

博 士 論 文

腸管病原性ウエルシュ菌 F5603 株中のバクテリ
オシン遺伝子保有プラスミドについての検討

徳島文理大学大学院薬学研究科
薬学専攻 博士課程

宮 本 和 明

指導教授 永浜政博

腸管病原性ウエルシュ菌 F5603 株中のバクテリオシン遺伝子保有プラスミドの検討

目次

第一章 緒論.....	2
第二章 腸管病原性ウエルシュ菌 F5603 株中のエンテロトキシン遺伝子保有プラスミドと共存するプラスミド (pBCNF5603).....	7
2-1. pBCNF5603 に認められる遺伝子の機能の推定.....	7
第三章 pBCNF5603 のバクテリオシン (BCN5603) について.....	11
3-1. BCN5603 遺伝子の比較ゲノム学的検討.....	11
3-2. BCN5603 産生調節領域の比較ゲノム学的検討.....	13
3-3. BCN5603 のストレス刺激による産生促進.....	15
第四章 pBCNF5603 のプラスミドの複製領域.....	21
4-1. pBCNF5603 のプラスミド複製領域の同定.....	21
4-2. 複製開始タンパク質 (Rep) 遺伝子の比較ゲノム学的検討.....	29
第五章 プラスミドの和合性 (compatibility) の検討.....	36
第六章 pBCNF5603 のプラスミド分配領域の安定性への関与.....	44
6-1. ウエルシュ菌宿主株での安定性.....	44
6-2. 推定プラスミド分配領域の比較ゲノム学的検討.....	51
第七章 総括.....	56
第八章 今後の展望.....	58
参考文献.....	61
参考資料.....	65
発表論文.....	89

第一章 緒 論

細菌の遺伝物質としては、染色体がある。染色体は、細菌において必須のもので、通常 1 つしか存在しないが、遺伝学的に rRNA 遺伝子を持つものと定義することで、複数有するものも知られている（腸炎ビブリオ¹⁾やセパシア菌²⁾では複数の染色体 DNA が存在する）。染色体以外に自己複製能をもつ DNA（レプリコン）としては、プラスミド（大きさに規定はなく、小さいものから大きいものまで様々で、染色体と異なり rRNA（リボゾーム RNA）遺伝子を持たない DNA で同一のプラスミドがひとつの細菌細胞内に複数コピー存在する場合がある）や細菌のウイルスであるバクテリオファージ（プラスミドと区別が容易でない場合もある）が知られている。これらは、細胞質に存在する DNA（遺伝情報を持つもの）ということでエピソーマル(episomal) DNA と総称される。これらの染色体以外の遺伝物質は、菌の生存に必須ではないが、菌の性質（特定の菌名も含めて）を決めている場合がいくつか知られている。例えば、赤痢菌³⁾では染色体自身は大腸菌とほぼ同じであるが、毒素遺伝子などを保有するプラスミドが存在することで赤痢菌としての生物学的、免疫学的性質を示す。また、炭疽菌⁴⁾も染色体は近縁菌種であるセレウス菌とほぼ同じであり、炭疽菌としての生物学的特徴は、保有する大きな 2 種類のプラスミドに由来する。これらの菌ではプラスミドは病原性にも重要で、赤痢菌³⁾では、毒素や病原性に重要な遺伝子は大きなプラスミドにあり、炭疽菌⁴⁾では、毒素遺伝子などを含むトランスポゾンがプラスミドにある。また、ボツリヌス菌では、多くの病原性を持つ株は毒素遺伝子が染色体上ではなくプラスミドやファージに存在することが知られている。ウエルシュ菌についても、遺伝学的に多くの毒素遺伝子がプラスミドに存在することからプラスミドが病原性に重要であることが報告されている^{5,6)}。

ウエルシュ菌 (*Clostridium perfringens*) は、土壌、淡水、海水、ヒトや動物の腸管、食品など生活に密着した環境に幅広く存在することが知られている。一方で、ウエルシュ菌は、病原性の強い細菌の一つとして古くから知られており、ヒトではガス壊疽に代表される致死性化膿性感染症や規模の大きな食中毒を起こす。また、動物で

は毒素に起因する致死性感染症を起こし、多大な経済的損失をもたらす。古くから知られている主要毒素の産生パターンからウエルシュ菌は、A-E型の5つの型に分類されている(表1)。主要毒素とは、染色体上に遺伝子を持つ α 毒素とそれに加えてプラスミド上に遺伝子が存在する β 、 ϵ 、 ι の3種類の毒素のことである。その他の重要な毒素としては、食中毒に代表されるヒト腸管病原性に重要なエンテロトキシン(エンテロトキシンは、その遺伝子が染色体に存在する株とプラスミド上に持つ株がある非常に特異な毒素である)、最近見つけられたニワトリなどの鳥類の壊死性腸炎の主要毒素であるNetB毒素などもその遺伝子はプラスミドにある^{5, 6)}。ウエルシュ菌が疾患を起こすために必須の毒素遺伝子、つまり、多くの重要な毒素遺伝子がプラスミドに存在することから、毒素遺伝子を持つプラスミドは、病原性に必須と考えられる。また、病原性との関連が深い毒素の遺伝子の多くが染色体ではなくプラスミドに存在することは、ヒトや多くの動物で様々な病気の原因となる多様性が認められることに関連していると推測される。

表1 ウエルシュ菌の型別とそれぞれの型によるヒトと家畜の疾患

毒素型	型別に応用される主要毒素				疾患との関連が深い毒素	ヒトの疾患	家畜の疾患
	α 毒素	β 毒素	ϵ 毒素	ι 毒素			
A	+				CPE (Enterotoxin) NetB 毒素 β 2毒素	ガス壊疽 食中毒、下痢症	ガス壊疽 腸炎 壊死性腸炎 腸炎
B	+	+	+				壊死性腸炎、エンテロトキセミア
C	+	+				壊死性腸炎	壊死性腸炎、エンテロトキセミア
D	+		+				エンテロトキセミア
E	+			+		食中毒	腸炎

ウエルシュ菌の型別に応用されているいわゆる主要毒素やヒトの腸管病原性に最も重要なエンテロトキシンの遺伝子を保有しているプラスミドのいくつかについては全塩基配列が明らかにされており、遺伝学的に詳しく解析できるようになった^{5, 6, 7, 8, 9)}。しかし、主要毒素遺伝子を保有するプラスミド上に認められる遺伝子の多くは、機能が不明である。全塩基配列が決定されている主要毒素遺伝子を保有するプラスミ

ドでは約 30 kb という比較的大きい連続した保存領域が共通して認められる^{5, 6)}。この領域には、プラスミドの複製や分配に関連した領域が同定されており、分子生物学の手法によりその機能がある程度推測されてきている^{5, 6, 10)}。しかし、プラスミドの複製や分配に関連した遺伝子群の詳細については研究が始まったばかりである。この大きな保存領域で最も詳しく検討されているのは、プラスミドの伝達装置に関連したタンパク質の遺伝子群がある^{5, 6)}。ウエルシュ菌のプラスミド伝達装置は大腸菌で詳細に調べられている伝達装置と比較するとかなりの相違が認められ、ウエルシュ菌の毒素遺伝子を保有するプラスミドに特有のものであることが知られている^{5, 6)}。約 30 kb の大きい保存領域には、その他にアデニンメチル化酵素、シトシンメチル化酵素や比較的大きいコラーゲン結合蛋白に相同性を持つタンパク質などが認められるが、その働きについては現在までのところほとんど研究がされていない。一方、非保存領域には、機能がはっきりしている毒素遺伝子の領域を除いて、ほとんどの遺伝子が機能だけでなく、実際に発現しているかどうか不明である。

毒素遺伝子保有プラスミドの全塩基配列の情報を利用して、多くの病原性株に存在する主要毒素遺伝子保有プラスミドについて共通性や多様性について調査が行われてきた^{5, 6)}。その結果、プラスミドの複製や伝達に関連した遺伝子群を含む約 30 kb の保存領域は、一部の株のプラスミドを除いてほとんどの病原性株のプラスミドで認められることが明らかとなり、毒素遺伝子保有プラスミドは保存領域という基本構造を有することが報告された^{5, 6)}。一方、毒素遺伝子を含む非保存領域については、かなりの多様性があることも判明した^{5, 6)}。これらのことから、毒素遺伝子保有プラスミドについては、プラスミドの伝達など遺伝学的背景がある程度解明された。しかし、ウエルシュ菌の病原性株には、毒素遺伝子保有プラスミド以外にも多くのプラスミドがしばしば認められる。しかしながら、ウエルシュ菌の存続や病原性などにおけるそれらの共存プラスミドの役割はほとんど知られていない。

毒素遺伝子を保有するプラスミド以外のプラスミドについて、近年の分子生物学的方法を用いた全塩基配列の決定による研究がいくつか報告されている^{5, 6, 8, 9)}。全塩基配列が報告されているプラスミドには、毒素遺伝子保有プラスミドと共存するテトラ

サイクリン耐性遺伝子をもつ pCW3 プラスミド^{5, 6, 10}、毒素遺伝子保有プラスミドを持たない Strain 13 株に存在する pCP13 プラスミド¹¹や CPN50 株に認められるバクテリオシン遺伝子を持つ pIP404 プラスミド¹²が知られている。また、我々が以前にシーケンスを行った pBCNF5603 プラスミドもある。テトラサイクリン耐性遺伝子を持つ pCW3 プラスミドは、典型的な毒素遺伝子保有プラスミドの保存領域、つまり、プラスミドの複製やプラスミドの伝達に関連した遺伝子群を含む領域を保有しており、典型的な毒素遺伝子保有プラスミドの亜型であると考えられる^{5, 6, 10}。一方、分子生物学的研究の実験にしばしば用いられている Strain 13 株に認められる pCP13 プラスミド¹¹には、 $\beta 2$ 毒素の遺伝子が認められるが、毒素遺伝子を持つ典型的なプラスミドに認められる保存領域を保持せず、その複製やこのプラスミド上に認められるその他の遺伝子の機能についてはほとんど研究されていない。また、 α 毒素以外の毒素遺伝子を持たない株である CPN50 株に認められるバクテリオシン遺伝子を保有する pIP404 プラスミドは、プラスミドの複製に必須の Rep タンパク質をコードしている遺伝子が同定されている¹²。この Rep 遺伝子を用いて、大腸菌とウエルシュ菌のシャトルベクターが作成されており、分子生物学的研究に応用されている^{13, 14}。また、この pIP404 プラスミドでは、バクテリオシン遺伝子とバクテリオシン発現制御領域が詳しく研究されている^{15, 16}。しかし、pIP404 プラスミドを持つ CPN50 株は、 α 毒素以外の毒素遺伝子を保有する株ではないため、pIP404 プラスミド自身の病原性における関与については不明である。一方、病原性株に認められる全塩基配列（おそらく）の決まっている共存プラスミドが GenBank にいくつかみられるが、その役割はほとんど研究されていない。しかし、病原性ウエルシュ菌株が、毒素産生により致死性の疾患を起こすためには、環境に広く分布している非病原性のウエルシュ菌や他の細菌を抑えて大量に増殖し、病原性発現に十分な量の毒素を産生することが必要であると考えられる。この点について病原性株に毒素遺伝子保有プラスミドと同時に存在するプラスミドが病原性発現に関与している可能性が考えられる。

本研究室では、細胞レベルにおける病原性に重要な主要毒素の作用機序について様々な面から研究を続けている。本研究では、病原性の発現に最も重要な毒素の分子

生物学的活性という視点から少し離れて、毒素産生ウエルシュ菌が病原性を発揮するために十分な量の毒素を産生する必要があるという点に注目した。そこで、毒素産生能を持ったウエルシュ菌株が大量に増殖することを可能にすることで病原性に関わっているであろうと考えられる因子を分子生物学的手法により遺伝学的観点から検討した。特に、多くの毒素遺伝子がプラスミドに存在するという点を考え、病原性株において毒素遺伝子保有プラスミドと共存するプラスミドに注目した。今回、腸管病原性株である F5603 株のエンテロトキシン遺伝子保有 pCPF5603 プラスミドと同時に存在し、以前にその全塩基配列を決定した pBCNF5603 プラスミド(参考資料 13、14) に認められるいくつかの遺伝子の機能を明らかにした。

pBCNF5603 プラスミドは、36,695 塩基対 (アクセッション番号 : AB189671) からなっており、PFGE の結果から推測されるエンテロトキシン遺伝子保有プラスミドと共存するプラスミドの大きさ、約 40 kb とほぼ同様の大きさである (図 1)。このプラスミドの GC%は 25.4%で、共存するエンテロトキシン遺伝子保有プラスミド pCPF5603 の GC%の 25.3%⁸⁾とほとんど同一で、もうひとつのプロトタイプのエンテロトキシン遺伝子保有プラスミド pCPF4969 の GC%、26.6%よりやや低い。

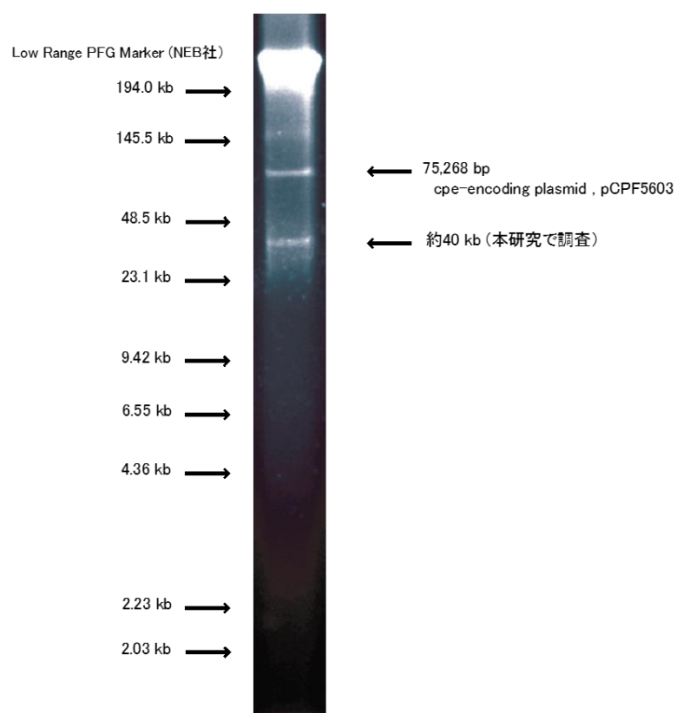


図1 PFGE法によるウエルシュ菌F5603株のプラスミドの解析

第二章 腸管病原性ウエルシュ菌 F5603 株中のエンテロトキシン遺伝子保有プラスミドと共存するプラスミド (pBCNF5603)

本研究では、ウエルシュ菌 F5603 株を使用した。F5603 株は、ヒトの下痢症患者に由来し、腸管毒であるエンテロトキシンの産生能が確認されており、腸管病原性を持つと考えられている。この株のエンテロトキシン遺伝子保有プラスミドは、全塩基配列がすでに報告⁸⁾されており、この株のエンテロトキシン遺伝子保有プラスミドは、大きく 2 種類に分けられるエンテロトキシン遺伝子保有プラスミドのプロトタイプの一つである^{5,6)}。また、この F5603 株には、以前に行った PFGE (Pulsed-Field Gel Electrophoresis) 法による解析 (図 1) で、エンテロトキシン遺伝子を保有するプラスミドと同時に pBCNF5603 プラスミド (約 37 kb) が認められる⁸⁾。エンテロトキシン遺伝子保有プラスミドだけでなく、同時に存在しているプラスミドも非常に安定して存在するプラスミドであることから、このプラスミドも本株の病原性に関わる因子を保有する可能性が考えられる。そこで、実際にどのような遺伝子がこのプラスミドに存在し、それらの遺伝子にどのような機能を持つ可能性があるのかについて検討し、本プラスミドの病原性への関与についての役割を明らかにする目的で研究を行った。

2-1. pBCNF5603 と pCP8533S12 に認められる遺伝子の機能の推定

<使用したソフトウェア>

ORF Finder ソフトウェア (NCBI)

BLAST ソフトウェア (NCBI)

<方法>

2 種類のプラスミドの塩基配列を用いて、NCBI の ORF Finder プログラムを利用し、Open Reading Frame (ORF) を推測し、その後、開始コドン上流の SD 配列 (Shine-Dalgarno 配列) を推測し、ORF の開始コドン (細菌の場合、開始コドンは、ATG だけでなく TTG、GTG、CTG なども開始コドンとして働くため) を決定し、

ORF を決定した。NCBI の BLAST プログラムを利用して、決定した各 ORF と相同性を持つ遺伝子の遺伝情報を調査し、その機能を推測した。

<結果と考察>

エンテロトキシン遺伝子保有プラスミドと共存する pBCNF5603 プラスミドの推測される遺伝子は 36 個で、そのうち pCP13 プラスミドの遺伝子と相同性を持った遺伝子が 15 個、pIP404 プラスミドの遺伝子と類似したものが 8 個認められた。相同性から pCP13 プラスミド上の遺伝子の領域は、2 つの連続した領域として認められ、pIP404 プラスミドの遺伝子も 2 つの連続した領域として認められた。これらのことから、pBCNF5603 プラスミドの中心となる部分は、pCP13 プラスミドと pIP404 プラスミドがモザイク状に組合わされたものと考えられた (図 2、表 2)。

相同性検索の結果、17 個の遺伝子の機能を推測することができた。主なものには、pCP13 プラスミド上の遺伝子と相同性のあるプラスミドの分配と関連を持つ ParA (Soj) 遺伝子、ParB 遺伝子や細胞壁結合タンパク質の 3 つが認められた¹¹⁾。また、pIP404 プラスミドの遺伝子と相同性を持つものには、UviA 遺伝子、UviB 遺伝子、バクテリオシン遺伝子のバクテリオシン産生系の遺伝子群、プラスミドの複製系の複製開始タンパク質 (Rep) 遺伝子、Cop (Copy number protein) 遺伝子が認められた¹²⁾。その他のものでは、エンテロコッカス属の二成分制御系の遺伝子、ABC 型の物質転送系の遺伝子群が認められた。さらに、GenBank 上の遺伝子と相同性を持たないものが 3 個、相同性を持つが機能未知の保存推測タンパク質 (Conserved hypothetical protein) 遺伝子 9 個と推測タンパク質 (Hypothetical protein) 遺伝子 7 個が認められた。これらの機能未知のものの中にはウエルシュ菌の染色体上の遺伝子と相同性を持つものが 2 個存在していた¹¹⁾。

プラスミドの複製に関連する遺伝子としては、pIP404 プラスミドと相同性を持つ ORF が認められた。しかし、pCP13 プラスミドの複製に関連した遺伝子は認められなかった。これは、pCP13 プラスミドのプラスミドの複製に関与する遺伝子が同定されていないことと関係すると考えられる。

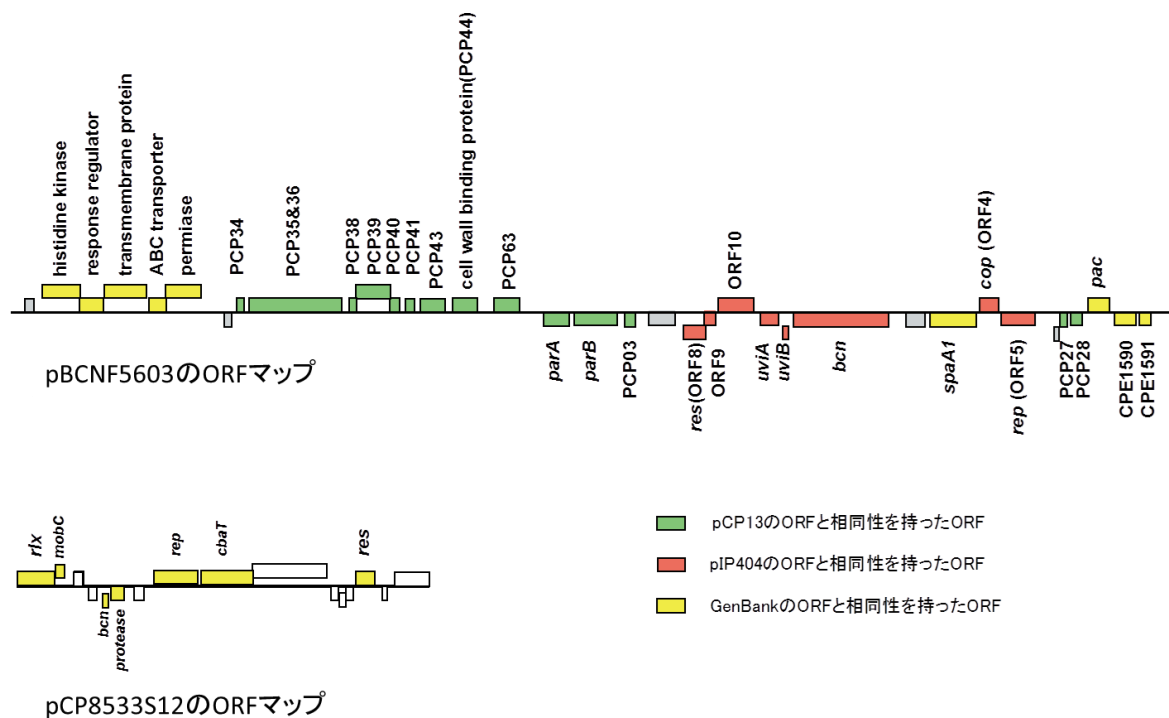


図2 本研究で遺伝子の機能解析を行ったプラスミドのOpen Reading Frame (ORF) マップ

B型 NCTC8533 株の pCP8533S12 プラスミドも pBCNF5603 プラスミドと同様の方法で解析した結果、推測される ORF は 16 個であった (図 2、表 3)。このうち機能を推測できたものが 9 個存在していた。この中には、菌の移動に関連した Mob 遺伝子群の一部、バクテリオシン様のタンパク質をコードする遺伝子、プロテアーゼ遺伝子、プラスミドの複製に関連する Rep 遺伝子、ABC 型の物質転送関連の遺伝子群、DNA に関連を有するリラクサーゼ (relaxase) 遺伝子やレゾルバーゼ (resolvase) 遺伝子と相同性を持つ遺伝子が認められた。プラスミドの複製に必須の Rep 遺伝子は、pIP404 プラスミドの Rep 遺伝子と相同性を持っていた¹²⁾。

今までの研究から得られた塩基配列を比較すると、NTCC8533 株の ϵ 毒素遺伝子保有プラスミド、 β 毒素遺伝子保有プラスミド、 λ 毒素遺伝子保有プラスミド (ウレアーゼ遺伝子群も保有) は、ATCC3626 株のそれぞれの毒素遺伝子保有プラスミドの塩基配列と非常に類似していた (未発表データ)。これらの毒素遺伝子保有プラスミドに加えて、この小さいプラスミドがほとんど同じであることから、NCTC8533 株と ATCC3626 株は同じ由来であることが考えられる。

表2 pBCNF5603プラスミドに認められる遺伝子とその相同性

putative ORF	homologous ORF	results of BLAST search
PBCN01		no homology
PBCN02	<i>vncS</i>	sensor histidine kinase [Enterococcus faecalis V583]
PBCN03	<i>vncR</i>	DNA-binding response regulator [Enterococcus faecalis V583]
PBCN04	<i>vex3</i>	permease, putative [Enterococcus faecalis V583]
PBCN05	<i>vex2</i>	ABC-type antimicrobial peptide transport system ATPase component [Enterococcus faecium]
PBCN06	<i>vex1</i>	ABC-type antimicrobial peptide transport system, permease component [Enterococcus faecium]
PBCN07		no homology
PBCN08	PCP34	hypothetical protein PCP34 [Clostridium perfringens st13]
PBCN09	PCP35&36	conserved hypothetical protein PCP35 [Clostridium perfringens st13] conserved hypothetical protein PCP36 [Clostridium perfringens st13]
PBCN10	PCP38	hypothetical protein PCP38 [Clostridium perfringens st13]
PBCN11	PCP39	conserved hypothetical protein PCP39 [Clostridium perfringens st13]
PBCN12	PCP40	hypothetical protein PCP40 [Clostridium perfringens st13]
PBCN13	PCP41	hypothetical protein PCP41 [Clostridium perfringens st13]
PBCN14	PCP43	conserved hypothetical protein PCP43 [Clostridium perfringens st13]
PBCN15	PCP44	probable cell wall-binding protein [Clostridium perfringens st13]
PBCN16	PCP63	hypothetical protein PCP63 [Clostridium perfringens st13]
PBCN17	<i>soj (parA)</i>	Soj protein [Clostridium perfringens st13]
PBCN18	<i>parB</i>	ParB protein [Clostridium perfringens st13]
PBCN19	PCP03	hypothetical protein PCP03 [Clostridium perfringens st13]
PBCN20		similar to conjugated bile acid hydrolase [Listeria monocytogenes EGD-e]
PBCN21	<i>resP (ORF8)</i>	resolvase [Plasmid pIP404]
PBCN22	ORF9	hypothetical protein ORF9 [Plasmid pIP404]
PBCN23	ORF10	hypothetical protein ORF10 [Plasmid pIP404]
PBCN24	<i>uviA</i>	uviA protein [Plasmid pIP404]
PBCN25	<i>uviB</i>	uviB protein [Plasmid pIP404]
PBCN26	<i>bcn</i>	bacteriocin BCN5 [Plasmid pIP404]
PBCN27		lin2918 [Listeria innocua]
PBCN28	<i>spaA</i>	protective antigen SpaA.1 [Erysipelothrix rhusiopathiae]
PBCN29	<i>cop (ORF4)</i>	copy number protein [Plasmid pIP404]
PBCN30	<i>rep (ORF5)</i>	replication protein [Plasmid pIP404]
PBCN31		no homology
PBCN32	PCP27	hypothetical protein PCP27 [Clostridium perfringens st13]
PBCN33	PCP28	conserved hypothetical protein PCP28 [Clostridium perfringens st13]
PBCN34	<i>pac</i>	probable penicillin acylase [Clostridium perfringens st13]
PBCN35	CPE1590	conserved hypothetical protein [Clostridium perfringens st13]
PBCN36	CPE1591	conserved hypothetical protein [Clostridium perfringens st13]

