プラスミド pKYM の不和合性とコピー数の Ribonucleic Acid による調節

廣瀬智弘, 柴田仁美, 長谷 哲, 中西義信, 正宗行人*
金沢大学薬学部

Incompatibility and the Copy Number of Plasmid pKYM is Regulated by Ribonucleic Acid

TOMOHIRO HIROSE, HITOMI SHIBATA, TETSU HASE,
YOSHINOBU NAKANISHI and YUKITO MASAMUNE*

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

(Received March 14, 1988)

Plasmid pKYM is a multicopy plasmid isolated from *Shigella sonnei*. We have determined the region required for the incompatibility which also controls the copy number. It is partially overlapped with the region required for the initiation of replication. There are two promoters in this region. One promoter synthesizes messenger ribonucleic acid (mRNA) of *rep* protein (P_R promoter) and another one transcribes the opposite strand in the same region (P_L promoter).

These two RNAs seem to interact through the stem-and-loop structure present in this region. The repression of the synthesis of *rep* protein which is essential for plasmid replication by the interaction of these two RNAs seems to be the main mechanism of the incompatibility and the regulation of copy number.

Keywords—plasmid pKYM; plasmid incompatibility; plasmid copy number; stem and loop structure; RNA-RNA interaction

プラスミドの不和合性の発揮やコピー数の調節は、自己の複製に必須な蛋白質 (*rep* 蛋白質) を産生するプラスミドでは、この *rep* 蛋白質の量を調節することによって行っている例が多い。その機構としては、i) *rep* 蛋白質が自己の messenger ribonucleic acid (m-RNA) の転写プロモーターに結合し、その結果発現を抑制する^{1,2)} ii) *rep* 蛋白質が自己のプラスミドのプロモーター以外の特定の構造に結合し、複製に働くことを抑制する^{3,4)} iii) *rep* 蛋白質の m-RNA に相補的な RNA が合成され、この RNA が抑制物質として働く⁵⁾ などが報告されている。我々が、*Shigella sonnei* より単離したプラスミド pKYM⁶⁾ の不和合性の発揮とコピー数の調節機構は、*rep* 蛋白質の m-RNA と相補的な RNA (cop RNA) の合成による型であることが分かった。

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。

Table I の欠失変異体 dl は、pKYB312 の *Nru* I 切断部位より複製開始領域、不和合性を発揮する領域を Fig. 1 の左側から BAL31 で削ったもので、dr は、pKYB223 の *Nru* I 切断部位より複製開始領域、不和合性を発揮する領域を Fig. 1 の右側から BAL31 で削ったものである。詳しい作製法は別報⁷⁾ に記した。

一般的方法と試薬 菌の培養、プラスミド deoxyribonucleic acid (DNA) による形質転換、プラスミド DNA の調整及び、種々の組み換えプラスミドの作製法は既報⁸⁾ に従った。組み換えには、T4DNA リガーゼ、制限酵素 (ニッポンジーン)、仔ウシ小腸アルカリフォスファターゼ (宝酒造) 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。

E. coli RNA ポリメラーゼ、リファンピシン、クロラムフェニコールは、ベーリンガー・マンハイム山之内の製品を用いた。ジチオトレイトール (DTT), 5,5' ジチオビス 2-ニトロ安息香酸 (DTNB), アセチル CoA, ヒドロキシルアミンは和光純薬工業の製品を用いた。結晶ウシアルブミン (BSA), 結晶リゾチーム, adenosine triphosphate (ATP), cytidine triphosphate (CTP), guanosine triphosphate (GTP), uridine triphosphate (UTP) は生

