宿主および無細胞系抽出液の調製に用いた。*E. coli* の培養は 2 × YT 培地 (Sambrook *et al.*, 1989) で行った。*S. lividans* の培養は通常は YEME 液体培地 I (3 g/L 酵母エキスを ; 5 g/L ペプトン ; 3 g/L マルトエキス ; 10 g/L グルコース ; 5 mM MgCl₂ ; 340 g/L スクロース ; Hopwood *et al.*, 1985) あるいは R2YE 平板培地 (Hopwood *et al.*, 1985) で行い、無細胞系抽出液の調製にはスクロースの代わりに 0.5% (w/v) のポリエチレングリコール (PEG) 6000 を含む YEME 液体培地 II (Thompson *et al.*, 1984) を用いた。使用した組み換え体プラスミドは表 3-1 に示した。

組み換え DNA 操作

E. coli からのバクテリオファージの抽出、*E. coli* の形質導入は、Sambrook らの方法に従った (Sambrook *et al.*, 1989) 。その他の組み換え DNA 操作については、第一章の同項目と同様に行なった。

表 3-1. 実験に使用したプラスミド。

プラスミド名	構造	備考
pRTS020N	pSN22 の <i>sso1</i> を含む <i>Pst</i> I- <i>Bgl</i> II 断片を持つ <i>E. coli</i> - <i>S. lividans</i> シャトルプラスミド。 (<i>ssoI</i> ⁺ , <i>tsr</i>)	第一章参照
pRTS020O	pRTS020N と同じ pSN22 断片を持つが、 <i>sso1</i> は活性を持たない方向に挿入されている。 (<i>ssoI</i> ⁻ , <i>tsr</i>)	同上
pSSO020	pSN22 の <i>sso1</i> を含む <i>Pst</i> I- <i>Bgl</i> II 断片を pBluescriptII SK+ の <i>Pst</i> I- <i>Bam</i> HI 部位に挿入したプラスミド。ssDNA を調製した場合は <i>sso1</i> のラギング鎖側が含まれる (<i>ssoI</i> ⁻)。	同上
pSSO021	pSN22 の <i>sso1</i> を含む <i>Pst</i> I (T4 DNA ポリメラーゼで平滑化) - <i>Bgl</i> II 断片を pBluescriptII SK+ の <i>Bam</i> HI- <i>Spe</i> I (T4 DNA ポリメラーゼで平滑化) 部位に挿入したプラスミド。ssDNA を調製した場合は <i>sso1</i> のリーディング鎖側が含まれる (<i>ssoI</i> ⁺)。	同上

ssDNA の検出

S. lividans の形質転換体より Hopwood らの方法に基づいて全 DNA を抽出した (Hopwood *et al.*, 1985)。ds および ssDNA プラスミド分子を検出する場合は、1.6 µg の全 DNA を 1%アガロースゲル電気泳動で分画した後、アルカリ変性を行い DNA をナイロン膜 (Hybond-N, Amersham, Bucks, UK) にブロットニングした。プラスミドの検出は、サザンハイブリダイゼーション法 (Southern, 1975) により行った。プローブとしては、DIG DNA labeling kit (Boehringer Mannheim, Mannheim, Germany) によりジゴキシゲニン (digoxigenin; DIG) -dUTP ラベルした pBluescriptII SK+を用い、DIG luminescent detection kit (Boehringer Mannheim) によってプラスミドを検出した。ssDNA プラスミド分子のみを検出する場合は、

第一章と同様に、te Riele らの方法に従いアルカリ変性を行わずに DNA をナイロン膜にブロッキングし、菌体内に存在する ssDNA のみを膜に固定して (te Riele *et al.*, 1986a)、プラスミドの検出を行った。

無細胞系抽出液の調製

S. lividans の無細胞系抽出液は、プラスミド非保持株 *S. lividans* TK21 より調整した。菌体を 6 L の YEME 液体培地 II を用い、10 L のジャーファーメンターで 200 rpm、1 vvm、30°C で培養した。対数増殖中期 (12 時間) あるいは定常期 (36 時間) の菌体を、室温でフィルター過で集め (Thompson and Cundliffe, 1981)、-80°C で保存した。菌体は 1 g (wet weight) 当たり 2.5 ml の S30 緩衝液 (50 mM Hepes-KOH pH 7.5、60 mM NH₄Oac、10 mM Mg(OAc)₂、5 mM 2-メルカプトエタノール、10% (v/v) グリセリン ; Thompson *et al.*, 1984 より改変) に再懸濁し、フレンチプレスで 70-80 MPa で破碎した。細胞破碎液を 1,800 rpm、4°C で 30 分間遠心分離した後、上清に含まれる DNA を硫酸ストレプトマイシン沈殿法 (Conrad and Campbell, 1979) によって除去した。1.0 ml の上清に対し 0.1 ml の 33% (w/v) 硫酸ストレプトマイシンを加え、4°C で 30 分間攪拌した。生成した沈殿はベックマン SW28 ローターを用い、25,000 rpm、4°C で 30 分間遠心分離して除去した。得られた粗抽出液 1.0 ml に対し 0.436 g の硫酸アンモニウムを加え、4°C で 30 分間攪拌した。1,800 rpm、4°C で 30 分間遠心分離した後、得られたペレットを S30 緩衝液に溶解し、S30 緩衝液に対して 4°C、3 時間透析を行った。透析後の無細胞系抽出液は、液量を最初の菌体破碎液の液量と等しくなるように希釈し、少量に分けて -80°C で保存した。無細胞系抽出液中のタンパク質量は、Protein Assay Kit I (Bio-Rad, Hercules, CA) で IgG を標準タンパク質として用いて測定し、6.4 mg/ml に合わせた。*E. coli* の無細胞系抽出液 (fraction II) は、プラスミド非保持株 *E. coli* BL21 より Fuller らの方法に従って調製した (Fuller *et al.*, 1981)。

ssDNA の調製

組み換え体 pBluescriptII SK+ の ssDNA は、ヘルパーファージ VCSM13 (Stratagene) を用いて供与元のプロトコルに従って調製した。M13mp18 バクテリオファージの ssDNA は、Sambrook らの方法に従い PEG を用いて沈澱させ、フェノール抽出およびフェノール・クロロホルム抽出を行って調製した (Sambrook *et al.*, 1989)。ヘルパーファージや ssDNA 中に夾雑するオリゴヌクレオチドを除去するために、アルカリアガロースゲル電気泳動 (Sambrook *et al.*, 1989) により ssDNA を精製し、エレクトロエリ्यूション (Sambrook *et al.*, 1989) によって ssDNA を回収した。DNA 複製反応のプライマーとなり得る夾雑するオリゴヌクレオチドの存在は、Klenow 断片を用いて ^3H ラベルした dCTP の取り込みを測定することにより確認した。取り込み反応は 12.5 μl の反応液中に 20 mM Tris-HCl pH8.0、10 mM MgCl_2 、各 50 μM dATP、dGTP、dTTP、1 μl (4 μM 、25 Ci/mmol) $[5\text{-}^3\text{H}]\text{dCTP}$ 、0.5 μg ssDNA および 0.16 units/ml の Klenow 断片を含む組成で、37°C で 30 分間行った。反応の停止および $[5\text{-}^3\text{H}]\text{dCTP}$ の取り込み量の測定は、以下に示した「*In vitro* でのセカンド鎖合成の測定」と同様に行った。アルカリアガロースゲル電気泳動による精製後の、0.5 μg の M13mp18 ssDNA の $[5\text{-}^3\text{H}]\text{dCTP}$ の取り込み量は 0.06 pmol で、精製前の取り込み量の 1/55 であった。

In vitro でのセカンド鎖合成の測定

標準の反応液 (12.5 μl) の組成としては、50 mM Hepes-KOH pH 7.5、60 mM NH_4OAc 、7.5 mM $\text{Mg}(\text{OAc})_2$ 、5 mM 2-メルカプトエタノール、10% (v/v) グリセリン、5 $\mu\text{g/ml}$ リファンピシン、2 mM rATP、各 50 μM dATP、dGTP、dTTP、1.0 μl (4 μM 、25 Ci/mmol) $[5\text{-}^3\text{H}]\text{dCTP}$ あるいは 0.5 μl (0.132 μM 、3000 Ci/mmol) $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{dCTP}$ 、0.5 μg 鋳型 ssDNA および 2.0 μl (12.8 μg) 無細胞系抽出液を含む。反応は 30°C で行った。 $[5\text{-}^3\text{H}]\text{dCTP}$ を用いた反応では、反応の停

止は Inuzuka と Helinski の方法に従い、500 μ l の氷冷 10% (w/v) トリクロロ酢酸、0.1 M ニリン酸ナトリウム溶液 (TCA-NaPPi 溶液) を加えて行った (Inuzuka and Helinski, 1978)。反応を停止した液のうち 41 μ l を取り、酸不溶性画分を ϕ 25 mm のガラスフィルター上に集め、2 ml の冷 TCA-NaPPi 溶液で 2 回、2 ml の冷 0.01 N HCl で 1 回、2 ml の冷エタノールで 1 回洗浄した。ガラスフィルターを乾燥させた後、液体シンチレーションカウンターで放射能を測定した。 $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{dCTP}$ を用いた反応では、反応の停止は 1.25 μ l の 500 mM EDTA pH 8.0 を加えて行い、その後 0.7% アガロースゲル電気泳動を行って反応生成物を分画した。反応生成物は、乾燥させたゲルのオートラジオグラフィーを行って観察した。

E. coli の無細胞系抽出液を用いた *in vitro* でのセカンド鎖合成反応は、上記と同じ反応液 (12.5 μ l) の組成に、12.8 μ g のタンパク質を含む *E. coli* 無細胞系抽出液を加えて行った。反応は 37°C で行い、30 分間に取り込まれた $[5\text{-}^3\text{H}]\text{dCTP}$ の量を上記と同様にして測定した。