表3 pCP8533S12プラスミドに認められる遺伝子とその相同性

putative ORF	homologous ORF	results of BLAST search
ORF01	relaxase superfamily	protein rlx [Clostridium perfringens B st ATCC 3626]
ORF02	mobilization protein	MobC, Bacterial mobilisation protein [Clostridium perfringens B st ATCC 3626]
ORF03	CopG	ribbon-helix-helix protein, CopG family domain protein [Clostridium perfringens B st ATCC 3626]
ORF04		conserved hypothetical protein [Clostridium perfringens B st ATCC 3626]
ORF05	bacteriocin-like protein	bacteriocin-type signal sequence domain protein [Clostridium perfringens B st ATCC 3626]
ORF06	protease	caax amino protease family [Clostridium perfringens B st ATCC 3626]
ORF07		conserved hypothetical protein [Clostridium perfringens B st ATCC 3626]
ORF08	<i>rep</i>	replication protein [Clostridium perfringens B st ATCC 3626]
ORF09	<i>CbaT</i>	ABC transporter CbaT [Clostridium perfringens E st JGS1987]
ORF10	ABC transportor	ABC transporter CbaT [Clostridium perfringens E st JGS1987]
ORF11		hypothetical protein AC1_A0173 [Clostridium perfringens B st ATCC 3626]
ORF12		hypothetical protein AC1_A0172 [Clostridium perfringens B st ATCC 3626]
ORF13		hypothetical protein AC1_A0171 [Clostridium perfringens B st ATCC 3626]
ORF14	resolvase	resolvase [Clostridium perfringens B st ATCC 3626]
ORF15		hypothetical protein HMPREF0555_1757 [Leuconostoc mesenteroides subsp. cremoris ATCC 19254]
ORF16		hypothetical protein AC1_A0169 [Clostridium perfringens B st ATCC 3626]

第三章 pBCNF5603 のバクテリオシン (BCN5603) について

3-1. BCN5603 遺伝子の比較ゲノム学的検討

すでに述べたように、腸管病原性ウエルシュ菌 F5603 株のエンテロトキシン遺伝子保有プラスミドと同時に存在する pBCNF5603 プラスミド上に、バクテリオシン遺伝子とその制御遺伝子群が認められた。このことは、使用した腸管病原性株がヒトの腸管などで他の菌に打ち勝って増殖し、大量の毒素を産生して病原性を発揮するうえでバクテリオシンが何らかの役割を果たす可能性が考えられる。そこでまず認められたバクテリオシン遺伝子について、このタイプのバクテリオシンが他の病原性株などにも認められるかどうかを NCBI の遺伝情報を用いて比較検討した。

<使用したソフトウェア>

ORF Finder ソフトウェア (NCBI)

BLAST-P ソフトウェア (NCBI)

<方法>

NCBI のホームページ上のオンラインソフトウェアを使用して検討した。

<結果と考察>

本研究で見つかった pBCNF5603 プラスミドのバクテリオシン (BCN5603 バクテリオシン) は、ヒト分離株 CPN50 株 (KZ210 株) が持つ pIP404 プラスミドに存在する最も詳しく研究されている BCN5 バクテリオシンのアミノ酸配列と相同性を持っていた (図 3) ^{15, 16})。BCN5 バクテリオシンと比較すると SH3 ドメインが BCN5 バクテリオシンでは 3 ヶ所であるが、BCN5603 バクテリオシンでは 2 ヶ所あった。SH3 ドメインは、バクテリオシンによく認められるドメインであり、膜との結合に関与すると考えられているが、バクテリオシンにおけるその役割は明確ではない。また、いずれのバクテリオシンにも、ペプチダーゼ活性に関与する亜鉛結合部位が 2 ヶ所認められた。最も大きな違いは、BCN5603 バクテリオシンには、グルカンに結合するドメインと細胞壁に結合すると考えられる繰り返し配列を持っていたが、BCN5 バク

テリオシンにはその部分は認められなかった。

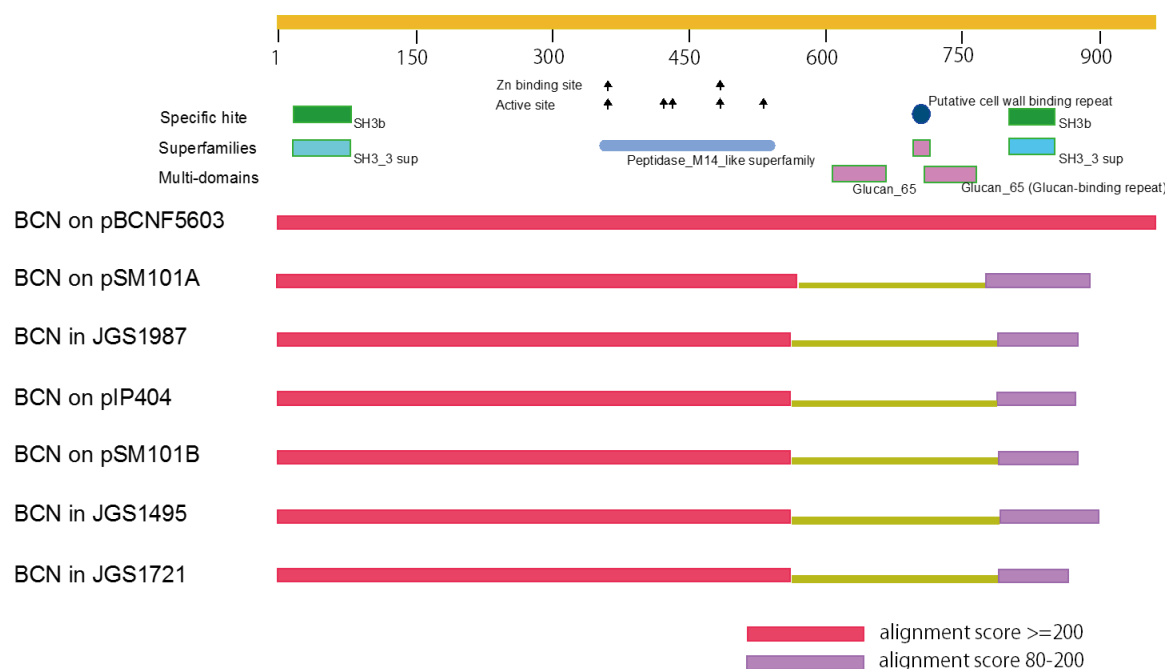


図3 ウェルシュ菌F5603株のバクテリオシンBCNF5603と相同性を持つバクテリオシン

さらに、BCN5603 バクテリオシン遺伝子と相同性を有するバクテリオシン遺伝子には、ウェルシュ菌の食中毒株に由来する SM101 (NCTC8798) 株の 2 つのプラスミド各々に 1 つ認められるバクテリオシン遺伝子や C 型 JGS1495 株、D 型 JGS1721 株、E 型 JGS1987 株のバクテリオシン遺伝子が GenBank に認められた。N 末端側は、これら全てのバクテリオシンにおいて保存されていた。しかし、BCN5603 バクテリオシンの C 末端側は、他のバクテリオシンと相違が認められた。上述の細胞壁、グルカン結合ドメインは、BCN5603 バクテリオシンにのみ認められ、他のウェルシュ菌のバクテリオシンには認められずユニークな部分であった。この違いがバクテリオシンの活性やスペクトルと関連を持っていることが考えられる。

また、以前に行った PCR 法による検討¹⁷⁾からヒト食中毒由来株、動物の疾患由来株など様々な株に類似のバクテリオシン遺伝子が存在することが推測された。類似のバクテリオシン遺伝子が、ヒトや動物の消化管疾患と関連のある株で認められることから、これらのバクテリオシンがウェルシュ菌の病原性と関連を持つ可能性が高いことが推測できるが、詳細については今後更なる研究が必要であると思われる。

いくつかの病原性株に認められるバクテリオシンの比較ゲノム学的検討の結果、部分的にはあるがバクテリオシンのアミノ酸配列には多様性があることが明らかとなった。ウエルシュ菌におけるバクテリオシン活性の生物学的特性を比較するためには、バクテリオシン遺伝子を単独発現するシステムを構築する必要がある。これは、全塩基配列の決定など遺伝学的背景がはっきりしていない株では、確認されたバクテリオシン遺伝子以外にも、染色体上や他のプラスミド上にトランスポゾンやファージなどにより持ち込まれたバクテリオシン遺伝子が存在する可能性があるためである。今後、このようなバクテリオシン発現、解析システムの構築を行い、様々な病原株に存在するバクテリオシンの生物活性を調べることで病原性発現におけるバクテリオシンの役割が明らかになると考えられる。

3-2. BCN5603 産生調節領域の比較ゲノム学的検討

病原性と関連を持つと考えられるバクテリオシン遺伝子が、ORF の相同性の比較から pBCNF5603 プラスミドに存在すると考えられた。本研究で見つかった BCN5603 バクテリオシン遺伝子は、ヒト分離株 CPN50 が持つ pIP404 プラスミドにある BCN5 バクテリオシン遺伝子と相同性が高かった¹⁵⁾。さらに、BCN5603 遺伝子上流域には、BCN5 遺伝子上流域にある産生制御領域に認められる遺伝子群と相同性を持つ UviA 遺伝子、UviB 遺伝子が認められた。BCN5 バクテリオシンでは、これらの遺伝子発現制御領域は詳しく研究されている^{15, 16)}。そこで、pBCNF5603 プラスミドの BCN5603 バクテリオシン遺伝子の発現制御領域を BCN5 バクテリオシン遺伝子発現制御領域と比較した。

<結果と考察>

BCN5 バクテリオシン遺伝子の産生制御領域には、UviA 遺伝子と UviB 遺伝子が認められる¹²⁾。今回明らかにした BCN5603 バクテリオシン遺伝子上流域にも同様にこれら 2 つの遺伝子が認められた (図 4)。遺伝子の発現と最も深い関連を持つシグマ (σ) 因子であると報告^{15, 16)}されている UviA 遺伝子について比較すると

pBCNF5603 プラスミドの UviA 遺伝子のアミノ酸配列は pIP404 プラスミドの UviA 遺伝子と 98.9%の相同性を持っていた。しかも、シグマ因子 UviA の重要な部分であるプロモーターと相互作用する 4.2 と 2.4 部分 (それぞれ-35 と-10 のプロモーターと相互作用)^{15, 16)}は、2つのプラスミドの UviA で全く同じであった (図 4)。一方、バクテリオシン・イムニティに関連している UviB 遺伝子は、2つのプラスミドでアミノ酸配列が完全に一致していた。

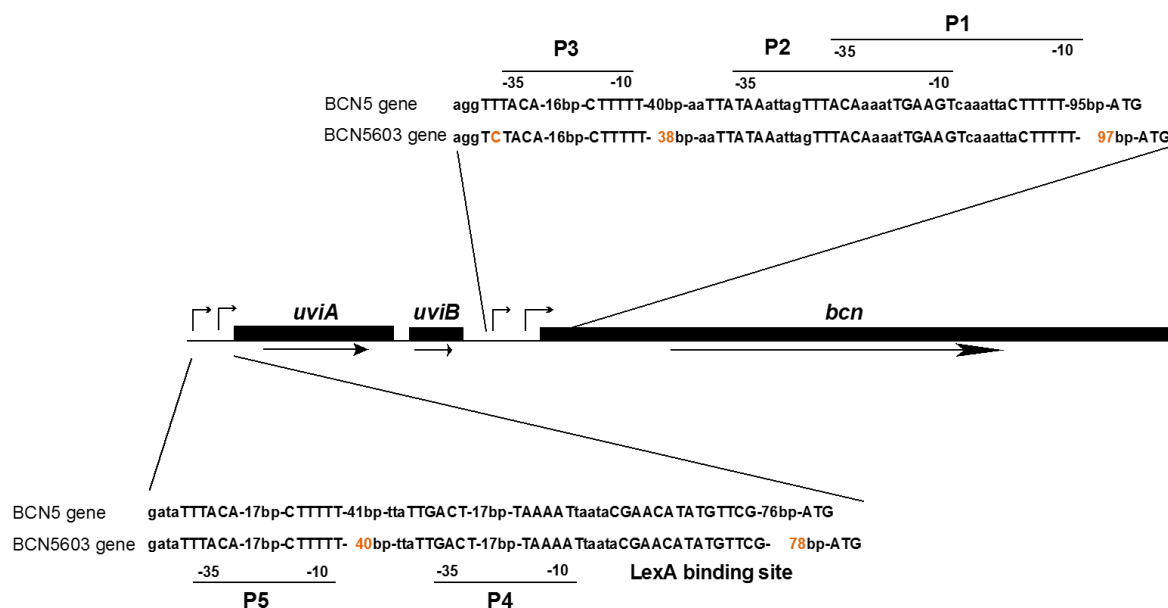


図4 バクテリオシンBCNF5603遺伝子上流の発現制御領域とバクテリオシンBCN5の発現制御領域との類似性

次に、産生制御に重要な BCN5603 バクテリオシン遺伝子のプロモーター領域を、pIP404 プラスミドの BCN5 バクテリオシン遺伝子のプロモーター部分^{15, 16)}と比較した。BCN5603 バクテリオシン遺伝子上流には、BCN5 バクテリオシン遺伝子のプロモーターと塩基配列が全く同一の2つのプロモーター (P1、P2) と1塩基の違いのある1つのプロモーター (P3) が認められた (図 4)。また、UviA 遺伝子上流にある P4 と P5 のプロモーター配列も完全に同じであった。さらに、P4、P5 プロモーターの下流に位置する BCN5 バクテリオシン遺伝子発現制御領域 (LexA 結合領域) の配列も BCN5603 バクテリオシンと BCN5 バクテリオシンは全く同じであった。

このように、遺伝子発現制御領域が2つのバクテリオシン遺伝子で非常に類似していることから、pBCNF5603 プラスミド上にある BCN5603 バクテリオシン遺伝子は、

pIP404 プラスミドの BCN5 バクテリオシン遺伝子とほとんど同じ発現制御をうけていると考えられる。つまり、紫外線やマイトマイシン C などのストレスによりこれらのバクテリオシン遺伝子の発現が促進されると考えられる。

3-3. BCN5603 のストレス刺激による産生促進

ウエルシュ菌は、環境に広く存在する細菌の一つで健常なヒトや動物の腸管内に存在する。ウエルシュ菌が、ヒトや動物の疾患を起こす主な要因は、一部の株が産生する毒素が大きな要因と考えられている。毒素遺伝子を持ち毒素を産生する株が、実際にヒトや動物の腸管内などで病原性を発現するためには、正常細菌叢にうちかって増殖し、大量の毒素を産生する必要がある。他の細菌に殺菌的や静菌的に働く因子であるバクテリオシンを産生することは、毒素産生株が正常細菌叢との競争にうちかって増殖できるひとつの要因であると考えられる。ウエルシュ菌のバクテリオシンについては、古くはバクテリオシン産生能やバクテリオシンに対する感受性などによる菌株の分類などが報告¹⁸⁾されている。最近、鳥類の壊死性腸炎毒素 NetB 産生株に認められたバクテリオシン Perfrin が詳細に調べられ、病原因子を有する株の病原性の発現に寄与している可能性が報告されている¹⁹⁾。

今回、腸管病原性をもつ F5603 株にある pBCN5603 プラスミドにバクテリオシン遺伝子が存在することを見出した。しかも、その発現制御領域は、比較的よく研究されている pIP404 プラスミドの BCN5 バクテリオシンとほとんど同じで、BCN5603 バクテリオシンは、BCN5 バクテリオシンと同じようにストレスにより発現が促進されると考えられた。そこで、実際に BCN5603 バクテリオシンが発現しており、さらに BCN5 バクテリオシンと同様にストレスで転写が促進されるかについて検討した。

<材料>

1. 培地

Cooked Meat Medium (DIFCO)

Fluid Thioglycollate Medium : FTG (DIFCO)

Brain Heart Infusion (BHI) (DIFCO)

TGY Medium (100 ml)

Tryptic Soy Broth (DIFCO)	3 g
Glucose (Nakarai Tasque)	2 g
Yeast Extract (DIFCO)	1 g
L-Cysteine (Nakarai Tasque)	0.1 g

2. 試薬

Mitomycin C (Sigma)

RNAlater Solution (Ambion)

3. キット

RNeasy Mini Kit (QIAGEN)

SuperScript III One-step RT-PCR system (Invitrogen)

4. 使用機器

トランスイルミネーターDT-20MCP (ATTO)

5. 参考資料

バクテリオシン発現誘導

ウエルシュ菌の RNA 検出 (RT-PCR 法)

3-3-1. バクテリオシンの産生能

<方法>

Cooked Meat 培地で保存していた F5603 株培養液 0.2 ml を 10 ml の FTG 培地に加え、37°Cで一晩培養した。一晩培養した培養液 0.2 ml を 10 ml の TGY 培地に加え、同様に 37°Cで一晩培養した。TGY 培地の菌液を BHI 寒天培地に塗布し、37°Cで一晩嫌気培養をした。形成されたコロニーについて、コロニーPCR 法により BCN5603 バクテリオシン遺伝子の存在を確認し、BCN5603 バクテリオシン遺伝子陽性のコロニーを 10 ml の TGY 培地で 16 時間培養した。16 時間培養した培養液 0.4 ml を 2 本の新たな 10 ml TGY 培地に加え、37°Cで嫌気培養した。BCN5 バクテリオシンの発現誘導法¹¹⁾と同様に 3 時間培養した対数増殖期早期の培養液 3 ml を遠心に

より集菌し、菌塊を 5 ml の PBS(-) に浮遊しシャーレに広げ、5 秒から 10 秒紫外線照射 (310 nm) を行った。紫外線照射した菌浮遊液を集菌し、10 ml の TGY 培地に再浮遊し 3 時間嫌気培養をおこなった。3 時間培養した培養液の上清部分をバクテリオシン活性測定に用いた。バクテリオシン活性の測定法は、バクテリオシンを含む上清 40 μ l を BHI 寒天培地に数回に分けてスポットし、その後 BHI 寒天培地を 37°C で十分に乾燥させ、バクテリオシンを寒天に浸透させた。指標株 (indicator) としては、プラスミドを持たない ATCC3624 株と pCP13 プラスミドを除去した Strain 13 株を用いた。一晚、TGY 培地で培養したこれらの指標株の培養液 0.2 ml を新たな 10 ml の TGY 培地で培養し、3-4 時間培養した後、バクテリオシンをスポットした BHI 寒天培地に丁寧に塗り広げた。指標株を塗り広げた BHI 寒天培地を 37°C で嫌気培養し、指標株の増殖とバクテリオシンによる増殖阻止を 3-18 時間観察した。

<結果と考察>

F5603 株の上清を滴下し、十分に乾燥させた後 Strain 13 株を塗布したプレートでは、滴下した部分に同心円状の Strain 13 株の増殖が抑制された領域が認められ、今回我々が用いたバクテリオシン検出方法は有用であると考えられた (図 5)。一方、ATCC3624 株では増殖抑制領域は認められなかった (図 5)。このことから F5603 株では、ウエルシュ菌の一部の菌株に増殖抑制活性を有するバクテリオシンを産生していると考えられた。バクテリオシンには様々な種類が存在し、F5603 株で産生が確認できたバクテリオシンが pBCN5603 上の BCN5603 遺伝子の産物である BCN5603 バクテリオシンかどうかは断言できないが、紫外線照射した F5603 株の培養上清には、照射していない場合より Strain 13 株への抑制域が明確で、範囲が大きい傾向が認められた (図 5)。このことから、バクテリオシン産生が紫外線照射で増加しているので F5603 株の培養上清に認められたバクテリオシン活性は、少なくとも一部は紫外線により産生が促進された BCN5603 バクテリオシンによるものであると推察される。

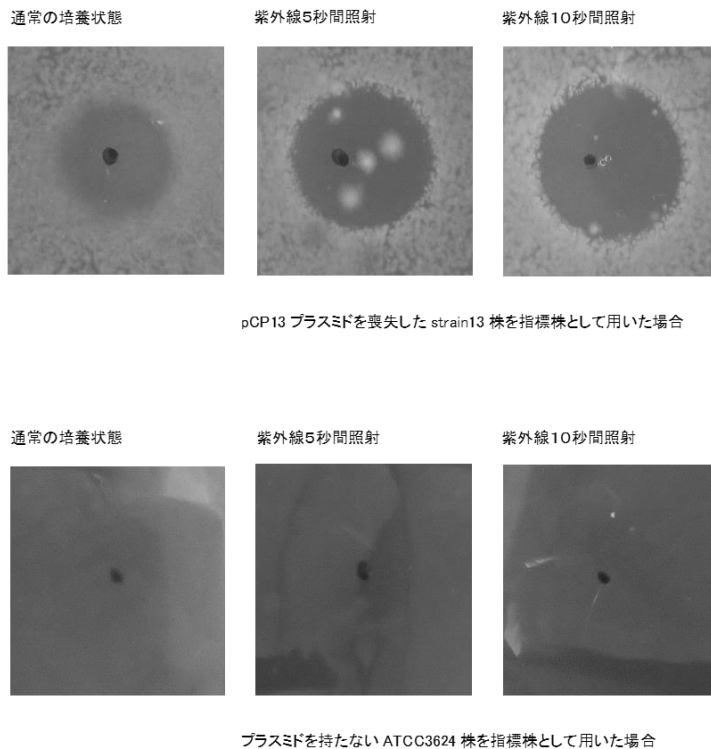


図5 腸管病原性F5603株の上清に認められるバクテリオシン活性と紫外線照射による誘導

3-3-2. バクテリオシン遺伝子のストレスによる転写促進

<方法>

Cooked Meat 培地で保存していた F5603 株培養液 0.2 ml を 10 ml の FTG 培地に加え、37°Cで一晩培養した。一晩培養した培養液 0.2 ml を 10 ml の TGY 培地に加え、同様に 37°Cで一晩培養した。TGY 培地の菌液を BHI 寒天培地に塗布し、37°Cで一晩嫌気培養をした。形成されたコロニーについて、コロニーPCR 法により BCN5603 バクテリオシン遺伝子の存在を確認し、BCN5603 バクテリオシン遺伝子陽性のコロニーを 10 ml の TGY 培地で 16 時間培養した。16 時間培養した培養液 0.4 ml を 2 本の新たな 10 ml TGY 培地に加え、37°Cで嫌気培養した。培養 3 時間後に一方の培養液に Mitomycin C (Sigma) を最終濃度 6 $\mu\text{g/ml}$ になるように添加し、添加後 3 時間嫌気培養した培養液から RNA を抽出した。コントロールには同時に用意した Mitomycin C を加えていない TGY 培地で 6 時間嫌気培養した培養液を用いた。培養液を 3000 x g で遠心し、ペレットに RNA 安定化剤、RNAlater Solution (Ambion)

10 ml 加え、RNA を安定化させた後、RNA 抽出キット RNeasy Mini Kit (QIAGEN) を用いて RNA の抽出を行った。RNA 抽出後速やかに SuperScript III One-step RT-PCR system (Invitrogen) を用いて BCN5603 バクテリオシン遺伝子を検出する RT-PCR 反応を行った。RNA サンプルを 10 倍段階希釈し、段階希釈した RNA サンプルをそれぞれ RT-PCR 反応の鋳型として用いることで半定量的な RT-PCR 反応を行った。RT-PCR 産物を 1.5%アガロースゲルで電気泳動し、Mitomycin C 添加の有無による BCN5603 バクテリオシン遺伝子転写産物の量を検討した。

<結果と考察>

希釈 RNA サンプルを用いた RT-PCR 法により転写 RNA 量を半定量的に比較したところ、Mitomycin C 存在下で培養した菌液より抽出した RNA では 10^2 希釈まで BCN5603 バクテリオシン遺伝子の転写産物が認められた (図 6)。一方、Mitomycin C 非存在下では、10 倍希釈までしか検出されなかった (図 6)。つまり、通常の培養でも BCN5603 バクテリオシン遺伝子の発現はあるが、Mitomycin C の存在により BCN5603 バクテリオシン遺伝子がより多く転写されていると考えられた。一方、通常の PCR 反応では、BCN5603 バクテリオシン遺伝子は検出されず DNA の混入はわずかであると考えられた (図 6)。これらのことから、BCN5603 バクテリオシン遺伝子の転写は、Mitomycin C 処理により促進されることが判明した。一方、今回用いたバクテリオシン遺伝子発現を検討する方法は、BCN5603 バクテリオシンのようにストレスにより発現が促進される遺伝子の検出に有用であることが明らかとなった。

紫外線照射や Mitomycin C 添加により BCN5603 バクテリオシン遺伝子の発現が増加するという結果は、比較ゲノム学的検討から BCN5 バクテリオシン遺伝子と BCN5603 バクテリオシン遺伝子の発現制御領域が極めて類似しており、BCN5 バクテリオシン遺伝子はストレスにより発現が誘導されることと同様に BCN5603 バクテリオシン遺伝子もストレスにより発現が促進されると推測される。