TABLE I. Bacterial Strains and Plasmids

<i>E. coli</i> strains and plasmids	Genotype	Reference
<i>E. coli</i> strain		
HI1006	F ⁻ <i>araD139 Δ(ara leu)7697 ΔlacX74 galU galK strA trpA38 recA1</i>	9
WA802 <i>polA</i>	<i>polA metB1 lac3 lacY galK2 galT22 supE hsdR2</i>	15
JM109	<i>recA1 endA1 gyrA96 thi hsdR17 supE44 relA1 λ⁻ Δlac proAB F' traD36 proAB lacI^qZ ΔM15</i>	12
Plasmid		
pKYM		6
pBR322	Ap ^r Tc ^r	25
pSC101	Tc ^r	16
pKK232-8	Rep(pBR322) Ap ^r CAT Promoter selection vector	11
pKYM-Cm ^r	Rep(pKYM) Cm ^r	6
pKYB312	Rep(pBR322) Rep(pKYM) Ap ^r	6
dl 1-dl 30	Deletion mutants of pKYB312	This work
pKYB223	Rep(pBR322) Ori(pKYM) Ap ^r	6
dr 1-dr 20	Deletion mutants of pKYB223	This work
pKYB213	Rep(pBR322) <i>Hind</i> II C-A fragment of pKYM Ap ^r	6
pKYL213	Rep(pBR322) Rep(λdv021) <i>Hind</i> II C-A fragment of pKYM Ap ^r	6
pCM701	Rep(pBR322) Rep(pKYM) Ap ^r	This work

Abbreviations: Rep(): replication system used by the plasmid is shown in the parenthesis. Ori(): replication origin included in the plasmid is shown in the parenthesis. Ap^r, ampicillin resistant; Cm^r, chloramphenicol resistant; Tc^r tetracycline resistant; Δ, deletion; dl, deletion mutants of pKYB312 produced by the digestion of BAL31 at *Nru*I site; dr, deletion mutants of pKYB223 produced by the digestion of BAL31 at *Nru*I site. The other genetic symbols are those used by Demerec *et al.*²⁶⁾

化学工業の製品を用いた。[α-³²P] UTP (400 Ci/mmol) はアマジヤムの製品を用いた。

不和合性を発揮する領域の同定法 pKYM-Cm^r⁸⁾ を持つ *E. coli* HI1006 *recA* 株⁹⁾ を pKYB312, pKYB223 (Table I) 及び、これらのプラスミドより作製した dl, dr 欠失変異体 (Fig. 1) の DNA を用いて形質転換し、Ap^rCm^r 又は、Ap^r の形質転換体をそれぞれ薬剤の入った [アンピシリン (明治製薬, 25 μg/ml), クロラムフェニコール (20 μg/ml)] LB アガープレート上で選択した。pKYB312, pKYB223 及びこれらのプラスミドより作製した欠失変異体は pBR322 の複製機構で増殖できるので、不和合性が発揮されると pKYM-Cm^r のみ増殖できず、Ap^rCm^r の二重形質転換体は得られず、Ap^r だけの形質転換体を得られる。¹⁰⁾ また Ap^rCm^r の二重形質転換体は得られたものについては、薬剤の入っていない LB の液体培地中で 20 世代培養し、再び ApCm 及び Ap の入った LB アガープレートに広げそれぞれの菌数を測定し、20 世代培養中に pKYM-Cm^r が失われた場合は不和合性が発揮されているとした。¹⁰⁾

プロモーター活性測定用プラスミド pLCM, pRCM の作製 pKYM の不和合性を発揮する領域内のプロモーターを調べる目的で、この領域内の種々の位置に CAT 遺伝子が結合した各種のプラスミドを Fig. 2 に例示する方法で作製した。

欠失変異体 dl, dr の末端には、すべて *Bgl* II リンカーが結合されており、*Bgl* II 切断部位となっているので、この *Bgl* II とベクター内の *Bam* HI 切断部位とで欠失変異体を切断し、不和合性領域内のプロモーターを含むと思われる断片を *Bgl* II と *Bam* HI の切断末端が同一 (5'GATC.....3' / 3'-HO.....5') であることを利用して、CAT 遺伝子を持つプロモーター検出ベクター pKK232-8¹¹⁾ の *Bam* HI 切断部位に挿入した。*Bgl* II と *Bam* HI の切断末端の結合した方は、いずれの酵素でも切断されないので *Bam* HI とベクター内の *Hin* dIII 切断部位で切断し、どちら側に *Bam* HI 切断部位が残っているかを確認し、目的の構造の pLCM, pRCM (Fig. 3) を得た。

クロラムフェニコール・アセチル・トランスフェラーゼ (CAT) の定量 pLCM, pRCM を持つ *E. coli* JM109 *recA* 株¹²⁾ を作製し、この株を一晩 37°C の LB で培養し、2 ml の LB 液体培地中に 1/50 量加え、37°C で 5×10⁸ cells/ml になるまで培養した。1.5 ml の培養液を遠心し、上清を除き、沈殿を冷えた (4°C) 750 μl の 50 mM Tris-HCl (pH 7.8)-30 μM DTT に懸濁した。液体窒素で瞬間凍結し、10°C に 10 分間放置して融解させた。15 μl の 15 mg/ml リゾチーム-50 mM ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) を加え、0°C に 30 分間放置

Fig. 2. Construction of the Plasmid for the Identification of Promoter

Construction of pRCMdr13 is shown as an example of the construction of pRCM and pLCM derivatives used for the identification of promoter.

