

水田土壌から分離した 2,4-D 分解菌由来の
分解遺伝子及び大型プラスミドに関する研究

筑波大学大学院
生命環境科学研究科
生命産業科学専攻
博士（農学）学位論文

酒 井 順 子

目次

緒言	1
第一章 水田土壌由来 2,4-ジクロロフェノキシ酢酸 (2,4-D) 分解菌の収集と分解遺伝子のタイプ分け	7
1.1 要約	7
1.2 緒言	7
1.3 材料及び方法	12
1.3.1 2,4-D 分解菌の収集.....	12
1.3.2 分解菌の同定と分解遺伝子のタイプ分け.....	15
1.4 結果	21
1.4.1 2,4-D 分解菌の収集.....	21
1.4.2 分解菌の同定と分解遺伝子のタイプ分け.....	23
1.5 考察	32
第二章 分解菌のプラスミドの収得と分解遺伝子の特定	37
2.1 要約	37
2.2 緒言	37
2.3 材料	39
2.4 方法	39
2.4.1 プラスミドの検出法の選定	39
2.4.2 分解遺伝子プローブを用いたサザンハイブリダイゼーション	40
2.4.3 RASC サブグループ分解遺伝子配列の周辺構造の比較	41
2.5 結果	41
2.5.1 プラスミドの検出法の選定	41
2.5.2 分解遺伝子プローブを用いたサザンハイブリダイゼーション	42
2.5.3 RASC サブグループ分解遺伝子配列の周辺構造の比較	48
2.6 考察	50

第三章 2,4-D 分解遺伝子を保有する大型プラスミド pM7012 の全塩基配列の解析	53
3.1 要約	53
3.2 緒言	53
3.3 材料	54
3.4 方法	55
3.4.1 プラスミドの分離回収条件の最適化	55
3.4.2 pM7012 の全塩基配列の解析	56
3.4.3 アノテーションと配列の登録	59
3.5 結果	60
3.5.1 プラスミドの分離回収条件の最適化	60
3.5.2 pM7012 の全塩基配列の解析	65
3.5.3 アノテーション	65
3.6 考察	68
第四章 pM7012 が外部から獲得したと考えられる機能遺伝子配列の比較解析	70
4.1 要約	70
4.2 緒言	70
4.3 方法	71
4.4 結果	72
4.5 考察	85
第五章 pM7012 の属するプラスミドグループの解析	92
5.1 要約	92
5.2 緒言	92
5.3 方法	93
5.4 結果	94
5.5 考察	105

第六章	pM7012 及び類縁の 2,4-D 分解プラスミドの伝達性の調査	108
6.1	要約	108
6.2	緒言	108
6.3	材料	109
6.4	方法	110
6.4.1	接合伝達試験	110
6.4.2	pM7012 と同じ分解遺伝子配列を持つプラスミドの調査	111
6.5	結果	114
6.5.1	接合伝達試験	114
6.5.2	pM7012 と同じ分解遺伝子配列を持つプラスミドの調査	114
6.6	考察	119
総括		122
謝辞		127
引用文献		128
付記		142

本文中で用いた略号は以下のとおりである。

<略号表>

2,4-D; 2,4-dichlorophenoxyacetic acid

γ -HCH ; γ -hexachlorocyclohexane

blastp; protein blast

CDS; coding sequence

DDBJ; DNA data banc of Japan

DDT; dichloro-diphenyl-trichloroethane

DIG; digoxigenin

EtBr; ethidium bromid

HPLC; high performance liquid chromatography

ICE; integrative and conjugative element

KEGG; Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes

MCPA; 4-chloro-2-methylphenoxyacetic acid

MGE; mobile genetic element

NCBI; National Center for Biotechnology Information

ORF; open reading frame

Pfam; database of protein families

PFGE; pulsed field gel electrophoresis

RDP; ribosomal database project

SDS; sodium dodecyl sulfate

T4CP; type 4 coupling protein

T4SS; type IV secretion system

緒言

人類は科学の発展と共に自然界に存在しないものを人工的に作り出し、利用するようになった。その一つに、有機合成化合物が挙げられる。作り出された有機化合物は人類に大きな恵みをもたらし、近代の人類の活動を継続かつ発展させていくために不可欠となっている。しかしその一方で、環境を汚染する原因の一つとなる場合があり、社会問題となってきた。例えば、ポリ塩化ビフェニル（PCB）は絶縁体として非常に優れており、日本では 1950 年代から 1970 年代にかけて多用された。しかし、1968 年のカネミ油症事件をきっかけに人体に有害であることが明白となり、環境への残留性も高いことから 1972 年に製造が禁止された（中島 & 小倉, 2008）。ジクロロジフェニルトリクロロエタン（DDT）や γ -ヘキサクロロシクロヘキサン（ γ -HCH）に代表されるいくつかの農薬も、残留性が高いために使用が禁止された（松中, 2002）。またごく最近では、マイクロプラスチックによる海洋汚染が明らかとなり問題視されている（do Sul & Costa, 2014）。ある物質が“汚染物質”となるのは、その物質が難分解で自然界に残留する場合や生物に毒性を持つ場合と考えられる。微生物は、有機化合物の分解者として大きな役割を担うが、もともと自然界に存在しない物質に対しては、分解能を持つとは限らない。そのような難分解物質は環境中に蓄積する傾向がある。

難分解の有機化合物がある一方で、微生物が早期に分解能を獲得した化合物も存在し、その代表例として、除草剤の 2,4-ジクロロフェノキシ酢酸（2,4-D）が挙げられる。2,4-D は、有機合成除草剤としては最も古く、1940 年代に合成に成功した。単子葉植物には作用せず、双子葉植物のみに作用するホルモン型の選択制除草剤で、主食とされるムギ類やトウモロコシ畑で有効なため、世界的に大量に使用された（農薬ハンドブック, 2011）。本農薬は、土壤中ですばやく分解されることが、環境中での使用が開始された後の早い時期に明らかになり、微生物による有機化合物分解能の獲得モデルとして、精力的に研究が進められてきた。1950 年に 2,4-D 分解細菌の土壌からの分離がロンドン大学より報告され（Audus, 1950）、1977 年には、伝達性プラスミド上に 2,4-D 分解遺伝子が存在することが初めて報告された（Pemberton & Fisher, 1977）。この報告は、微生物による分解遺伝子の獲得に、伝達性プ

ラスミドが関わっていることを示す研究として大きく注目された。その後、複数の株で伝達性プラスミド上に 2,4-D 分解遺伝子が確認された (Bhat *et al.*, 1994; Chaudhry & Huang, 1988; Don & Pemberton, 1981; Mae *et al.*, 1993)。好氣的な 2,4-D の完全分解には、6 つの遺伝子が必要とされる (Perkins *et al.*, 1990)。その全ての遺伝子が、遺伝子群としてプラスミドの一方所に存在することが複数のプラスミドで明らかにされている (Hoffmann *et al.*, 2003; Leveau *et al.*, 1999; Trefault *et al.*, 2004; Vedler *et al.*, 2004)。2,4-D 分解菌や他の芳香族塩素化合物の分解遺伝子群との比較解析から、最初は分かれて存在していた遺伝子が、寄せ集まって現在の 2,4-D 分解遺伝子群が形成されたと考えられている (Fulthorpe *et al.*, 1995; van der Meer, 2008)。

微生物が新しい能力を獲得するためには、遺伝子を変異させる、あるいは新たな遺伝子を獲得する必要がある。しかし、原核生物は真核生物とは異なり有性世代を持たないため、交雑によってゲノムを多様化させることはできない。塩基配列の変異によって新しい遺伝子を獲得するには非常に長い時間がかかる。そのため、迅速な遺伝子の獲得には、可動性遺伝因子 (Mobile genetic elements, MGEs) が重要な役割を果たしていると考えられている。可動性遺伝因子としてはトランスポゾンとプラスミドが知られる。トランスポゾンは、保有する遺伝子、あるいは二つのトランスポゾンに挟まれた領域を、ゲノム上の別の位置に挿入してゲノムに変化をもたらす。一般的なトランスポゾンは、細胞内で DNA 分子を変化させるが、異なる個体には移動できない。原核生物間の遺伝子の移動には、接合伝達性プラスミドと接合伝達性トランスポゾン (Integrative and conjugative elements, ICEs) という接合伝達因子が大きな役割を果たしていると考えられる。これまでに様々な有機物の分解菌が環境より分離され解析が進められたが、分解遺伝子群はトランスポゾンとして、接合伝達因子上に見出される場合が多い (Nojiri *et al.*, 2004; Ogawa *et al.*, 2004)。よって、新たな化合物を分解する分解遺伝子群は、トランスポゾンと接合伝達因子双方の働きで構築されてきたと考えられている。2,4-D 分解菌もその例外ではなく、分解遺伝子群をトランスポゾンとして伝達性プラスミド上に保有する株が複数見出されている (Kim *et al.*, 2013; Trefault *et al.*, 2004; Vedler *et al.*, 2004)。可動性遺伝因子の特性を明らかにすることは、細菌による新しい分解

能の獲得を考える上で非常に重要であり、微生物を用いた難分解物質の分解技術の向上につながると考えられる。

2,4-D 分解菌は世界各地で分離され、これまでに 100 株以上が農耕地土壌、非農耕地土壌、池や水路等の水系、及び活性汚泥より単離されている (Amy *et al.*, 1985; Don & Pemberton, 1981; Han *et al.*, 2014; Huong *et al.*, 2007; Itoh *et al.*, 2000; Ka *et al.*, 1994; Kamagata *et al.*, 1997; Lee *et al.*, 2005; Macur *et al.*, 2007; Maltseva *et al.*, 1996; Park & Ka, 2003; Tonso *et al.*, 1995; Zabaloy & Gomez, 2014)。中でも *Cupriavidus pinatuboensis* JMP134 株 (以前は *Alcaligenes eutrophus*, *Ralstonia eutropha*, 及び *Cupriavidus necator*) (Don & Pemberton, 1981) は、代表的な 2,4-D 分解菌で、この株を用いて数多くの研究が成されてきた。JMP134 株は、分解遺伝子を宿主範囲が広く、伝達頻度が高い IncP-1 プラスミド上に持つ。その後、複数の株で分解遺伝子が IncP-1 プラスミド上に見出された (Kim *et al.*, 2013; Poh *et al.*, 2002; Vedler *et al.*, 2004)。加えて、2,4-D 分解 IncP-1 プラスミドが土壌中で高頻度に伝播することが実験的に示された (DiGiovanni *et al.*, 1996; Top *et al.*, 1996)。これらの結果より、IncP-1 プラスミドは、2,4-D 分解遺伝子の伝播に重要な役割を担っていると考えられている。その一方で、各地で分離された分解菌の一部は、JMP134 株と異なる分解遺伝子群を保有し (Fulthorpe *et al.*, 1995; Ka *et al.*, 1994; Kitagawa *et al.*, 2002; Tonso *et al.*, 1995)、90 kb 前後の IncP-1 プラスミドより大型のプラスミド上に分解遺伝子を報告することが報告されている (Cavalca *et al.*, 1999; Vallaey *et al.*, 1998)。しかし、これらのプラスミドの伝達性は明らかにされていない。

日本では、1950 年代後半から水田除草剤として 2,4-D が大量に使用された (Fig. 1)。しかし、本剤が残留して汚染を引き起こしたとの報告はなく、一般的に数週間で分解する (農業ハンドブック, 2011)。このことは、水田にも 2,4-D 分解菌が存在することを示唆している。日本の水田は栽培期間中は湛水し、それ以外の期間は落水するというサイクルで維持されており、一般的な畑土壌や水系とは異なる分解菌の棲息する可能性がある。しかし、水田からの 2,4-D 分解菌の分離は海外を含めても見当たらず、どのような微生物種が分解を担っているのかは明らかにされていない。また、国内における 2,4-D 分解菌の分離例は、2,4-D の施

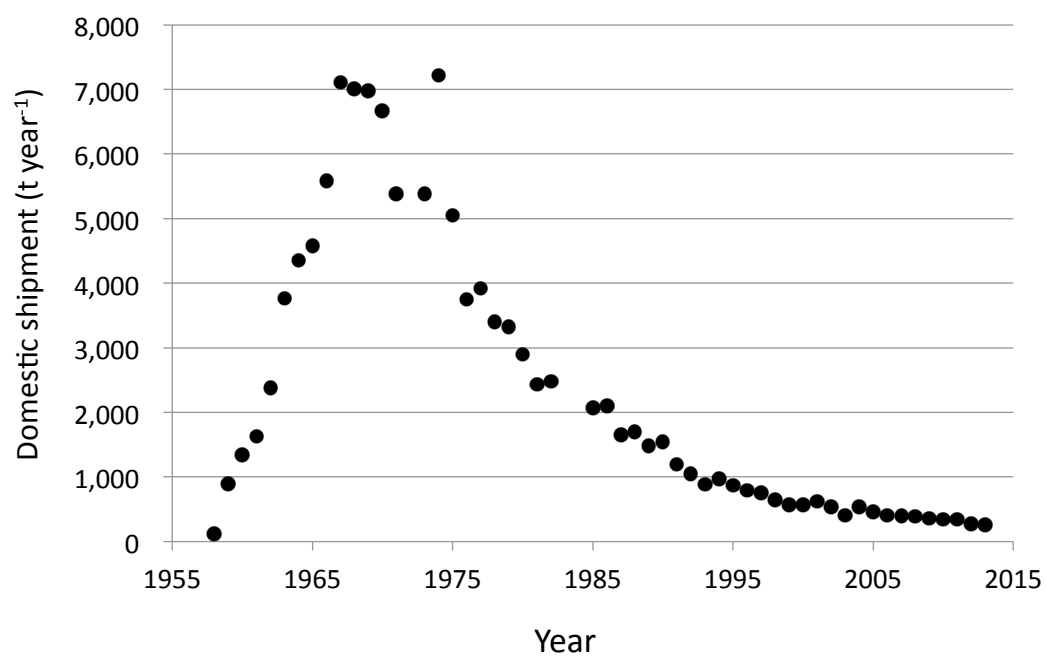


Fig. 1 Domestic shipment of 2,4-D granules in Japan. Data were collected from pesticide handbooks named “Nouyaku Yoran”.

用暦のない畑土壌 (Itoh *et al.*, 2000) 及び活性汚泥 (Lee *et al.*, 2005) に限られており、2,4-D が積極的に施用された場所の分解菌は調べられていない。本研究では、国内の水田土壌にも 2,4-D 分解菌が存在すると予測し、それらの保有する 2,4-D 分解遺伝子の種類とその獲得機構について研究を行うこととした。主食の生産を担う水田においてどのような微生物種がどのように分解遺伝子を獲得したのかを明らかにすることは、今後新しい薬剤を使用する際に、水田微生物がどのように分解能を獲得するかの予測につながる。また、報告例のない新しいタイプの分解菌、あるいは分解遺伝子が見出された場合、バイオレメディエーション技術の推進のための素材となることが期待された。

微生物による分解遺伝子群の獲得機構と伝播を明らかにすることは、難分解性物質の分解技術の向上の他に、組換え遺伝子の環境中における拡散の問題への情報収集が挙げられる。組換え生物は 1973 年に初めて大腸菌で作出された (Cohen *et al.*, 1973)。現在では動物から植物まで幅広く作出され、植物についてはラウンドアップ耐性トウモロコシに代表されるように、海外では広く商業利用されている。一方、組換え微生物の利用は、把握する限りでは、主に実験室レベル、あるいは屋内の培養タンク等の閉鎖系に限られる。組換え生物の利用はカルタヘナ法によって厳しく制限されているが、事故によって組換え微生物が環境中に流出することは否定できず、組換え遺伝子の拡散のリスク評価が必要とされる。2,4-D 分解遺伝子群は、2,4-D の使用が開始した 1940 年代以降に微生物が構築したと考えられる。よってこの遺伝子群がどのように環境中に拡散しているのかを把握することで、組換え遺伝子の拡散を予測するための情報が得られると考えた。

第一章では、日本各地の水田より 2,4-D 分解菌を分離すると共に、それぞれの菌の保有する分解遺伝子のタイプを調べた。分離した 14 株は、世界各地で見出されてきた代表的な 3 グループの分解遺伝子を保有することが明らかになった。

第二章では、それぞれの分解菌の分解遺伝子を保有するプラスミドを調査した。特に RASC サブグループの分解遺伝子群を保有するおよそ 600 kb のプラスミドは、属種の異なる複数の細菌によって保持され、報告例のない伝達性分解プラスミドの可能性が示された。

第三章では、600 kb のプラスミドの一つである pM7012 の全塩基配列を明らかにした。本

プラスミドは、2,4-D 分解遺伝子群の他にヒ素耐性遺伝子群と一連の接合伝達遺伝子群を保有することが明らかになった。

第四章では、プラスミド **pM7012** の祖先プラスミドが、外部から獲得したと考えられる遺伝子群を解析した。2,4-D 分解遺伝子群は既知の分解遺伝子群と相同性が高いことが明らかとなり、本プラスミドの 2,4-D 分解遺伝子群は独自に構築されたのではなく、外部から取り込まれた可能性が示された。

第五章では、**pM7012** の属するプラスミドグループについて研究した。接合伝達遺伝子群と複製分配遺伝子群の配列解析の結果より、本プラスミドは、これまでに報告例のない伝達性プラスミドグループに属することが示唆された。

第六章では、**pM7012** 及び類縁のプラスミドの接合伝達性について解析し、少なくとも過去には異なる細菌間に伝播した可能性が示された。

水田土壌由来 2,4-ジクロロフェノキシ酢酸 (2,4-D) 分解菌の収集と分解遺伝子のタイプ分け

1.1 要約

国内 8 カ所の水田から土壌を収集し、2,4-D を添加して集積培養を行った後、2,4-D を唯一の炭素源とする選択培地で、本農薬の分解菌の分離を試みた。コロニーの形態の違いや生育速度の異なる株をそれぞれの土壌について数株ずつ選び、分解菌候補を取得した。この株を、2,4-D 液体培地に接種して、培地中の 2,4-D の消失が認められた株を 2,4-D 分解菌とした。各土壌につき 1 から数株、合計 14 株の 2,4-D 分解菌を取得した。これらの菌の属する微生物グループと、保有する分解遺伝子の種類を明らかにするため、それぞれの微生物の 16S rDNA 及び 2,4-D 分解遺伝子の部分塩基配列を調べた。その結果、14 株中 13 株は β -プロテオバクテリアに属し、うち 8 株が *Burkholderia* 属菌、5 株が *Cupriavidus* 属菌と同定された。残る 1 株は α -プロテオバクテリアの *Sphingobium* 属菌に近縁だった。これらの菌の保有する 2,4-D 分解遺伝子配列は、世界各地で分離されている 2,4-D 分解菌の保有する配列に高い相同性を示すと共に、3 つのグループに分けられることが明らかとなった。また、異なる属種の細菌が、塩基配列として 98%以上相同な 2,4-D 分解遺伝子を保有していた。これらの結果は分解遺伝子が、接合伝達因子により過去に細菌間に水平伝播した可能性と、分解菌が地理的に移動した可能性を示す。

1.2 緒言

2,4-D は人類が化学合成した初めての除草剤で、世界中で多用されたため、分解微生物や分解機構について盛んに研究が行われてきた。2,4-D の施用は、欧米では 1940 年代に始まり、1950 年には 2,4-D 分解菌の土壌からの分離が報告されている (Audus, 1950)。1981 年に分離が報告された *Cupriavidus pinatuboensis* JMP134 株 (Don & Pemberton, 1981) は、その後、最もよく研究され、2,4-D 分解菌の代表株 (representative strain) となっている。2,4-D 分解菌は農耕地土壌、未耕地土壌、川や池等の水系、活性汚泥等から分離され、その数は、100

株以上にのぼる (Amy *et al.*, 1985; Don & Pemberton, 1981; Ka *et al.*, 1994; Lee *et al.*, 2005; Macur *et al.*, 2007; Tonso *et al.*, 1995)。当初はヨーロッパ、オーストラリア、アメリカ等で2,4-D分解菌の研究が盛んに行われたが、近年は、南米 (Zabaloy & Gomez, 2014)、ベトナム (Huong *et al.*, 2007)、韓国 (Park & Ka, 2003)、中国 (Han *et al.*, 2014) 等からも分離の報告がある。2,4-D分解菌は、2,4-D施用歴のない土壌 (Itoh *et al.*, 2000; Kamagata *et al.*, 1997) や塩濃度とpHの高い極限環境 (Maltseva *et al.*, 1996) からも分離されており、世界中に分布が認められる。

世界各地で分離された2,4-D分解細菌の多くがβ-プロテオバクテリアに属する。その中でも *Burkholderia* 属菌とその近縁種が高い頻度で分離されているが (Baelum *et al.*, 2010; Fulthorpe *et al.*, 1995; Huong *et al.*, 2007)、土壌の集積培養においては、2,4-Dを高い濃度 (500 mg kg⁻¹) で加えると、*Burkholderia* 属細菌の割合が増えることが報告されている (Macur *et al.*, 2007)。α-プロテオバクテリアの *Sphingomonas* 属菌及びその近縁種も、2,4-D分解菌として古くから分離されてきたが (Fulthorpe *et al.*, 1995; Huong *et al.*, 2007; Ka *et al.*, 1994)、同じα-プロテオバクテリアの *Bradyrhizobium* 属細菌は、生育速度が遅く、2,4-Dの施用歴のない土壌から分離される傾向がある (Itoh *et al.*, 2000; Kitagawa *et al.*, 2002)。2,4-D以外の芳香族化合物、例えば、トルエン、ナフタレン、及びカルバゾール等の分解菌としては、γ-プロテオバクテリアの *Pseudomonas* 属菌が分離されることが多い (Ogawa *et al.*, 2004)。しかし、*Pseudomonas* 属菌の2,4-D分解菌としての分離例は限られている (Baelum *et al.*, 2010; Fulthorpe *et al.*, 1995; Han *et al.*, 2014)。これまでに分離されている2,4-D分解細菌は、主に *Proteobacteria* 門に分類されていたが、近年、中国の小麦畑から初めて、*Firmicutes* 門の *Bacillus* 属細菌が分離された (Han *et al.*, 2014)。また、2,4-D分解菌として分離されてきたのは、微生物の中でも細菌に限られていたが、2013年に初めて糸状菌の2,4-D分解菌が報告された (Itoh *et al.*, 2013)。

好気的環境では、2,4-D は比較的速やかに消失するが、主に Fig. 1-1 に示した経路で微生物に分解されていると考えられている (Perkins *et al.*, 1990)。2,4-D 分解菌の代表株、*C. pinatuboensis* JMP134 株 (Don & Pemberton, 1981) を主に用いて、分解酵素とこれをコ

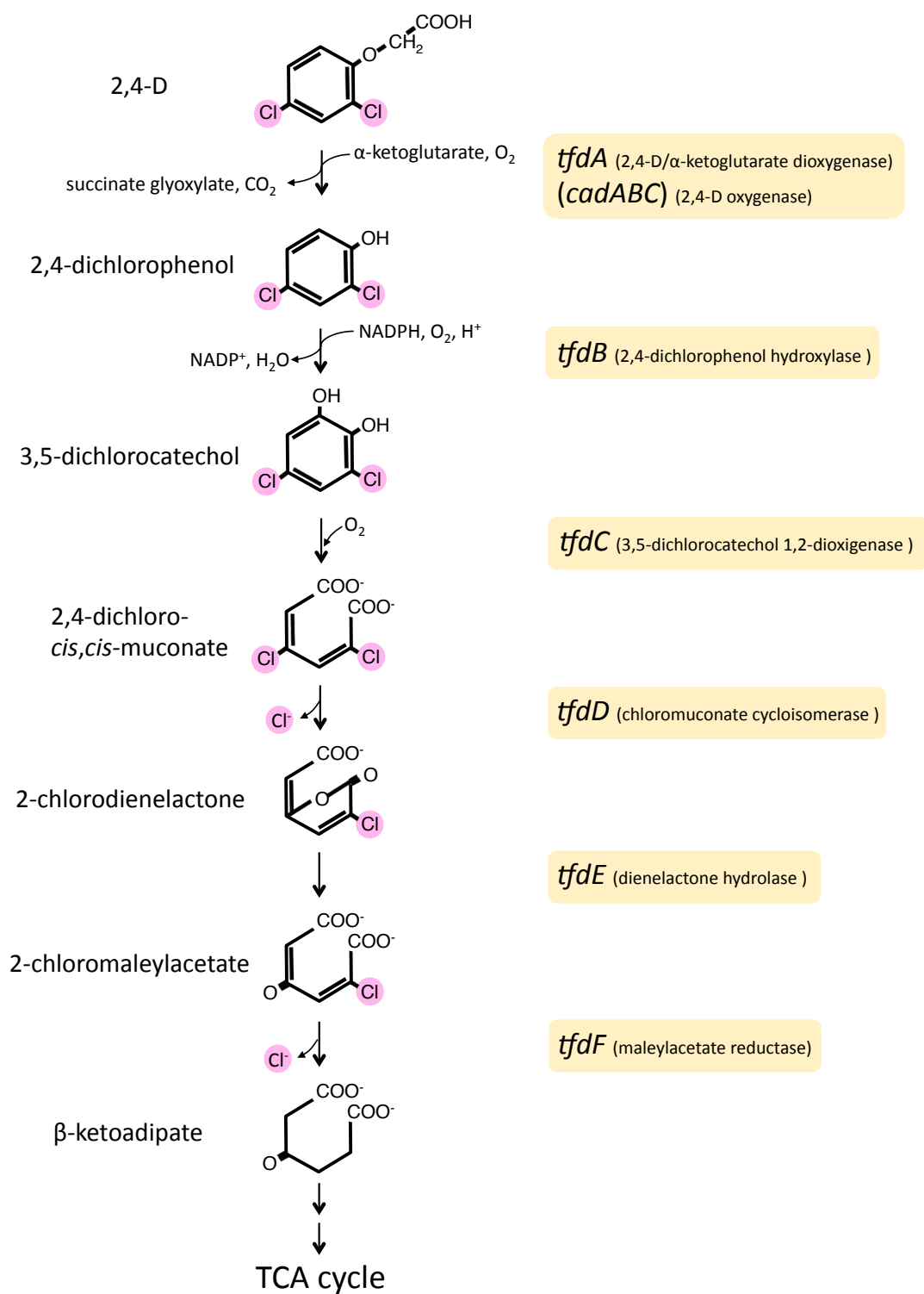


Fig. 1-1 The catabolic pathway of 2,4-D.

ードする遺伝子の研究が行われてきた (Farhana & New, 1997; Fukumori & Hausinger, 1993; Perkins *et al.*, 1990; Streber *et al.*, 1987)。JMP134 株は、2,4-D の分解に関わる *tfdB* 以下の分解遺伝群を 2 セット保有する。この遺伝子群は *tfdC_ID_IE_IF_IB_I* クラスター及び *tfdD_{II}C_{II}E_{II}F_{II}B_{II}* クラスターとして IncP-1 グループの伝達性プラスミド pJP4 の上に、隣り合って存在する (Fig. 1-2) (Laemmli *et al.*, 2000; Leveau & van der Meer, 1997)。双方の対応する遺伝子の相同性は、塩基配列として 65%前後である。*tfdA* 分解遺伝子も、上記分解遺伝子群に近接して存在するが、このような 2,4-D 分解遺伝子群の局在は、他の 2,4-D 分解菌でも報告されている (Hoffmann *et al.*, 2003; Kim *et al.*, 2013; Poh *et al.*, 2002; Vedler *et al.*, 2004)。一方、 α -プロテオバクテリア属菌の 2,4-D 分解菌 *Bradyrhizobium* sp. HW13 株では、*tfdA* 遺伝子の代わりに *cadABC* 遺伝子群が 2,4-D の最初の代謝を行うことが報告され (Kitagawa *et al.*, 2002)、その後 *cadA* の保有が複数の α -プロテオバクテリア属菌で確認された (Itoh *et al.*, 2004)。 α -プロテオバクテリア属菌には、*tfdA* 様の遺伝子として *tfdA* α 遺伝子が見出されている (Itoh *et al.*, 2002)。しかし、同遺伝子は 2,4-D を分解しない株にも存在し (Itoh *et al.*, 2004)、JMP134 株の *tfdA* に比べて 2,4-D ジオキシゲナーゼ活性が弱いため (Mal E 融合体の状態において) (Itoh *et al.*, 2002)、2,4-D 分解は、主に *cadABC* が担っていると考えられている (Kitagawa & Kamagata, 2014)。 α -プロテオバクテリア属菌の 2,4-D 分解遺伝子群については報告が限られているが、*Novosphingobium* sp. TFD44 株 (以前は *Sphingomonas* sp.) で、*tfdC* 以降のクロロカテコールの分解を担う遺伝子がクラスターを形成していることが報告された (Thiel *et al.*, 2005)。その後、4-chloro-2-methylphenoxyacetic acid (MCPA) 分解菌 *Sphingomonas* sp. ERG5 株で、*cadABC* 及び *tfdB* 以降の分解遺伝子群が、トランスポゾンとして局在することが明らかにされた (Nielsen *et al.*, 2013)。

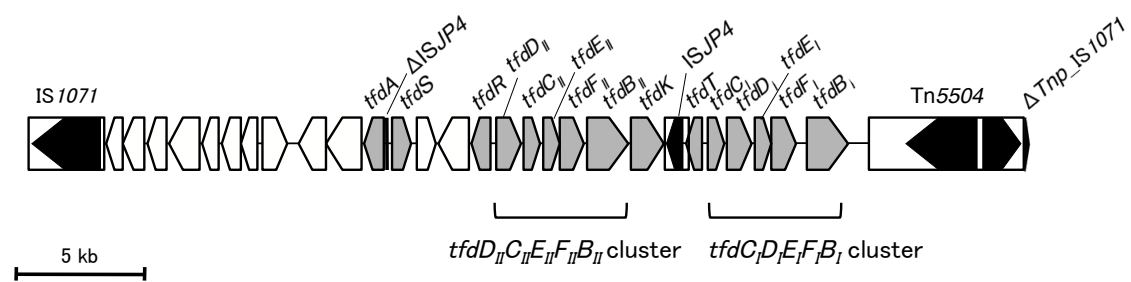


Fig. 1-2 Gene organization of 2,4-D degradation genes in *C. pinatuboensis* JMP134.

世界各地で盛んに 2,4-D 分解菌が分離されているが、日本国内の分離は、活性汚泥 (Lee *et al.*, 2005) 及び 2,4-D 施用歴のない畑地土壌 (Itoh *et al.*, 2000) に限られていた。日本では、2,4-D を水田除草剤として使用し、1950 年代から数十年に渡って多用された (Fig. 1)。しかし、水田からの分解菌の分離例はなく、また海外においても水田からの分離の報告は見当たらない。

本研究では、水田にも 2,4-D 分解菌が生息すると予測し、国内各地の水田土壌を収集して、2,4-D 分解菌の分離を試みると共に、それぞれの分離株の保有する分解遺伝子のタイプを解析した。

1.3 材料及び方法

1.3.1 2,4-D 分解菌の収集

(1) 土壌の収集と調整

国内各地の水田より土壌サンプルを収集した (Fig. 1-3)。ただし収集した 8 カ所のうちの 1 カ所 (北海道札幌市) は、数年前まで水田であったが、サンプル採取時は大豆が栽培されていた。土壌は湛水前に採取したが、北海道と新潟の土壌は積雪の影響で水分含量が高く、集積培養の際、基質である 2,4-D の混合が困難と考えられた。そこで、室内でシートに広げてゆっくり乾燥し、土壌水分を減じた。この際、表面のみ乾燥しすぎないように随時、土壌を攪拌した。全ての土壌は 2 mm のふるいにかけ、粗大な有機物を除いた。

集積培養を一定の水分条件で行うため、供試土壌の最大容水量を以下の方法で予め測定した。網状の底のついた高さ 50 mm の円柱にろ紙を敷いて土壌を入れた。これを水の入った容器に、底面よりゆっくり浸漬し、土壌表面まで十分に吸水させた。水から取り出して、数時間静置後、土壌を容器ごと乾熱器に入れて 105°C で一晚乾燥した。乾燥前後の重さの違いから、単位乾燥土壌あたりの水分量を算出し、得られた値を供試土壌の最大容水量とした。

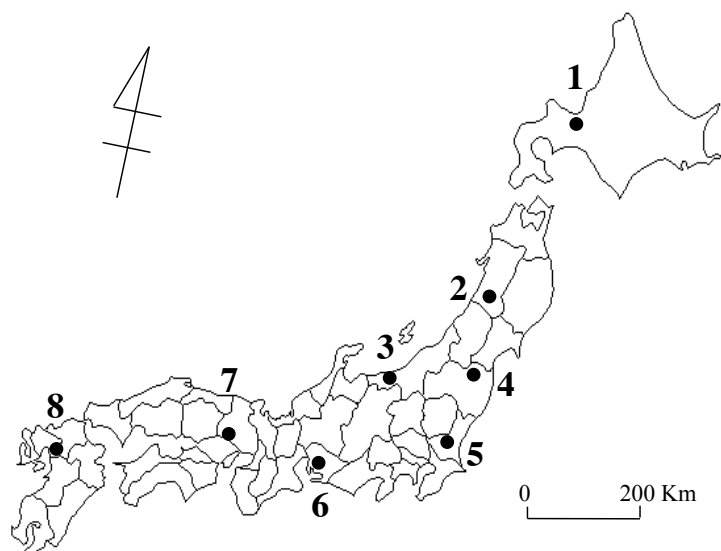


Fig. 1-3 Soil sampling sites in Japan. 1, Hokkaido; 2, Akita; 3, Niigata; 4, Fukushima; 5, Ibaraki; 6, Aichi; 7, Hyogo; 8, Fukuoka.

(2) 一次集積培養

一次集積培養の容器には、市販の梅酒びん（4 L）を用いた。梅酒びんはあらかじめよく洗浄した後、70%エタノールで滅菌し、風乾して実験に供した。乾燥重量 1 kg 相当の土壌をビニール袋に測りとり、0.5 g の 2,4-D（和光純薬工業）を粉末のまま加えて袋の中で十分に混合した後、培養容器に入れた。土壌水分が最大容水量の 55% となるよう、滅菌水をピペットでまんべんなく加えた。土壌を入れた容器は付属の蓋で封をし、28℃で 1 ヶ月培養した。ただし茨城で採取した土壌は 4 ヶ月、北海道で採取した土壌は 6 ヶ月培養した。培養容器の中が強い嫌気条件になるのを避けるため、培養開始から 1 ヶ月間は 1 週間に一度、2 ヶ月目以降は 1 ヶ月に一度、容器の蓋を開けて容器内の空気を置換した。

(3) 二次集積培養

2,4-D分解菌を確実に取得するため、二次集積培養を行った。1 gの集積培養土壌を100 mLの滅菌蒸留水に懸濁し、これをさらに希釈して 10^{-3} 及び 10^{-4} 倍希釈液を作成した。この希釈液を0.1 mLずつ、50 mL三角フラスコに入れた10 mLの2,4-D水溶液（ 0.5 mg mL^{-1} ）に加え、28℃、130 rpmの条件で一週間振とう培養した。2,4-Dはそのままでは水に溶けにくいいため、NaOHで中和しながら 25 mg mL^{-1} の高濃度溶液を予め作成した。ただし秋田県及び北海道由来の土壌からは、2,4-D水溶液を用いた二次集積培養では分解菌が取得されなかった。そこで、2,4-D水溶液（ 0.5 mg mL^{-1} ）に炭素源を含まない無機塩基本培地の成分（Ogawa & Miyashita, 1995）を加えて2,4-D液体培地とし、これを用いて再度の分離操作を行った。無機塩基本培地の成分は以下の通りである。1 Lあたり成分： $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 1.1 g; K_2HPO_4 , 2.29 g; KH_2PO_4 , 0.9 g; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.1 g; $\text{MnSO}_4 \cdot 4\sim 6\text{H}_2\text{O}$, 0.025 g; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.005 g; l-ascorbic acid, 0.005 g。茨城の土壌サンプルは、2,4-D水溶液と2,4-D液体培地の双方を用いて2次集積培養を行った。

(4) 2,4-D 分解菌候補の収集

2,4-D 分解菌の候補を単離するため、二次集積培養液を滅菌蒸留水で順次希釈し、0.1 mL

を 2,4-D を唯一の炭素源とする無機塩寒天培地 (2,4-D 平板培地) に塗布した。2,4-D 平板培地は、前述の 2,4-D 液体培地に精製寒天、Agar purified (Becton Dickinson (旧 Difco), USA) を加えて作成した。2,4-D 平板に接種源を塗布しておよそ一週間 28℃で培養した後、形成されたコロニーを白金耳で新しい 2,4-D 平板培地に塗り広げた。この際、コロニーの形態や生育スピードに応じて、コロニーを目視でグルーピングし、それぞれのグループについて数株ずつ単離した。形成されたシングルコロニーを新しい平板培地に塗り広げる操作を、さらに 2 回繰り返し、2,4-D 平板培地で安定して生育する菌株を選抜した。

(5) 2,4-D 分解能の確認

得られた菌株の 2,4-D 分解能を確認するため、選抜株を、2,4-D 液体培地に接種して、28℃、130 rpm の条件で 1 週間培養した。培養液は必要量を 0.2 μm のメンブレンフィルターでろ過した後、高速液体クロマトグラフィー (HPLC、日立製作所) を用いて 2,4-D の消失を調べた。分離カラムには TSKgel ODS-80Ts (東ソー) を用い、移動相にはメタノールと 0.1% リン酸の 6 : 4 混合液を使用した。カラム温度 25℃、流速 1 ml min⁻¹、検出波長 230 nm の条件で分析を行った。

1.3.2 分解菌の同定と分解遺伝子のタイプ分け

(1) 材料

水田より分離した 2,4-D 分解菌、及び既存の代表的な 2,4-D 分解菌 *C. pinatuboensis* JMP134 を用いた。また、JMP134 株の *tfdC_ID_IE_IF_IB_I* クラスターに相同な遺伝子群を保有する 2,4-D 分解菌 *Burkholderia cepacia* CSV90 株のプラスミド pMAB1 から構築された分解遺伝子群保有ベクター pMAB10 (Bhat *et al.*, 1994) 及び、JMP134 株の *tfdD_{II}C_{II}E_{II}F_{II}B_{II}* クラスターをベクターに導入した pJP4KH1SK1 を用いた。JMP134 株、プラスミド pMAB10 及び pJP4KH1SK1 は、小川直人博士 (現 静岡大学教授) から分譲を受けた。

(2) ゲノム DNA の抽出

水田土壌由来の 2,4-D 分解菌 14 株及び JMP134 株を、2,4-D 平板培地で前培養した後、Luria-Bertani broth (LB) 液体培地 (Sambrook & Russell, 2001) に接種し、28℃で 1 から 2 晩、対数増殖期後期まで 130 rpm で振とう培養した。ただし、C308 株は LB 培地での生育が極端に遅かったため、10 分の 1 に希釈した LB 液体培地を用いた。培養液を遠心して菌体を回収し、CTAB 法 (Current protocols in molecular biology, 1990)、またはゲノム DNA 抽出キット、Gentra Puregene Yeast / Bact. Kit (Qiagen, Holland) で DNA を抽出した。抽出操作はキットの説明書に従った。

(3) 16S rDNA 及び 2,4-D 分解遺伝子の部分配列の決定

ゲノム DNA を鋳型として 16S rDNA 及び 2,4-D 分解遺伝子の部分塩基配列を PCR 増幅した。分解遺伝子は、最初の 3 段階の反応に関わる遺伝子 (Fig. 1-1)、*tfdA* /*cadA*、*tfdB*、及び *tfdC* の配列を調べた。PCR は、50 µL の反応液に 1 ng のゲノム DNA、1.3 U の *Ex Taq* DNA ポリメラーゼ (タカラバイオ)、*Ex Taq* バッファー、0.2 mM の各 dNTP 及び 100 pmol の各プライマー (Table 1-1, *tfdC* はおよそ 270 bp の PCR 産物が得られるプライマー) を加えて実施した。ただし、16S rDNA 及び *tfdB* の部分塩基配列の増幅は、プライマーを 50 pmol に減じて実施した。本研究で設計した *cadA* 用のプライマーは、*Bradyrhizobium* sp. HW13 株の *cadA* 配列 (Accession number; AB062679) のポジション 589 から 612 及び 929 から 908 に該当する。PCR 反応プログラムは Table 1-2 に示した。PCR にはサーマルサイクラー model 9700, Gene Amp PCR System (Life Technologies, USA) を用いた。

得られた PCR 産物はアガロースゲルで電気泳動を行った後、エチジウムブロマイド (EtBr) で染色して、紫外線照射で可視化した。PCR 産物を含むゲルを切り出し、DNA ゲル抽出キット、QIAEX II gel extraction kit (Qiagen) で DNA を精製した。これを鋳型に、PCR 増幅に用いたプライマー (Table 1-1) で両方向よりシーケンス反応を行った。ただし、*tfdB* 部分配列は PCR 産物が長く、ダイレクトシーケンスではプライマー近傍の配列情報を取得できないため、TA クローニングを行い (ベクター pCR2.1 ; 宿主、*E. coli* TOP10F⁺) (Life Technologies)、M13 プライマーで両方向よりシーケンス解析した。また、K101 株、K401

株、I502 株及び T101 株はダイレクトシーケンスの結果、複数の *tfdC* 配列を持つ可能性が示されたため、*tfdB* と同じ方法でクローニング及びシーケンスを行った。全てのシーケンス反応は、BigDye Terminator cycle sequencing kit, ver.3.1 (Life Technologies) を用いてキットの説明書に従って実施し、キャピラリーシーケンサー、ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer (Life Technologies) で塩基配列を解析した。

Table 1-1 Primers for PCR.

