

DNA Regions Essential for Replication and Stable Maintenance of Plasmid

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2017-10-04 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/2297/7840

プラスミドの複製と安定維持に必要な DNA 領域

金沢大学がん研究所生物物理部門

守 家 成 紀

(昭和60年12月23日受付)

Staphylococcus aureus から単離されたカナマイシン耐性プラスミド pUB110 は *Bacillus subtilis* においても増殖可能である。このプラスミドの複製開始機構と分配機構を調べるために、種々の欠失プラスミドを作成して *B. subtilis* における自己複製能、形質転換能及び安定性を検討した。制限酵素で切断した DNA 断片を用いた解析から、このプラスミドの自己複製に必要な機能は複製開始点を含む 1631 塩基対からなる Taq I-Hpa II DNA 断片に含まれていることが明らかとなった。塩基配列決定の結果、この DNA 断片内には 303 アミノ酸をコードするオープンリーディングフレーム (ORF) が存在することを見出した。しかも、この ORF 内に含まれる 2 個の Taq I 部位を切断すると複製能を失うことから、この ORF はプラスミドの複製に必要な蛋白 (REP 蛋白) をコードしている遺伝子であると考えられる。核酸分解酵素 Bal 31 を用いて作成した種々の欠失プラスミドの *B. subtilis* における安定性を検討した結果、以前に *B. subtilis* 細胞膜との結合活性が認められている Mbo I DNA 断片 (BA3 領域) に欠失が及んでいる 2 種のプラスミドが非常に不安定であった。この領域の塩基配列を解析した結果、数種のステムループ構造が形成可能であり、不安定なプラスミドではこの構造に欠失が生じていることがわかった。また、この BA3 領域に欠失が生じているプラスミドでは *B. subtilis* 形質転換活性が他のプラスミドの 1/10 以下に低下することが見出された。さらに、この欠失プラスミドに新たに BA3 領域を有する DNA 断片を挿入すると、プラスミドの安定性及び *B. subtilis* 形質転換活性は共に BA3 領域を有する他のプラスミドのレベルにまで回復した。これらの結果から、ステムループ構造が形成可能な BA3 領域はプラスミドの安定維持と *B. subtilis* を効率よく形質転換させるために共に必要であることが明らかとなった。また、細胞内での相同 DNA の組み換え活性を失っている *recE*⁻ 株を *B. subtilis* 形質転換の受容菌として用いた場合には、*recE*⁺ 株で観察された BA3 領域の欠損に伴う形質転換活性低下現象がより顕著にあらわれた。このことは、pUB110 を改良して *B. subtilis* における新しいクローニングベクターを作成するとき、その作成過程で BA3 領域を失わないように注意する必要があることを示している。

Key words plasmid, replication, stability, transformability

プラスミドが細菌細胞で安定に維持されるためには、プラスミド DNA が複製され、さらに新生プラスミド分子が 2 個の娘細胞へ正確に分配されることが必要である。種々のプラスミドを用いてこれらの問題を研究することは細菌染色体の複製と分配に関する研究のモデル系ともなり、重要な意味がある。また、種々の目的に応じたクローニングベクターとして利用する際にも有用な知見となり得る。

Escherichia coli を宿主とする種々のプラスミドについてその複製開始機構が研究され、その結果プラスミドの自己複製にはプラスミド側の因子として基本的に以下の二つのことが必要であるとわかってきた。一つは、複製開始点を含む数百塩基対からなる配列 (*ori*) であり、もう一つは、その構造と結合する複製に必須な蛋白 (REP 蛋白) である。そして、プラスミド DNA にはさらにこの REP 蛋白量を調節する領域

Abbreviations: BHI, Brain Heart Infusion; bp, base pairs; *B. subtilis*, *Bacillus subtilis*; *E. coli*, *Escherichia coli*; EtBr, ethidium bromide; ORF, open reading frame; RF, replicative form; *S. aureus*, *Staphylococcus aureus*; SD, Shine-Dalgarno.

が存在し、この調節機構によって細胞あたりのプラスミド分子数(コピー数)を決定している。また、分配機構については、プラスミド側の因子としてプラスミド DNA 上の特異的な塩基配列を必要とすることがいくつかのプラスミドについて報告されている²³⁾。

一方、グラム陽性の *Bacillus subtilis* にも固有のプラスミドが存在するが、適当な遺伝子マーカーを含んでいない。しかし、*Staphylococcus aureus* から単離された薬剤耐性プラスミドは *B. subtilis* において自己増殖することが明らかになり⁹⁾、*B. subtilis* による遺伝子クローニングの有用性が明らかになるにつれてベクターとして繁用されている。それにもかかわらず、これらのプラスミドの複製及び安定維持に関して詳しい研究はほとんどなされていない。そこで、本研究では材料として *B. subtilis* におけるクローニングベクターとして繁用され、しかもその複製に細胞膜との結合の重要性が指摘されている⁹⁾ カナマイシン耐性プラスミド pUB110 を用いた。

このプラスミドの複製開始機構を解析するために、まず REP 蛋白の存在について検討した。複製開始に REP 蛋白を必要とする場合には、自己複製に *rep* 遺伝子を含む一定サイズのプラスミド DNA 領域を要求することが期待されるので、複製に必須な最小領域の決定を試みた。その結果、自己複製に必要な領域を複製開始部位 (*ori*) を含む約 1650 塩基対 (bp) の領域にまで限定することができた。このとき同時に、このプラスミドは *B. subtilis* において非常に不安定であることがわかった。pUB110 の安定維持に関する研究はまだなされていないので、上記 1650 bp 以外の DNA 領域にこのプラスミドの安定性に関わる因子が存在している可能性が考えられる。そこで、このプラスミドの分配機構を解析するために複製に必要な領域以外の領域に種々の欠失を有するプラスミドを作成し、その *B. subtilis* における安定性を検討し、複製開始必須領域とは全く異なる部位の特定の配列が安定維持に必須であることを明らかにした。