Fig. 3. Derivatives of pKYM Used for the Identification of Promoters in the *ori-inc* Region

The structural gene of chloramphenicol acetyltransferase (CAT) was inserted at several positions of the *ori-inc* region of pKYM as indicated in the figure by the method shown in Fig. 2. The enzyme activity was measured and expressed as units/mg protein in the last column.

した後、再び液体窒素で瞬間凍結し、10°C に 10 分間放置して融解させた。遠心し、上清を CAT 活性の定量に用いた。

CAT 活性の定量は、Shaw による方法¹³⁾に従った。サンプル 50 μ l に最終濃度が 0.1 M Tris-HCl(pH 7.8)-400 μ g/ml DTNB-0.1 mM アセチル CoA-30 μ g/ml クロラムフェニコールとなるように加え、再蒸留水で全量

1 ml とした. これを 37°C で反応し, 黄色を呈するまでの時間を測定し, その間の 412 nm での吸光度の変化を測定した. CAT 活性の著しく高いものについては, 反応時間が 5 分程度になるようにサンプルを緩衝液で希釈して行った. 酵素活性の 1 ユニットは, 1 分間に 1 nmol のクロラムフェニコールをアセチル化する活性で, これは吸光度の増加量 0.0136/min に対応する.¹⁸⁾ また, 総蛋白質量は, Bradford の方法¹⁴⁾によって測定した.

ヒドロキシルアミンを用いた dl 13 のコピー数変異株の分離 pKYB312 由来の欠失変異体で pKYM のレプリコンを完全に持っている dl 13 (Fig. 1) の DNA 2 µg を 0.1 ml 中で 50 mM Tris-HCl(pH 6.0)-1 mM EDTA-0.7 M 塩酸ヒドロキシルアミン (pH 6.0) の存在下, 65°C で 0 時間, 2 時間, 4 時間反応した. サンプルを透析した後, *E. coli* WA802 *polA* 株¹⁹⁾を形質転換し, 野生型の dl 13 が増殖できない濃度のアンピシリン (1 mg/ml) の入った LB アガープレートで選択し, 高コピー変異体を分離した.

コピー数の測定 プラスミド pSC101¹⁰⁾ (Tc^r) を持つ, *E. coli* WA802 *polA* 株をコピー数を測定したいプラスミド (Ap^r) で形質転換し, Ap^r, Tc^r の二重形質転換体を得た. プラスミド pSC101 はコピー数がクロモゾム当たり約 5 であることが分かっているのので,¹⁰⁾ これを内部標準として目的のプラスミドのコピー数を測定した.

それぞれの二重形質転換体をアンピシリンとテトラサイクリン (武田薬品, 15 µg/ml) の入った 37°C の LB 液体培地中で 5×10^8 cells/ml まで培養し, 1.5 ml から DNA を抽出した. プラスミドを 1 ケ所で切断する制限酵素 (*Hin* dIII) で消化し, 0.2 µg 程度の DNA を 0.7% アガロース電気泳動を行った. デンシトメーター (ゲルマシ DCD-16) でそれぞれのバンドの DNA 濃度を測定し, プラスミド DNA の大きさを考慮に入れてコピー数を計算した.