Target sequence	Primer name	Primer sequences (5'-3') ^a	Reference
16S rDNA	1F	agtttgatcctggctc	Ochiai & Kaku (1999)
	3R	aaggaggtgatccagcc	
<i>tfdA</i>	<i>tfdA</i> -1	aacgcagcgrttrtcca	Vallaey's <i>et al.</i> (1999)
	<i>tfdA</i> -2	acggagttctgygayatg	
<i>cadA</i>	<i>cadA</i> -1	tatacattcaatggaaactggaag	this study
	<i>cadA</i> -2	ataatctgcagattcggataga	
<i>tfdB</i>	<i>tfdB</i> -1	atagcgctgrttcatytc	Vallaey's <i>et al.</i> (1999)
	<i>tfdB</i> -2	cgayatcaccaaycarc	
<i>tfdC</i>	CCDb	gtitggcaytciaciccigaygg	Leander <i>et al.</i> (1998)
(ca. 270 bp)	CCDe	tgigtyatgatgaagtyccicc	
<i>tfdC</i>	TFDCF	ggccggctsaagachtacga	Cavalca <i>et al.</i> (1999)
(ca. 600 bp)	TFDCR	gcgggytcgatvacgaagt	
insert of vector	-21M13	tgtaaaacgacggccagt	Instruction for the vector
	M13Rev	caggaaacagctatgacc	

^a r, a or g; y, t or c; i, inosine; h, a or c or t; v, a or g or c

Table 1-2 Conditions for PCR.

Target	PCR conditions
16S rDNA	94°C 2 min. 94°C 15 sec. 55°C 30 sec. 72°C 1.5 min.] 30 cycles 72°C 7 min.
<i>tfdA</i>	94°C 3 min. 94°C 30 sec. 59°C 30 sec. 72°C 30 sec.] 35 cycles 72°C 7 min.
<i>cadA</i>	94°C 2 min. 94°C 30 sec. 48°C 30 sec. 72°C 30 sec.] 35 cycles 72°C 7 min.
<i>tfdB</i>	94°C 2 min. 94°C 30 sec. 54°C 30 sec. 72°C 30 sec.] 35 cycles 72°C 7 min.
<i>tfdC</i> (ca. 270 bp)	94°C 2 min. 94°C 30 sec. 48°C 30 sec. 72°C 30 sec.] 35 cycles 72°C 7 min.
<i>tfdC</i> (ca. 600 bp)	94°C 4 min. 94°C 1 min. 57°C 1 min. 72°C 2 min.] 40 cycles 72°C 15 min.

(4) 塩基配列データの解析と登録

それぞれの PCR 産物のシーケンスデータは、遺伝情報処理ソフトウェア、GENETYX-MAC ver.12 (ゼネティックス) を用いてアセンブル及びプライマー配列の除去を行った。解析で得られた 16SrDNA 配列と最も近縁な配列を持つ基準株 (type strain) の検索は、Ribosomal database project (RDP) (<http://rdp.cme.msu.edu/>) で行い、分解遺伝子配列に相同な配列の検索を、日本 DNA データバンク (DDBJ) (<http://www.ddbj.nig.ac.jp/>) で実施した。配列の相同性の値は、GENETYX-MAC で取得し、系統樹を作成するための複数配列のアライメント、距離計算、及び最尤法による系統樹の作成は、遺伝子系統解析ソフトウェア、MEGA 5 (Tamura *et al.*, 2011) で実施した。

本研究で明らかにした 14 株の 16S rDNA 及び 2,4-D 分解遺伝子の部分塩基配列は DDBJ を通じて登録した。Accession number は以下の通りである。AB212226 から AB212239 (16S rDNA)、AB212768 から AB212780 (*tfdA*)、AB212781 (I602 株の *cadA*)、AB212782 から AB212795 (*tfdB*)、及び AB212972 から AB212989 (*tfdC*)。

(5) JMP134 グループの 2,4-D 分解遺伝子保有株のハイブリダイゼーション解析

JMP134 株及びこの株と相同性の高い分解遺伝子配列を持つ K101、K301、及び K401 株のゲノム DNA を、制限酵素 *EcoRI* (東洋紡) で切断し、150×140 mm の 0.7% アガロースゲルで泳動した (5 µg DNA/well, 200 V, 1 時間)。DNA サイズマーカーには λ *HindIII* を用いた。泳動ゲルの中のゲノム DNA は、バキュームブロッティング装置、VacuGene (GE healthcare, USA) でナイロンメンブレン、Hybond-N+ (GE healthcare) にトランスファーし、UV クロスリンクで固定した。

tfdB_I プローブ及び *tfdC_I* プローブは pMAB10、*tfdB_{II}* プローブ及び *tfdC_{II}* プローブは、pJP4KH1SK1 を鋳型として PCR 増幅で作成した。*tfdC* 配列のハイブリダイゼーションは、AlkPhos Direct Labelling and Detection System (GE healthcare) を用いて実施した。*tfdC_I* プローブ及び *tfdC_{II}* プローブの作成は、およそ 600 bp の PCR 産物の得られる Cavalca ら (1999) のプライマー (Table 1-1) を用いて、Table 1-2 の条件で鋳型 DNA 配列を増幅し、

得られた産物を、AlkPhos Direct Labelling Module (GE healthcare) でラベリングすることによって実施した。この方法では、PCR 産物にアルカリフォスファターゼが直接結合したプローブが作出される。*tfdB* 遺伝子配列のハイブリダイゼーションでは、digoxigenin (DIG) でラベルしたプライマーを用いた。プローブの作成は、1.3.2 (3) で述べた PCR 反応で実施した。ただし、反応液に、DIG-11-dUTP (Roche, Switzerland) を 0.25 nmol 相当添加した。ハイブリダイゼーションバッファーには PerfectHyb (東洋紡) を用い、DIG Nucleic Acid Detectio kit (Roche) で DIG にアルカリフォスファターゼを結合した。メンブレン上の DNA に結合したプローブは、検出試薬、CDP-Star (Roche) で発光させ、X 線フィルムに露光して検出した。

1.4 結果

1.4.1 2,4-D 分解菌の収集

実験に用いた国内 8 カ所の水田土壌全てから、2,4-D を唯一の炭素源とする平板培地で生育するコロニーが多数得られた。しかし 2 回の集積培養により、コロニーの多くは、本実験の培養環境に適した同一の菌に由来している可能性が考えられた。そこで、それぞれの土壌につき、形態や増殖速度の異なるコロニーを数個ずつ選んで 2,4-D 分解菌の候補とし、繰り返しシングルコロニーを継代することにより、菌株を純化した。いくつかの株は、継代する過程で生育不良となったため、廃棄した。得られた菌株の 2,4-D 分解能の有無を確認するため、2,4-D を唯一の炭素源とする 2,4-D 液体培地にこれらの株を接種した。HPLC で培養液中の 2,4-D の消失を確認したところ、いくつかの株では、2,4-D 分解能が認められなかった。このような株を、2,4-D 平板培地と同じ組成の 2,4-D を含まない平板培地に接種したところ、2,4-D 平板培地を用いた場合と同様に生育した。即ち、本研究で用いた方法では、寒天培地中に僅かに含まれる 2,4-D 以外の炭素源を利用して生育する菌も分離されていた。HPLC で 2,4-D の消失が確認された株の中から、それぞれの土壌について 1 から 3 菌株を選び、合計 14 株を水田由来 2,4-D 分解菌の代表株とした (Table 1-3)。

Table 1-3 2,4-D-degrading strains isolated in this study.

Site number ^a	Sampling site (prefecture, city)	Strains
1	Hokkaido, Sapporo	H801 ^b
2	Akita, Omagari	M701 ^b
3	Niigata, Joetsu	T101, T201, T301
4	Fukushima, Fukushima	Ff54
5	Ibaraki, Tsukuba	Y103, Y212 ^b
6	Aichi, Kariya	K101, K301, K401
7	Hyogo, Tatsuno	I502, I602
8	Fukuoka, Chikugo	C308, C801

a; Site number is correlated with the number shown in the map of Fig. 1-3.

b; the strain isolated from 2,4-D liquid medium inoculated with soil dilutions.

これとは別に、8カ所のうちの1カ所の秋田県でサンプリングした土壌について、土壌に2,4-Dを添加培養する一次集積培養を省いて液体培地を用いた集積培養を行い、この培養液から2,4-D分解菌の単離を試みたが、分解菌は得られなかった。

1.4.2 分解菌の同定と分解遺伝子のタイプ分け

(1) 水田由来2,4-D分解菌の16S rDNA配列

水田より単離された14株の2,4-D分解菌それぞれについて、およそ1,500 bpの16S rDNA配列を取得した（ただしI602株は975 bp）。この配列を用いて、最も近縁なtype strainを検索した結果をTable 1-4に示す。いずれの株のrDNA配列も既存のtype strainの配列に97%以上の高い相同性を示し、14株中8株が*Burkholderia*属菌、5株が*Cupriavidus*属菌、1株が*Sphingobium*属菌と同定された。また、8株の*Burkholderia*属菌は4種、5株の*Cupriavidus*属菌は2種のtype strainに高い相同性を示した。即ち、水田より分離した14株の2,4-D分解菌は、属レベルでは3種類、種レベルでは8種類の細菌より構成されていることが示された。

Table 1-4 Similarities among type strains and 2,4-D-degrading strains isolated in this study, and type of 2,4-D degradation genes in each strain.

Strain	Identified as:	16S rRNA gene sequence comparison			Group of 2,4-D degradation genes ^a
		Closest relative (accession number)	Identity		
Y212	<i>Burkholderia</i>	<i>Burkholderia metallica</i> R-16017 ^T (AM747632)	1487 / 1490 (99%)		RASC
Ff54	<i>Burkholderia</i>	<i>Burkholderia metallica</i> R-16017 ^T (AM747632)	1487 / 1490 (99%)		RASC
T301	<i>Burkholderia</i>	<i>Burkholderia metallica</i> R-16017 ^T (AM747632)	1487 / 1490 (99%)		RASC
K301	<i>Burkholderia</i>	<i>Burkholderia metallica</i> R-16017 ^T (AM747632)	1487 / 1491 (99%)		JMP134
T201	<i>Burkholderia</i>	<i>Burkholderia diffusa</i> R-15930 ^T (NR_042633)	1488 / 1490 (99%)		RASC
C308	<i>Burkholderia</i>	<i>Burkholderia terrae</i> KMY02 ^T (NR_041287)	1462 / 1470 (99%)		RASC
H801	<i>Burkholderia</i>	<i>Burkholderia sediminicola</i> HU2-65W ^T (NR_044383)	1444 / 1468 (98%)		RASC
M701	<i>Burkholderia</i>	<i>Burkholderia sacchari</i> IPT101 ^T (NR_025097)	1480 / 1491 (99%)		RASC
T101	<i>Cupriavidus</i>	<i>Cupriavidus basilensis</i> DSM 11853 ^T (NR_025138)	1481 / 1484 (99%)		EST4002
K101	<i>Cupriavidus</i>	<i>Cupriavidus basilensis</i> DSM 11853 ^T (NR_025138)	1481 / 1484 (99%)		JMP134
I502	<i>Cupriavidus</i>	<i>Cupriavidus basilensis</i> DSM 11853 ^T (NR_025138)	1481 / 1484 (99%)		EST4002
K401	<i>Cupriavidus</i>	<i>Cupriavidus basilensis</i> DSM 11853 ^T (NR_025138)	1449 / 1484 (97%)		JMP134
Y103	<i>Cupriavidus</i>	<i>Cupriavidus laharis</i> 1263a ^T (NR_040869)	1449 / 1492 (97%)		RASC
I602	<i>Sphingobium</i>	<i>Sphingobium chlorophenolicum</i> ATCC 33790 ^T (NR_040807)	802 / 821 (98%)		TFD44

a; group name is corresponding with the name shown in Table 1-5.

(2) 2,4-D 分解遺伝子配列の解析

14 株が保有する *tfdA* (または *cadA*)、*tfdB*、及び *tfdC* 遺伝子 (Fig. 1-1) の部分塩基配列はそれぞれ、既知の 2,4-D 分解菌 *C. pinatuboensis* JMP134 株、*A. xylosoxidans* EST4002 株 (Mae *et al.*, 1993) 及び *Novosphingobium* sp. TFD44 (Fulthorpe *et al.*, 1995) 株の配列に 91%以上の相同性を示した (Table 1-5)。これら既知の 2,4-D 分解菌 3 株の保有する *tfdA*、*tfdB*、及び *tfdC* の塩基配列の菌株間の相同性は概ね 70%以下であるため (ただし、JMP134 株と EST4002 株の *tfdA* の塩基配列の相同性は 81%) (Table 1-6)、14 株の保有する 2,4-D 分解遺伝子配列は 3 つのグループに分けられた (Table 1-5)。本研究においてはこの 3 グループを、JMP134 グループ、EST4002 グループ、及び *Sphingomonas* グループと名付けた。EST4002 グループに分類された 10 株はさらに 2 つのサブグループに分けられた。10 株のうち 8 株の *tfdA*、*tfdB*、及び *tfdC* の塩基配列は EST4002 株の配列に 93 から 95%の相同性を示したのに対し、*Burkholderia tropica* RASC 株の配列に 98%以上の相同性を示したため、RASC サブグループに分類した。残りの 2 株の配列は、EST4002 株の保有する配列に 98%以上の相同性を示したため、EST4002 サブグループに分類した。*tfdC* の部分塩基配列を用いて、分解遺伝子の系統関係を Fig. 1-4 に示した。特に RASC サブグループと JMP134 グループの分解遺伝子は、それぞれ複数の属種の細菌に保有されていることが明らかとなった (Table 1-4)。

Table 1-5 Grouping of 2,4-D-degrading strains based on the nucleotide sequence similarity in the *tfdA*, *tfdB* and *tfdC* homologs.

Group	Strain	Similarity (%) of nucleotide sequence with indicated gene ^a			
		<i>tfdA</i>	<i>tfdB</i>	<i>tfdC</i>	
JMP134 group	<i>Cupriavidus</i> sp. K101	100	100 (<i>tfdB_I</i>)	100 (<i>tfdC_I</i>)	
			+ ^b (<i>tfdB_{II}</i>)	99.1 (<i>tfdC_{II}</i>)	
	<i>Cupriavidus</i> sp. K401	100	100 (<i>tfdB_I</i>)	100 (<i>tfdC_I</i>)	
			+ (<i>tfdB_{II}</i>)	100 (<i>tfdC_{II}</i>)	
	<i>Burkholderia</i> sp. K301	100	100 (<i>tfdB_I</i>)	100 (<i>tfdC_I</i>)	
			– (<i>tfdB_{II}</i>)	– (<i>tfdC_{II}</i>)	
EST4002 group					
EST4002 subgroup	<i>Cupriavidus</i> sp. T101	100	99.6	98.7	
	<i>Cupriavidus</i> sp. I502	100	99.6	98.7	
RASC subgroup	<i>Cupriavidus</i> sp. Y103	100	98.2	100	
	<i>Burkholderia</i> sp. Y212	100	98.2	100	
	<i>Burkholderia</i> sp. C308	100	98.2	100	
	<i>Burkholderia</i> sp. T201	100	98.2	100	
	<i>Burkholderia</i> sp. T301	100	98.2	100	
	<i>Burkholderia</i> sp. M701	100	98.2	100	
	<i>Burkholderia</i> sp. H801	100	98.2	100	
	<i>Burkholderia</i> sp. Ff54	100	98.2	100	
<i>Sphingomonas</i> group	<i>Sphingobium</i> sp. I602	86.4 (<i>cadA</i>)	92.0	91.0 ^c	

^a % similarity was calculated using the nucleotide sequences of the degrading gene homolog in the strain isolated in this study and the corresponding gene from the representative strain, JMP134, EAT4002, RASC or TFD44, of the respective (sub-) group. The gene fragments used in this analysis were *tfdA* (213 bp), nucleotide positions 505 to 717 of *tfdA* from strain JMP134 (M16730); *tfdB* (226 bp), positions 59 to 284 of *tfdB_I* from strain JMP134 (X07754); *tfdC* (223 bp), positions 384 to 606 of *tfdC_I* from strain JMP134 (M36280); and *cadA* (295 bp), positions 613 to 907 of *cadA* from *Bradyrhizobium* sp. strain HW13 (AB062679). The nucleotide sequences of the representative strains were obtained from DDBJ and had the following accession numbers: *tfdA*, *C. pinatuboensis* strain JMP134, M16730; *A. xylosoxidans* strain EST4002, U32188; *B. cepacia* strain RASC, U25717. *tfdB*, strain JMP134, X07754 (I), U16782 (II); strain EST4002, U32188; strain RASC, AF068279; *Novosphingobium* sp. strain TFD44, AF068273. *tfdC*, strain JMP134, M36280 (I), U16782 (II); strain EST4002, AY540995; strain RASC, AF043451; strain TFD44, AY598949. *cadA*, strain TFD44, AB119243.

^b + (–), the gene was detected (or not detected) by analysis of Southern hybridization.

^c *Novosphingobium* sp. strain TFD44 has two genes encoding chlorocatechol 1,2-dioxygenase, namely *tfdC* and *tfdC2* (Thiel *et al.*, 2005) , and the sequence data of *tfdC* is used in this table.

Table 1-6 Similarity (%) among the partial nucleotide sequences of *tfdA*, *tfdB*, and *tfdC* from *C. pinatuboensis* strain JMP134, *A. xylosoxidans* strain EST4002, and *Novosphingobium* sp. strain TFD44^a.

	JMP134 ^b vs. EST4002	JMP134 ^b vs. TFD44 ^c	EST4002 vs. TFD44 ^c
<i>tfdA</i>	81.2	49.3 ^d	49.8 ^d
<i>tfdB</i>	58.4	60.6	67.7
<i>tfdC</i>	63.9	68.3	60.9

^a The positions and accession numbers of the sequences in this table are given in the footnotes to Table 1-5.

^b The nucleotide sequence data of *tfdB_I* and *tfdC_I* of *C. pinatuboensis* strain JMP134 are used in this table.

^c *Novosphingobium* sp. strain TFD44 has two genes that encode chlorocatechol 1,2-dioxygenase (*tfdC* and *tfdC2*), and the nucleotide sequence data of *tfdC* are used in this table.

^d The similarity of the partial nucleotide sequences of the *tfdA*-like gene of *Novosphingobium* sp. strain TFD44 (AB119237) and the *tfdA* of *C. pinatuboensis* strain JMP134 or *A. xylosoxidans* strain EST4002 is shown.

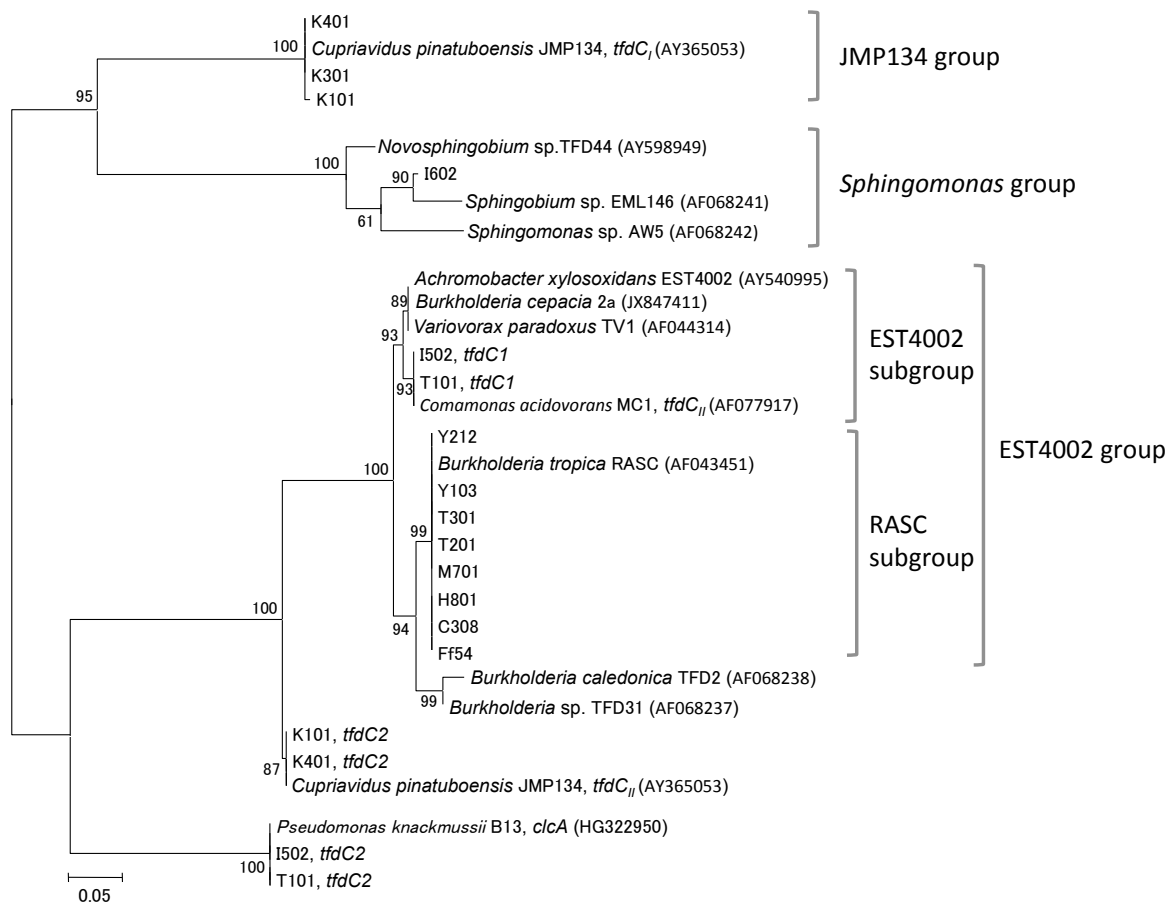


Fig. 1-4 Phylogenetic tree of partial nucleotide sequences (ca. 270 bp) of *tfdC* homologues from 2,4-D-degrading strains isolated from paddy fields and related strains. Parentheses represent accession number of *tfdC* homologues in DNA database. Name of gene is shown after strain name, when the strain has plural of the homologues. The tree was reconstructed by maximum-likelihood analysis using MEGA 5 software. Bootstrap values were calculated from 1,000 replicates.

JMP134株は、2つのクロロフェノール分解遺伝子群を保有するが(Laemmli *et al.*, 2000) (Fig. 1-2)、この分解遺伝子群は、それぞれ異なる分解遺伝子グループに属する。即ち、*tfdC_ID_IE_IF_IB_I*クラスターはJPM134グループの分解遺伝子配列を持ち、*tfdD_{II}C_{II}E_{II}F_{II}B_{II}*クラスターはEST4002グループに近い分解遺伝子配列を持つ (Fig. 1-4)。本研究で分離した14株の2,4-D分解菌のうち3株がJMP134グループの分解遺伝子配列を保有した (Table 1-5)。そのうちの2株、K101株及びK401株も2種類の*tfdC*配列を保有し、JMP134株の保有する*tfdC_I*及び*tfdC_{II}*の塩基配列に99%以上相同であった。一方、K301株ではJMP134株の*tfdC_I*に相同な配列のみ検出された。*tfdB*配列の解析は、PCR産物をクローニングした後、それぞれの分解菌につき1クローンずつ解析したところ、3株から検出された配列は、JMP134株の*tfdB_I*に同一であった。

EST4002サブグループの分解遺伝子配列を持つI502株及びT101株は、ゲノムDNAを鋳型としたPCR産物のダイレクトシーケンスの波形から、複数の*tfdC*配列を持つことが示唆された。そこでTAクローニング解析を行った結果、両株で2種類の*tfdC*配列が見出され、*tfdC₁*及び*tfdC₂*と名付けた。I502株とT101株の*tfdC₁*はほぼ同一で、EST4002株の*tfdC*塩基配列に98%相同であった (Table 1-5)。一方、両株の*tfdC₂*も互いに同一であったが、EST4002株の*tfdC*塩基配列への相同性は68%であった。*tfdC₂*に相同な配列をDNAデータベースで検索したところ、クロロ安息香酸分解菌*Pseudomonas kanackmussii* B13株 (Frantz & Chakrabarty, 1987)の保有するクロロカテコールジオキシゲナーゼ遺伝子、*clcA*と塩基レベルで同一であった (Fig. 1-4)。

Sphingobium sp. I602株のゲノムDNAからは、*tfdA*のPCR産物が検出されなかった。ハワイで分離された*Bradyrhizobium* sp. HW13株では、*cadABC*が2,4-D分解の最初の反応を担う事が報告されており (Kitagawa *et al.*, 2002)、*Bradyrhizobium* sp. RD5-C2, *Novosphingobium* sp. TFD44株及び*Sphingomonas* sp. B6-10株等の他、 α -プロテオバクテリアの2,4-D分解菌からも*cadA*遺伝子の配列が検出されている (Itoh *et al.*, 2004)。そこで、I602株の*cadA*配列を解析した結果、同配列はB6-10株の*cadA*配列に同一で、TFD44株及びHW13株の配列への相同性はそれぞれ86%及び76%であった。また、I602株の*tfdB*

と *tfdC* は、TFD44 株の同遺伝子にそれぞれ 92% と 91% の相同性を示した (Table 1-5)。

(3) JMP134 グループの分解遺伝子保有株のハイブリダイゼーション解析

JMP134 グループの分解遺伝子を持つ 3 株が、JMP134 株と同様に 2 種類のクロロフェノール分解遺伝子群を保有するのかは、PCR に基づいた部分塩基配列の解析では判断できなかった。そこで、*tfdB* 配列及び *tfdC* 配列をプローブとしたサザンハイブリダイゼーションを行った。*tfdC* 遺伝子配列の解析には、AlkPhos Direct Labelling and Detection System (GE healthcare) を用いたが、ゲノム DNA 全体がスメアーに検出され、特異性が低いようであった (Fig. 1-5 右図 2 枚)。*tfdC_I* プローブでは、JMP134 株と K301 株はおおよそ 23 kb の DNA 断片にシグナルが検出され、K101 株及び K401 株では、それよりやや小さい DNA 断片にシグナルが検出された。*tfdC_{II}* プローブでは、*tfdC_I* プローブで検出されたバンドに弱いシグナルが 4 株全てで検出され、その下の 9 kb 前後の DNA 断片に K301 株を除く 3 株で、強いシグナルが検出された。弱いシグナルは非特異的検出と考え、K301 株は *tfdC_{II}* の配列を持たないと判断した。*tfdB* 配列の解析では、ハイブリダイゼーションに用いる試薬とプローブのラベリング法を変更して、特異性が改善された (Fig. 1-5 左図 2 枚)。*tfdB_I* プローブでは、*tfdC_I* プローブと同じパターンのシグナルが得られた。一方、*tfdB_{II}* プローブの場合、JMP134 株では 23 kb 付近と 2 kb 以下の断片、K101 株及び K401 株では 4 kb 付近と 2 kb 以下の DNA 断片にシグナルが認められ、K301 株ではシグナルが検出されなかった。即ち、K101 株及び K401 株は、JMP134 株同様、2 種類の *tfdB* 及び *tfdC* 配列を保有するが、K301 株は *tfdB_I* 及び *tfdC_I* 配列のみ保有すると考えられた。

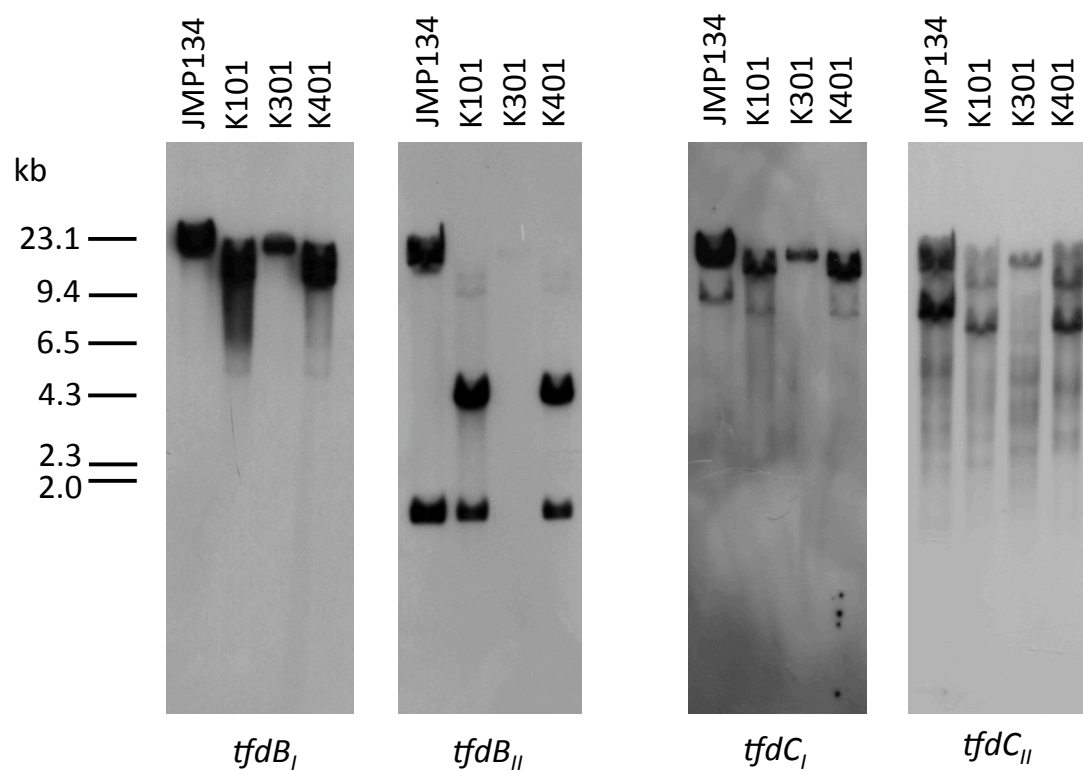


Fig. 1-5 Analysis of the hybridization pattern of *EcoRI*-digested total DNA of the strains having the degradation genes of JMP134 group. The name of the applied probe is shown under the each picture.

1.5 考察

2,4-D 分解菌の研究は当初、欧米を中心に実施された。そのため、主にアジア地域に分布する水田は、2,4-D が多用された歴史があるにもかかわらず、分解菌の分離が行われてこなかったと考えられる。本研究で、北海道から九州まで、国内 8 カ所の水田より土壌を採取して 2,4-D 分解菌の集積培養と分離を試みたところ、比較的容易に 2,4-D 分解菌を単離することができた。即ち、水田土壌から 2,4-D 分解菌が初めて分離され、水田土壌にも 2,4-D 分解菌の存在することが確認された。この分解菌を単離する過程で、2,4-D を唯一の炭素源とする平板培地を用いたにも関わらず、2,4-D 分解能を持たない株も多数コロニーを形成した。土壌には低栄養を好む細菌が数多く生息しており (Ohta & Hattori, 1983; Saito *et al.*, 1998)、精製寒天であっても土壌細菌の利用可能な炭素源が含まれていたと考えられた。一方、コロニーの純化の過程で一部のコロニーが消失したのは、用いた培養条件がその個体に適合しなかった可能性と、複数の菌株により 2,4-D の資化を行っていた可能性が考えられた。特に後者については、実際の土壌で 2,4-D 分解に重要な役割を果たしている可能性があるが、本研究では、細菌における 2,4-D 分解遺伝子群の獲得と伝播の調査を目的として研究を実施するため、単独で 2,4-D を資化する菌のみを扱うこととした。

水田土壌から分離した 14 株の 2,4-D 分解菌のうち 13 株は、 β -プロテオバクテリアに属し、残りの 1 株が α -プロテオバクテリアに属した。これまでに単離されている 2,4-D 分解細菌の多くは、 β -プロテオバクテリアに属し、次いで α -プロテオバクテリアに属する。即ち、これまでに世界各地で水田以外の環境から分離されてきた 2,4-D 分解菌と同様の分解菌が、水田からも分離された。16S rDNA 配列に基づいて、13 株の β -プロテオバクテリアのうち、8 株が *Burkholderia* 属菌、5 株が *Cupriavidus* 属菌と同定された。また、16S rDNA の配列だけでは細菌を種のレベルまで同定できないが、それぞれの分離株に最も近縁な **type strain** を検索したところ、同属でも異なる種の **type strain** に近縁であった。この結果は、双方の属の 2,4-D 分解菌に複数の種が含まれることを示していると考えられた。唯一の α -プロテオバクテリアの菌株は、*Sphingobium* 属菌と同定された。*Sphingobium* 属菌は、以前の分類では

Sphingomonas 属菌に含まれるが、2001 年に *Sphingomonas* 属菌を 4 属に分ける提案があり (Takeuchi *et al.*, 2001)、これに従った。*Sphingomonas* 属菌として分離された TFD44 株 (Fulthorpe *et al.*, 1995) も、現在の分類では *Novosphingobium* 属菌に分類されている (Thiel *et al.*, 2005)。

14 株の分解遺伝子、*tfdA* (または *cadA*)、*tfdB* 及び *tfdC* は、塩基配列の相同性に基づいて 3 グループ、サブグループを含めると 4 グループに分けられた。いずれの配列も海外で分離された代表的な 2,4-D 分解菌の配列と高い相同性を示し、世界各地で見出されてきた主要な 2,4-D 分解遺伝子が、国内の水田土壌にも存在することが示された。2,4-D 分解の最初の遺伝子である *tfdA* 及び *cadA* の配列が、2,4-D 分解遺伝子の代表的な配列として分類されてきたが、その方法は、研究グループによって異なる (Table 1-7)。混乱を招きやすい上に、本研究では、*tfdA* のみならず *tfdB* と *tfdC* も含めてグループ分けを行ったため、代表株名をグループの名前とした。

水田由来の 14 株において、JMP134 グループと RASC サブグループの 2,4-D 分解遺伝子が複数の属種の細菌に保持されていた (Table 1-4)。よってこれらの分解遺伝子は、なんらかの接合伝達因子によって細菌間に伝播したと考えられた。一般に、機能遺伝子に比べて rDNA 遺伝子の塩基配列の保存性は高く、異なる属種の機能遺伝子の配列の相同性が、偶然に rDNA 遺伝子より高くなることはないと考えられる。主に米国で分離された 2,4-D 分解菌においても、JMP134 グループと RASC サブグループそれぞれの *tfdA* 配列が、異なる 16S rDNA を持つ細菌に保有されていることが明らかになり、分解遺伝子が細菌間に伝播した可能性が報告されている (McGowan *et al.*, 1998)。JMP134 株の分解遺伝子は、宿主範囲が広く伝達頻度の高い IncP-1 不和合性グループの伝達性プラスミドに保有される (Don & Pemberton, 1981)。従って、水田由来の JMP134 グループの分解遺伝子も、同じプラスミドによって伝達している可能性が高いと考えられた。一方、*B. tropica* RASC 株 (以前は TFD3 株、*B. cepacia*) (Baelum *et al.*, 2010; Tonso *et al.*, 1995; Vallaey *et al.*, 1996) の 2,4-D 分解遺伝子は、JMP134 株の遺伝子ほどには解析されていない。同株の *tfdA* 配列が染色体上に存在することが報告される一方 (Suwa *et al.*, 1996)、*tfdC* 配列は、532 kb の大型のプラ

Table 1-7 Classification of *tfdA* and *cadA* genes depending on the sequence similarities.