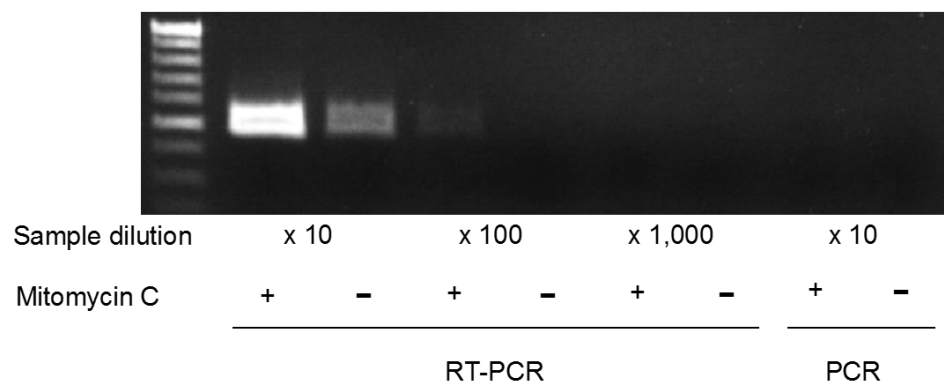


図6 バクテリオシンBCNF5603遺伝子の転写とMitomycin Cストレスによる転写誘導

第四章 pBCNF5603 のプラスミドの複製領域

4-1. pBCNF5603 のプラスミド複製領域の同定

プラスミドは、染色体と同様に自己複製能を有している自律的複製体(レプリコン)である。特に、大きいサイズのプラスミドでは、一つの細菌細胞内に存在するプラスミド分子の数(コピー数)が少ないことが知られている。今回、検討したプラスミドは、以前のパルスフィールド電気泳動法(PFGE)を用いた結果⁴⁾などから、コピー数は少なく、おそらく細菌細胞内に1コピーしか存在しないと推測される(図1)。しかも、非常に安定しているプラスミドで複製が厳密にコントロールされていると考えられる。プラスミドの自己複製領域や複製開始タンパク質(Rep)遺伝子は、プラスミドの存在に必須の領域(プラスミドが複製するのに必要な最低限度の領域)であり、プラスミドが細菌細胞内に安定的に存在することに関連を持つと考えられる。つまり、Rep遺伝子を含む領域はプラスミドを特徴づける基本的領域である。また、Rep遺伝子と同定することでプラスミドの複製スタイルを推定することができ、プラスミドのひとつの特徴的性質である和合性(compatibility)とも関連づけることが出来る。和合性とは、2種類以上のプラスミドがひとつの細菌細胞内に安定して共存できることであり、同じ複製、分配システムを持つ近縁のプラスミドは共存できず不和合性(incompatibility)であると言われる。言い換えると、和合性を調べることにより対象のプラスミドと他のプラスミドとの関係を調べることができ、和合性の結果によりプラスミドを分類することができる。また、プラスミドの複製領域を同定し、大腸菌のベクタープラスミドに組み込むことで大腸菌とウエルシュ菌のシャトルベクターを作成することができ、ウエルシュ菌の遺伝子の機能を実験的に証明することが可能である。

既に述べたように今回検討した結果、pBCNF5603 プラスミドには B2 毒素遺伝子を持つ pCP13 プラスミドに類似の遺伝子群と pIP404 プラスミドの複製領域と類似の領域があり、それぞれのプラスミドと類似の複製関連領域が認められる。つまり、自己複製に必須の Rep タンパク質の遺伝子と想定される遺伝子が 2ヶ所に認められ

る。今回、このバクテリオシン遺伝子を保有し、そのことで病原性の発現に関連を持っていると思われる pBCNF5603 プラスミドの 2ヶ所の複製関連領域の複製能を検討し、このプラスミドの複製領域と Rep 遺伝子の同定を行った。

<材料>

1. 使用した培地

Cooked Meat Medium (DIFCO)

Fluid Thioglycollate Medium (FTG) (DIFCO)

Tryptic Soy Broth 培地 (DIFCO)

Brain Heart Infusion (BHI) (DIFCO)

TGY Medium (100 ml)

Tryptic Soy Broth (DIFCO) 3 g

Glucose (Nakarai Tasque) 2 g

Yeast Extract (DIFCO) 1 g

L-Cysteine (Nakarai Tasque) 0.1 g

2. 使用した酵素

Restriction enzymes : AvrII、BsmI、BstBI、HpaI、PfiMI、SnaBI、SpeI、XmnI

DNA polymerase Klenow fragment (Promega)

Alkaline phosphatase (CIAP) (1 U/μl) (Roche Applied Science)

T4 DNA ligase (5 U/μl) (Roche Applied Science)

3. 使用したキットと機器

QUICKGENE Plasmid Kit SII (KURABO)

Electro Cell Manipulator BMC630 (BTX)

4. 参考資料

遺伝子組み換えのためのプラスミドベクターの調整

ライゲーション反応

遺伝子組み換えのためのケミカルコンピート細胞の調整

大腸菌へのプラスミドベクターの導入

コロニーからの直接 PCR 法 (Colony Direct PCR 法) による遺伝子の検出

ウエルシュ菌への遺伝子導入 (エレクトロポレーション法) 9)

<方法>

抗生物質耐性遺伝子のうち、大腸菌のプラスミドによく用いられているアンピシリン耐性遺伝子は、ウエルシュ菌では機能しない。一方、クロラムフェニコール耐性遺伝子やエリスロマイシン耐性遺伝子は、大腸菌でもウエルシュ菌でも機能することが知られている。今回はクロラムフェニコール耐性遺伝子を利用した。ベースとなるプラスミドには、既に作成されている大腸菌とウエルシュ菌のシャトルベクターでクロラムフェニコール耐性遺伝子を保有する pJIR750 プラスミド¹⁴⁾を用いた (図 7)。このプラスミドは、大腸菌での複製領域に加えて、pIP404 プラスミドの複製領域をもったプラスミドである。このプラスミドから制限酵素 XmnI と SpeI を用い、pIP404 プラスミドの複製領域の部分 (2,629 bp) を切り離し、DNA Polymerase Klenow Fragment (Promega) を用い、末端の平滑化反応を行った。次に、pJIR750 由来の DNA の自己ライゲーションを防ぐため、Alkaline Phosphatase (Roche) を用い、平滑化した断端の脱リン酸を行い、DNA 断片の挿入用のベクターとして使用した。

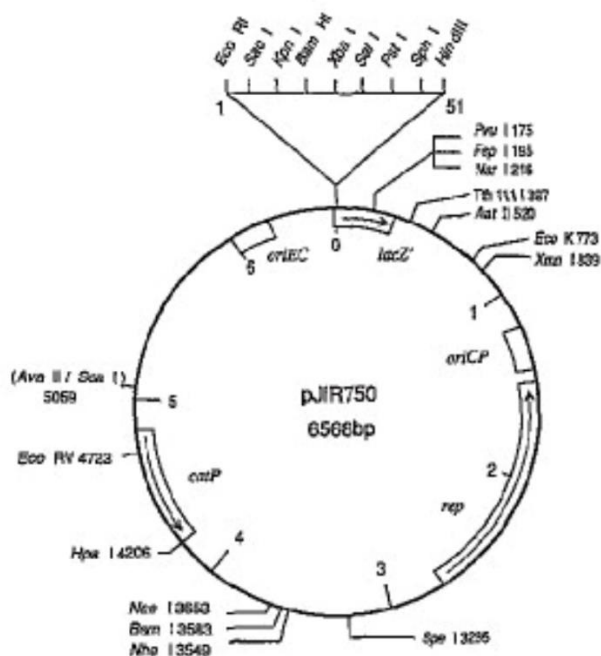


図7 大腸菌とウエルシュ菌のシャトルベクターpJIR750の模式図

挿入断片は、推測された複製領域を含む領域を F5603 株の DNA を鋳型として PCR 反応により増幅し、制限酵素により必要な領域を切り出した。pBCNF5603 プラスミドの 2 ヶ所のプラスミド複製領域と考えられる領域には、ウエルシュ菌 Strain 13 株に存在する pCP13 プラスミドの複製領域と推測される領域と類似の遺伝子構成を持つ領域があり、この領域には PBCN16 遺伝子とその上流の ParA 遺伝子、ParB 遺伝子が存在する。この pCP13 プラスミド類似領域について今回決定した塩基配列の情報を参考に PCR 法により増幅した。PCR 産物を制限酵素 AvrII と BstBI 処理により作成した DNA 断片 (PBCN16 遺伝子と ParA 遺伝子、ParB 遺伝子を含む) と制限酵素 AvrII と HpaI 処理により作成した PBCN16 遺伝子とその上流域 (ParA 遺伝子の一部を含む) の DNA 断片の 2 種類の DNA 断片を用意した (図 8)。制限酵素処理後の PCR 産物をベクターと同様に末端を平滑化して用いた。

一方、pBCNF5603 プラスミドに認められた pIP404 プラスミドの Rep 遺伝子と相同性を持った領域には、pIP404 プラスミドの Rep 遺伝子と Cop 遺伝子 (プラスミ

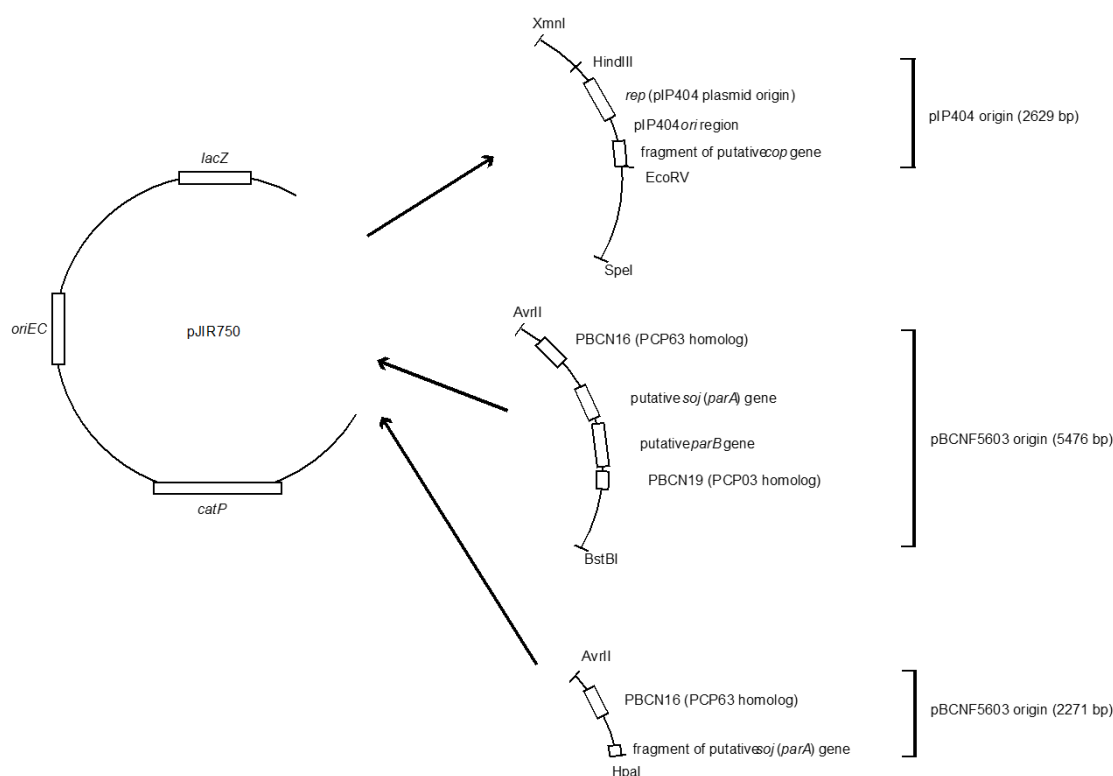


図8 PBCN16遺伝子を持つリコンビナントプラスミド作成の模式図

ドのコピー数を制御する遺伝子) と相同性を持つ 2 つの遺伝子 PBCN30 遺伝子と PBCN31 遺伝子が認められた。この領域を PCR 反応で増幅した後、制限酵素 SpeI と SnaBI で切断し、ベクターと同様に末端の平滑化を行った。pIP404 プラスミドの Rep 遺伝子と相同性を持つもうひとつの遺伝子には、B 型ウエルシュ菌 NCTC8533 株に認められた pCP8533S12 プラスミドの Rep 遺伝子がある。このプラスミドの遺伝情報をもとにプライマーを作成し、Rep 遺伝子の領域を PCR 反応で増幅し、制限酵素 BsmI と PflMI で切断し、ベクターと同様に末端の平滑化を行った (図 9)。これにより、pIP404 プラスミドの Rep 遺伝子と相同性を持つ Rep 遺伝子の複製能を今回使用した方法で推測できるかどうかについても検討した。

これらの操作により作成した 4 種類 DNA 断片を、それぞれ大腸菌複製部分をもつ pJIR750 プラスミドの断片とライゲーション反応により結合し、新たなベクタープラスミドを 4 種類作成した (表 4)。具体的には、用意した 4 種類の Rep 遺伝子を含む複製領域を持つ DNA 断片それぞれと pJIR750 プラスミド断片を混合し、DNA T4 Ligase (Roche) を加え、16°C、一晩、ライゲーション反応を行った。

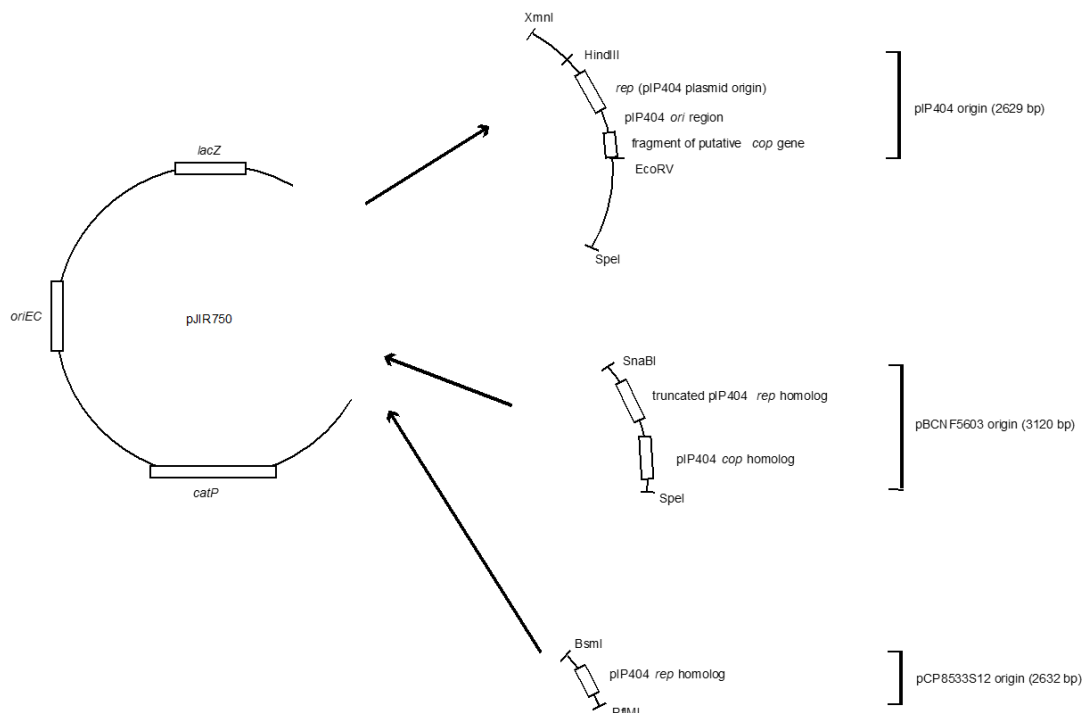


図9 PBCN30遺伝子を持つリコンビナントプラスミド作成の模式図

反応液を、大腸菌 HB101 のケミカルコンピート細胞にヒートショック法により導入した。ヒートショック処理をした試料を、クロラムフェニコール (30 mg/ml) を含む Tryptic Soy 寒天培地に塗布し、37°C で一晩培養した。出来たコロニーについて、pCP13 プラスミドの PCP63 遺伝子と相同性を持つ PBCN16 遺伝子や pIP404 プラスミドの Rep 遺伝子と相同性を持つ pBCN5603 プラスミドの PBCN30 遺伝子を保有するかどうかについてコロニー PCR 法により確認し、PCR 反応陽性コロニーについて、クロラムフェニコールを含む Tryptic Soy 液体培地 (3 ml) で増菌し、プラスミド精製キット (KURABO) を用いて精製した。

表4 本研究で作製したリコンビナントプラスミド

Plasmid	
pKZ100	pJIR750 (XmnI/SpeI) Ω pBCNF5603 PCR product (SpeI/SnaBI; 3120 bp) (<i>cop</i> and <i>rep</i> fragment)
pKZ110	pJIR750 (XmnI/SpeI) Ω pCP8533S12 PCR product (BsmI/PfIM1; 2632 bp) (<i>rep</i> fragment)
pKZ200	pJIR750 (XmnI/SpeI) Ω pBCNF5603 PCR product (AvrII/BstBI; 5476 bp) (PCP63, <i>soj</i> , <i>parB</i> and PCP03 fragment)
pKZ210	pJIR750 (XmnI/SpeI) Ω pBCNF5603 PCR product (AvrII/HpaI; 2271 bp) (PCP63 fragment)

精製したプラスミドについて、

1. pBCNF5603 の pCP13 プラスミドの推定複製領域と類似の遺伝子群を持つことを確認するため、PBCN16 遺伝子に特異的なプライマーを用いて PCR 法により存在を確認した。さらに推定分配領域については、ParA 遺伝子に特異的なプライマーを用いた PCR 法により確認した。また、pIP404 プラスミドの Rep 遺伝子を含んでいないことを同様に PCR 法により確認した。作成した PBCN16 遺伝子だけのプラスミドと PBCN16 遺伝子に加えて ParA 遺伝子、ParB 遺伝子の領域を含むプラスミドの 2 種類のプラスミドが複製能をもつかどうか検討した。
2. 特異的なプライマーを用いた PCR 反応により PBCN30 遺伝子 (pBCNF5603 プラスミドの pIP404 プラスミド Rep 遺伝子相同遺伝子) の存在や pCP8533S12 プラスミドの Rep 遺伝子の存在、さらに pJIR750 プラスミドのウエルシュ菌の Rep

遺伝子を持たないことを確認した。これら 2 種類の pIP404 プラスミドの Rep 遺伝子に相同性を持った Rep 遺伝子を持つプラスミド (pBCNF5603 由来のものと pCP8533S12 由来のもの) について Rep 遺伝子が機能するかどうかを調べた。

ウエルシュ菌へのベクターの導入方法は、既に報告しているエレクトロポレーション法⁹⁾を用いた。用いたウエルシュ菌株は、エレクトロポレーション法により遺伝子の導入が可能な株である ATCC3624 株と Strain 13 株の 2 種類を用いた。簡単に述べると、Cooked Meat 培地に保存していたウエルシュ菌培養液 0.4 ml を 10 ml の FTG 培地にいれ、37°C で一晩培養した。一晩培養した FTG 培地の菌液 0.2 ml を 10 ml の TGY 培地に入れ、同様に 37°C で一晩培養した。培養菌液を BHI 寒天培地上に塗布し、37°C で、一晩嫌気培養した。形成されたウエルシュ菌のコロニーを 10 ml の TGY 培地に加え培養した。翌日、一晩培養した培養液 0.6 ml を、新たな TGY 培地 20 ml に加え、37°C、8 時間、嫌気状態で培養した。培養液を遠心し、集菌した菌を塩化カルシウム緩衝液で処理した後、1.2 ml の塩化カルシウム緩衝液に懸濁し、その 0.6 ml をリコンビナントプラスミド DNA と混合した。氷上で静置した後、Electro Cell Manipulator BCM630 (BMX 社) を用いて、遺伝子の導入を行った。電気ショックを加えたベクター DNA と培養菌液の混合液を 4 ml の TGY 培地に入れ、3 時間、37°C で培養した。3 時間培養した培養液の 1 ml を 1.5 ml の滅菌エッペンドルフチューブに入れ、10,000 rpm、2 分間遠心し、菌の濃縮液を用意した。菌の濃縮液をクロラムフェニコール (15 mg/ml) 含有 BHI 寒天培地に塗布し、37°C で 16 から 24 時間嫌気培養した。形成されたコロニーについてコロニー PCR 法を用いてそれぞれの推定 Rep 遺伝子の有無を確認した。

<結果と考察>

腸管病原性ウエルシュ菌 F5603 株にエンテロトキシン遺伝子保有 pCPF5603 プラスミドと共存するバクテリオシン遺伝子保有 pBCNF5603 プラスミドには、比較ゲノム学的検討からプラスミド複製に関係している領域が 2 ヶ所存在する可能性が考えられた。1 つは、染色体とプラスミドの全塩基配列が世界で最初に報告された Strain

13 株に存在する $\beta 2$ 毒素遺伝子を保有する pCP13 プラスミドと相同性を持った遺伝子群の領域にあると考えられた。pCP13 プラスミドの推測複製領域は現在まで同定されていないが、pCP13 プラスミド上の ORF の方向がその部分を境に逆になる領域があり、その近くにはプラスミドの分配に関連する遺伝子群を含む領域が認められる。この領域と非常に類似している領域が pBCNF5603 プラスミドにも認められ、この領域がプラスミド複製に関連していると考えられた。一方、相同性の比較から pIP404 プラスミドの Rep 遺伝子と相同性の高い PBCN30 遺伝子を含む領域があり、この領域もプラスミドの複製に関連があると考えられた。

この 2 ヶ所の Rep 遺伝子を含むと考えられる領域をそれぞれ別々に大腸菌の複製領域を持つプラスミドに組み込んでリコンビナントプラスミドを作成した。具体的に述べると、比較ゲノム学においては機能が推測できなかった PCP63 遺伝子と相同性をもつ PBCN16 遺伝子とその上流域 (ParA 遺伝子の一部) を含むリコンビナントプラスミド (pKZ210 プラスミド) と PBCN16 遺伝子領域に加えてプラスミドの分配に関連を持つと考えられる領域 (ParA 遺伝子、ParB 遺伝子、さらにそれらの上流域) を含む大きい断片もつリコンビナントプラスミド (pKZ200 プラスミド) の 2 種類、pIP404 プラスミドの Rep 遺伝子と相同性を持つ PBCN30 遺伝子とその上流に認められたプラスミドのコピー数の制御に関連を持っていると考えられる Cop 遺伝子を保有したリコンビナントプラスミド (pKZ100 プラスミド)、さらに、pIP404 プラスミドの Rep 遺伝子と相同性を持つ B 型ウエルシュ菌 NCTC8533 株に認められた約 12 kb のプラスミドにある Rep 遺伝子を持つリコンビナントプラスミドの 4 種類である (表 4)。

作成したリコンビナントプラスミドが実際にウエルシュ菌内で複製できるかについて、プラスミドを保有していないと考えられているウエルシュ菌 ATCC3624 株に導入し検討した結果、pBCN5603 プラスミドの PBCN16 遺伝子とその上流領域を持つ pKZ210 プラスミドや PBCN16 遺伝子に加えプラスミド分配に関連する領域を持つ pKZ200 プラスミドを導入した ATCC3624 株のサンプルでは、クロラムフェニコール耐性コロニーが確認できた。出現したコロニーは、コロニー PCR 法で PBCN16

遺伝子が陽性であった。このことから、pCP13 プラスミドに類似した pBCNF5603 の複製と関連を持つと考えられる領域は、プラスミドを保有しない ATCC3624 株内で複製できた。つまり、pCP13 プラスミドの PCP63 遺伝子と相同性の PBCN16 遺伝子は、プラスミドの複製に必須の Rep 遺伝子であると考えられた。これらのリコンビナントプラスミドは、Strain 13 株でも同様の実験結果が得られ、Strain 13 株内でも複製すると考えられる。

一方、数回行なったいずれの実験の場合でも、pIP404 プラスミドの Rep 遺伝子と相同性を持つ pBCNF5603 プラスミドの PBCN30 遺伝子をもつ pKZ100 プラスミドを導入した ATCC3624 株のサンプルにクロラムフェニコール耐性コロニーが認められなかった。つまり、この pKZ100 プラスミドは、ウエルシュ菌内で複製することができないことが判明した。一方、pIP404 プラスミドの Rep 遺伝子に相同性を持つ NCTC8533 株の約 12 kb のプラスミドに認められた Rep 遺伝子をもつプラスミド (pKZ110 プラスミド) を導入した ATCC3624 株では、クロラムフェニコール耐性のコロニーが認められた。これらのことから、pBCNF5603 プラスミドの pIP404 プラスミドの Rep 遺伝子に相同性をもつ PBCN30 遺伝子は、Rep 遺伝子としての機能を有していないことが明らかになった。

4-2. 複製開始タンパク質 (Rep) 遺伝子の比較ゲノム学的検討

今回検討したバクテリオシン遺伝子を保有する pBCNF5603 プラスミドの Rep 遺伝子と相同性を持つ遺伝子を持つプラスミドが他に存在するかどうか、また、そのプラスミド上にウエルシュ菌の病原性へ関与する遺伝子を有するかどうかを検討した。つまり、今回同定した Rep 遺伝子と近縁の Rep 遺伝子を有するプラスミドに病原性に関連するかどうかについて GenBank 上に登録されている遺伝子情報を用いて検討した。

<材料>

1. 使用した培地

Cooked Meat Medium (DIFCO)

Fluid Thioglycollate Medium (FTG) (DIFCO)

Tryptic Soy Broth 培地 (DIFCO)

Brain Heart Infusion (BHI) (DIFCO)

TGY Medium (100 ml)

Tryptic Soy Broth (DIFCO) 3 g

Glucose (Nakarai Tasque) 2 g

Yeast Extract (DIFCO) 1 g

L-Cysteine (Nakarai Tasque) 0.1 g

2. 使用したキット・機器

illumina bacteria genomic Prep Mini Spin Kit (GE Healthcare)

NucleoSpin Gel & PCR Clean-up (TaKaRa)

New BigDye Terminator v1.1 (Applied Biosystem)

New BigDye X-Terminator purification Kit (Applied Biosystem)

Takara PCR Thermal Cycler Dice TP600 Ver.3.00

ABI3500 (Applied Biosystem)

3. 使用したソフトウェア

Gene Tool Lite ソフトウェア (フリーソフト)

BLAST-P ソフトウェア (NCBI)

ORF Finder ソフトウェア (NCBI)