In Vitro での P_L プロモーターからの RNA 転写反応 反応液 50 µl {50 mM Tris-HCl(pH 7.8)-5 mM MgCl₂-0.1 mM EDTA-0.1 mM DTT-25 µg/ml BSA-100 mM NaCl-0.3 mM ATP-0.3 mM CTP-0.3 mM GTP-0.06 mM UTP-3 µCi[α-³²P]UTP} を用い, 0.5 µg の鋳型 DNA と 7 units の RNA ポリメラーゼを加え, 37°C で 5 分間反応し, 最終濃度 1 µg/ml のリファンピシリンを加え, 更に 4 分間反応した. このサンプルをフェノール・クロロホルムで抽出し, エタノール沈殿を 2 回行い, 沈殿を 10 µl のホルムアミド色素液 [80% ホルムアミド-0.1% ブロムフェノールブルー (和光純薬工業)-0.1% キシレンシアノール (半井化学薬品)-10 mM EDTA に溶かし, 3 µl を 5% アクリルアミド-7 M 尿素ゲルで電気泳動し,¹⁷⁾ オートラジオグラフィで転写産物を検出した.¹⁷⁾

結 果

不和合性の発揮に必要な領域

pKYB312 と pKYB223 より BAL31 を用いて作製した種々の欠失変異体 dl, dr を用いて不和合性の発揮に必要な領域を検討した.

まず, Fig. 1 に示す塩基配列の左側から削った pKYB312 由来の dl 変異体を使って不和合性を発揮する領域の左端の決定を行った (Table II).

Fig. 1 に示す塩基配列番号の 416 番まで削れた dl 14 までは, pKYM-Cm^r と不和合性を示したが, 429 番まで削れた dl 15 は, Ap^rCm^r の二重形質転換体が Ap^r の形質転換体と同じ頻度で得られ, 一見不和合性を発揮していないように思われた. しかし, 20 世代培養したところ, pKYM-Cm^r だけが細胞から失なわれた. し

TABLE II. Incompatibility of dl Mutants

Plasmid		Frequency of plasmid (B) retained (Transformation) ^{a)}	Plasmid (B) retained after 20 generations ^{b)} (%)
Incoming (A)	Resident (B)		
pBR322	pKYM-Cm ^r	0.96	100
pKYB312	pKYM-Cm ^r	<10 ⁻³	— ^{c)}
dl 1 to dl 14	pKYM-Cm ^r	<10 ⁻³	—
dl 15	pKYM-Cm ^r	1.0	16
dl 16 to dl 20	pKYM-Cm ^r	1.0	100
dl 21 to dl 24	pKYM-Cm ^r	<10 ⁻³	—
pKYB213 (<i>Hind</i> II)	pKYM-Cm ^r	1.0	100

a) Incoming plasmid DNA (A) was introduced into *E. coli* HI1006 *recA* carrying pKYM-Cm^r as described in the text. b) When the transformants carry both plasmids their stability were examined as described by Yamaguchi *et al.*¹⁰⁾ c) Double transformant was not obtained.

TABLE III. Incompatibility of dr Mutants

Plasmid		Frequency of plasmid (B) retained (Transformation) ^{a)}	Plasmid (B) retained after 20 generations ^{b)} (%)
Incoming (A)	Resident (B)		
pBR322	pKYM-Cm ^r	0.96	100
pKYB213	pKYM-Cm ^r	<10 ⁻³	— ^{c)}
dr 1 to dr 8	pKYM-Cm ^r	<10 ⁻³	—
dr 9 to dr 20	pKYM-Cm ^r	1.0	100

a), b) and c) See legend of Table II.

たがって dl15 も不和合性を発揮していることが分かった。467 番まで削れた dl16 と 501 番まで削れた dl20 は、不和合性を発揮しなかった。したがって不和合性の発揮に必要な領域の左端は 417 番と 467 番の間にあることが分かった。しかし、更に欠失させて 510 番まで削れた dl21 と 521 番まで削れた dl24 は再び不和合性を発揮した。そして、569 番の *Hin* dII 部位まで削れた pKYB213 では再び不和合性を発揮しなくなった。

次に、Fig. 1 に示す塩基配列の右側から削った pKYB223 由来の dr 変異体を使って不和合性を発揮する領域の右端の決定を行った (Table III)。

Fig. 1 に示す塩基配列番号の 734 番まで削れた dr8 までは、pKYM-Cm^r と不和合性を示したが、646 番まで削れた dr9 は、不和合性を発揮しなかった。したがって不和合性の発揮に必要な領域の右端は、646 番と 733 番の間にあることが分かった。