Strain/ gene	McGowan <i>et al.</i> (1998)	Baelum <i>et al.</i> (2010)	Lee <i>et al.</i> (2005)	This study
JMP134/ <i>tfdA</i>	Class I	Class I-a	Class I	JMP134 group
TFD9/ <i>tfdA</i>	Class I	Class I-b	Class I	JMP134 group
RASC/ <i>tfdA</i>	Class II	Class II	Class II	RASC subgroup
EST4002/ <i>tfdA</i>	Class III	Class III	Class II	EST4002 subgroup
HW13/ <i>cadA</i>	-	-	Class III	-
TFD44/ <i>cadA</i>	-	-	-	<i>Sphingomonas</i> group
Uncultured bacterium/ <i>cadA</i> -like	-	-	Class IV	-

スミド上に存在することが報告されている (Cavalca *et al.*, 1999)。2,4-D 分解能が RASC 株から別の株に低い頻度で伝達されたことが報告され (McGowan *et al.*, 1998)、分解遺伝子がプラスミドによって伝達した可能性が示されているが、プラスミドそのものの伝達は確認されていない。

本研究で得られた α -プロテオバクテリアの 2,4-D 分解菌 I602 株の分解遺伝子は、既知の α -プロテオバクテリアの 2,4-D 分解菌、TFD44 株の遺伝子に高い相同性を示した。 α -プロテオバクテリアの 2,4-D 分解菌は、 β -プロテオバクテリアや γ -プロテオバクテリアとは異なる分解遺伝子群を保有することが報告されており (Itoh *et al.*, 2002; Kamagata *et al.*, 1997; Kitagawa *et al.*, 2002; McGowan *et al.*, 1998)、本研究の結果も同様であった。

JMP134 株はクロロフェノール分解遺伝子群を 2 つ持つことが報告されており (Laemmli *et al.*, 2000; Leveau & van der Meer, 1997)、本研究で得られた JMP134 グループの分解遺伝子を持つ K101 株と K401 株も同様に、2 つの遺伝子群を持つことが示唆された。一方、K301 株は JMP134 株の *tfdB_I* 及び *tfdC_I* に相同な配列を持つことが明らかとなったが、*tfdB_{II}* 及び *tfdC_{II}* に相同な配列は検出されなかった。JMP134 株の *tfd_{II}* クラスターはトランスポザーゼ様の構造を持ち、*tfd_I* クラスターに挿入されたと考えられている (Leveau & van der Meer, 1997)。よって K301 株は、*tfd_I* クラスターに *tfd_{II}* クラスターが挿入する前の 2,4-D 分解遺伝子群を保有している場合と、保有していた 2 つのクラスターのうち、*tfd_{II}* クラスターを喪失した場合の 2 通りの可能性が考えられた。*B. cepacia* CSV90 株の保有するプラスミド pMAB1 も *tfd_I* クラスターに相同な配列のみ保有するが、*tfd_{II}* クラスターのごく一部も保有するため、最初は 2 つのクラスターを保有したが、途中で *tfd_{II}* クラスターを喪失したと考えられている (Ogawa *et al.*, 2004)。

JMP134 株とは異なり、*A. xylosoxidans* EST4002 株は *tfdC* を一つしか持たない (Vedler *et al.*, 2004)。しかし、EST4002 サブグループの分解遺伝子配列を持つ I502 株及び T101 株は、EST4002 グループ、JMP134 グループ及び TFD44 グループのいずれにも属さない *tfdC* 配列をもう一つ別に保有したため、*tfdC2* と名付けた (Fig. 1-4)。この *tfdC2* 配列は、クロロ安息香酸分解菌の *P. kanackmussii* B13 株の保有するクロロカテコールジオキシゲナーゼ

clcA の塩基配列に同一であった。B13 株は、ICE*clc* と名付けられた 105 kb の自己伝達性ゲノミクトランスポゾン上に *clcA* を保有する (Ravatn *et al.*, 1998)。即ち I502 株及び T101 株は、2,4-D 分解遺伝子群とは別のクロロカテコール分解遺伝子群を ICE*clc* としてゲノム上に保有する可能性が示唆された。しかし、*clcA* 遺伝子に相同な配列のみを部分的に保有する可能性もあり、これを明らかにするためにはさらなる実験が必要とされる。

第二章 分解菌のプラスミドの収得と分解遺伝子の特定

2.1 要約

前章において、2,4-D 分解遺伝子の細菌間の伝播が示唆され、水田由来の分解菌も既存の株同様、プラスミド上に分解遺伝子を保有する可能性が示された。そこで本章では、プラスミドを染色体より分離、検出する方法を検討すると共に、プラスミドの分解遺伝子の保有状況を調べた。プラスミド抽出法として一般的なアルカリ SDS 法では、一部の株でプラスミドを検出できなかったため、菌体を電気泳動用の well で溶菌した後、泳動する方法を採用した。溶菌と泳動の条件を最適化した結果、14 株全てでプラスミドが確認された。この電気泳動で分離した DNA 分子をメンブレンにトランスファーし、分解遺伝子配列をプローブとしたサザンハイブリダイゼーションを実施した。その結果、全ての株が 90 kb 以上の大型のプラスミド上に分解遺伝子配列を持つ事が明らかとなった。特に RASC サブグループの分解遺伝子配列は、8 株全てでおよそ 600 kb のプラスミド上に存在した。この大型プラスミドは既知の分解プラスミドに較べて非常に大きいため、未知の伝達性 2,4-D 分解プラスミドである可能性が示された。また、 α -プロテオバクテリアの 2,4-D 分解菌では初めて、分解遺伝子がプラスミド上に存在することが示された。

2.2 緒言

天然物の分解菌が、分解遺伝子を伝達性プラスミド上に持つ事は、少なくとも 1973 年には報告されていた (Dunn & Gunsalus, 1973; Rheinwald *et al.*, 1973)。2,4-D 分解プラスミドは、人類が化学合成した有機化合物の分解遺伝子を保有する伝達性プラスミドとして、1977 年に初めて報告された (Pemberton & Fisher, 1977)。その後、伝達性分解プラスミドは、微生物による分解能の獲得機構として注目を集めた。2,4-D 分解菌の代表株、*C. pinatuboensis* JMP134 株の保有する分解プラスミド、pJP4 は IncP-1 プラスミドグループに属する (Don & Pemberton, 1981)。IncP-1 グループはプラスミドの不和合性グループの

一つで、伝達頻度が高く、宿主範囲が広い特徴がある。他に、*A. xylosoxidans* EST4002 株及び *Burkholderia cepacia* 2a 株が保有する分解プラスミド (pEST4011 及び pIJB1) も IncP-1 プラスミドに分類される (Poh *et al.*, 2002; Vedler *et al.*, 2004)。近年、全塩基配列の解析された 2,4-D 分解プラスミドの p712 及び pDB1 も IncP-1 プラスミドであることが明らかにされた (Kim *et al.*, 2013)。また、いくつかのクロロ安息香酸分解菌も、分解遺伝子群を IncP-1 プラスミド上に保有する (Top *et al.*, 2002)。IncP-1 分解プラスミドは、土壌中で細菌間に伝播することも確認され (DiGiovanni *et al.*, 1996; Top *et al.*, 1996)、芳香族塩素化合物分解遺伝子の伝播に重要な役割を担っていると考えられている。

2,4-D 分解遺伝子の多くは、IncP-1 プラスミド上に存在することが報告される一方、不適合性グループの異なるプラスミドや (Don & Pemberton, 1981)、一般的な IncP-1 グループの分解プラスミド (90 kb 前後) より大型のプラスミドからも検出されている (Cavalca *et al.*, 1999; Vallaey *et al.*, 1998)。この中には *B. tropica* RASC 株も含まれ、当初、プラスミド抽出法によって 2,4-D 分解プラスミドが検出されなかったため、染色体上に *tfdA* 遺伝子が存在することが報告された (Suwa *et al.*, 1996)。その後、532 kb のプラスミド上に *tfdC* 遺伝子配列が検出された (Cavalca *et al.*, 1999)。IncP-1 グループの 2,4-D 分解プラスミドは全塩基配列、伝達頻度及び宿主範囲等も調査されて研究が進んでいるが、それ以外の 2,4-D 分解プラスミドについては、ほとんど解析されていない。 α -プロテオバクテリアの *Sphingomonas* 属菌とその近縁種、及び *Bradyrhizobium* 属菌も 2,4-D 分解菌として環境中から分離されているが、これらの菌の分解遺伝子とプラスミドの関係は、明らかにされていない。2,4-D 以外の化合物、例えば、トルエン等の芳香族化合物を分解する *Sphingomonas aromaticivorans* F199 株の分解遺伝子は、伝達性プラスミド上に存在することが報告されている (Romine *et al.*, 1999)。

前章において、水田由来の 14 株のうち 8 株は、属種が同一ではないにもかかわらず、RASC サブグループの概ね同じ分解遺伝子配列を保有することが明らかとなった。よって、分解遺伝子が接合伝達因子によって細菌間に伝達した可能性が示されている。JMP134 グループの分解遺伝子を保有する 3 株でも同様の可能性が示された。先に述べたように、既知の 2,4-D

分解遺伝子群はプラスミド上に見出されており、本研究の分離株も分解遺伝子をプラスミド上に持つ可能性が高いと考えられた。そこで、14 株の 2,4-D 分解菌のプラスミドの検出を試みると共に、プラスミド上の分解遺伝子の有無を検討した。

2.3 材料

国内の水田土壌より分離した 14 株の 2,4-D 分解菌 (Table 1-3) に加えて、既存の 2,4-D 分解菌、*C. pinatuboensis* JMP134 株、*Variovorax paradoxus* TV1 株 (Vallaey 1998) 及び *Novospingobium* sp. TFD44 株を用いた。また、2,4-D 分解遺伝子を持たないがプラスミドの大きさが既知の *Rizobium radiobacter* MAFF301724 株 (Moriguchi 2001) をサイズマーカー及び、ネガティブコントロールとして用いた。既存の 2,4-D 分解菌は小川直人博士 (現静岡大学教授) から、MAFF301724 株は澤田宏之博士 (現 (独) 農業生物資源研究所) から分譲を受けた。

2.4 方法

2.4.1 プラスミドの検出法の選定

2,4-D 分解菌よりプラスミドを抽出する方法として、アルカリ SDS 法の原理を用いた Kado & Liu (1981)、Kieser (1984)、及び谷 & 竹内 (1993) らの方法を試みた。また、電気泳動でプラスミドを可視化する方法として、菌体を電気泳動用ゲルの well の中で溶菌する方法 (Lakzian *et al.*, 2002) を改変した方法を用いた。即ち、PA 液体培地 (Lakzian *et al.*, 2002) で OD₆₆₀ が 0.6 になるまで増殖した菌体 0.5 mL を集菌し、25 μ L の溶菌バッファーに懸濁し、0.7% アガロースゲル (59 mm \times 107 mm) の well に入れた。このゲルを電気泳動槽、Mupid (アドバンス) に入れた 0.5% SDS 添加泳動バッファーに浸し、室温で 1 時間静置した。バッファーの交換をすることなく、50 V で 50 分間電気泳動を行った後、バッファーをアスピレーターで除去し、0.25% の SDS を加えた泳動バッファーに交換した。さらに 50 V で 2 時

間半電気泳動を行った後、DNA を EtBr で染色した。SDS と余分な EtBr を除去するため、泳動ゲルを TAE バッファーで振とう洗浄した後、UV を照射して DNA バンドを検出した。ただし、K101 株、I502 株及び T101 株は、PA 培地で菌体外多糖を生産し、溶菌及び泳動が阻害されたため、1/10 LB 平板で増殖して菌体外多糖の生成を減じ、実験に用いた。

2.4.2 分解遺伝子プローブを用いたサザンハイブリダイゼーション

(1) DNA プローブの作成

JMP134 株からゲノム DNA 抽出キット、Gentra Puregene Yeast / Bact. Kit (Qiagen, Holland) で DNA を抽出した。これを鋳型に *tfdA*、*tfdB* 及び *tfdC* 遺伝子の部分塩基配列を PCR 増幅し、TA クローニングした。同様に I602 株のゲノム DNA から増幅した *cadA* 及び *tfdC* の PCR 産物を TA クローニングした。配列の確認と、JPM134 株の保有する *tfdB_I* と *tfdB_{II}*、及び *tfdC_I* と *tfdC_{II}* 配列の判別のため、M13 プライマーでシークエンスした。得られたプラスミドを鋳型として、DIG-11-dUTP (Roche, Switzerland) を 0.25 nmol 相当、50 µL の PCR 反応液に加え、それぞれの配列に特異的なプライマーで PCR 増幅した。PCR、TA クローニング及びシークエンスは、第一章で述べた方法に準じて実施した。得られた PCR 産物は、PCR purification kit (Qiagen) で精製してプローブとした。

(2) サザンハイブリダイゼーション

電気泳動ゲルの中のゲノム DNA は、バキュームブロッティング装置、VacuGene (GE healthcare, USA) を用いてナイロンメンブレン、Hybond-N+ (GE healthcare) にトランスファーし、UV クロスリンクでメンブレン上に固定した。DNA を固定したメンブレンは市販のハイブリダイゼーションバッファー、PerfectHyb (東洋紡) にプローブと共に入れ、68°C で 1 時間インキュベートした後、同じ温度で 2×SSC, 0.1%SDS で 5 分間の洗浄を 2 度実施した。その後、*tfdB_I*_{JMP134} プローブあるいは *tfdB_{II}*_{JMP134} プローブを用いた実験では、0.2×SSC, 0.1%SDS を用い、それ以外の場合は 0.5×SSC, 0.1%SDS を用いて 15 分間、2 度洗浄した。目的の DNA バンドの検出は、メンブレン上のプローブに anti-digoxigenin alkaline

phosphatase conjugate (Roche) を結合し、これを検出試薬、CDP-Star (Roche) で発光させて X 線フィルムに露光する方法で行った。

2.4.3 RASC サブグループ分解遺伝子配列の周辺構造の比較

RASC サブグループに属する分解遺伝子を保有する 8 株のゲノム DNA を、制限酵素 *EcoRI*、*HindIII*、あるいは *BamHI* (いずれもニッポンジーン) で切断した後、0.7%のアガロースゲルで電気泳動した。また、3.4.2 (2)の方法で *tfdC_{Y212}* プローブを作成し、サザンハイブリダイゼーションを行った。プローブをハイブリダイズした後の 2×SSC, 0.1%SDS を用いた 2 度の洗浄後は、0.1×SSC, 0.1%SDS で洗浄した。

2.5 結果

2.5.1 プラスミドの検出法の選定

水田由来の 2,4-D 分解菌のプラスミドを検出するために、いくつかのアルカリ抽出法を試した。試した中では谷 & 竹内 (1993) の方法が最もよくプラスミドを抽出できたが、この方法でも 14 株中 6 株はプラスミドを検出できなかった。また一度はプラスミドを抽出できた株でも、その後安定して抽出できるとは限らなかった。そこで、大型プラスミドの検出に用いられてきた、菌体を泳動ゲルの well で溶菌してゲノム DNA を電気泳動する方法を試みた。その結果、一部の株を除いて、簡便かつ再現性が高くプラスミドを検出できた。さらに条件の検討を行い、菌体を入れたゲルを 0.5%の SDS を含むバッファーに泳動前に 1 時間浸漬することで、全ての株のプラスミドが検出できるようになった。泳動は、0.5%の SDS を含む泳動バッファーで開始し、50 分後、0.25%の SDS を含む泳動バッファーに置換した。この操作の理由は、3 時間半の泳動を 0.5%の SDS を含むバッファーで行うと、バッファーの温度が上昇し、うまく泳動しないためである。本法をさらに簡便にするため、菌体を SDS で溶菌してから泳動ゲルにアプライする方法も試みたが、DNA 分子が well にとどまり、泳動されなかった。また、菌体の調製の際、PA 培地に変えて、一般的に用いられる LB 培地の適用も

試みたが、DNA バンドが薄くなる傾向があり、本法では PA 培地が適していると判断された。

2.5.2 分解遺伝子プローブを用いたサザンハイブリダイゼーション

(1) RASC サブグループ

RASC サブグループの分解遺伝子配列を持つ、水田由来の 8 株のゲノム DNA 分子を電気で分離したところ、いずれの株も 100 kb 以上の大型の DNA 分子が 1 から数個保有することが示された (Fig. 2-1A)。 *tfdA*_{JMP134}、 *tfdB*_{JMP134}、 及び *tfdC*_{JMP134} をプローブとするサザンハイブリダイゼーションを実施した結果、全てのプローブが、8 株のおよそ 600 kb の DNA 分子上にシグナルを示した。 *tfdC*_{JMP134} プローブの結果を Fig. 2-1B に示した。ポジティブコントロールとして泳動した JMP134 株では、88 kb の 2,4-D 分解プラスミドに濃いシグナルが検出されたが、ネガティブコントロールの MAFF301724 株ではシグナルは検出されず、実験が適切に実施されたと判断された。即ち、水田由来の 8 株は、いずれも、分解遺伝子をおよそ 600 kb の巨大プラスミド上に持つ事が示された。

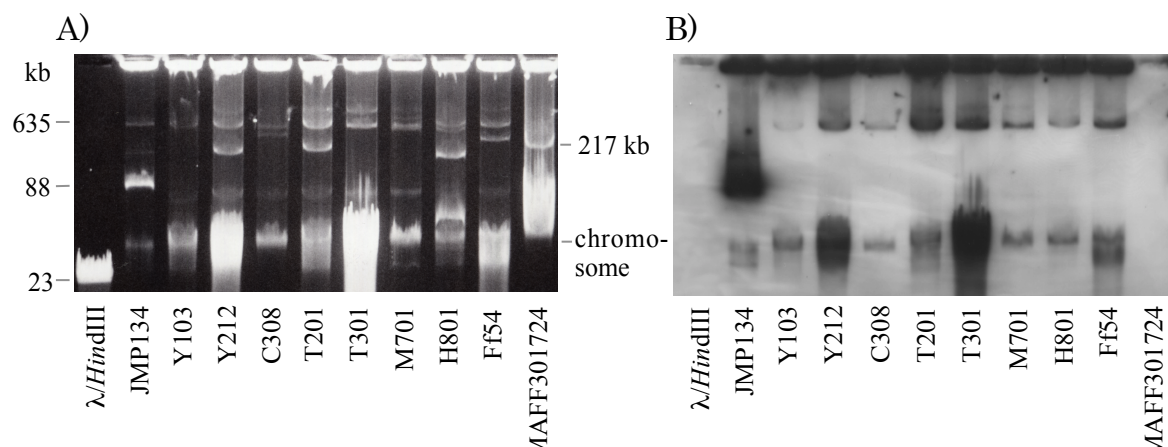


Fig. 2-1 Agarose gel electrophoresis of plasmids from 2,4-D-degrading strains of the RASC subgroup (A), and Southern hybridization analysis of these plasmids using the *tfdCII*_{JMP134} probe (B). Two plasmids from strain JMP134 (pJP4, 88 kb [DDBJ accession number, AY365053], and another plasmid, 635 kb [CP000092]) were loaded as size markers and positive control. A plasmid in *Agrobacterium rhizogenes* strain MAFF301724 (pRi1724, 217 kb [AP002086]) was loaded as another size marker and a negative control for the plasmid analysis.

(2) JMP134 グループ

JMP134 グループの分解遺伝子配列を保有する 3 株も RASC サブグループと同じ方法で DNA 分子の分離を行った。その結果、3 株全てで 200 kb 以上の大型の DNA 分子が、1 から複数個検出された (Fig. 2-2, A-1)。 *tfdA*_{JMP134}、 *tfdB_{II}*_{JMP134}、及び *tfdC_{II}*_{JMP134} をプローブとしたサザンハイブリダイゼーションを実施した結果、3 株のうちの 2 株 (K101 株及び K401 株) では、全てのプローブがおおよそ 400 kb の DNA 分子にハイブリダイズした。残りの一株の K301 株では、*tfdA*_{JMP134} プローブのみ、おおよそ 600 kb の DNA バンドにシグナルを示し、*tfdB_{II}*_{JMP134}、及び *tfdC_{II}*_{JMP134} プローブでは、シグナルが検出されなかった。そこで、この 2 つのプローブの代わりに *tfdB_I*_{JMP134} 及び *tfdC_I*_{JMP134} プローブを用いたところ、どちらのプローブも、*tfdA*_{JMP134} プローブと同じ DNA 分子にシグナルを示した。Fig. 2-2, A-2 には *tfdA*_{JMP134} プローブを用いた場合の結果を示した。K101 株と K401 株は、*tfdA*、*tfdB_I*、*tfdB_{II}*、*tfdC_I*、及び *tfdC_{II}* 遺伝子配列をおおよそ 400 kb のプラスミド上に保有した。これに対し、K301 株は、*tfdA*、*tfdB_I*、及び *tfdC_I* 遺伝子配列のみをおおよそ 600 kb のプラスミド上に保有し、*tfdB_{II}* 及び *tfdC_{II}* 遺伝子配列に相同な配列は保有しないことが示された。

(3) EST4002 サブグループ

EST4002 サブグループの分解遺伝子配列を持つ I502 株及び T101 株では、いずれもおおよそ 300 kb 程度の DNA 分子のみが検出された (Fig. 2-2, B-1)。 *tfdA*_{JMP134}、 *tfdB_{II}*_{JMP134}、及び *tfdC_{II}*_{JMP134} のプローブは全て、この DNA 分子にハイブリダイズした。Fig. 2-3, B-2 には *tfdC_{II}*_{JMP134} プローブの結果を示した。対照株の TV1 株は、おおよそ 200 kb の大きさの 2,4-D 分解プラスミド pTV1 を保有することが報告されているが (Vallaeyes *et al.*, 1998)、本実験では、500 kb 前後と考えられる大型の DNA 分子にシグナルが検出された。

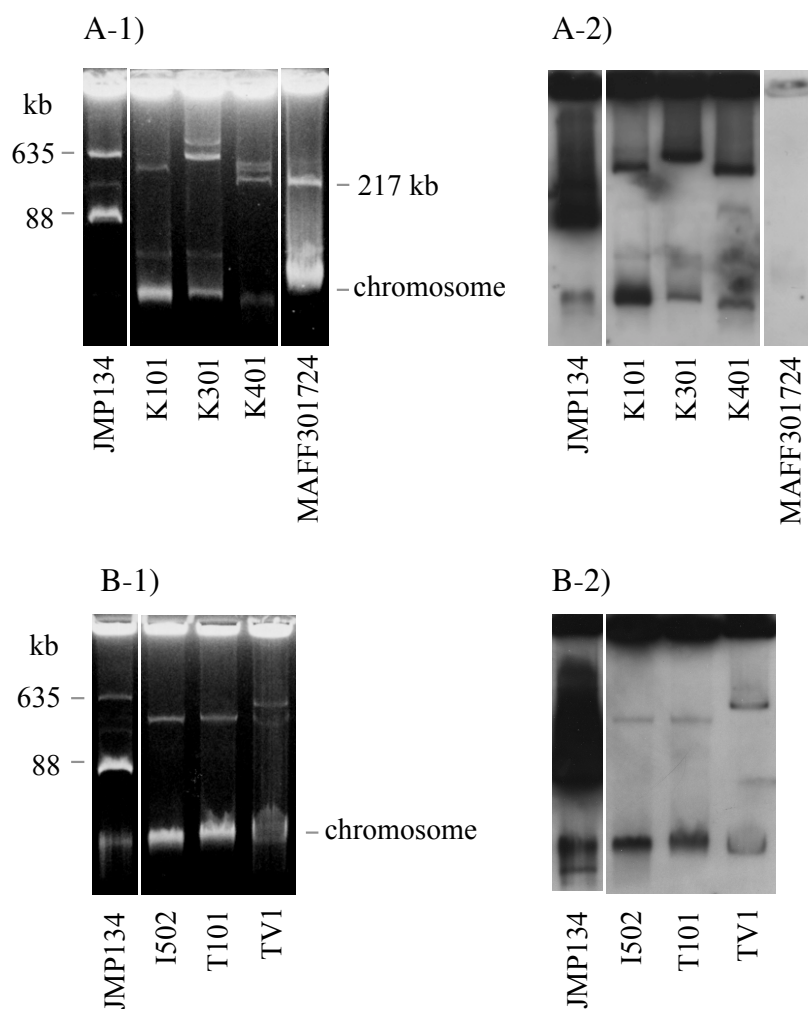


Fig. 2-2 Agarose gel electrophoresis of replicons from 2,4-D-degrading strains of the JMP134 group (A-1) and EST4002 subgroup (B-1). Southern hybridization analysis of the replicons of the JMP134 group using the *tfdA*_{JMP134} probe (A-2) and the EST4002 subgroup using the *tfdCII*_{JMP134} probe (B-2). Plasmids from strains JMP134 and MAFF301724 were loaded as size markers and positive and negative controls as in Fig. 2-1.

(4) *Sphingomonas* グループ

I602 株では、ゲノム DNA の泳動で 3 本の濃いバンドとその上に 1 本の薄いバンドが検出され、少なくとも 4 つの DNA 分子が検出された (Fig. 2-3A)。TFD44 株とはバンドの位置が異なるものの、大型の DNA 分子を複数持つという点では共通していた。*tfdA*_{JMP134}、*tfdB*_{II}_{JMP134}、及び *tfdC*_{II}_{JMP134} 配列をプローブとしたサザンハイブリダイゼーションでは、*tfdB*_{II}_{JMP134} プローブのみでシグナルが検出された。そこで I602 株の *cadA* 配列および *tfdC* 配列に由来するプローブを用いたところ、*tfdB*_{II}_{JMP134} プローブで検出されたシグナルと同じ位置にシグナルが検出された (Fig. 2-3B)。よって I602 株の 4 つの DNA 分子のうち、一番小さいおよそ 90 kb のプラスミドに *cadA*、*tfdB* および *tfdC* の分解遺伝子配列の存在することが示された。このプラスミドの大きさは、TFD44 株の分解プラスミドより少し小型であった。ただし TFD44 株の 2,4-D 分解プラスミドでは、I602 株とは異なり、*tfdC*_{II}_{JMP134} プローブでもシグナルが検出された。一連の結果より、I602 株と TFD44 株は、およそ 90 kb のプラスミドに分解遺伝子を保有することが示された。

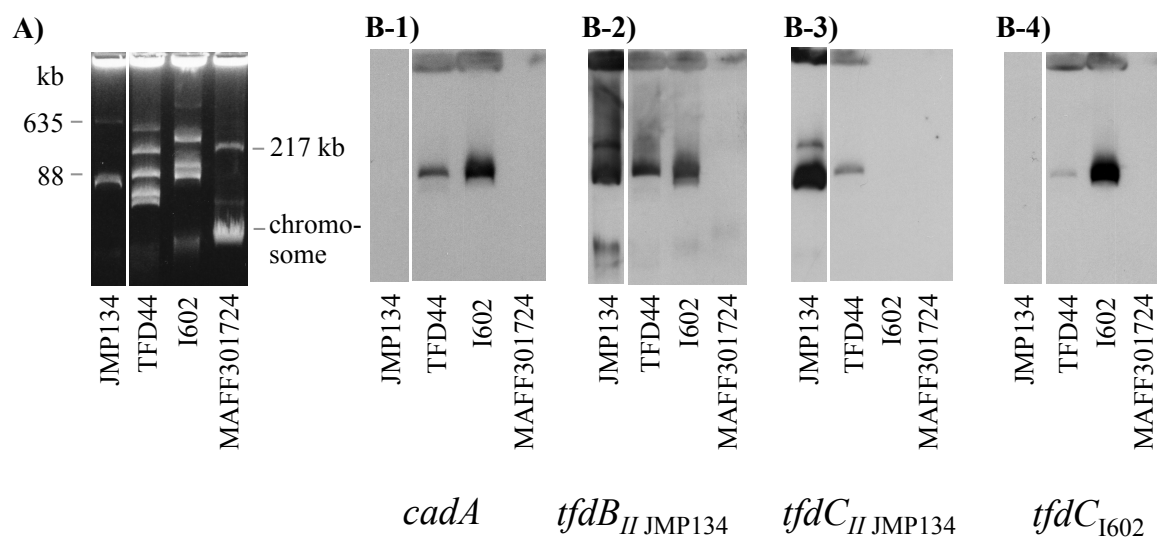


Fig. 2-3 Agarose gel electrophoresis of plasmids from 2,4-D-degrading strains of the *Sphingomonas* group (A) and Southern hybridization analysis of these plasmids using the *cadA* (B-1), *tfdB_{II}* JMP134 (B-2), *tfdC_{II}* JMP134 (B-3), and *tfdC_{I602}* probes (B-4). Plasmids from strains JMP134 and MAFF301724 were loaded as size markers and positive and negative controls as in Fig. 2-1.

2.5.3 RASC サブグループ分解遺伝子配列の周辺構造の比較

RASC サブグループの分解遺伝子配列を持つ 8 株の 2,4-D 分解菌について、分解遺伝子群の周辺配列の相同性を推測するため、ゲノム DNA を制限酵素で切断して分解遺伝子配列をプローブとしたサザンハイブリダイゼーションを実施した。ゲノム DNA を *EcoRI* で切断し、*tfdC_{Y212}* プローブでハイブリダイゼーションを行ったところ、いずれの株も 2 本のバンドが検出された (Fig. 2-4)。Y212 株のみ異なるパターンを示し、およそ 9 kb と 6 kb の位置にバンドが検出されたが、それ以外の 7 株はおよそ 11 kb と 3 kb の DNA 断片に分解遺伝子プローブがハイブリダイズした。*HindIII* でゲノム DNA を切断して同じプローブを用いた場合も 2 本のバンドが検出され、Y212 株のみ異なるパターンを示した。*BamHI* で DNA を切断した場合には、8 株全てでおよそ 11 kb のバンドが 1 本検出された。

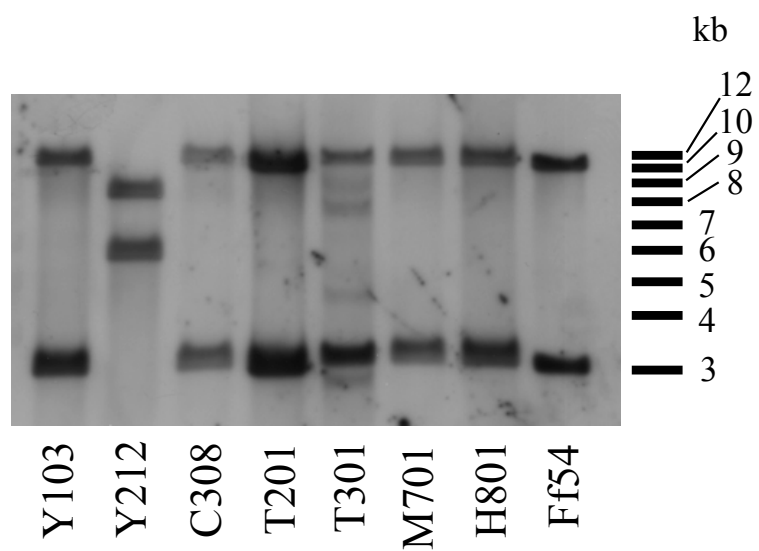


Fig. 2-4 Analysis of the hybridization pattern of *EcoRI*-digested total DNA of the strains in the-RASC subgroup with the *tfdC*_{Y212} probe.

2.6 考察

水田から分離した 14 株の 2,4-D 分解菌全てでプラスミドが検出され、少なくとも 2,4-D 分解の最初の反応に関わる遺伝子 *tfdA* (または *cadA*)、*tfdB* 及び *tfdC* の部分塩基配列は、それぞれの株の同一の大型プラスミドに存在することが示された。特に 14 株中 8 株を占める RASC サブグループの分解遺伝子を持つ 2,4-D 分解菌は、およそ 600 kb の同じ大きさのプラスミドに分解遺伝子を持つ事が明らかとなった。前章において、複数の属種の細菌で構成されるこれら 8 株は、ほぼ同じ分解遺伝子配列を保有するため、分解遺伝子が何らかの接合伝達因子によって細菌間に伝播した可能性が示された。本実験で得られた結果は、およそ 600 kb の大型プラスミドが、分解遺伝子の伝播を担っている可能性を強く示した。これまでに、RASC 株の *tfdC* 遺伝子配列も 532 kb のプラスミド上に存在することが報告されており (Cavalca *et al.*, 1999)、概ねこれに一致する結果が得られた。これまでによく解析されている 2,4-D 分解プラスミドは、90 kb 前後の大きさの IncP-1 グループのプラスミドに限られており、RASC 株以外に 2,4-D 分解遺伝子を 500 kb 以上のプラスミドに持つという報告は見当たらない。また、RASC 株のプラスミドは、大きさ以外の情報がない。即ち、本研究で検出されたおよそ 600 kb の 2,4-D 分解遺伝子保有プラスミドは、これまでにほとんど解析されていない伝達性の 2,4-D 分解プラスミドと考えられた。

次に、この水田由来の 8 株が保有する 600 kb のプラスミドが、大きさだけでなく、遺伝子構造も同じであることを明らかにする必要があると考えた。小型のプラスミドであれば、抽出して制限酵素で切断し、泳動パターンから相同性を推測できる。しかし、600 kb のプラスミドは、抽出が困難である上に複数のプラスミドを保有する株が多く、制限酵素切断パターンによる解析は不向きと判断した。そこで、まずは分解遺伝子群及びその周辺配列を解析することとし、ゲノム DNA を制限酵素で切断し、分解遺伝子の存在する DNA 断片の長さを比較した。その結果、*Burkholderia* sp. Y212 株以外の 7 株の傾向は一致していた。よって、少なくとも 7 株の分解遺伝子群及びその周辺構造は、類似していると考えられた。

JMP134 グループの分解遺伝子配列を持つ 3 株の 2,4-D 分解菌は、いずれも 200 kb 以上

の大型のプラスミド上に分解遺伝子を保有していた。この結果は、JMP134 株と同じ 90 kb 前後の大きさの IncP-1 のプラスミド上に分解遺伝子を持つという予想とは全く異なっていた。一方、Cavalca *et al.* (1999) は、調査した JMP134 グループの分解遺伝子を持つ 2,4-D 分解菌のなかで、JD1 株、JD2 株、JD16 株及び JD17 株は、分解遺伝子を 200 kb 前後のプラスミドに保有することを報告している。JMP134 株の分解遺伝子群はトランスポゾン様の構造を持つことが報告されており (Clement *et al.*, 2001)、IncP-1 プラスミドによって細胞内に入った分解遺伝子群が、トランスポゾンとして大型のプラスミドに挿入された可能性がある。その一方で、JMP134 グループの分解遺伝子を持つ K101 株と K401 株は、16S rDNA 配列は異なるが (Table 1-4)、分解遺伝子配列が一致し (Table 1-5)、同じ大きさの分解プラスミドを保有する (Fig. 2-2, A)。よって、大型プラスミドとして細菌間に伝播した可能性も否定できない。

EST4002 グループの分解遺伝子配列も、IncP-1 プラスミド上に存在することが報告されている (Poh *et al.*, 2002; Vedler *et al.*, 2004)。しかし、水田由来の I502 株と T101 株は、IncP-1 プラスミドの一般的な大きさである 90 kb より大型の、およそ 300 kb のプラスミド上に分解遺伝子を保有していた。I502 株と T101 株は、16S rDNA 配列が同一であったため、同一の細菌に由来する可能性が高く、プラスミドの伝達能は考察できない。両者はコロニーの形態が少し異なるため、菌株としては区別される。EST4002 株の 2,4-D 分解遺伝子群もトランスポゾンとして IncP-1 プラスミド上に存在することが報告されており、同分解遺伝子がトランスポゾンとして大型プラスミドに挿入された可能性が考えられた。本実験で EST4002 グループの対照株として用いた TV1 株は、200 kb のプラスミド、pTV1 上に分解遺伝子配列を持つ事が報告されている (Vallaey's *et al.*, 1998)。その後、Cavalca *et al.* (1999) は pTV1 の大きさを 442 kb と推定した。本研究で pTV1 について得られた結果は、後者に近い値であったが、I502 株と T101 株の保有するおよそ 200 kb の分解プラスミドよりは明らかに大きく (Fig. 2-2, B)、これらが同じプラスミドグループに属するのかは判断できなかった。pTV1 は接合伝達実験で伝達の確認されなかったことが報告されている (Vallaey's *et al.*, 1998)。Cavalca *et al.* (1999) は、pTV1 の保有する *tfdC* 遺伝子に相同な配列を、およそ 200 から

300 kb のプラスミドに保有する株を複数見出したが、これらの株について、その後の報告は見当たらない。

TFD44 グループの分解遺伝子配列を持つ I602 株及び TFD44 株も、*cadA*, *tfdB* 及び *tfdC* 遺伝子全てを同一のプラスミドに保有することが明らかとなった。 α -プロテオバクテリア属の 2,4-D 分解菌では、分解遺伝子とプラスミドの関係についての報告がなく、本研究で初めて示された。TFD44 株は *tfdC* 以下の分解遺伝子を遺伝子クラスターとして保有することが報告されている (Thiel *et al.*, 2005) ため、少なくとも TFD44 株は 2,4-D 分解に必用な遺伝子を全てプラスミド上に保有すると考えられる。本研究において、*cadA* 及び *tfdB* が、*tfdC* と同一のプラスミド上に見出されたことは、分解遺伝子の伝播と獲得を考える上で重要な意味を持つ。I602 株と TFD44 株の分解遺伝子配列保有プラスミドは、いずれも 90 kb 程度と IncP-1 プラスミドと同様の大きさであった。しかし、*cadA* 遺伝子が α -プロテオバクテリア以外の細菌から検出されたという報告は見当たらないことから、本実験で検出された分解プラスミドは、IncP-1 プラスミドとは異なる宿主範囲の狭いプラスミドの可能性が高いと考えられた。I602 株及び TFD44 株の属する *Sphingomonaceae* 科細菌では、2,4-D 以外の様々な化合物の分解菌が環境から分離されており、分解遺伝子の全部、あるいは一部をプラスミド上に保有することが明らかにされている (Stolz, 2009)。これらのプラスミドは接合伝達に関わると考えられる遺伝子群を持つ事が報告されているが、IncP-1 グループのプラスミドは見出されていない (Stolz, 2014)。

第三章 2,4-D 分解遺伝子を保有する大型プラスミド pM7012 の全塩基配列の解析

3.1 要約

国内の水田土壌より分離された 2,4-D 分解菌 *Burkholderia* sp. M701 株の保有するおよそ 600 kb の 2,4-D 分解プラスミド (pM7012) を、パルスフィールドゲル電気泳動法 (PFGE) で染色体から分離し、全塩基配列を明らかにした。その結果、pM7012 の全長は 582,142 bp で、GC 含量は 59.7%、タンパク質をコードすると考えられた配列 (CDS) は 541 個見出された。アノテーションの結果、2,4-D 分解遺伝子群の他にヒ素耐性トランスポゾン及び接合伝達遺伝子群が見出され、両遺伝子群の間には *Burkholderia* 属菌のクロミド (以前は、第二染色体) に相同性の高い領域が存在した。また、プラスミド全体で 39 個の tRNA 遺伝子配列が見出された。従って、pM7012 は、これまでに塩基配列の明らかにされている 2,4-D 分解プラスミドとは異なる遺伝子群を持つことが示された。

3.2 緒言

プラスミドは、細胞内で染色体とは別に自立的に複製される DNA 分子で、分子生物学的手法を用いた研究では、ベクターとして利用されている。細胞内のコピー数が多く数 kb の小型のものから、根粒菌等に見出される 1 M 以上の大型のものまで様々である。プラスミドは一般に環状であるが、ビフェニル分解菌の *Rhodococcus jostii* RHA1 株は分解遺伝子を大型の線状プラスミドに持つ (Shimizu *et al.*, 2001)。細胞からの抽出が難しい 100 kb 以上のプラスミドは、小型のプラスミドに比べると解析が遅れる傾向があったが、多様かつ重要な遺伝子を保有することから、メガプラスミドとして解析が進められた。窒素固定プラスミド、重金属耐性プラスミド、有機物分解プラスミド、及び病原性プラスミド等が知られる (Schwartz, 2008)。近年、ゲノムの解析が進むにつれて、プラスミドの塩基配列データが膨大に集積されている。しかしプラスミドの伝達性等、プラスミド自体の解析は行われていな

い場合が多い。

細菌における 2,4-D 分解能の獲得に伝達性プラスミドが重要な働きをしていることは間違いないが、これまでに全塩基配列の明らかにされた 2,4-D 分解プラスミドは、pJP4、pEST4011、pIJB1、p712 及び pDB1 の 5 つに限られ、いずれも IncP-1 プラスミドグループに属する (Kim *et al.*, 2013; Poh *et al.*, 2002; Trefault *et al.*, 2004; Vedler *et al.*, 2004)。代表的な 2,4-D 分解プラスミド、pJP4 には、プラスミド分配複製遺伝子群、接合伝達遺伝子群、2,4-D 分解遺伝子群の他、水銀耐性遺伝子群が存在する。

前章の結果から、RASC サブグループの分解遺伝子がおよそ 600 kb のプラスミド上に保持され、細菌間に伝播している可能性が示されている。このプラスミドは、2,4-D 分解プラスミドとして詳細な解析例がない。また、これまでに報告されている他の芳香族化合物分解プラスミド、例えばトルエン分解プラスミド pWW0 (117 kb) (Greated *et al.*, 2002) やカルバゾール分解プラスミド pCAR1 (199 kb) (Maeda *et al.*, 2003) に比べて大型で、新規の伝達性分解プラスミドの可能性が高いと考えられた。そこで、この大型プラスミドの全塩基配列の解析を行うこととした。

3.3 材料

RASC サブグループの分解遺伝子を持つ 8 株の分解菌のうち、*Burkholderia* sp. M701 株の 2,4-D 分解遺伝子保有プラスミドを解析した。M701 株を選んだ理由として、ゲノムの電気泳動で検出されたプラスミドの数が比較的少ないことが挙げられる (Fig. 2-1A)。もう一つの理由は、M701 株の rDNA 配列は *B. sacchari* の同配列に相同性が最も高く (99%、Table 1-4)、日和見病原菌の *B. cepacia* に高い相同性を示す *B. metallica* や *B. diffusa* に相同な rDNA 配列を持つ株に比べて安全に実験できると考えたためである。

3.4 方法

3.4.1 プラスミドの分離回収条件の最適化

(1) プラスミドの分離方法の検討と 2,4-D 分解遺伝子配列保有プラスミドの特定

第一章で実施したミニゲルを用いた電気泳動では、近接するバンドの切り分けと十分量のプラスミド DNA の回収が困難と考えられた。そこで、より多量の DNA 分子を精度よく分離する方法として、PFGE 法を試みた。M701 株を 2 倍希釈した LB 液体培地に接種し、28℃、150 rpm でおよそ 12 時間振とう培養した。OD₆₆₀ が 0.7 となった培養液を集菌し、Takami *et al.* (1999) の方法に従って PFGE 用のプラグを作成した。プラグ 1 個あたりに使用する菌量は、培養液 0.2 mL とした。泳動ゲルは、PFGE 用アガロース (Bio-Rad, USA) を 1% 含む 0.5×TBE バッファーで作成した。DNA サイズマーカーには λ DNA ladder (Bio-Rad) を用いた。プラグ内のゲノム DNA は、PFGE 装置、CHEF-DR II (Bio-Rad) を用いて、14℃ に冷却した 0.5×TBE バッファー内で 24 時間泳動した後 (parameters: gradient, 6.0 V cm⁻¹; included angle, 120°; initial switch time, 2.98 s; final switch time, 57.62 s; ramping factor, linear)、EtBr で染色した。染色したゲルは、0.5×TBE バッファー内でゆるやかに振とうして余分な EtBr を除去した後、画像撮影システム、Pharos FX (Bio-Rad) で泳動像を取得した。