結 果

S. lividans 内で single strand origin の有無は、pSN22 由来プラスミドのコピー数に影響を与えない

S. lividans を宿主として用い、pSN22 由来のプラスミドにおける SSO 活性の有無が、ds プラスミド分子のコピー数に与える影響を調べた。解析に用いたプラスミドの内、pRTS020N は pSN22 の SSO である *sso1* を活性を持つ方向で保持しており、一方 pRTS020O は *sso1* を活性を持たない方向で含んでいる（第一章参照）。2つのプラスミドをそれぞれ *S. lividans* TK21 株のプロトプラストに形質変換法により導入し、形質転換体を 5 μ g のチオストレプトンを含む YEME 液体培地 I で対数増殖終期まで培養した。全 DNA を抽出し、その内 1.6 μ g をプラスミド上に一個所のみ切断部位を持つ制限酵素 *Eco*RI で処理した後、アガロースゲル電気泳動で分画した。*sso1* の活性を有する、有しないに関わらず、どちらのサンプルもほぼ同じ量の ds プラスミド DNA および染色体 DNA が観察された（図 4-1）。従って *sso1* の活性の有無は、恐らく *S. lividans* が持つ SSO 非依存の、部位非特異的なセカンド鎖合成能のために、pSN22 由来プラスミドの ds 分子のコピー数に変化を与えないと考えられた。

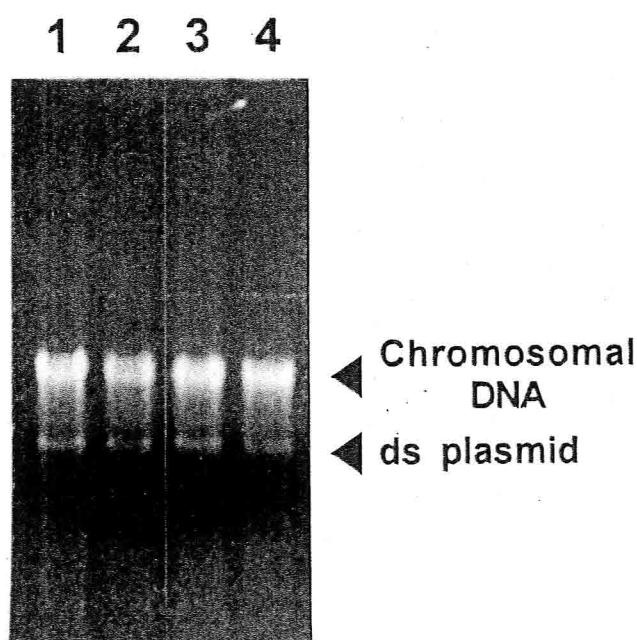


図 4-1. SSO 活性の有無のプラスミドのコピー数への影響。プラスミドを含む *S. lividans* 形質転換体の全 DNA を抽出し、1.6 μ g を *Eco*RI で処理してプラスミドを直鎖化した後、1%アガロースゲル電気泳動で分画した。泳動終了後のゲルを、臭化エチジウムで染色して観察した。レーン 1 および 2、pRTS020N (*sso1*⁺) ; レーン 3 および 4、pRTS020O (*sso1*⁻) 。

リファンピシンは、*S. lividans* 内での pSN22 由来プラスミドのセカンド鎖合成を阻害しない

Staphylococcus の RC 型プラスミドの複製では、セカンド鎖合成は宿主にコードされた RNA ポリメラーゼによるプライマー合成で開始される。RNA ポリメラーゼの阻害剤であるリファンピシンの添加は、*S. aureus* および *B. subtilis* 内でのプラスミドの複製中間体 ssDNA の蓄積を引き起こす (Boe *et al.*, 1989; Leenhouts *et al.*, 1991)。 *S. lividans* における RC 型プラスミドのセカンド鎖合成へのリファンピシンの影響を調べるため、プラスミド pRTS020N あるいは pRTS020O の形質転換体 *S. lividans* を対数増殖期まで培養し、*S. lividans* の生育を阻害する終濃度 100 µg/ml のリファンピシンを添加した。さらに 30-120 分間 30°C で振とうした後、菌体を回収して全 DNA を抽出した。アガロースゲル電気泳動でプラスミドの dsDNA 分子と ssDNA 分子を分画した後、DIG ラベルした pBluescriptII SK+ をプローブとして、サザンハイブリダイゼーション法によりプラスミド分子を検出した。ところが、*S. lividans* においては、*sso1* 活性の有無に関わらず、リファンピシンは ssDNA 複製中間体の量に変化を与えなかった (図 4-2)。この結果から、ファースト鎖合成、セカンド鎖合成共にリファンピシンによって阻害されている可能性と、プラスミド複製がリファンピシンの添加によっても全く正常に行われている可能性の二つが考えられた。そこで、以下に述べる *in vitro* での解析によって、リファンピシンの影響を検証した。

S. lividans の無細胞系抽出液を用いたセカンド鎖合成の解析

S. lividans における RC 型プラスミドのセカンド鎖合成を *in vitro* で解析するため、プラスミド非保持株 *S. lividans* TK21 より無細胞系抽出液を調製した。鋳型として用いる ssDNA は、pBluescriptII SK+ に *sso1* 断片を組み込んだ pSSO021 (*sso1*⁺) および pSSO020 (*sso1*⁻) よりヘルパーファージ VCSM13 を用いて調製し、アルカリアガロースゲル電気泳動で精製した。

セカンド鎖合成反応は 30°C で行い、[5-³H]dCTP の鋳型 ssDNA 上への取り込みを、液体シン

チレーションカウンターで測定した。*In vitro*でのセカンド鎖合成では、*ssoI*の活性の有無に関わらず、取り込み反応の速度および最終的な取り込み量にはほとんど違いが見られなかった(図4-3)。これは *in vivo*において *ssoI*のプラスミド pRTS020O が *ssoI*⁺のプラスミド pRTS020N と同じ ds プラスミド分子のコピー数を示した結果(図4-1)と一致する。しかしこの結果からでは、*ssoI*のプラスミドがなぜ菌体内で複製中間体 ssDNA を蓄積するのかは、明らかにはならなかった。

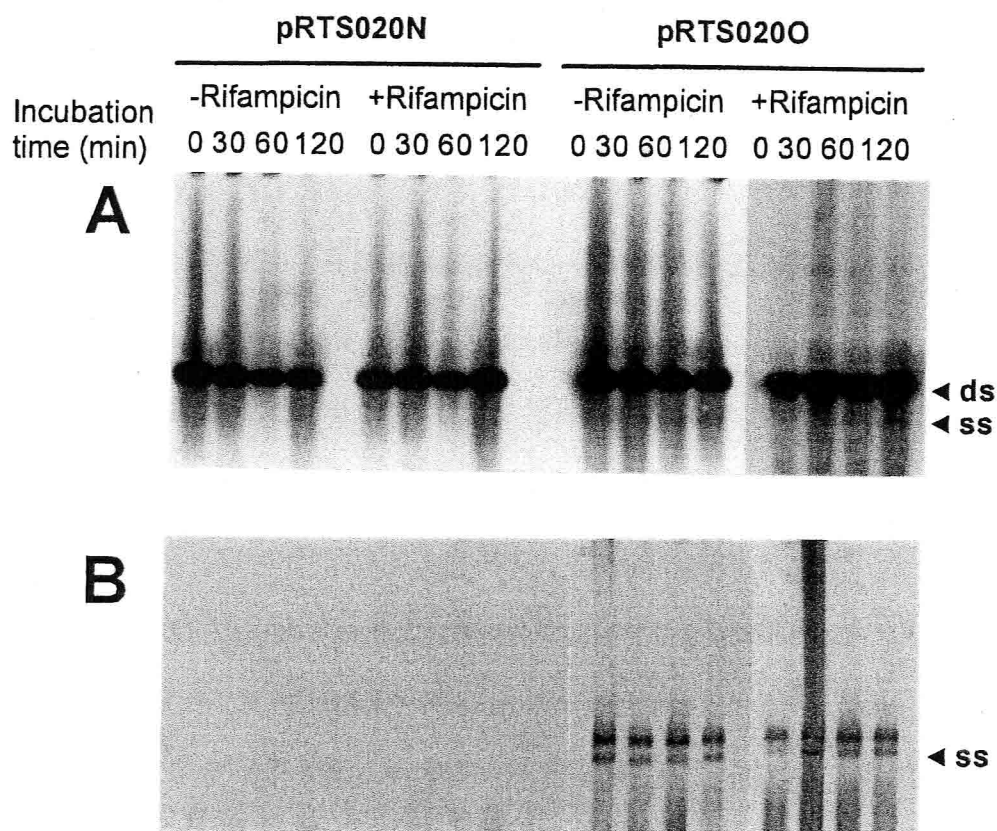


図4-2. *S. lividans* 内でのプラスミドのセカンド鎖合成へのリファンピシンの影響。プラスミド pRTS020N (*ssoI*⁺) または pRTS020O (*ssoI*⁻) を含む *S. lividans* 形質転換体の対数増殖中期の各培養液に、終濃度 100 µg/ml のリファンピシンを添加し、図に示した時間間隔で菌体を集め、全 DNA を抽出した。コントロールとして全ての培養液にアミノ酸への翻訳を阻害するエリスロマイシンを終濃度 100 µg/ml 添加し、RNA ポリメラーゼの活性の阻害による影響と区別した。1.6 µg の全 DNA を 1%アガロースゲル電気泳動で分画し、サザンハイブリダイゼーション法によって ss (線状または環状) および ds (*EcoRI* 処理により直鎖化) のプラスミド分子を検出した。(A) ゲルをアルカリ変性後、ナイロン膜に DNA をブロッティングしたもの。(B) ssDNA だけを検出するために、アルカリ変性を行わずに DNA をナイロン膜にブロッティングしたもの。