<方法>

後述するように pCP13 プラスミドと pBCNF5603 プラスミドは、不和合性のプラスミドと考えられた。しかし、pBCNF5603 プラスミドの Rep 遺伝子 (PBCN16 遺伝子) と pCP13 プラスミドの PCP63 遺伝子では、遺伝子の大きさや開始コドンの上流の塩基配列に大きな違いが認められ、不和合性であることが不思議であると思われた。そこで、実際に和合性の実験に用いた不和合性である pCP13 プラスミドを持つと思われる当教室に保存されていた Strain 13 株の PCP63 遺伝子とその上流の塩基配列を決定した。

Cooked Meat 培地で保存していた Strain 13 株培養液の 0.4 ml を 10 ml の FTG 培地に加え、37°C で一晚培養した。一晚培養した培養液 0.2 ml を 10 ml の TGY 培地でさらに 37°C、一晚培養した。一晚培養した培養液を BHI 寒天培地に塗布し、37°C で嫌気培養を行った。形成されたコロニーについて、コロニー PCR 法により 62 毒素遺伝子を持つことを確認した。62 毒素遺伝子の存在が確認できたコロニーを 10 ml TGY 培地で 37°C、一晚培養した。培養液 1 ml から illumina bacteria genomic Prep Mini Spin Kit を用いてウエルシュ菌の DNA を精製した。精製したゲノム DNA を鋳型として PCP63 領域にプライマーを作成し、PCR 法により PCP63 遺伝子の領域を増幅した。PCR 産物を NucleoSpin Gel & PCR Clean-up キット (TaKaRa) により精製し、New BigDye Terminator v1.1 によりシーケンス反応を行い、その後 New BigDye X-Terminator purification Kit を用いてシーケンス反応産物を精製し、DNA シーケンサー ABI3500 (Applied Biosystem 社) を用いて塩基配列を決定した。

<結果と考察>

プラスミドの複製は、大きく 3 段階、つまり、Initiation、Elongation、そして Termination の段階を経て起こると考えられている。Rep タンパク質は、プラスミドの複製開始点 (*ori*) を認識し、プラスミド複製の Initiation の段階に関連を持つことでプラスミドの複製を制御している。また、プラスミドの複製スタイルにはイテロン型プラスミド (Iteron-containing plasmid : ICP)、Rolling Circle、RNA により複製制御を受けるプラスミドの 3 種類が知られている。今回、検討したプラスミドは約 40 kb と比較的大きなプラスミドで、このプラスミドは ICP プラスミドであろうと予測される。そこで、pBCNF5603 プラスミドの複製機構が ICP 型であることを推測するため、イテロン Iteron (reiterated DNA sequence) と推測できる塩基配列が Rep 遺伝子の開始コドンの上流に存在するかどうか検索した。その結果、Rep 遺伝子上流に 5 組の 6-8 塩基からなる IR (Inverted Repeat) 配列が認められ、これらがイテロン配列と考えられる (図 10)。さらに、その上流には A と T が続く領域 (*ori* 領

域と思われる) が認められ、pBCNF5603 プラスミドは ICP プラスミドに属することが明らかになった。

今回同定した Rep 遺伝子と相同性がある pCP13 上の遺伝子は推測タンパク質 (Hypothetical protein) 遺伝子と記載されており、他の相同性を持った遺伝子も GenBank 上では同様に登録されていると考えられる。そのことから、推測タンパク質遺伝子で PBCN16 遺伝子と高い相同性をもつ遺伝子について GenBank のデータベース上で検索した。その結果、PBCN16 遺伝子と高い相同性のある遺伝子を持つと考えられたプラスミドには、pCP13 プラスミド以外に pCP-OS1 プラスミド、pCP-TS1 プラスミド (この 2 つは最近腸管毒性を持つ亜型 ν 毒素の遺伝子を有するプラスミド²⁰⁾ や F262 株と WAL-14572 株に認められるプラスミド (機能不明のタンパク質の遺伝子だけを保有するプラスミド) が認められた。pCP13 上の PCP63 遺伝子を除き、

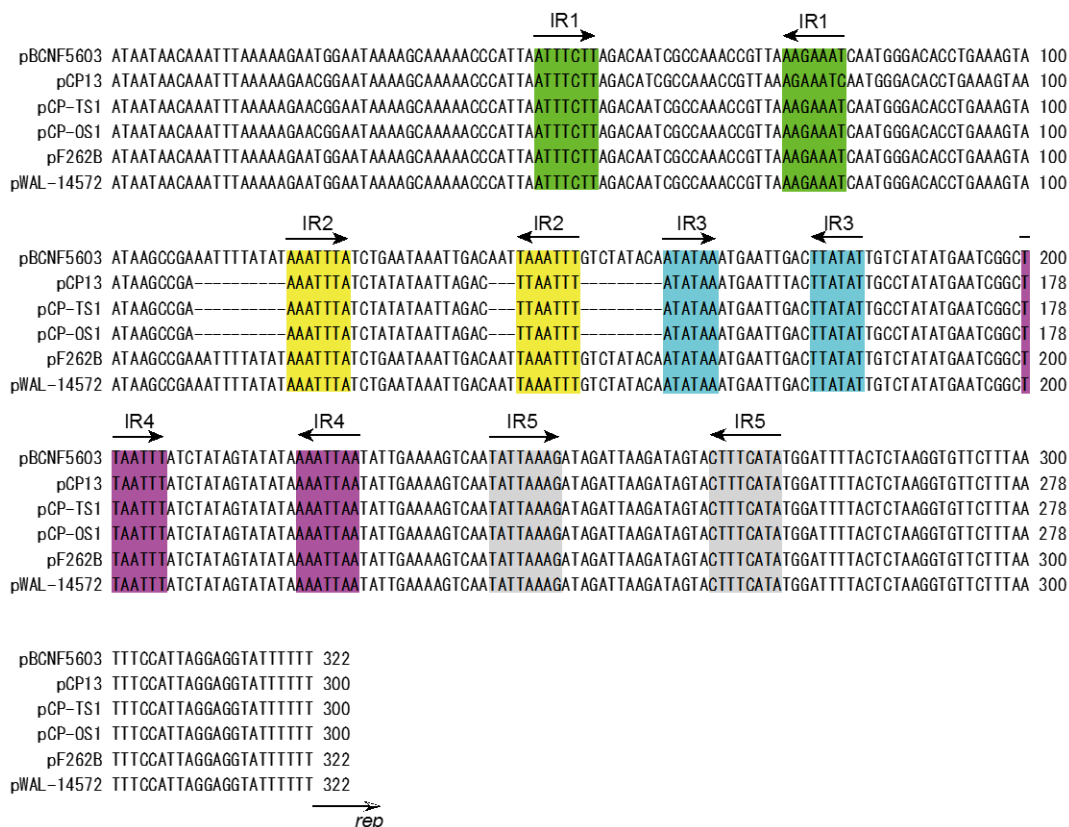


図10 同定したRep遺伝子(BCN16遺伝子)の上流に認められるイテロン配列

これらのプラスミドに認められる PBCN16 遺伝子と相同性を持つ遺伝子は、いずれも pBCNF5603 プラスミドの Rep 遺伝子である PBCN16 遺伝子よりやや大きく、

PBCN16 遺伝子が 852 bp であるのに対して 918 bp (pCP-OS1 プラスミドと pCP-TS1 プラスミド) や 906 bp (F262 株のプラスミドと WAL-14572 株のプラスミド) であった (表 5)。GenBank に登録されている pCP13 の PCP63 遺伝子は、最も小さく 722 bp であった。これらのプラスミドの Rep 蛋白質と考えられる蛋白質のアミノ酸配列の比較では、いずれも 90%以上の相同性を持っており、しかも、保存ドメインである Helix-Turn-Helix (HTH) 構造部分のアミノ酸配列は保存されており DNA 結合能を有し、機能的には非常に類似していると考えられた。これらのことから 5 種類のプラスミドに認められる PBCN16 遺伝子と類似の遺伝子はいずれも Rep 遺伝子であることが判明した (表 5)。

一方、Strain 13 株に存在する pCP13 プラスミドに認められる PCP63 遺伝子は、大きさが最も小さいだけでなく、開始コドンの上流に明らかなイテロン配列が認めら

表5 プラスミドの複製、分配領域の類似性

	PCP63 homologs		<i>parA</i> (<i>soj</i>)		<i>parB</i>		<i>parS</i> sequence length	PCP03 homologs	
	ORF size	Identity*	ORF size	Identity*	ORF size	Identity*		ORF size	Identity*
pBCNF5603	852 bp	100%	753 bp	100%	1278 bp	100%	117 bp	363 bp	100%
pCP13	906 bp	92%	753 bp	99%	1281 bp	96%	117 bp	363 bp	94%
pCP-TS1	918 bp	91%	753 bp	97%	1281 bp	99%	117 bp	363 bp	90%
pCP-OS1	918 bp	90%	753 bp	97%	1281 bp	99%	117 bp	363 bp	90%
pF262B	906 bp	93%	753 bp	99%	1278 bp	100%	117 bp	363 bp	99%
pWAL-14572	906 bp	93%	753 bp	99%	1278 bp	100%	117 bp	363 bp	99%
pCP8533cpb	-	-	753 bp	98%	1281 bp	96%	117 bp	363 bp	96%
JGS1945cpb	-	-	753 bp	99%	1281 bp	96%	117 bp	363 bp	95%

*: Substitutional amino acid identity

れなかった。それにも関わらず、後述するように pBCN5603 プラスミドの Rep 遺伝子をもつ pKZ200 プラスミドや pKZ210 プラスミドと pCP13 プラスミドは同時に安定して存在できず、不和合性 (incompatible) であった。このことから、pCP13 プラスミドの PCP63 遺伝子も Rep 遺伝子である可能性が高く、しかも pCP13 プラスミドも ICP プラスミドであることが考えられる。そのため和合性の実験に用いた当教室に保存されていた Strain 13 株の PCP63 遺伝子とその周辺の塩基配列を決定し、不和合性の pCP13 プラスミドの PCP63 遺伝子と pBCNF5603 プラスミドの Rep 遺伝子 (PBCN16 遺伝子) と比較した。今回決定した pCP13 プラスミド上の pBCNF5603 プラスミドの Rep 遺伝子と相同性を有する PCP63 遺伝子は、GenBank

の登録されていた pCP13 の PCP63 遺伝子と 1 塩基の違いが認められた。その結果、当教室の Strain 13 株に認められる PCP63 遺伝子は、pBCN5603 プラスミドの Rep 遺伝子より大きく 906bp であり、そのアミノ酸配列は pBCNF5603 プラスミドの Rep 遺伝子やエンテロトキシン活性を持つ毒素類似の毒素遺伝子を持つプラスミド上の遺伝子とも 90%以上の相同性を持っており、非常に類似していた (表 5)。

pBCNF5603 プラスミドの Rep 遺伝子上流に認められたイテロンと考えられる IR 配列について、pCP13 プラスミドを含めた他のプラスミドの Rep 遺伝子と考えられる遺伝子上流域の塩基配列と比較したところ、他の 5 種類のプラスミドの Rep 遺伝子と考えられる遺伝子上流にも、ほとんど同じ配列を持つ 5 組の IR 配列が認められ、さらに上流には保存されている AT 配列が認められた。以上のことから、これらの Rep 遺伝子と思われる遺伝子を有するプラスミドはいずれも ICP プラスミドであり、非常に近縁のプラスミドであると考えられた (図 10)。

一方、今回の検討で pIP404 プラスミドの Rep 遺伝子と相同性を有する PBCN30 遺伝子をもつ pKZ100 プラスミドはウエルシュ菌内では自己複製能がなく、この PBCN30 遺伝子は pBCNF5603 プラスミドの複製と関連がないことが判明した。しかし、pIP404 プラスミドや pCP8533S12 プラスミド (アクセッション番号: AB736082) 上に存在する相同性の遺伝子が Rep 遺伝子であり、GenBank にも相同性の Rep 遺伝子と考えられる遺伝子が認められる。そこで、PBCN30 遺伝子と Rep 遺伝子の機能を示す遺伝子や GenBank に報告された遺伝子と比較した。他の pIP404 プラスミドの Rep 遺伝子と相同性を持つ Rep 遺伝子 (約 1,200 bp) と比較すると PBCN30 遺伝子だけが 3'側が約 200 bp 短くなっていた。他の相同性を持った Rep 様遺伝子には、染色体上に存在するものがあり、その遺伝子もやはり複製能を持つ Rep 遺伝子より短かった。これらの Rep 遺伝子には明らかな保存ドメインは認められなかったが、pCP8533S12 プラスミドや pIP404 プラスミドの相同性を持った Rep 遺伝子が機能することと考えあわせると、3'側の部分がこのタイプの Rep 遺伝子が機能するうえで重要であると推察される (図 11)。また、相同性を持つ Rep 遺伝子が存在するプラスミドは 10 kb 程度の場合が多く、この型の Rep 遺伝子が制御しているの

は、比較的小さい 10 kb 程度のサイズのプラスミドであり、今回検討した pBCNF5603 プラスミドのように 40 kb 程度の大きさではないと考えられる。以上のことも、この PBCN30 遺伝子が機能していないことを裏付ける証明となる。さらに、以前に行った pCP8533S12 プラスミドの PFGE 法とサザンブロット法による検討(未発表データ)では、毒素プラスミドと比較すると pCP8533S12 プラスミドはコピー数が多く、この Rep 遺伝子が pBCNF5603 の複製と関連しない点である。

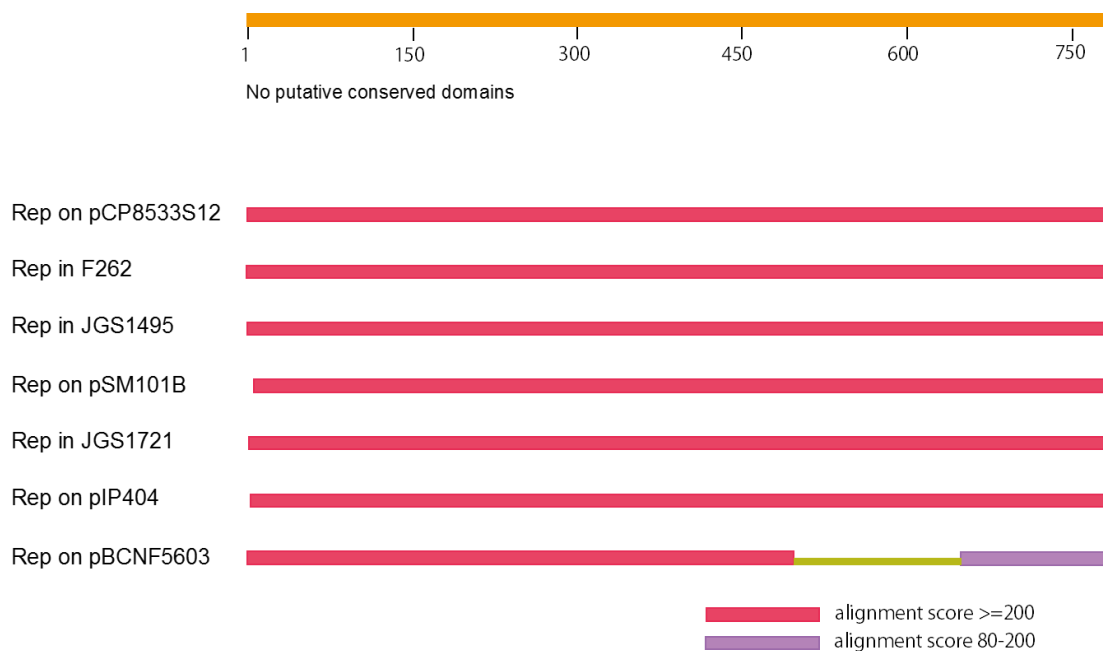


図11 PBCN30遺伝子と相同性を持つ遺伝子(Rep遺伝子)から推測されるタンパク質の比較

第五章 プラスミドの和合性 (compatibility) の検討

プラスミドは、細菌細胞内で安定して存在するシステムを持つ自己複製体（リプリコン）である。しかし、近縁のプラスミド、つまり、同じ複製システムを持つ別のプラスミドとは同時に安定して存在できないいわゆる不和合性 (incompatibility) という特徴を持つ。大腸菌のイテロン型プラスミド (ICP プラスミド) では Rep 遺伝子とその上流に認められるイテロンがプラスミドの和合性に重要であることが知られており、それを利用して大腸菌群のプラスミドは Inc ファミリーとして分類されている。ウエルシュ菌では、毒素遺伝子保有プラスミドもイテロン配列を持つ ICP プラスミドであることが知られている^{5, 6)}。しかし、この毒素遺伝子保有プラスミドは、非常に類似した Rep 遺伝子とイテロン配列を持つにもかかわらず少なくとも 3 種類のもものが同時に存在し、不和合性ではないことが明らかにされている^{5, 6)}。一方、プラスミドの分配に関連した領域も和合性に関連を持つことも知られている。ウエルシュ菌の毒素遺伝子保有プラスミドでは Rep 遺伝子の上流にプラスミドの分配に関与すると考えられる ParMRC 領域をもっており、この領域がプラスミドの和合性に重要であることを確認している (未発表データ)。

本研究で検討したバクテリオシン遺伝子を保有する pBCNF5603 プラスミドの Rep 遺伝子である PBCN16 遺伝子を含む複製領域の比較ゲノム学的解析を行った。その結果、染色体も含め全ての遺伝情報が決定されているウエルシュ菌 Strain 13 株に認められる β2 毒素遺伝子を持つ pCP13 プラスミドに認められる PCP63 遺伝子が相同性を持つことが明らかになった。pCP13 プラスミドでは複製領域は同定されていないが、今回同定した Rep 遺伝子と相同性がある PCP63 遺伝子を含む領域は、pCP13 プラスミドの複製領域である可能性が高い。また、既に述べたように比較ゲノム学的解析から、最近報告された ι 毒素遺伝子と相同性を持ちヒトで食中毒などの腸管疾患を起こす毒素の遺伝子を持つプラスミド¹⁷⁾にも、今回同定した Rep 遺伝子 (PBCN16 遺伝子) や PCP63 遺伝子と相同性の高い遺伝子 (PBCN16 相同遺伝子) が認められる。それらの遺伝子では pBCNF5603 プラスミドの Rep 遺伝子より少し

大きい、これらの PBCN16 相同遺伝子上流には、非常に類似したイテロン配列が存在しており、これらは同一グループのプラスミドと考えられる。

すでに述べたように当研究室に保存していた Strain 13 株の pCP13 プラスミドの PCP63 遺伝子は、GenBank に登録されているものより大きく、腸管病原性 ι 毒素プラスミドの PCP63 相同遺伝子に非常に類似していた。そこで、本研究では、pBCNF5603 プラスミドの Rep 遺伝子 (PBCN16 遺伝子) とその上流領域をもつリコンビナントプラスミド (pKZ200 プラスミド) と Rep 遺伝子を含むプラスミド複製領域に加えてさらにその上流にあるプラスミド分配領域をもつリコンビナントプラスミド (pKZ210 プラスミド) の 2 種類のリコンビナントプラスミドを用いて、当教室に保存していた Strain 13 株の pCP13 プラスミドとの和合性について検討することで、pBCNF5603 プラスミドと pCP13 プラスミドの和合性について推測した。その他に Strain 13 株を用いる理由としては Strain 13 株がエレクトロポレーションにより遺伝子の導入が可能であることも重要である。

<材料>

1. 使用した培地

Cooked Meat Medium (DIFCO)

Fluid Thioglycollate Medium (FTG) (DIFCO)

Tryptic Soy Broth (DIFCO)

Brain Heart Infusion (BHI) (DIFCO)

TGY Medium (100 ml)

Tryptic Soy Broth (DIFCO) 3 g

Glucose (Nakarai Tasque) 2 g

Yeast Extract (DIFCO) 1 g

L-Cysteine (Nakarai Tasque) 0.1 g

Brain Heart Infusion (BHI) (DIFCO)

2. 使用した試薬

Taq ポリメラーゼ

GoTaq Flexi DNA Polymerase (Promega)

TaKaRa EX Taq (タカラバイオ)

Chloramphenicol (WAKO)

3. 使用したキット・機器

QUICKGENE Plasmid Kit SII (KURABO)

Electro Cell Manupurator ECM630 (BTX)

Takara PCR Thermal Cycler Dice TP600 Ver.3.00

4. 参考資料

ウエルシュ菌プラスミドの和合性実験

ウエルシュ菌への遺伝子導入 (エレクトロポレーション法) ⁹⁾

コロニーからの直接 PCR 法 (Colony Direct PCR 法) による遺伝子の検出

<方法>

リコンビナントプラスミドの導入はすでに述べた方法 ⁹⁾ を用い、和合性実験に応用した。簡単に述べると、Cooked Meat 培地に保存していた Strain 13 株培養液 0.4 ml を 10 ml の FTG 培地にいれ、37°C で一晩培養した。一晩培養した FTG 培地の菌液 0.2 ml を 10 ml の TGY 培地に入れ、37°C で一晩培養した。培養菌液を BHI 寒天培地上に塗布し、37°C で、一晩嫌気培養した。BHI 寒天培地上のコロニーについて、コロニー PCR 法で $\beta 2$ 遺伝子陽性であることにより pCP13 プラスミドが存在することを確認した。 $\beta 2$ 遺伝子陽性のコロニーを 10 ml の TGY 培地で、一晩培養した。培養した Strain 13 の菌液 0.6 ml を、新たな TGY 培地 20 ml に加え、37°C、8 時間、嫌気状態で培養した。培養液から遠心により集菌し、2 度塩化カルシウム緩衝液で洗浄した後、菌塊を 1.2 ml の塩化カルシウム緩衝液に懸濁し、その 0.6 ml をプラスミド DNA と混合した。氷上で静置した後、Electro Cell Manupurator ECM630 を用いて、遺伝子の導入を行った。電気ショックを加えた混合液を 4 ml の TGY 培地に入れ、3 時間、37°C で培養した。3 時間培養した TGY 培地の菌液 0.2 ml を 10 ml の新たなクロラムフェニコール (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 含有の TGY 培地に継代した。これを継代 1 代目とした。

一日培養した培養液 0.2 ml を 24 時間ごとに 10 ml のクロラムフェニコール (10 $\mu\text{g/ml}$) 含有 TGY 培地に継代する操作を 5 回繰り返した。継代 2 代目と 5 代目の培養菌液を、クロラムフェニコール (15 $\mu\text{g/ml}$) を含む BHI 寒天培地に塗布した。2 種類のリコンビナントプラスミド (pKZ200 プラスミドと pKZ210 プラスミド) のいずれかを導入した Strain 13 株に由来する BHI 寒天培地上のクロラムフェニコール耐性コロニーについて pCP13 プラスミドの存在を調査し、pCP13 プラスミドとリコンビナントプラスミドとの和合性について検討した。つまり、2 種類のクロラムフェニコール耐性遺伝子を保有するリコンビナントプラスミドのいずれかを導入し、継代した培養液から形成されたクロラムフェニコール耐性コロニーについて、pCP13 プラスミド上の特徴的な遺伝子である $\beta 2$ 毒素遺伝子の有無をコロニーPCR 法により検討した。加えて、pCP13 プラスミドではいくつかのトランスポゾン様の遺伝子が認められ、それらの遺伝子の影響により $\beta 2$ 毒素遺伝子とその周辺が抜け落ちた可能性もあるため、pCP13 プラスミドが除去 (cure) されていることを確認するため $\beta 2$ 毒素遺伝子領域から離れた場所に位置する TopA 遺伝子と Rep 遺伝子と考えられる PCP63 遺伝子の下流の領域 (ParA 遺伝子とは反対の領域) に存在する Cna 遺伝子について PCR 法を用いて存在の有無を検討した。

<結果と考察>

2 種類のリコンビナントプラスミドのいずれかを導入した Strain 13 株を 2 代継代した培養液と 5 代継代した培養液からクロラムフェニコールを含む BHI 培地上に形成されたコロニーについて検討した。2 代継代した培養液から形成されたコロニーでは、それぞれのリコンビナントプラスミドにつきそれぞれ 25 個、全体で 50 個のコロニー、5 代継代した培養液から pKZ210 プラスミドを導入した培養液からの 25 個のコロニーについて、コロニーPCR 法で $\beta 2$ 遺伝子、TopA 遺伝子、Cna 遺伝子の有無を検討した結果、形成されたコロニーにこれらの遺伝子が陽性のものは認められなかった (表 6)。一方、対照として用いた pJIR750 プラスミドを導入し、5 代継代培養した培養液から形成された 25 個のクロラムフェニコール耐性コロニーでは $\beta 2$ 遺伝子

が全てのコロニーに認められた (表 6)。

表6 プラスミドの和合性

Rate of <i>cpb2</i> -positive colonies		
	2 passages	5 passages
pKZ200 in Strain 13	0%*	NT
pKZ210 in Strain 13	0%*	0%
pJIR750 in Strain 13	NT	100%

*: These colonies were also negative for PCR assays

さらにこれらの B2 遺伝子を持たないクロラムフェニコール耐性コロニーについて検討した。まず、 α 毒素遺伝子が存在することがウエルシュ菌であると同定する必須条件であるので、コロニーがウエルシュ菌であることを確認するため、以前に報告したプライマー¹⁷⁾による PCR 反応を行い α 毒素遺伝子の有無を確認した。その結果調べた 16 個のコロニーすべてが α 毒素遺伝子陽性であり、これらのクロラムフェニコール耐性コロニーはウエルシュ菌であると考えられた。さらに α 毒素遺伝子は、株による塩基配列の違いが比較的大きく多様性を持っている遺伝子であることを利用して、16 個のウエルシュ菌のコロニーのうち 4 個の α 毒素遺伝子の塩基配列を決定した。決定した塩基配列を以前に報告¹⁷⁾した Strain 13 株の α 毒素遺伝子の塩基配列と比較した結果、決定した α 毒素遺伝子の塩基配列は以前に報告した Strain 13 株の α 毒素遺伝子の塩基配列¹⁷⁾と全く同じであった。また、これらの α 毒素遺伝子の塩基配列は今回使用した他のウエルシュ菌株 (F5603 株、ATCC3624 株) とは明らかに異なっており、クロラムフェニコール耐性コロニーは Strain 13 株に由来すると考えられた (図 12)。Rep 遺伝子 (PBCN16 遺伝子) とその上流域及び上流の ParA 遺伝子の一部を持つリコンビナントプラスミド (pKZ210)、Rep 遺伝子とプラスミドの分配に関連した領域 (ParA 遺伝子、ParB 遺伝子、ParS 配列の ParABS 領域) を持つリコンビナントプラスミド (pKZ200) のいずれとも pCP13 プラスミドが同時に安定し