2,4-D 分解プラスミドを保有する DNA 分子を明らかにするため、PFGE で検出された M701 株の 6 つの DNA 分子をナイロンメンブレンにトランスファーして UV 固定し、*tfdC*_{M701} プローブでサザンハイブリダイゼーションを行った。DNA トランスファー、サザンハイブリダイゼーション、及びプローブの作成法は第二章で述べた方法に準じた。

(2) pM7012 の効率的回収のための PFGE 条件の検討

PFGE 法で pM7012 を M701 株の保有する他の DNA 分子から分離できることが明らかになった。しかしクローンライブラリーの作成には 1 μ g 以上の DNA が必要とされ、効率よくプラスミド DNA を回収するためには、PFGE で検出される pM7012 のバンドをもっと太く

する必要があると考えた。そこで PFGE のプラグの作成に用いる M701 株の生育ステージ、クロラムフェニコール処理、及び菌量が PFGE の泳動像に及ぼす影響を調べた。

生育ステージとしては、対数増殖期初期に細胞膜の弱い菌体がより多いと考えた。そこで、それまで OD₆₆₀ が 0.7 まで増殖した菌体を用いていたところ、OD₆₆₀ が 0.5 及び 0.3 まで増殖した菌体を回収して使用した。この際プラグに入れる菌量は、OD 値で揃えた。クロラムフェニコールの効果の調査では、OD₆₆₀ が 0.5 及び 0.7 まで増殖した培養液に、終濃度 180 µg mL⁻¹ のクロラムフェニコールを加え、2 時間培養した後に回収した菌体を用いた。クロラムフェニコールはタンパク質合成を阻害するため、菌体の増殖を抑制して細胞あたりの DNA 量の増えることを期待して使用した。

PFGE でゲノムの DNA 分子を分離しても、DNA バンドの背景がスメアーになり、目的外の DNA の混入が懸念された。そこで、PFGE で pM7012 を分離した後、pM7012 を含むゲル片を切り出し、PFGE 用の新しい泳動ゲルに埋め込んで再度 PFGE にかけることで、混入した目的外の DNA を除去することとした。

3.4.2 pM7012 の全塩基配列の解析

(1) pM7012 の抽出と精製

3.4.1 で最適化した方法に従い、pM7012 を PFGE で分離し、2 回目の PFGE ゲルから切り出したゲル片からの DNA の回収を、電気溶出法 (Sambrook & Russell, 2001) で行った。プラスミド DNA 含むゲルを少量の TE バッファーと共に透析チューブに入れてクローサーで閉じ、TAE バッファーを入れた電気泳動槽、Mupid (アドバンス) で、100 V で 2 時間泳動した。この後、透析膜に付着した DNA を遊離するため、100 V で逆方向に 1 分間泳動し、透析チューブ内の溶出液を TE バッファーで洗いながら回収した。溶出液に含まれる DNA はフェノール及びクロロホルムで精製し、TE バッファーに溶解した。一度の PFGE でプラグ 9 個を泳動する場合、回収される pM7012 の DNA 量は、およそ 200 ng であった。2 µg 以上の pM7012 DNA を得るために、PFGE と DNA の回収を繰り返し実施した。

(2) ショットガンライブラリーの作成とシーケンス解析

プラスミド DNA の断片化、ライブラリーの作成、及びキャピラリーシーケンスによるペアエンド解析はドラゴンジェノミックセンター（タカラバイオ）に依頼した。プラスミド DNA 1 μ g は物理的に破碎し、およそ 2 kb の断片を分取した後、末端を平滑化してプラスミドベクター pUC118 / *Hinc* II にライゲーションして、大腸菌 DH10B 株（Life technologies, USA）でクローニングした。M13-47 プライマー（CGCCA GGGTT TTCCC AGTCA CGAC）及び RV-M プライマー（GAGCG GATAA CAATT TCACA CAGG）を用いてインサートの両側からシーケンス反応を行った。ただし、うまく配列を読めていないクローンは、必要に応じて、所属の研究機関で再解析を行った。即ち、解析対象の配列を含むクローンのプラスミド DNA を Templiphi (GE healthcare, UK) で増幅して鋳型とし、M13 プライマー (Table 1-1) を用いて、第一章で述べた方法で、キャピラリーシーケンスを行った。

キャピラリーシーケンスで得られた塩基配列のアセンブルは、シーケンスアセンブリソフトウェア ATGC ver. 6（ゼネティックス）で行った。ソフトウェア ATGC では、ペアエンド配列を認識して、矛盾なくアセンブルする機能が見出されなかったため、個々のインサートの両端が互いに逆向きにおよそ 2 kb 以内にあることを目視で確認し、矛盾のある場合には、手動で配列をつなぎ直した。また、相同性の高い繰り返し配列は、ソフトウェアのみでのアセンブルが難しかったため、適宜、手動でアセンブルし直した。

(3) 次世代シーケンス解析

キャピラリーシーケンスデータを補うため、pM7012 の次世代シーケンス解析を行った。プラスミド DNA の断片化、シーケンス解析、及び次世代シーケンスデータのアセンブルは北海道システム・サイエンス株式会社に依頼した。プラスミド DNA 1 μ g は物理的に破碎し、Illumina Genome Analyzer (Illumina, USA) で解析した。

(4) pM7012 の長鎖 DNA 断片を含むクローンの取得と解析

コンティグの並び順を明らかにし、またアセンブルが正しく行われていることを確認する

ために、10 kb 以上の長い DNA 断片を挿入配列とするライブラリーを構築して、挿入配列の両側をシーケンスした。土壌から長鎖 DNA を抽出する方法 (Zhou *et al.*, 1996) の改変法を用いて、M701 株より長鎖のゲノム DNA を取得した。得られたゲノム DNA は制限酵素 *EcoRI* (ニッポンジーン) で部分切断し、PFGE で分画して 40-200 kb の範囲を切り出した。混入する短い DNA 断片を除くため、また広がったバンドを収束するため、ゲル片を最初の泳動方向と逆向きにゲルに埋め込み、再度同じ条件で PFGE を行った。2 回目の PFGE では、 β -agarase を用いたゲルからの DNA 回収ができるよう、PFGE 用の低融点アガロース、Seaplaque GTG agarose (Lonza, Switzerland) でゲルを作成した。目的の DNA を含むゲル片を切り出し、 β -agarase (和光純薬) で、酵素付属の説明書に従って溶解した後、高分子物質遠心濃縮フィルター、Microcon Ultracel YM-100 (Merck Millipore, USA) で、低分子化したアガロースを除去すると共に、DNA を濃縮した。この DNA から、BAC ライブラリー構築キット、CopyControl BAC Cloning Kit (Epicentre, USA) を用いてライブラリーを作成した。インサートの長さを確認するため、30 コロニーをランダムに選び、BAC ベクター用の mini prep 法 (Sambrook & Russell, 2001) でベクターを抽出し、インサート挿入位置の両側にある *NotI* サイトで切断して電気泳動した。このライブラリーは M701 のゲノム DNA から構築されているため、pM7012 の配列を持つクローンの候補をコロニーハイブリダイゼーション法で検出した。プローブの作成には、シーケンス解析用に PFGE で分離精製した pM7012 DNA の残りを鋳型として用いた。DIG ラベリングキット (Roche, Switzerland) で、pM7012 全体の配列をラベルしながらランダムに増幅してプローブとした。このプローブで M701 ゲノムライブラリーから pM7012 の配列を持つクローンを抽出し、挿入配列の両端をシーケンスした。M701 株のゲノム DNA を制限酵素 *HindIII* (ニッポンジーン) で切断した場合のライブラリーも同じ方法で作成し、同様の解析に用いた。

(5) primer walking 法によるシーケンス解析

コンティグ間のギャップや、コンティグ配列の曖昧な箇所を明らかにするために、必要に応じてその前後の配列情報からプライマーを作成し、短断片クローンと長断片クローン由来

のプラスミド、あるいは M701 株のゲノム DNA を鋳型にキャピラリーシーケンス解析を行った。

3.4.3 アノテーションと配列の登録

まず始めに、遺伝子解析ソフトウェア、*in silico* Molecular Cloning (インシリコバイオロジー株式会社) を用いて、遺伝子の開始コドンと終止コドンに挟まれた open reading frame (ORF) を抽出した。次に、塩基配列が 200 bp 以上の ORF 全てのアミノ酸配列を National Center for Biotechnology Information (NCBI) の protein blast (blastp) のサイト (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) (Altschul *et al.*, 1997) で検索し、上位にヒットしたタンパク質の相同性が 40% 以上の場合に同定候補タンパク質とした。機能の類似したタンパク質は、共通の構造モチーフやドメインを持つ事が知られている。そこでタンパク質のデータベース、Pfam (<http://pfam.xfam.org/>) (Finn *et al.*, 2010) の検索機能を用いて、同定候補タンパク質の構造モチーフやドメインの保有状況を調べ、同定の根拠とした。上述の blastp と Pfam の検索では、pM7012 の ORF の開始位置と偽遺伝子の可能性の確認も合わせて実施した。また、遺伝子解析ソフトウェア、*in silico* Molecular Cloning の配列検索機能を用いて、pM7012 上のプロモーターの共通配列を検出し、CDS の開始位置を決定するための判断材料とした。t-RNA の解析は、tRNA 解析サイト tRNAscan-SE (<http://lowelab.ucsc.edu/tRNAscan-SE/>) (Schattner *et al.*, 2005) で実施した。

得られた pM7012 の全塩基配列及びアノテーションのデータは日本 DNA データバンク (DDBJ) を通じて DNA データベースに登録した (Accession number ; AB853026)。

3.5 結果

3.5.1 プラスミドの分離回収条件の最適化

(1) プラスミドの分離方法の検討と 2,4-D 分解遺伝子配列保有プラスミドの特定

ゲノム DNA を PFGE で解析した結果、M701 株のゲノムは 6 つ以上の DNA 分子より構成され、少なくとも 4 つの大型プラスミドを保有することが明らかとなった (Fig. 3-1 左図)。また、PFGE が M701 株のプラスミドの分離に有効であることが示された。 *tfdC*_{M701} プロブを用いてサザンハイブリダイゼーションを行った結果、6 本のバンドのうち下から 2 本目のバンドにシグナルが認められた (Fig. 3-1 右図)。この 2,4-D 分解遺伝子配列を持つプラスミドを、pM7012 と名付けた。

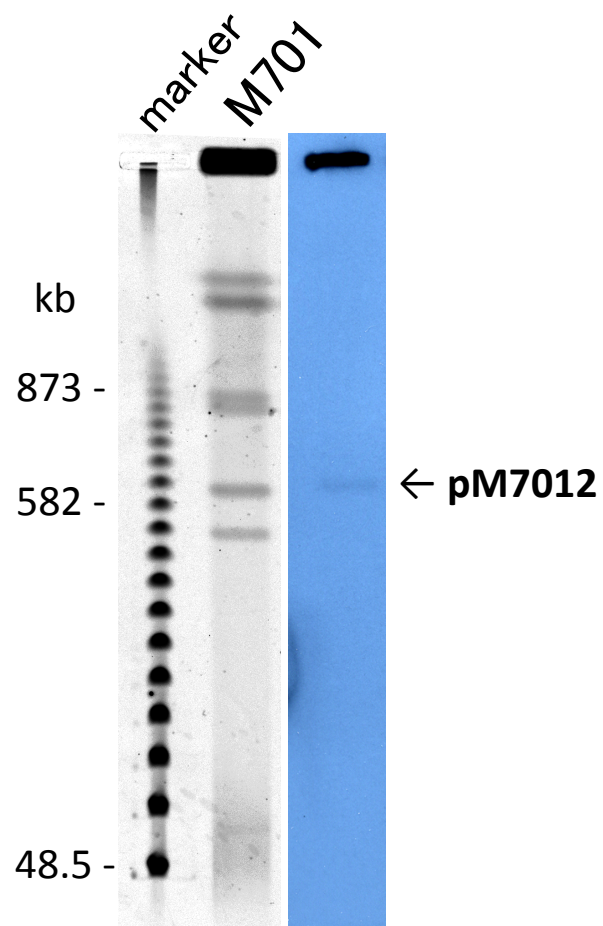


Fig. 3-1 PFGE of replicons from strain M701 (left figure) and Southern hybridization analysis of the replicon using the *tfdC*_{M701} probe (right figure).

(2) pM7012 の効率的回収のための PFGE 条件の検討

M701 株の生育ステージが、PFGE で検出される DNA バンドの太さに及ぼす影響を調べた結果、処理間の差は認められなかった (Fig. 3-2A)。クロラムフェニコールの添加で、検出される DNA バンドは少し太くなったが、明確な効果は認められなかった。最も改善の効果が認められたのは、プラグあたりの菌量を増やした場合であった。Fig. 3-1 に結果を示した最初の実験では、プラグ 1 個あたりの菌量は培養液 0.2 mL とした。本実験では、少なくとも 2.4 mL までは、菌量を増やすほど DNA バンドが太くなる傾向が認められた (Fig. 3-2B)。一方、高分子 DNA がプラグから電気溶出しやすくなることを期待して、プラグのゲル濃度を通常 1% から 0.7% に下げる条件も検討したが、DNA バンドの太さに大きな差は認められなかった (Fig. 3-2B)。0.7% ゲルのプラグは泳動終了時に変形していたため、プラグのゲル濃度は 1% がよいと判断した。

菌量を増やすことで DNA バンドが太くなったが、その一方で、泳動像がスメアーになりやすい傾向が認められた。目的外 DNA の混入を極力なくするため、PFGE で分離した pM7012 の DNA を含むゲル片を 2 回目の PFGE にかけることで、混入した低分子 DNA が効率的に除去された (Fig. 3-3)。

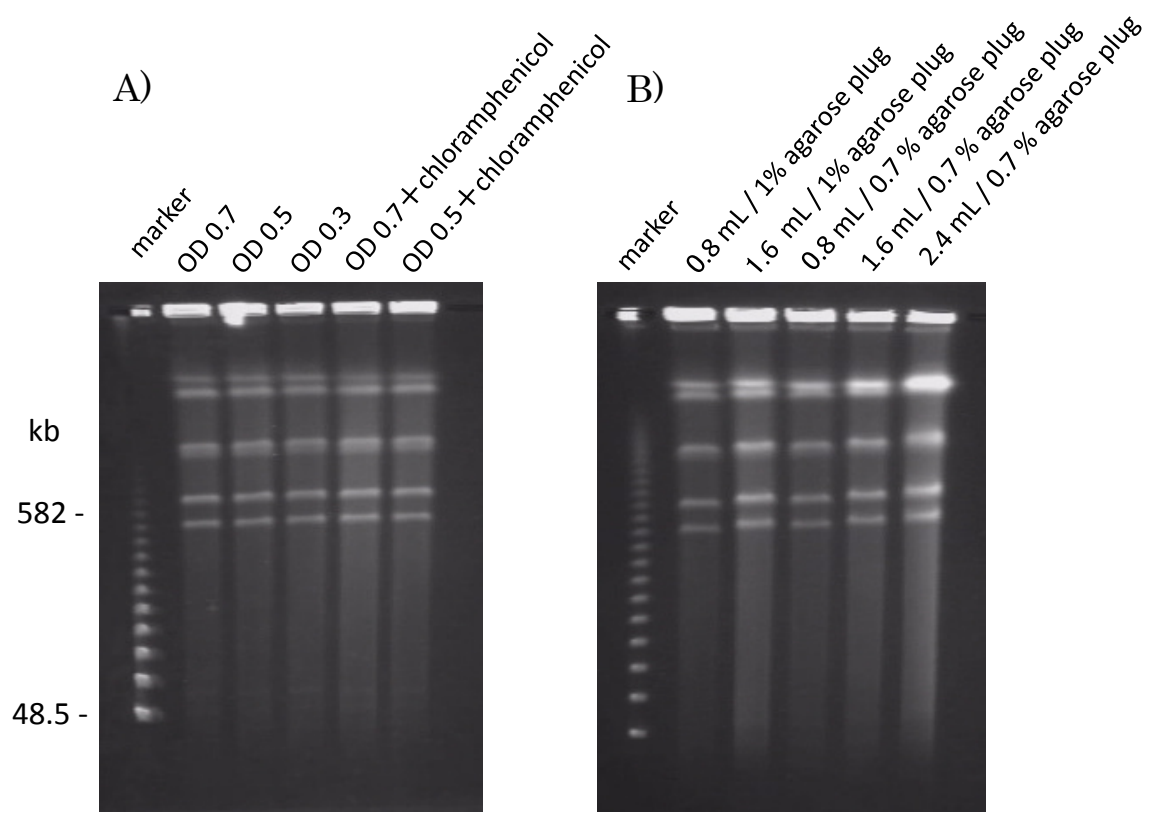


Fig. 3-2 Comparison of the effect of growth conditions (A) and electrophoresis conditions (B) on PFGE of replicons from strain M701.

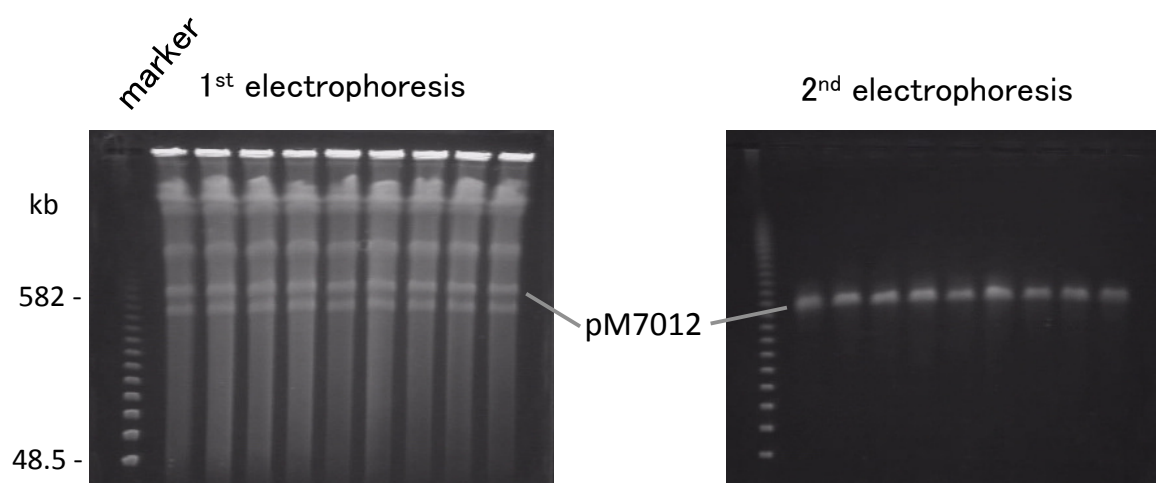


Fig. 3-3 PFGE of replicons from strain M701 for getting DNA of plasmid pM7012. At the 1st electrophoresis, the replicons of strain M701 were separated in PFGE gel, and at the 2nd electrophoresis, DNA of pM7012 in cut-out gel was electrophoresed again to remove contaminated other DNA fragments.

3.5.2 pM7012 の全塩基配列の解析

pM7012 のショットガンライブラリーの解析から、およそ 6,500 個の塩基配列が取得された。一配列の長さは、およそ 600 bp であったため、pM7012 の冗長度 6 に相当する。ゲノム解析では冗長度 5 のデータの取得が目安とされ、プラスミドの解析では十分量のデータと思われた。しかしアセンブルの結果、100 以上のコンティグが形成され、ショットガンライブラリーの結果だけでは、pM7012 の全塩基配列を明らかにすることはできなかった。そこで、次世代シーケンス解析を行い、1 配列あたりおよそ 30 bp の配列を 470 万個取得した。即ち合計 141 Mb、冗長度 235 相当のデータが取得された。しかし、次世代シーケンスデータのみではアセンブルがうまくいかず、新たな配列情報はほとんど得られなかった。先のショットガンライブラリーから得られたコンティグ配列に、次世代シーケンスデータをマッピングすることにより、コンティグの不確かだった配列を確定し、コンティグ間のギャップの情報の一部が得られた。この時点でも数十のコンティグが存在していたため、10 kb 以上の長い DNA 断片を挿入配列とするライブラリーを構築してペアエンド解析を行い、コンティグの並び順を明らかにした。また、このペアエンドのシーケンス情報からアセンブルが正しく行われていることを確認した。primer walking 法でコンティグ間のギャップや、コンティグ配列の曖昧な箇所を解析した結果、pM7012 の全塩基配列が明らかにされた。全長は、582,142 bp、GC 含量は、59.7%であった。

3.5.3 アノテーション

pM7012 のアノテーションの結果を Fig. 3-4 に示した。pM7012 には、541 個の CDS とと思われる配列が検出された。そのうち既知のタンパク質と相同性を持ち、機能の推定ができたのは、187 個のみであった。既存のデータベースに相同な配列の存在しない機能未知の配列は、特にプラスミド複製開始領域から時計回りに最初の半分に集中していた。この領域の両端には、GC 含量が高い繰り返し配列が複数存在した。この繰り返し配列を含む領域は開始コドンと終止コドンの間が広く、最も長い領域では 4000 aa 以上にもなった。アミノ酸として相同性検索を行ったところ、部分的に outer membrane autotransporter (*Burkholderia*

vietnamiensis G4, YP_001110606)と低い相同性を示した。プラスミドの残りの半分には、ヒ素耐性トランスポゾン、2,4-D 分解遺伝子群、及びタイプ IV 分泌遺伝子群が存在した。ヒ素耐性トランスポゾンと 2,4-D 分解遺伝子群の間には *Burkholderia* 属菌のクロミド(第二染色体)に相同性の高い領域が存在した。クロミドとは染色体とは区別される染色体様の DNA 分子を指し、Harrison *et al.* (2010) によって提唱された。CDS 間の塩基配列が比較的長い場合は、NCBI の nucleotide blast で相同な配列の検索を行った。その結果、pM7012 上には tRNA の存在することが明らかとなったため、tRNA 解析サイト tRNAscan-SE で解析を行った。39 個の tRNA 配列が見出され、2 カ所にまとまって存在したため、tRNA cluster I 及び tRNA cluster II と名付けた。

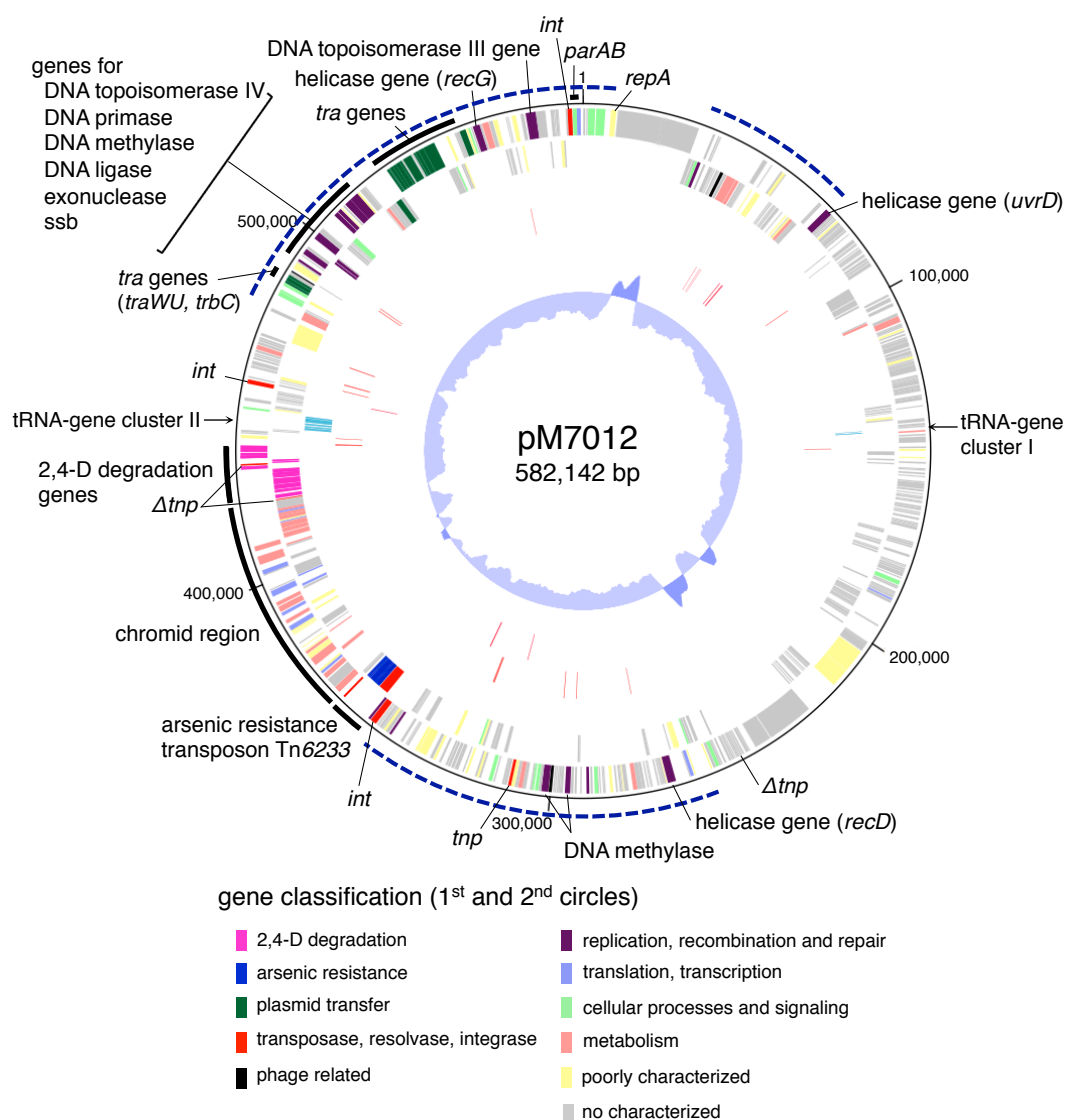


Fig. 3-4 Map of plasmid pM7012 in *Burkholderia* sp. M701. The first and second circles (from outside to inside) represent genes transcribed in the clockwise and counterclockwise direction, respectively, with colors representing COG classification, except genes annotated as involved in 2,4-D degradation, arsenic resistance, plasmid transfer, gene mobilization, and genes related to phage. The third circle represents tRNA genes, and the fourth and fifth represent pM7012_repeat A sequences in the clockwise and counterclockwise direction, respectively. The sixth circle shows GC contents from 47–62% separated by different colors, with a mean value of 54%. The regions in synteny with *byi_2p* and *pBVIE01* are shown by dotted blue line.

3.6 考察

M701 株のゲノムから 2,4-D 分解プラスミド、pM7012 を分離して全塩基配列を解析した結果、大きさは 582 kb であった。これまでに全塩基配列の明らかにされている 2,4-D 分解プラスミドはいずれも 90 kb 前後の大きさの IncP-1 グループのプラスミドである (Kim *et al.*, 2013; Poh *et al.*, 2002; Trefault *et al.*, 2004; Vedler *et al.*, 2004)。よってそれ以外の 2,4-D 分解プラスミドの全塩基配列の解析は、本研究が初めてである。pM7012 には、2,4-D 分解プラスミドにしばしば見出されてきた水銀耐性遺伝子群は存在しなかった。代わりに、2,4-D 分解プラスミド上には見出されたことのないヒ素耐性遺伝子群が見出された。また、一連の接合伝達遺伝子群が pM7012 に存在することが明らかになり、pM7012 が伝達性プラスミドである可能性を支持する結果が得られた。2,4-D 分解遺伝子群とヒ素耐性遺伝子群の間の 50 kb 以上の領域は、*Burkholderia* 属菌のクロミド（以前は第二染色体）に相同であった。もし、M701 株の全ゲノムを解析し、得られた配列を既知のゲノム配列にマッピングし、残りをプラスミド DNA とする手法で pM7012 を解析していたら、クロミド配列を見落とした可能性がある。本研究では、pM7012 の DNA のみを PFGE のゲルから切り出して解析したため、プラスミド上のクロミド配列を確実に検出できたと考えられる。

DNA データベースによると、これまでにゲノムの解析されている *Burkholderia* 属菌のゲノムサイズは 8 Mb 前後の菌株が多く、pM7012 は宿主のゲノムサイズの 1/13 程度に相当すると考えられる。*Burkholderia* 属菌のゲノムは複数の DNA 分子から構成されることが多く、プラスミドがクロミドを取り込んだ可能性が考えられる一方で、pM7012 自身がクロミドという可能性も考えられた。しかし、Harrison *et al.* (2010) は染色体、クロミド、及びプラスミドの分類の基準を示しており、それに従うと、pM7012 はプラスミドに分類されることが考えられた。その根拠として、以下の 3 点があげられる。第一に、pM7012 の GC 含量が、DNA データベースに登録されている *Burkholderia* 属菌の染色体 DNA 配列の GC 含量より低いことがある。クロミドは染色体と同程度の GC 含量を持つと定義されている。第二に、クロミドは種特異的配列を持つとされるが、pM7012 は属種を超えて伝達している可能性が第一章

及び、後述の第六章より強く示唆されている。第三に、pM7012 に相同なプラスミド骨格を持つプラスミド pBVIE01（第五章）が、Harrison *et al.* (2010) の報告でプラスミドに分類されていることが挙げられる。

pM7012 のプラスミド複製開始領域から時計回りにおよそ最初の半分の領域の CDS は大半が機能未知であった。この領域は、*Burkholderia* 属菌あるいは近属菌の DNA 配列との相同性が低く、一部にはファージに相同な配列も見いだされた。この領域の両側には、GC 含量が高く、互いに相同性の固い配列が存在する。よってこれらの領域は、相同組換え等で、外部より取り込まれた可能性が高いと考えられた。

PFGE により、少なくとも 300 kb までの大型のプラスミドが、スーパーコイルの形態で分離されることが報告されている (Wang & Lai, 1995)。本研究でも、制限酵素処理を行うことなく、300 kb 以上のプラスミドが分離され、PFGE を用いた大型プラスミドの解析の有効性が確認された。本研究で用いた PFGE 用のプラグ作成法では、途中、50℃で一晩培養するため、プラスミドにニックが入り、プラスミドの一部、あるいは大半がオープンサークルの形態に変化している可能性が高い。Wang & Lai (1995) は 100 kb のオープンサークルのプラスミドは well に留まり、PFGE で分離できなかったことを報告している。本研究の PFGE ゲルで分離したゲノム DNA のサザンハイブリダイゼーションでは、well の位置に濃いシグナルが認められた (Fig. 3-1)。この結果は、オープンサークルとなったプラスミドが検出されているためと考えられた。

第四章 pM7012 が外部から獲得したと考えられる機能遺伝子配列の比較解析

4.1 要約

pM7012 には 2,4-D 分解に必要とされる一連の分解遺伝子が全て揃い、その並び順は、既知の分解プラスミドに類似していることが明らかとなった。一方で、これまでに報告されている 2,4-D 分解遺伝子群の両側に見出されてきた挿入配列 IS1071 は、pM7012 上には見出されなかった。従って本プラスミドは、既知の 2,4-D 分解プラスミドとは異なる方法で 2,4-D 分解遺伝子群を獲得した可能性が示唆された。ヒ素耐性遺伝子群は Tn3 ファミリーのトランスポゾン形態をとり、既知のヒ素耐トランスポゾンと非常に高い相同性を示した。このトランスポゾンは周辺の配列の解析より、*Burkholderia* 属菌のクロミドの一部と共に pM7012 に取り込まれたと考えられた。また、pM7012 に存在する 2 つの tRNA クラスターのうち、36 個の tRNA 遺伝子より構成されるクラスターII は、20 種類のアミノ酸全てに対応するが、それぞれの配列が複数の生物種の tRNA に相同性を示し、未知の微生物より獲得された可能性が示された。これらの結果は、pM7012 の祖先が、多様な配列を外部より獲得して現在の pM7012 が構築されていることを意味しており、本プラスミドが、*Burkholderia* 属菌の遺伝子の獲得と再編に大きな役割を担っていることが示された。

4.2 緒言

プラスミドは、大きく分けて 2 つの要素から構成される。一つは、プラスミド固有の配列で、プラスミドの維持複製に必須の遺伝子群や接合伝達遺伝子群がこれに相当する。これらの配列は、プラスミドの骨格的配列 (plasmid backbone) (Burlage *et al.*, 1990; Thomas, 2000) と呼ばれる。プラスミドの保有するもう一つの要素は、後天的にプラスミドが獲得したと考えられる配列で、アクセサリ遺伝子 (accessory gene) と呼ばれる (Heuer *et al.*, 2004)。IncP-1 グループのプラスミドで詳細に解析が行われ、プラスミドの骨格的配列が同

じプラスミドでも、保有するアクセサリ遺伝子群の異なることが報告されている (Sen *et al.*, 2011; Szczepanowski *et al.*, 2011)。プラスミドの骨格的配列への DNA 断片の挿入は、トランスポゾンが最も一般的で、多くのプラスミドがトランスポゾン様配列を保有する。これまでに全塩基配列の明らかにされている 2,4-D 分解プラスミドもその例外ではなく、2,4-D 分解遺伝子群の両側には IS1071 が存在し、複合トランスポゾンの形態をとっている (Kim *et al.*, 2013; Poh *et al.*, 2002; Trefault *et al.*, 2004; Vedler *et al.*, 2004)。Burkholderia cepacia 2a 株の保有する 2,4-D 分解プラスミド pIJB1 では、2,4-D 分解遺伝子群とその両側の IS1071 を合わせて Tn5530 と名付けられている。

プラスミドの骨格的配列への DNA 断片の挿入としてもう一つ考えられるのは、プラスミドが染色体の一部を取り込む現象で、大型のプラスミドでは一般的に検出される (Lawley *et al.*, 2004)。最も有名なのは、F プラスミドが染色体を取り込んで F' プラスミドとなる現象で、大腸菌の染色体 DNA の解析の手段としても利用された。2,4-D 分解菌においても、分解プラスミドの染色体への挿入が確認されている (Ka & Tiedje, 1994)。

プラスミドのアクセサリ遺伝子は、宿主に新しい能力を付与して宿主の生残を有利にすると共に、宿主の染色体の変化、例えば新たな配列の取り込みや、配列の相同組換えを推進していると考えられる。本研究ではまず始めに、pM7012 の宿主である M701 株に 2,4-D 分解能を付与している 2,4-D 分解遺伝子群について、既知の分解遺伝子群と比較解析を行った。次に、pM7012 のプラスミドの骨格的配列に、後天的に挿入されたと考えられる分解遺伝子以外の配列を解析した。

4.3 方法

(1) 機能遺伝子クラスター及びその周辺配列の比較解析

遺伝子解析ソフトウェア、in silico Molecular Cloning (インシリコバイオロジー) を用いて、遺伝子配列情報から遺伝子構造の図を書き出し、比較解析に用いた。また、pM7012 の繰り返し配列の検出も、同ソフトウェアの配列検索機能で実施した。遺伝子の相同性の値は、

遺伝子解析ソフトウェア、Genetix ver. 15（ゼネティックス）を用いて算出した。クロミド領域については、特定の機能遺伝子群の有無を明らかにするために、Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG)を利用して解析した。

(3) tRNA 遺伝子の比較解析

ゲノム DNA の tRNA 検出サイト、tRNAscan-SE (Schattner *et al.*, 2005) からアンチコドンと対応するアミノ酸のデータを取得した。また tRNA 遺伝子の由来を推定するために、tRNA データベース、tRNADB-CE (Abe *et al.*, 2011) を利用して、既報の配列との相同性を解析した。

4.4 結果

(1) 2,4-D 分解遺伝子群

pM7012 の 2,4-D 分解遺伝子群の構成は、既知の 2,4-D 分解プラスミド pEST4011 の保有する分解遺伝子群に最も相同であった (Fig. 4-1)。ただし、pM7012 の *tfdE_IC_ID_IR_I* の並び順は pJP4 の保有する *tfd_{II}* 遺伝子クラスターに最も似ていた。pM7012 においても一部の分解遺伝子は複数存在し、クラスターを形成していたため、*tfdC_{II}E_{II}B_{II}* と名付けた。遺伝子クラスター *tfdC_{II}E_{II}B_{II}* の上流には *tfdR* 遺伝子の中央で一塩基欠失してフレームシフトの生じた偽遺伝子が検出され、 Δ *tfdR_{II}* と名づけた。pM7012 上の Δ *tfdR_{II}* 及び *tfdC_{II}E_{II}B_{II}* は、pM7012 の保有するもう一つの分解遺伝子クラスター *tfdE_IC_ID_IR_I* の単純な重複ではなかった。 Δ *tfdR_{II}* と、pEST4011 の保有する *tfdR* は塩基配列で 91% 相同であったが、pM7012 の *tfdR_I* の塩基配列とは 72% の相同性であった。pM7012 の *tfdC_IE_I* と *tfdC_{II}E_{II}* の塩基配列は *tfdE* の最後の 81 塩基を除いて同一であったが、pM7012 の *tfdB_{II}* は pM7012 の *tfdB_I*、pEST4011 の *tfdB*、及び pJP4 の *tfdB_{II}* の塩基配列に、77 から 79% の相同性を示した。

2,4-D 分解遺伝子群の周辺に見出されることの多い IS1071 様のトランスポゾン pM7012 上には見出されなかった。pM7012 の *tfd* 遺伝子群の *tfdF* 遺伝子側の外側には、IS3 ファミ

リーの IS1416 (Hasebe *et al.*, 1998) の末端に存在する繰り返し配列にほぼ同一の配列が存在し、この配列の近くには、*Xylella fastidiosa* subsp. Sandi Ann-1 の保有する IS605 のトランスポザーゼ (404 aa; GenBank accession number; EAO31770) に相同な 85 aa のアミノ酸配列が存在した。pM7012 の *tfd* 遺伝子群の末端に位置する *tfdB_{II}* 遺伝子の外側には、pM7012_repeat A と名付けた繰り返し配列が存在したが、この配列は短いものも含めると pM7012 の 29 カ所に見出された (Table 4-1)。この *tfdB_{II}* 遺伝子の 10 kb ほど下流には、インテグラーゼが pM7012_repeat A の一つと近接していた (Fig. 4-1)。pM7012 上には、他にも複数の繰り返し配列や挿入配列が存在し (Table 4-1, 4-2, Fig. 3-4)、過去に盛んにプラスミド DNA の再編の行われたことが示唆された。

Table 4-2 Transposase and integrase gene homologues in pM7012 .