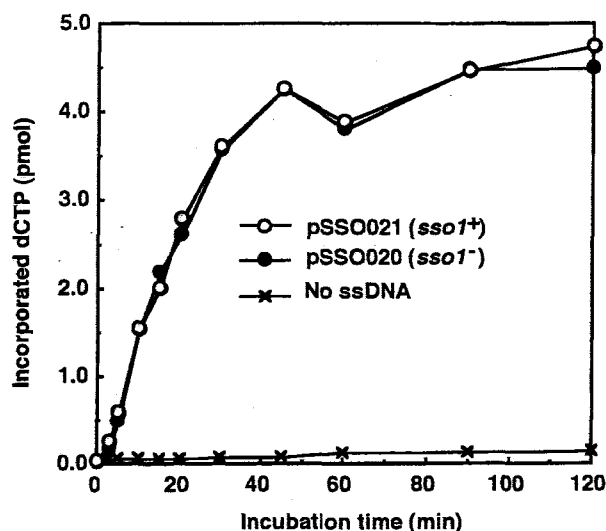


図 4-3. *S. lividans* TK21 株の無細胞系抽出液を用いた *in vitro* セカンド鎖合成の経時変化。対数増殖期の細胞からの抽出液を使用した。反応液 (300 μ l) は、[5-³H]dCTP を使用した標準の活性測定組成を用い、30°C で反応を行った。12.5 μ l ずつを経時的に取り出して、あらかじめ分注した 500 μ l の氷冷 TCA-NaPPi 溶液に加えて反応を停止し、酸不溶性画分中に取り込まれた ³H ラベルした dCTP の量を測定した。鋳型として pSSO021 (*ssoI*⁺; ○) および pSSO020 (*ssoI*⁻; ●) の ssDNA を 12 μ g ずつ使用した。×印は鋳型 ssDNA を含まない反応。

この *S. lividans* 無細胞系抽出液による SSO 非依存のセカンド鎖合成について、アルカリアガロースゲルで精製した M13mp18 の ssDNA を鋳型として用い、さらに解析した。[α -³²P]dCTP の M13mp18 ssDNA への取り込みを、アガロースゲル電気泳動後オートラジオグラフィーにより観察した。図 4-4 に示したように、鋳型 ssDNA 上でのセカンド鎖合成により dsDNA の位置にシフトしたバンドが見られた。バンドの位置はレーンによって多少異なるが、現在のところ原因は不明である。5 μ g/ml のリファンピシンの添加は、セカンド鎖合成に全く影響を与えなかった (図 4-4A、レーン 2)。さらに驚いたことに、rATP 以外の 3 種類の rNTP を除いた場合でも、セカンド鎖合成は影響を受けずに行われた (図 4-4A、レーン 3、4、および図 4-4B、レーン 1)。4 種類の rNTP 全てを除いた場合、対数増殖期の細胞より調製した無細胞系抽出液では、セカンド鎖合成によるバンドが認められた (図 4-4A、レーン 5)。しかし、定常期の細胞より調製した無細胞系抽出液を用いた場合、全ての rNTP を除くとセカンド鎖合成によるバンドは見られなかった (図 4-4B、レーン 3)。rATP の代わりに他の rNTP を用いた場合、セカンド鎖合成は観察

された（図 4-4B、レーン 2、および表 4-2）。対数増殖期の細胞抽出液では、rATP あるいは他の rNTP の添加によるセカンド鎖合成活性の増加は 20-40%であったが、定常期の細胞抽出液では、セカンド鎖合成反応には rATP あるいは他の rNTP が必須であった（表 4-2）。そこで $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{rATP}$ の鋳型 ssDNA 上への取り込みを調べてみたが、4 種類全ての rNTP が存在して RNA プライマーが形成される条件下でも、鋳型 ssDNA 上への取り込みは観察されなかった（データ不掲載）。

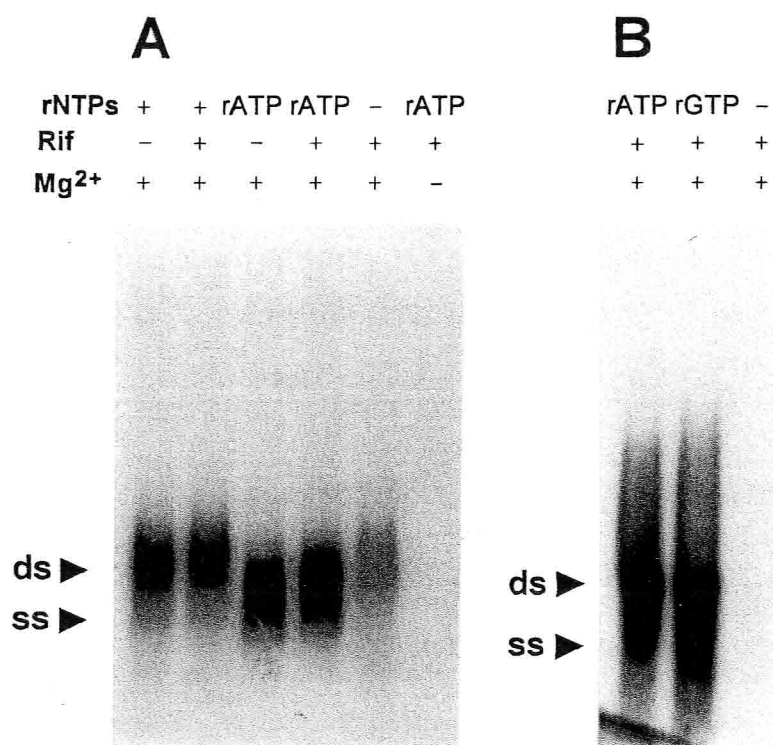


図 4-4. 異なる生育状態の細胞からの抽出液における、rNTP、リファンピシンおよび Mg^{2+} の影響。*S. lividans* の無細胞系抽出液を、（A）対数増殖期および（B）定常期の細胞より調製した。 $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{dCTP}$ および鋳型として M13mp18 の ssDNA を含む反応液を用い、 30°C で 30 分間反応を行った。反応終了後、サンプルを 0.7% アガロースゲル電気泳動で分画し、ゲルを乾燥させて、オートラジオグラフィーにより反応生成物を観察した。図中に示した各物質の濃度は次の通り；rNTP、2 mM rATP、各 500 μM rCTP、rGTP、rUTP；rATP、2 mM rATP のみ；rGTP、2 mM rGTP のみ；Rif、5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ リファンピシン； Mg^{2+} 、7.5 mM $\text{Mg}(\text{OAc})_2$ 。図中の ss、ds は鋳型として用いた M13mp18 の ss および dsDNA 分子の位置を示す。

表 4-2. *S. lividans* 無細胞系抽出液による *in vitro* でのセカンド鎖合成の性質。セカンド鎖合成反応は、0.5 μg の M13mp18 ssDNA を鋳型とした標準の組成の反応液 (12.5 μl) をもとに、30°C で 30 分間行った。

Reaction mixture		Exponential phase (%)	Stationary phase (%)
Complete ^a		100	100
- M13mp18 ssDNA		1	14
- Cell-free extract		0	0
- dATP, dGTP, dTTP		1	17
rATP dependency	- rATP	70 - 82	28
	+ 2 mM rCTP	100	100
	+ 2 mM rGTP	100	93
	+ 2 mM rUTP	100	100
	+ 2 mM ADP	100	93
Mg ²⁺ dependency - Mg(OAc) ₂		3	9

^a 標準の反応液の組成での [5-³H]dCTP の取り込みは、対数増殖期の細胞抽出液を用いた場合 1.84 pmol、定常期の細胞抽出液を用いた場合は 0.286 pmol。

無細胞系抽出液中および鋳型 ssDNA 上に RNA が内在して、これが分解されて rNTP を供給している可能性が考えられたので、無細胞系抽出液および鋳型 ssDNA を 90 units/ml の RNase A あるいは RNase T1 で処理し、NAP-10 カラム (Pharmacia, Uppsala, Sweden) を用いて分解されたオリゴヌクレオチドを除去した。この RNase 処理による [5-³H]dCTP の取り込みには影響が見られず (データ不掲載)、内在する RNA を利用してプライマー合成を行っているの

はないことが明らかとなった。

S. lividans の *in vitro* でのセカンド鎖合成反応は、 Mg^{2+} を要求した (図 4-4A、レーン 6、および表 4-2)。反応の至適 Mg^{2+} 濃度は、7.5 mM であった (図 4-5A)。鋳型 ssDNA への dCTP の取り込みの至適 pH は、7.5 であった (図 4-5B)。図 4-5C に、反応に対する鋳型 ssDNA 量の影響を示した。最大の取り込みは 0.5 μ g の M13mp18 ssDNA で得られ、この時の反応液 12.5 μ l 中の無細胞系抽出液の至適量は、タンパク質量にして 12.8 μ g (2 μ l ; 図 4-5D) であった。セカンド鎖合成反応は鋳型 ssDNA および 4 種類の dNTP を要求し、ターミナルデオキシリボヌクレオチルトランスフェラーゼによる 1 種類の dNTP で鋳型非依存的に起こる DNA 伸長反応ではないことが示された。