て存在することができないと考えられた。このことは、大腸菌のプラスミドの **Inc** ファミリーにおける不和合性と同じように、**Rep** 遺伝子とその上流域に存在するイテロン配列が **pCP13** プラスミドとリコンビナントプラスミドの不和合性に関連していると考えられた。また比較ゲノム学的解析から、**pBCNF5603** プラスミドの **Rep** 遺伝子に加え、**pCP13** プラスミドの **PCP63** 遺伝子やその他の相同性を持った **Rep** 遺伝子と考えられる遺伝子の上流域にはイテロンと考えられる 5 つの **IR** 配列が認められ、その塩基配列はほとんど同じであった (図 10)。

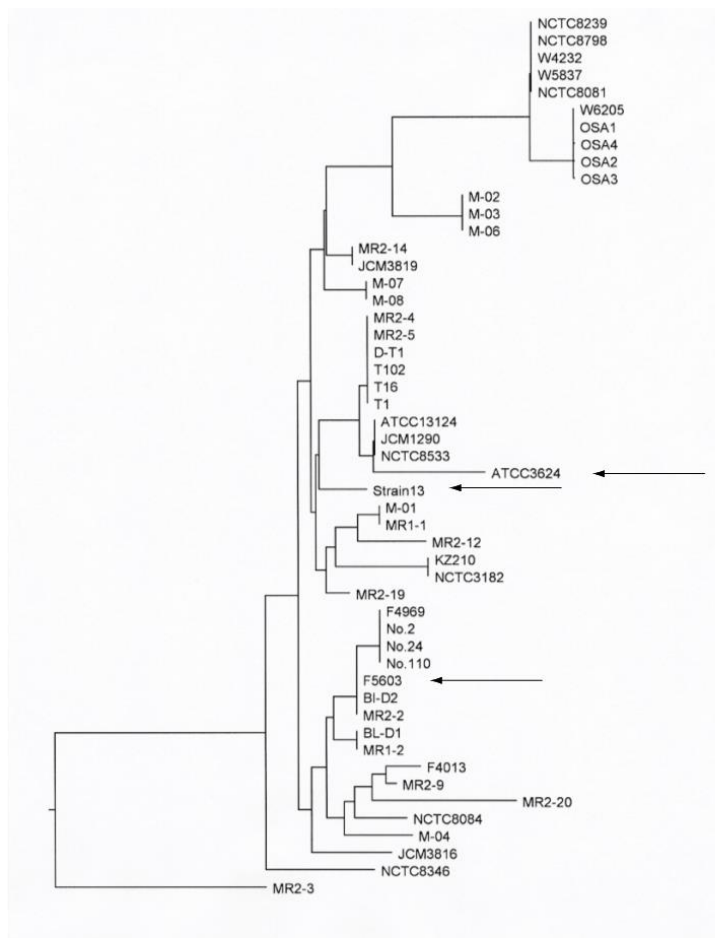


図12 α毒素遺伝子の部分配列をもとにした系統樹

実験結果から、**pCP13** プラスミドと **pBCNF5603** プラスミドは、不和合性のプラスミドであることが判明した。比較ゲノム学解析の結果と考え合わせると、**ICP** プラスミドの **Rep** 遺伝子領域を利用した和合性の分類から **pBCNF5603** プラスミドの **Inc** (**Incompatibility**) ファミリーには、**β2** 毒素遺伝子保有 **pCP13** プラスミド、エンテ

ロトキシシン活性を持つ毒素遺伝子保有 pCP-OS1²⁰⁾、pCP-TS1 プラスミド²⁰⁾、ウエルシュ菌の病原性への関与がはっきりしていない pB262B プラスミド、WAL-14572 株に認められるプラスミドなどが属すると考えられた。

一方、現在のところ最も詳しく調べられているウエルシュ菌の主要毒素遺伝子保有プラスミドは、Rep 遺伝子がほとんど同じで、しかも、非常に類似したイテロン部分の塩基配列を有している^{5, 6, 10)}。しかしながら、ほとんど同じ Rep 遺伝子とイテロンを持つ毒素遺伝子保有プラスミドが、NetB 毒素保有テトラサイクリン耐性株や B 型ウエルシュ菌 NCTC8533 株（未発表データ）では 3 種類が同時に安定して存在できていることが知られている^{5, 6)}。つまり、主要毒素遺伝子保有プラスミドは、ほとんど同じ Rep 遺伝子とほとんど同じ塩基配列のイテロンを持つにも関わらず和合性であると考えられる。これらの毒素遺伝子保有プラスミドでは、イテロンの塩基配列の少しの違いが和合性を可能にしているかもしれない。しかし、これらのプラスミドでは、Rep 遺伝子上流に認められるプラスミド分配領域である ParMRC 領域（特に ParC 配列）が同時に存在する和合性プラスミドで明確な違いが認められ、この領域が和合性に重要であると考えられる（未発表データ）。ウエルシュ菌のプロトタイプ毒素遺伝子保有プラスミドと異なり、今回検討した ICP 型の pBCNF5603 プラスミドとその近縁のプラスミドである pCP13 プラスミドでは、プラスミド分配領域の ParABS 領域（特に ParA、ParB の結合領域と考えられる ParS 領域）を保有しないリコンビナントプラスミドが不和合性に関連していることから、以前から詳しく調べられている大腸菌のプラスミドなどと同様にイテロン配列が和合性に強く関連していることが判明した。一方、プラスミド分配領域がプラスミドの和合性に関与する可能性はあるが、今回の実験では検討していない。今後この点について検討していく予定である。

<参考結果>

PCR アッセイ系の特異性の検討

この研究で新たに用いた 5 つの遺伝子に対する PCR アッセイ系 (pBCNF5603 プラスミドと pCP13 プラスミドの Rep 遺伝子、pBCNF5603 プラスミドの BCN5603 遺伝子、pCP13 プラスミドの $\beta 2$ 毒素遺伝子、TopA 遺伝子、Can 遺伝子) の特異性について検討した。対象として用いた菌株はウエルシュ菌の 5 株、セレウス菌 4 株である。表に示すように、実験に用いた 5 種類の遺伝子を検出する PCR 法は、それぞれの遺伝子の特異的に検出していた (表 7)。

表7 和合性、安定性の実験で用いたPCR反応の特異性

		Target gene				
Strain		<i>rep</i>	<i>cpb2</i>	<i>bcn</i>	<i>can</i>	<i>topA</i>
<i>C. perfringens</i>	strain 13	+	+	-	+	+
	F5603	+	-	+	+	-
	F4969	-	-	-	-	-
	NCTC8329	-	-	-	+	+
	ATCC3624	-	-	-	-	-
<i>B. cereus</i>	13061	-	-	-	-	-
	87-015	-	-	-	-	-
	43	-	-	-	-	-
	35	-	-	-	-	-

第六章 pBCNF5603 のプラスミド分配領域の安定性への関与

6-1. ウエルシュ菌宿主株での安定性

プラスミドは、宿主の持っている染色体複製系とは異なる独自の複製系を持つが、染色体の複製と同期して複製することで宿主細胞分裂後も子孫細胞に受け継がれる。また、分裂した子孫細胞それぞれに均等に分配 (partitioning) され、分裂を繰り返しても安定して維持される。しかし、プラスミドの維持つまり安定性が宿主により異なることが知られている。具体的な例として、グラム陰性菌の薬剤耐性遺伝子保有プラスミドが菌種により安定性が異なることが報告²¹⁾されており、プラスミドの分配に宿主側の因子が関連すると考えられている。しかし、プラスミドの分配に関連した具体的な宿主側の因子についての報告はほとんどない。また、Rep 遺伝子以外にも様々な因子がイテロン型プラスミド (ICP) の複製に影響を与え、プラスミドの安定性に関連していると推測される。

ウエルシュ菌の毒素遺伝子保有プラスミドの伝達実験から、本来、毒素遺伝子保有プラスミドを持たない株に毒素遺伝子保有プラスミドが伝達された場合、受け取った株 (recipient) は、比較的容易にプラスミドを失うことが知られている (personal communications)。以上のことから、プラスミドの安定性は、今回同定した複製領域や分配領域の機能と同時に宿主の因子により影響を受け、それによりプラスミドの安定性に違いが生じる可能性が示唆される。

本研究では、プラスミドの安定性に関連するプラスミドが持つ因子として考えられる複製領域と ParA 遺伝子、ParB 遺伝子を含む分配領域をもったリコンビナントプラスミド (pKZ200 プラスミド) を用いて、本来プラスミドを持たない株である ATCC3624 株と pBCNF5603 プラスミドと同一の Inc グループに属するプラスミド pCP13 をもつ Strain 13 株におけるリコンビナントプラスミドの安定性を比較し、プラスミドの複製、分配領域のプラスミド安定性への寄与と宿主因子のプラスミド安定性への関与について検討した。

<材料>

1. 培地

Cooked Meat Medium (DIFCO)

Fluid Thioglycollate Medium (FTG) (DIFCO)

Tryptic Soy Broth (DIFCO)

Brain Heart Infusion (BHI) (DIFCO)

TGY Medium (100 ml)

Tryptic Soy Broth (DIFCO) 3 g

Glucose (Nakarai Tasque) 2 g

Yeast Extract (DIFCO) 1 g

L-Cysteine (Nakarai Tasque) 0.1 g

Brain Heart Infusion (BHI) (DIFCO)

2. 試薬

Taq ポリメラーゼ

GoTaq Flexi DNA Polymerase (Promega)

TaKaRa EX Taq Polymerase (TaKaRa)

Chloramphenicol (WAKO)

3. 使用した機器

TaKaRa PCR Thermal Cycler Dice TP600 Ver.3.00

参考資料

コロニーからの直接 PCR 法 (Colony Direct PCR 法) による遺伝子の検出

<方法>

本研究で作成したクロラムフェニコール耐性リコンビナントプラスミドで、Rep 遺伝子に加えてプラスミドの分配に関連していると推定される遺伝子群 ParA 遺伝子、ParB 遺伝子 (この 2 つの遺伝子はオペロンと考えられる) と ParS 領域と推測される塩基配列部分をもつ pKZ200 プラスミドを用いて検討した。プラスミドの複製領域の同定実験で得られ、Cooked Meat 培地で保存していた pKZ200 プラスミド保有 ATCC3624 由来株と pKZ200 プラスミド保有 Strain 13 由来株 (この株では pCP13

プラスミドは cure され、保有されていないことを確認している) の各々2 クローンを用いた。保存株の培養液 0.2 ml を 10 ml FTG 培地で一晚培養し、その後、培養液 0.2 ml を 10 ml のクロラムフェニコール含有 (15 µg/ml) TGY 培地で 37°C、一晚培養した。クロラムフェニコール含有 (15 µg/ml) BHI 寒天培地に塗布し、37°Cで嫌気培養した。形成されたコロニーをクロラムフェニコール含有 (15 µg/ml) TGY 培地で 2 回継代培養した。クロラムフェニコール含有 TGY 培地で 2 回継代培養した培養液を、クロラムフェニコールを含有していない TGY 培地 10 ml に 10 µl を入れ、24 時間 37°C で培養した (10 ml の培地に 10 µl 入れることで 1 回の継代培養で約 1,000 倍希釈となり、元の状態にまで増殖することで少なくとも約 10 世代分裂していると推定することができる)。同様の方法で 6 回継代培養 (約 60 世代) した。コントロールとしてクロラムフェニコール含有 (10 µg/ml) TGY 培地で継代培養したものを用いた。4 回継代培養した培養液と 6 回継代培養した培養液を、クロラムフェニコールを含まない BHI 平板培地に塗布し、37°Cで嫌気培養した。各々25 個の形成されたコロニーをクロラムフェニコール含有 (15 µg/ml) BHI 寒天培地とクロラムフェニコールを含有していない BHI 寒天培地に画線塗布し、レプリカを作成し 37°Cで嫌気培養した。レプリカ上での増菌を確認することで、クロラムフェニコールを含まない BHI 培地で形成されたコロニーのクロラムフェニコール耐性を確認することにより、リコンビナントプラスミド (pKZ200 プラスミド) の保有の有無を検討した。プラスミドを自然保有する F5603 株と Strain 13 株も同様に約 60 世代培養し、BHI 培地上で形成されたコロニーについて、Rep 遺伝子と BCN5603 遺伝子 (F5603 株) 又は Rep 遺伝子と B2 毒素遺伝子 (Strain 13 株) の有無をコロニーPCR 法により確認し、pBCNF5603 プラスミドと pCP13 プラスミドの安定性についても検討した。

<結果と考察>

pKZ200 を保有する ATCC3624 株の場合、BHI 寒天培地上で形成されたコロニーのうちクロラムフェニコールを含まない TGY 培地で約 60 世代培養した後のクロラムフェニコール耐性コロニーは、2 種類のクローンいずれにおいても 40% 程度であった

(表 8)。一方、クロラムフェニコール含有 (10 µg/ml) TGY 培地で継代した場合には、いずれも 80%以上がクロラムフェニコール耐性コロニーであった。言い換えると、ATCC3624 株におけるリコンビナントプラスミド (pKZ200) は比較的不安定であると考えられた(表 8)。一方、同じ Inc ファミリーに属するプラスミドである pCP13 プラスミドを保有していた Strain 13 株にリコンビナントプラスミド pKZ200 を導入した 2 種類のクローンでは、40 世代培養後のクロラムフェニコール耐性コロニー (リコンビナントプラスミド保有コロニー) の比率は ATCC3624 株に比べて高い傾向が認められた。しかし、60 世代培養後のクロラムフェニコール耐性コロニーは、いずれも 40%程度で ATCC3624 株の場合と明らかな違いは認められなかった(表 8)。つまり、いずれの株においてもリコンビナントプラスミドは、プラスミド複製、分配領域を保有しているにも関わらず、比較的不安定であった。

クロラムフェニコール耐性コロニーやクロラムフェニコール感受性コロニーがリコンビナントプラスミド pKZ200 を保有、または、消失しているかを確認するため、一部のコロニーについてコロニーPCR 法を用いて Rep 遺伝子の有無を検討したところ、クロラムフェニコール感受性コロニーでは Rep 遺伝子は認められなかった。一方、クロラムフェニコール耐性コロニーでは Rep 遺伝子が検出された。

次に、導入したリコンビナントプラスミドの不安定さが pCP13 プラスミドの影響によるものでないことを確認するため β2 毒素遺伝子に対する PCR 法により検討すると、いずれのコロニーにも β2 毒素遺伝子は認められず、リコンビナントプラスミド pKZ200 の不安定性は、pCP13 プラスミドが影響したわけではないと考えられた。

一方、F5603 株を 60 世代 (それ以上) 培養した後のコロニーでは、BCN 遺伝子、Rep 遺伝子の陽性率は 100%で、pBCNF5603 プラスミド保有率は、100%であると考えられた。同様に Strain 13 株でも 60 世代 (それ以上) 培養後のコロニーの β2 毒素遺伝子、PCP63 遺伝子の陽性率は 100%で、これらの 2 種類のプラスミドは、本来の株では非常に安定していると考えられ、リコンビナントプラスミド pKZ200 の安定性と大きな違いが認められた (表 8)。

表8 ウェルシュ菌におけるリコンビナントプラスミドの安定性

A) pKZ200 in ATCC3624

		Rate of Cp resistant colonies	
		40 generations	60 generations
clone 1	Culture with Cp	96%	92%
	Culture without Cp	64%	40%
clone 2	Culture with Cp	84%	84%
	Culture without Cp	28%	44%

B) pKZ200 in Strain 13

		Rate of Cp resistant colonies	
clone 1	Culture with Cp	92%	80%
	Culture without Cp	88%	40%
clone 2	Culture with Cp	100%	96%
	Culture without Cp	60%	44%

C) pBCNF5603 in F5603

		Rate of PCR positive colonies	
clone 1	PCR for the rep gene	NT	100%
	PCR for the bcn gene	NT	100%
clone 2	PCR for the rep gene	NT	100%
	PCR for the bcn gene	NT	100%

D) pCP13 in strain 13

		Rate of PCR positive colonies	
clone 1	PCR for the PCP63 gene	NT	100%
	PCR for the cpb2 gene	NT	100%
clone 2	PCR for the PCP63 gene	NT	100%
	PCR for the cpb2 gene	NT	100%

Culture samples after 40 and 60 generations

Rate of randomly selected colonies

Cp: Chloramphenicol

比較ゲノム学的検討の結果から、pBCNF5603 プラスミドや pCP13 プラスミドなどに認められる ParA 遺伝子、ParB 遺伝子含む領域がプラスミドの分配に関連する可能性が考えられた。さらに詳細に調べると、この 2 つの遺伝子の下流域に 117bp からなる非常に保存された領域が認められた。この領域には、2 組の IR 配列と 1 つの繰り返し配列が存在する (図 13)。言い換えると 1 組の IR 配列と 1 つの繰り返し配列を含む領域が 2 ヶ所に存在していた。これらの配列は、大腸菌の P1 プラスミドなどに存在するプラスミドの分配領域の構成要素である ParS シーケンスの領域と極めて類似しており、pBCNF5603 プラスミドは、この領域に ParS 領域を保有していると考えられた。つまり、pBCNF5603 プラスミドや pCP13 プラスミドは、プラ

スミド分配領域として ParABS システムを有すると考えられる。さらに下流の PBCN19 遺伝子と相同性を持つ遺伝子も 6 種類すべてのプラスミドに認められ、その機能は不明で、明らかな保存ドメインは認められないがプラスミドの安定性に関与するものであるかもしれない (表 5)。

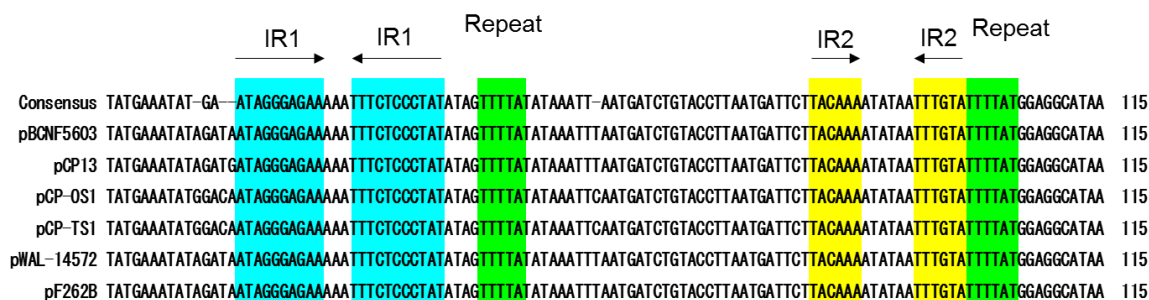


図13 ParS領域と考えられるParB遺伝子下流の塩基配列

今回用いたリコンビナントプラスミド pKZ200 は、詳しく研究されている大腸菌の P1 プラスミドなどの ICP プラスミドにおける分配や安定性に重要な構造をすべて保有している。しかしながら、リコンビナントプラスミド pKZ200 は、ウエルシュ菌 ATCC3624 株だけでなく pCP13 を保有していた Strain 13 株に由来する株のいずれにおいても、pBCNF5603 プラスミドや pCP13 プラスミドのように安定して存在することができなかった。また、アクリジンオレンジによる染色体とプラスミドの複製抑制効果の差を利用したウエルシュ菌 Strain 13 株の pCP13 プラスミドの除去 (curing) を試みた実験では、大腸菌の場合と異なり、調査した Strain 13 株のコロニーの中に pCP13 プラスミドを消失したと考えられるクローンは認められなかった (未発表データ)。これらの結果を考え合わせるとウエルシュ菌における比較的大きいプラスミドは非常に安定であり、この安定性には、P1 プラスミドと異なる機構や因子が関係していることが明らかになった。

本来のプラスミドとリコンビナントプラスミドの一番大きな違いは大きさであり、プラスミドの大きさ自身がプラスミドの安定性に寄与している可能性が考えられる。しかし、B 型株である NCTC8533 株では、一番大きい毒素遺伝子保有プラスミドである β 毒素遺伝子が最も消失しやすく、その次には 2 番目に大きい λ 毒素遺伝子保有

プラスミドで、最も消失しにくいのは最も小さい ϵ 毒素遺伝子を保有する約 65kb のプラスミドであった（未発表データ）。このことから、ウエルシュ菌のプラスミドの場合、単に大きいことが重要ではなく最も安定性に適した大きさがある可能性が示唆される。また、プラスミドがある程度の大きさを持つということは、今回同定した複製領域や分配領域以外の場所に存在する機能未知の遺伝子や塩基配列がプラスミドの安定性には重要である可能性も推察される。実際、大腸菌のプラスミドでは、プラスミド分配領域の遺伝子以外にもプラスミド上の様々な遺伝子がプラスミドの安定性に関係することが知られている。今回検討した pBCNF5603 プラスミドだけでなく塩基配列が報告されているウエルシュ菌のプラスミド上には、多くの機能未知の遺伝子が認められ、想定タンパク質（Hypothetical protein）遺伝子や保存想定タンパク質（Conserved hypothetical protein）遺伝子として報告されている。このような機能未知の遺伝子の中に、ウエルシュ菌のプラスミドの安定性に重要な因子をコードする遺伝子が存在する可能性も十分に考えられる。

別の理由としては、pBCNF5603 プラスミドと pCP13 プラスミドでは、Rep 遺伝子やプラスミドの複製、分配領域が完全には同一でないことが影響している可能性がある。つまり、Rep 遺伝子の保存ドメインは 2 つのプラスミドで同じであるが、それ以外の領域に少しの異なる部分があることや同じ Inc ファミリーに属する pCP13 プラスミドは、pBCNF5603 プラスミド由来のプラスミド分配領域には少しの塩基配列の違いが認められる。また、同じ ICP プラスミドである毒素遺伝子保有プラスミドがウエルシュ菌で複製できなくなる変異体では最も上流のイテロンの 2 塩基上流に変異がはいることで複製能を失うことが報告¹⁰⁾されており、このようなわずかな違いが Strain 13 におけるリコンビナントプラスミド pKZ200 の安定性に関連している可能性がある。

また、大腸菌群の細菌では、プラスミドの安定性に宿主因子が関わり合いを持っていることが知られているが、ウエルシュ菌でそのような点に注目した研究は、これまで行われていない。宿主細胞の遺伝学的性状についての 8 つの染色体上の遺伝子を用いた multi-locus sequence typing (MLST) analysis 研究¹⁷⁾で、毒素遺伝子保有プラ

スミドなどのプラスミドをもつ株は、持たない株とは異なる遺伝学的背景を持つことが報告されている。MLST を用いた研究の結果では、今回宿主として使用したウエルシュ菌株である F5603 株と Strain 13 株は、ATCC3624 株と比べるとより近い遺伝学的背景を持っている。それにも関わらず pBCNF5603 プラスミドのプラスミド分配領域を持つリコンビナントプラスミドが、Strain 13 株では安定的に存在できない結果であった。しかし、プラスミドの複製領域に関連した宿主染色体のハウスキーピング遺伝子（代表的なものには DnaA 遺伝子がある）は、以前のウエルシュ菌の MLST 研究では調査されていない。つまり、少なくともプラスミドの複製や分配に関連した領域と直接関係を持つ染色体上の遺伝子については、現在までのところ十分な検討は行なわれていない。今後、プラスミド上や染色体上の遺伝子でプラスミドの複製や分配に関連した遺伝子をくわしく調査し、ウエルシュ菌の B2 毒素や主要毒素遺伝子を保有するプラスミドの安定性に関連を持つ因子を明らかにすれば、病原性ウエルシュ菌による疾患の治療や予防に応用することが可能となる。

6-2. 推定プラスミド分配領域の比較ゲノム学的検討

Rep 遺伝子の上流部分に認められた ParA 遺伝子、ParB 遺伝子、ParS シークエンスのプラスミドの分配に関連した ParABS 領域は、プラスミドの安定性や和合性に関連をもつ可能性がある。また、これらの遺伝子は PCR 法による以前の検討¹⁷⁾で様々な株に存在することが判明している。そこで、今回同定した Rep 遺伝子を同時に保有するプラスミドに加え、そのほかのプラスミドにもプラスミドの分配に関連した ParABS 領域が存在するかどうかを GenBank のデータベースで検討した。

<使用したソフトウェア>

BLAST-P (NCBI)

ORF Finder (NCBI)

<方法>

NCBI のホームページ上のオンラインソフトウェアを使用して検討した。

<結果と考察>

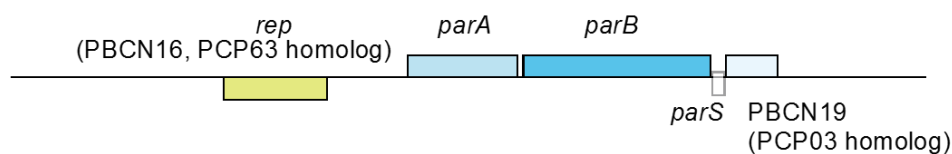
プラスミドの分配に関連した領域として、pBCNF5603 プラスミドと pCP13 プラスミドでは Rep 遺伝子上流に逆向きの ParA 遺伝子と ParB 遺伝子のオペロンが認められた。これらの遺伝子の塩基配列から推測されるアミノ酸配列は、これらのプラスミドで 96%以上の相同性を持ち Rep 遺伝子以上に非常に類似していた (表 5)。また、pBCNF5603 プラスミドや pCP13 プラスミドと非常に近縁な Rep 遺伝子を持つ 4 種類のプラスミドについて、これらのプラスミド分配領域の存在を確認したところ、同じ Inc ファミリーと考えられる 4 種類のプラスミド (pCP-TS1、pCP-OS1、pF262、pWAL) にも Rep 遺伝子上流に同様の ParABS 領域が認められ、いずれも非常に保存されていた (表 5)。