Start position	End position	Strand	Product in pM7012 (background)	Homologous product detected in database (Host, Accession number)	Amino acid identity (%)
245708	246151	+	none (pseudogene of transposase ISL3 family)	transposase TnpA, ISL3 family protein (<i>Cupriavidus</i> sp. HMR-1, WP_008640690)	50
310801	311580	+	putative transposase (pfam: transposase IS200 like)	hypothetical protein Bphy.2789 (<i>Burkholderia phymatum</i> STM815, YP_001859007)	58
351302	353035	+	phage integrase family protein (pfam: phage integrase protein, phage integrase family)	Integrase (<i>Burkholderia vietnamiensis</i> AU4, WP_021157892)	63
354185	357151	-	Tn3 family transposase (pfam: transposase)	transposase (<i>Alcaligenes faecalis</i> subsp. faecalis NCIB 8687, WP_003804152)	99
421848	422105	-	none (pseudogene of transposase IS605 superfamily)	transposase (<i>Xylella fastidiosa</i> EB92.1, WP_004091452)	36
432624	433052	+	none (pseudogene of transposase IS66 family)	transposase IS66 (<i>Variovorax paradoxus</i> SI10, YP_002947819)	66
455006	456148	+	putative phage integrase family protein (pfam: phage integrase family)	DNA integration/recombination/inversion protein (<i>Burkholderia rhizoxinica</i> HK1 454, YP_004030688)	44
577891	579105	+	phage integrase family protein (pfam: phage integrase family)	hypothetical protein (<i>Pseudomonas</i> sp. HPB0071, WP_010799701)	50

(2) ヒ素耐性遺伝子群

pM7012 のヒ素耐性遺伝子群は、プラスミド維持複製領域から時計回りにおよそ 350 kb の位置に存在し (Fig. 3-4)、arsenic resistance transcriptional regulator, *arsR*; arsenate reductase *arsC*; arsenical resistance operon trans-acting repressor, *arsD*; arsenite-activated ATPase, *arsA* 及び arsenical pump membrane protein, *arsB* の 5 つの遺伝子から構成されていた (Fig. 4-2a)。この遺伝子群は、Tn3 ファミリーのトランスポザーゼ遺伝子、*tnpA* 及びトランスポゾンリゾルバーゼ遺伝子、*tnpR* に挟まれており、*tnpA* と *tnpR* の下流には、非常によく保存された逆方向反復配列が存在した (Fig. 4-2a, b)。即ち、ヒ素耐性遺伝子群がトランスポゾンとして pM7012 上に存在することが示された。この遺伝子群に相同な配列を NCBI のデータベースで検索したところ、南アフリカで、ヒ素濃度の非常に高い硫黄鉄鉱生物酸化処理タンクより分離されたヒ素耐性菌、*Leptospirillum ferriphilum* Fairview 株の保有するヒ素耐性トランスポゾン TnLfArs (Tuffin 2006) と相同性が非常に高いことが明らかになった (Fig. 4-2a, b)。それぞれの対応する遺伝子の向きと並び順が同じである事に加えて、各遺伝子のアミノ酸レベルの相同性は 93~98%、両者の逆方向反復配列はほぼ同一であった。一方、TnLfArs と同程度に pM7012 のヒ素耐性トランスポゾンに対して高い相同性を示す配列は、他には検出されなかった。pM7012 上に見出されたヒ素耐性トランスポゾンは、トランスポゾン命名システム (Roberts *et al.*, 2008) に従って Tn6233 と命名した。

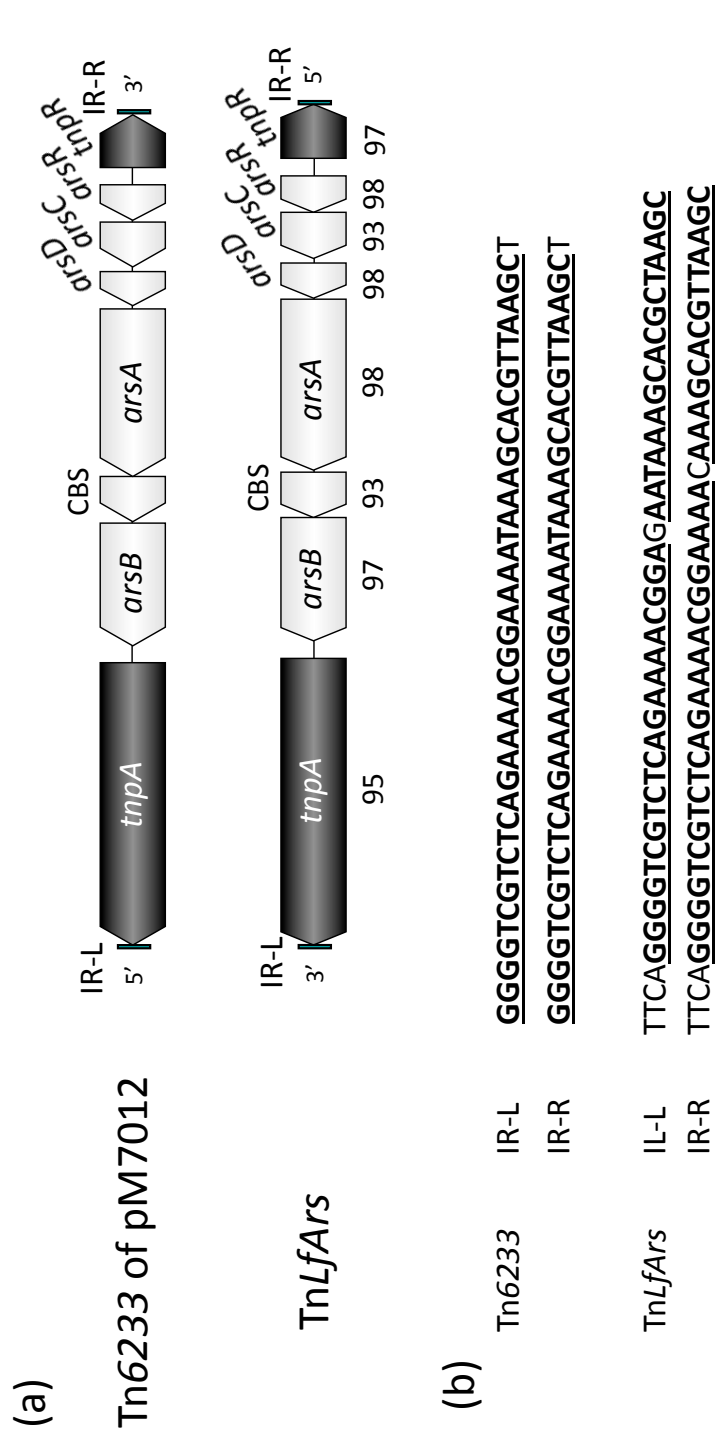


Fig. 4-2 Gene organization (a) and inverted repeats (b) of arsenic resistance transposon Tn6233 in pM7012 and the transposon TnLfArs. Numbers under arrows represent identities (%) of amino acid sequences of the enzymes encoded by the genes in TnLfArs to the corresponding sequences in Tn6233. Accession number: TnLfArs, DQ057986.

(3) クロミド領域

プラスミド pM7012 のヒ素耐性遺伝子群と 2,4-D 分解遺伝子群の間には 59 kb の領域が存在し、51 個の CDS が見出された。これらの配列は、既にゲノム配列の明らかにされている他の *Burkholderia* 属細菌、例えば、マメ科根粒菌として分離された CCGE1002 株

(Ormeno-Orrillo *et al.*, 2012)、植物生育促進共生細菌、PsJN 株 (Weilharter *et al.*, 2011) 及び PCB 分解菌、LB400 株 (Chain *et al.*, 2006) の保有する染色体の次に大きい環状 DNA (クロミド、以前の定義では第二染色体) と相同性が高かった。pM7012 の 59 kb の領域にある 51 個の CDS のうち、27 個は CCGE1002 株のクロミド上の一カ所の領域の配列に 80% 以上相同で、51 個の CDS のうち、35 個は並び順が CCGE1002 株の保有する相同な CDS に一致した。同様の傾向が、PsJN 株及び LB400 株のクロミドと pM7012 との間にも認められた。pM7012 の 51 個の CDS の機能を、KEGG を用いて調べたところ、それぞれの配列が脂質の代謝合成やアミノ酸の代謝等、様々な代謝系の一部を担う遺伝子と同定された。即ち、pM7012 の 59 kb の領域は、2,4-D 分解遺伝子群のように、ある物質の一連の代謝遺伝子群としてではなく、単にクロミドの一部が pM7012 に取り込まれたことが示唆された。pM7012 の 59 kb の領域の末端にはフォスホリパーゼ C 遺伝子の配列が存在するが、この配列は途中からヒ素耐性トランスポゾン Tn6233 に置換されていた。クロミド領域が pM7012 の祖先に取り込まれて後、ヒ素耐性トランスポゾンが挿入された場合には、ヒ素耐性トランスポゾンの両側に同方向反復配列が存在し、分断されたフォスホリパーゼ C 配列が存在するはずであるが、Tn6233 の両側に、そのような配列は見出されなかった。即ち、*Burkholderia* 属細菌のクロミド上のフォスホリパーゼ C 配列に Tn6233 が挿入され、これを、pM7012 の祖先がクロミドの一部と共に取り込んだ可能性が示された。

(4) tRNA 遺伝子

pM7012 上に見出された 2 つの tRNA 様遺伝子のクラスターのうち、tRNA 遺伝子クラスターI は 3 つの tRNA 遺伝子配列を含み、その配列は既知の *Burkholderia* 属細菌の CCGE1002 株や STM815 株の保有する tRNA 配列に 85%以上相同であった (Table 4-3)。一方、tRNA 遺伝子クラスターII は、2,4-D 分解遺伝子群から 5.4 kb の位置に存在し (Fig. 4-1)、構成する 36 個の tRNA 遺伝子配列は、様々な細菌及び古細菌の tRNA 遺伝子に相同性を示した (Table 4-3)。この 36 個の配列は 20 個の必須アミノ酸全てをコードし、さらに一種類のアミノ酸に対して複数の tRNA 配列が存在する場合でも、アンチコドンの重複は認められなかった (Table 4-4)。36 個の tRNA は 4.8 kb の中に 36 個の tRNA 遺伝子配列が近接して存在し、同配列間が 10 塩基以下のカ所が 15 カ所あった (Fig. 4-3)。即ち、tRNA 遺伝子クラスターI は *Burkholderia* 属細菌あるいはその近縁種から取り込まれた可能性が高い一方、tRNA 遺伝子クラスターII は、未知の微生物から取り込まれた可能性が示された。

Table 4-3 tRNAs in pM7012 and results of blastn analysis in tRNA Gene DataBase (tRNASB-CE) .

tRNA in pM7012				Closest tRNA		AA / Anticodon in DNA		Identity (%) / Coverage (%)		Sequence ID in tRNADB-CE	
tRNA cluster	Start position	End position	Strand	Host	Host	AA / Anticodon in DNA	AA / Anticodon in DNA	Identity (%) / Coverage (%)	Identity (%) / Coverage (%)	Sequence ID in tRNADB-CE	Sequence ID in tRNADB-CE
tRNA-gene cluster I	139048	139121	+	Betaproteobacteria	Betaproteobacteria	Gly / TCC	Gly / TCC	98 / 100	98 / 100	C10102498	C10102498
	139510	139600	+	Betaproteobacteria	Betaproteobacteria	Ser / GGA	Ser / GGA	96 / 100	96 / 100	C08001984	C08001984
	139619	139711	+	Betaproteobacteria	Betaproteobacteria	Ser / TGA	Ser / TGA	85 / 102	85 / 102	C10102488	C10102488
tRNA-gene cluster II	443544	443619	+	Firmicutes	Firmicutes	Gly / CCC	Gly / CCC	90 / 68	90 / 68	C11119077	C11119077
	443660	443746	+	Bacteroidetes	Bacteroidetes	Tyr / GTA	Pro / GGG	96 / 35	96 / 35	C09106216	C09106216
	443756	443831	+	Betaproteobacteria	Betaproteobacteria	Glu / TTC	Glu / TTC	91 / 82	91 / 82	C011112	C011112
	443839	443912	+	Betaproteobacteria	Betaproteobacteria	Gly / TCC	Gly / TCC	92 / 100	92 / 100	C10102498	C10102498
	443937	444012	+	Betaproteobacteria	Betaproteobacteria	Gly / GCC	Gly / GCC	90 / 100	90 / 100	C10113183	C10113183
	444056	444130	+	Gemmatimonadetes	Gemmatimonadetes	Phe / GAA	Phe / GAA	97 / 54	97 / 54	C09106255	C09106255
	444138	444213	+	Betaproteobacteria	Betaproteobacteria	Ala / TGC	Ala / TGC	95 / 86	95 / 86	C10113347	C10113347
	444372	444445	+	Chloroflexi	Chloroflexi	Lys / TTT	Trp / CCA	96 / 39	96 / 39	C09110683	C09110683
	444499	444576	+	Firmicutes	Firmicutes	Asn / GTT	Asn / GTT	91 / 80	91 / 80	C014171	C014171
	444604	444679	+	Betaproteobacteria	Betaproteobacteria	His / GTG	His / GTG	87 / 87	87 / 87	C10113328	C10113328
	444700	444778	+	Betaproteobacteria	Betaproteobacteria	Gln / TTG	Gln / TTG	93 / 78	93 / 78	C10102540	C10102540
	444885	444961	+	Alphaproteobacteria	Alphaproteobacteria	Pro / TGG	Pro / TGG	94 / 100	94 / 100	C09102481	C09102481
	445313	445402	+	Gammaproteobacteria	Gammaproteobacteria	Ser / GGA	Ser / CGA	100 / 29	100 / 29	C006971	C006971
	445432	445508	+	Betaproteobacteria	Betaproteobacteria	Ile / GAT	Ile / GAT	98 / 70	98 / 70	C10109344	C10109344
	445518	445593	+	Cyanobacteria	Cyanobacteria	Trp / CCA	Trp / CCA	89 / 76	89 / 76	C007434	C007434
	445603	445693	+	Deltaproteobacteria	Deltaproteobacteria	Ser / CGA	Gln / TTG	100 / 25	100 / 25	C09106400	C09106400
	445701	445777	+	Alphaproteobacteria	Alphaproteobacteria	Arg / ACG	Arg / TCG	95 / 31	95 / 31	C018940	C018940
	446200	446275	+	Firmicutes	Firmicutes	Lys / CTT	Lys / CTT	91 / 79	91 / 79	C024685	C024685
	446299	446376	+	Chloroflexi	Chloroflexi	Pro / CGG	Pro / CGG	88 / 80	88 / 80	C10112707	C10112707
	446384	446473	+	Euryarchaeota	Euryarchaeota	Ser / GCT	Ser / GCT	100 / 24	100 / 24	A00626	A00626
	446497	446573	+	Gammaproteobacteria	Gammaproteobacteria	Val / TAC	Val / TAC	93 / 83	93 / 83	C10100239	C10100239
	446580	446655	+	Betaproteobacteria	Betaproteobacteria	Asp / GTC	Asp / GTC	91 / 50	91 / 50	C09111138	C09111138
	446664	446739	+	Firmicutes	Firmicutes	Thr / GGT	Pro / TGG	100 / 28	100 / 28	C10113426	C10113426
	446747	446822	+	Gammaproteobacteria	Gammaproteobacteria	Thr / CGT	Thr / CGT	92 / 52	92 / 52	C003677	C003677
	446830	446906	+	Gammaproteobacteria	Gammaproteobacteria	Thr / TGT	Thr / TGT	96 / 35	96 / 35	C100539	C100539
	446915	447001	+	Actinobacteria	Actinobacteria	Leu / GAG	Leu / CAG	86 / 72	86 / 72	C10107500	C10107500
	447007	447096	+	Actinobacteria	Actinobacteria	Leu / CAG	Leu / TAA	96 / 29	96 / 29	C10102546	C10102546
	447103	447189	+	Firmicutes	Firmicutes	Leu / CAA	Leu / CAA	93 / 38	93 / 38	C08004111	C08004111
	447197	447282	+	Betaproteobacteria	Betaproteobacteria	Leu / TAG	Leu / TAG	86 / 79	86 / 79	C09102571	C09102571
	447289	447378	+	Chlorobi	Chlorobi	Leu / TAA	Leu / TAA	91 / 39	91 / 39	C08003603	C08003603
	447382	447458	+	Bacteroidetes	Bacteroidetes	Arg / TCT	Arg / TCT	88 / 72	88 / 72	C10110689	C10110689
	447604	447680	+	Planctomycetes	Planctomycetes	Met / CAT	Met / CAT	97 / 54	97 / 54	C10110180	C10110180
	447687	447761	+	Verrucomicrobia	Verrucomicrobia	Met / CAT	Val / TAC	100 / 19	100 / 19	C08006559	C08006559
	447771	447855	+	Betaproteobacteria	Betaproteobacteria	Cys / GCA	Cys / GCA	93 / 46	93 / 46	C10113350	C10113350
	447861	447938	+	Crenarchaeota	Crenarchaeota	Arg / CCG	Arg / CCG	86 / 90	86 / 90	A00266	A00266
	447944	448019	+	Actinobacteria	Actinobacteria	Arg / CCT	Arg / CCT	85 / 75	85 / 75	C10101356	C10101356

Table 4-4 Anticodons and isotypes of tRNAs in tRNA-gene cluster II of pM7012.

Isotype	Anticodon Counts:						
Ala : 1	AGC:	GGC:	CGC:	TGC:	1		
Gly : 3	ACC:	GCC: 1	CCC: 1	TCC:	1		
Pro : 2	AGG:	GGG:	CGG: 1	TGG:	1		
Thr : 3	AGT:	GGT: 1	CGT: 1	TGT:	1		
Val : 1	AAC:	GAC:	CAC:	TAC:	1		
Ser : 3	AGA:	GGA: 1	CGA: 1	TGA:		ACT:	GCT: 1
Arg : 4	ACG: 1	GCG:	CCG: 1	TCG:		CCT: 1	TCT: 1
Leu : 5	AAG:	GAG: 1	CAG: 1	TAG: 1		CAA: 1	TAA: 1
Phe : 1	AAA:	GAA: 1					
Asn : 1	ATT:	GTT: 1					
Lys : 2	CTT: 1	TTT: 1					
Asp : 1	ATC:	GTC: 1					
Glu : 1	CTC:	TTC: 1					
His : 1	ATG:	GTG: 1					
Gln : 1	CTG:	TTG: 1					
Ile : 1	AAT:	GAT: 1	TAT:				
Met : 2	CAT: 2						
Tyr : 1	ATA:	GTA: 1					
Supres: 0	CTA:	TTA:					
Cys : 1	ACA:	GCA: 1					
Trp : 1	CCA: 1						
SelCys: 0	TCA:						

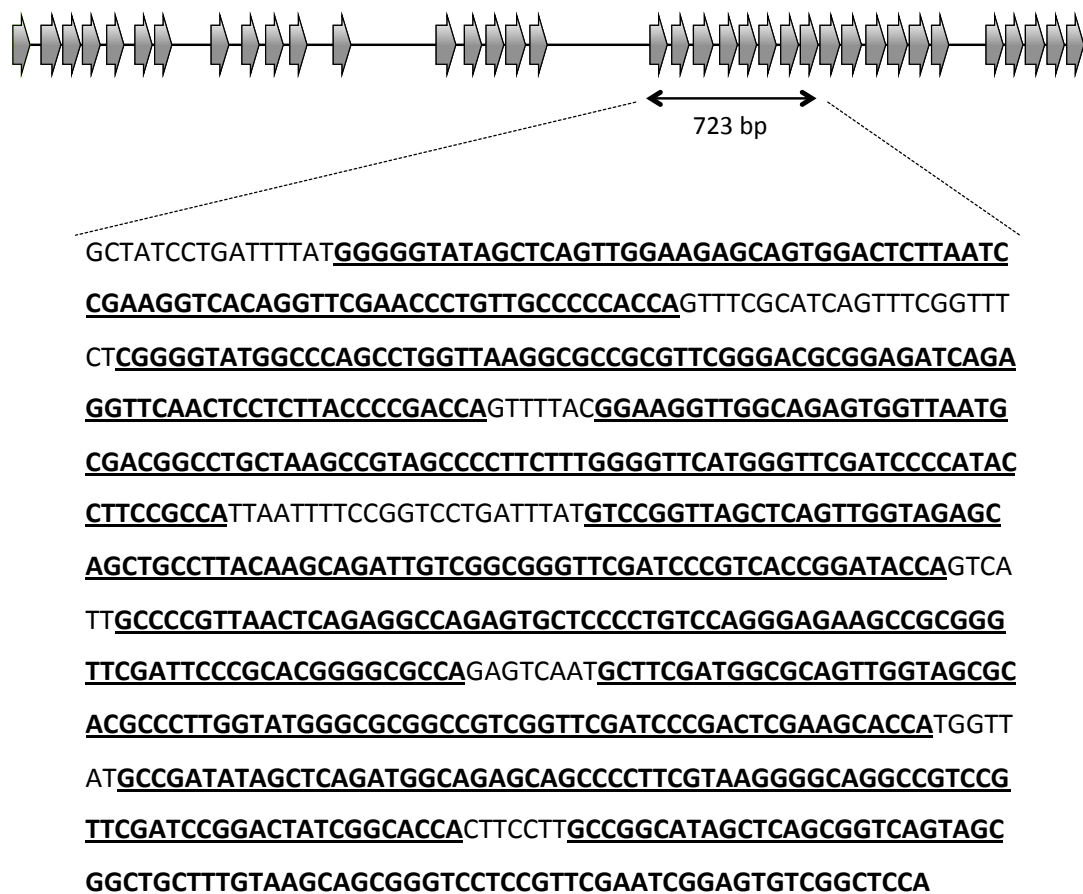


Fig. 4-3 Gene organization of tRNA-gene cluster II in pM7012 and sequence of a part of the gene cluster shown by arrow (723 bp). The letters in bold font with underline show sequences of tRNA-genes.

4.5 考察

pM7012 の全塩基配列を明らかにすることにより、第一章で部分配列の明らかにされていた *tfdA*、*tfdB* 及び *tfdC* 位遺伝子の全塩基配列が明らかになった。また 2,4-D 分解における下流の遺伝子である *tfdD*、*tfdE* 及び *tfdF* も近傍に存在することが示された。即ち、2,4-D の完全分解に必要な遺伝子全てが 1 つの遺伝子群として pM7012 上に存在することが明らかとなった。これまでに、RASC 株の 2,4-D 分解遺伝子は部分塩基配列しか明らかにされておらず (Baelum *et al.*, 2010; Cavalca *et al.*, 1999; Suwa *et al.*, 1996; Vallaeys *et al.*, 1999)、本研究で初めて、RASC サブグループの分解遺伝子群の遺伝子構造が示された。pM7012 に見出された 2,4-D 分解遺伝子群の全体の構造は、既知の 2,4-D 分解プラスミド pEST4011 及び pJP4 の保有する 2,4-D 分解遺伝子群の一部に相同性が高かった (Fig. 4-1)。よって、pM7012 の主要な分解遺伝子群は独自に構築されたのではなく、既に構築されていた遺伝子群を取り込んだ可能性が高いと考えられた。pM7012 の *tfdCEB* は重複し、2 つの *tfdCE* 配列は概ね同一であった。*tfdC* 遺伝子の重複は、JMP134 株の 2,4-D 分解プラスミド、pJP4 にも存在するが、コピー数を増やすことにより、*tfdB* の働きで生じる猛毒のクロロカテコールを速やかに分解する役割を担っていると考えられている (Trefault *et al.*, 2002)。pJP4 を含む InP1 グループのプラスミドは細胞あたりのコピー数が 5 個程度であるのに対し (Trefault *et al.*, 2002)、pM7012 のような大型のプラスミドのコピー数は 1 から 2 個程度で、2,4-D の分解において pM7012 が保有する複数の *tfdC* は、pJP4 以上に重要な意味を持つ可能性がある。

pM7012 の重複する *tfdCE* 配列が概ね同一であった一方、一塩基欠失の認められた Δ *tfdR*_{II} 及び *tfdB*_{II} は、*tfdR*_I 及び *tfdB*_I とは異なる配列を持っていた。特に Δ *tfdR*_{II} の塩基配列は、*tfdR*_I には 72% の相同性であったのに対し、pEST4002 の保有する *tfdR* には 91% の相同性を示し、pM7012 の *tfdR*_I が細胞内で重複したのではなく、EST4002 サブグループの遺伝子群から取り込まれた可能性が高いと考えられる。pM7012 の *tfdB*_{II} は、pM7012 の *tfdB*_I、pEST4011 の *tfdB* 及び pJP4 の *tfdB*_{II} に 78% 前後の相同性を示し、外部から取り込まれた可能性と、

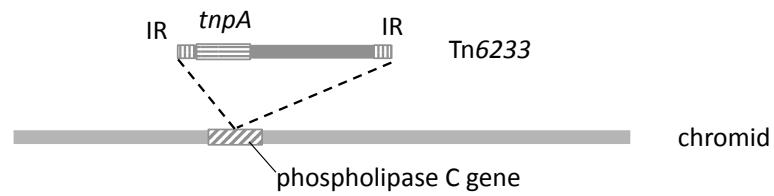
pM7012 の *tfdCEB* 配列が重複した後に、*tfdCE* ほどには必要性が高くなかったため、塩基の置換が進んだ可能性とが考えられた。即ち、pM7012 の 2,4-D 分解遺伝子群は、他の 2,4-D 分解遺伝子群と交雑して構築された可能性が示された。

pM7012 は既存の 2,4-D 分解遺伝子群を外部から獲得したと考えられる一方、2,4-D 分解遺伝子群の両側に高い頻度で見出される挿入配列 IS1071 が pM7012 の上には見出されなかった。そのため、pM7012 は既知の 2,4-D 分解プラスミドとは異なるメカニズムで、分解遺伝子を獲得したと考えられた。IS1071 は 2,4-D 分解遺伝子群のみならず、他の化合物の分解遺伝子群の近傍にも見出され、細菌の遺伝子獲得に大きな役割を担っていると考えられている (Sota *et al.*, 2006)。pM7012 の 2,4-D 分解遺伝子群はクロミド領域の近傍に存在し、クロミド領域との間には、挿入配列の残骸が複数、見出された。2,4-D 分解遺伝子群の獲得メカニズムの一つの可能性としては、なんらかの挿入配列によって *Burkholderia* 属菌のクロミドに挿入された 2,4-D 分解遺伝子群を、後述するクロミド領域の取り込みの際に、pM7012 の祖先プラスミドが共に取り込んだ可能性がある。もう一つの可能性としては、接合伝達性挿入因子 (integrative conjugative elements (ICEs)) の関わりが考えられた。2,4-D 分解遺伝子群のクロミド配列とは逆側には、CDS の検出されない領域がある。そこには、pM7012 上に多数存在するおよそ 200 bp の反復配列 pM7012_repeat_A が存在した。pM7012_repeat_A の一つは、pM7012 の *tfdB_{II}* 遺伝子のおよそ 10 kb 下流に、インテグラーゼと近接して存在していた。ICE である、塩化ビフェニル分解トランスポゾン Tn4371 (Toussaint *et al.*, 2003) やクロロ安息香酸分解ゲノミックアイランド ICE_{clc} (Ravatn *et al.*, 1998) はおよそ 200 bp の繰り返し配列を両末端に保有する。これらの ICE のインテグラーゼは、その繰り返し配列の近傍に存在する。よって、pM7012 の 2,4-D 分解遺伝子群の獲得に ICE が関与した可能性が考えられたが、pM7012 上には pM7012_repeat_A が多数存在し、ICE の原型を見極めるのは困難であった。また、pM7012 上には、その他の繰り返し配列、インテグラーゼ及びトランスポザナーゼの配列も多数見いだされ、過去にプラスミド DNA が大きく再編された結果と考えられる。2,4-D 分解遺伝子群もそのような遺伝子の再編の一部として取り込まれた可能性が高いが、そのメカニズムは明らかではない。

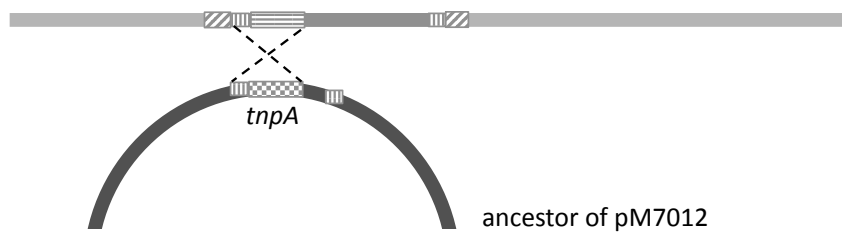
2,4-D 分解プラスミドとしては初めて、ヒ素耐性遺伝子群が Tn3 ファミリーのトランスポゾンとして検出され Tn6233 と命名した。Tn6233 はアフリカで、ヒ素濃度の非常に高い、硫と鉄鉱生物酸化処理タンクより分離されたヒ素耐性菌 *Leptospirillum ferriphilum* Fairview 株の保有するヒ素耐性トランスポゾン TnLfArs (Tuffin *et al.*, 2006) と非常に高い相同性を持つ。TnLfArs はヒ素耐性と伝達能を持つ事が実験により確認されており、塩基配列の相同性の高さ、及び逆方向反復配列の保存性の高さから Tn6233 もヒ素耐性能と伝達性を持つ可能性が高いと考えられた。細菌によるヒ素耐性にはいくつかの機構が存在し (Silver & Phung, 2005)、Tn6233 や TnLfArs の保有するヒ素耐性遺伝子群は、最も一般的なヒ素耐性機構を発現するための遺伝子群といえる。それにもかかわらず、この両者のトランスポゾンと同じ遺伝子構造のトランスポゾンは、DNA データベース上には見出されなかった。両菌株は、それぞれ、南アフリカと日本という地理的に離れた場所から分離され、さらに、*Nitrospirae* 門の *Leptospirillum* 属菌と *Proteobacteria* 門の *Burkholderia* 属菌という門レベルで異なる細菌を宿主とする。それぞれの微生物が別々に同じ遺伝子群を構築したとは考えにくく、ヒ素耐性トランスポゾンが、地理的、及び生物学的に伝播している一つの例が示されたが、トランスポゾン単独では異なる細菌に伝播することはできず、接合伝達性プラスミドや ICE が細菌間の伝達を媒介したと考えられる。

pM7012 上には *Burkholderia* 属菌のクロミドに相同な領域が見出されたが、この領域の由来は、pM7012 の祖先プラスミドが、過去に、*Burkholderia* 属菌のクロミドに挿入され、再び切り出される際に、クロミドの一部を取り込んだためと考えられた。pM7012 のクロミド領域の Tn6233 側の末端には、フォスホリパーゼ C 配列が Tn6233 によって分断される形で存在し、フォスホリパーゼ C の残りの配列は、Tn6233 の逆側には見出されなかった。また、トランスポゾンが挿入する際にその両側に形成される同方向反復配列が、Tn6233 の両側からは検出されなかった。即ち、Tn6233 は最初はクロミドに挿入され、pM7012 の祖先が、Tn6233 とクロミドの一部を共に取り込んだと考えられた。2,4-D 分解遺伝子群もクロミドと共に取り込まれた可能性がある。そのモデルの一例を Fig. 4-4 に示した。

I. Integration of Tn6233 into chromid



II. Integration of an ancestor of pM7012 into chromid at Tn6233



III. Excision and circularization of an ancestor of pM7012 with Tn6233 and a part of chromid

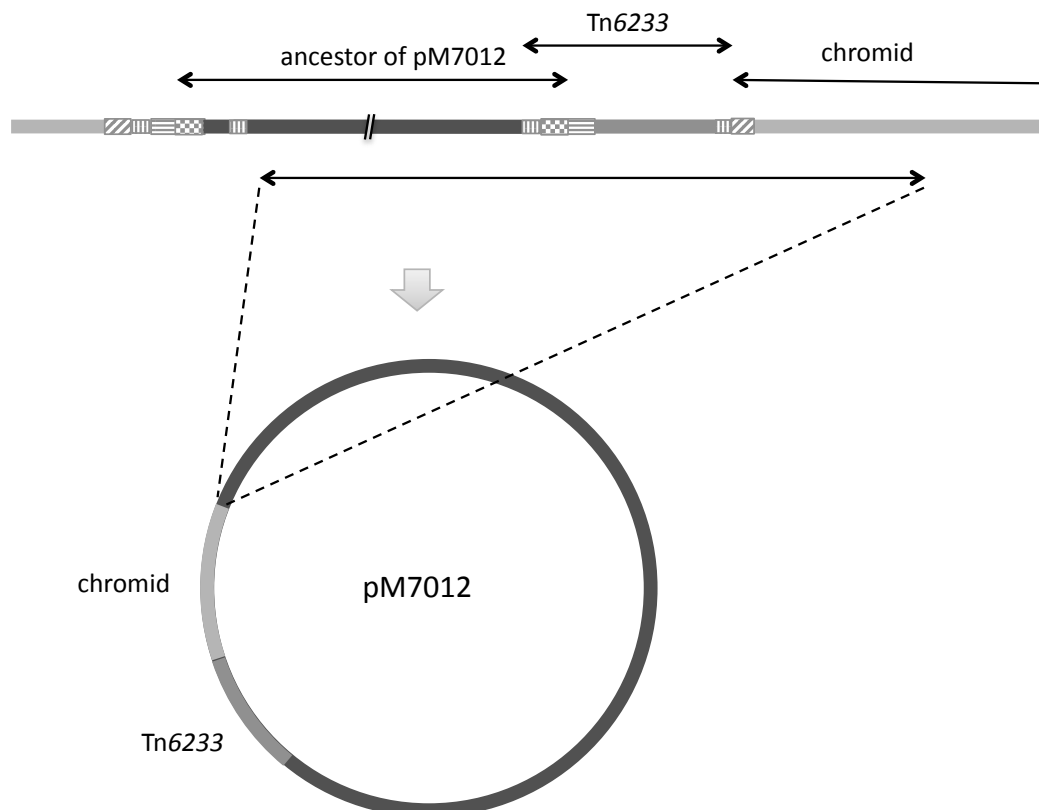


Fig. 4-4 Model for capturing arsenic-resistance transposon Tn6233 and a part of chromid on an ancestor of pM7012.

pM7012には39個のtRNA遺伝子配列が見出されたが、これは、ゲノムの小さな細菌が保有するtRNA遺伝子数に匹敵する。特にpM7012上に見出されたtRNA gene cluster IIは非常に狭い範囲に36個のtRNAを保有し、20種のアミノ酸を全て網羅する。さらに、一つのアミノ酸に対して複数のtRNAが存在する場合でもコドンの重複が見当たらない。このようなtRNAの最小セットは、マイコプラズマやリケッチア等、寄生性でゲノムの小さい微生物に見出されるが[Genomic tRNA-Database (Chan & Lowe, 2009)]、そのような生物でも、tRNA遺伝子配列が何カ所かに分散して存在する。DNAデータベースに登録されている配列の中に、pM7012のtRNA gene cluster IIに相同性の高い配列は認められず、現時点ではtRNA gene cluster IIの由来を推測できない。少なくとも*Burkholderia*属菌やその近縁種とは異なる、寄生性の未知の微生物に由来すると考えられた。pM7012の宿主である*Burkholderia* sp. M701株のゲノム配列は明らかにされていないが、rRNAのデータベースrrnDB (Lee *et al.*, 2009)によると、これまでに解析されている24株の*Burkholderia*属菌は平均、62個のtRNAを保有する。しかし、NCBIのgenomeのデータベースにおいて、*Burkholderia*属菌のうち代表的な菌株を調べた限りでは、tRNA遺伝子配列は、染色体、あるいはクロミドに分散して存在し、プラスミド上には見当たらない。tRNA遺伝子はこれまでも大型プラスミド上に見出されているが (Smillie *et al.*, 2010)、pM7012のように全アミノ酸を全て網羅するtRNAを保有するプラスミドは他には見当たらない。最も類似している例として、*Methylobium petroleiphilum* PM1株 (Kane *et al.*, 2007) の保有するプラスミドRPME01 (599 kb, 以前はpPM1) が19個のアミノ酸に対応する27個のtRNAをクラスターとして保有することが見出された。多数のtRNA遺伝子配列をコドンの重複なく、クラスターとして保有する点でpM7012と類似している。ただし、pM7012とRPME01の保有するtRNA遺伝子クラスターの間には、相同性は認められず、大型プラスミドの保有するtRNAクラスターに多様性のあることが示唆された。

本章においてここまで述べてきたように、pM7012 は多様な遺伝子群を外部から取り込み、再編を繰り返して現在の配列となっていることが示唆された。プラスミド DNA の可塑性の高いことはこれまでも報告されているが、pM7012 もその例外ではないと考えられたと考えられた。特に 2,4-D 分解遺伝子群とヒ素耐性遺伝子群の取り込みは、宿主に新しい能力を付

与し、水田環境における生残を有利にしたことが予想された。ヒ素は 2,4-D が多量投与された時代に、有機ヒ素剤（抗菌剤）として農耕地に大量投入された（Fig. 4-5）。また、ヒ素は還元状態で毒性の高まることが報告されている（Takahashi *et al.*, 2004）。これらのことが、水田土壌で IncP-1 プラスミドより pM7012 様プラスミドが検出されやすいことの根拠かもしれない。

プラスミドがモザイク構造をしていることは、これまでも数々報告されているが（Thomas, 2004）、pM7012 もその例外ではなかった。プラスミドの分配複製領域や接合伝達遺伝子群といったプラスミドの骨格的配列以外に、アクセサリ遺伝子として、2,4-D 分解遺伝子群をはじめ、ヒ素耐性遺伝子群、クロミドに相同な領域、tRNA 遺伝子群等が見出された。また、機能未知の ORF が連続して存在する領域も、pM7012 の祖先プラスミドに挿入された可能性が高い。多数の繰り返し配列、複数のインテグラーゼ及びトランスポザーゼ遺伝子が見出され、過去に様々なイベントのあったことが推測された。微生物のゲノムは変化し続けるものであり、その中でもプラスミドは染色体以上に、その性質が強いと考えられる。染色体には、生育に必須の配列が多数存在し、そこに挿入配列が入った場合は、その微生物は死滅するのに対し、プラスミドは、プラスミドの維持複製に関わる遺伝子が損傷を受けない限り、あるいは宿主に対して害を及ぼすような遺伝子配列が挿入されない限り、外部の DNA 断片を取り込むことができる。プラスミドは”遺伝子プール”と称されることがある（Norman *et al.*, 2009）。pM7012 のような大型プラスミドの”遺伝子プール”としての役割は大きく、新たな分解遺伝子群を産み出す原動力になっていると考えられた。

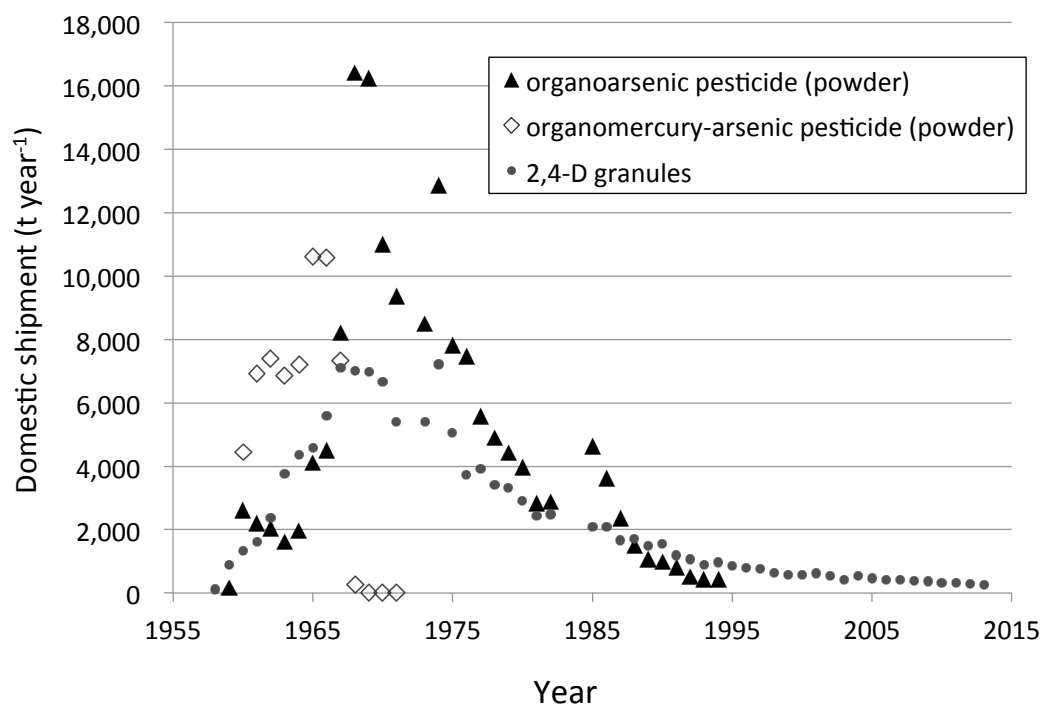


Fig. 4-5 Domestic shipment of organoarsenic pesticides and 2,4-D granules in Japan. Data were collected from pesticide handbooks named “Nouyaku Yoran”.