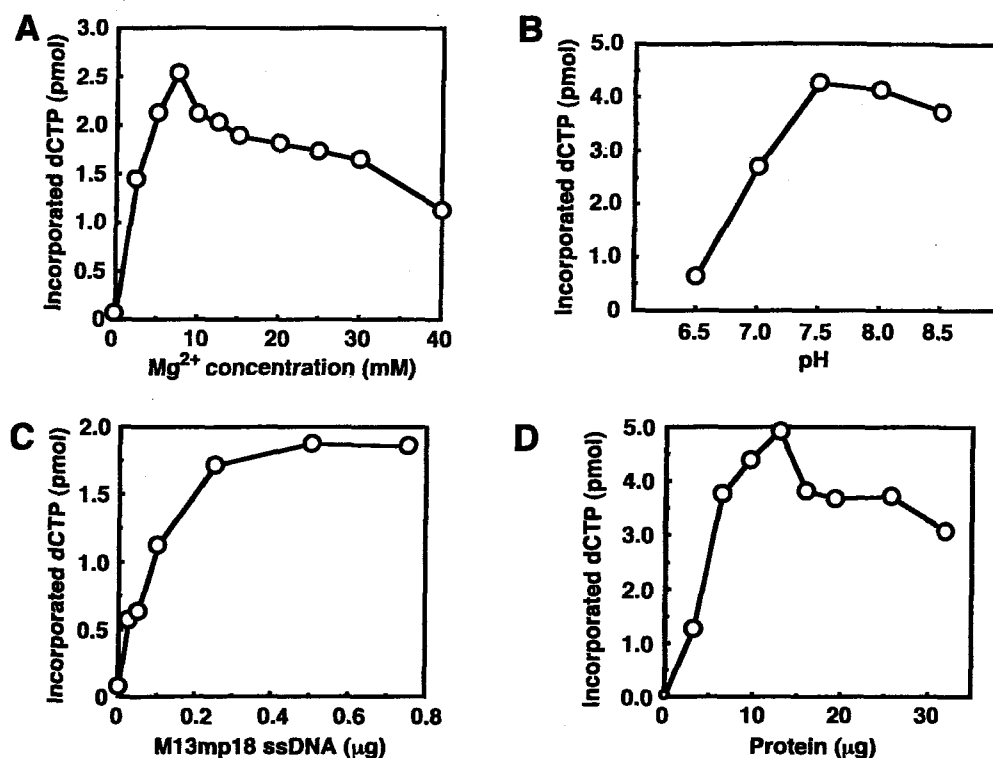


図 4-5. *S. lividans* 無細胞系抽出液による *in vitro* セカンド鎖合成における、反応液中の (A) Mg^{2+} 、(B) pH、(C) 鋳型 ssDNA の量、(D) タンパク質の量の影響。反応液は標準の組成をもとに、図に示されたそれぞれの $Mg(OAc)_2$ 濃度、Hepes-KOH 緩衝液の pH、M13mp18 の ssDNA 量、対数増殖期の細胞抽出液の量に調整して、30°C で 30 分間反応を行った。

S. lividans および *E. coli* 無細胞系抽出液を用いた *in vitro* セカンド鎖合成の比較

*In vitro*での解析の結果から、*S. lividans*の無細胞系抽出液によるセカンド鎖合成反応は、*E. coli*の“general priming”と呼ばれる反応によく似ていると考えられた。General primingによる*in vitro*でのセカンド鎖合成は、*E. coli*のssDNA フェージ ϕ X174等で研究されている(Kornberg and Baker, 1992)。宿主染色体DNA上にコードされたDnaBタンパク質とプライマーゼが、*in vitro*で鋳型ssDNA上にSSO非依存の部位非特異的なプライマー合成を行う。このプライマー合成反応はリファンピシン耐性で、rATPと4種類のdNTPを必要とする(McMacken and Kornberg, 1978)。プラスミド非保持株*E. coli* BL21より無細胞系抽出液(fraction II, Fuller *et al.*, 1981)を調製し、アルカリアガロースゲル電気泳動によって精製したM13mp18 ssDNAを鋳型として、*S. lividans*と*E. coli*のSSO非依存のセカンド鎖合成を比較した。M13mp18のSSO(minus-strand origin)は、宿主*E. coli*のRNAポリメラーゼによって認識される(Kaguni and Kornberg, 1982)ため、反応にリファンピシンを加えた状態でSSO依存のプライマー合成を阻害できる。[5-³H]dCTPの取り込みを測定した結果(表4-3)、*E. coli*の無細胞系抽出液を用いた反応では、リファンピシンの添加で活性が37%にまで阻害され、さらにrNTPのうちrATPのみを加えた反応(general priming)では、もとの活性の1/5の取り込み量しか示さなかった。一方*S. lividans*の無細胞系抽出液を用いた反応では、リファンピシンの添加によっても活性は20%ほどしか阻害されなかった。さらにrNTPのうちrATPのみ加えた反応では、4種類のrNTPを含む場合と取り込み量は変わらず、*E. coli*のgeneral primingと比較して4倍の活性を示した。

表 4-3. *S. lividans* および *E. coli* 無細胞系抽出液による、SSO 非依存的なセカンド鎖合成の rNTP およびリファンピシンによる影響。反応は、*S. lividans* の抽出液を用いたものでは 30°C、*E. coli* の抽出液を用いたものでは 37°C で、30 分間行った。

rNTPs	Rifampicin ^c	<i>S. lividans</i> cell-free extract ^d (%)	<i>E. coli</i> fraction II (%)
+ ^a	-	100 ^e	100 ^f
+ ^a	+	79	37
rATP ^b	+	79	21
-	+	58	8

^arNTPs : 2 mM rATP、各 500 μM rCTP、rGTP、rUTP。

^brATP : 2 mM rATP のみ。

^cRifampicin : 5 μg/ml リファンピシン。

^d 対数増殖期の細胞抽出液を使用。

^e3.72 pmol の[5-³H]dCTP が取り込まれた。

^f1.84 pmol の[5-³H]dCTP が取り込まれた。

考 察

*S. lividans*において pSN22 の *ssol* の有無は、ds プラスミド分子のコピー数に影響を与えなかった。*S. lividans* 中では RC 型プラスミドは、SSO を欠損していても高いコピー数を維持できる (Deng *et al.*, 1988; Zaman *et al.*, 1993a) が、これは SSO 非依存の部位非特異的なプライマー合成が起こっているからと考えられていた。例えば、プラスミド pIJ101 由来のクローニングベクター pIJ702 では、野生型の pIJ101 が染色体 DNA あたり約 400 コピーあるのに対し、SSO を含まない pIJ702 では数は減少するものの依然として染色体 DNA あたり約 100 コピーが存在する (Zaman *et al.*, 1993a)。一方 pSN22 では、SSO の有無に関わらずプラスミドのコピー数はほぼ同じであった。この原因は明らかではないが、野生型の pSN22 のコピー数が pIJ702 よりも少ない (50 コピー以下、第三章 表 3-1 参照) ためであるという仮説が考えられる。即ち、本章の *in vitro* での解析で明らかになった SSO 非依存のセカンド鎖合成によって、*S. lividans* は 100 コピー程度までなら複製中間体 ss プラスミドを ds プラスミドに変換できるが、pSN22 のコピー数は 50 以下に制御されているため、結果的に SSO が存在していても SSO が無い場合と同じコピー数になる。

In vitro でのセカンド鎖合成は、*ssol* の活性によっては増加しなかった。これは *in vivo* で *ssol* が ssDNA の蓄積を防ぐ強い活性を持っている (図 4-2 参照) のと対照的である。これは、調製した無細胞系抽出液中に、SSO で優先的にプライマー合成を行わせる何らかの因子が含まれていなかったためと考えることができる。例えば *E. coli* では、セカンド鎖合成の開始点の配列をプライマー合成を行う因子に認識させる役割に、ssDNA 結合タンパク質 (single-stranded DNA binding protein; SSB) が関与している (Arai and Kornberg, 1979)。*S. lividans* の SSB はまだ発見されていないが、無細胞系抽出液中にはほとんど見出されることが判っている (横山、緒方; 私信)。*E. coli* の SSB (Stratagene) が、*S. lividans* の *in vitro* のセカンド鎖合成における *ssol* の認識に役立つかどうかを試したが、有為な影響は見られなかった (データ不掲載)。従って、*S. lividans* における RC 型プラスミドの SSO の認識を行う因子については、さらなる

研究が必要である。

S. lividans の無細胞系抽出液によるセカンド鎖合成は、*S. aureus* の無細胞系抽出液によるセカンド鎖合成 (Birch and Khan, 1992; Dempsey *et al.*, 1995) と異なり、リファンピシンによる阻害を受けなかった。リファンピシン耐性のセカンド鎖合成としては、グラム陽性菌では他に *L. lactis* のプラスミド pVWO1 が知られていてのみである (Leenhouts *et al.*, 1991; Seegers *et al.*, 1995)。このセカンド鎖合成が必要とする rNTP は 1 種類のみで、 $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{rATP}$ の取り込みも観察されなかったことから、セカンド鎖合成のプライマーは RNA プライマーではなく、DNA プライマーである可能性が考えられる。但し、Dempsey らは *S. aureus* の *in vitro* のセカンド鎖合成において、RNA プライマーは鋳型 ssDNA 上に検出できなかったと述べており (Dempsey *et al.*, 1995)、*S. lividans* で $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{dCTP}$ の取り込みが見られなかったことも、RNA プライマーがすでに鋳型上から除去されていたためとも考えられる。

rATP は、定常期の菌体から調製した無細胞系抽出液によるセカンド鎖合成を、特に活性化した。定常期と対数増殖期の菌体から調製した抽出液では rATP による活性化に違いが見られたが、これは無細胞系抽出液の調製時に透析が不完全だった為ではない。対数増殖期の細胞抽出液の、定常期のそれと比較して低い rATP 要求性は、さらに抽出液を TSK-gel HW-55 ゲルろ過クロマトグラフィー (東ソー、東京) で部分的に精製した後も変化が無かった (データ不掲載)。

E. coli の無細胞系抽出液による general priming の活性は、抽出液全体の持つセカンド鎖合成活性の 1/5 程度であった。一方、*S. lividans* の無細胞系抽出液によるリファンピシン耐性、SSO 非依存のセカンド鎖合成の活性は、*E. coli* の general priming よりも高いことが明らかとなった。この高い SSO 非依存のセカンド鎖合成能が、SSO の欠損や SSO を逆向きに挿入することによる不活性化が、*S. lividans* の細胞内において pSN22 由来のプラスミドのコピー数に影響しない原因と考えられる。興味深いことに、対数増殖期の細胞から調製した無細胞系抽出液は、*E. coli* の抽出液と比較しても rNTP 要求性が低いのに対し、定常期の細胞からの抽出液では、rNTP はセカンド鎖合成の活性に必須であった。*Streptomyces* における気中菌糸形成や二次代謝産物の生産には、タンパク質のリン酸化によるシグナル伝達によって制御されるものが存在する

(Beppu, 1995)。従って上記の結果より、*Streptomyces* の DNA 複製機構も、タンパク質のリン酸化による制御を受けている可能性が示唆される。セカンド鎖合成に関与する因子は、対数増殖期中は活性化されているが、定常期には不活化されている。従って、rNTP を加えることにより、*in vitro* では定常期の細胞からの抽出液のセカンド鎖合成を活性化できると推察される。この SSO 非依存の、リファンピシン耐性のセカンド鎖合成は、RC 型プラスミドの複製機構だけでなく、*S. lividans* の染色体 DNA のラギング鎖複製のモデルとしても用いることができると考えられる。

