

14 微生物

126

メタノール酸化性菌 *Methylobacterium extorquens* NR-1が保持するプラスミドの複製必須領域について

(名大・農・食工化) ○小森弘史、上田俊策、山根恒夫

1) 目的 メタノール等のC₁化合物を唯一炭素源として生育できる通性メタノール酸化性菌の一種であり、当研究室で単離された *Methylobacterium extorquens* NR-1株 (*Pro-taminobacter ruber* NR-1 と同等) は約47kbのプラスミド (pNR1)を保持している。¹⁾ 本研究では *M. extorquens* NR-1株を宿主とするベクター系の作成を目的として、pNR1のベクターとしての利用可能性を検討するために、本プラスミドの小型化および複製必須領域の解析を試みた。

2) 方法および結果 *M. extorquens* NR-1株より調製したpNR1を *Eco*RIで26kb、17kb、4kbの断片に完全分解後、それぞれの断片を pTH30 (Km^r、Cm^r、pACYC184の *Hind*III部位に *Tn5*の3.3kb *Hind*III断片を挿入したもの) の *Eco*RI部位に連結した。これらの組替えプラスミドを用いてプラスミド非保持株である *M. extorquens* NR-2 (*P. ruber* ATCC8457) を電気パルス法によって形質転換し、Km (50 μg/mL) 含有平板培地上で生育を調べたところ、4kbの *Eco*RI断片が挿入された組替えプラスミド (pNRE31) を導入した場合のみ形質転換株が得られた。一方、本 *Eco*RI断片が逆方向に挿入されたもの (pNRE32) を用いた場合にも同様に形質転換株が得られた。また、挿入された 4kb *Eco*RI断片はサザンブロット解析により、pNR1由来であることが確認された。この結果から、pNR1の複製必須領域が 4kb *Eco*RI断片中に含まれることが推測され、さらに詳細な解析を行っている。

1)小森弘史、上田俊策、清水祥一：日本農芸化学会1990年度大会講演要旨集 p.428
Region responsible for the replication of plasmid harbored in a methylotrophic bacterium, *Methylobacterium extorquens* NR-1.

○Hiroshi Komori, Shunsaku Ueda, Tsuneo Yamane (Dept. of Food Sci. and Technol., Sch. of Agriculture, Nagoya Univ.)

好熱性細菌由来薬剤耐性プラスミド pTB19のコピー数調節機構の解析

127

(阪大・工・醗酵) ○巻 秀樹 今中忠行

(目的) 当研究室において自然界より単離された、好熱性 *Bacillus* 属細菌由来薬剤耐性プラスミド pTB19は、宿主 (*Bacillus subtilis*) 細胞内でのコピー数がほぼ1に制御されている。pTB19には *repA*、*repB* の2種類のDNA複製領域が存在することが明らかとなっている。¹⁾ そこで、このプラスミドを材料に、コピー数を1に保つために必要な複製制御機構の解明と、物質生産において必要とされる宿主菌への負担の少ない低コピー数で安定なベクターの作製を目的とした。

(方法) プラスミド pTB19由来の複製開始領域 *repA* のみを含むプラスミドではコピー数が8-10、*repB* のみを含むプラスミドでは、コピー数が約20と増加が認められた。そこでまず、*repA*、*repB* 間の相互作用を調べるために、*repA*、*repB* を同時に含むプラスミドの作製をおこなった。また pTB19の小型化に伴うコピー数変化を解析して、コピー数を1に保つのに必要な領域の限定を行った。

(結果) *repA* 型プラスミド (pTB523) と *repB* 型プラスミド (pTB913) の *Eco*RI 部位での結合を試みたが、pTB19のように、*repA*、*repB* が共存した小型プラスミドの取得はできなかった。このことは、pTB19上の *repA*、*repB* 領域以外のDNA部位に両レプリコンを安定に維持させる機能部位が存在していることを示唆している。そこで次に pTB19 自体からの *repA*、*repB* 領域以外の断片の除去を行い、コピー数変化を調べた。その結果、pTB19の *Eco*RI 消化により生じる6断片、R1a(*repA*)、R1b(Km^r)、R2(*repB*)、R3(Tc^r)、R4a、R4bのうち、R3あるいは、R1bの殆どの領域を欠くとコピー数が上昇した(コピー数3-6)。そこから更に、R1bとR2の配向性が pTB19 の場合と逆になった場合もコピー数が8-10に上昇した。従って、コピー数を1に保つには、R3及びR1bが必須で、更にR1bとR2の配向性が重要であると考えられた。

1) T. Imanaka, T. Ano, M. Fujii, S. Aiba, J. Gen. Microbiol., 130, 1399-1408, (1984)

Studies on copy number control of low copy number plasmid pTB19

○Hideki Maki, Tadayuki Imanaka

Dept. of Fermentation Technology, Faculty of Engineering, Osaka Univ.