コリシン E1 型プラスミドの大腸菌 *recB recC sbcB* での非増殖性について

東 美恵子, 本山千春, 長谷 哲, 正宗行人*

金沢大学薬学部

The Transformation of *E. coli recB recC sbcB* with colE1 Type Plasmid Is Inhibited by the Transcription of *cea* Gene

MIEKO HIGASHI, CHIHARU MOTOYAMA, TETSU HASE
and YUKITO MASAMUNE*

Department of Microbiology, Faculty of Pharmaceutical Science,
Kanazawa University, Kanazawa, 920, Japan

(Received July 14, 1987)

Although colicin E1 type plasmids (colE1 and pKY-1) can not transform *Escherichia coli recB recC sbcB*, pBR322, a derivative of a colicin E1 type plasmid, can transform it. The analysis by using the derivatives of pKY-1 gave the following conclusions concerning their inability.

- 1) *E. coli recB recC sbcB* was not transformed with the plasmid carrying *cea* gene of colicin E1 which was transcribed by constitutive promoter.
- 2) Transcription of the first 250 bases of the *cea* gene was sufficient to inhibit the transformation.
- 3) The inhibition of transformation with the plasmid is expressed by transcription of its own *cea* gene (*cis*-acting).
- 4) When the replication origin of pKY-1 was changed to pKYM, the transformation was not inhibited. The transcript inhibits only the transformation with the plasmid carrying the replication origin derived from colicin E1 or its relative.
- 5) Transcription of the *cea* gene inhibited multiplication of the host cells carrying the plasmid. The synthesis of plasmid deoxyribonucleic acid (DNA) continued in the host cells but the DNA was not isolated from the cytoplasm as a closed circular form.

Keywords—colE1-type plasmid; pKY-1; *cea* gene; *E. coli recB recC sbcB*; replication origin of plasmid; replication inhibition; *cis* effect transcription

プラスミド pKY-1 は colE1 と非常によく似たプラスミドで、我々が *Shigella sonnei* に見出したものである。このプラスミドの複製開始部位及びコリシン E1* の構造遺伝子 (*cea**) とその周辺の塩基配列 (3 022 塩基対) を決定し、報告した。¹⁾ colE1 型プラスミドは *Escherichia coli recB recC sbcB* 変異株を形質転換できず、この菌内では増殖できないことが知られている。²⁾ pKY-1 も同様に、*recB recC sbcB* 株で増殖できない事が分かったので、その機構を形質転換頻度を比較することにより解析した。その結果、以下の事が明らかとなったので報告する。

- i) コリシン E1* 蛋白の N 末側をコードする領域が転写されると pKY-1 プラスミドをもつ宿主菌の増殖が阻害される。
- ii) この増殖阻害は colE1 型の複製開始機構をもつプラスミドに特異的である。
- iii) この阻害作用は *cea** と pKY-1 の *ori* が同一 deoxyribonucleic acid (DNA) 上にあり、*cea** が転写される時にのみ起こる。

実 験 の 部

大腸菌株とプラスミド 使用した大腸菌株とプラスミドは Table I に示した。プラスミドの作製法は各々の図の説明の項に示した。なおプラスミドの調製には BMH408 株を用いた。

TABLE I. Bacterial Strains and Plasmids

Strain	Relevant properties	Reference
Bacteria		
BMH408	Δ (<i>lac pro</i>) <i>su</i> ⁺ <i>F'</i> <i>lacI</i> ^a <i>Z</i> ⁺ <i>Y</i> ⁺	3
JC9937	<i>rec</i> ⁺	9
JC9387	<i>recB21 recC22 sbcB15</i>	9
Plasmids		
pHK21	pKY-1 <i>ori</i> Km ^r	1
pHK22	pKY-1 <i>ori</i> Km ^r	1
pHK27	pBR322 <i>ori</i> Km ^r Ap ^r	1
pHK30	pKY-1 <i>ori</i> Km ^r	1
pKY-1::Tn3		1
pBR322	Ap ^r Tc ^r	10
pKYM		5
RSF2124	<i>colE1</i> ::Tn3	11
pMPC1	<i>lacI</i> ⁺	12

Abbreviations: Δ , deletion; Ap^r, ampicillin resistance; Km^r, kanamycin resistance; Tc^r, tetracycline resistance. The other genetic symbols are those used by Demerec *et al.*¹⁴⁾