材料および方法

I. 使用菌株およびプラスミド

1. 使用菌株

E. coli C600r⁻m⁻株 (*thi*, *thr*, *leuB*, *lacY*, *tonA*, *supE*, *hsdR*, *hsdM*) を宿主としてプラスミドの作成をおこなった。塩基配列決定のために作成した種々の M13 ファージ組換え体の選択および増殖には *E. coli* JM105 株 (Δ *lacpro*, *thi*, *strA*, *sbcB*, *hsdR*, F' *traD36*, *proAB*, *lacI*^q Δ M15) を用いた。*B. subtilis* の形質転換の宿主として CRK3000 (*leu8*, *metB5*, *purA16*,

hisA3)⁶⁾, CRK3006 (*leu8*, *metB5*, *purA16*, *recE4*)⁷⁾, BD170 (*trpC2*, *thr5*), BD224 (*trpC2*, *thr5*, *recE4*)⁸⁾, PSL1 (*leu8*, *arg15*, *thrA1*, *recE4*, *hsrM*, *hsmM*, *stp*)⁹⁾ の 5 種の菌株を使用した。PSL1 株はアメリカ合衆国、デラウェア大学の Pène 博士から供与された。

2. プラスミド

pUB110 は *S. aureus* 由来の *B. subtilis* で増殖するカナマイシン耐性プラスミド、pBR322 は *E. coli* のアンピシリン及びテトラサイクリン耐性プラスミドである。本研究ではいずれも pUB110 と pBR322 との複合プラスミドである pNO2¹⁰⁾, pNO4, pMS102¹¹⁾ の 3 種を用いた(図 2)。pNO2 と pNO4 は pUB110 を制限酵素 *Alu* I で部分分解して得られた DNA 断片と *Eco* R I で切断した pBR322 DNA とを結合させた後 *E. coli* に導入し、カナマイシン耐性の形質転換体から単離した。pMS102' は pUB110 と pBR322 のマーカー遺伝子を含んでいる *Eco* R I-Bam H I 断片からなる。*B. subtilis* で pNO4 と pMS102' は増殖できるが、pNO2 は増殖できない。pUB110 は図 2 に示した *ori* 部位から複製が始まり、矢印の方向に進行する¹¹⁾。pNO2 と pNO4 の複製能の比較から、*ori* 部位を含む領域が pUB110 の複製に必須であると考えられる。

II. 試薬類

各種制限酵素は宝酒造(株)あるいは日本ジーン(株)の製品を、他の酵素類、Sal I リンカー、アガロース及び低融点アガロースは宝酒造(株)の製品を用いた。M13 mp10 及び *mpl* I RF DNA は Pharmacia P-L Biochemicals から購入し、シークエンシング用キット及び [α -³²P] dATP (>400Ci/mmol) はいずれも Amersham International plc. から購入した。Brain Heart Infusion (BHI) 培地は Difco Lab. の、硫酸カナマイシンはペーリンガーマンハイム山之内(株)の製品をそれぞれ用いた。他の試薬はいずれも和光純薬(株)あるいは半井化学(株)の製品を用いた。

III. プラスミド DNA の調整及び形質転換

1. プラスミド DNA の調整

プラスミド DNA は *E. coli* から Birnboim-Doly の方法¹²⁾に従って抽出した。

2. 形質転換

プラスミド DNA 及び M13 ファージ組換え体 DNA は Mandel-Higa の方法¹³⁾に従ってそれぞれ *E. coli* C600r⁻m⁻株及び JM105 株に導入した。

B. subtilis の形質転換は *E. coli* から抽出したプラスミド DNA (1-2 μ g) を使用し、Dubnau の方法¹⁴⁾¹⁵⁾に従って実施した。カナマイシン 10 μ g/ml を含む寒天平板で形質転換体を選択し、その出現数を計測して形質転換効率を比較した。

IV. プラスミドの安定性試験

プラスミドを保持している CRK3000 株をカナマイシンを含む選択平板上に塗抹して培養し、新鮮なコロニーを形成させた後、このコロニーの一部（対数増殖期の細胞群）を滅菌楊枝に附着させ、カナマイシンを含まない非選択平板に塗抹し、37°Cで培養した。生育してきた同一コロニーの一部を経時的にかき取り、希釈後、非選択平板上に広げて培養した。生育してきた 40 コロニーを選択平板に塗抹してカナマイシン耐性性質の有無、すなわち、プラスミドの有無を調べた。

V. プラスミド分子数の比較検討

各プラスミドを保持している CRK3000 株を選択液体培地で菌数が約 3×10^8 細胞/ml になるまで培養し、その 10 ml を遠心分離して得られた菌体から Marmur 法¹⁶⁾の一部を変更した方法¹⁷⁾に従い染色体及びプラスミド DNA を抽出した。この DNA 溶液の 1/4 量を制限酵素 Eco RI で完全に切断後、1% アガロースゲル中で電気泳動し、0.5 μ g/ml のエチジウムブロミド (EtBr) で染色してから紫外線下でプラスミド DNA 量を比較した。

VI. 塩基配列の決定

M13-dideoxy チェンターミネーション法を用いて、pUB110 の複製開始領域を含む Eco RI 切断部位から Pvu II 切断部位まで約 3500 bp の塩基配列を決定した。すなわち、各種制限酵素を用いて DNA の小断片を作成し、これらを M13 mp10 及び mp11 の適切なクローニング部位に挿入後、Amersham 社発行の説明書に従ってその塩基配列を決定した。図 1 中矢印は塩基配列を決定した領域とその方向を示している。両鎖の塩基配列を決定してその結果に矛盾のないことを確認した。

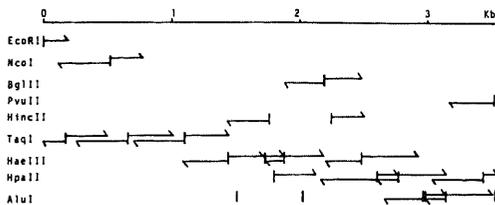


Fig. 1. Strategy for determination of nucleotide sequence. Restriction sites for various enzymes within a larger Eco RI-Pvu II fragment of pUB110 are shown. An Eco RI site is taken as the start point of numbering nucleotides of the sequence. Length and direction of fragments sequenced in this study are shown by arrows.