終章

総論

終章 総論

本論文では、放線菌ローリングサークル (rolling circle; RC) 型プラスミドより遺伝子操作に用いるための優れたベクターを開発するために、放線菌 RC 型プラスミド pSN22 の複製機構について解析を行い、より多くのプラスミド複製機構に関する情報を集めることを目的とした。

第一章では、pSN22 の RC 型複製において、複製中間体一本鎖 (single-stranded; ss) DNA のラギング鎖複製の開始点となる single strand origin (SSO)、*sso1* を同定した。この *sso1* は、先に片岡らが報告した *ori2* (Kataoka *et al.*, 1994b) とは異なる位置、*spdA* と *traR* の間の非コード領域に存在した。*sso1* と他の放線菌 RC 型プラスミド pIJ101、pJV1 の SSO 領域を比較した結果判明した約 170 bp の保存配列は、今のところ他のグラム陽性菌由来の RC 型プラスミドの SSO との相同性は見出されず、放線菌 RC 型プラスミド独自の SSO が存在することが明らかとなった。

今後の課題として、*sso1* がプラスミドの不和合性に関与する strong incompatibility (Sti) 活性を持つかどうかに興味を持たれる。pIJ101 および pJV1 の SSO 領域は、Sti 活性も持つことが知られている (Deng *et al.*, 1988; Zaman *et al.*, 1993a; Servín-González *et al.*, 1995)。一方、片岡らの報告では、pSN22 には Sti 活性は見られない (Kataoka *et al.*, 1994b)。しかし、今回同定された *sso1* と他の SSO の相同性を考慮して、再度 *sso1* の Sti 活性を確認し、SSO 活性と Sti 活性が分離できるかどうかを調べる必要がある。現在のところでは、SSO の活性の有無がプラスミドの不和合性に影響を与えると考えられているが、もし *sso1* に Sti 活性が無ければ、Sti の活性は未知の機構によるものと考えなくてはならない。これについては、現在研究の準備中である。

第二章では、先に片岡らによって報告された (Kataoka *et al.*, 1994b)、実は pSN22 上とは逆向きに挿入されたときに SSO 活性を有する *ori2* 断片上の 2 つの SSO、*sso2* および *sso3* の同

定を行った。*sso2* および *sso3* は、*sso1* とは対照的に、他の放線菌 RC 型プラスミドの SSO とは相同性を示さず、予測されるステム・ループ上に *Staphylococcus* 由来の RC 型プラスミドの SSO などに見られる 6 塩基の保存配列に類似した配列を持つことから、むしろ *Staphylococcus* 型の SSO であると考えられる。但し、*sso2* および *sso3* のサイズは、他のグラム陽性菌 RC 型プラスミドの SSO (130-220 bp、Gruss and Ehrlich, 1989) に比べて非常に小さいことが特徴的である。

今後の課題として、この pSN22 のラギング鎖上に存在する *sso2* および *sso3* の、プラスミドにおける機能の解析が挙げられる。*sso2* および *sso3* は pSN22 の RC 型複製に利用されるとは考えられないが、*sso1* と同等の SSO 活性を維持しているため、何らかの役割を持つ可能性がある。特に、これは *sso1* も含めてではあるが、プラスミドの接合伝達においてこれらの SSO が何らかの役割を果たすかどうか注目される。*E. coli* 等と同様に放線菌の接合伝達においても ssDNA が移行するならば、移行後のプラスミドのセカンド鎖合成に関与できる SSO の有無が、接合伝達に影響を与える可能性が考えられる。これについても現在、研究の準備を行っている。

第三章ではプラスミドの RC 型複製の最初の開始点となる、double strand origin (DSO) に注目し、予測されたニッキング部位に点突然変異を導入して複製への影響を調べた。得られた結果より、ニッキング部位の保存配列は（恐らく）プラスミド上にコードされる Rep タンパク質によって、厳密に認識されていることが示唆された。これは Brasch と Cohen の pIJ101 の DSO に関する報告とは異なり、彼らの示したニッキング部位の領域を欠失してもプラスミドが複製することが出来る、という結果 (Brasch and Cohen, 1995) とは一致しなかった。彼らの実験法は今回の実験法とはあまりにも異なるため、これについての議論は難しく、今後 pIJ101 においても、同様の点突然変異を用いた解析が行われることを期待する。

興味深い点として、ニッキング部位の下流より急に pSN22 の塩基配列が pIJ101 と高い相同性を示すことがあげられる。逆に、全体的に pSN22 と高い相同性を示す *Streptomyces phaeochromogenes* 由来のプラスミド pJV1 (図 5-1 参照) は、*rep* 領域の相同性だけが異常に

低い (Servín-González *et al.*, 1995)。従って、予測された配列が実際にニッキング部位として機能しているのならば、第三章図 3-4 に示したような pSN22 生成の仮説が考えられる。

今後の *dso* および *rep* 領域の研究の課題としては、まずプラスミドのコピー数制御の問題が挙げられる。今回用いた変異プラスミド pRTS7823 は、野生型のプラスミド pRT1 より若干高いコピー数を示した (第三章、表 3-1)。放線菌プラスミドのコピー数制御の問題には、まだ全く手がつけられていないため、現在この原因は不明である。次に、Rep タンパク質の結合部位の研究が考えられる。今回比較を行った 3 つの DSO における 1 番目の保存配列 (第三章、図 3-2) が、Rep タンパク質の結合部位である可能性は高い。DSO および *rep* については、SSO と異なりこれが複製の必須領域であるにもかかわらず、領域限定以上の研究がほとんど行われていないのが現状である。

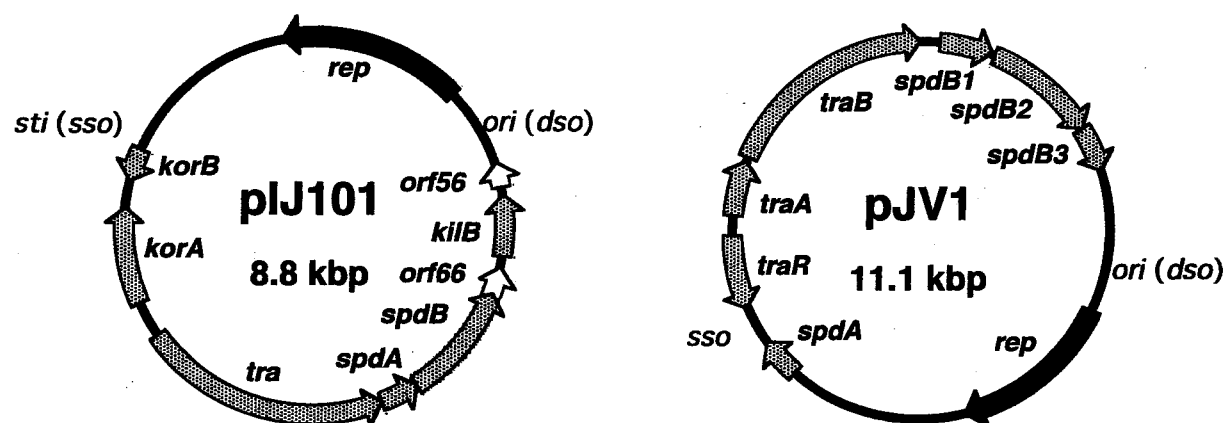


図 5-1. 放線菌プラスミド pIJ101 (Kendall and Cohen, 1988 より改変) および pJV1 (Servín-González *et al.*, 1995 より改変) の構造。pJV1 は全体的に pSN22 とよく似た構造を持つ。

第四章においては前章までのプラスミド上の因子に関する解析とは異なり、宿主 *Streptomyces lividans* における SSO 非依存的なセカンド鎖合成機構についての解析を行った。pIJ101 では SSO 欠損によってコピー数が減少することが知られている (Deng *et al.*, 1988; Zaman *et al.*, 1993a) が、それでも細胞内には 1 染色体 DNA あたり 100 コピー以上が維持されており、プラスミドは安定に分配、保持される。この原因は宿主 *S. lividans* が、SSO を欠損したプラスミドの複製中間体 ssDNA 上にも部位非特異的に複製のプライマーを合成する機能を持ったためと考えられ、そのために今まで放線菌 RC 型プラスミドの SSO は研究の対象とならなかったと推察される。

S. lividans の無細胞系抽出液を用いた *in vitro* でのセカンド鎖合成の解析の結果、*S. lividans* は SSO 非存在下でも高いセカンド鎖合成能を持つことを示した。興味深いことに、この活性はリファンピシンに対して耐性を示し、プライマー合成が RNA ポリメラーゼによるものではないことが明らかとなった。この結果は、*S. lividans* のセカンド鎖合成の機構が、*Staphylococcus aureus* において知られている RNA ポリメラーゼによるセカンド鎖合成機構 (Birch and Khan., 1992; Dempsey *et al.*, 1995) とは全く異なることを示している。

また、対数増殖期の細胞からの抽出液を用いた反応で rNTP を必須としないことから、このプライマー合成因子は少なくとも *in vitro* ではプライマーの合成に dNTP を利用出来ることが示唆された。*Escherichia coli* のプライマーゼもリファンピシン耐性を示し、DnaB タンパク質存在下で鋳型 ssDNA 上に部位非特異的にプライマーを合成できる (Arai and Kornberg, 1979)。このプライマーゼも dNTP をプライマー合成に利用できることが知られているが、*S. lividans* と *E. coli* の無細胞抽出液を用いた比較の結果、*S. lividans* の方がセカンド鎖合成反応における抽出液全体としての rNTP 要求性が低いことを示した (第四章、表 4-3)。*S. lividans* の細胞内では DNA プライマーが合成されているのか、またこのプライマー合成因子は *E. coli* のプライマーゼとはどのように異なるのかは、今後の研究の課題として残される。