一般的方法及び試薬 プラスミド DNA の取扱い, 形質転換, 培養は既報に従った.¹⁾ 制限酵素, T₄ DNA リガーゼ, T₄ DNA ポリメラーゼはニッポンジーンの商品を用いた. これらの酵素の反応条件は指定された条件に従った. 大腸菌の形質転換体の選択には, アンピシリンナトリウム (明治製菓, 25 μ g/ml), 硫酸カナマイシン (山之内製菓, 50 μ g/ml), 塩酸スペクチノマイシン (日本アプジョン, 100 μ g/ml) を培地に添加して行った. ラクトースプロモーターからの転写を誘発させるにはイソプロピル β -D-チオガラクトシド (IPTG, Sigma, 1 mM) を用いた. DNA の標識, DNA-DNA ハイブリダイゼーションは既報⁹⁾に従った. プラスミド及び染色体 DNA の標識には [³H]チミジン (50—90 Ci/mmol, New England Nuclear) を用いて行った.

結 果

colE1 型プラスミドによる *E. coli recB recC sbcB* の形質転換

E. coli recB recC sbcB では colE1 型プラスミドが安定に保持されないことが報告されているが, 一方 colE1 型プラスミドの複製開始領域のみを持つ pBR322 はかなり安定に保持される.¹⁾ 我々は pKY-1 の構造解析を行う過程で作成した種々のプラスミドで *recB recC sbcB* 株を形質転換したところ, プラスミドによりその形質転換効率に著しい差があることを見出した. Fig. 1 に示すように pKY-1 の複製開始領域のみをもつ pHK30 及び pBR322 の *recB recC sbcB* 株に対する形質転換効率は野生株に対する効率と同じであった. 一方, pKY-1::Tn3 と RSF2124 は *recB recC sbcB* 株に対する効率が野生株に比べて 10⁻⁸ に減少した.

pHK21 は Tn5 由来のカナマイシン耐性遺伝子 (*aph* (3')) を pKY-1 の *cea** の上流に挿入したプラスミドである. この挿入のため pHK21 では *cea** 本来のプロモーターがこわされているが, 代りに挿入された *aph* (3') のプロモーターから開始する転写によってコリシン E1* を構成的に生産するようになっている. この pHK21 の *recB recC sbcB* 株に対する形質転換頻度は低下していた. 一方, pHK22 は *aph* (3') を, pHK21 とは逆向きに挿入したもので, *cea** を転写するプロモーターはない. この pHK22 は *recB recC sbcB* 株を野生株と同様の頻度で形質転換出来た. この結果は, *cea** 領域が転写されると形質転換頻度が低下する事を示唆している. そこでこの事を確認するため転写ターミネーター (Ω フラグメント⁴⁾) を pHK21 の *aph* (3') のプロモーター, あるいは *aph* (3') の構造遺伝子内に挿入したプラスミド pMH30 及び pMH31 を作製した. これらのプラスミドは *aph* (3') から始まる転写が転写ターミネーターで停止するため *cea** を read-through しなくなっているものである. これらの pMH30 と pMH31 は *recB recC sbcB* 株を高頻度に形質転換出来た. この結果は pKY-1 の *HincII* 部位から右向きに *cea** 領域が転写されると pKY-1 は *recB recC sbcB* 株を形質転換できなくなることを示している.

Fig. 1. Restriction Maps of the Derivatives of pKY-1 Used to Determine the Transformation Efficiency of *E. coli recB recC sbcB*

The transformation efficiency shown at the right column was calculated by dividing the transformation frequency of *E. coli recB recC sbcB* with that of wild-type *E. coli*.

The genetic and physical map of pKY-1 is shown at the top line.

The straight line represents the fragment derived from pKY-1.

⇒ is the Km^r fragment and the arrowhead indicates the direction of transcription.

■ is the fragment derived from pBR322.

□ is the fragment derived from pKYM. Filled circle is the replication origin (*ori*) of the plasmid. White square is the transposon Tn3 conferring ampicillin resistance. Filled triangle is the Ω fragment where the transcription proceeded from upstream (left to right in this figure) terminates⁴⁾.

→ is the region of the primer RNA synthesized for the DNA replication and its direction of transcription. *cea** and *imm** are the structural genes of colicin E1* and its immunity protein deduced from the nucleotide sequence. The arrowhead indicates the direction of transcription. The construction of pHK21, pHK22, pHK27 and pHK30 was described previously¹⁾. pHK28 was prepared by joining the *HindIII*—*EcoRV* fragment of pHK21 with the *HindIII*—*EcoRV* fragment of pBR322. pMH10, pMH11 and pMH12 were prepared by eliminating either the *SmaI*—*ScaI*, *PstI*—*PstI* or *PvuII*—*EcoRV* fragment present in pHK27. pMH20, pMH21 and pMH22 were prepared by eliminating either *SmaI*—*SmaI*, *HincII*—*PstI* or *HincII*—*PvuII* fragment present in pHK21. pMH40 was prepared by joining the *EcoRV*—*EcoRV* fragment of pHK21 with *SspI*—*SspI* fragment of pKYM.⁵⁾ pMH50 was prepared by joining the *EcoRV*—*HaeII* fragment of pHK21 with the Ω fragment.