成 績

I. プラスミド pUB110 の自己複製に必要な DNA 領域

図 2 に示したように *B. subtilis* で増殖可能なプラスミド pNO4 を制限酵素 Cla I と Hpa II で切断し、pUB110 の複製開始領域を含む約 1800 bp の DNA 断片を単離した。この断片をさらに制限酵素 Taq I で部分分解し、生じる各種 DNA 断片を複製開始領域を失い、*B. subtilis* で増殖できないプラスミド pNO2 の Cla I 部位にクローニングした。得られた各種プラスミドの *B. subtilis* における複製能を調べてみると、1650 bp の Taq I-Hpa II 切断断片を含むプラスミドのみが自己複製能を示し、これよりも小さい他の DNA 断片を含むプラスミドはいずれも自己複製能を示さなかった。このことは pUB110 の自己複製のためには複製開始部位を含む広い領域が必要であることを示しており、*rep* 遺伝子存在の可能性が考えられた。そこで、pNO4 に含まれている pUB110 DNA の塩基配列 (pUB110 DNA の Eco RI 部位から Pvu II 部位まで約 3500 bp) を決定した。その結果、図 3 に示したようにこの 3518 bp 内に 4 個のオープンリーディングフ

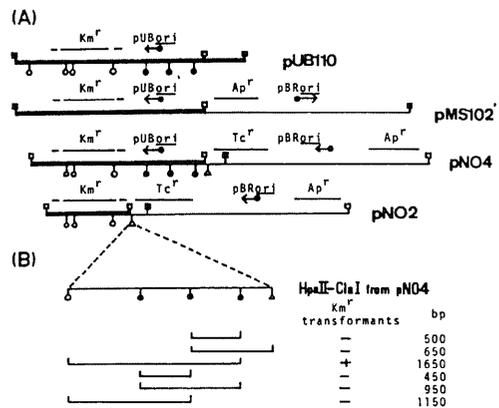


Fig. 2. Structure of plasmids and the essential region for autonomous replication of pUB110 plasmid.

(A) Genetic and restriction sites of pUB110, two shuttle vectors, pMS102' and pNO4, and an *ori* searching vector, pNO2, are shown. Restriction enzyme cleavage sites are: BamH I, ■; Eco RI, □; Taq I, ●; Hpa II, ○; and Cla I, △. (B) A Hpa II-Cla I fragment was isolated from pNO4. Various fragments obtained by partial digestion with Taq I were inserted into the Cla I site of pNO2 to test for transformation of kanamycin-resistance in *B. subtilis*. Only a 1650 bp fragment is active for the transformation.

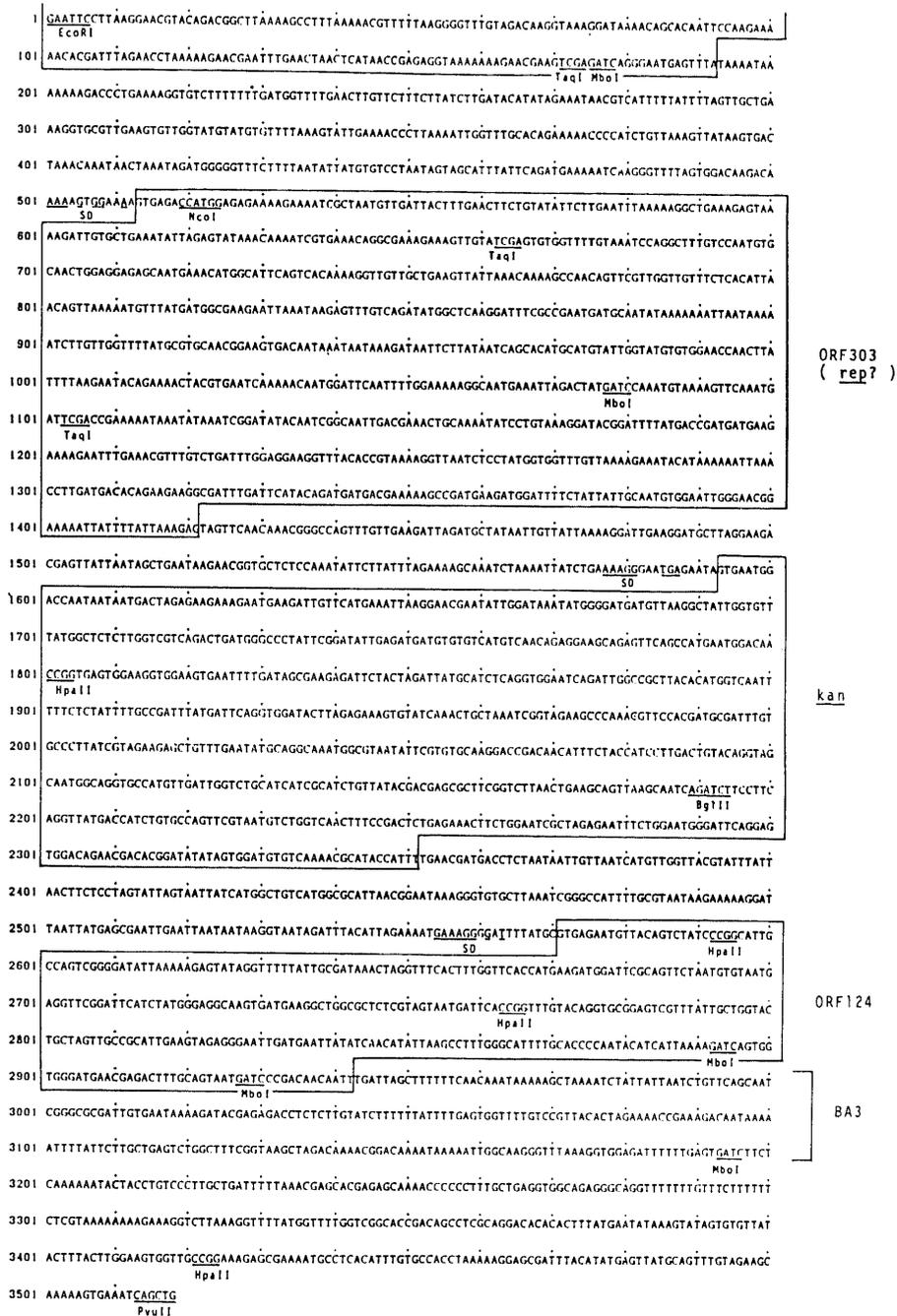


Fig. 3. Nucleotide sequence of a larger Eco RI-Pvu II fragment of pUB110. The nucleotide number 1 is Eco RI site as in Fig. 1. Open reading frames (ORFs) are boxed. Possible SD sequence (binding region to ribosome) for each ORF is underlined. *kan*, kanamycin-resistant gene; *rep?*, essential gene for autonomous replication of pUB110 predicted from this study; BA3, Mbo I fragment (No.2928-3195).

