

脱ハロゲン能を担うプラスミド pUO1 と薬剤耐性プラスミド RP4 との組み換えプラスミドについて

(大府大 農化) ○川崎東彦, 高雄 誠, 外村健三

1. 目的 フルオル酢酸資化性菌 *Moraxella* sp. B に見つけられた伝達性プラスミド pUO1 (43.7 Mdal) は 2 種の脱ハロゲン酵素 (H-1, H-2) と水銀耐性を支配する^{1,2)}。一方, RP4 (36 Mdal) は, テトラサイクリン (Tc), カナマイシン (Km), アンピシリン (Ap) 耐性を支配する宿主域の広い伝達性薬剤耐性プラスミドである。両プラスミドを接合伝達により *Pseudomonas* 属の一分離株に共存させたところ, 3 種の組み換えプラスミドが得られた。これら組み換えプラスミドの DNA 構成, 形質, 伝達性を調べ, その由来を考察した。

2. 方法 グリコール酸資化能のある分離菌 *Pseudomonas* sp. E を受容菌として, 先づ *Moraxella* B より pUO1 を接合伝達させ, 続いて *E. coli* 2050 より RP4 を接合伝達させた。pUO1 の選択はフルオル酢酸 (FA) またはクロル酢酸 (CA) 資化性あるいは水銀耐性により, RP4 の選択はカナマイシン耐性によった。プラスミドは Hansen-Olsen 法で抽出し, CsCl-ExBr 平衡密度勾配遠心法で精製した。制限酵素 *EcoRI*, *SalI*, *HindIII*, *BamHI*, *SmaI* は宝酒造(株) 製を用い, 切断条件はそのテキストに従った。切断フラグメントの分析は *E buffer* を用いるアガロースゲル電気泳動により行った。

3. 結果 pUO1 を導入した *Pseudomonas* E と *E. coli* 2050 (RP4) とを mating し, 3 種の選択プレート CA-Km, FA-Km および Hg-Km で transconjugant を選択した。いずれのプレートに生じたコロニーも全て *Pseudomonas* であり, *E. coli* の transconjugant は認められなかった。各プレートより得られた transconjugant をそれぞれ 20~30 株選び, そのプラスミドをアガロースゲル電気泳動で観察した結果, 大部分の株は pUO1, RP4 の両プラスミドバンドあるいは RP4 バンドのみを示したが, どちらのバンドとも合致しない組み換えプラスミドのものと見られる 1 本のバンドを示す株が 3 種得られた。いずれのプラスミドも pUO1 より少し大きい分子量を示した。CA-Km プレートより得られた株の組み換えプラスミド pRD-1 は約 46 Mdal であり, RP4 の全形質 (Tc^r, Km^r, Ap^r) と pUO1 の形質のうち H-1, H-2 生成能を有していたが, 水銀耐性を失っていた。Hg-Km プレートより得られた組み換えプラスミド pRD-2 は RP4 の全形質と水銀耐性を有していたが, H-1, H-2 生成能は無くなっていた。FA-Km プレートより得られた組み換えプラスミド pRD-3 は pUO1 の形質 (H-1, H-2, 水銀耐性) を有していたが, RP4 の Tc^r, Ap^r が無くなっていた。これらの 3 つのプラスミドは, それぞれの株より *Moraxella* B および *E. coli* へ接合伝達され, すべての形質が発現した。制限酵素切断分析の結果, いずれの組み換えプラスミドにも親プラスミド (pUO1, RP4) のフラグメントが認められた。pRD-1 では pUO1 由来の部分は約 16 Mdal, RP4 由来の部分は約 30 Mdal と推定された。これらの構成フラグメントの親プラスミド切断地図での位置づけを目下検討中である。

1) H. Kawasaki et al. Agric. Biol. Chem. 45, 29 (1981)

2) H. Kawasaki et al. Agric. Biol. Chem. 45, 1477 (1981)