第五章 pM7012 の属するプラスミドグループの解析

5.1 要約

pM7012 の全体の配列及び構造は、韓国で分離されたフェニトロチオン分解菌 *Burkholderia* sp. YI23 株の保有するプラスミド byi_2p (356 kb) 、及び米国で分離されたトリクロエチレン分解菌 *Burkholderia vietnamiensis* G4 株の保有するプラスミド pBVIE01 (397 kb) に最も相同性が高かった。これら 3 つのプラスミドは、プラスミド複製分配遺伝子群と接合伝達遺伝子群もほぼ同じ構造を持っており、同じグループのプラスミドと考えられた。接合伝達遺伝子群の解析から、pM7012 を含むプラスミドグループは、接合伝達に必須と考えられているリラクサーゼ遺伝子 (*traI*) を共通して持たない事が明らかになると共に、既知の伝達性プラスミドグループとは区別される未分類の接合伝達性因子の可能性が示唆された。

5.2 緒言

伝達性プラスミドは、ヒトの病原菌の抗生物質耐性獲得のメカニズムの研究の中から、抗生物質耐性遺伝子を伝達するDNA分子として研究が始まった (Summers, 1996)。他に赤痢菌 (Dorman, 2008) や、炭疽菌 (Fouet & Moya, 2008) といった病原菌の毒素遺伝子もプラスミド上に存在していたことから、医療現場においても盛んに研究されてきた。伝達性プラスミドにも様々な種類があるが、最初の分類は、プラスミドの維持複製の機構が同じプラスミドは一つの細胞内に安定して維持されないという性質 (不和合性) を利用して行われた。培養法に基づき、一つの細胞に2つのプラスミドが安定して共存できれば、その2つは異なるグループ、どちらかが脱落する場合は同じグループとされた。研究グループによってプラスミドグループの命名法が異なり、主に腸内細菌を扱う研究グループではIncF, IncP, IncQといった分類が用いられ、*Pseudomonas aeruginosa* の抗生物質耐性プラスミドを対象とする研

究グループでは、IncP-1, IncP-2, IncP-3といった分類が用いられた (Taylor *et al.*, 2004)。

IncPグループとIncP-1グループは同じプラスミドグループを指し、これまでによく解析されている2,4-D分解プラスミドが属する。分子生物学の発展と共に、それぞれのプラスミドグループに特異的な配列を検出する方法が提案され、特異プローブを用いたサザンハイブリダイゼーション法や、特異プライマーを用いたPCR法が開発された (Carattoli *et al.*, 2005; Couturier *et al.*, 1988; Gotz *et al.*, 1996)。近年、細菌のゲノム解析が進んだ結果、より多様なプラスミドが多数検出され、培養法を基礎とした分類には困難が生じるようになった。

Francia *et al.* (2004) は、rDNA配列によって細菌を分類するように、伝達性プラスミドも保存性の高い配列によって分類することを提案し、その配列として接合伝達遺伝子の一つであるリラクサーゼ (relaxase) 遺伝子を選ばれた。リラクサーゼはプラスミドの二本鎖DNAの一方にニックを入れ、二本鎖を開くヘリカーゼ様の働きをすると共に、切断したDNA鎖の5'側に結合して、伝達先の細胞へDNA分子を誘導する役割を持つ (de la Cruz *et al.*, 2010)。

リラクサーゼ遺伝子は自己伝達性プラスミドのみならず、自己伝達能のない伝達性プラスミドや伝達性トランスポゾンにも存在し、接合伝達因子に必須の遺伝子と位置づけられている。リラクサーゼ遺伝子配列を用いた分類によると、接合伝達因子は6個のグループに分けられ、2,4-D分解プラスミドの多くが属するIncP-1グループはMOBpグループに含まれる (Garcillan-Barcia *et al.*, 2009)。また例えば、IncP-9グループのトルエン分解プラスミド pWW0はMOB_F、Inc-7グループのpCAR1はMOB_Hグループに分類される。

本研究では、pM7012 が属する接合伝達因子グループを明らかにするために、プラスミド全体の配列を既存のプラスミド配列と比較すると共に、プラスミドの骨格的配列と考えられるプラスミド複製分配遺伝子群及び接合伝達遺伝子群について、比較解析を行った。

5.3 方法

pM7012の全体、あるいは一部の配列に相同性の高い配列の検索を、NCBIのデータベースと検索機能を使用して実施した。複数のDNA分子が共通して保有するCDSの位置と相同性を

示すリンクマップの作成、及び遺伝子の矢印図の作成は遺伝子解析ソフトウェア、*in silico* Molecular Cloning (インシリコバイオロジー)を用いて実施した。系統樹は、MEGA5を用いて配列のアライメントを行った後、最尤法で距離計算を行い、得られた結果から作成した。

5.4 結果

(1) プラスミド全体の比較

Burkholderia sp. M701 株の保有するプラスミド pM7012 全体の塩基配列を既知のプラスミドと比較したところ、フェニトロチオン分解菌 *Burkholderia* sp. YI23 株の保有するプラスミド byi_2p (356 kb) (Lim *et al.*, 2012) 及び、トリクロロエチレン分解菌の *Burkholderia* sp. G4 株 (Nelson *et al.*, 1986) の保有するプラスミド pBVIE01 (397 kb) (Accession number: CP000617) に最も高い相同性を示した。相同な CDS を線で結び、アミノ酸レベルの相同性に応じてその線に色をつけた図を Fig. 5-1 に示す。また、Fig. 3-4 の pM7012 の全体像に、byi_2p と pBVIE01 に相同な領域を青の破線で示した。byi_2p と pBVIE01 の間は、対応する CDS の相同性が 90%以上であるのに対し、pM7012 とそれぞれのプラスミドでは、対応する CDS の相同性は 50%前後であった。ただし接合伝達遺伝子領域及びプラスミド維持複製領域は 60%前後と、他の領域よりも高い相同性を示した。byi_2p と pBVIE01 の配列情報はゲノム解析の一部として取得されており、プラスミドの特性は明らかにされていない。一方、プラスミドとしてよく研究されている *Cupriavidus metallidurans* CH34 株の保有する重金属耐性プラスミド pMOL30 (233 kb) (Monchy *et al.*, 2007) と pM7012 の間にも、程度は低いものの一定の相同性が認められた。



(2) 接合伝達遺伝子群の比較

接合伝達には、タイプ IV 分泌システム (T4SS) 遺伝子群、タイプ IV カップリングプロテイン (T4CP) 遺伝子及びリラクサーゼ遺伝子 (*traI*) が必要とされる (Lawley *et al.*, 2003)。pM7012 には、リラクサーゼ遺伝子に相同な配列は見出されなかったが、F プラスミド様の一連の T4SS 遺伝子群及び T4CP 遺伝子が見出された (Fig. 5-2)。pM7012 の T4CP 配列と相同な配列を持つ既知の遺伝子群の構造を比較したところ (Fig. 5-2)、プラスミド byi_2p 及び pBVIE01 の遺伝子群とは高い相同性が示された。次いで相同性が高い遺伝子群は、メチル tert-ブチルエーテル分解菌 *Methylibium petroleiphilum* PM1 株 (Kane *et al.*, 2007) の保有するプラスミド RPME01 (以前は pPM1, 599 kb)、及び病院の患者より分離された抗生物質耐性菌 *P. purida* H8234 株 (Molina *et al.*, 2013) の染色体に見出された。それ以外に、メチルベンゼン分解菌 *Azoarcus* sp. EbN1 株 (Rabus *et al.*, 2005) の plasmid 1 (207 kb) 及び罹病稲の葉鞘より分離された *Burkholderia gladioli* BSR3 株 (Seo *et al.*, 2011) のプラスミド bgla_3p (128 kb) が該当した。これら相同な遺伝子群を持つプラスミドや染色体は、少なくとも接合伝達遺伝子群の近傍にリラクサーゼ遺伝子を持たないという点でも共通していた。T4CP 遺伝子は大型で配列の保存性が高いため、プラスミドの分類の指標の一つとして利用できることが報告されている (Smillie *et al.*, 2010)。そこで、pM7012、既知の代表的な接合伝達性プラスミド (Garcillan-Barcia *et al.*, 2009)、及び pM7012 に相同な配列を持つプラスミド等の T4CP 遺伝子の系統解析を行った (Fig. 5-3)。その結果、pM7012 の配列を含むクラスターは、リラクサーゼ遺伝子配列に基づいて分類された既知の接合伝達因子グループ (MOB group) のクラスターとは区別された。即ち、pM7012 を含むプラスミドグループは、これまでに報告例のない接合伝達因子の可能性が示された。

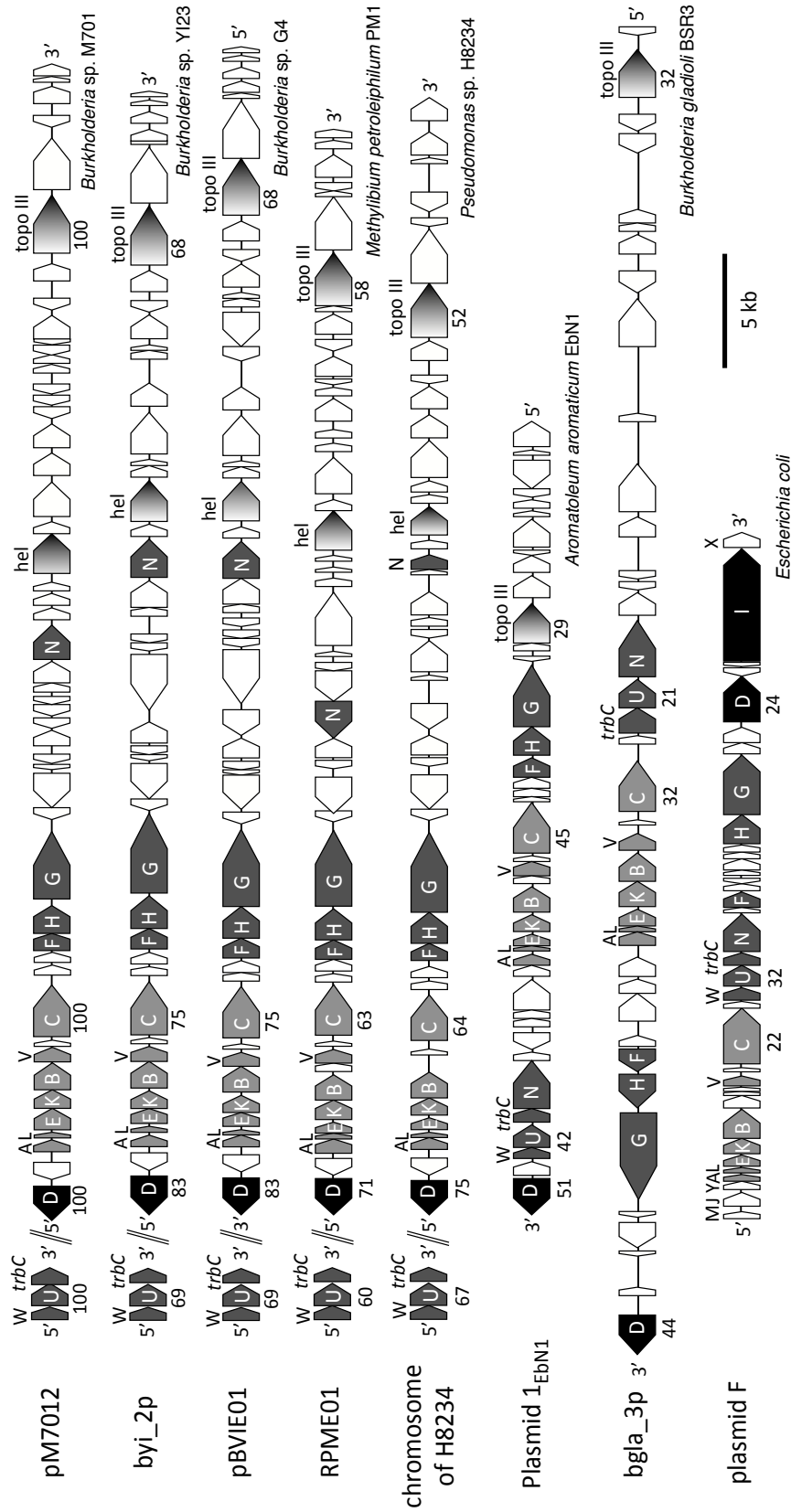


Fig. 5-2 Gene organization for conjugative transfer genes of pM7012 and other related plasmids. Light gray arrows represent genes encoding core T4SS proteins, dark gray arrows represent genes encoding proteins for pilus assembly and mating pair stabilization, black arrows labeled "D" and "T" represent *traD* (T4CP) gene, originally annotated as *traG* in plasmids, except the F plasmid and pM7012) and *traI*, respectively. Graduated arrows labeled "hel" and "topo III" represent putative genes for helicase and topoisomerase III. White arrows represent other genes. Capital letters represent *tra* genes, for example, "G" represents *traG*. Numbers below arrows indicating *traU*, *traD*, *traC*, and topo III represent percent amino acid sequence identity between the indicated gene and the corresponding sequences of pM7012. Directions of the gene clusters are indicated by 5' and 3'. Double slash indicates non-contiguous regions omitted in this figure. Accession numbers: plasmid byi_2p, CP003091; pBVIE01, NC_009230; RPME01, NC_008826; H8234, CP005976; plasmid 1_{EbN1}, NC_006823; bgla_3p, NC_015378; plasmid F, NC_002483.

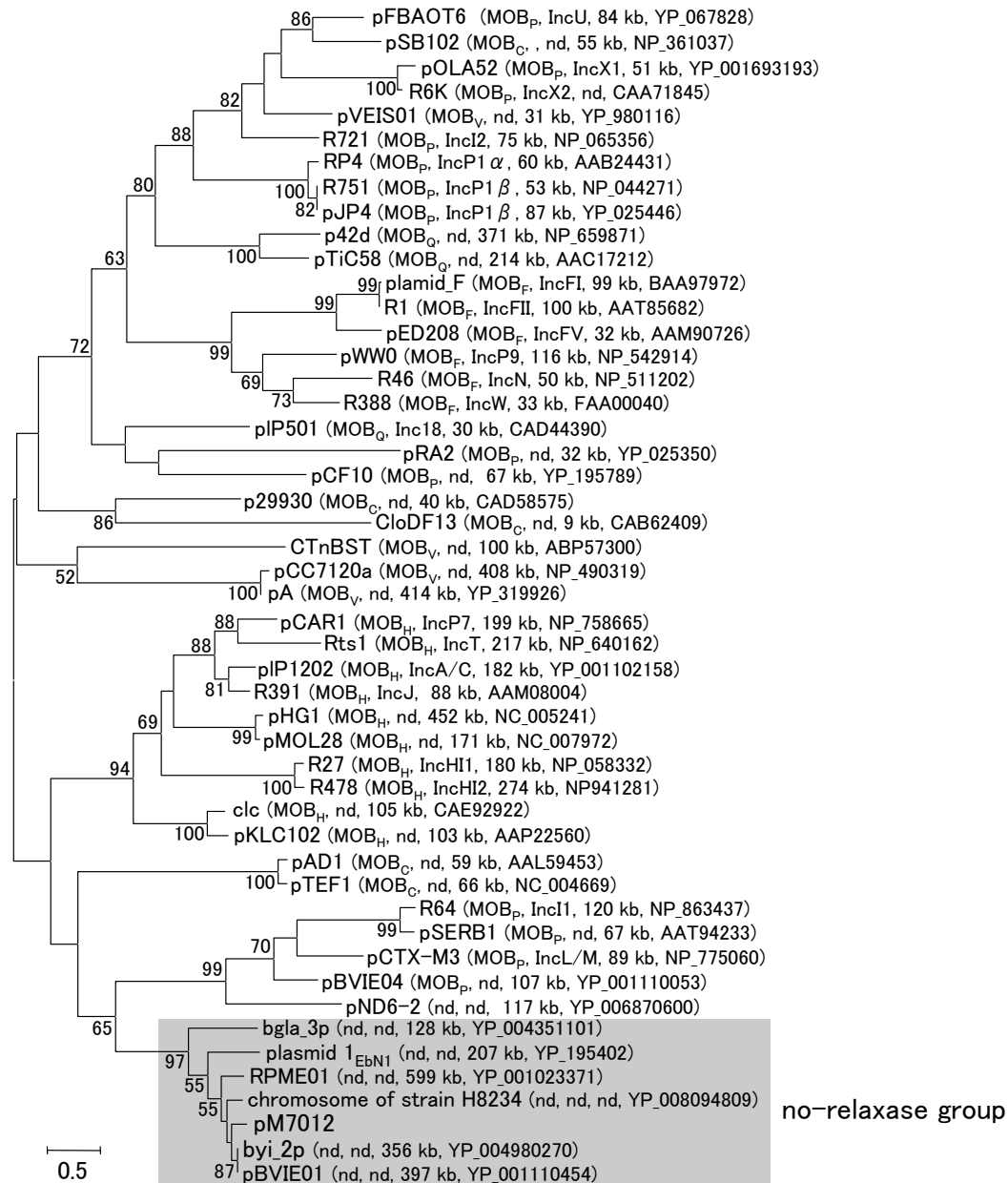


Fig. 5-3 Phylogenetic tree of T4CP amino acid sequences from pM7012, the related plasmids, and plasmids belonging to the MOB families. Related sequences from chromosomes and ICEs were added. Parenthesis after the plasmid name represent MOB group, incompatible group, size, and accession number of T4CP. "nd " indicates no data. The tree was constructed by maximum-likelihood analysis using Mega 5 software. Bootstrap values (calculated from 1,000 replicates) of more than 50 are shown.

(2) プラスミドの複製開始領域の比較

多くの大型プラスミドの維持複製領域は、プラスミド複製領域とプラスミド分配領域より構成される (Hayes & Barilla, 2006)。pM7012 のプラスミド分配領域はプラスミド・セントロメア配列、*parS*、Walker タイプ ATPase 遺伝子、*parA*、及びプラスミド・セントロメア結合タンパク質遺伝子、*parB* より構成されていた (Fig. 5-4)。プラスミド複製遺伝子、*repA* はプラスミド分配領域のおよそ 7 kb 下流に存在した。これらの遺伝子群を、既知のプラスミドと比較したところ、全体の構成が最も似ている *byi_2p* 及び pBVIE01 と、ほぼ同じであった (Fig. 5-4)。また、プラスミド上の遺伝子の並び順の相同性が一定程度認められた pMOL30 においても相同性が認められた。他に、相同な維持複製遺伝子群を持つプラスミドとして、ナフタレン分解菌 *Pseudomonas putida* ND6 株のプラスミド pND6-2 (Li *et al.*, 2013)、また *P. putida* H8234 株の染色体上にも類似の遺伝子群が見出された。

既知のプラスミドの保有する *parA* 遺伝子のアミノ酸配列に基づいて系統樹を作成したところ (Fig. 5-5)、プラスミド、pM7012、*byi_2p*、pBVIE01、pMOL30、pND6-2 及び H8234 株の染色体に由来する配列は、他のプラスミドとは区別される一つのクラスターを形成することが明らかとなった。その一方で、それらの配列は、IncP-7 プラスミドグループに分類されている pCAR1 及び pND6-1 の保有する ATPase と相同性の高いことも明らかとなった。

そこで IncP-7 プラスミドグループのプラスミド、pCAR1 及び pND6-1 におけるプラスミド維持複製遺伝子群の遺伝子の構成を図に書き出して比較したところ (Fig. 5-4)、*parS* が *parA* と *parB* の間にある点、*repA* が *parA* 及び *parB* の上流に逆向きで存在する点で、プラスミド pM7012 を含むプラスミドグループの遺伝子群とは異なることが明らかとなった。また、*parS* に含まれる逆方向反復配列を比較したところ (Table 5-1)、pCAR1 及び pND6-1 の配列はプラスミド pM7012、*byi_2p*、pBVIE01、pMOL30、pND6-2 及び H8234 株の染色体の配列とは明確に区別されることが示された。

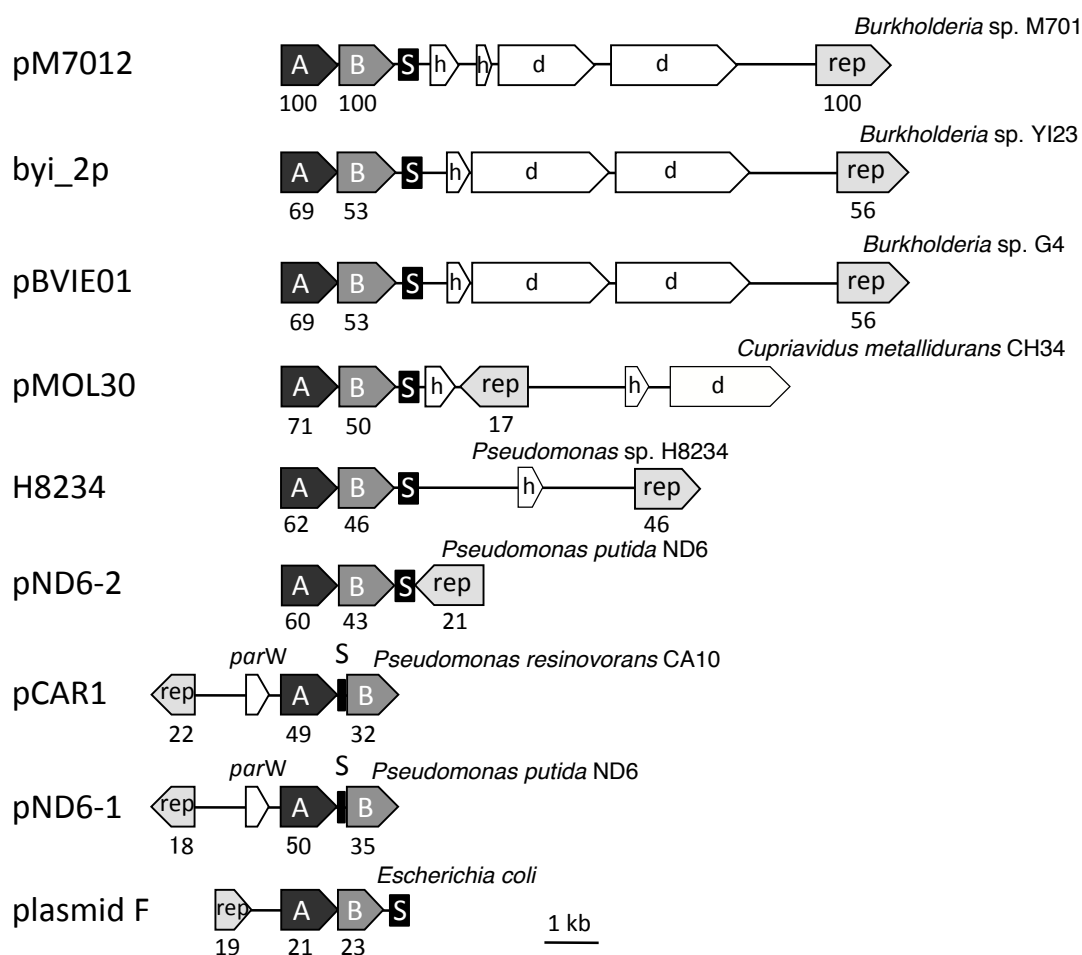


Fig. 5-4 Gene organization in plasmid maintenance regions of pM7012, other related plasmids and a chromosome from strain H8234. Dark gray arrows labeled “A” represent *parA/sopA* genes, gray arrows labeled “B” represent *parB/sopB* genes, light gray arrows labeled “rep” represent genes for replication protein, RepA, and black squares labeled “S” represent *parS/sopC* regions. Labels “h” and “d” on the arrows indicate genes for hypothetical protein and diguanylate cyclase, respectively. Numbers under the arrows represent amino acid sequence identities (%) between each gene and the corresponding gene in pM7012. Accession numbers: plasmid byi_2p, CP003091; pBVIE01, NC_009230; pMOL30, NC_007971; H8234, CP005976; pND6-2, NC_018746; pCAR1, NC_004444; pND6-1, NC_005244; plasmid F, NC_002483.

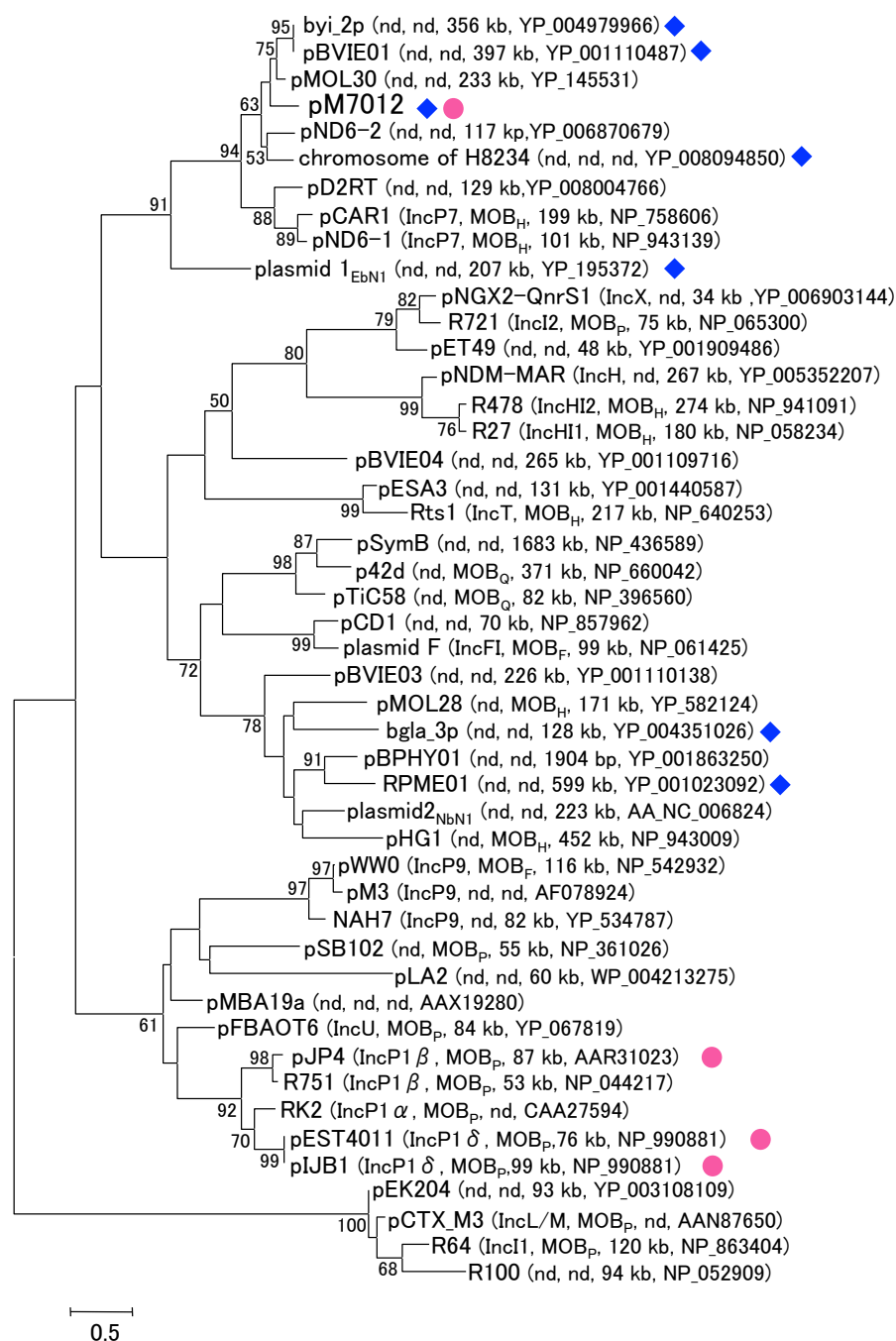


Fig. 5-5 Phylogenetic tree of amino acid sequences of plasmid-partitioning ATPase.

Parenteses after plasmid name represent incompatibility group, MOB group, size of the plasmid, and accession number of the sequence. Letters “nd” represent no data. The tree was constructed using maximum-likelihood analysis with software, Mega 5. Bootstrap values (calculated 1,000 times) higher than 50 were shown. Blue lozenge shows the replicon with the gene cluster for T4CP-T4SS related to those of pM7012. Pink circle shows the replicon with 2,4-D degradation gene cluster.

Table 5-1 Palindrome sequences of centromere region *parS/ sopS* of pM7012 and related plasmids.

Plasmid or chromosome	Palindrome sequence ¹⁾	Sequence length (bp)	Repeat number ²⁾
pM7012	<u>TTTTCACSGTGAAAA</u>	15	11
byi_2p	<u>TTTTCACSGTGAAAA</u>	15	9
pBVIE01	<u>TTTTCACSGTGAAAA</u>	15	9
pMOL30	<u>TTTCACSGTGAAA</u>	13	6
pND6-2	<u>TTTTCACSGTGAAAA</u>	15	2
chromosome of H8234	<u>TTTTCACWGTGAAAA</u>	15	16
pCAR1	<u>TGGTGCTCGGAGCACCA</u>	17	4
pND6-1	<u>TGGTGCTCGGAGCACCA</u>	17	3
F plasmid	<u>TGGGACCACGGTCCCA</u>	16	12

1) S = C or G, W=A or T, underbars show inverted repeat.

2) The number of sequences those have more than 80% identities to the parindrome sequence shown in this table.

(3) pM7012 と相同な配列を持つ染色体及び部分的に相同なプラスミドの解析

H8234 株はプラスミドを保有しないことが報告されているが (Molina *et al.*, 2013)、ここまでの解析で、染色体上に pM7012 のプラスミド維持複製領域と接合伝達遺伝子群の双方に相同な配列を持っていることが明らかになった。pM7012 に相同な配列が、H8234 株の染色体上にどのように配置されているのかを明らかにするために、pM7012 と H8234 株との間の対応する CDS の相同性を色のついた線で示すリンクマップを作成した (Fig. 5-6)。その結果、接合伝達遺伝子群からプラスミド維持複製遺伝子群にかけての遺伝子の並び順は非常に相同性の高いことが明らかとなり、H8234 株の染色体に pM7012 と類似の配列がまとまって挿入されていることが示された。

一方、プラスミド RPME01 (以前は pPM1, 599 kb) はプラスミドの維持複製遺伝子群に含まれる *parA* 遺伝子の配列は、pM7012 とは全く異なる配列であったが (Fig. 5-5)、接合伝達遺伝子群は非常に相同であった (Figs. 5-2, 5-3)。そこで、H8234 株の場合と同様に、pM7012 との遺伝子の配置を、リンクマップを作成して比較したところ (Fig. 5-6)、接合伝達遺伝子群を含むプラスミドのおよそ半分のみ、pM7012 と非常に相同であることが分かった。即ち、RPME01 (599 kb) は pM7012 を含むプラスミドグループのプラスミドと、pM7012 とは異なるプラスミドグループに属するプラスミドの融合プラスミドである可能性が示された。

5.5 考察

pM7012は、既知のプラスミドの中では、*Burkholderia*属菌の保有するプラスミドbyi_2p及びpBVIE01と最も相同であった。しかし、どちらのプラスミドもゲノム配列解析の中で見出されたプラスミドで、伝達性等、プラスミドの性質は明らかにされていない。一方、pM7012と弱い相同性を示した重金属耐性プラスミドpMOL30はプラスミドとしてよく研究されている (Mergeay *et al.*, 2009; Monchy *et al.*, 2007)。このプラスミドは、接合伝達遺伝子群の大半を欠失し、伝達能を失っているが、pBVIE01と一定の相同性を持つ事が報告されている。本研究において、プラスミドの維持複製領域の解析や接合伝達遺伝子群を解析した結果、これら4つのプラスミドは、同じプラスミドグループに属すると考えられた。共通のプラスミドを祖先に持ち、別々に外部遺伝子を獲得した可能性が高い。中でも、byi_2pとpBVIE01は相同性が非常に高く、異なるプラスミドに分岐したのは、より最近の事象と考えられた。

伝達性プラスミドとしてのpM7012の位置づけを明らかにするため、接合伝達遺伝子群の解析を行った結果、pM7012はこれまでには報告例のない、接合伝達因子グループに属する可能性が示された。pM7012は、一連の接合伝達に必要な遺伝子を保有するにもかかわらず、リラクサーゼ遺伝子に相同な配列は見出す事ができなかった。類似の接合伝達遺伝子群を持つプラスミド、byi_2p及びpBVIE01等にもリラクサーゼ遺伝子ホモログが見当たらず (Fig. 5-2 (Smillie *et al.*, 2010))、pM7012のみがリラクサーゼ遺伝子を偶発的に喪失したとは考えにくかった。接合伝達遺伝子群の一部を構成するタイプIV分泌システム (T4SS) は核酸の接合伝達のみならず、毒素の排出やタンパク質の排出系にも見出されるため、T4SSを保有してもリラクサーゼ遺伝子を持たないプラスミドは、非伝達因子に分類されてきた

(Garcillan-Barcia *et al.*, 2009)。pM7012に相同な接合伝達遺伝子群を持つプラスミドは伝達性の試験が行われておらず、伝達性の有無は明らかではない。しかし、相同な接合伝達遺伝子群が属種を超えて保有されていることは、接合伝達遺伝子群自身が過去に伝播したことを示していると考えられる。またpM7012については第一章で述べた通り、ほぼ同一の分解遺伝子配列を保有する同じ大きさのプラスミドが属種の異なる細菌に存在することが明らか

になっており、伝達性を持つ可能性が強く示されている。pM7012が過去に伝達したと仮定すると、接合伝達遺伝子群にリラクサーゼが存在しないことについて、3つの可能性が考えられた。一つ目として、リラクサーゼ遺伝子が不安定で、M701株が宿主となった時、あるいは研究室で継代した時に脱落してしまった可能性が挙げられる。二つ目として、リラクサーゼ遺伝子を持つ別のプラスミドがpM7012様のプラスミドと細胞内共存することにより、pM7012様のプラスミドが伝達した可能性が挙げられる。これまでに、接合伝達遺伝子を持たないプラスミドが、接合伝達遺伝子を持つプラスミドと共存することで伝達された例が報告されている (Li *et al.*, 2013)。3つ目として、pM7012様のプラスミドがリラクサーゼを用いた接合伝達とは異なるメカニズムで伝達した可能性が挙げられる。pM7012様のプラスミドの接合伝達遺伝子群にはトポイソメラーゼIII遺伝子とヘリカーゼ遺伝子が概ね全てのプラスミドに見出された。トポイソメラーゼIIIはトポイソメラーゼグループIAに分類される。プラスミドRP4やFプラスミドのリラクサーゼはトポイソメラーゼグループIA様の活性、即ち、ssDNAを開裂し、開裂部位のDNAの5'末端に自身のチロシン残基で結合することが報告されている (Bugreev & Nevinsky, 2009; de la Cruz *et al.*, 2010; Pansegrau *et al.*, 1993)。また、リラクサーゼにはヘリカーゼドメインの存在することも報告されている (de la Cruz *et al.*, 2010)。即ち、M7012様のプラスミドの接合伝達に、リラクサーゼに代わってトポイソメラーゼIIIやヘリカーゼが関わった可能性が考えられるが、これを明らかにするためにはさらなる実験が必要とされる。

pM7012 を含むプラスミドグループは、プラスミド維持複製領域の解析からも既知の伝達性プラスミドとは区別されることが示された。既知の伝達性プラスミドの中で、pM7012と最も相同性の高いプラスミド維持複製領域を保有するのは IncP-7 グループのプラスミドであったが、このグループのプラスミドとは異なることが示されたためである。その根拠として、遺伝子の並び順と *parS* 配列の相違の他に、*Pseudomonas putida* ND6 株がそれぞれのプラスミドグループに属する pND6-1 と pND6-2 を同時に保有する (Li *et al.*, 2012) ことが挙げられる。両プラスミドグループ間には不和合性がなく、異なるプラスミドグループであることを意味していると考えられるためである。

本章の解析において、pM7012 の維持複製遺伝子群と接合伝達遺伝子群に相同な配列が、*Pseudomonas* sp. H8234 株の染色体上に見出され、pM7012 グループのプラスミドの配列が染色体に挿入された形態をとっていることが分かった。このことは、pM7012 がクロミド配列の一部を獲得する際の機構として推測したように、プラスミドが染色体に挿入された形態が、実際に存在することが示されたと考えられる。また、pM7012 グループのプラスミドの宿主範囲が、 β -プロテオバクテリアとは異なる γ -プロテオバクテリアにまで広がる可能性が示された。さらに、H8234 株が、他の pM7012 グループのプラスミドを持つ環境微生物とは異なり、病院内の患者から分離された抗生物質耐性菌であることから、pM7012 グループのプラスミドが、医療現場においても抗生物質耐性遺伝子や病原遺伝子の伝播等を引き起こしている可能性も考えられる。

プラスミドは、染色体との間だけでなく、異なるプラスミド分子との間でも、挿入、離脱、相同組換え等に基づく DNA 断片のやりとりを行い、モザイク状の構造を持つことが知られる。このモザイク構造は、アクセサリ遺伝子の取り込みだけでなく、プラスミドの骨格配列の構築の時点で生じていると考えられている (Thomas, 2000)。実際、プラスミド維持複製領域を複数保有するプラスミドが報告されている (Osborn *et al.*, 2000)。本章の解析においても、プラスミド RPME01 は、接合伝達遺伝子群の相同性が pM7012 と高い一方、プラスミド維持複製領域は別のグループのプラスミドと相同性が高く、2 種類のプラスミドが融合して形成された可能性が示された。また pM7012 グループのプラスミドも維持複製領域が IncP-9 プラスミドに相同性が高かったが、接合伝達遺伝子群は IncP-9 プラスミドとは大きく異なった。ただし、pM7012 グループのプラスミドは、属種の異なる複数の細菌から見出され、現時点では、安定したプラスミドとして環境中に広まっていると考えられる。一方、RPME01 と同じ組み合わせのプラスミドの維持複製領域と接合伝達遺伝子群を持つプラスミドは、現時点の DNA データベースには見出されない。

第六章 pM7012 及び類縁の 2,4-D 分解プラスミドの伝達性の調査

6.1 要約

pM7012 の伝達性を検出するため、接合伝達実験を実施したが、接合伝達株を検出することはできなかった。そこで、国内の水田土壌から分離された pM7012 と類似のプラスミドを保有する 7 株について、PFGE でプラスミドを分離し、第一章で解析した 2,4-D 分解遺伝子配列に加えて、接合伝達に関わる遺伝子、プラスミドの分配に関わる遺伝子、及びヒ素耐性遺伝子の部分塩基配列をプローブとしたサザンハイブリダイゼーションを実施した。その結果、7 株全てが概ね pM7012 と同じ大きさのプラスミド上に調査した 4 配列を保有することが明らかとなった。また、それぞれの遺伝子の部分塩基配列は、pM7012 の配列と 98%以上相同であった。アメリカで分離された 2,4-D 分解菌 *B. tropica* RASC 株についても同様に調べたところ、およそ 900 kb のプラスミド上に同じ 4 配列を保有し、これらの配列は pM7012 の配列に 97%以上相同であった。即ち、pM7012 様のプラスミドが少なくとも過去には異なる細菌間に伝播した可能性と、国を越えて pM7012 様のプラスミドが伝播している可能性が示された。

6.2 緒言

プラスミドは、遺伝子伝達因子として発見されたことから、伝達性の研究はプラスミドの発見当時から行われている。プラスミドの伝達性は寒天平板の上で、プラスミド供与株とプラスミドを持たないプラスミド受容株を混合培養し、選択培地でプラスミドを受け取った株（接合伝達株）を検出する方法が一般的で、接合伝達頻度は、プラスミド受容株当たりの接合伝達株数で算出することが多い。宿主範囲は、IncP-1 プラスミドに代表されるように広宿主域のものから、例えば IncF プラスミドのように大腸菌とその近縁種にのみ伝達する低宿主域のものがある。伝達頻度は、大型のプラスミドで低い傾向があり、宿主への負荷を減らす

ためにその伝達が強く抑制されていると考えられている。近年、根粒菌の大型プラスミドでは、伝達抑制遺伝子が見出された (Perez-Mendoza *et al.*, 2005)。

環境中の伝達性プラスミドの調査として、プラスミド受容菌を環境試料に接種して、接合伝達株を選択培地で検出する実験が行われた (Top *et al.*, 1996)。また、近年の膨大なゲノム DNA データベースを利用して IncP-1 プラスミドを保有する宿主細菌を検出し、プラスミドの宿主範囲を解析した報告もある (Yano *et al.*, 2013)。リラクサーゼ遺伝子の有無を基準に、DNA データベースに登録されているプラスミドの伝達性を推定した報告によると、500 kb 以上の大型の伝達性プラスミドは非常に少ない (Smillie *et al.*, 2010)。