定常期の *S. lividans* の細胞より調製した抽出液は、セカンド鎖合成に rATP あるいは他の rNTP を要求した。従って、*S. lividans* のセカンド鎖合成能は、rATP もしくは他の rNTP によ

って活性を制御されている可能性が示唆される。放線菌においては最近タンパク質のリン酸化／脱リン酸化が気中菌糸の分化や二次代謝を制御していることが明らかになっており (Beppu, 1995)、これらの結果が *S. lividans* の DNA 複製にもタンパク質のリン酸化による制御機構の存在の可能性を示している点は興味深い。

今後の最も重要な課題は、*in vitro* のセカンド鎖合成において SSO に対する特異性を持たせることである。本来この章における研究は、SSO を認識する宿主側の因子を探索する目的を持っていたが、残念ながら無細胞系抽出液を用いた反応では、SSO に対する特異性は全く示されなかった。RC 型プラスミドでは、SSO が宿主によって認識されるかどうか、プラスミドの宿主域に影響を与えるといわれている。*S. lividans* において SSO に対する特異性に関与する因子を同定すれば、放線菌におけるプラスミドの宿主域の研究に重要な情報が得られると考えられる。

今回同定した SSO を放線菌 RC 型プラスミドベクターに組み込むことにより、ベクターを長期間、構造的に安定に細胞内に保持することが出来ると考えられる。SSO を持たないプラスミドベクターは、宿主細胞内に複製中間体 ssDNA を蓄積し、それが自身や染色体 DNA と組み換えを起こし易いことから、構造的に不安定であることが知られている (序章、図 0-2)。従ってこのようなベクターは、長期間細胞内に保持するには適していない。特にこの傾向は、著者の経験では *E. coli* とのシャトルベクターにしたプラスミドにおいて強く見られる。また Pigac らも、シャトルベクターでは放線菌細胞内で欠失が起り易いと述べている (Pigac *et al.*, 1988)。余談ながら、この欠失したプラスミドを含む *S. lividans* 形質転換体の全 DNA を用いて再び *E. coli* の形質転換を行うと、正常なシャトルプラスミドが得られることから (データ不掲載)、欠失はどちらかといえば *E. coli* のプラスミド由来の部分に起り易いと推察されるが、それが放線菌プラスミドの高い GC 含量と関連しているのかどうか、詳細は不明である。

また前述のように、SSO が宿主内で活性を持つかどうか、放線菌においてもプラスミドの宿主域を決定する可能性があることから、今まで既知のベクターが使用できなかった放線菌株に対し、SSO を組み込んだベクターを用いてみるのも興味深い。SSO を組み込むことにより、様々

な放線菌株で複製可能な広宿主域ベクターが開発できるかもしれない。SSO 活性の有無が宿主域に影響を与えるかどうかの解析は、pSN22 を用いて現在準備を行っている。

最後に、同定した SSO を実際にベクターに組み込んだ例を示す。*sso1* だけでなく、*sso2* や *sso3* も、pSN22 上での役割は不明であるものの、プラスミドに組み込めば SSO としての機能が期待できる。図 5-2A に示したプラスミドは、当研究室において竜田らによって作製された、pSN22 由来の温度調節型遺伝子発現システム (Kataoka *et al.*, 1996) を用いた放線菌温度調節型遺伝子発現ベクター、pSNT107 である。このプラスミドは *E. coli* とのシャトルベクターになっており、遺伝子の組み込みは *E. coli* を宿主として行うことが出来るようになっている。pSNT107 は遺伝子発現のプロモーターとして、pSN22 の transfer gene regulating element (TRE) を用いているが、TRE 領域内には第二章で同定した *sso2* が含まれている。pSNT107 上では *sso2* は活性を持つように *dso-rep* に対して逆方向に組み込まれているため、図 5-2B に示したように複製中間体 ssDNA は蓄積されない。従って、pSNT107 は SSO を持たない他の放線菌 RC 型プラスミドベクターに比べ、宿主細胞内で構造的に安定に保持されると考えられる。

放線菌における宿主・ベクター系の開発における最大の問題点は、抗生物質等の物質生産を行う数限りない放線菌群に対し、それぞれ最適な遺伝子操作系を作らなくてはならないことである。形質転換法でも、最適なプロトプラスト作製法、最適なエレクトロポレーション法などは各放線菌株毎に調べなければならない。ベクターについても、全ての放線菌株において増殖できる、万能なプラスミドベクターは現在のところ無い。個々の放線菌株に対して従来のベクターを試し、それが合わなければその放線菌自身が持つプラスミドを探し、運良く見つかった場合は自力でベクターを構築するしか今のところ方法はない。従って、放線菌プラスミドの複製機構の研究は、「特定の宿主、プラスミドについて深く」よりも、「多くの宿主、多くのプラスミドについて、広く浅く」行われているのが現状であり、それが個々の放線菌プラスミドの複製機構の解析がなかなか進まない原因ともなっている。

本論文では、今までの放線菌プラスミドの複製の研究が、必須領域の限定やその DNA 塩基配列の決定等、取りあえずベクターとして使えることに重点が置かれたものに留まっていたのに対し、従来あまり注目されなかった部分、SSO・DSO の構造や、宿主 *S. lividans* における部位非特異的なセカンド鎖合成についての解析を行った。従って、内容については一見「重箱の隅をつつく」観があるのは否めない。しかし、これらの情報を含め、序章等にした放線菌プラスミドの複製機構研究における各問題点、疑問点の解決が、放線菌 RC 型プラスミドベクターを一層使い易くするために必ず役立つと、筆者は考える。

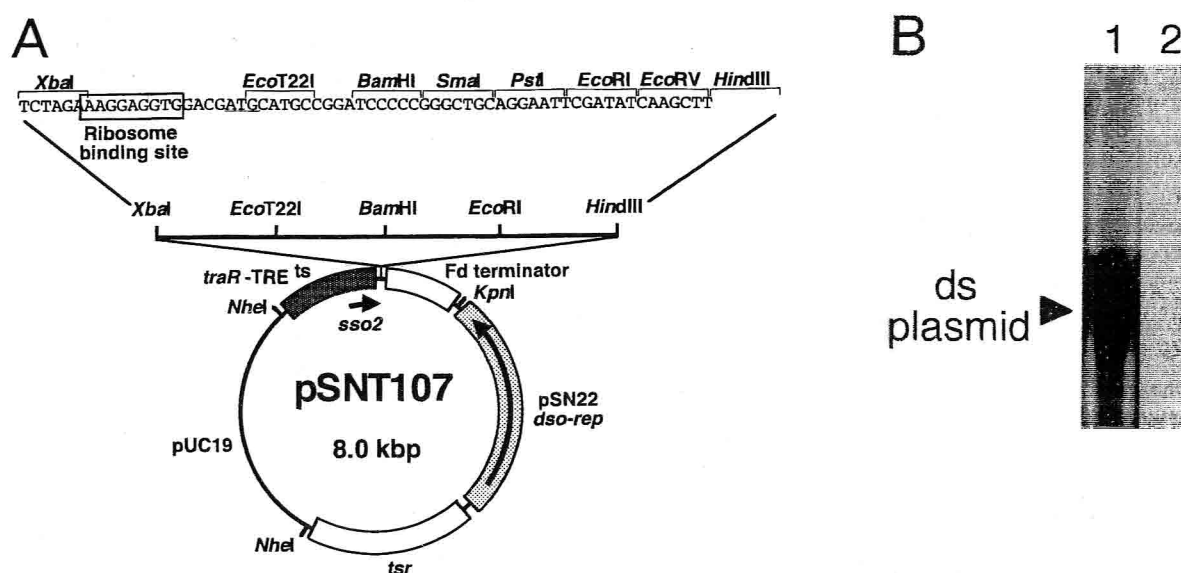


図 5-2. (A) 放線菌温度調節型遺伝子発現ベクター pSNT107 (竜田、1996)。TRE 領域の転写を抑制する *traR* 遺伝子産物に温度感受性突然変異を持つため、培養温度をコントロールすることにより遺伝子発現の制御が可能である。(B) pSNT107 は *S. lividans* の細胞内で ssDNA 複製中間体を蓄積しない。pSNT107 を導入した *S. lividans* の全 DNA より、サザンハイブリダイゼーション法によりプラスミドを検出した。レーン 1、アルカリ変性処理後ブロッティング；レーン 2、アルカリ変性を行わずにブロッティング。

参考文献

- Arai, K., and Kornberg, A. (1979). A general priming system employing only *dnaB* protein and primase for DNA replication. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **76**, 4308-4312.
- Baltz, R. H. (1995). Gene expression in recombinant *Streptomyces*. In *Gene expression in recombinant microorganisms*. Smith, A. (ed.) New York: Marcel Dekker, Inc. pp. 309-381.
- Beppu, T. (1995). Signal transduction and secondary metabolism: prospects for controlling productivity. *Trends Biotechnol.* **13**, 264-269.
- Birch, P., and Khan, S. A. (1992). Replication of single-stranded plasmid pT181 DNA *in vitro*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**, 290-294.
- Boccard, F., Smokvina, T., Pernodet, J.-L., Friedmann, A., and Guérineau, M. (1989). The integrated conjugative plasmid pSAM2 of *Streptomyces ambophaciens* is related to temperate bacteriophages. *EMBO J.* **8**, 973-980.
- Boe, L., Gros, M. -F., te Riele, H., Ehrlich, S. D., and Gruss, A. (1989). Replication origins of single-stranded-DNA plasmid pUB110. *J. Bacteriol.* **171**, 3366-3372.
- Brasch, M. A., and Cohen, S. N. (1995). Sequence essential for replication of plasmid pIJ101 in *Streptomyces lividans*. *Plasmid* **33**, 191-197.
- Calcutt, M. J., and Schmidt, F. J. (1992). Conserved gene arrangement in the origin region of the *Streptomyces coelicolor* chromosome. *J. Bacteriol.* **174**, 3220-3226.
- Chater, K. F. (1993). Genetics of differentiation in *Streptomyces*. *Annu. Rev. Microbiol.* **47**, 685-713.
- Chung, S. T. (1987). Tn4556, a 6.8 kilobase-pair transposable element of *Streptomyces fradiae*. *J. Bacteriol.* **169**, 4436-4441.
- Chung, S. T. (1988). Transposition of Tn4556 in *Streptomyces*. *Dev. Ind. Microbiol.* **29**, 81-88.
- Conrad, S. E., and Campbell, J. L. (1979). Characterization of an improved *in vitro* DNA replication system for *Escherichia coli* plasmids. *Nucl. Acids Res.* **6**, 3289-3303.
- Dempsey, L. A., Zhao, A. C., and Khan, S. A. (1995). Localization of the start sites of