レーム (ORF, 蛋白をコードすることが可能な遺伝子) を見出すことができ, さらに3個のORFについてはいずれもその開始コドンの上流にリボゾームとの結合配列(SD配列)を認めることができた. 問題のTaq

I (No.171)-Hpa II (No.1801) 1631 bp断片には303アミノ酸をコードし得るORFが存在していた. しかも切断により自己複製能を失う2個のTaq I部位(No.662, No.1103)はいずれもこのコード領域内に存在しているのでこのORFが *rep* 遺伝子であると考えられる.

しかしながら, pUB110の複製の最小領域を決定するためのベクターとして用いたpNO2はその制限酵素地図よりpUB110由来のDNAとしてカナマイシン耐性遺伝子(*kan* 遺伝子)の他にその下流領域の塩基配列(No.3134のAlu I部位まで)を有していると考えられる. 図3に示すように, この領域にはORF124や *in vitro* で細胞膜との結合活性が認められているBA3領域¹⁹⁾(Mbo I DNA断片, No.2928-3195)の一部が含まれている. このプラスミドの複製にはプラスミドDNAの細胞膜への結合が重要であると報告されているので, pNO2に残存しているBA3領域の一部やORF124遺伝子産物をpUB110の自己複製に必要でないと断定することはできない. そこで, この問題を解決するためにプラスミドpMS102'を制限酵素

Table 1. Plasmid transformation of *recE*⁺ and *recE*⁻ recipients

Plasmid DNA	Recipients (Number of transformants / μ g plasmid DNA)				
	CRK3000	BD170	CRK3006	BD224	PSL1
pMS102'	4870	5660	900	1210	590
pSM19	32900	3480	567	1190	740
pSM103	700	2670	157	180	10
pSM132	219	123	0	0	0
pSM101	402	132	0	0	0
pSM109	210	72	0	0	0
pSM139	314	13	0	0	0
pSM1393	3790	3880	262	572	370

The plasmid transformation method described by Dubnau et al^{14, 15)} was used. CRK3000 and BD170 are *recE*⁺ strains and other three strains are *recE*⁻

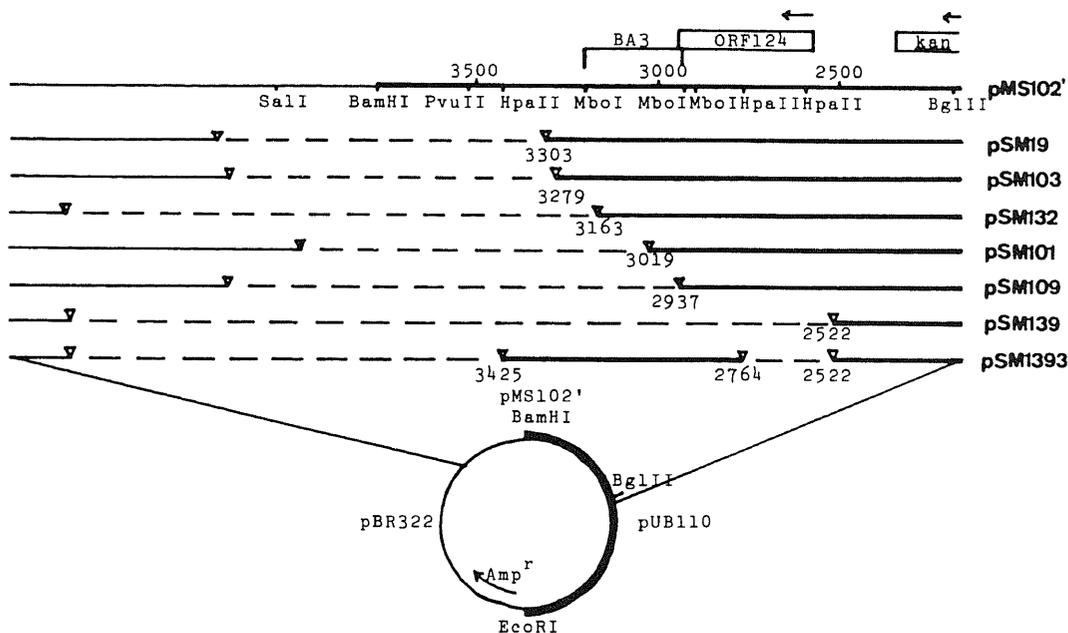


Fig. 4. Map of plasmids with deletions in BA3 region.

Deletions were created by digestion with *Bal*31 from Bam H I site of pMS102'. Thick and thin lines represent the sequence of pUB110 and pBR322 respectively. Broken lines are the sequences deleted by *Bal* 31. Sal I linkers indicated by triangle were inserted into end-points of the deletion. Arrows indicate the directions of ORFs. Nucleotide number of end-point of deletion of each plasmid was determined by sequencing each Sal I -Bgl II fragment from Sal I site to Bgl II site with M13 dideoxy chain termination method.