*: The efficiency of pMH50 was measured in the presence of pMH40. — in each structure of plasmid represents the deleted fragment. B, EV, HII, HIII, PI, PII and S represent the sites of *BamHI*, *EcoRV*, *HincII*, *HindIII*, *PstI*, *PvuII* and *SmaI*, respectively. Km^r and Ap^r represent the resistance markers of kanamycin and ampicillin, respectively.

pHK21 の *aph* (3') と *cea** の一部を含む領域を pBR322 にクローニングした pHK27 も同様に *recB recC sbcB* 株を形質転換できないことが分かった。この結果は形質転換阻害は必ずしも完全な *cea** を必要とせず、また複製開始領域が pBR322 であっても阻害する事を示している。次に、この阻害を起こすのに必要な *cea** の最少領域を決定するため、コリシン E1* 蛋白の C 末端をコードする DNA 領域 (3' 側領域) を欠失したプラスミドを作製した (pMH10 及び pMH11)。その結果 *cea** の *HincII*—*PstI* の領域 (約 250 塩基対) が転写されると、pKY-1 プラスミドは *recB recC sbcB* 株を形質転換出来なくなることが分かった。更に *Pvu II* 部位まで欠失させたプラスミド (pMH12) では、形質転換効率は野生株に比べて 10^{-1} と低いが、形質転換体を得ることができた。

この結果は *Hinc* II—*Pvu* II 領域の転写では形質転換阻害は不完全になることを示している。一方, *cea** の 5' 側を欠失させたプラスミドを作製して調べたところ, *Hinc* II—*Pvu* II の領域を除くと *aph* (3') から *cea** 領域へ転写が, read-through しても *recB recC sbcB* 株を野生株と同様に形質転換できることが分かった (pMH20, pMH21, pMH22)。以上の結果から, pKY-1 の *recB recC sbcB* 株の形質転換阻害が *Hinc* II—*Pst* I 領域の転写によると考えられる。またこの *Hinc* II—*Pst* I 領域の構造が *colE1* のそれと同一であることから,¹⁾ pKY-1 と *colE1* の *recB recC sbcB* 株での形質転換阻害は共通の機構によると考えられる。

複製開始領域の特異性

Hinc II—*Pst* I 領域の転写による阻害効果が複製開始に特異性があるかどうかを pHK27 の pBR322 の部分を *Shigella sonnei* 由来の pKYM に変えた pMH40 を作製して調べた。このプラスミドは *recB recC sbcB* 株を形質転換出来た (Fig. 1)。pKYM の複製機構に対しては *Hinc* II—*Pst* I 領域による形質転換阻害はみられないことから, この阻害が *colE1* 型プラスミドの複製機構に特異的であると考えられる。

*cea** 領域の転写のシス効果

pMH40 が *recB recC sbcB* 株で増殖できたのでこのプラスミドを用いて *Hinc* II—*Pst* I 領域が転写されている条件下で pKY-1 の複製開始領域のみを持つプラスミドが共存できるかどうか調べた。pKY-1 の *Hinc* II—*Pst* I 領域を持たず複製開始領域のみを持つ pMH50 と pMH40 を *recB recC sbcB* 株に共存させることは可能で, しかも薬剤を含まない非選択培地中で約 15 世代培養しても pMH50 の脱落はみられなかった。したがって, *Hinc* II—*Pst* I 領域の転写による増殖阻害はシスにしか作用しないことが明らかとなった。

複製開始方向と *cea** の転写方向

これまで調べたプラスミド (pHK21, pHK27, pMH10, pMH11, pMH12) はいずれも *cea** の転写方向と複製開始の方向とが一致している。そこで pHK21 の pBR322 の結合方向を逆向きにした pHK28 及び pHK21 の *EcoRV* 部位に Ω フラグメントを挿入した pMH32 を作製し, これらのプラスミドの *recB recC sbcB* 株の形質転換能を調べたが, いずれも形質転換出来なかった (Fig. 1)。したがって, この阻害はシスに働くが, 複製開始の方向と *Hinc* II—*Pst* I 領域の転写の方向は必ずしも同じ向きである必要はなく, また *Hinc* II—*Pst* I 領域の転写が複製開始領域へ流れ込むために阻害が起こるのではないことを示唆している。