さらに、Rep 遺伝子とプラスミドの分配に関連した遺伝子の間 (Intergene 領域) の塩基配列は、イテロン配列、AT 配列だけでなく、ParA 遺伝子のプロモーター領域を含むと考えられる領域すべてがかなり保存されていた。これらの ParA 遺伝子、ParB 遺伝子の下流の ParS と推測される塩基配列には、保存された 117 塩基の塩基配列が認められた。この推定 ParS 領域には、11 塩基からなる IR (IR1) と 6 塩基からなる IR (IR2) との 2 種類の IR 塩基配列と 2 つの 6 塩基からなる繰り返し配列が認められ、プラスミドの分配に関する遺伝子群は、6 種類のプラスミドに共通であった (図 13)。詳細な研究が行われている大腸菌の P1 プラスミドのプラスミド分配領域に類似の構造がウエルシュ菌の pBCNF5603 プラスミドとその近縁のプラスミド全てで認められ、特にプラスミドの分配に必須の部分とされている IR 配列と繰り返し配列のペアーの部分が保存されていた。この部分に類似した構造が、ウエルシュ菌の pBCNF5603 プラスミドのグループのプラスミドすべてに認められることから、基本的には本研究で推定した領域は、比較ゲノム学的検討からもプラスミドの分配に関連し、ParABS 領域はプラスミドの安定性に関連する可能性が推測された。しかし、これらの領域全てを持つリコンビナントプラスミドを用いた実験からはプラスミドの安定性とこの領域との関連は認められなかった。

一方、同時に存在しているエンテロトキシン遺伝子を保有するプラスミドも同様に

ICP プラスミドであると考えられているが、Rep 遺伝子上流に存在するのは、ParMRC 系のプラスミド分配システムであると報告^{5, 6)}されており、今回研究した pBCNF5603 プラスミドの ParABS プラスミド分配システムとは異なる。しかし、GenBank 上に主要毒素である β 毒素遺伝子を保有し、ParMRC 系のプラスミド分配システムをもつプラスミドに、pBCNF5603 プラスミドの分配領域である ParABS 領域と極めて類似した遺伝子構成を有する領域が認められた。我々が今まで研究に用いてきた B 型 NCTC8533 株の β 毒素遺伝子にも同様の領域が認められるかどうか NCTC8533 変異株を用い、部分的な塩基配列を決定して検討したところ、B 型 NCTC8533 の β 毒素遺伝子保有プラスミドにも ParABS 領域と極めて類似した遺伝子構成を有する領域が認められた (アクセッション番号: AB736083)。しかし、これらの領域は β 毒素遺伝子保有プラスミドの複製領域から離れた部分に存在すると考えられた。その他にもこの領域は、B 型 ATCC3626 株の β 毒素遺伝子保有プラスミドや C 型 JGS1945 株の β 毒素遺伝子保有プラスミドに認められ、さらに E 型 JGS1987 株のプラスミドと考えられる塩基配列情報にも認められた。これらについて比較したところ、B 型 NCTC8533 株、B 型 ATCC3626 株、C 型 JGS1945 株の β 毒素遺伝子保有プラスミドでは、塩基配列が非常に類似しており、いずれも ParABS 領域が認められた (表 5、図 14)。

pBCNF5603



The *cpb*-plasmid in NCTC8533 strain

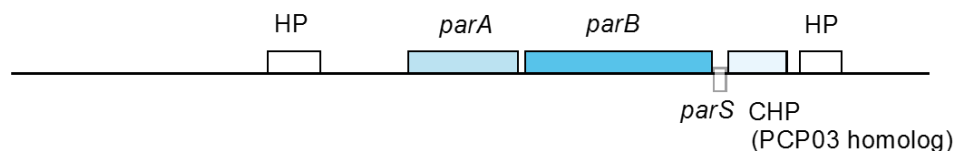


図14 pPBCN5603プラスミドのRep遺伝子上流に認められる領域とβ毒素遺伝子保有プラスミド上の類似領域の比較

プラスミド分配領域は、プラスミドの安定性だけでなく和合性と関連を持つ可能性が考えられ、pBCNF5603 プラスミドと非常に類似しているプラスミド分配領域を持つβ毒素遺伝子保有プラスミドと pBCNF5603 プラスミドとが不和合性を示すかどうかは興味深いところであり今後研究を進めていきたいと考えている。

これまで述べてきたように、このプラスミド分配領域と考えられる領域には3つの遺伝子と1つの領域が存在すると考えられる。ParA 遺伝子と ParB 遺伝子は、これまで報告されている大腸菌のプラスミドなどと同様にオペロンを形成していると考えられた²²⁾。また、ParB 遺伝子とその下流の PBCN19 遺伝子との間には ParS 領域と考えられる塩基配列が存在するが、その大きさは117塩基であり、ParA 遺伝子と ParB 遺伝子に加えて PBCN19 遺伝子もオペロンを形成していると推測される。これらのことから、pBCNF5603 プラスミドは3つの遺伝子からなるプラスミド分配領域を持っている可能性も考えられる。

pBCNF5603 プラスミドのプラスミド分配領域の各々の遺伝子産物の中で、ParA 蛋白質は ATPase 活性を持つと推察され、1か所の P ループドメイン (KGGVAKT 配列) を有する²²⁾。この P ループドメインは、リン結合領域で Walker A モチーフと考えられる。一方、ParA 蛋白質に通常認められる Walker B モチーフは BLAST 上では同定されていない。これは Walker B モチーフは一般に多様性があることから特定しにくいと考えられる。しかし、ParA 蛋白質には Walker B モチーフと思われる4個の疎水性アミノ酸とそれに続くアスパラギン酸の5つのアミノ酸の配列 (YCLID 配列) が確認された。さらに、ParA 蛋白質には2か所のマグネシウムイオン結合部位と考えられる部位が認められた。

ParB 蛋白質には、今まで報告されている ParB ヌクレアーゼ活性に関連を持つドメインが存在している²²⁾。一方、機能が未知である PBCN19 相同タンパク質には明らかな保存ドメインは認められないが、相同性を持つもの (相同性は低い) に SpoVT 蛋白質がある。この SpoVT 蛋白質は芽胞形成時に機能するタンパク質のひとつである。また、ParA 蛋白質に高い相同性を持つものの一つとして Soj 蛋白質があり、この Soj 蛋白質は芽胞形成開始阻害因子 (Sporulation initiation inhibition protein)

であると考えられており、ParA 蛋白質が芽胞形成時に機能するタンパクに類似していることを考えると PBCN19 相同遺伝子の産物は ParA 蛋白質と関連がある可能性が考えられる。

第七章 総括

今回、ウエルシュ菌の腸管病原性株の毒素遺伝子保有プラスミドと共存するプラスミドについて研究を行い、以下のことを明らかにした。

1. プラスミドの病原性への役割を検討するため、毒素遺伝子保有プラスミドと共存するプラスミド pBCNF5603 の保有する遺伝子の機能を推測した。
2. 機能が推測できた遺伝子のなかにバクテリオシン遺伝子とその制御領域が存在していた。バクテリオシン遺伝子自身は、既に報告されているバクテリオシン BCN5 とほとんど同じドメイン構造を有していた。バクテリオシン発現の制御領域は、比較ゲノム学的検討で、ストレスにより発現が促進されると推察された。今回、ヒトの腸管病原性ウエルシュ菌株が、バクテリオシン産生能を有していることを初めて確認し、実際に、その産生がストレス処理により促進されることも確認した。
3. 今回の研究で、ウエルシュ菌の伝達能を有していない毒素遺伝子保有プラスミドのグループにおいて、その基本的機能である自己複製能に重要な遺伝子である Rep 遺伝子を同定した。さらに、その上流の塩基配列の比較からイテロン配列を同定し、このプラスミドがイテロン型プラスミド (Iteron-containing plasmid : ICP) であることを明らかにした。さらには、比較ゲノム学的方法により Rep 遺伝子上流にプラスミド分配領域を同定した。同定したプラスミド分配領域から、本研究で解明したプラスミドは、typeII プラスミド分配領域²²⁾を持つプラスミド毒素遺伝子保有プラスミドとは異なる type Ia のプラスミド分配領域²²⁾を持っていることを初めて明らかにした。
4. バクテリオシン遺伝子を保有しているプラスミドには、毒素産生や薬剤耐性などの遺伝子は認められなかった。また、このプラスミドは伝達性に関連した遺伝子群は存在しなかったが、共存する毒素遺伝子保有プラスミドが伝達性であると考えられていることから、毒素遺伝子保有プラスミドとの共伝達の可能性は考えられる。

5. 今回の研究で、ウエルシュ菌のプラスミドの和合性を検討するための実験系を初めて確立した。さらに、類似の複製システムを持つと考えられるプラスミドにおける和合性の実験に応用し、実際に不和合性であることを確認した。和合性の実験結果から、**Rep** 遺伝子とイテロン領域がプラスミドに特徴的な不和合性（近縁プラスミドは同時にひとつの細胞内存在できない性質）に関連していることを明らかにした。さらに比較ゲノム学的検討より近縁のプラスミド（同じグループに分類されるであろう）が少なくとも 5 種類あり、3 種類は毒素遺伝子保有プラスミドであった。これらのプラスミドは、和合性（**Incompatibility**）に基づくプラスミドの分類に応用が可能で、ウエルシュ菌のプラスミドの **Inc** グループを初めて明らかにした。また、これらの **Inc** グループのプラスミドは、ウエルシュ菌の病原性と関連を持っていると考えられた。
6. ウエルシュ菌におけるプラスミドの安定性に関する研究は今までされていない。**Rep** タンパク質の同定から、プラスミドの細菌細胞内での安定性（分裂しても子孫に確実に受け継がれる）に重要なプラスミド分配と関連をもつと思われる遺伝子群を確認した。そこでこれらウエルシュ菌プラスミドの安定性について検討した結果、ウエルシュ菌プラスミドにおいては、プラスミド分配領域だけではプラスミドの安定性を説明できないことをはじめて明らかにした。このことから、このプラスミドの安定性には、プラスミド分配遺伝子群の領域外の遺伝子や染色体の複製関連遺伝子が関係していると推定できる。

第八章 今後の展望

今回の研究結果から、腸管病原性ウエルシュ菌の病原性発現にバクテリオシンが関与している可能性が強く示唆された。一般にバクテリオシンは、プロバイオテックスによる腸内フローラのバランスの改善に作用する微生物が産生し、病原細菌の増殖阻害活性に関連していると考えられている。近年、家畜への抗生物質の投与が、ヒトに認められる耐性菌出現の温床になっていると考えられ、ヨーロッパやオーストラリアなどにおいては使用が制限されてきている。そのため、ウエルシュ菌による動物の疾患、特に抗生物質により発生が抑制されていた鶏の壊死性腸炎が養鶏場などで発生し、大きな経済的損失をもたらすことが問題になっている²⁰⁾。この感染症は、かつてはウエルシュ菌の主要毒素である α 毒素によると考えられてきたが、近年の研究からウエルシュ菌の β 毒素や δ 毒素に相同性を持つNetB (necrotic enteritis B-like) 毒素がその主な原因であると考えられるようになってきた²³⁾。今回発見したバクテリオシンBNC5603や以前から詳細に研究されているバクテリオシンBCN5などがウエルシュ菌に活性を持つことから、このような疾患に毒素遺伝子を持たないがバクテリオシンを産生するウエルシュ菌をプロバイオテックスとして用いることで、病原性ウエルシュ菌の増殖を抑制し、疾患の発生を阻止することに応用できると考えられる。今後研究を進めることは、鶏の壊死性腸炎の発生を抗生物質の使用なしに抑制し、大きな経済的損失をなくすることによりかなりの貢献があると考えられる。

また、ウエルシュ菌の近縁菌種に、ヒトにおいて抗生物質関連下痢症や院内感染、更には高齢者での難治性、再発を繰り返す下痢症の原因菌として問題になっているディフィシル菌 (*Clostridium difficile*) がある。近年毒素を持たないディフィシル菌の株をワクチンとして利用することや健常なヒトの糞便移植などによるディフィシル菌による疾患の制御が検討されている。ウエルシュ菌は、健常なヒトの糞便に含まれ、ウエルシュ菌が産生するバクテリオシンは、主に近縁菌種に活性を持つことから、今回発見したバクテリオシンのディフィシル菌に対する増殖抑制効果を調べることや他のウエルシュ菌の病原性株のバクテリオシンのディフィシル菌に対する抑制効果

を調べることは、ヒトでのディフィシル菌による疾患（CDAD）の制御に応用できる可能性がある。

本研究で、プラスミドの安定性に大きく関与すると考えられるプラスミド分配システムが明らかとなった。しかし、それだけではウエルシュ菌のプラスミドの安定性を説明できないことも明らかになった。プラスミドが菌細胞の分裂後、子孫細胞に正確に受け継がれるには、少なくとも二つの重要なステップがある。一つ目は宿主細胞の染色体の複製開始のシグナルを正確に受け取ってプラスミドの分裂を開始することである。この第一のステップでは、Rep 蛋白質の DNA への結合が細胞分裂と関連を持ついくつかの染色体上の宿主因子（特に DnaA と IHF（Integration host factor）が知られている）による影響を受けることによると考えられる。しかし、DNA へのタンパク質の結合は、細菌細胞だけでなくヒトなどの細胞において様々な場面で起きている。タンパク質と DNA との結合に影響を及ぼすような薬剤は、多くの因子に影響を及ぼす可能性が高い。言い換えると、このような薬剤は様々な副作用を起こすリスクが高いと思われる。

コピー数が少ないプラスミドでは、プラスミド分配のステップで分裂した子孫細胞それぞれにプラスミドが正確に少なくとも一つずつが分かれることが必要である。このステップで、プラスミドの安定性に大きく関与する因子はプラスミド分配因子である。プラスミド分配に関連したプラスミドの因子は、HSP 型の ATPase 活性様の作用を持つ ParA タンパク質、ヌクレアーゼの作用と関連を持つ ParB タンパク質、ParB タンパク質が結合する ParS 領域がある。これらはプラスミドに特有の因子であることからターゲットとして有効な可能性がある。本研究の結果では、類似の複製機構を持つプラスミドを保有する株では、プラスミドを保有しない株と比較すると、プラスミドがやや安定して存在していると考えられ、宿主によりプラスミドの安定性に差があることが推察された。しかし、2 種類の宿主細胞で明らかな差は認められなかった。この理由の一つとして、プラスミドの複製、分配領域がうまく働いていないことが考えられる。このことは、宿主因子だけでなく未知のプラスミドの因子の関連の可能性が考えられる。宿主因子については、大腸菌などではプラスミドの分配のステップに

IHF が関与していることが知られているが、その機構は十分に解明されておらず、今後研究を進める必要があると思われる。プラスミド分配領域に認められる以外のプラスミドの因子については、今まで全く知られておらず今後研究を進めることが必要である。

プラスミドの安定性の差を正確に検出できなかったもうひとつの理由として、安定性評価に用いたアッセイ系の問題が考えられる。本研究で用いたアッセイ系は、従来から用いられている方法で、コロニー形成という菌の分裂を伴うステップが必要であること、限られたコロニー数しか調べられないなどプラスミドの安定性の差を正確に検出するには十分とは言えない。プラスミドの安定性に関与する因子について今後詳細に研究するため、まず簡便で正確なアッセイ法の確立が必要である。具体的には、real-time PCR 法を利用してプラスミドと染色体上の遺伝子の比率を正確に算出する方法が有用であると考えられる。

プラスミドの安定性は、プラスミドと関連した毒素産性能や薬剤耐性と大きく関連している重要な問題である。これらの重要なプラスミドは、基本的には ICP 型のプラスミドで、コピー数が少ないことから、本研究で明らかになったように、プラスミドの維持には未知のプラスミドや充分解明されていない宿主の因子が大きく関わっていると考えられる。今回検討したような比較的大きく、様々な遺伝子を保有するプラスミドの安定性に関与する未知の因子を同定することは、プラスミドに関連した因子によって引き起こされる問題に対応する大きなヒントになると考えられる。つまり、プラスミドの安定性に関連する因子を同定し、その因子を阻害する物質を探し出し、その物質に由来する薬剤を開発していくことで多くの毒素遺伝子をもつ非常に安定なプラスミドをウエルシュ菌から取り除くことが可能となり、その結果、ウエルシュ菌による疾患、特に大きな経済的損失をもたらす家畜の疾患の治療や予防に利用できると思われる。また、同様の考え方をプラスミドに薬剤耐性遺伝子を持つ他の菌に応用すれば、既存の抗生物質との組み合わせなどにより薬剤耐性菌に対する新たな治療戦略につながっていく可能性がある。

参考文献

参考書籍

1. The Clostridia: Molecular Biology and Pathogenesis. Edited by Julian I. Rood, Bruce A. McClane, J. Glenn Songer and Richard W. Titball. 1997. Academic Press, California.
2. Handbook on Clostridia. Edited by Peter Durre. 2005. Taylor & Francis, Boca Raton.
3. Plasmid Biology. Edited by Barbara E. Funnell and Gregory J. Phillips. 2004. ASM Press, Washington, D.C.
4. Food Microbiology. 4th ed. Edited by Michael P. Doyle and Robert L. Buchanan. 2013. ASM press, Washington, D.C.

引用論文

1. Yamaichi Y, Iida T, Park K S, Yamamoto K, and Honda T. 1999. Physical and genetic map of the genome of *Vibrio parahaemolyticus*: Presence of two chromosomes in *Vibrio* species. *Mol. Microbiol.* 31: 1513-1521.
2. Wigley P, and Burton N F. 2000. Multiple Chromosomes in *Burkholderia cepacia* and *Burkholderia gladioli* and their distribution in clinical and environmental strains of *B. cepacia*. *J. App. Microbiol.* 88 :914-918
3. Watanabe, H., and Nakamura, A. 1985. Large plasmids associated with verulence in *Shigella* species have a common function necessary for epithelial cell penetration. *Infect. Immun.* 48: 260-262.
4. Ivanova N, Sorokin A, Anderson I, Galleron N, Candelon B, Kapatral V, Bhattacharyya A, Reznik G, Mikhailova N, Lapidus A, Chu L, Mazur M, Goltsman E, Larsen N, D'Souza M, Walunas T, Grechkin Y, Pusch G, Haselkorn R, Fonstein M, Ehrlich S. D, Overbeek R and Kyrpides N. 2003.

- Genome sequence of *Bacillus cereus* and comparative analysis with *Bacillus anthracis*. *Nature* 423, 87-91.
5. Li J., V. Adams, T.L. Bannam, K. Miyamoto, J.P. Garcia, F.A. Uzal, J.I. Rood, and B.A. McClane. 2013. Toxin plasmids of *Clostridium perfringens*. *Microbiol Molec. Biol. Rev.* 77: 208-233.
 6. Adams V., J Li., J. A. Wisniewski, F. A. Uzal, R. J. Moore, B. A. McClane and J. I. Rood. Virulence plasmids of spore-forming bacteria. 2014. *Microbiol Spectrum* 2: PLAS-0024-2014.
 7. Miyamoto K., J. Li, and B.A. McClane. 2012. Enterotoxigenic *Clostridium perfringens*: Detection and Identification. *Microbes Environ.* 27:343-349.
 8. Miyamoto K., D.J. Fisher, J. Li, S. Sayeed, S. Akimoto, and B.A. McClane. 2006. Complete sequencing and diversity analysis of the enterotoxin-encoding plasmids in *Clostridium perfringens* type A non-food-borne human gastrointestinal disease isolates. *J. Bacteriol.* 188, 1585-1598.
 9. Miyamoto K., J. Li, S. Sayeed, S. Akimoto, and B.A. McClane. 2008. Sequencing and diversity analyses reveal extensive similarities between some epsilon-toxin-encoding plasmids and the pCPF5603 *Clostridium perfringens* enterotoxin plasmid. *J. Bacteriol.* 190:7178-7188.
 10. Bannam T. L., W. L. Teng, D. Bulach, D. Lyras, and J. I. Rood. 2006. Functional identification of conjugation and replication regions of the tetracycline resistant plasmid pCW3 from *Clostridium perfringens*. *J. Bacteriol.* 188: 4942-4951.
 11. Shimizu T., K. Ohtani, H. Hirakawa, K. Ohshima, A. Yamashita, T. Shiba, N. Ogasawara, M. Hattori, S. Kuhara, and H. Hayashi. 2002. Complete genome sequence of *Clostridium perfringens*, an anaerobic flesh-eater. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99, 996-1001.
 12. Garnier T., and S.T. Cole. 1986. Characterization of a bacteriocinogenic plasmid from *Clostridium perfringens* and molecular genetic analysis of the

- bacteriocin-encoding gene. J. Bacteriol. 168: 1189-1196.
13. Rood J.I. and S.T. Cole. 1991. Molecular genetics and pathogenesis of *Clostridium perfringens*. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 55: 621-648.
 14. Sloan J., T.A. Warner, P.T. Scott, T.L. Bannam, D.I. Berryman, and J.I. Rood 1992. Construction of a sequenced *Clostridium perfringens*-*Escherichia coli* shuttle plasmid. Plasmid 27, 207-219.
 15. Dupuy B., S. Raffestin, S. Matamouros, N. Mani, M.R. Popoff, and A.L. Sonenshein. 2006. Regulation of toxin and bacteriocin gene expression in *Clostridium* by interchangeable RNA polymerase sigma factors. Mol. Microbiol. 60: 1044-1057.
 16. Dupuy B., N. Mani, S. Katayama, and A.L. Sonenshein. 2005 Transcription activation of a UV-inducible *Clostridium perfringens* bacteriocin gene by a novel σ factor. Mol. Microbiol. 55: 1196-1206.
 17. Deguchi A., K. Miyamoto, T. Kuwahara, Y. Miki, I. Kaneko, J. Li, B.A. McClane, and S. Akimoto. 2009. Genetic characterization of type A enterotoxigenic *Clostridium perfringens* strains. PLoS One 4: e5598.
 18. Tagg J.R., A.S. Dajani, and L.W. Wannamaker 1976. Bacteriocins of gram-positive bacteria. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 40: 722-756.
 19. Timbermont L., L.D. Smet, F.V. Nieuwerburgh, V.R. Parreira, G.V. Driessche, F. Haesebrouk, R. Ducatelle, J. Prescott, D. Deforce, B. Devreese, and F.V. Immerseel. 2014. Perfrin, a novel bacteriocin associated with *netB* positive *Clostridium perfringens* strains from broilers with necrotic enteritis. Veterinary Research: 45, 40.
 20. Yonogi S., Matsuda S., Kawai T., Yoda T., Harada T., Kumeda Y., Gotoh K., Hiyoshi H., Nakamura S., Kodama T. and Iida T. 2014. BEC, a novel enterotoxin of *Clostridium perfringens* found in human clinical isolates from acute gastroenteritis outbreaks. Infect Immun: 82, 2390-2399.

21. Gelder L.D., J.M. Ponciano, P. Joyce, and E.M. Top. 2007. Stability of a promiscuous plasmid in different hosts: no guarantee for a long-term relationship. *Microbiology* 153: 452-463.
22. Manjitha S. and Austin S. 2011. Prevalence and significance of plasmid maintenance functions in the virulence plasmids of pathogenic bacteria. *Infect Immun*: 79, 2502-2509.
23. Keyburn A.L., J.D. Boyce, P. Vaz, T.L. Bannam, M.E. Ford, D. Parker, A. Di Rubbo, J.I. Rood, and R.J. Moore. 2008. NetB, a new toxin that is associated with avian necrotic enteritis caused by *Clostridium perfringens*. *PLoS Pathog.* 4: e26.