Bam HI で切断後 Bal 31 を作用させ、上記 2 領域に図 4 に示すような種々の欠失を有するプラスミドを作成し、それらのプラスミドの *B. subtilis* における自己複製能を検討した。欠失程度が最も大きく、上記 2 領域が完全に失われていたプラスミド pSM139 でも表に示したように CRK3000 株でカナマイシン耐性の形質転換体が得られ、自己複製能は失われないことがわかった。従って、ORF124 遺伝子産物及び BA3 領域は共に pUB110 の自己複製に必要なものではないと結論した。

II. プラスミドによる *B. subtilis* 形質転換活性の差異

各プラスミドの自己複製能を調べる過程で自己複製能を有する種々のプラスミドの *B. subtilis* 形質転換活性に差のあることが見い出された。すなわち、表に示したように CRK3000 株を受容菌とした場合、2 種のプラスミド (pMS102' と pSM19) では 1-2 μ g のプラスミド DNA あたり 4000 以上のカナマイシン耐性形質転換体が得られたのに対し、pSM103 では上記 2 種の約 1/6 に、また 4 種のプラスミド (pSM132, pSM101, pSM109, pSM139) では 1/10 以下の値に低下した。そこで、この *B. subtilis* 形質転換活性に影響を及ぼしたプラスミド DNA の領域を調べるために上記 6 種の欠失プラスミドの欠失終了点をその塩基配列を決定することにより求めた。図 4 に示したように、形質転換活性の低下がみられた 4 種のプラスミドではいずれもその欠失が BA3 領域内に及んでいた。このとき pBR322 側への欠失程度と形質転換活性低下との間には規則性が見られないので、この現象に pBR322 の配列が関与しているとは考えにくい。プラスミド DNA による *B. subtilis* の形質転換現象は染色体 DNA による場合とは異なり *recE* 遺伝子産物を必要としないことが知られているが、この機構の詳細に関してはまだ不明な点が多い¹⁹⁾。そこで、今回見い出されたこの形質転換活性低下現象も *recE* 遺伝子産物に依存するかどうか検討するために 3 種の *recE*⁻ 株を受容菌として用い、その形質転換活性を調べた。まず、遺伝的背景が CRK3000 株と異なる別の *recE*⁺ 株 BD170 を受容菌として用いても同様の結果が得られた。従って、この活性低下現象は CRK3000 株に特有のものではない。3 種の *recE*⁻ 株 (CRK3006, BD224, PSL1) を用いた場合は、*recE*⁺ 株に比べて相対的に形質転換体数が減少し、さらに BA3 領域の欠失に基づく活性低下現象は著しく強調されることを観察した。

次に、BA3 領域が形質転換活性の促進に関わっていることを証明するために、BA3 領域及び ORF124 遺伝子を完全に失っているプラスミド pSM139 に新たに

BA3 領域を含む 662 bp の Hpa II 断片を挿入したプラスミド pSM1393 を作製し (図 4)、このプラスミドの *B. subtilis* 形質転換活性を測定した。その結果、表に示したように 5 種を受容菌のいずれを用いても形質転換活性は親プラスミドである pMS102' とほぼ同等のレベルにまで回復した。従って、pUB110 を用いた *B. subtilis* の形質転換効率に影響するプラスミド側の因子は少なくとも BA3 領域を含む 540 bp (No.2764-3303) の領域内に存在している。

III. プラスミドの *B. subtilis* における安定性

プラスミド pUB110 の複製開始領域 1631 bp を自己複製能のないプラスミド pNO2 に挿入して得られたプラスミドは *B. subtilis* において自己複製できるようになったが、非常に不安定でこのプラスミドの脱落した *B. subtilis* 細胞の出現が容易に観察できた。ところが、このとき用いた pNO2 は *B. subtilis* の形質転換活性に関する BA3 領域の一部が欠失している。そこで、BA3 領域の欠失が原因で生じる *B. subtilis* 形質転換活性低下現象はプラスミドの極端な不安定性に依存しているのかもしれないと考えて、各プラスミドの *B. subtilis* における安定性を検討した。図 5 に示したように、プラスミドを保持している CRK3000 (*recE*⁺) 株を非選択培地で 37°C、26 時間培養した結果、pUB110 が 100% の安定性を示したのに対し、BA3 領域に欠失が及んでいる 2 種のプラスミド (pSM132 と pSM139) ではほとんどの *B. subtilis* 細胞がプラスミドを失っていた。また、形質転換活性低下がみられ

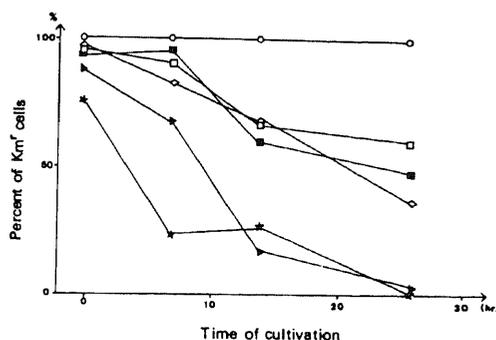


Fig. 5. Stability of various plasmids in *recE*⁺ cells. Cells containing pUB110 or each one of its derivatives were grown on a kanamycin (Km)-containing agar medium and then grown on a Km-free medium at 37°C for indicated times. Percent of Km-resistant (Km^r) cells was determined by examining 40 colonies appeared in Km-free agar plates. ○—○, pUB110; □—□, pSM19; ◇—◇, pSM103; ★—★, pSM132; ▲—▲, pSM139; ■—■, pSM1393.

なかったプラスミド pSM19 や若干の活性低下が観察された pSM103 及び新たに BA3 領域を加え活性の回復が認められた pSM139 の 3 種のプラスミドではいずれも 26 時間培養後のプラスミド保有率が約 50% であった。このように、形質転換活性の低下や回復が観察されたプラスミドで同様に安定性の低下及び回復が認められ、この両者の間には相関性のあることがわかった。Ba1 31 で BA3 領域に向かって削り込んで作成した pSM103 と新たに BA3 領域を含む断片を挿入して作成した pSM139 が同様の安定性 (26 時間で 50%) を示したので、両プラスミドの欠失領域図 (図 4) から考えて、pUB110 の *B. subtilis* における安定維持に強く関与している因子は BA3 領域を含む 516 bp (No.2764-3279) に存在していると考えられる。従って、形質転換活性低下現象と同様にプラスミドの安定維持にも BA3 領域の構造が関与していると思われる。そこで、この領域でとりうる構造を検討したところ、図 6 に示したように数種のステムループ構造が形成可能であった。しかも、*B. subtilis* で非常に不安定であったプラスミド (pSM132, pSM139) ではこのステムループ構造に欠失が及んでいた。

IV. プラスミド分子数の比較検討

親プラスミドである pUB110 は *B. subtilis* 細胞において約 40 分子存在する¹¹⁾。そこで、本研究で用いた 2 種の pUB110 誘導体 (pSM132 と pSM139) の不安定性はコピー数の減少による可能性が考えられる。この可能性を検討するために、プラスミドを保持しているほぼ同数の *B. subtilis* 細胞から DNA を抽出し、そのプラスミド DNA 量を比較検討した。図 7 に示した