ラクトースプロモーターによる *cea** 領域の転写調節

これまで述べたプラスミドはいずれも *aph* (3') のプロモーターにより構成的に *cea** 領域が転写されているので *recB recC sbcB* 株で形質転換体が得られないため, この領域の転写による形質転換阻害の機構を解析することはできない。そこで *Hinc* II—*Pst* I 領域を転写調節が可能なラクトースプロモーターの下流に挿入し, この転写が宿主及びプラスミドの増殖に及ぼす影響を調べ, 形質転換阻害の機構の解析を試みた。*cea** が転写されないため *recB recC sbcB* 株で増殖可能な pHK22 にラクトースプロモーターを含む DNA 断片を挿入して pCM1 を作製した (Fig. 2)。

挿入した DNA 断片にはラクトースオペロンのレプレッサーである *lacI* 遺伝子が含まれているため, ラクト

Structure of plasmid		Transformation efficiency <i>recB recC sbcB/rec</i> ⁺	
		—IPTG	+IPTG
	pHK22	0.77	0.95
	pCM1	0.43	<0.001

Fig. 2. Construction of pCM1 and the Effect of IPTG on Its Transformation of *E. coli recB recC sbcB*

pCM1 was prepared by joining the *Hinc*II fragment of pMPC1 which carried *lacI* and *lacP*¹²⁾ with *Hind*III—*Bam*HI fragment of pHK22. The transformation efficiencies were measured in the absence (—IPTG) or presence (+IPTG) of IPTG following the method described in Fig. 1.

TABLE II. Effect of IPTG on the Growth of Bacteria and the Synthesis of Plasmid DNA

Incubation time (h)	Without IPTG			With IPTG		
	Viable cell ^{a)} (cells/ml)	[³ H]DNA ^{b)}		Viable cell ^{a)} (cells/ml)	[³ H]DNA ^{b)}	
		Total (cpm)	Hybridized (%)		Total (cpm)	Hybridized (%)
0	5.5×10^6	1.7×10^4	10.7			
1	1.7×10^7	2.1×10^4	8.1	8.3×10^6	1.8×10^4	8.4
2	4.3×10^7	2.3×10^4	5.2	7.5×10^6	2.1×10^4	6.8
3	8.1×10^8	2.7×10^4	4.6	6.9×10^6	2.4×10^4	6.8

a) *E. coli recB recC sbcB* carrying pCM1 was grown at 37°C in L-broth. When the cells were grown to 10^7 /ml (0 h), half of the culture was added with 1 mM IPTG and the viable cells were measured at the indicated times.

b) The DNA was labeled with [³H]thymidine (20 μCi/ml) for an hour at the indicated times and 100 μl × 2 samples were withdrawn. The total incorporation of [³H]thymidine into acid-insoluble fraction was measured and the DNA extracted was hybridized to pCM1 DNA as described in the text. The incorporation of [³H]thymidine into acid-insoluble fraction was similar independent of the presence or absence of IPTG. The one reason why the incorporation of [³H]thymidine into acid-insoluble fraction was not proportional to the cell number is probably due to that the host cell does not require thymine for its growth.

ースプロモーターからの転写は抑えられている。pCM1 はこの条件下では *recB recC sbcB* 株を形質転換出来たが、ラクトースプロモーターのインデューサーである IPTG を添加し *cea** が転写される条件下では形質転換体は得られなくなった。以上の結果から *cea** 領域が転写されると *recB recC sbcB* 株を形質転換出来なくなることが分かった。

*cea** 領域の転写とプラスミド及び宿主菌の DNA 合成

pCM1 をもつ *recB recC sbcB* 株を培養し IPTG 添加後のプラスミド及び宿主染色体の DNA 合成を調べた。なお、プラスミドの DNA 合成量は DNA-DNA ハイブリダイゼーション法を用いて測定した。また同時に、菌の増殖に対する IPTG の影響も調べた。その結果を Table II に示す。IPTG 存在下ではプラスミドを保持する生菌数は増加しなくなった。この時顕微鏡にて形態を調べたところ、細胞が長く伸びていることが観察された。

染色体及びプラスミド全体の DNA 合成量は [³H]チミジンの取込みで調べるかぎり、IPTG を加えない対照と大きな違いはなかった。しかし、IPTG 存在下に出来たプラスミド DNA を抽出後アガロースゲル電気泳動により調べたところ、IPTG 非添加時に観察される閉環状、あるいは開環状の pCM1 プラスミドに相当する DNA は回収されなかった。