- lagging-strand replication of rolling-circle plasmids from Gram-positive bacteria. *Mol. Microbiol.* **15**, 679-687.
- Deng, Z., Kieser, T., and Hopwood, D. A. (1988). "Strong incompatibility" between derivatives of the *Streptomyces* multi-copy plasmid pIJ101. *Mol. Gen. Genet.* **214**, 286-294.
- 土居克実、横山英之、緒方靖哉。(1996)。放線菌における遺伝子ターゲティングの利用。日本農芸化学会誌 **70**、889-892
- Drocourt, D., Bejar, S., Calmels, T., Reynes, J. P., and Tiraby, G. (1988). Nucleotide sequence of the xylose isomerase gene from *Streptomyces violaceoniger*. *Nucl. Acids. Res.* **16**, 9337.
- Eguchi, Y., Itoh, T., and Tomizawa, J. (1991). Antisense RNA. *Annu. Rev. Biochem.* **60**, 631-652.
- Fuller, R. S., Kaguni, J. M., and Kornberg, A. (1981). Enzymatic replication of the region of the *Escherichia coli* chromosome. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **78**, 7370-7374.
- Galli, D. M., and LeBlanc, D. J. (1994). Characterization of pVT736-1, a rolling-circle plasmid from the Gram-negative bacterium *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *Plasmid* **31**, 148-157.
- Gruss, A., Ross, H. F., and Novick, R. P. (1987). Functional analysis of a palindromic sequence required for normal replication of several staphylococcal plasmids. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **84**, 2165-2169.
- Gruss, A., and Ehrlich, S. D. (1989). The family of highly interrelated single-stranded deoxyribonucleic acid plasmids. *Microbiol. Rev.* **53**, 231-241.
- Hagège, J., Boccard, F., Smokvina, T., Pernodet, J. -L., Friedmann, A., and Guérineau, M. (1994). Identification of a gene encoding the replication initiator protein of the *Streptomyces* integrating element, pSAM2. *Plasmid* **31**, 166-183.
- Hagège, J., Pernodet, J. -L., Friedmann, A., and Guérineau, M. (1993a). Mode and origin of replication of pSAM2, a conjugative integrating element of *Streptomyces ambifaciens*. *Mol. Microbiol.* **10**, 799-812.
- Hagège, J., Pernodet, J.-L., Sezonov, G., Gerbaud, C., Friedmann, A., and Guérineau, M.

- Jansen, R. B., and Gerdes, K. (1995). Programmed cell death in bacteria: proteic plasmid stabilization systems. *Mol. Microbiol.* 17, 205-210.
- Kaguni, J. M., and Kornberg, A. (1982). The σ subunit of RNA polymerase holoenzyme confers specificity in priming M13 viral DNA replication. *J. Biol. Chem.* 257, 5437-5443.
- 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., Kosono, S., Seki, T., and Yoshida, T. (1994a). 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., Kuno, N., Horiguchi, T., Seki, T., and Yoshida, T. (1994b). Replication of the *Streptomyces* plasmid pSN22 through single-stranded intermediates. *Mol. Gen. Genet.* 242, 130-136.
- Kataoka, M., Miura-Kiyose, Y., Michisuji, Y., Horiguchi, T., Seki, T., and Yoshida, T. (1994c). Complete nucleotide sequence of the *Streptomyces nigrifaciens* plasmid, pSN22: genetic organization and correlation with genetic properties. *Plasmid* 32, 55-69.
- Kataoka, M., Tatsuta, T., Suzuki, I., Kosono, S., Seki, T., and Yoshida, T. (1996). Development of a temperature-inducible expression system for *Streptomyces* spp. *J. Bacteriol.* 178, 5540-5542.
- Katz, E., Thompson, C. J., and Hopwood, D. A. (1983). Cloning and expression of the tyrosinase gene from *Streptomyces antibioticus* in *Streptomyces lividans*. *J. Gen. Microbiol.* 129, 2703-2714.
- 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.

- 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.
- Kieser, T., Hopwood, D. A., Wright, H. M., and Thompson, C. J. (1982). pIJ101, a multi-copy broad host-range *Streptomyces* plasmid: functional analysis and development of DNA cloning vectors. *Mol. Gen. Genet.* 185, 223-238.
- Kieser, T., Hopwood, D. A., Wright, H. M., and Thompson, C. J. (1982). pIJ101, a multi-copy broad host-range *Streptomyces* plasmid: functional analysis and development of DNA cloning vectors. *Mol. Gen. Genet.* 185, 223-238.
- Kornberg, A. and Baker, T. A. (1992). *DNA replication, 2nd ed.* New York: W. H. Freeman & Co.
- Kosono, S., Kataoka, M., Seki, T., and Yoshida, T. (1996). 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.* 19, 397-405.
- Kramer, M. G., del Solar, G., and Espinosa, M. (1995). Lagging-strand origins of the promiscuous plasmid pMV158: physical and functional characterization. *Microbiol.* 141, 655-662.
- Kuhstoss, S., Richardson, M. A., and Rao, R. N. (1989). Site-specific integration in *Streptomyces ambofaciens*: Localization of integration functions in *S. ambofaciens* plasmid pSAM2. *J. Bacteriol.* 171, 16-23.
- Kuhstoss, S., Richardson, M. A., and Rao, R. N. (1991). Plasmid cloning vectors that integrate site -specifically in *Streptomyces* spp. *Gene* 97, 143-146.
- Kuhstoss, S., and Rao, R. N. (1991). Analysis of the integration function of the streptomycete bacteriophage ϕ C31. *J. Mol. Biol.* 222, 897-908.
- Lee, Y. H. W., Tzecheng, Z. Y., Wang, S. C., Cheng, W. L., and Cheng, C. W. (1986). Structural stability of heterologous genes cloned in *Streptomyces* plasmid pIJ702. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 140, 372-378.

- Leenhouts, K. J., Tolner, B., Bron, S., Kok, J., Venema, G., and Seegers, J. F. M. L. (1991). Nucleotide Sequence and characterization of the broad-host-range lactococcal plasmid pWVO1. *Plasmid* 26, 55-66.
- van der Lelie, D., Bron, S., Venema, G., and Oskam, L. (1989). Similarity of minus origins of replication and flanking open reading frames of plasmids pUB110, pTP913 and pMV158. *Nucl. Acids Res.* 17, 7283-7294.
- Lomovska, N. D., Chater, K. F., and Mkrtumian, N. M. (1980). Genetics and molecular biology of *Streptomyces* bacteriophages. *Microbiol. Rev.* 44, 206-229.
- Lydiate, D. J., Malpartida, F., and Hopwood, D. A. (1985). The *Streptomyces* plasmid SCP2*: Its functional analysis and development into useful cloning vectors. *Gene* 35, 223-235.
- Maniatis, M. G. (1973). Location of a DNA methylation gene on the *Escherichia coli* genetic map. *Mol. Gen. Genet.* 127, 47-55.
- Muth, G., Farr, M., Hartmann, V., and Wohlleben, W. (1995). *Streptomyces ghanaensis* plasmid pSG5: nucleotide sequence analysis of the self-transmissible minimal replicon and characterization of the replication mode. *Plasmid* 33, 113-126.
- Novick, R. P. (1989). Staphylococcal plasmids and their replication. *Annu. Rev. Microbiol.* 43, 537-565.
- Pernodet, J.-L., Simonet, J.-M., and Guérineau, M. (1984). Plasmids in different strains of *Streptomyces ambofaciens*: Free and integrated form of plasmid pSAM2. *Mol. Gen. Genet.* 198, 35-49.
- Picard, V., Ersdal-Badju, E., Lu, A., and Bock, S.C. (1994). A rapid and efficient one-tube PCR-based mutagenesis technique using *Pfu* DNA polymerase. *Nucl. Acids. Res.* 22, 2587-2591.
- Pigac, J., Vujaklija, D., Toman, Z., Gamulin, V., and Schrempf, H. (1988). Structural instability of a bifunctional plasmid pZG1 and single-stranded DNA formation in *Streptomyces*. *Plasmid* 19, 222-230.
- te Riele, H., Michel, B., and Ehrlich, S. D. (1986a). Single-stranded plasmid DNA in *Bacillus*

- subtilis* and *Staphylococcus aureus*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **83**, 2541-2545.
- te Riele, H., Michel, B., and Ehrlich, S. D. (1986b). Are single-stranded circular intermediates involved in plasmid DNA replication? *EMBO J.* **5**, 631-637.
- Saiki, R. K., Gelfand, D. H., Stoffel, S., Scharf, S. J., Higuchi, R., Harn, G. T., Mullis, K. B., and Erlich, H. A. (1988). Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* **239**, 478-491.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F., and Maniatis, T. (1989). *Molecular cloning: a laboratory manual*, 2nd ed. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F., and Maniatis, T. (1989). *Molecular cloning: a laboratory manual*, 2nd ed. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory.
- Sanger, F., Nicklen, S., and Coulson, A. R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74**, 5463-5467.
- Seegers, J. F. M. L., Zhao, A. C., Meijer, W. J. J., Khan, S. A., Venema, G., and Bron, S. (1995). Structural and functional analysis of the single-strand origin of replication from the lactococcal plasmid pWVO1. *Mol. Gen. Genet.* **249**, 43-50.
- Seery, L. T., Nolan, N. C., Sharp, P. M., and Devine, K. (1993). Comparative analysis of the pC194 group of rolling circle plasmids. *Plasmid* **30**, 185-196.
- Servín-González, L. (1993). Relationship between the replication functions of *Streptomyces* plasmids pJV1 and pIJ101. *Plasmid* **30**, 131-140.
- Servín-González, L. (1996). Identification and properties of a novel *clt* locus in the *Streptomyces phaeochromogenes* plasmid pJV1. *J. Bacteriol.* **178**, 4323-4326.
- Servín-González, L., Sampieri, A. III, Cabello, J., Galván, L., Juárez, V., and Castro, C. (1995). Sequence and functional analysis of the *Streptomyces phaeochromogenes* plasmid pJV1 reveals a modular organization of *Streptomyces* plasmids that replicate by rolling circle. *Microbiol.* **141**, 2499-2510.
- Shiffman, D., and Cohen, S. N. (1992). Reconstruction of a *Streptomyces* linear replicon from separately cloned DNA fragments: Existence of a cryptic origin of circular replication