ように、複合プラスミドでは親プラスミド pUB110 に比しコピー数が増加しているが、BA3 領域の欠失 (プラスミドの不安定化) によるコピー数の減少は観察されなかった。この測定法は必ずしも厳密ではないが、8 種の欠失プラスミドのコピー数は元の pUB110 に比し多少多い傾向はあっても決して少なくはない。

考 察

S. aureus 由来で *B. subtilis* においても増殖可能な薬剤耐性プラスミド pUB110 の自己複製に必要な領域を含む 3518 bp の遺伝子構成を本研究で得られた結果を基にして図 8 に模式的に表わした。

まず、このプラスミドの自己複製に必要な領域 (ORI/REP, 1631 bp) の解析結果から、この領域内に見い出された ORF303 遺伝子は自己複製に必要な REP 蛋白をコードする遺伝子であると考えられた。*rep* 遺伝子であることの直接的証明はまだなされていないが、DNA 結合蛋白に存在する典型的なアミノ酸配列²⁰⁾がこの遺伝子産物にも認められるとの報告もあり²¹⁾、*rep* 遺伝子である可能性が強い。また、このプラスミドの複製は Mbo I 切断部位 (N0.1077, 図 3) 近くから開始することが知られているが、本研究での塩基配列決定の結果、この切断部位は ORF303 遺伝子内に位置していることが明らかとなった。従って、pUB110 の複製は *rep* 遺伝子内部から始まることが予想される。同様な ORI/REP の配置が *S. aureus* から単離されたテトラサイクリン耐性プラスミド pT181 において報告されている²²⁾。

図 8 に示した BA3 領域は *in vitro* で *B. subtilis* 細

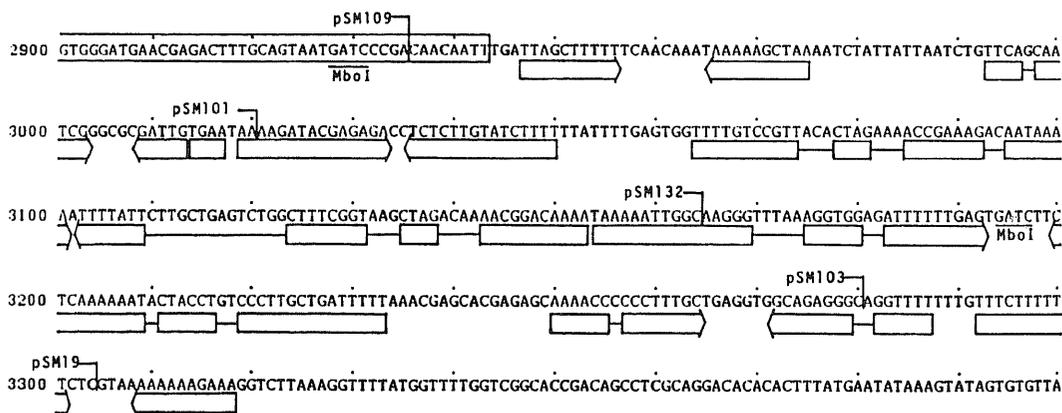


Fig. 6. Nucleotide sequence of BA3 region.

Two thick arrows facing each other indicate the sequences complementary to each other and are possible to form a stem structure. Boxed sequence is a part of ORF124. Each plasmid contains the sequence left-side of vertical line.

外膜との結合活性を有する Mbo I DNA 断片として見いだされた領域である。この BA3 領域及び ORF124 遺伝子産物は共に pUB110 の自己複製には必要でなかった。ところが、BA3 領域はプラスミドの安定性と *B. subtilis* 形質転換活性に大きな影響を及ぼすことが本研究により初めて明らかとなった。しかも、この領域には数種のステムループ構造が形成可能であり、この構造に欠失が及ぶとプラスミドは *B. subtilis* において非常に不安定となった。このことから、このステムループ構造が pUB110 の安定維持に重要な機能を果していると考えられる。*E. coli* を宿主とするプラスミド pSC101⁹⁾ や *B. subtilis* において増殖可能なプラスミド pC194²³⁾ においても同様にステムループ構造がそのプラスミドの安定性に関与していると報告されている。また、pSC101 ではステムループ構造を有する *par*⁺ (安定維持機能を持つ) プラスミドは細胞

外膜の分面に抽出されてくるが、*par*⁻ プラスミドは膜分面に抽出されないことも報告されている²⁴⁾。BA3 領域に細胞膜との結合活性が認められることから、pUB110 もこの領域に存在するステムループ構造を介した細胞膜への結合によって安定に維持されているのかもしれない。同様の安定維持機構が *E. coli* を宿主とするプラスミド F の研究結果から “パーティゾーム” モデルとして考えられている²⁾。このモデルでは、そのプラスミド DNA 上の特異的な塩基配列 (パーティー部位) と自身の遺伝子にコードされている複数の蛋白が複合体を形成し、この複合体がさらに細胞膜と結合し (パーティゾーム)、形成されたプラスミド DNA-蛋白-細胞膜複合体は 2 個ずつ対合した後、細胞隔壁の伸長に伴って分離され、2 個の娘細胞へ均等に分配されてゆくと考えられている。pUB110 の分配もこのパーティゾームモデルに従うとすれば、BA3 領域に見いだされたステムループ構造がパーティー部位に相当すると考えられる。また、pUB110 の Bam HI-Eco RI 領域 (約 700 bp) には ORF β , γ の 2 種の遺伝子が存在するとその塩基配列から示唆されており²¹⁾

(図 8)、さらに本研究で用いたプラスミド pSM19 (BA3 領域を有しているが、ORF β , γ を欠いている) は親プラスミド pUB110 で観察された 100% の安定性を示さなかったため、この ORF β , γ はパーティー部位と結合してプラスミドを安定化する因子であるのかもしれない。前述したプラスミド pC194 の安定維持にもス