参考資料

1. 略語・用語
2. ウエルシュ菌からのプラスミドの抽出
3. 遺伝子組み換えのためのプラスミドベクターの調整
4. ライゲーション反応
5. 遺伝子組み換えのためのケミカルコンピテント細胞の調整
6. 大腸菌へのプラスミドベクターの導入
7. 大腸菌からのプラスミドの精製（ミニプレブ法）
8. バクテリオシン発現誘導
9. ウエルシュ菌の RNA 検出（RT-PCR 法）
10. コロニーからの直接 PCR 法（Colony Direct PCR 法）による遺伝子の検出
11. ウエルシュ菌への遺伝子導入（エレクトロポレーション法）
12. ウエルシュ菌プラスミドの和合性実験
13. 使用した GenBank 上の遺伝情報
14. pBCNF5603 プラスミドの全塩基配列の決定
15. 全塩基配列の決定に使用したプライマー

1. 略語・用語

略語・用語一覧

PFGE法	: Pulsed Field Gel Electrophoresis、パルスフィールドゲル電気泳動法
ORF	: Open Reading Frame、アミノ酸に翻訳した場合に終止コドンを含まない読み取り枠でタンパク質に翻訳される可能性がある塩基配列。
IR	: Inverted Repeat、ここではDNAの逆向きの反復塩基配列。
バクテリオシン	: 主に細菌細胞が産生する同種や類縁種に対する抗菌活性をもったタンパク質やペプチド。
プラスミド	: 細菌細胞が保有する核以外のDNAで、細菌の生存に必須ではない。
プラスミドの伝達性	: 一部のプラスミドが持つ性質で、近縁菌種との接触によりその複製体やその一部が移動する性質。プラスミドが伝達することで受け取った細菌細胞も伝達された遺伝子の機能を保有することになる。
プラスミドの和合性	: 異なる複製機構をもつプラスミドの場合、ひとつの細菌細胞内に同時に存在できること。同じ複製機構を持つものは同時に存在できず不和合性となる。
プラスミドの安定性	細菌細胞が分裂した後、親細菌細胞に存在していたプラスミドが子孫細胞に正確に受け継がれる場合を安定しているという。

2. ウエルシュ菌からのプラスミドの抽出

<菌の培養>

Day 1 Cooked Meat 培地で保存していたウエルシュ菌の培養液 0.2 ml を 10 ml の FTG 培地にいれ、37°Cで一晩、培養する。

FTG (Fluid Thioglycollate) 培地には芽胞の発芽を促進する成分が含まれている。

Day 2 一晩培養した菌液 0.2 ml を 10 ml の TGY 培地にいれ、37°Cで一晩、培養する。

TGY 培地には、グルコースを多く含むウエルシュ菌の増殖には適している。

<プラスミドの抽出>

Step 1 一晩培養した TGY 培地のウエルシュ菌培養液 1 ml を 1.5 ml のエッペンドルフチューブに移し、8,000–10,000 rpm で 3–5 分遠心し、上清を捨てる。

Step 2 菌のペレットを TES バッファー 400 μ l に再浮遊させる。8,000–10,000 rpm で 3–5 分遠心し、上清を捨てる。

この段階のペレットを–80°Cで 1–2 週間保存することができる。

Step 3 菌のペレットに再度 TES バッファー 400 μ l に再浮遊させる。

Step 4 100 μ l のリゾチーム溶液を加え、37°Cで 10 分間インキュベートする。

Step 5 さらに、100 μ l の 0.25 M EDTA, 50mM Tris buffer (pH 8.0) 溶液を加え充分懸濁したあと 60 μ l の 20%SDS 溶液を加え、転倒混和後 37°Cで 10–15 分インキュベートする。

Step 6 3 N NaOH を 28 μ l 加え、転倒混和し、室温で 10 分間静置する。

このステップは、アルカリ変性のステップで、NaOH 溶液は用事調整が望ましい。

Step 7 100 μ l の 2 M Tris-HCl (pH 7.0) を加え、すばやく転倒混和してから、室温で 3 分間静置する。

このステップは、溶液を急速に中和し、染色体 DNA は変性したままで、プラスミド DNA など小さい DNA が再度溶けることになる。

Step 8 75 μ l の 5 M NaCl 溶液を加え、転倒混和後、4°Cで 90 分以上静置する。

変性した染色体 DNA を沈殿させ、取り除くために行う。

Step 9 8,000–10,000 rpm で 5 分間、遠心し、上清を新しいエッペンドルフチューブに移す。

Step 10 9 μ l の RNaseA 溶液を加え、室温に 15–30 分静置する。

このステップは省いても良い

Step 11 P/C/I 抽出を 2 度繰り返す。

Step 12 新たなエッペンドルフチューブに水層をピペットで移し、1/10 量の 5 M NaCl と 2.5 倍量の 99.9%エタノールを加え、転倒混和し、–20°Cで 30 分又は一晩静置する。

Step 13 8,000–10,000 rpm で 15 分間、遠心し、上清を捨てる。

Step 14 DNA のペレットを 70%エタノールで軽く洗浄し、DNA を乾燥させる。DNA は TE バッファーに溶解する

<使用する培地と試薬>

1. Cooked Meat Medium
2. FTG (Fluid Thioglycollate) Medium
3. TGY Medium (100 ml あたり)
 - Tryptic Soy Broth 3 g
 - Yeast Extract 1 g
 - Glucose 2 g
 - L-cysteine 0.1 g
4. TES Solution (pH 8.0)
 - 50 mM Tris (5 ml of 1 M Tris buffer, pH 8.0)
 - 1 mM EDTA (5 ml of 0.5 M EDTA, pH 8.0)
 - 6.7% Sucrose (67 ml of 10% Sucrose)
 - up to 100 ml of DW (DW 23 ml)
5. Lysozyme Solution
 - リゾチームを 25 mM Tris-HCl Buffer (pH 8.0) で 20 mg/ml になるように調整する。
 - 2.5 ml of 1 M Tris buffer, pH 8.0 (250 μ l)
 - up to 100 ml of DW (10 ml)
6. Tris-EDTA Buffer (pH 8.0)
 - 50 mM Tris (5 ml of 1 M Tris buffer) (0.5 ml)
 - 0.25 M EDTA (50 ml of 0.5 M EDTA) (5 ml)
 - up to 100 ml of DW (10 ml)
7. 20%SDS Solution
 - SDS を 50 mM Tris、20 mM EDTA Solution で 20%になるように調整する。
 - 50 mM Tris (5 ml of 1 M Tris buffer) (0.5 ml)
 - 20 mM EDTA (4 ml of 0.5 M EDTA) (0.4 ml)
 - up to 100 ml of DW (10 ml)
8. 3 N NaOH Solution
 - 用事調整が望ましく、使用する日に 1.5 ml エッペンドルフチューブに小さい粒 1 粒をいれ、重さを測定し、それに 3 M (3 N) になるように蒸留水を加えて作成する。NaOH の分子量は、40.0 なので計算が容易である。
9. 2 M Tris-HCl Buffer (pH 7.0)
10. 5 M NaCl
 - このくらい濃度の高い NaCl 溶液は、溶解しにくいので、前日までに作成しておく。
11. RNaseA Solution (10 mg/ml)
 - RNaseA は取り扱いに注意する。RNase は容易には失活しないため、周辺に撒き散らすと近くで RNA を取り扱っている実験に支障をきたすことになる。また DNase が混入しないように注意して取り扱う。
12. Tris-EDTA (TE) Buffer (pH 8.0)
 - 10 mM Tris
 - 1 mM EDTA

3. 遺伝子組み換えのためのプラスミドベクターの調整

<準備>

Day 1 −80℃で保存していたベクターを持つ大腸菌株のグリセロール溶液のほんの一部をそれぞれの抗生物質を含む **Tryptic Soy Broth 3 ml** に加え、37℃で一晩、振盪培養する。

Day 2 一晩培養した菌液を、抗生物質を含む **Tryptic Soy** 寒天培地に塗り広げる。
抗生物質によるセレクションは液体培地より平板培地の方が優れている。

Day 3 寒天培地上に形成されたコロニーの一部を、抗生物質を含む **Tryptic Soy Broth 3 ml** に加え、37℃で一晩、振盪培養する

Day 4 一晩培養した培養液の **0.1 ml** を新たな抗生物質を含む **Tryptic Soy Broth 3 ml** に加え、37℃で一晩、振盪培養する（このステップは少量の調整の場合には省略できる）。
大量調整の場合は、培養液の量を多くする。
数回程度の実験であれば **3 ml** の培養 **3-4** 本で十分なベクタープラスミドは用意できる。

Day 5 一晩振盪培養した菌液からプラスミド精製キットを用いてプラスミドの精製を行い、**0.8-1%**のアガロースゲルで電気泳動を行い、プラスミドの存在、大きさを確認する。
プラスミドは、**2**本鎖環状なので実際の大きさよりは小さいサイズの場所に泳動される。プラスミドに小さい傷（ニック）のものも少なくとも少量含まれる。多ければ薄いバンドとして認められる。**2**本鎖の片方だけのニックであれば本来の大きさより少し小さい大きさに、完全に直鎖上になっていれば予測サイズの場所に泳動される。つまり、**1**種類のプラスミドで**3**本のバンドが認められる。

<ベクタープラスミドの遺伝子組み換えのための準備>

Step 1 精製プラスミドの一部を制限酵素で切断する。以下の混合液を用意し、制限酵素に適した温度で**3**時間、ベクタープラスミドの切断反応を行う。

ベクター溶液	X μ l
バッファー	2-3 μ l
制限酵素	1 μ l
DW	で合計 20-30 μ l にする

バッファーはそれぞれの制限酵素に適したものがメーカーのカタログに記載されているのでそれを参考にする。**2**種類の制限酵素を使用する場合などには、このステップを**2**回繰り返すか、**2**種類の酵素のどちらにも利用できるパーファーを選んで使用する。

反応時間は、通常**3**時間程度で十分であるが、必要に応じて長くすることは可能であるが、長すぎるとスター活性（ランダムな切断を起こす）により必要な制限酵素切断断端が得られないことがあるので注意が必要。

制限酵素（グリセオール溶液で調整されている酵素一般）の量は、反応液全体の**10%**以下にする。それ以上になると酵素反応が悪くなる。

Step 2 反応液から酵素や小さい切断断片の DNA を取り除く。

基本的には、P/C 溶液を等量加えるフェノール抽出を**2**度繰り返し、その後エタノール沈殿により DNA を沈渣とする。

1本鎖 DNA となっている状態なので、PCR 産物と同様のものとして扱えるため、最近では PCR 産物を精製するキットを用いるのが簡便である。

Step 3 Alkaline Phosphatase により、切断断端を脱リン酸化する。

ベクター溶液 X μ l
バッファー 10 μ l
制限酵素 1 μ l
DW で合計 100 μ l にする

酵素反応のステップの温度や時間は酵素の種類で異なる。酵素には一般に CIP (Alkaline Phosphatase, Calf Intestine) が用いられる。

同様に切断断片の形状でも、時間や温度は異なる。

5 ‘突出 37°C、30 分
3 ‘突出 37°C、15 分に加えて、55°C、45 分
平滑末端 55°C、30 分

Step 4 Alkaline Phosphatase 酵素を不活化する。反応液に、10% SDS 溶液 5 μ l、0.5 M EDTA 溶液 1 μ l、Proteinase K 溶液 1 μ l を加え、55°C、30 分インキュベーションする。

Step 5 Step 2 と同様に反応液から酵素や断片を取り除き、精製ベクターは -20°C で保存する。

必要に応じて脱リン酸化の前に 5 ‘突出断端の平滑化を行う。

使用試薬

DNA Polymerase I Large (Klenow) Fragment (Promega)

Klenow 10 X Buffer (500 mM Tris-HCl (pH7.2)、100 mM MgSO₄、1 mM DTT

反応液

制限酵素処理した DNA X μ l
10 X バッファー 5 μ l
400 mM dNTP Solution 5 μ l each (20 μ l)
200 mg/ml acetylated BSA 1 μ l
Klenow Fragment 1 unit (1 μ g DNA あたり)
DW total 50 μ l にする

Step1 室温、10 分インキュベーションする。

Step2 75°C、10 分で酵素の不活化を行う。

4. ライゲーション反応

Step 1 抽出プラスミド DNA を制限酵素で切断する。

反応液

DNA 溶液	X μ l
バッファー	2–3 μ l
制限酵素	1 μ l
DW で合計 20–30 μ l にする	

反応温度は制限酵素の種類による。XbaI では 37°C。

反応時間は、P/C/I とエタノール沈殿により、精製した DNA であるので、一晚反応させた
が、調整した DNA サンプルや制限酵素の種類によりばらつきがあるので注意が必要であ
る。

バッファーはそれぞれの制限酵素に適したものがメーカーのカタログに記載されているの
でそれを参考にする。2 種類の制限酵素を使用する場合などには、このステップを 2 回繰
り返すか、2 種類の酵素のどちらにも利用できるパーファーを選んで使用する。

反応時間は、通常 3 時間程度で十分であるが、必要に応じて長くすることは可能であるが、
長すぎるとスター活性（ランダムな切断を起こす）により必要な制限酵素切断断端が得ら
れないことがあるので注意が必要。

制限酵素（グリセオール溶液で調整されている酵素一般）の量は、反応液全体の 10% 以下
にする。それ以上になると酵素反応が悪くなる。

Step 2 制限酵素を不活化し、その後 DNA サンプルを P/C/I 抽出によりタンパク質成分を除
去する。

サンプルと当量の P/C/I を加え、10 回程度転倒混和して十分混和する。その後、8,000
–10,000 rpm で 5 分遠心し、上清をピペットで新しいエッペンドルフチューブに移す。

Step 3 エタノール沈殿により、DNA を精製する。

DNA 溶液と当量のエタノールと 1/10 量の 5 M NaCl 溶液を加え、8,000–10,000 rpm
で 10 分遠心し、上清をピペットで除去する。70%エタノールを加え、軽く洗浄し、
再度 8,000–10,000 rpm で 5 分遠心する。上清をピペットで除去し、DNA の沈渣を
乾燥させる。その後 TE バッファー又は Tris バッファーで DNA を溶解する。

Step 4 別に準備したベクター DNA と制限酵素処理したウエルシュ菌プラスミド DNA のラ
イゲーションを行う。

反応液

DNA 溶液	X μ l
ベクター DNA	0.5–1 μ l
バッファー	2–3 μ l
T4 DNA Ligase	1 μ l (Roche : 5 U/ μ l)
DW で合計 20–30 μ l にする	

ライゲーション反応は、16°C、16–18 時間行う。

3 時間程度でもある程度反応は起こるが、効率よくする（非特異的な結合も起こる）には一
晩行うのが良い。

ベクターとインサートの量の比率は 1 : 3 程度が一般的である。これはインサートが 1 kb

程度のサイズのものまでで、3–5 kb と大きい場合にはベクターとインサートの比率が3 : 1 などと変える必要がある。

DNA 量は、あくまでも目安で実際の DNA 分子の数の比率が実際には重要なようである。

Step 5 反応液をそのまま大腸菌の形質転換に用いる。

5. 遺伝子組み換えのためのケミカルコンピート細胞の調整

<準備>

Day 1 -80°C で保存していた大腸菌株のグリセロール保存液のほんの一部を Tryptic Soy Broth 3 ml に加え、 37°C で一晩、振盪培養する。

Day 2 一晩培養した菌液を Tryptic Soy 寒天培地に塗り広げる。

Day 3 寒天培地上に形成されたコロニーの一部を Tryptic Soy Broth 3 ml に加え、 37°C で一晩、振盪培養する。

<コンピート細胞の調整>

Step 1 一晩培養した培養液の 0.3 ml を新たな Tryptic Soy Broth 30 ml (250 ml のフラスコなどが適している) に加え、 37°C で振盪培養する。約 3 時間で O.D. (吸光度) が、0.4 - 0.5 とコンピート細胞作成に適した状態となる。

Step 2 6,000 x g、10 分遠心により集菌する。

Step 3 上清を取り除き、沈渣を 10 ml の 100 mM 塩化カルシウム溶液に十分に浮遊させる。

Step 4 再度 6,000 x g、10 分遠心により集菌する。

Step 5 上清を取り除き、沈渣を 10 ml の 100 mM 塩化カルシウム溶液に十分に浮遊させ、氷上で 20 分インキュベートする。

Step 6 再度、6,000 x g、10 分遠心により集菌する。

Step 7 上清を取り除き、沈渣を 3 ml の 50 mM 塩化カルシウム、15% グリセロール溶液に十分に浮遊させ、200 μl に分注し、 -80°C で保存する。

6. 大腸菌へのプラスミドベクターの導入

Step 1 -80°C で保存していた大腸菌のコンピート細胞を氷上で溶解する。

おおそ 5–8 分でちょうど溶解された状態となる。

溶解直後が最も適していると考えられているので、長時間氷上に放置しない。

Step 2 溶解状態のコンピート細胞 100–200 μl に適当な量の DNA を加え、フリッキングにより DNA と大腸菌細胞を混合させる。

溶液が暖まらないように手早く行う。

DNA 溶液の量は、コンピート細胞溶液の 10% を超えないようにする。

Step 3 氷上で 30 分 DNA を大腸菌の細胞表面に十分吸着させる。

DNA は極性が陰性で、コンピート細胞は陽性に調整されている。

Step 4 42°C 、90–120 秒のヒートショックを与え、その後、氷上で 2 分間冷却する。

Step 5 1 ml の前もって 37°C に温めておいた SOC 培地を加え、 37°C で 1 時間ゆっくりと浸透培養する。

SOC 培地は、凍結、融解を繰り返すのはよくないので、少量ずつ分注して -80°C で保存する。また、一度融解したものは、 4°C で短期間なら保存可能である（もちろん効率は低下する）。

SOC 培地の代わりに **Tryptic Soy Broth** でも可能であるが、効率はやや低下する。

Step 6 反応液を適切な抗生物質を含む **Tryptic Soy** 寒天培地にコンラージュ棒を用いて塗り広げる。

コンピート溶液内の菌数は非常に多いため、形質転換の効率が良い場合にはすごくたくさんのコロニーができるので注意する。また、効率が悪い場合にはほんの数個しかコロニーができない。このように実験ごとにコロニー数が変わるため、寒天培地を複数枚（4 枚程度）用意し、菌液の濃いものから薄いものまで段階的に塗布するのが望ましい。また、余った反応液は、 4°C で保存しておく（翌日であれば使用可能である）。

SOC 培地

Tryptone 20 g、Yeast Extract 5 g、NaCl 0.5g、1 M KCl 25 ml（又は KCl 0.186 g）を 1L の蒸留水に溶かし、NaOH を使用し、pH を 7.0 に調節し、 121°C 、15 分オートクレーブで滅菌する。その後、別に滅菌しておいた 1 M MgCl_2 溶液 10 ml と 1 M MgSO_4 溶液 10 ml と濾過滅菌した 1 M グルコース溶液 20 ml を加えよく混合した後、1 ml ずつに分注し、 -80°C で保存する。

7. 大腸菌からのプラスミドの精製（ミニプレフ法）

- Step 1** 大腸菌の形質転換実験により形成された **Triptic Soy** 寒天培地上のコロニーの一部を爪楊枝でとり、3ml の **Triptic Soy Broth**（抗生物質含有：アンピシリン 100 µg/ml）ですすぎ、37°C、一晚振盪培養する。
- Step 2** 培養液の 1~1.5 ml を 1.5 ml のエッペンドルフチューブに移し、2 分間、遠心する（通常 8,000~10,000 rpm で）。
- Step 3** 遠心後、上清を捨て A バッファー 100 µl で菌を再浮遊する。
- Step 4** つづいて、B バッファー 200 µl を加え、6~8 回転倒混和し、室温に 1~2 分静置する。
ここは大腸菌の細胞壁を壊すステップで、2 分以上置くと大腸菌の染色体の混入量が増加する。
- Step 5** C バッファー 150 µl を加え、6~8 回転倒混和し、氷上で約 5 分静置し、その後 8,000~10,000 rpm で 10 分間遠心する。
- Step 6** 遠心後、沈渣部分が混入しないように上清をデカンテーションで新しいエッペンドルフチューブに移す。
上清の量はおおよそ 400 µl である。
ピペットで移しても良いが、不純物の混入量が多くなる傾向がある。
- Step 7** フェノール抽出によりタンパク成分を除去する。P/C 又は P/C/I 溶液を上清に対して等量加え、30 秒間ボルテックスし、十分に混和させる。そのあと、8,000~10,000 rpm で 5 分間遠心する
基本的には、P/C 又は P/C/I 溶液を上清に対して等量加えるが、半量程度でも問題はない。プラスミドが大きい場合には、ボルテックスによりキズがはいるので、ローテーターなどでゆっくり 30-60 分回転させて混和する。
- Step 8** 中間層のタンパク質や下層のフェノールを吸い取らないように注意して、ピペットで上清を新しいエッペンドルフチューブに移す。
中間層に近い部分には DNA が比較的多く存在するため注意深くピペットですいとる。
- Step 9** ここからは、エタノール沈殿を行う。5 M NaCl 溶液を 50 µl 加え、つづいて 1 ml のエタノール（99.9%）を加える。10 分から室温で静置する。
加えるエタノール量は、DNA 溶液の 2-2.5 倍量である。
- Step 10** 8,000~10,000rpm で 10 分間遠心し、上清をデカンテーションにより捨て、チューブを逆さまにしてペーパータオル上で乾燥させる。
乾燥させすぎると DNA がペーパータオルに落ちるので完全には乾燥させない。
また、完全に乾燥させると DNA が TE バッファーに溶解しにくくなる。その場合は 60°C で 5-10 分加熱して溶解する。
- Step 11** 50 µl の TE バッファーに溶解し、-20°C で保存する。

A Buffer	50 mM Glucose	(20% Glucose solution)
	25 mM Tris-HCl	(1 M Tris-HCl, pH 8.0)
	10 mM EDTA	(0.5 M EDTA, pH 8.0)

B Buffer	0.2 M NaOH 1% SDS	(1M NaOH) (1.25% SDS)
C Buffer	3 M NaOAc 2 M HOAc	(3.428 M NaOAc) (96% HOAc)

8. バクテリオシン発現誘導 (BCN5、BCN5603)

<準備>

- Day 1 クックトミート培地の保存菌液（培地成分も含め）0.2–0.4 ml を 10 ml の FTG 培地に加え、37°Cで培養。
- Day 2 FTG 培地で一晩から 24 時間培養し、菌の増殖が確認できた培養液 0.2 ml を 10 ml の TGY 培地へ加え、37°Cで培養。
- Day 3 菌液が一定の増えた状態にするため、再度培養液 0.2 ml を新たな 10 ml の TGY 培地に加え、37°Cで培養する。

<バクテリオシン発現誘導法>

- Step 1 一晩（16–18 時間）培養した 10 ml の TGY 培地の 0.4 ml を 10 ml の TGY 培地へ加えて 37°Cで嫌気培養する。
培養時間は対数増殖期の早期までのものを用いる。F5603 株で 3 時間
- Step 2 培養菌液を 3 ml を 1.5ml のエッペンドルフチューブに移し、3,000 rpm、2 分遠心する。
- Step 3 上清を除去し、PBS 5 ml で菌槐を十分に再浮遊させる。
- Step 4 シャーレに広げ、紫外線照射を行う。
（オリジナルの照射量は 15 J/m²）
- Step 5 照射菌液をエッペンドルフチューブに移し、3,000 rpm、2 分遠心する。
- Step 6 菌槐を TGY 培地に再浮遊させる、3 時間、37°Cで培養する。
同時に一晩培養したインデックス株の ATCC3624 株の培養液 0.4ml を TGY 培地に加え、37°Cで培養する。
- Step 7 3時間培養した培養液を十分に混和し、1.5mlのエッペンドルフチューブに移し、3,000 rpm、2 分遠心、上清をバクテリオシン活性測定に用いる。

<バクテリオシン活性測定法>

- Step 1 ガラスシャーレに BHI 寒天培地（2%寒天）を作成しておく。
- Step 2 ガラスシャーレの BHI 寒天培地に対数増殖期初期のインデックス株を、エーゼなどを用いて塗り広げる。
- Step 3 塗り広げた BHI 寒天培地にイエローチップを逆さまにして、必要数の穴を開ける。
- Step 4 開けた穴に底を作成するために 80ml の 2%滅菌寒天液を加える。
- Step 5 十分に固めた後開けた穴に、バクテリオシン発現誘導した上清を段階希釈し 100ml をいれ、シャーレの BHI 寒天培地を 6 時間嫌気培養する。

必要な培地

FTG 培地 10 ml 1 本

TGY 培地 10 ml 1 本

4 ml 1 本

BHI 寒天培地

クロラムフェニコール含有 4 枚

SMP 緩衝液

270 mM Sucrose (27 ml of 1 M Sucrose solution)

1 mM MgCl₂ (1 ml of 100 mM MgCl₂)

7 mM Sodium phosphate solution pH 7.4 (7 ml of 100 mM Sodium phosphate solution)

(65 ml Distilled water)

9. ウェルシュ菌の RNA 検出

<RNA 調整>

Step 1 培養菌液を 3000xg、10 分遠心する。

Step 2 培養液などの上清を 10ml ピペットで除去し、ペレットが流れ落ちないように注意してペーパータオルに逆さまにして、上清の残りを捨てる (約 10 分)。

Step 3 ボルテックスによりペレットを柔らかくして、そこに RNA 安定化剤 (RNAlater solution) 10ml を加え、十分に浸透させる。

この状態にすると 4°C で RNA は 1 週間程度安定である。

Step 4 RNA の抽出、精製を行う。

RNA は不安定なため、基本的には RNA 精製キット (RNeasy Mini Kit など) を用いる。

RNA 抽出後は、RNA は不安定になるため、できるだけ速やかに逆転写反応を行う。

<RT-PCR 反応>

Step 1 One-Step RT-PCR 反応を行う。

2 段階で RT-PCR 反応を行う方法もあるが、今回は簡便な逆転写反応と PCR 反応を一連の連続した反応として行う方法を用いた。

逆転写反応を行い、その産物を PCR 反応の鋳型として用いる方が様々な Taq ポリメラーゼによる PCR 反応が可能で、感度を上げることができる。

2 X Reaction Mix	25 μ l
Template RNA	1 μ l
Forward Primer	1 μ l
Reverse Primer	1 μ l
SuperScript III RT/Platinum Taq Mix	2 μ l
DW で合計 50 μ l にする	

Step 2 逆転写反応

45°C、30 分

Step 3 DNA の変性 (Denature)

94°C、5 分

Step 4 DNA の増幅

94°C 30 秒

55°C 30 秒

68°C 60 秒

を 1 サイクルとして 40 サイクル繰り返す。

Step 5 PCR 産物の大きさを揃えるための反応と考えて良いと思われる。

68°C 8 分

10. コロニーからの直接 PCR 法 (Colony Direct PCR 法) による遺伝子の検出

< 鋳型 DNA 調整方法 >

Step 1 平板培地上に形成された単一コロニーのほんのわずかを爪楊枝の先に付けエッペンドルフなどのチューブに前もって入れておいた蒸留水 (DNase や RNase を含まない) 20 μ l 内で先端をよくすすぎ、爪楊枝は捨てる

単一コロニーを形成させることは簡単ではない。白金耳で形成させるには修練を必要とする。この場合は、再度のコロニー分離をする方がその後の実験がうまくいく。単一コロニーを比較的容易に作成するには、菌液を段階希釈し、その希釈液 (通常 10^6 – 10^7) の一部 (100–200 μ l) をコンラージュ棒 (スプレッダー) で塗り広げるよい。安定的に単一コロニーを得ることができる。