- within the linear plasmid. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**, 6129-6133.
- Smokvina, T., Mazodier, P., Boccard, F., Thompson, C. J., and Guérineau, M. (1990). Construction of a series of pSAM2-based integrative vectors for use in actinomycetes. *Gene* **94**, 53-59.
- del Solar, G. H., Moscoso, M., and Espinosa, M. (1993). Rolling-circle replicating plasmids from Gram-positive and Gram-negative bacteria: a wall falls. *Mol. Microbiol.* **8**, 789-796.
- del Solar, G. H., Puyet, A., and Espinosa, M. (1987). Initiation signals for the conversion of single stranded to double stranded DNA forms in the streptococcal plasmid pLS1. *Nucl. Acids Res.* **15**, 5561-5580.
- Solenberg, P. J., and Baltz, R. H. (1991). Transposition of Tn5096 and other IS493 derivatives in *Streptomyces griseofuscus*. *J. Bacteriol.* **173**, 1096-1104.
- Solenberg, P. J., and Baltz, R. H. (1994). Hypertransposing derivatives of the streptomycete insertion sequence IS493. *Gene* **147**, 47-54.
- Southern, E. M. (1975). Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.* **98**, 503-517.
- Stein, D. S., Kendall, S. J., and Cohen, S. N. (1989). Identification and analysis of transcriptional regulatory signals for the *kil* and *kor* loci of *Streptomyces* plasmid pIJ101. *J. Bacteriol.* **171**, 5768-5775.
- 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.
- Tai, J. T.-N., and Cohen, S. (1994). Mutations that affect regulation of the *korB* gene of *Streptomyces lividans* plasmid pIJ101 alter plasmid transmission. *Mol. Microbiol.* **12**, 31-39.
- Takano, E., White, J., Thompson, C. J., and Bibb, M. J. (1995). Construction of thiostrepton-inducible, high-copy number expression vectors for use in *Streptomyces spp.* *Gene* **166**, 133-137.
- 竜田敏之。(1996)。放線菌における温度調節型発現ベクターの開発。大阪大学工学部修士論文。

- Thompson, C. J., Ward, J. M., and Hopwood, D. A. (1982). Cloning of antibiotic resistance and nutritional genes in *Streptomyces*. *J. Bacteriol.* **151**, 668-677.
- Thompson, J., Rae, S., and Cundliffe, E. (1984). Coupled transcription-translation in extracts of *Streptomyces lividans*. *Mol. Gen. Genet.* **195**, 39-43.
- Thompson, J., and Cundliffe, E. (1981). Purification and properties of an RNA methylase produced by *Streptomyces azureus* and involved in resistance to thiostrepton. *J. Gen. Microbiol.* **124**, 291-297.
- Tinoco, I. Jr., Borer, P. N., Dengler, B., Levine, M. D., Uhkenbeck, O. C., Crothers, D. M., and Gralla, J. (1973). Improved estimation of secondary structure in ribonucleic acids. *Nature* **246**, 40-41.
- Tomizawa, J., Ohmori, H., and Bird, R. E. (1977). Origin of replication of colicin E1 plasmid DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74**, 1865-1869.
- Ward, J. M., Janssen, G. R., Kieser, T., Bibb, M. J., Buttner, M. J., and Bibb, M. J. (1986). Construction and characterization of a series of multi-copy promoter-probe plasmid vectors for *Streptomyces* using the aminoglycoside phosphotransferase gene from Tn5 as indicator. *Mol. Gen. Genet.* **203**, 468-478.
- 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.
- Wong, H. C., Ting, Y., Lin, H. -C., Reichert, F., Myambo, K., Watt, K. W. K., Toy, P. L., and Drummond, R. J. (1991). Genetic organization and regulation of the xylose degradation genes in *Streptomyces rubiginosus*. *J. Bacteriol.* **173**, 6849-6858.
- Yang, X., and McFadden, B. A. (1994). The complete DNA sequence and replication analysis of the plasmid pCB2.4 from the cyanobacterium *Synechocystis* PCC 6803. *Plasmid* **31**, 131-137.
- 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-

- Yokoyama, E., Doi, K., Kimura, M., and Ogata, S. (1996). Detection of the single-stranded DNA of *Streptomyces* plasmid pSA1.1 and a binding histone-like protein. *FEMS Microbiol. Lett.* **138**, 197-200.
- Yusibov, V. M., Steck, T. R., Gupta, V., and Gelvin, S. B. (1994). Association of single-stranded transferred DNA from *Agrobacterium tumefaciens* with tobacco cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**, 2994-2998.
- Zakrzewska-Czerwinska, J., and Schrempf, H. (1992). Characterization of an autonomously replicating region from the *Streptomyces lividans* chromosome. *J. Bacteriol.* **174**, 2688-2693.
- Zaman, S., Richards, H., and Ward, J. (1992). Expression and characterization of the *korB* gene product from the *Streptomyces lividans* plasmid pIJ101 in *Escherichia coli* and determination of its binding site on the *korB* and *kilB* promoters. *Nucl. Acids Res.* **20**, 3693-3700.
- Zaman, S., Radnedge, L., Richards, H., and Ward, J. M. (1993a). Analysis of the site for second-strand initiation during replication of the *Streptomyces* plasmid pIJ101. *J. Gen. Microbiol.* **139**, 669-676.
- Zaman, S., Richards, H., and Ward, J. (1993b). Identification of the minimal replicon of the streptomycete plasmid pIJ101. *Plasmid* **29**, 57-62.
- Zhang, Y., Praszkie, J., Hodgson, A., and Pittard, A. J. (1994). Molecular analysis and characterization of a broad-host-range plasmid, pEP2. *J. Bacteriol.* **176**, 5718-5728.

本研究に関連する論文

Ichiro Suzuki, Masakazu Kataoka, Tatsuji Seki, and Toshiomi Yoshida. (1996). Three single strand origins located on both strands of the *Streptomyces* rolling circle plasmid pSN22. *Plasmid* (Accepted)

Ichiro Suzuki, Masakazu Kataoka, Tatsuji Seki, and Toshiomi Yoshida. (1996). Nicking site of the *Streptomyces* plasmid pSN22 rolling circle replication. *FEMS Microbiological Letters*, (Submitted)

Ichiro Suzuki, Masakazu Kataoka, Tatsuji Seki, and Toshiomi Yoshida. (1996). Single strand origin-independent second strand synthesis of rolling circle replicating plasmids in *Streptomyces lividans* *in vivo* and *in vitro*. *Plasmid* (Submitted)

その他の関連する論文

Masakazu Kataoka, Toshiyuki Tatsuta, Ichiro Suzuki, Saori Kosono, Tatsuji Seki, and Toshiomi Yoshida. (1996). Development of a temperature-inducible expression system for *Streptomyces* spp. *J. Bacteriol.* **178**, 5540-5542.

謝辞

本研究を終えるにあたり、終始御懇篤なる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、吉田敏臣教授に心から感謝いたします。また、本研究の遂行にあたり、絶えず適切なる御助言、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、関達治教授に深く感謝いたします。本論文の作成にあたり、有益なる御助言、御教示を賜りました大阪大学大学院工学研究科山田靖宙教授、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、大阪大学産業科学研究所、二井将光教授、ならびに関西大学大学院、大嶋泰治教授（大阪大学名誉教授）に感謝の意を表します。

本研究の遂行にあたり、様々な御助言、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、藤山和仁博士、ならびに高木睦博士に感謝いたします。

本研究に際し、直接に終始懇切なる指導を賜りました、国立小児病院小児医療研究センター、片岡正和博士に心から感謝申し上げます。氏には研究室の内外を問わず、常に有益な御指導をいただき、精神的にも鍛錬していただいたことを厚くお礼申し上げます。

本論文の作成にあたり、有益なる御助言、御討論を賜りました英国 John Innes Centre、Tobias Kieser 博士に深く感謝いたします。また、論文の作成にあたり、御指導をいただきましたシンガポール国立大学、Sim Tiow Suan 博士、ならびにマラヤ大学、Koh Chong-Lek 博士にお礼申し上げます。

General priming の機構について、御指導、御討論を賜りました、東京大学医科学研究所、正井久雄博士に感謝いたします。

筆者が卒業生として配属されました際、御懇篤なる御指導により、筆者の研究に対する興味を引き出していただきました、北海道大学、木下晋一教授（元・生物工学国際交流センター）に、深く感謝いたします。

本論文において単離した SSO を、応用例としてプラスミドベクターに組み込んでいただきました、竜田敏之氏にお礼申し上げます。

研究室の諸事においてお世話になりました日本生物工学会、澤住文子氏、大阪大学生物工学国際交流センター、永井敏子氏、五条久美子氏にお礼を申し上げます。また、研究室の内外を問わずお世話になりました牧秀明博士（海洋バイオテクノロジー研究所）、呉奎燮博士（University of Waterloo）、古園さおり博士（理化学研究所）、Daniel G. Moran 氏をはじめ、いろいろな面でご協力をいただきました大阪大学生物工学国際交流センターの皆様感謝するとともに、皆様の今後の研究のご発展をお祈りいたします。

最後に、11 年の長期にわたる大学生活を精神的、経済的に支援してくれた両親に、深い感謝の意を表します。