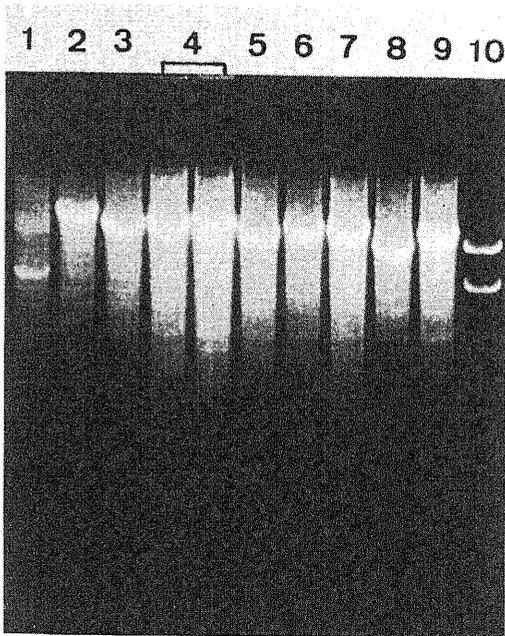


Fig. 7. Approximate copy number of pUB110 derivatives with deletions in BA3 region. *RecE*⁺ transformants with various plasmids were grown in a Km medium. Whole DNA was prepared from approximately equal number of cells and digested with Eco RI. Linear plasmid DNAs were separated in agarose gel to estimate the amount by ethidium bromide staining. Each lane is pUB110, 1; pMS102', 2; pSM19, 3; pSM103, 4; pSM132, 5; pSM101, 6; pSM109, 7; pSM139, 8; pSM1393, 9; and pMS102'B7, 10, respectively. pMS102'B7 DNA was extracted from *E. coli* and used as a size marker.

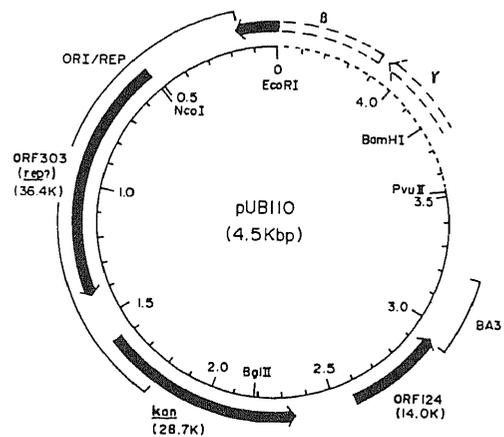


Fig. 8. A circular map of pUB110. A minimum fragment essential for autonomous replication shown in Fig. 2 is presented by ORI/REP. Arrows are ORFs shown in Fig. 3. The region whose nucleotide sequence has not been reported is indicated by broken line. ORF β and γ are suggested by McKenzie et al¹⁹⁾.

テムループ構造の他に蛋白の関与が示唆されている²³⁾。

pUB110のBA3領域はこのプラスミドの安定維持に必要であると同時に*B. subtilis*の形質転換能にも大きく影響した。本研究ではプラスミドの安定性と形質転換活性の間に良い相関が得られたが、pC194ではステムループ構造の変化によりプラスミドが非常に不安定になったにもかかわらず、形質転換活性の低下は観察されなかった²⁵⁾。従って、この両現象を単純に結びつけることはできない。現在のところ、本研究で得られた*B. subtilis*形質転換活性低下現象の原因ははっきりとしないが、*B. subtilis*におけるクローニングベクターとしての観点からみると、この現象は重要な意味を含んでいる。すなわち、*B. subtilis*遺伝子のクローニングを同一宿主を受容菌として用いる場合、染色体への組み込みを避けるために*recE*-株を使用しなければならないが、そのクローニング効率を高くするためにはベクターDNAにBA3領域を加える必要がある。

結 論

1. *B. subtilis*において増殖可能なカナマイシン耐性プラスミドpUB110の自己複製に必要な機能は複製開始点を含む1631塩基対に含まれることが示された。塩基配列決定の結果、この領域内には303アミノ酸をコードする遺伝子が見い出され、この蛋白がpUB110の自己複製に必要なREP蛋白であると考えられた。

2. pUB110プラスミドDNAには*B. subtilis*における安定維持に積極的に関与する領域が存在した。それは*B. subtilis*細胞膜との結合活性を有する領域を含む516塩基対からなる領域であった。その塩基配列の解析から、この領域には蛋白をコードする遺伝子が見当らず、膜結合活性のある領域には数種のステムループ構造が形成可能であった。そして、このステムループ構造が失なわれるとプラスミドは非常に不安定となった。

3. pUB110の安定維持に必要であったこのプラスミドDNA領域はまた同時に*B. subtilis*を効率よく形質転換させるためにも必要であった。

謝 辞

稿を終えるにあたり、御指導、御校閲を賜った吉川寛教授に深謝いたします。また、終始懇切な御教示を頂きました大阪大学医学部遺伝学講座助手小笠原直毅博士、並びに金沢大学がん研究所生物物理部門各位に深く感謝いたします。

文 献

- 1) Scott, J. R.: Regulation of plasmid replication. *Microbiol. Rev.*, **48**, 1-23 (1984).
- 2) 平賀壮太: 細菌におけるプラスミドの安定保持機構。蛋白質核酸酵素, **29**, 430-443 (1984).
- 3) Tucker, W. T., Miller, C. A. & Cohen, S. N.: Structural and functional analysis of the *par* region of the pSC101 plasmid. *Cell*, **38**, 191-201 (1984).
- 4) Ehrlich, S. D.: Replication and expression of plasmids for *Staphylococcus aureus* in *Bacillus subtilis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **74**, 1680-1682 (1977).
- 5) Winston, S. & Sueoka, N.: DNA-membrane association is necessary for initiation of chromosomal and plasmid replication in *Bacillus subtilis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **77**, 2834-2838 (1980).
- 6) Yamaguchi, K. & Yoshikawa, H.: Association of the replication terminus of *Bacillus subtilis* chromosome to the cell membrane. *J. Bacteriol.*, **124**, 1030-1033 (1975).
- 7) Seiki, M., Ogasawara, N. & Yoshikawa, H.: Structure and function of the region of the replication origin of the *Bacillus subtilis* chromosome. II. Identification of the essential region for inhibitory functions shown by the DNA segment containing the replication origin. *Mol. Gen. Genet.*, **183**, 227-233 (1981).
- 8) Dubnau, D., Davidoff-Abelson, R., Scher, B. & Cirigliano, C.: Fate of transforming deoxyribonucleic acid after uptake by competent *Bacillus subtilis*. Phenotypic characterization of radiation-sensitive recombination-deficient mutants. *J. Bacteriol.*, **114**, 273-286 (1973).
- 9) Ostroff, G. R. & Péne, J. J.: Molecular cloning with bifunctional plasmid vectors in *Bacillus subtilis*. Isolation of a spontaneous mutant of *Bacillus subtilis* with enhanced transformability for *Escherichia coli*-propagated chimeric plasmid DNA. *J. Bacteriol.*, **156**, 934-936 (1983).
- 10) Seiki, M., Ogasawara, N. & Yoshikawa, H.: Structure and function of the region of the replication origin of the *Bacillus subtilis* chromosome. I. Isolation and characterization of plasmids containing the origin region. *Mol. Gen. Genet.*, **183**, 220-226 (1981).
- 11) Scheer-Abramowitz, J., Gryczan, T. J. &