考 察

recB recC sbcB 株では *colE1* 型プラスミドは形質転換体を得られないが、その理由は pKY-1 の *Hinc* II—*Pst* I 領域が転写されるためと考えられる。この形質転換を阻害する作用が生ずるには *cea** と pKY-1 の *ori* が同一分子上に存在することが必要であり (*cis* 効果)、しかも *colE1* 型の複製開始領域を持つプラスミドに特異的であった。

最近 Cohen と Clark は *recB recC sbcB* 株で *colE1* 型プラスミドが線状のマルチマーになることを見出した。^{6,7)} 彼らはこのような線状のマルチマーはエキソヌクレアーゼ I, エキソヌクレアーゼ V の欠損した *recB recC sbcB* 株でローリングサークル型の DNA 複製により合成され、このようなマルチマー形成のため *colE1* 型プラスミドが *recB recC sbcB* 株で不安定になると考えている。

ラクトースプロモーターを用いて転写を誘発してもプラスミド DNA の合成速度に変化はみられなかったが、プラスミドを持つ細胞の増加は停止した。このプラスミド DNA を抽出したところ、転写を誘発した場合には閉環状のプラスミド DNA は回収されなかったことから、プラスミド DNA の構造が異常となり、高分子のマルチマーを形成するか、細胞膜に結合している可能性がある。その結果宿主の細胞分裂も阻害されたのではないと思われる。

recB recC sbcB 株では *colE1* 型プラスミドは形質転換出来ないが、*recF* 変異が更に加わると増殖できるようになることが知られている。²⁾ 我々も pKY-1 プラスミドの誘導体を用いて同様の結果を得ている。この *recF* 遺

伝子はプラスミドの組換えに関与しており、野生株では *recF* 遺伝子の発現は抑制されているが *recB recC sbcB* 変異があると *recF* の発現が促進される。⁸⁾ pKY-1 の *Hinc* II—*Pst* I 領域が転写されると *recF* 経路による分子間又は分子内組換えが促進され、プラスミド DNA がマルチマー分子になった可能性がある。

形質転換阻害の作用は転写される領域と、複製開始点が同一分子内にある時にのみ生ずることから、*Hinc* II—*Pst* I 領域の転写産物あるいはこの領域にコードされる蛋白質が関与しているというよりはむしろ、転写により引き起こされる *Hinc* II—*Pst* I 領域の DNA の構造変化が異常な DNA 合成の開始の要因となっている可能性がある。

Hinc II—*Pst* I 領域には *cea** の SOS ボックスが存在するので、この SOS ボックスの存在と形質転換阻害との関係を調べた。*lexA* 遺伝子¹⁸⁾を pBR322 上に持つプラスミド (SOS ボックスを持つ) は *recB recC sbcB* 株で増殖可能であったことから、SOS ボックスが *colE1* 型プラスミドの形質転換の阻害に関与しているとは考えにくい。

謝辞 研究費の一部は文部省科学研究費によったことを記して、謝意を表します。

引用文献

- 1) M. Higashi, M. Hata, T. Hase, K. Yamaguchi, Y. Masamune, *J. Gen. Appl. Microbiol.*, **32**, 433 (1986).
- 2) C. L. Basset, S. R. Kushner, *J. Bacteriol.*, **157**, 661 (1984).
- 3) T. Hase, A. Kitamoto, Y. Masamune, *J. Biochem.*, **96**, 1205 (1984).
- 4) P. Prentki, H. M. Krisch, *Gene*, **29**, 303 (1984).
- 5) S. Sugiura, S. Nakatani, Y. Mizukami, T. Hase, H. Hirokawa, Y. Masamune, *J. Biochem.*, **96**, 1193 (1984).
- 6) A. Cohen, A. J. Clark, *J. Bacteriol.*, **167**, 327 (1986).
- 7) A. Cohen, A. Laban, *Mol. Gen. Genet.*, **189**, 471 (1983).
- 8) Z. Horii, A. J. Clark, *J. Mol. Biol.*, **80**, 327 (1973).
- 9) D. R. F. Leach, F. W. Stahl, *Nature (London)*, **305**, 448 (1983).
- 10) F. Bolivar, R. L. Rodrigues, P. J. Greene, M. C. Betlach, H. L. Heyneker, M. W. Boyer, *Gene*, **2**, 95 (1977).
- 11) M. So, R. Gill, S. Falkow, *Mol. Gen. Genet.*, **142**, 239 (1975).
- 12) M. P. Calos, *Nature (London)*, **274**, 762 (1978).
- 13) T. Horii, T. Ogawa, H. Ogawa, *Cell*, **23**, 689 (1981).
- 14) M. Demerec, E. A. Adelberg, A. J. Clark, P. E. Hartman, *Genetics*, **54**, 61 (1966).