これまで見出されてきた 2,4-D 分解プラスミドの多くは、IncP-1 グループに分類され、様々な宿主に高い頻度で伝達する。2,4-D 分解菌 *B. tropica* RASC 株は、分解遺伝子の一つである *tfdC* を 532 kb のプラスミド上に保有し (Cavalca *et al.*, 1999)、IncP-1 プラスミドとは異なるプラスミド上に分解遺伝子を保有する可能性が示されている。また、McGowan *et al.* (1998) は RASC 株を供与株とした接合伝達試験で、受容株が低い頻度で 2,4-D 分解能を獲得したことを報告している。ただし、RASC 株の分解遺伝子の伝達がプラスミドによって行われたのかは明らかにされていない。

本研究では、pM7012 及び同じ RASC サブグループの分解遺伝子配列を持つ他のおよそ 600 kb のプラスミドの接合伝達試験を行って伝達能を調べると共に、pM7012 以外のこれらのプラスミドが、pM7012 と同じプラスミドか否かを明らかにするため、プラスミドの骨格的配列の相同性と、ヒ素耐性遺伝子の有無と相同性を調べた。

6.3 材料

接合伝達試験のプラスミド供与株として、pM7012 の宿主である *Burkholderia* sp. M701 株、及び pM7012 の分解遺伝子配列にほぼ同一の配列をおよそ 600 kb のプラスミド上に持つ水田由来の 7 株のうち、ストレプトマイシン耐性を持たない 3 株 (*Cupriavidus* sp. Y103 株, *Burkholderia* sp. C308 株, *Burkholderia* sp. H801 株)、及びアメリカ由来の *B. tropica*

RASC 株を用いた。RASC 株はミシガン州立大学の Terence L. Marsh 博士より分譲を受けた。接合伝達試験のプラスミド受容株としては以下の 2 株を用いた。一株目は、3-クロロ安息香酸分解菌のプラスミド脱落株 *Cupriavidus* sp. NH9D 株 (Ogawa & Miyashita, 1999) を小川直人博士 (現 静岡大学教授) から分譲を受け、ストレプトマイシン濃度を徐々に高めた液体培地で繰り返し培養することにより作出したストレプトマイシン耐性株、*Cupriavidus* sp. NH9DS 株を用いた。二株目は、3-クロロ安息香酸分解菌 NK8 株 (Francisco *et al.*, 2001) のプラスミド脱落株 NK82 株に自然突然変異でストレプトマイシン耐性を付与した *Burkholderia* sp. NK82S 株は山元季実子研究員 ((独) 農業環境技術研究所) から分譲を受け実験に用いた。ゲノムの PFGE 解析のサイズマーカーとして、市販の λ DNA ladder (Bio-rad) に加えて *C. pinatuboensis* JMP134 株及び *R. radiobacter* MAFF301724 株を用いた。JMP134 株は小川直人博士から分譲を受け、MAFF301724 株は澤田宏之博士 (現 (独) 農業生物資源研究所) から分譲を受けた。

6.4 方法

6.4.1 接合伝達試験

一連の接合伝達試験は、以下に述べたフィルターメンブレン法で実施した。供試株を LB 液体培地で振とう培養 (28°C) して対数増殖期まで増殖し (M701 株は 1/2LB)、プラスミド供与菌及びプラスミド受容菌それぞれにつき 10^9 cfu 相当を 1 本のチューブに入れて混合、集菌し、15 μ L の 0.9% NaCl に懸濁した。15 μ L 全量を LB 寒天平板中央に径 10 mm 程度の円となるよう塗布し、28°C で一晚培養した。LB 平板上に増殖した菌体を、白金耳でかきとって、予め 1.5 mL チューブに分注しておいた 0.9% NaCl 1 mL に懸濁した。これを順次、0.9% NaCl で希釈した後、ストレプトマイシンを添加した 2,4-D 平板 (第一章) に塗布して、28°C で 1 週間ほど培養し、出現するコロニーを接合伝達株として計数した。対象区として、プラスミド供与菌のみ、あるいは受容菌のみの場合も同時に実験を行った。2,4-D 平板には、当初、2,4-D 分解菌の分離の時と同じ寒天、Agar purified (BD, USA) を 1.5% 用いたが、

2,4-D 分解能を持たないプラスミド受容菌もある程度生育することが明らかとなり、電気泳動用のアガロース、Agarose Type II (Sigma-Aldrich, USA) を培地の 0.6%相当用いる方法に変更した。

6.4.2 pM7012 と同じ分解遺伝子配列を持つプラスミドの解析

(1) PFGE によるプラスミドの分離

第三章の M701 株のゲノムの PFGE 解析において、第二章のミニゲルの泳動では DNA 分子の分離が必ずしも十分ではないことが示されたため、他の株についても、PFGE 解析を実施した。しかし、一部の株でバンドが検出されなかったため、Cheng & Lessie (1994) の報告を参考に、プラグのプロテアーゼ処理時に SDS を終濃度 1% となるよう添加する方法に変更した。また、DNA バンドの濃さが大きく異なると、次に実施するサザンハイブリダイゼーションの結果を得にくいため、初回の泳動で濃いバンドの検出された株のプラグは半分から 1/4 にカットして泳動に供した。2 回目の泳動では、pM7012 株とほぼ同一の分解遺伝子配列を持つアメリカ由来の *B. tropica* RASC 株のゲノムも並べて解析した。PFGE で分離したゲノム DNA はメンブレンフィルターにトランスファーし、サザンハイブリダイゼーション解析に用いた。

(2) サザンハイブリダイゼーション法と PCR 法によるプラスミドの相同性解析

582 kb 付近に DNA バンドとして検出されたプラスミドが大きさだけでなく、配列も pM7012 に類似しているかを明らかにするために、サザンハイブリダイゼーションと PCR 産物のシーケンス解析を実施した。解析に用いる配列は、以下の 4 配列とした。2,4-D 分解遺伝子を保有する DNA 分子を確認するための *tfdC* 遺伝子配列、プラスミド固有の配列として、接合伝達に関わる T4CP 遺伝子配列 (*traD*)、及び複製したプラスミドの宿主への分配に関わる *parA* 遺伝子配列。さらに、プラスミドの構造の相同性を推測するため、ヒ素耐性遺伝子群の一部、*arsA* 遺伝子配列を解析対象とした。プローブの作成と部分塩基配列の解析のための PCR 及びシーケンス解析には、同じプライマー (Table 6-1a) を用いた。PCR 反

応条件は、Table 6-1b に示した。DIG でラベルしたプローブの作成は、M701 株のゲノム DNA を鋳型として第一章で述べた方法で実施した。また、PCR 断片のシーケンス解析は、それぞれの株のゲノム DNA を鋳型として目的の配列を PCR 増幅した後、第一章で述べた方法で行った。

Table 6-1a Primers for PCR.

Target sequence	Primer name	Primer sequences (5'-3')
<i>parA</i>	pM7012_parAf	ttcagacgcgaagctactc
	pM7012_parAr	cggtcatggagttttcgttg
<i>traD</i> (T4CP gene)	pM7012_traDf	aaacagagtgccaaaccaagg
	M7012_traDr	catacgaccccaattcatcc
<i>arsA</i>	pM7012_arsAf	atcggtaatcgcgtcaca
	pM7012_arsAr	agccgggatgttcttcag

Table 6-1b Conditions for PCR.

Target	PCR conditions
<i>parA</i>	94°C 3 min.
	94°C 15 sec.
	56°C 15 sec.
	72°C 15 sec.
	72°C 3 min.
	25 cycles
<i>traD</i>	94°C 3 min.
	94°C 15 sec.
	55°C 15 sec.
	72°C 15 sec.
	72°C 3 min.
	25 cycles
<i>arsA</i>	94°C 3 min.
	94°C 15 sec.
	51°C 15 sec.
	72°C 15 sec.
	72°C 3 min.
	25 cycles

6.5 結果

6.5.1 接合伝達試験

接合伝達実験の結果、ポジティブコントロールの JMP134 株をプラスミド供与株とした場合は 10^{-3} 程度の伝達頻度で接合伝達株が検出された。しかし、pM7012 様プラスミド保有株を宿主とした場合は、接合伝達株は検出されなかった。

6.5.2 pM7012 と同じ分解遺伝子配列を持つプラスミドの解析

(1) PFGE によるプラスミドの分離

第三章で用いた方法で、PFGE を実施したところ、pM7012 と同じ分解遺伝子配列を概ね同じ大きさのプラスミド上に持つ 7 株のうち、4 株は、DNA 分子が検出されなかった (Fig. 6-1)。MAFF301724 株では 217 kb のプラスミドを保有することが報告されているが (Satuti *et al.*, 2000)、200 kb 付近に 2 本のバンドが検出され、どちらが 217 kb のプラスミドかは判断できなかった。JMP134 株はゲノム解析により、635 kb と 88 kb のプラスミドを保有することが明らかにされているが (Lykidis *et al.*, 2010)、88 kb のプラスミドは本泳動条件では検出されなかった。

PFGE 様プラグの作成の際、プロテアーゼ処理時に終濃度 1% の界面活性剤を添加することで供試株全ての DNA バンドが検出できるようになった (Fig. 6-2a)。国内由来の 8 株はいずれも 582 kb 付近に DNA バンドが検出されたが、RASC 株ではこの大きさのバンドは検出されず、代わりに 480 kb 付近と 900 kb 付近にバンドが検出された。

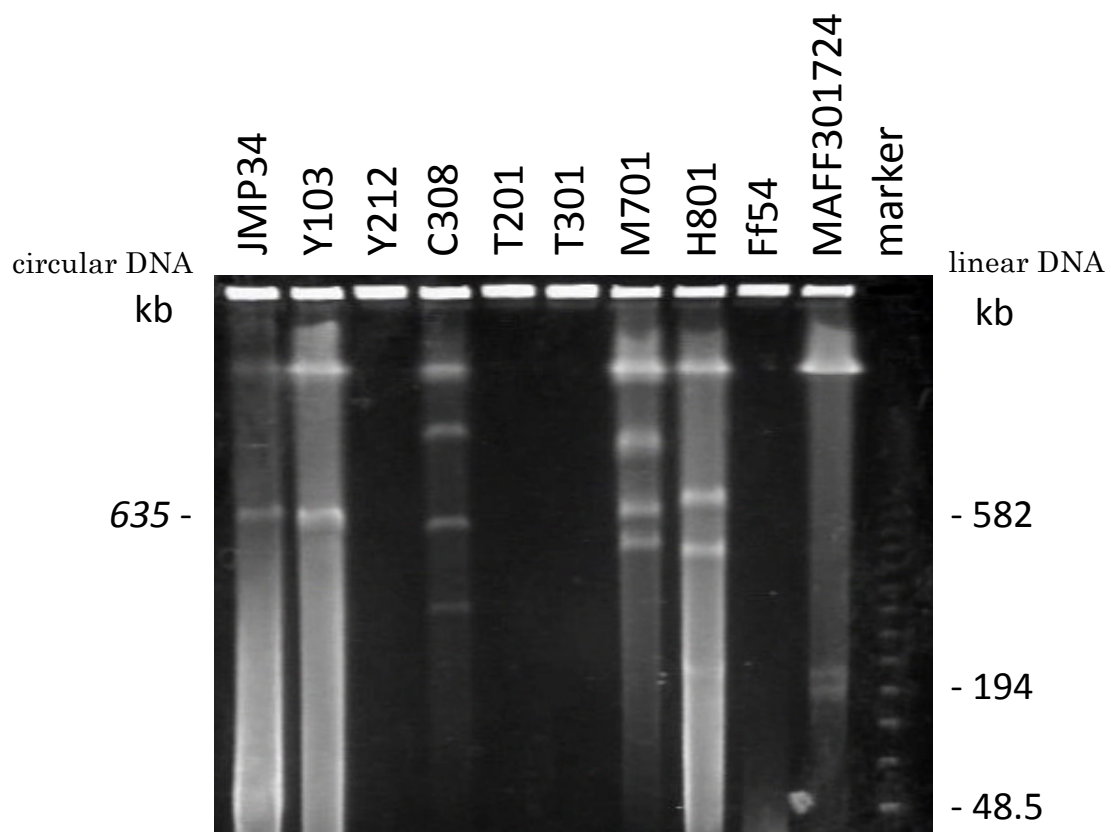


Fig. 6-1 Pulse-field gel electrophoresis of replicons from 2,4-D-degrading strains.

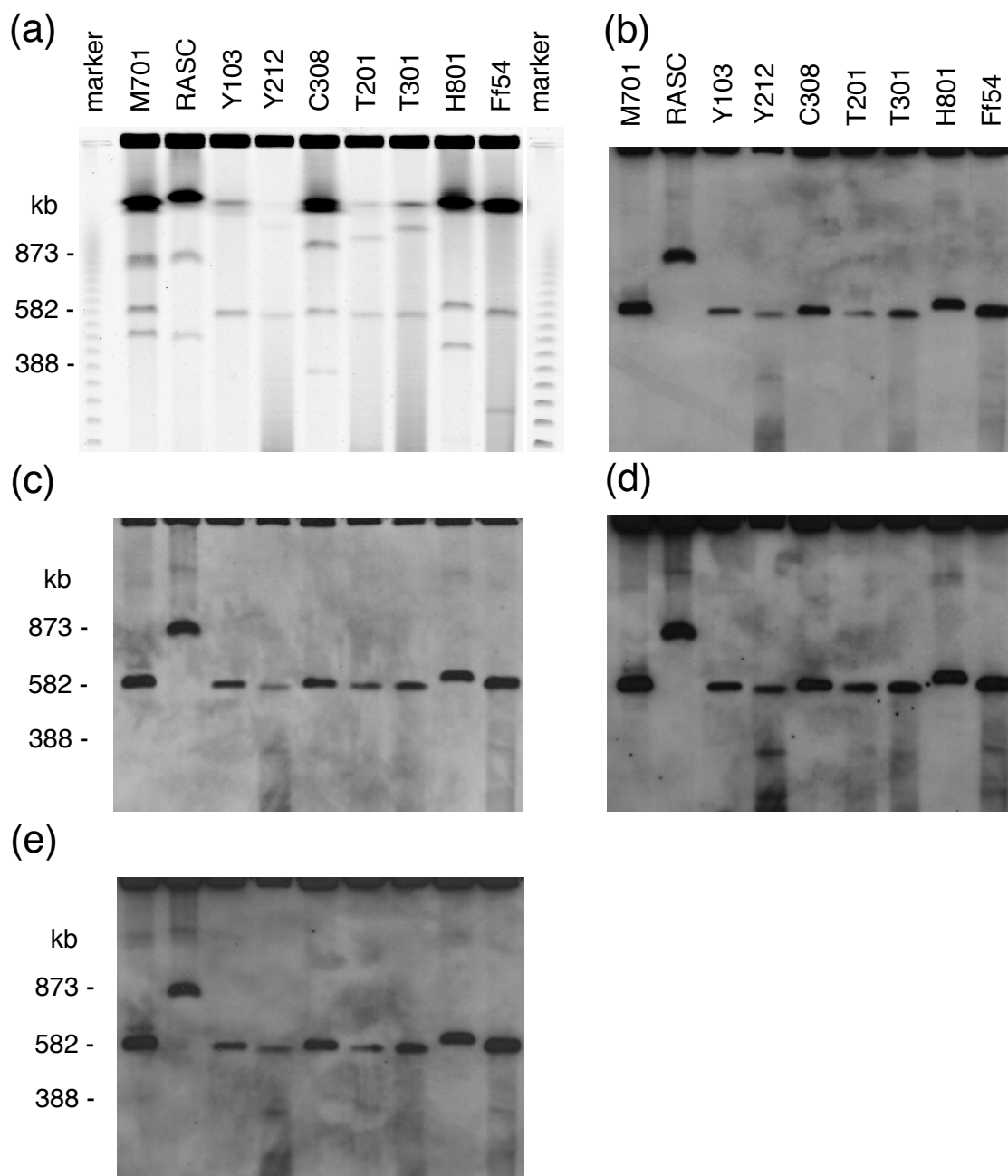


Fig. 6-2 Pulse-field gel electrophoresis of replicons from 2,4-D-degrading strains (a), and Southern hybridization analysis of the replicons using the *tfdC_{pM7012}* probe (b), *traD_{pM7012}* probe (c), *parA_{pM7012}* probe (d), and *arsA_{pM7012}* probe (e). Lambda ladder (Bio-Rad Laboratories, 48.5 kb interval) was used as the marker. Strains; *Burkholderia* spp. strains M701, Y 212, C308, T201, T301, H801, and Ff54, *Cupriavidus* sp. Y103, and *B. tropica* strain RASC.

(2) サザンハイブリダイゼーション法と PCR 法によるプラスミドの相同性解析

まず始めに、*tfdC*_{pM7012} プローブを用いてサザンハイブリダイゼーションを実施したところ、国内由来の 8 株はおよそ 582 kb のマーカー付近の DNA バンドにシグナルを示し、概ね同じ大きさのプラスミド上に分解遺伝子配列を持つ事が確認された (Fig. 6-2b)。一方、アメリカで分離された RASC 株はおよそ 900 kb の DNA バンドでシグナルが検出された。次いで、*traD*_{pM7012} プローブ、*parA*_{pM7012} プローブ、及び *arsA*_{pM7012} プローブを用いて同様に実験したところ (Fig. 6-2c, d, e)、いずれのプローブも *tfdC*_{pM7012} プローブと同じ位置にシグナルを示した。即ち、これらの 4 配列は同一のプラスミド上に存在することが示された。さらに、塩基配列の明らかにされていない *tfdC* 以外の 3 配列の部分塩基配列を調べたところ、国内の株は M701 株に 98%以上の相同性を示し、RASC 株も 97%以上相同な配列を持つ事が明らかとなった (Table 6-2)。即ち、これらのプラスミドは同一のプラスミドに由来し、少なくとも過去には細菌間に伝播した可能性が示された。またアメリカ由来の株からも pM7012 と相同性の高いプラスミドの検出されたことで、pM7012 様プラスミドが国を越えて伝播している可能性が示された。

Table 6-2 Nucleotide sequence similarity (%) between the partial nucleotide sequence of the indicated genes in pM7012 of strain M701 and the corresponding sequences in the other strains.

<hr/>				
strain				
name	<i>tfdC</i>	<i>traD</i>	<i>parA</i>	<i>arsA</i>
M701	100	100	100	100
Y103	100	99	99	100
Y212	100	98	100	100
C308	100	99	100	100
T201	100	99	100	100
T301	100	99	100	100
H801	100	99	100	100
Ff54	100	100	100	100
RASC	98	97	100	100
<hr/>				

6.6 考察

PFGE によるゲノム DNA の分離、サザンハイブリダイゼーション及び一連の PCR 解析の結果から、pM7012 様のプラスミドが少なくとも過去には、属種の異なる細菌に伝播したことが示された。第四章の解析で、pM7012 のヒ素耐性トランスポゾンがクロミド領域と共に pM7012 の祖先プラスミドに取り込まれた可能性を合わせて考えると、pM7012 で見出された 59 kb のクロミド領域が他の 7 株のプラスミドにも存在する可能性が高い。即ち、pM7012 様のプラスミドは、プラスミド全体の構造を維持したまま属種の異なる細菌に伝播し、現時点では大きなプラスミドの再編は受けていないと考えられた。

接合伝達因子の伝達能の検出法として最も一般的なフィルターメンブレン法では、pM7012 及びその類縁プラスミドの伝達能を検出できなかった。その理由としては、いくつか考えられた。一つ目は、pM7012 グループの接合伝達に必要な遺伝子（例えばリラクサーゼ遺伝子）が、2,4-D 分解菌を環境サンプルから分離して研究室で継代する際に脱落、あるいは変異が生じて、伝達不能になっている可能性がある。二つ目の可能性として、pM7012 様プラスミドの伝達には、別の接合伝達性プラスミドの助けが必要なことが挙げられる。伝達に必要な遺伝子を持たないプラスミドが、接合伝達性のプラスミドと細胞内に共存することにより、別の細胞に伝達したことが、近年報告されている (Li *et al.*, 2013)。三つ目の可能性として、本研究で用いた接合伝達実験条件が、pM7012 様プラスミドには適していない可能性がある。*Sinorhizobium meliloti* 1021 の保有する大型プラスミド pSymA は接合に必要な伝達遺伝子群を全て持つにも関わらず、通常の実験条件下では接合伝達せず、発現抑制因子をコードする *rctA* 遺伝子によって接合伝達遺伝子の発現が抑制されていることが報告されている (Perez-Mendoza *et al.*, 2005)。四つ目として、pM7012 様プラスミドの接合伝達頻度が検出限界より低い可能性があげられる。大型のプラスミドの接合伝達は、小型のプラスミドに比べて、強く抑制されていることが報告されており、接合伝達頻度が本研究の接合伝達実験の検出限界値 10^{-8} 以下の場合には検出されない。どの要因が関わっているのかを明らかにするためにはさらなる実験が必要とされる。

RASC 株は 532 kb のプラスミド上に分解遺伝子を持つ事が報告されていたが (Cavalca *et al.*, 1999)、本研究では、およそ 900 kb のプラスミド上に分解遺伝子配列を持つという結果が得られた。Cavalca *et al.* (1999) は、通常の電気泳動で RASC 株の分解プラスミドの大きさを計測しており、大型の DNA 分子では測定誤差が大きかった可能性がある。現在はゲノムの解析から 635kb であることが明らかになっている JMP134 株の大型プラスミドも、同報告では 410 kb と見積もられている。ただし、本研究で算出した 900 kb という大きさは、直鎖の λ DNA マーカーの大きさに基づいている。PFGE において直鎖状と環状のプラスミドの移動度は異なり、その程度は泳動条件に左右される (Wang & Lai, 1995)。本研究の結果から、少なくとも RASC 株の 2,4-D 分解プラスミドが、pM7012 より大きいことは間違いのないであろう。それにもかかわらず RASC 株の分解プラスミドは、pM7012 とほぼ同じプラスミド分配遺伝子配列と接合伝達遺伝子配列を保有し、pM7012 と同じプラスミド骨格を持つ可能性が示された。よって、pM7012 様のプラスミドは、世界的に伝播している可能性が示された。日本とアメリカそれぞれにおいて、同じ祖先プラスミドが、同じ 2,4-D 分解遺伝子群とヒ素耐性遺伝子群を獲得したとは考えにくく、国内で見出された pM7012 様のプラスミドと RASC 株の保有する 900 kb のプラスミドは、同一のプラスミドに由来する可能性が高いと考えられた。近年、アメリカとカナダより分離した一連の 2,4-D 分解菌 (Tonso *et al.*, 1995) の *tfdA* 遺伝子配列が解析された結果、RASC 株とほぼ同じ分解遺伝子配列を持つ株が高い割合で存在することが示された (Baelum *et al.*, 2010)。これらの株は、分解遺伝子とプラスミドの関係は明らかにされていないが、RASC 株とは異なる場所から分離されており、さらに解析が進むことで、pM7012 様プラスミドの伝播の裏付けとなるデータの得られることが期待される。

RASC サブグループの分解遺伝子を持つ国内の 8 株及びアメリカの一株は Y103 株を除いて全て *Burkholderia* 属細菌であり、pM7012 に相同性の高いプラスミドは、特に *Burkholderia* 属細菌と強い結びつきを持っていると考えられた。第四章の結果より、pM7012 には *Burkholderia* のクロミドに相同性の高い領域が存在し、tRNA gene cluster I の配列も *Burkholderia* 属細菌の配列に最も相同性が高かった。また第五章では、pM7012 と最も相同

性が高い既知のプラスミドは byi_2p と pBVIE01 で、いずれも *Burkholderia* 属細菌を宿主とすることが明らかになっている。*Burkholderia* 属細菌は、様々な場所に生息し、環境への適応力の強い生物グループと考えられる。ゲノムサイズの大きな種が多く、一般に、ゲノムが多数の DNA 分子から構成される。NCBI のデータベースによると、例えば、pBVIE01 の宿主である *Burkholderia vietnamiensis* G4 株の 8 Mb のゲノムは、染色体と 2 つのクロミド、及び 5 個のプラスミドで構成される。pM7012 の宿主の M701 株も少なくとも 4 つのプラスミドを保有することが、PFGE の結果から明らかとなっている。大量の遺伝情報を一つの細胞内に保有することは、DNA 分子間、あるいは配列間の交雑の頻度を高め、多様な個体が生まれやすいと考えられる。大きなゲノムとその可塑性が *Burkholderia* 属細菌の多様な環境に適応する大きな理由の一つになっていると考えられる。pM7012 はそのような遺伝子の交雑の中で生まれたプラスミドの一つかもしれない、大型であるが故に、大量の遺伝子を運ぶことができる。2,4-D 分解遺伝子とヒ素耐性遺伝子の双方が、本章で解析した全ての pM7012 様のプラスミドに見出されたことは、*Burkholderia* 属細菌のクロミド領域に相同な 50 kb 以上の配列が、異なる種の *Burkholderia* 属細菌や *Cupriavidus* 属細菌に伝播していることを示唆する。通常は、種固有の配列であるクロミドの遺伝子が、pM7012 によって異なる属種の細菌に運ばれている可能性が示された。即ち、pM7012 は *Burkholderia* 属細菌とその近縁細菌のゲノムの多様化と環境適応を推進する遺伝子伝達因子の一つと考えられた。

総括

本研究では、微生物による分解遺伝子の獲得機構と遺伝子の伝播を解析するために、最も古い化学合成除草剤である 2,4-D をモデル化合物として、その分解菌を水田より収集し、分解遺伝子群の分布及び分解遺伝子群を微生物間に伝播する遺伝子伝達因子を調べた。その結果、国内外を含めて初めて、水田由来の 2,4-D 分解菌が収集され、国内の水田にも、これまで世界各地で見出されてきた代表的なグループの 2,4-D 分解遺伝子の存在することが明らかとなった。また、これらの分解遺伝子は全てプラスミド上に存在することが示された。特に、 α -プロテオバクテリアの 2,4-D 分解菌は、分解遺伝子とプラスミドの関係はこれまで明らかにされていなかったが、本研究で初めて、分解遺伝子がプラスミド上に存在することが示された。さらにこれまで、 β -プロテオバクテリアの 2,4-D 分解遺伝子群の伝播は、主に IncP-1 グループの伝達性プラスミドによって行われていると考えられてきたが、水田からはこのグループの 2,4-D 分解プラスミドを保有する 2,4-D 分解菌は分離されなかった。代わりに 200 kb 以上の大型のプラスミド上に 2,4-D 分解遺伝子群が見出され、特に、アメリカで分離された 2,4-D 分解菌 *Burkholderia tropica* RASC 株の分解遺伝子に相同な遺伝子が、水田由来の 8 株で、およそ 600 kb のプラスミド上に検出された。この 600 kb のプラスミドの一つである pM7012 の全塩基配列を解析して既知のプラスミドと比較し、さらに水田由来の 8 株の保有する 600 kb のプラスミドの部分塩基配列を調べた結果、この大型のプラスミドは、これまでに報告例のない新規の接合伝達因子グループに属することが示唆された。この結果は、2,4-D 分解プラスミドとして新しいプラスミドの存在を示すだけでなく、リラクサーゼ遺伝子を持たないプラスミドに伝達性はないとするこれまでの概念 (Smillie *et al.*, 2010) を覆す可能性があり、細菌による遺伝子の獲得と伝播についての研究に、今後、大きな影響を及ぼすものと考えられる。

pM7012 様のプラスミドは、“分解プラスミド”としてもこれまでに報告例のないものであった。分解プラスミドとしては、2,4-D の他に、クロロ安息香酸、サリチル酸、カルバゾール、及びトルエン等が知られるが、IncP-1、IncP-2、IncP-7 及び IncP-9 の不和合性プラス

ミドグループに属することが報告されている (van der Meer, 2008)。プラスミドが異なる不和合性グループに属することは、細胞内に共存できることを意味する。また、細胞内の DNA 分子の共存は、DNA 分子の交雑をもたらすため、多様な接合伝達因子に分解遺伝子が保有されることは、新たな分解遺伝子群を生み出す原動力の一つになっていると考えられる。このことは、pM7012 様のプラスミドの産業利用を考える上で、重要である。

pM7012 様プラスミドの産業利用の可能性の一つに、バイオレメディエーションが挙げられる。土壌が低濃度で広範囲に化学物質に汚染されている場合、汚染土壌を施設に持ち込んで処理する事は現実的ではなく、現位置での微生物の分解能の適用が検討されてきた。しかし、分解菌を人為的に接種しても土壌では分解能を十分には発揮できず、大半は死滅する場合の多いことが経験的に知られるようになった。そのような中で、分解菌を接種するのではなく、可動性遺伝因子上に分解遺伝子を保有する菌を接種し、土着の菌に分解遺伝子を保有させる gene bioaugmentation と呼ばれる試みが行われている。2,4-D 分解プラスミドでも試みられ (DiGiovanni *et al.*, 1996; Inoue *et al.*, 2012; Newby *et al.*, 2000; Pepper *et al.*, 2002; Top *et al.*, 1998)、その有効性が確認されている。2,4-D そのものは比較的分解されやすく、汚染が問題となることはほとんどない。しかし、2,4-D 分解遺伝子群の保有するクロロカテコール分解遺伝子群は、ポリ塩化ビフェニル (PCB) 等の芳香族塩素化合物分解遺伝子群に共通しており、PCB 分解におけるクロロカテコールの分解に寄与できる可能性がある。クロロカテコールは生物にとって有害であり、細胞内のクロロカテコール分解遺伝子数を増やす事は、分解能の向上に繋がることが報告されている (Trefault *et al.*, 2002)。前述のように、pM7012 様のプラスミドは既知の分解プラスミドと細胞内で共存できると考えられ、接合伝達条件が明らかになれば、PCB 分解菌にクロロカテコール分解遺伝子群を付与できると考えられる。また、単に遺伝子の数を増やすだけでなく、一つの細胞内に pM7012 様プラスミドと他の分解プラスミドを共存させることは、遺伝子組換え技術を使うことなく、プラスミド間の相同組換えやトランスポゾンの挿入を誘導し、新しい分解遺伝子群が構築される可能性がある。有用な品種の掛け合わせで実施される植物の育種のように、pM7012 様プラスミドを用いた分解菌の育種の可能性も考えられた。

pM7012 様プラスミドのもう一つの利用法として、分子生物学研究のベクターとしての利用が挙げられる。*Burkholderia* 属菌はヒトの病原菌、あるいは植物の病原菌として人類に害を及ぼす生物として研究される一方、人類に利益をもたらす菌として、植物の生育促進、植物に共生して窒素固定を行う株、また 2,4-D 以外の様々な分解菌も見出され、人類と深い関わりを持つ。これらの分離株の遺伝子の発現解析を行うにあたり、遺伝子ベクターは重要な道具であるが、pUC 系等大腸菌用のベクターは使用できず、*Burkholderia* 属菌で使用可能なベクターは限られている。pM7012 は *Burkholderia* 属菌を宿主として見出されており、プラスミド分配複製領域を導入して構築したベクターは、*Burkholderia* 属菌及びその近縁種で利用可能になると考えられる。また、pM7012 から構築されるベクターは、すでに構築されている IncP-1 プラスミドのプラスミド複製領域を用いたベクター (Cheng *et al.*, 2014; Kakirde *et al.*, 2011) と細胞内で共存が可能となるため、複数の遺伝子の相互関係を調べる際にも有効と考えられる。pM7012 から構築されるベクターのもう一つのメリットとして、大腸菌の実験系で用いられている BAC ベクターのように、インサートとして長い DNA 断片を導入できる可能性が挙げられる。トランスフォーメーションの効率の問題はあるものの、理論的には数百 kb の DNA 断片を導入できると考えられる。

本研究は、細菌の遺伝子伝達因子の解析に加えて、遺伝子の伝播の現状の把握と組換え遺伝子が流出した場合の遺伝子拡散の予測も目的として実施した。結論から述べると、土壌細菌の遺伝子に国境はなく、地球上のどこかで偶発的に生まれた遺伝子配列は、短期間で世界中に広まる可能性を持つことが示された。非常に相同な分解遺伝子群を保有する 2,4-D 分解菌が世界各地で分離されることは既に明らかにされてきたことではあるが、国内の水田もその例外ではなかった。おそらく、環境中での生残に有利な遺伝子ほど、微生物集団の中でその遺伝子を保有する個体数を増やし、増えた微生物は、地理的に拡散する頻度が高まる。さらに、その遺伝子が遺伝子伝達因子上に存在する場合は、土着の菌に遺伝子伝達因子が移ることで定着性が向上し、拡散のスピードが加速する可能性が高い。2,4-D は 1940 年代に開発されて以降、世界的規模で農薬として使用されたために、2,4-D 分解菌あるいは、2,4-D 分解プラスミドが効率よく拡散したことが予想される。細菌が構築した 2,4-D 分解遺伝子群は数

十年の間に、世界各地に広まったと考えられるが、人や物の流れが当時よりもさらに活発化している現代では、遺伝子の拡散の速度も格段に早まっている可能性が高い。従って、もし遺伝子操作を受けた遺伝子が細菌の生残に有利なものであれば、比較的短期間に、世界中に広まることが推測される。環境中に拡散した遺伝子は回収不能と考えられ、2,4-D 分解プラスミドの解析を通じて、組換え遺伝子を保有する微生物の取扱いには細心の注意が必要であることが改めて示された。

遺伝子には国境がないと考えられる一方、pM7012 様のプラスミドは、ヒトの病原菌として分離され、精力的にゲノムの解読されている *Burkholderia cepacia complex* の菌群には見出されなかった。水田から分離された pM7012 様のプラスミド保有の 8 株のうち、4 株は type strain の *Burkholderia metallica* と *Burkholderia diffusa* に最も近縁で (Table 1-4)、*Burkholderia cepacia complex* に分類されることが考えられる。従って、pM7012 グループのプラスミドも、ヒトに生息する *Burkholderia* 属菌に伝達して維持されることが可能と考えられる。現在のところ pM7012 グループのプラスミドがヒト由来の *Burkholderia cepacia complex* に検出されないのは、pM7012 グループのプラスミドが、ヒトで生息する上で有利な遺伝子を保有しないためかもしれない。もし pM7012 グループのプラスミドが抗生物質耐性遺伝子等を獲得して、偶発的にでもヒト由来の *Burkholderia cepacia complex* に保有されることとなれば、瞬く間に病原性の *Burkholderia cepacia complex* に伝播する可能性がある。患者から分離された抗生物質耐性菌 *Pseudomonas* sp. H8234 株にも同じグループと考えられる可動性遺伝因子の配列が見出され、医療現場の *Pseudomonas* 属菌の間では、既に何らかの遺伝子の伝達因子として機能している可能性がある。即ち、pM7012 を用いたベクターの構築においては、抗生物質耐性遺伝子等、ヒトという環境で生息が有利になる遺伝子はマーカーとして用いるべきではなく、例えば、重金属耐性遺伝子や、分解遺伝子を用いる必要がある。

pM7012 グループのプラスミドは、*Burkholderia* 属菌のみならず、*Cupriavidus* 属菌及び *Pseudomonas* 属菌にも見出された。*Cupriavidus* 属菌 Y103 株は pM7012 と概ね同じと考えられるプラスミドを保有するため、pM7012 様のプラスミドは *Burkholderia* 属菌と

Cupriabidus 属菌の双方を宿主にできると推測される。一方、*Pseudomonas* 属菌 H8234 株の保有する染色体への挿入配列は、祖先プラスミドが pM7012 と同じであることはほぼ間違いないと考えられるが、プラスミドの複製に関わる遺伝子群や接合伝達遺伝子群の相同性が pM7012 の保有する配列と比べると 60-75%程度で、このプラスミドが、双方の宿主を自由に伝播できるのかは判断できない。プラスミドは異なる宿主に伝達した後、その宿主が増殖を繰り返すとプラスミドの配列が変化し、新しい宿主に適応していくことが、IncP-1 プラスミドを用いた実験で報告されている (Norberg *et al.*, 2011)。

本研究では、pM7012 様のプラスミドの接合伝達を、接合伝達実験としては検出することは、できなかった。しかし、水田由来の 8 株とアメリカ由来の RASC 株の解析から、プラスミドの伝達を示すことに成功した。塩基配列のシーケンス技術の進歩により、細菌のゲノムデータ、またあらゆる環境のメタゲノムデータは増え続けており、今後、その中からも pM7012 様のプラスミドが見出されてくることが予想される。数年後には、プラスミドの比較解析がより詳細に実施できる可能性があり、プラスミドの宿主範囲や環境中での分布について、さらなる知見の得られることが期待される。そうした情報を収集することにより、pM7012 様プラスミドが、より有効に産業利用されることを期待する。

謝辞

本論文をまとめるにあたり、丁寧なご指導とご校閲を頂きました筑波大学大学院生命環境科学科学研究研究科生命産業科学専攻 中島敏明 教授、王碧昭 教授、内海真生 准教授、山田小須弥 准教授に深く感謝致します。

本研究を行うにあたり、土壌を分与頂きました(独)農業・食品産業技術総合研究機構の安田道夫 研究員、加藤直人 研究員、高橋智己 研究員、村上弘治 研究員、吉田政則 研究員、及び土屋一成 研究員に深く感謝致します(所属は当時)。また、*B. tropica* RASC 株を分譲頂きました、アメリカミシガン州立大学 Dr. Terence L. Marsh 及び Marsh 博士を紹介頂きました中央大学 諏訪裕一 教授、*Rizobium radiobacter* MAFF301724 株を分譲頂きました、澤田宏之 博士(現(独)農業生物資源研究所)、*Burkholderia* sp. NK82S 株を分譲頂きました(独)農業環境技術研究所 山元季実子 研究員に心より感謝致します。

本論文の研究の機会を与えて与えてくださいました(独)農業環境技術研究所 宮下清貴 理事長、研究の遂行と論文の作成にあたり、指導と助言をいただきました同研究所の長谷部亮 理事、藤井毅 領域長、菅原和夫 室長、及び研究室のメンバーに感謝致します。特に、実験手法、菌株の分譲、及び論文の取りまとめを一貫してサポートいただいた小川直人 博士(現静岡大学教授)、DNA の配列データの解析手法を伝授いただいた下村有美 博士、及び中島 教授を紹介頂いた北本宏子 研究リーダーに深く感謝致します。

最後に、本研究をまとめるにあたり、暖かく支えてくれた家族に感謝します。

引用文献

- Abe, T., Ikemura, T., Sugahara, J., Kanai, A., Ohara, Y., Uehara, H., Kinouchi, M., Kanaya, S., Yamada, Y., Muto, A. & Inokuchi, H. (2011). tRNADB-CE 2011: tRNA gene database curated manually by experts. *Nucleic Acids Res* **39**, D210-D213.
- Altschul, S. F., Madden, T. L., Schaffer, A. A., Zhang, J. H., Zhang, Z., Miller, W. & Lipman, D. J. (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: A new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res* **25**, 3389-3402.
- Amy, P. S., Schulke, J. W., Frazier, L. M. & Seidler, R. J. (1985). Characterization of aquatic bacteria and cloning of genes specifying partial degradation of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid. *Appl Environ Microb* **49**, 1237-1245.
- Audus, L. J. (1950). Biological detoxication of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid in soils: Isolation of an effective organism. *Nature* **166**, 356-356.
- Baelum, J., Jacobsen, C. S. & Holben, W. E. (2010). Comparison of 16S rRNA gene phylogeny and functional *tfdA* gene distribution in thirty-one different 2,4-dichlorophenoxyacetic acid and 4-chloro-2-methylphenoxyacetic acid degraders. *Syst Appl Microb* **33**, 67-70.
- Bhat, M. A., Tsuda, M., Horiike, K., Nozaki, M., Vaidyanathan, C. S. & Nakazawa, T. (1994). Identification and characterization of a new plasmid carrying genes for degradation of 2,4-dichlorophenoxyacetate from *Pseudomonas cepacia* CSV90. *Appl Environ Microb* **60**, 307-312.
- Bugreev, D. V. & Nevinsky, G. A. (2009). Structure and mechanism of action of type IA DNA topoisomerases. *Biochemistry (Mosc)* **74**, 1467-1481.
- Burlage, R. S., Bemis, L. A., Layton, A. C., Sayler, G. S. & Larimer, F. (1990). Comparative genetic organization of incompatibility group-P degradative plasmids. *J Bacteriol* **172**, 6818-6825.
- Carattoli, A., Bertini, A., Villa, L., Falbo, V., Hopkins, K. L. & Threlfall, E. J. (2005). Identification of plasmids by PCR-based replicon typing. *J Microbiol Methods* **63**, 219-228.
- Cavalca, L., Hartmann, A., Rouard, N. & Soulas, G. (1999). Diversity of *tfdC* genes: Distribution and polymorphism among 2,4-dichlorophenoxyacetic acid degrading soil bacteria. *FEMS Microbiol Ecol* **29**, 45-58.