- Dubnau, D.: Origin and mode of replication of plasmids pE194 and pUB110. *Plasmid*, **6**, 67-77 (1981).
- 12) Birnboim, H. C. & Doly, J.: A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucl. Acids Res.*, **7**, 1513-1523 (1979).
- 13) Mandel, M. & Higa, A.: Calcium-dependent bacteriophage DNA infection. *J. Mol. Biol.*, **53**, 159-162 (1970).
- 14) Dubnau, D. & Davidoff-Abelson, R.: Fate of transforming DNA following uptake by competent *Bacillus subtilis*. I. Formation and properties of the donor-recipient complex. *J. Mol. Biol.*, **56**, 209-221 (1971).
- 15) Contente, S. & Dubnau, D.: Characterization of plasmid transformation in *Bacillus subtilis*. Kinetic properties and the effect of DNA conformation. *Mol. Gen. Genet.*, **167**, 251-258 (1979).
- 16) Marmur, J.: A procedure for the isolation of DNA from microorganisms. *J. Mol. Biol.*, **3**, 208-218 (1961).
- 17) Ogasawara, N., Seiki, M. & Yoshikawa, H.: Effect of novobiocin on initiation of DNA replication in *Bacillus subtilis*. *Nature*, **281**, 702-704 (1979).
- 18) Tanaka, T. & Sueoka, N.: Site-specific in vitro binding of plasmid pUB110 to *Bacillus subtilis* membrane fraction. *J. Bacteriol.*, **154**, 1184-1294 (1983).
- 19) Dubnau, D.: Genetic transformation in *Bacillus subtilis*. p147-178. In D. A. Dubnau (ed.), *The molecular biology of the Bacilli*, Academic Press Inc., New York, 1982.
- 20) Pabo, C. O. & Sauer, R. T.: Protein-DNA recognition. *Ann. Rev. Biochem.*, **53**, 293-321 (1984).
- 21) Mckenzie, T., Tanaka, T. & Sueoka, N.: 私信
- 22) Khan, S. A., Adler, G. K. & Novick, R. P.: Functional origin of replication of pT181 plasmid DNA is contained within a 168-base-pair segment. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **79**, 4580-4584 (1982).
- 23) Alonso, J. C. & Trautner, T. A.: A gene controlling segregation of the *Bacillus subtilis* plasmid pC194. *Mol. Gen. Genet.*, **198**, 427-431 (1985).
- 24) Gustafsson, P., Wolf-Watz, H., Lind, L., Johansson, K. & Nordström, K.: Binding between the *par* region of plasmid R1 and pSC101 and the outer membrane fraction of the host bacteria. *EMBO J.*, **2**, 27-32 (1983).
- 25) Alonso, J. C. & Trautner, T. A.: Cold-sensitivity in the transfer of a plasmid with a deletion hot spot into recombination deficient *B. subtilis* cells. *Mol. Gen. Genet.*, **198**, 437-440 (1985).

DNA Regions Essential for Replication and Stable Maintenance of Plasmid Shigeki Moriya, Department of Biophysics, Cancer Research Institute, Kanazawa University, Kanazawa 920 - J. Juzen Med. Soc., **94**, 1144-1154 (1985)

Key words: plasmid, replication, stability, transformability

Abstract

A kanamycin-resistant plasmid pUB110 isolated from *Staphylococcus aureus* can propagate in *Bacillus subtilis* cells. To study the mechanism of initiation of replication and partition of the plasmid, plasmids lacking various portions of the genome were constructed and the ability of autonomous replication, transformability and stability were measured in *B. subtilis*. A TaqI-HpaII fragment composed of 1631 base pairs containing the origin of replication was identified as the minimum region essential for replication. Determination of the nucleotide sequence of this fragment showed an open reading frame (ORF) coding for 303 amino acids. Cleavage of two TaqI sites located within the ORF caused inactivation of the ability of autonomous replication, suggesting that the ORF corresponds to a gene for a protein required for autonomous replication of pUB110. Several deletion plasmids were created by the treatment with Ba131 nuclease to test their stability in *B. subtilis*. Among them two, which lack a complete MboI fragment (BA3

region) containing the binding activity with cell membrane as reported previously, are less stable in *B. subtilis*. Moreover, it has been that several possible stem-loop structures are formed in the nucleotide sequence of BA3 region and a part or all of these structures are absent in the unstable plasmids. Transforming activities for *B. subtilis* by the plasmids lacking the BA3 region were reduced to lower than 1/10 of those by other plasmids. Moreover, when a fragment containing BA3 region was inserted back into a plasmid lacking the same region, not only the transformability but also the stability of the plasmid was recovered. These results indicate clearly that BA3 region containing possible stem-loop structures is essential for both stable maintenance of pUB110 and efficient plasmid transformation in *B. subtilis*. Moreover, when three recombination-deficient (*recE*⁻) strains were used as recipients for transformation by the plasmids without BA3 region, the degree of the decrease in transforming activity was more remarkable than that observed in *recE*⁺ strains. This indicates the importance of the BA3 region in constructing new cloning vectors from pUB110 to be used in *B. subtilis*.