菌成分が多すぎると後で行う PCR 反応の阻害成分として働くため取り過ぎないように注意する。取りすぎた場合は、あとで蒸留水などで希釈する。

Step 2 菌浮遊液を 100°C で 10 分程度加熱し、細菌細胞を物理的に破壊する

加熱により、細胞壁が壊れると考えられる。そのためプラスミド成分は十分な量が浮遊液中に出てくる。染色体については主に壊れた部分が出てくると考えられる。

Step 3 菌浮遊液を氷上で 2 分程度冷やす。

氷上での冷却は大体 2 分程度で十分である (他の場合も応用できる)。

Step 4 加熱した菌浮遊液を軽く遠心して、沈渣部分以外の部分を PCR 反応に使用する。

PCR 反応には、1–2 μ l を用いるが、最初の蒸留水の量を 100 μ l にすれば 5–10 μ l を用いることも可能である。

< PCR 反応 >

PCR 反応条件

Step 1 DNA の変性 (Denature)

95–96°C (今回は 95°C)、2 分

2 本鎖 DNA を一時的に完全に 1 本にすることで、次のステップの増幅反応を行いやすくする。

このステップは、PCR 反応における増幅の立ち上がりに関連すると考えられ、最終的な PCR 反応産物の量に影響すると思われる。

用いる Taq ポリメラーゼにより、活性化を必要とするものなどでは 5 分行う。

Step 2 DNA の増幅

90–95°C (今回は 95°C) 30 秒

55–62°C (今回は 61°C) 30 秒

68–72°C (今回は 72°C) 30 秒

を 1 サイクルとして 30–40 サイクル繰り返す。

最初が DNA の変性でおおよそこの程度の時間で行う。

次が鋳型 DNA とプライマーとの結合のためのステップとなる

この反応の温度、時間は、鋳型 DNA の GC%、プライマーの長さ、 T_m 値などにより異なるため、使用する菌種、作成したプライマーなどにより変更する。大腸菌などの GC% が比較的高い場合には、このステップは省略できるが、ウエルシュ菌などのように GC% が低いものではこのステップを省くとうまく PCR 反応が起こらない場合がある。

最後が伸長反応のステップで、目的とする PCR 反応産物の大きさにより時間は長くする。1 kb あたり 1 分が目安とされている。また、この反応の適した温度は用いる Taq ポリメラーゼにより異なる、この際の温度が PCR 反応の正確性に関連すると言われている。一般に、Taq ポリメラーゼによる反応は、40 サイクル近くになると非特異的反応を起こすようになってくるので、注意が必要。

Step 3 PCR 産物の大きさを揃えるための反応と考えて良いと思われる。

68–72°C (今回は 72°C) 5 分

PCR 反応では、主な大きさのものが電気泳動の際最も多くの PCR 産物として検出されるが、実際にはそれより小さい PCR 反応の産物が存在する。最終的な目的とする PCR 反応産物が多くなるように行うステップと考えられる。

TAKARA

Thermal Cycler Dice TP600 Ver.3.00

11. ウエルシュ菌への遺伝子導入法（エレクトロポレーション法）

<準備>

Day 1 クックトミート培地の保存菌液（培地成分も含め）0.2–0.4 ml を 10 ml の FTG 培地に加え、37°Cで培養。

Day 2 FTG 培地で一晩から 24 時間培養し、菌の増殖が確認できた培養液 0.2 ml を 10 ml の TGY 培地へ加え、37°Cで培養。

Day 3 菌液が一定の増えた状態にするため、再度培養液 0.2 ml を新たな 10 ml の TGY 培地に加え、37°Cで培養する。

Day 4 同様に菌液が一定の増えた状態にするため、再度培養液 0.2 ml を新たな 10 ml の TGY 培地に加え、37°Cで培養する。

<エレクトロポレーション法>

Step 1 一晩（16–18 時間）培養した 10 ml の TGY 培地の 0.6 ml を 20 ml の TGY 培地へ加えて 37°Cで嫌気培養する。

培養時間は菌株により異なり、F4969 株で 6 時間、ATCC3624 株や strain 13 株で 7–8 時間、F5603 株では 18–24 時間など。

一般には対数増殖期後期（この時期になるとガス産生が低下し、新たな泡の出現が少なくなる）のものを用いる。

次の Step に移る 30 分から 1 時間前にローターと遠心機を 4°Cに冷やしておく。

Step 2 培養菌液を 10 ml のピペットで 50 ml のプラスチック遠心管に移し、4°C、3000 x g、20 分遠心する。

Step 3 上清を 10 ml のピペットで除去し、前もって氷上で冷やしておいた SMP 緩衝液 10 ml で菌塊を十分に再浮遊させる。

Step 4 菌浮遊液を再度 4°C、3000 x g、20 分遠心する。

Step 5 上清を 10 ml のピペットで除去し、再度前もって氷上で冷やしておいた SMP 緩衝液 10 ml を加え、菌塊を十分に再浮遊させる。

Step 6 菌浮遊液を再度 4°C、3000 x g、20 分遠心する。

Step 7 菌塊に 1000ml のピペットマンで冷却した SMP 緩衝液 800–1200 μ l を加え、手早く再浮遊し、浮遊液約 600 μ l をキュベットに加え、指先でキュベットの底を揺らし（flicking）、DNA と菌液を混合する。

0.2 cm キュベット（BioRad では緑色）を用い、キュベットには前もって DNA 溶液 6–8 μ l を入れ、氷上で冷やしておく。

Step 8 キュベットを氷上で 5 分静置する。

Step 9 エレクトロポレーターにキュベットをセットし、以下の条件で電気ショックを与える。
1.25 kV、50 μ F、720 Ω （機器により多少設定が異なる）

Step 10 電気ショック後、キュベットを再度氷上で 10 分静置する。

Step 11 キュベット内の菌液を前もって 37°C で温めておいた 4ml の TGY 培地に専用のピペットで加え、37°C で 3 時間、培養する

Step 12 培養液をクロラムフェニコール (15 µg/ml) 含有 BHI 培地に塗布し、37°C で 18–24 時間、嫌気培養する。

塗布する菌量は、そのまま 200 µl でも構わない (strain 13 株や F4969 株) が、一般にはトランスフォームされる菌数は多くないため、培養液 1 ml 程度を 1.5 ml エッペンチューブで遠心濃縮し、濃縮液を塗布する。

必要な培地

FTG 培地 10 ml 1 本

TGY 培地 10 ml 1 本

4 ml 1 本

BHI 寒天培地

クロラムフェニコール含有 4 枚

SMP 緩衝液

270 mM Sucrose (27 ml of 1 M Sucrose solution)

1 mM MgCl₂ (1 ml of 100 mM MgCl₂)

7 mM Sodium phosphate solution pH 7.4 (7 ml of 100 mM Sodium phosphate solution)
(65 ml Distilled water)

12. ウエルシュ菌プラスミドの和合性実験

<準備>

Day 1 クックトミート培地の保存菌株 0.2–0.4 ml を 10 ml の FTG 培地に加え、37°C で培養。

Day 2 FTG 培地で一晚培養した菌の増殖が確認できた培養液 0.2 ml を 10 ml の TGY 培地へ加え、37°C で培養。

Day 3 菌液が一定の増えた状態にするため、再度培養液 0.2 ml を 10 ml のクロラムフェニコール含有 TGY 培地に加え、37°C で培養する。

<エレクトロポレーション法>

Day 1 通常のエレクトロポレーション法による遺伝子導入法と同じ

Step 1 一晚（16–18 時間）培養した 10 ml の TGY 培地の 0.6 ml を 20 ml TGY 培地へ加えて 37°C で嫌気培養する。

培養時間は菌株により異なり、F4969 株で 6 時間、ATCC3624 株や strain 13 株で 7–8 時間、F5603 株では 18–24 時間など

Step 2 培養菌液を 10 ml のピペットで 50 ml のプラスチック遠心管に集金し、4°C、3000 x g、20 分遠心する。

遠心機はローターを設置し、前もって 4°C に冷やしておく。

Step 3 上清を 10 ml のピペットで除去し、前もって氷上で冷やしておいた SMP 緩衝液 10 ml で菌塊を十分に再浮遊させる。

Step 4 菌浮遊液を再度 4°C、3000 x g、20 分遠心する。

Step 5 上清を 10 ml のピペットで除去し、前もって氷上で冷やしておいた SMP 緩衝液 10 ml を加え、菌塊を十分に再浮遊させる。

Step 6 菌浮遊液を再度 4°C、3000 x g、20 分遠心する。

Step 7 菌塊に 1000 μ l のピペットマンで冷却した SMP 緩衝液 800–1200 μ l を加え、手早く再浮遊し、浮遊液約 600 μ l をキュベットに加え、指先でキュベットの底を揺らし (flicking)、DNA と菌液を混合する

0.2 cm キュベット (BioRad では緑色) を用い、前もって DNA 溶液 6–8 μ l を入れ、氷上で冷やしておく。

Step 8 キュベットを氷上で 5 分静置する。

Step 9 エレクトロポレーターにキュベットをセットし、以下の条件で電気ショックを与える。
1.25 kV、50 μ F、720 Ω (機器により多少設定が異なる)

Step 10 電気ショック後、キュベットを再度氷上で 10 分静置する。

Step 11 キュベット内の菌液を前もって 37°C で温めておいた 4 ml の TGY 培地に専用のピペットで加え、37°C で 3 時間、培養する

Step 12 4 ml の菌培養液を 3 時間培養した後、0.2 ml を新たなクロラムフェニコール含有 (10 µg/ml) TGY 培地 10 ml に加えて 37°C で培養する (passage 1)。

Day 2 新たなクロラムフェニコール含有 TGY 培地に 24 時間培養した TGY 培養液 0.2 ml を加えて、37°C で培養する (passage 2)。

Day 3 Day 2 と同様に菌の培養を行う (passage 3)。

さらに、継代に用いた培養液を TGY 培地で 10^6 – 10^7 に段階希釈し、希釈液 100–200 µl をクロラムフェニコール含有 BHI 寒天培地に塗布し、37°C で嫌気培養する。

Day 4 Day 2 と同様に菌の培養を行う (passage 4)

また、BHI 寒天培地上に形成されたコロニーをコロニーPCR 法の鋳型として用いるため、爪楊枝で先に触ったあと、エッペンドルフチューブ内の 20 µl の蒸留水で洗浄する。菌を洗浄した蒸留水を 100°C に十分間加熱し、その後凍結保存する。

Day 5 Day 2 と同様に菌の培養を行う (passage 5)

Day 6 継代に用いた培養液を 10^6 – 10^7 に段階希釈し、希釈液 100–200 µl をクロラムフェニコール含有 BHI 寒天培地に塗布し、37°C で嫌気培養する。

Day 7 Day 4 と同様にコロニーPCR 法に用いる鋳型を調整する。

必要な培地

FTG 培地 10 ml 1 本

TGY 培地 10 ml 5 本

4 ml 1 本

希釈用

BHI 寒天培地

クロラムフェニコール含有 8 枚

SMP 緩衝液

270 mM Sucrose (27 ml of 1 M Sucrose solution)

1 mM MgCl₂ (1 ml of 100 mM MgCl₂)

7 mM Sodium phosphate solution pH 7.4 (7 ml of 100 mM Sodium phosphate solution)

(65 ml Distilled water)

13. 使用した GenBank 上の遺伝情報

Bacteriocin homologs

Strain		Plasmid	Accession number
1 F5603	<i>Clostridium perfringens</i>	pBCNF5603	NC006872
2 SM101	<i>Clostridium perfringens</i>	pSM101A	NC008263
3 JGS1987	<i>Clostridium perfringens</i>		ABDW010000027
4 CPN50	<i>Clostridium perfringens</i>	pIP404	NC001388
5 SM101	<i>Clostridium perfringens</i>	pSM101B	NC008264
6 JGS1495	<i>Clostridium perfringens</i>		ABDU010000006
7 JGS1721	<i>Clostridium perfringens</i>		ABOO010000081

Rep homologs (BCN16 homologs)

Strain		Plasmid	Accession number
1 strain 13	<i>Clostridium perfringens</i>	pCP13	AP003515
2 OS1	<i>Clostridium perfringens</i>	pCP-OS1	AP013033
3 TS1	<i>Clostridium perfringens</i>	pCP-TS-1	AP013034
4 F262	<i>Clostridium perfringens</i>	pF262B	AFES01000051
5 WAL-14572	<i>Clostridium perfringens</i>		ADLP01000024

ParABS region homologs

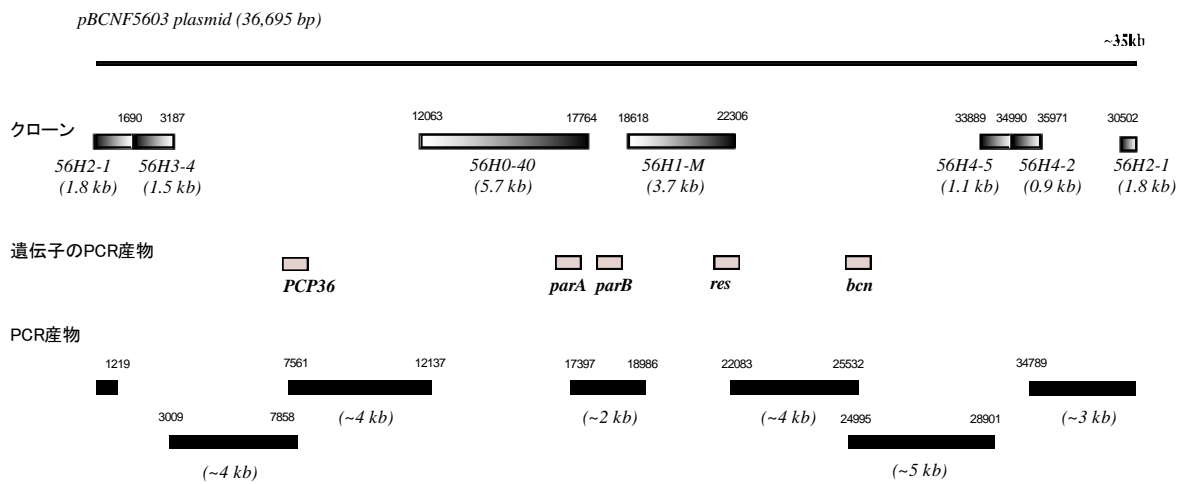
Strain		Plasmid	Accession number
1 str. 13	<i>Clostridium perfringens</i>	pCP13	AP003515
2 OS1	<i>Clostridium perfringens</i>	pCP-OS1	AP013033
3 TS1	<i>Clostridium perfringens</i>	pCP-TS-1	AP013034
4 F262	<i>Clostridium perfringens</i>	pF262B	AFES01000051
5 WAL-14572	<i>Clostridium perfringens</i>		ADLP01000024
6 NCTC8533	<i>Clostridium perfringens</i>	<i>cpb</i> -plasmid	AB736083
7 ATCC3626	<i>Clostridium perfringens</i>	<i>cpb</i> -plasmid	ABDV01000024
8 JGS1945	<i>Clostridium perfringens</i>	<i>cpb</i> -plasmid	ABDU01000064

Rep homologs (BCN30 homologs)

Strain		Plasmid	Accession number
1 NCTC8533	<i>Clostridium perfringens</i>	pCP8533S12	NC019358
ATCC3626	<i>Clostridium perfringens</i>		ABDV010000054
2 F262	<i>Clostridium perfringens</i>		AFES010000044
3 JGS1495	<i>Clostridium perfringens</i>		ABDU010000032
4 SM101	<i>Clostridium perfringens</i>	pSM101B	NC008264
5 JGS1721	<i>Clostridium perfringens</i>		ABOO010000094
6 CPN50	<i>Clostridium perfringens</i>	pIP404	NC001388
7 SM101	<i>Clostridium perfringens</i>	Chromosome	NC008262
8 F5603	<i>Clostridium perfringens</i>	pBCNF5603	NC006872

14. pBCNF5603 プラスミドの全塩基配列の決定

プラスミドの全塩基配列決定のシエーマ



15. pBCNF5603 プラスミドと pCP8533S12 の全塩基配列の決定に使用したプライマー

Primers for pBCNF5603 plasmid sequencing	
RESPD2-1	GAATCCAGATGGAGTTATAGTTAGAGG
RESPD2-2	GAAACTATATAGGAAAAACATTCAACG
RESPD2-3	TAAAGAATAATCCTAATGGTAGTGATG
RESPD2-4	GAATGGTACTATTTACAAAGTAATGGAG
RESPD2-5	TATGACTCAATAGGACAACATATCAAGG
resPD2-6R	CTAAAACTCCGCTGTTAATTCATC
RESPD2-4bF1	ATAGTAGCTAAGGATGGAGATTGGTACAAG
RESPD2-4bR1	TATTACTTCTCCAGCAGCTATATACGTTAC
RESPD2-6R2	ATTAGAGTGTATATATCCATAACCTGAAC
RESPD2-4F2	GTTTGTGGTAAAGATATTATAACTGGTG
RESPD2-4DR1	CAGAGTTTTAACTCCATACTTAACAAG
RESPD2-4F3	CAATACACATAAATCCTAACACAATTCC
RESPD2-4DR2	TCTTGTACCAATCTCTATCTTTAGCTAC
RESPD2-4F4	GTTAACAAAGAGAATGAACCTAGAGTTG
RESPD2-4F5	CGAGAGGACTATTATTAGAATATCCAG
56Hp4-5T3D	CAGTATCAACTTTATTTTTGATGGAG
56Hp4-5T3R	CTATTTTATCTGTAAGTATAATGAGC
56Hp4-5T3D1	CTTCACCATTAAGATTTGTGAGTGC
56Hp4-5T7R	GATCATTCAATTTTGATGGAAGTGG
56Hp3-4T3D	CCTGTATGTTATTCTTTATTGACTTAGC
56Hp3-4T3R	GGCATTTATAAAGATGTGAACGAC
56Hp3-4T7D	GTCTATGATGTATGTAATTTTATTCATGAG
56Hp3-4T7D1	GATATTCAGATACCTTATGTAAATGGAC
56Hp3-4T7R	GTTAAAAAAGTATCGGTACCAAATGG
PCP36FU9	GTATTCAATTGAGAAAGATACTAATGC
56Hp2-1T3D	CTAAAGTACATTATAATTTCTTAAAGCTG
56Hp2-1T3D1	CTTTTTAGCTATAGTTACAACAAAGTTG
56Hp2-1T7	GCTTGACTCTAATGATGAAGTTGGAC
56Hp2-1T7D1	CATTCTATCTAATTTGATTAGTAATGC
PCP36FU10	GAAATATTATCAAAAATAAGTTAGGAGAAC
PCP36FU9R	CTATTGCTAACAATCATTGAGTTATCAG
Hp3-4T7R2	CCATAAAAATAACAATAATGAAACTACAAC
RESPD2-4DR	ATTTAATTATGTAATATATTTAAAGTGTG
H1-MT7R	GGGGATGAGAGTATGATATGGAGCAAG
H1-MT7D3	GTCCTTTTTGTTGCTCTACAGATCC
PCP36FU11	CATTTGCACCTTTCTCATTATCAG
56Hp2-1 T3R	GCTTGTTTAAAGATACTTCTTACAGTACC
resPD2-6	GGGTTTAGATACCAAGTTATATTAGGTC
4-5T7R2	CACCCTCCTTACATATATATTATAACACG
Hp4-5T7R5	GTCTACCCTTTTTCTTTTCATATGGC
Hp4-5T7R6	AACTCTTTTATATTTTCTAGCCTTCTAC
PCP36FU4	GAAAGGATTGGATTTGATTTAAGTGAAG
RESPD-R1	CATGTGCTCATAATGGATTTGGTCCAG
PCP36FU5	TTGGAAAGGAAAGTAATATGTTTAGTG
PCP36FU6	GTCAAAGGATATTAGGCTTTAATAGCG
RESP2-4	GAATGGTACTATTTACAAAGTAATGGAG
PCP36FU7	TACTTACTTTATGTTTGAGATTAAGCG
PCP36FU8	AATAGAGAGAGATAAATTTGCCTGATG
PCP35F	GCACAATTTCTATCATTGCCCTCAC
bcn-F1	GTTTCAGGGGATTTAGTAGGAAGTAC
bcn-R1	CAACAAAATATCCTATTGCAAACG
bcnF2	GTTTCCGCCAAATGCAGTAGTAAGAG
bcnR2	GTTTCATCACCAACTACCTCTGCATTG
H0-40FU2	GCGTATAACAACATATATGGGTAATCCTG
PCP36RD1	CAATTTAGCATGAGCTAACTCATGG
PCP36FD	GTAAACTGAATTGGAGGAACTGATAG
M9FD10	GAACCTCAAATTAGTGACCATGTAGC
36FU3	TTGTATCTAAAGCTGAAGGTATAAGTGC
T7FD10	AATTTGAAGGATTAGCACAGTTACCAG
Hp4-5T7R3	CTCTGTAGCTACAGATCTTTTCGCAC
resPD2-7	GTTGGTTATCGTGATTATGTTAGGTG

H40-T7D1	CTAATATTTCAATCATATTCTCCATAGG
H40-T7R	AGTTAATGAATGGATTATTTATTGCAGAAG
SOJ-FU2	CAATTTTAGCGTAGATATGATTAGGCTG
SOJ-FU	GTACATCTGCAATTGAAACATCTTCC
H40-T7D2	GACTTTAACTTCTGCCATAATAAGCTC
H40-FU3	CTTTCATATGGATTTTACTCTAAGGTG
H40-T7D3	CTTGTTATTGTTGAATCAGTAGTTGC
H40-FU4	CTCAAAATGACAGCGTTCAAGATGTGG
H40-T7FU1	CATTCTTGTAGGTCAAATAGTGAAGCTC
H40-T7D4	GCACTACTAATCAGATTAGCTTCTC
H40-FU5	GAATTTACGACTATTATAGTTAAAGCTC
421UP4-2	CAGGATTAATATATATCTATCCTCAGC
H40-FU6	GTTAGATTGCAAATAAATACTGGTGC
H1-MT3D	GTTGCAGAAGAACTAAAGCTAAAGAG
H1-MT7D	TATGGATTATCACTTGATGTATCTAGCC
H1-MT3R	CTCTTTAGCTTTAGTTTCTTCTGC
sojFD	GATAGATAAGTTTGCTTTAGATGGC
H1-mT3D2	TAATAAATGGCTAGAGTATTTAGGC
H1-mT7D2	ACCAAAAATAATGCATCAAAAATCACCG
RES-21T7FD2	TATATACTCTGCTGTAAACCATGCTG
RES-21T7FD3	CAAATCAGAACTAATTTCTTTATTTACAG
RESPD-D4	AGTTTTAAATCAGTATTAACATCACAGTC
RESPDT7D5	AATAGGGGTAGAGTGCGTATGAGTG
PCP34R	CATACCTGATACTCTTTTTACTGAAGC
PCP36R	ATTTTCTAAATTATAAGTTTTTCTACG
RESPDT7D6	TGCCTTACAGAAAAGAACAAAAGG
RESPD-T7D7	AATATCGGCTTTTTTAATTTTTAGGTC
RESPDT7D8	GAGATGTTGATGGAAATCAAATCC
H0-40T7FU3	GAGATAATTTGATTCAAGGAAAGAAGG
PCP36RD2	CTCTTTCCAAAATGCAAAACTGC
PCP36FD2	GGGAGGAGTATTATCCATATGCTAAAAC
resT7D9	GGTAGTTGGTGATGAACTATATCTAAGAG
PCP36RD3	CATCTATTAATCATCTTCTAAACCTTC
PARB-F	GAAATAGTGGATATTGAATCTCTTGCG
PARB-R	CCTTGTTCTATAACTGCTTTAACTCTGG
RESP-F	GTGGTACTAAGCTGAGAAGGGATCAGC
RESP-R	CTATATACAGTTGCTCTACTTAACTCTG
Hp2-1T7R2	GCTTTCTAACATTGTATAAAACATCC
Hp4-5T7R2	GGATTTTAAATAGAATTATCAATTTCTCTAC
Hp4-5T7R4	CAGGTACATAGTACCCTATAATACAAGG

Primers for pCP853S12 plasmid sequencing

8533-30REPFR	TTCTTTTATATTCTCTAACCTTCTACAG
8533-30REPRR	AATAAGAAATAAAAATAGTTATGATGGTG
8533-30REPFR2	AAAAATCCATACTCTCTATATGGTAACGC
8533-30REPRR2	ATAGGTGAAAAATAAGATAACTCAAGTCC
8533-30REPFR3	TTCAATCTCATTATTTAACTATCTTTGC
8533-30REPRR3	ATTGATTCTAATTCATTAATTTTATCCG
8533-30REPFR4	CTAAACCATGCCCAAGTAAGAAATGTTGC
8533-30REPRR4	CTTGCTATTTCTTTACTGTGCTCACTTGG
8533-30REPFR5	CTTCATAGGTAAATAAGGATTTCTAGC
8533-30REPRR5	CATCTTAAACATTCCATTTTTATATCCTC
8533-30REPRR6	TAAGCACTGTTGCAAGATTAGTATTTGAG
8533-30REPFR6	ACTTGAATAGTTCCAATCCATAAAATAGC
8533-30REPRR7	GGAAAACTTTAGAAGAATTAATAATAGG
8533-30REPFR7	AATGTATAAGTAGTTGTGTTCTAAATGCC
8533-30REP-UF	AGAAGTAAAGAAAATAAAACCAGATAG
8533-30REP-DR	ATATGTTTATAGTAGGATTTTTTCTAGCC
8533-30REPFR8	GTCTACAAATCGTTGCTAAACATGCACAC
8533-30REPRR8	AAAAGAAAAATATAATGTAGAAACAAGAG
8533-30REPFR9	GGGAGTTACATTTGTAGGTTGGAAAGCAG
8533-30REPRR9	AAGAATATTTAAAGTTTTTTGATAGTGAG

発表論文

Kazuaki Miyamoto, Soshi Seike, Teruhisa Takagishi, Kensuke Okui, Masataka Oda, Masaya Takehara, Masahiro Nagahama. Identification of the replication region in pBCNF5603, a bacteriocin-encoding plasmid, in the enterotoxigenic *Clostridium perfringens* strain F5603. BMC Microbiol., 2015, 15, 118, doi:10.1186/s12866-015-0443-3