- Chain, P. S. G., Denef, V. J., Konstantinidis, K. T., Vergez, L. M., Agullo, L., Reyes, V. L., Hauser, L., Cordova, M., Gomez, L., Gonzalez, M., Land, M., Lao, V., Larimer, F., Lipuma, J. J., Mahenthiralingam, E., Malfatti, S. A., Marx, C. J., Parnell, J. J., Ramette, A., Richardson, P., Seeger, M., Smith, D., Spilker, T., Sul, W. J., Tsoi, T. V., Ulrich, L. E., Zhulin, I. B. & Tiedje, J. M. (2006). *Burkholderia xenovorans* LB400 harbors a multi-replicon, 9.73-Mbp genome shaped for versatility. *Proc Natl Acad Sci USA* **103**, 15280-15287.
- Chan, P. P. & Lowe, T. M. (2009). GtRNAdb: A database of transfer RNA genes detected in genomic sequence. *Nucleic Acids Res* **37**, D93-D97.
- Chaudhry, G. R. & Huang, G. H. (1988). Isolation and characterization of a new plasmid from a *Flavobacterium* sp. which carries the genes for degradation of 2,4-dichlorophenoxyacetate. *J Bacteriol* **170**, 3897-3902.
- Cheng, H. P. & Lessie, T. G. (1994). Multiple replicons constituting the genome of *Pseudomonas cepacia* 17616. *J Bacteriol* **176**, 4034-4042.
- Cheng, J. J., Pinnell, L., Engel, K., Neufeld, J. D. & Charles, T. C. (2014). Versatile broad-host-range cosmids for construction of high quality metagenomic libraries. *J Microbiol Meth* **99**, 27-34.
- Clement, P., Pieper, D. H. & Gonzalez, B. (2001). Molecular characterization of a deletion/duplication rearrangement in *tfd* genes from *Ralstonia eutropha* JMP134 (pJP4) that improves growth on 3-chlorobenzoic acid but abolishes growth on 2,4-dichlorophenoxyacetic acid. *Microbiol-Sgm* **147**, 2141-2148.
- Cohen, S. N., Chang, A. C. Y., Boyer, H. W. & Helling, R. B. (1973). Construction of biologically functional bacterial plasmids in-vitro. *Proc Natl Acad Sci USA* **70**, 3240-3244.
- Couturier, M., Bex, F., Bergquist, P. L. & Maas, W. K. (1988). Identification and classification of bacterial plasmids. *Microbiological Reviews* **52**, 375-395.
- de la Cruz, F., Frost, L. S., Meyer, R. J. & Zechner, E. L. (2010). Conjugative DNA metabolism in gram-negative bacteria. *FEMS Microbiology Reviews* **34**, 18-40.
- DiGiovanni, G. D., Neilson, J. W., Pepper, I. L. & Sinclair, N. A. (1996). Gene transfer of *Alcaligenes eutrophus* JMP134 plasmid pJP4 to indigenous soil recipients. *Appl Environ Microb* **62**, 2521-2526.
- do Sul, J. A. I. & Costa, M. F. (2014). The present and future of microplastic pollution in the marine environment. *Environ Pollut* **185**, 352-364.

- Don, R. H. & Pemberton, J. M. (1981).** Properties of six pesticide degradation plasmids isolated from *Alcaligenes paradoxus* and *Alcaligenes eutrophus*. *J Bacteriol* **145**, 681-686.
- Dorman, C. J. (2008).** The virulence plasmids of *Shigella flexneri*. In *Microbial Megaplasms*, pp. 151-170. Edited by E. Schwartz: Springer.
- Dunn, N. W. & Gunsalus, I. C. (1973).** Transmissible plasmid coding early enzymes of naphthalene oxidation in *Pseudomonas putida*. *J Bacteriol* **114**, 974-979.
- Farhana, L. & New, P. B. (1997).** The 2,4-dichlorophenol hydroxylase of *Alcaligenes eutrophus* JMP134 is a homotetramer. *Can J Microbiol* **43**, 202-205.
- Finn, R. D., Mistry, J., Tate, J., Coggill, P., Heger, A., Pollington, J. E., Gavin, O. L., Gunasekaran, P., Ceric, G., Forslund, K., Holm, L., Sonnhammer, E. L. L., Eddy, S. R. & Bateman, A. (2010).** The Pfam protein families database. *Nucleic Acids Res* **38**, D211-D222.
- Fouet, A. & Moya, M. (2008).** Virulence megaplasms in *Bacillus anthracis*. In *Microbial Megaplasms*, pp. 187-208. Edited by E. Schwartz: Springer.
- Francia, M. V., Varsaki, A., Garcillan-Barcia, M. P., Latorre, A., Drainas, C. & de la Cruz, F. (2004).** A classification scheme for mobilization regions of bacterial plasmids. *FEMS Microbiology Reviews* **28**, 79-100.
- Francisco, P. B., Ogawa, N., Suzuki, K. & Miyashita, K. (2001).** The chlorobenzoate dioxygenase genes of *Burkholderia* sp. strain NK8 involved in the catabolism of chlorobenzoates. *Microbiology* **147**, 121-133.
- Frantz, B. & Chakrabarty, A. M. (1987).** Organization and nucleotide-sequence determination of a gene-cluster involved in 3-chlorocatechol degradation. *Proc Natl Acad Sci USA* **84**, 4460-4464.
- Fukumori, F. & Hausinger, R. P. (1993).** *Alcaligenes eutrophus* JMP134 2,4-dichlorophenoxyacetate monooxygenase is an alpha-ketoglutarate-dependent dioxygenase. *J Bacteriol* **175**, 2083-2086.
- Fulthorpe, R. R., McGowan, C., Maltseva, O. V., Holben, W. E. & Tiedje, J. M. (1995).** 2,4-dichlorophenoxyacetic acid-degrading bacteria contain mosaics of catabolic genes. *Appl Environ Microb* **61**, 3274-3281.
- Garcillan-Barcia, M. P., Francia, M. V. & de la Cruz, F. (2009).** The diversity of conjugative relaxases and its application in plasmid classification. *FEMS Microbiology Reviews* **33**, 657-687.
- Gotz, A., Pukall, R., Smit, E., Tietze, E., Prager, R., Tschape, H., vanElsas, J. D. & Smalla, K. (1996).** Detection and characterization of broad-host-range

- plasmids in environmental bacteria by PCR. *Appl Environ Microb* **62**, 2621-2628.
- Greated, A., Lambertsen, L., Williams, P. A. & Thomas, C. M. (2002).** Complete sequence of the IncP-9 TOL plasmid pWW0 from *Pseudomonas putida*. *Environ Microbiol* **4**, 856-871.
- Han, L. Z., Liu, Y. B., He, A. G. & Zhao, D. G. (2014).** 16S rRNA gene phylogeny and *tfdA* gene analysis of 2,4-D-degrading bacteria isolated in China. *World J Microb Biot* **30**, 2567-2576.
- Harrison, P. W., Lower, R. P. J., Kim, N. K. D. & Young, J. P. W. (2010).** Introducing the bacterial 'chromid': Not a chromosome, not a plasmid. *Trends in Microbiology* **18**, 141-148.
- Hasebe, A., Tsushima, S. & Iida, S. (1998).** Isolation and characterization of IS1416 from *Pseudomonas glumae*, a new member of the IS3 family. *Plasmid* **39**, 196-204.
- Hayes, F. & Barilla, D. (2006).** The bacterial segrosome: a dynamic nucleoprotein machine for DNA trafficking and segregation. *Nature Reviews Microbiology* **4**, 133-143.
- Heuer, H., Szczepanowski, R., Schneiker, S., Puhler, A., Top, E. M. & Schluter, A. (2004).** The complete sequences of plasmids pB2 and pB3 provide evidence for a recent ancestor of the IncP-1 beta group without any accessory genes. *Microbiol-Sgm* **150**, 3591-3599.
- Hoffmann, D., Kleinsteuber, S., Muller, R. H. & Babel, W. (2003).** A transposon encoding the complete 2,4-dichlorophenoxyacetic acid degradation pathway in the alkali-tolerant strain *Delftia acidovorans* P4a. *Microbiology* **149**, 2545-2556.
- Huong, N. L., Itoh, K. & Suyama, K. (2007).** Diversity of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) and 2,4,5-trichlorophenoxyacetic acid (2,4,5-T)-degrading bacteria in Vietnamese soils. *Microbes Environment* **22**, 243-256.
- Inoue, D., Yamazaki, Y., Tsutsui, H., Sei, K., Soda, S., Fujita, M. & Ike, M. (2012).** Impacts of gene bioaugmentation with pJP4-harboring bacteria of 2,4-D-contaminated soil slurry on the indigenous microbial community. *Biodegradation* **23**, 263-276.
- Itoh, K., Kinoshita, M., Morishita, S., Chida, M. & Suyama, K. (2013).** Characterization of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid and 2,4,5-trichlorophenoxyacetic acid-degrading fungi in Vietnamese soils. *FEMS Microbiol Ecol* **84**, 124-132.
- Itoh, K., Tashiro, Y., Uobe, K., Kamagata, Y., Suyama, K. & Yamamoto, H.**

- (2004). Root nodule *Bradyrhizobium* spp. harbor *tfdA* alpha and *cadA*, homologous with genes encoding 2,4-dichlorophenoxyacetic acid-degrading proteins. *Appl Environ Microb* **70**, 2110-2118.
- Itoh, K., Kanda, R., Momoda, Y., Sumita, Y., Kamagata, Y., Suyama, K. & Yamamoto, H. (2000). Presence of 2, 4-D-catabolizing bacteria in a Japanese arable soil that belong to BANA (*Bradyrhizobium-Agromonas-Nitrobacter-Afipia*) cluster in α -*Proteobacteria*. *Microbes Environment* **15**, 113-117.
- Itoh, K., Kanda, R., Sumita, Y., Kim, H., Kamagata, Y., Suyama, K., Yamamoto, H., Hausinger, R. P. & Tiedje, J. M. (2002). *tfdA*-like genes in 2,4-dichlorophenoxyacetic acid-degrading bacteria belonging to the *Bradyrhizobium-Agromonas-Nitrobacter-Afipia* cluster in α -*proteobacteria*. *Appl Environ Microb* **68**, 3449-3454.
- Ka, J. O. & Tiedje, J. M. (1994). Integration and excision of a 2,4-dichlorophenoxyacetic acid-degradative plasmid in *Alcaligenes paradoxus* and evidence of its natural intergeneric transfer. *J Bacteriol* **176**, 5284-5289.
- Ka, J. O., Holben, W. E. & Tiedje, J. M. (1994). Genetic and phenotypic diversity of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D)-degrading bacteria isolated from 2,4-D-treated field soils. *Appl Environ Microb* **60**, 1106-1115.
- Kado, C. I. & Liu, S. T. (1981). Rapid procedure for detection and isolation of large and small plasmids. *J Bacteriol* **145**, 1365-1373.
- Kakirde, K. S., Wild, J., Godiska, R., Mead, D. A., Wiggins, A. G., Goodman, R. M., Szybalski, W. & Liles, M. R. (2011). Gram negative shuttle BAC vector for heterologous expression of metagenomic libraries. *Gene* **475**, 57-62.
- Kamagata, Y., Fulthorpe, R. R., Tamura, K., Takami, H., Forney, L. J. & Tiedje, J. M. (1997). Pristine environments harbor a new group of oligotrophic 2,4-dichlorophenoxyacetic acid-degrading bacteria. *Appl Environ Microb* **63**, 2266-2272.
- Kane, S. R., Chakicherla, A. Y., Chain, P. S. G., Schmidt, R., Shin, M. W., Legler, T. C., Scow, K. M., Larimer, F. W., Lucas, S. M., Richardson, P. M. & Hristova, K. R. (2007). Whole-genome analysis of the methyl tert-butyl ether-degrading beta-proteobacterium *Methylibium petroleiphilum* PM1. *J Bacteriol* **189**, 4973-4973.
- Kieser, T. (1984). Factors affecting the isolation of ccc DNA from *Streptomyces lividans* and *Escherichia coli*. *Plasmid* **12**, 19-36.
- Kim, D. U., Kim, M. S., Lim, J. S. & Ka, J. O. (2013). Widespread occurrence of

- the *tfd*-II genes in soil bacteria revealed by nucleotide sequence analysis of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid degradative plasmids pDB1 and p712. *Plasmid* **69**, 243-248.
- Kitagawa, W. & Kamagata, Y. (2014).** Diversity of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D)-degradative genes and degrading bacteria. In *Biodegradative Bacteria*, pp. 43-57. Edited by H. Nojiri, M. Tsuda, M. Fukuda & Y. Kamagata: Springer.
- Kitagawa, W., Takami, S., Miyauchi, K., Masai, E., Kamagata, Y., Tiedje, J. M. & Fukuda, M. (2002).** Novel 2,4-dichlorophenoxyacetic acid degradation genes from oligotrophic *Bradyrhizobium* sp. strain HW13 isolated from a pristine environment. *J Bacteriol* **184**, 509-518.
- Laemmli, C. M., Leveau, J. H. J., Zehnder, A. J. B. & van der Meer, J. R. (2000).** Characterization of a second *tfd* gene cluster for chlorophenol and chlorocatechol metabolism on plasmid pJP4 in *Ralstonia eutropha* JMP134 (pJP4). *J Bacteriol* **182**, 4165-4172.
- Lakzian, A., Murphy, P., Turner, A., Beynon, J. L. & Giller, K. E. (2002).** *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* populations in soils with increasing heavy metal contamination: Abundance, plasmid profiles, diversity and metal tolerance. *Soil Biol Biochem* **34**, 519-529.
- Lawley, T., Wilkins, B. M. & Frost, L. S. (2004).** Bacterial conjugation in gram-negative bacteria. In *Plasmid Biology*, pp. 203-226. Edited by B. E. Funnell & G. J. Phillips. Washington, DC, USA: ASM Press.
- Lawley, T. D., Klimke, W. A., Gubbins, M. J. & Frost, L. S. (2003).** F factor conjugation is a true type IV secretion system. *FEMS Microbiology Letters* **224**, 1-15.
- Leander, M., Vallaes, T. & Fulthorpe, R. (1998).** Amplification of putative chlorocatechol dioxygenase gene fragments from alpha- and beta-Proteobacteria. *Can J Microbiol* **44**, 482-486.
- Lee, T. H., Kurata, S., Nakatsu, C. H. & Kamagata, Y. (2005).** Molecular analysis of bacterial community based on 16S rDNA and functional genes in activated sludge enriched with 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) under different cultural conditions. *Microbial Ecol* **49**, 151-162.
- Lee, Z. M. P., Bussema, C. & Schmidt, T. M. (2009).** rrnDB: Documenting the number of rRNA and tRNA genes in bacteria and archaea. *Nucleic Acids Res* **37**, D489-D493.
- Leveau, J. H., Konig, F., Fuchslin, H., Werlen, C. & Van Der Meer, J. R.**

- (1999). Dynamics of multigene expression during catabolic adaptation of *Ralstonia eutropha* JMP134 (pJP4) to the herbicide 2, 4-dichlorophenoxyacetate. *Molecular microbiology* **33**, 396-406.
- Leveau, J. H. J. & van der Meer, J. R. (1997). Genetic characterization of insertion sequence ISJP4 on plasmid pJP4 from *Ralstonia eutropha* JMP134. *Gene* **202**, 103-114.
- Li, S. S., Zhao, H. B., Li, Y. X., Niu, S. M. & Cai, B. L. (2012). Complete genome sequence of the naphthalene-degrading *Pseudomonas putida* strain ND6. *J Bacteriol* **194**, 5154-5155.
- Li, S. S., Zhao, H. B., Li, Y. X., Niu, S. M. & Cai, B. L. (2013). Complete nucleotide sequence of plasmid pND6-2 from *Pseudomonas putida* ND6 and characterization of conjugative genes. *Gene* **512**, 148-156.
- Lim, J. S., Choi, B. S., Choi, A. Y., Kim, K. D., Kim, D. I., Choi, I. Y. & Ka, J. O. (2012). Complete genome sequence of the fenitrothion-degrading *Burkholderia* sp strain YI23. *J Bacteriol* **194**, 896-896.
- Lykidis, A., Perez-Pantoja, D., Ledger, T., Mavromatis, K., Anderson, I. J., Ivanova, N. N., Hooper, S. D., Lapidus, A., Lucas, S., Gonzalez, B. & Kyrpides, N. C. (2010). The complete multipartite genome sequence of *Cupriavidus necator* JMP134, a versatile pollutant degrader. *Plos One* **5**, e9729.
- Macur, R. E., Wheeler, J. T., Burr, M. D. & Inskeep, W. P. (2007). Impacts of 2,4-D application on soil microbial community structure and on populations associated with 2,4-D degradation. *Microbiol Res* **162**, 37-45.
- Mae, A. A., Marits, R. O., Ausmees, N. R., Koiv, V. M. & Heinaru, A. L. (1993). Characterization of a new 2,4-dichlorophenoxyacetic acid degrading plasmid pEST4011: Physical map and localization of catabolic genes. *J Gen Microbiol* **139**, 3165-3170.
- Maeda, K., Nojiri, H., Shintani, M., Yoshida, T., Habe, H. & Omori, T. (2003). Complete nucleotide sequence of carbazole/dioxin-degrading plasmid pCAR1 in *Pseudomonas resinovorans* strain CA10 indicates its mosaicity and the presence of large catabolic transposon Tn4676. *J Mol Biol* **326**, 21-33.
- Maltseva, O., McGowan, C., Fulthorpe, R. & Oriel, P. (1996). Degradation of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid by haloalkaliphilic bacteria. *Microbiol-Sgm* **142**, 1115-1122.
- McGowan, C., Fulthorpe, R., Wright, A. & Tiedje, J. M. (1998). Evidence for interspecies gene transfer in the evolution of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid

- degraders. *Appl Environ Microb* **64**, 4089-4092.
- Mergeay, M., Monchy, S., Janssen, P., Houdt, R. V. & Leys, N. (2009).** Megaplasms in *Cupriavidus* genus and metal resistance. In *Microbial Megaplasms*, pp. 209-238. Edited by E. Schwartz. Berlin, Heidelberg: Springer.
- Molina, L., Bernal, P., Udaondo, Z., Segura, A. & Ramos, J. L. (2013).** Complete genome sequence of a *Pseudomonas putida* clinical isolate, strain H8234. *Genome announcements* **1**, e00496-00413.
- Monchy, S., Benotmane, M. A., Janssen, P., Vallaeys, T., Taghavi, S., van der Lelie, D. & Mergeay, M. (2007).** Plasmids pMOL28 and pMOL30 of *Cupriavidus metallidurans* are specialized in the maximal viable response to heavy metals. *J Bacteriol* **189**, 7417-7425.
- Nelson, M. J., Montgomery, S. O., O'Neill E, J. & Pritchard, P. H. (1986).** Aerobic metabolism of trichloroethylene by a bacterial isolate. *Appl Environ Microb* **52**, 383-384.
- Newby, D. T., Josephson, K. L. & Pepper, I. L. (2000).** Detection and characterization of plasmid pJP4 transfer to indigenous soil bacteria. *Appl Environ Microb* **66**, 290-296.
- Nielsen, T. K., Xu, Z. F., Gozdereliler, E., Aamand, J., Hansen, L. H. & Sorensen, S. R. (2013).** Novel insight into the genetic context of the *cadAB* genes from a 4-chloro-2-methylphenoxyacetic acid-degrading *Sphingomonas*. *Plos One* **8**, e83346.
- Nojiri, H., Shintani, M. & Omori, T. (2004).** Divergence of mobile genetic elements involved in the distribution of xenobiotic-catabolic capacity. *Appl Microbiol Biot* **64**, 154-174.
- Norberg, P., Bergstrom, M., Jethava, V., Dubhashi, D. & Hermansson, M. (2011).** The IncP-1 plasmid backbone adapts to different host bacterial species and evolves through homologous recombination. *Nat Commun* **2**, 268.
- Norman, A., Hansen, L. H. & Sorensen, S. J. (2009).** Conjugative plasmids: Vessels of the communal gene pool. *Philos T R Soc B* **364**, 2275-2289.
- Ochiai, H. & Kaku, H. (1999).** Genetic among *Xanthomonas* species and pathovars based on RFLP analysis of PCR-amplified 16S, 23S rDNA and rDNA internal transcribed spacer. *Ann Phytopathol Soc Jpn* **65**, 437-446.
- Ogawa, N. & Miyashita, K. (1995).** Recombination of a 3-chlorobenzoate catabolic plasmid from *Alcaligenes eutrophus* NH9 mediated by direct repeat elements. *Appl Environ Microb* **61**, 3788-3795.

- Ogawa, N. & Miyashita, K. (1999).** The chlorocatechol-catabolic transposon Tn5707 of *Alcaligenes eutrophus* NH9, carrying a gene cluster highly homologous to that in the 1,2,4-trichlorobenzene-degrading bacterium *Pseudomonas* sp. strain P51, confers the ability to grow on 3-chlorobenzoate. *Appl Environ Microb* **65**, 724-731.
- Ogawa, N., Chakrabarty, A. M. & Zaborina, O. (2004).** Degradative plasmids. In *Plasmid Biology*, pp. 341-376. Edited by B. E. Funnell & G. J. Phillips. Washington, DC, USA: ASM Press.
- Ohta, H. & Hattori, T. (1983).** Oligotrophic bacteria on organic debris and plant-roots in a paddy field soil. *Soil Biol Biochem* **15**, 1-8.
- Ormeno-Orrillo, E., Rogel, M. A., Chueire, L. M. O., Tiedje, J. M., Martinez-Romero, E. & Hungria, M. (2012).** Genome sequences of *Burkholderia* sp. strains CCGE1002 and H160, isolated from legume nodules in Mexico and Brazil. *J Bacteriol* **194**, 6927-6927.
- Osborn, A. M., Tatley, F. M. D., Steyn, L. M., Pickup, R. W. & Saunders, J. R. (2000).** Mosaic plasmids and mosaic replicons: Evolutionary lessons from the analysis of genetic diversity in IncFII-related replicons. *Microbiol-Uk* **146**, 2267-2275.
- Pansegrau, W., Schroder, W. & Lanka, E. (1993).** Relaxase (Tral) of IncPa plasmid RP4 catalyzes a site-specific cleaving-joining reaction of single-stranded DNA. *Proc Natl Acad Sci USA* **90**, 2925-2929.
- Park, I. H. & Ka, J. O. (2003).** Isolation and characterization of 4-(2,4-dichlorophenoxy)butyric acid-degrading bacteria from agricultural soils. *J Microbiol Biotechn* **13**, 243-250.
- Pemberton, J. M. & Fisher, P. R. (1977).** 2,4-D plasmids and persistence. *Nature* **268**, 732-733.
- Pepper, I. L., Gentry, T. J., Newby, D. T., Roane, T. M. & Josephson, K. L. (2002).** The role of cell bioaugmentation and gene bioaugmentation in the remediation of co-contaminated soils. *Environ Health Persp* **110**, 943-946.
- Perez-Mendoza, D., Sepulveda, E., Pando, V., Munoz, S., Nogales, J., Olivares, J., Soto, M. J., Herrera-Cervera, J. A., Romero, D., Brom, S. & Sanjuan, J. (2005).** Identification of the *rctA* gene, which is required for repression of conjugative transfer of rhizobial symbiotic megaplasms. *J Bacteriol* **187**, 7341-7350.
- Perkins, E. J., Gordon, M. P., Caceres, O. & Lurquin, P. F. (1990).** Organization and sequence-analysis of the 2,4-dichlorophenol hydroxylase and

- dichlorocatechol oxidative operons of plasmid pJP4. *J Bacteriol* **172**, 2351-2359.
- Poh, R. P., Smith, A. R. & Bruce, I. J. (2002).** Complete characterisation of Tn5530 from *Burkholderia cepacia* strain 2a (pIJB1) and studies of 2,4-dichlorophenoxyacetate uptake by the organism. *Plasmid* **48**, 1-12.
- Rabus, R., Kube, M., Heider, J., Beck, A., Heitmann, K., Widdel, F. & Reinhardt, R. (2005).** The genome sequence of an anaerobic aromatic-degrading denitrifying bacterium, strain EbN1. *Arch Microbiol* **183**, 27-36.
- Ravatn, R., Studer, S., Springael, D., Zehnder, A. J. B. & van der Meer, J. R. (1998).** Chromosomal integration, tandem amplification, and deamplification in *Pseudomonas putida* F1 of a 105-kilobase genetic element containing the chlorocatechol degradative genes from *Pseudomonas* sp. strain B13. *J Bacteriol* **180**, 4360-4369.
- Rheinwald, J. G., Chakrabaty, A. M. & Gunsalus, I. C. (1973).** Transmissible plasmid controlling camphor oxidation in *Pseudomonas putida*. *Pro Natl Acad Sci USA* **70**, 885-889.
- Roberts, A. P., Chandler, M., Courvalin, P., Guedon, G., Mullany, P., Pembroke, T., Rood, J. I., Smith, C. J., Summers, A. O., Tsuda, M. & Berg, D. E. (2008).** Revised nomenclature for transposable genetic elements. *Plasmid* **60**, 167-173.
- Romine, M. F., Stillwell, L. C., Wong, K. K., Thurston, S. J., Sisk, E. C., Sensen, C., Gaasterland, T., Fredrickson, J. K. & Saffer, J. D. (1999).** Complete sequence of a 184-kilobase catabolic plasmid from *Sphingomonas aromaticivorans* F199. *J Bacteriol* **181**, 1585-1602.
- Saito, A., Mitsui, H., Hattori, R., Minamisawa, K. & Hattori, T. (1998).** Slow-growing and oligotrophic soil bacteria phylogenetically close to *Bradyrhizobium japonicum*. *FEMS Microbiol Ecol* **25**, 277-286.
- Sambrook, J. & Russell, D. W. (2001).** *Molecular Cloning: a laboratory manual*, 3rd edn. Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Satuti, N. N., Moriguchi, K., Sato, M., Kataoka, M., Maeda, Y., Tanaka, N. & Yoshida, K. (2000).** Genome structure of Ri plasmid (3). Sequencing analysis of the vir region of pRi1724 in Japanese *Agrobacterium rhizogenes*. *Nucleic Acids Symposium Series* **44**, 95-96.
- Schattner, P., Brooks, A. N. & Lowe, T. M. (2005).** The tRNAscan-SE, snoscan and snoGPS web servers for the detection of tRNAs and snoRNAs. *Nucleic Acids*

Res **33**, W686-W689.

- Schwartz, E. (2008). *Microbial Megaplasms*. Springer.
- Sen, D., Van der Auwera, G. A., Rogers, L. M., Thomas, C. M., Brown, C. J. & Top, E. M. (2011). Broad-host-range plasmids from agricultural soils have IncP-1 backbones with diverse accessory genes. *Appl Environ Microb* **77**, 7975-7983.
- Seo, Y. S., Lim, J., Choi, B. S., Kim, H., Goo, E., Lee, B., Lim, J. S., Choi, I. Y., Moon, J. S., Kim, J. & Hwang, I. (2011). Complete genome sequence of *Burkholderia gladioli* BSR3. *J Bacteriol* **193**, 3149-3149.
- Shimizu, S., Kobayashi, H., Masai, E. & Fukuda, M. (2001). Characterization of the 450-kb linear plasmid in a polychlorinated biphenyl degrader, *Rhodococcus* sp. strain RHA1. *Appl Environ Microb* **67**, 2021-2028.
- Silver, S. & Phung, L. T. (2005). Genes and enzymes involved in bacterial oxidation and reduction of inorganic arsenic. *Appl Environ Microb* **71**, 599-608.
- Smillie, C., Garcillan-Barcia, M. P., Francia, M. V., Rocha, E. P. C. & de la Cruz, F. (2010). Mobility of plasmids. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **74**, 434-452.
- Sota, M., Yano, H., Nagata, Y., Ohtsubo, Y., Genka, H., Anbutsu, H., Kawasaki, H. & Tsuda, M. (2006). Functional analysis of unique class II insertion sequence IS1071. *Appl Environ Microb* **72**, 291-297.
- Stolz, A. (2009). Molecular characteristics of xenobiotic-degrading sphingomonads. *Appl Microbiol Biot* **81**, 793-811.
- Stolz, A. (2014). Degradative plasmids from sphingomonads. *FEMS Microbiology Letters* **350**, 9-19.
- Streber, W. R., Timmis, K. N. & Zenk, M. H. (1987). Analysis, cloning, and high-level expression of 2,4-dichlorophenoxyacetate monooxygenase gene *tfdA* of *Alcaligenes eutrophus* JMP134. *J Bacteriol* **169**, 2950-2955.
- Summers, D. K. (1996). *The biology of plasmids*. Blackwell Science.
- Suwa, Y., Wright, A. D., Fukimori, F., Nummy, K. A., Hausinger, R. P., Holben, W. E. & Forney, L. J. (1996). Characterization of a chromosomally encoded 2,4-dichlorophenoxyacetic acid alpha-ketoglutarate dioxygenase from *Burkholderia* sp. strain RASC. *Appl Environ Microb* **62**, 2464-2469.
- Szczepanowski, R., Eikmeyer, F., Harfmann, J., Blom, J., Rogers, L. M., Top, E. M. & Schluter, A. (2011). Sequencing and comparative analysis of IncP-1 alpha antibiotic resistance plasmids reveal a highly conserved backbone and

- differences within accessory regions. *J Biotechnol* **155**, 95-103.
- Takahashi, Y., Minamikawa, R., Hattori, K. H., Kurishima, K., Kihou, N. & Yuita, K. (2004).** Arsenic behavior in paddy fields during the cycle of flooded and non-flooded periods. *Environ Sci Technol* **38**, 1038-1044.
- Takami, H., Nakasone, K., Hirama, C., Takaki, Y., Masui, N., Fuji, F., Nakamura, Y. & Inoue, A. (1999).** An improved physical and genetic map of the genome of alkaliphilic *Bacillus* sp. C-125. *Extremophiles* **3**, 21-28.
- Takeuchi, M., Hamana, K. & Hiraishi, A. (2001).** Proposal of the genus *Sphingomonas sensu stricto* and three new genera, *Sphingobium*, *Novosphingobium* and *Sphingopyxis*, on the basis of phylogenetic and chemotaxonomic analyses. *Int J Syst Evol Microbiol* **51**, 1405-1417.
- Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M. & Kumar, S. (2011).** MEGA5: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol Biol Evol* **28**, 2731-2739.
- Taylor, D. E., Gibreel, A., Lawley, T. D. & Tracz, D. M. (2004).** Antibiotic resistance plasmids. In *Plasmid Biology*. Edited by B. E. Funnell & G. J. Phillips. Washington, DC, USA: ASM Press.
- Thiel, M., Kaschabek, S., Groning, J., Mau, M. & Schlomann, M. (2005).** Two unusual chlorocatechol catabolic gene clusters in *Sphingomonas* sp. TFD44. *Arch Microbiol* **183**, 80-94.
- Thomas, C. M. (2000).** Paradigms of plasmid organization. *Molecular microbiology* **37**, 485-491.
- Thomas, C. M. (2004).** Evolution and population genetics of bacterial plasmids. In *Plasmid Biology*, pp. 509-528. Edited by B. E. Funnell & G. J. Phillips. Washington, DC, USA: ASM Press.
- Tonso, N. L., Matheson, V. G. & Holben, W. E. (1995).** Polyphasic characterization of a suite of bacterial isolates capable of degrading 2,4-D. *Microbial Ecol* **30**, 3-24.
- Top, E. M., Maltseva, O. V. & Forney, L. J. (1996).** Capture of a catabolic plasmid that encodes only 2,4-dichlorophenoxyacetic acid alpha-ketoglutaric acid dioxygenase (TfdA) by genetic complementation. *Appl Environ Microb* **62**, 2470-2476.
- Top, E. M., Springael, D. & Boon, N. (2002).** Catabolic mobile genetic elements and their potential use in bioaugmentation of polluted soils and waters. *FEMS*

Microbiol Ecol **42**, 199-208.

- Top, E. M., Van Daele, P., De Saeyer, N. & Forney, L. J. (1998).** Enhancement of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) degradation in soil by dissemination of catabolic plasmids. *Anton Leeuw Int J G* **73**, 87-94.
- Toussaint, A., Merlin, C., Monchy, S., Benotmane, M. A., Leplae, R., Mergeay, M. & Springael, D. (2003).** The biphenyl- and 4-chlorobiphenyl-catabolic transposon Tn4371, a member of a new family of genomic islands related to IncP and Ti plasmids. *Appl Environ Microb* **69**, 4837-4845.
- Trefault, N., Clement, P., Manzano, M., Pieper, D. H. & Gonzalez, B. (2002).** The copy number of the catabolic plasmid pJP4 affects growth of *Ralstonia eutropha* JMP134 (pJP4) on 3-chlorobenzoate. *FEMS Microbiology Letters* **212**, 95-100.
- Trefault, N., De la Iglesia, R., Molina, A. M., Manzano, M., Ledger, T., Perez-Pantoja, D., Sanchez, M. A., Stuardo, M. & Gonzalez, B. (2004).** Genetic organization of the catabolic plasmid pJP4 from *Ralstonia eutropha* JMP134 (pJP4) reveals mechanisms of adaptation to chloroaromatic pollutants and evolution of specialized chloroaromatic degradation pathways. *Environ Microbiol* **6**, 655-668.
- Tuffin, I. M., Hector, S. B., Deane, S. M. & Rawlings, D. E. (2006).** Resistance determinants of a highly arsenic-resistant strain of *Leptospirillum ferriphilum* isolated from a commercial biooxidation tank. *Appl Environ Microb* **72**, 2247-2253.
- Vallaey, T., Fulthorpe, R. R., Wright, A. M. & Soulas, G. (1996).** The metabolic pathway of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid degradation involves different families of *tfdA* and *tfdB* genes according to PCR-RFLP analysis. *FEMS Microbiol Ecol* **20**, 163-172.
- Vallaey, T., Albino, L., Soulas, G., Wright, A. D. & Weightman, A. J. (1998).** Isolation and characterization of a stable 2,4-dichlorophenoxyacetic acid degrading bacterium, *Variovorax paradoxus*, using chemostat culture. *Biotechnol Lett* **20**, 1073-1076.
- Vallaey, T., Courde, L., Mc Gowan, C., Wright, A. D. & Fulthorpe, R. R. (1999).** Phylogenetic analyses indicate independent recruitment of diverse gene cassettes during assemblage of the 2,4-D catabolic pathway. *FEMS Microbiol Ecol* **28**, 373-382.
- van der Meer, J. R. (2008).** A genomic view on the evolution of catabolic pathways

- and bacterial adaptation to xenobiotic compounds. In *Microbial Biodegradation: Genomics and Molecular Biology*, pp. 219-267. Edited by E. Díaz. Norfolk, UK: Caister Academic Press.
- Vedler, E., Vahter, M. & Heinaru, A. (2004).** The completely sequenced plasmid pEST4011 contains a novel IncP1 backbone and a catabolic transposon harboring *tfd* genes for 2,4-dichlorophenoxyacetic acid degradation. *J Bacteriol* **186**, 7161-7174.
- Wang, M. & Lai, E. (1995).** Pulsed field separation of large supercoiled and open-circular DNAs and its application to bacterial artificial chromosome cloning. *Electrophoresis* **16**, 1-7.
- Weilharter, A., Mitter, B., Shin, M. V., Chain, P. S. G., Nowak, J. & Sessitsch, A. (2011).** Complete genome sequence of the plant growth-promoting endophyte *Burkholderia phytofirmans* strain PsJN. *J Bacteriol* **193**, 3383-3384.
- Yano, H., Rogers, L. M., Knox, M. G., Heuer, H., Smalla, K., Brown, C. J. & Top, E. M. (2013).** Host range diversification within the IncP-1 plasmid group. *Microbiol-Sgm* **159**, 2303-2315.
- Zabaloy, M. C. & Gomez, M. A. (2014).** Isolation and characterization of indigenous 2,4-D herbicide degrading bacteria from an agricultural soil in proximity of Sauce Grande River, Argentina. *Ann Microbiol* **64**, 969-974.
- Zhou, J. Z., Bruns, M. A. & Tiedje, J. M. (1996).** DNA recovery from soils of diverse composition. *Appl Environ Microb* **62**, 316-322.
- 松中 (2002). 日本における農薬の歴史. 学会出版センター.
- 谷 & 竹内 (1993). 環境分離株からの巨大プラスミドの抽出. *Bulletin of Japanese Society of Microbial Ecology* **8**, 67-71.
- 中島 & 小倉 (2008). コプラナーPCB. 丸善株式会社.
- 農薬ハンドブック (2011). 日本植物防疫協会.
- 農薬要覧 (1963-2014). 日本植物防疫協会

付記

本題に関する研究の成果は、以下の雑誌及び学会にて発表した。

論文

Yoriko Sakai, Naoto Ogawa, Yumi Shimomura, and Takeshi Fujii (2014) A 2,4-dichlorophenoxyacetic acid degradation plasmid pM7012 discloses distribution of an unclassified megaplasmid group across bacterial species. *Microbiology*, 160, 525-536

Yoriko Sakai, Naoto Ogawa, Takeshi Fujii, Kazuo Sugahara, Kiyotaka Miyashita, and Akira Hasebe (2007) 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid-degrading genes from bacteria isolated from soil in Japan: spread of *Burkholderia cepacia* RASC-type degrading genes harbored on large plasmids. *Microbes and Environments*, 22: 145-156

学会発表

酒井順子, 小川直人, 下村有美, 藤井毅 (2014) 2,4-D分解プラスミドの配列解析から示された未分類の伝達性プラスミドグループ、環境微生物系学会合同大会

Yoriko Sakai, Yumi Shimomura, Naoto Ogawa, Takeshi Fujii (2010) Structure of 2,4-D degrading megaplasmids distributed throughout paddy fields in Japan、日本微生物生態学会

酒井順子, 小川直人, 藤井毅 (2010) 2,4-D分解メガプラスミドpM7012の保有する遺伝子の解析、日本土壤微生物学会

Yoriko Sakai, Naoto Ogawa, Takeshi Fujii, and Akira Hasebe (2005) Large plasmids coding 2,4-D degrading genes in bacteria isolated in Japan, 8th Symposium on Bacterial Genetics and Ecology

Yoriko Sakai, Naoto Ogawa, Kiyotaka Miyashita, Takeshi Fujii, Kazuo Sugahara, Akira Hasebe (2004) The diversity of *tfdA*, *tfdB* and *tfdC* of 2,4-D degrading bacteria isolated from Japanese paddy field, 10th international symposium on Microbiol Ecology

酒井順子, 小川直人, 長谷部亮 (2002) 日本各地で分離された2,4-D分解菌の*tfd*遺伝子群について、日本微生物生態学会

酒井順子, 小川直人, 長谷部亮 (2002) 日本各地で分離された2,4-D分解菌の*tfdA*及び*tfdC*の系統解析、日本土壤肥料学会

酒井順子, 小川直人, 長谷部亮 (2001) 日本各地の水田土壌より分離した2,4-D分解菌のクロロカテコール分解遺伝子について、日本微生物生態学会

酒井順子, 小川直人, 菅原和夫, 長谷部亮, 宮下清貴 (2001) 日本各地の水田土壌からの 2,4-D 分解菌の分離、日本土壤肥料学会