不和合性の領域内に存在する転写プロモーター

734 番まで削れた dr8 (Fig. 1) が、不和合性を発揮し、dr8 から更に 88 塩基対削れた dr9 は、不和合性を発揮しなかった。この領域には、塩基配列上 682 番から 653 番に 5'TGGGCA...TATATT3' という左向きの転写プロモーター構造¹⁸⁾ (P_L プロモーター) が推察され (Fig. 1), このプロモーターを dr9 は欠失しているから、不和合性を発揮しないのではないかと考えられた。一方、506 番から 534 番に 5'TTGACA...CAGAAT3' という右向きの転写プロモーター構造¹⁸⁾ (P_R プロモーター) が推察され (Fig. 1), これは、*rep* 蛋白質の m-RNA を転写すると考えられる。これら 2 つの転写プロモーターからは、互いに逆向きで相補的な RNA が合成されると思われる。プラスミド R1 では、複製に必須な蛋白質 (*repA*) の m-RNA と、これとは逆向きの RNA (*copA*) の相互作用によって不和合性が発揮されていると考えられている。¹⁹⁾ pKYM でもこれら 2 つのプロモーターから転写される RNA が相互作用して、不和合性が発揮されている可能性が考えられる。そこで、塩基配列から推察されたプロモーター構造が、本当にプロモーターとして働いているかどうかを調べた。プロモーターの検出は、CAT 遺伝子を持つプロモーター検出ベクター pKK232-8¹¹⁾ (Fig. 2) に欠失変異体の調べたいプロモーターが CAT 遺伝子の前に来るように結合し、CAT 活性を測定することによって行った (Fig. 3)。

dl 欠失変異体由来の pLCM を用いた場合 CAT 活性が dl23 及び dl29 では認められ dl30 では認められなかった。したがって dl29 と dl30 の間にある塩基配列から推察された 682 番から 653 番の P_L プロモーターが *in vivo* でプロモーターとして働いていると思われる。また、dl20 と dl23 の間で転写が終結していると思われる。

一方、dr 欠失変異体由来の pRCM を用いた場合 CAT 活性が dr8, dr9, dr13 では認められ、dr15, dr17 では認められなかった。したがって dr13 と dr15 の間にある塩基配列から推察された 506 番から 543 番の P_R プロモーターが *in vivo* でプロモーターとして働いていると思われる。

不和合性を発揮する領域内の塩基配列の特徴

不和合性の発揮は、417 番から 733 番までの領域にある相補的な 2 つの RNA によると推論される。この RNA に転写される領域内には、ステム・ループ構造が存在する (Fig. 1)。プラスミド R1,¹⁹⁾ ColE1²⁰⁾ の不和合性の発揮や、大腸菌外膜遺伝子の発現調節は、²¹⁾ RNA-RNA 相互作用により行われるが、この相互作用には、ステム・ループ構造の存在が重要である。pKYM の不和合性の発揮にもこれらのステム・ループ構造が重要な働きを持っているか調べた。

TABLE IV. Incompatibility and Copy Number of Copy Mutants of pKYM

Plasmid		Frequency of plasmid (B) retained (Transformation) ^{a)}	Plasmid (B) retained after 10* or 20 generations ^{b)}	Copy number ^{d)}
Incoming (A)	Resident (B)			
pBR322	pKYM-Cm ^r	0.96	100	—
dl 13	pKYM-Cm ^r	<10 ⁻⁸	— ^{c)}	17
dl 13 cop 3	pKYM-Cm ^r	0.52	21*	50
pCM701	pKYM-Cm ^r	0.82	100	100

a), b) and c) See legend of Table II. d) The copy number of the plasmid listed in Incoming (A) was measured using plasmid pSC101 as an internal marker following the method described in the text.

dl 13 (Fig. 1) をヒドロキシルアミンで処理して得られた高コピー変異体 dl 13 cop 3 は、ステム・ループ構造内の 575 番の C/G が T/A に変化していた (Fig. 1). この dl 13 cop 3 は、コピー数が増加していたのみならず、不和合性も野性型の dl 13 より明らかに弱くなっていた (Fig. 4, Table IV).

次に、この研究で用いた dl, dr 欠失変異体の末端が、すべて *Bgl* II リンカーによって *Bgl* II 切断部分となっていることを利用して、dl 29 と dr 13 (Fig. 1) を結合し、ステム・ループ構造の欠失した誘導体 pCM701 を作製し、そのコピー数及び不和合性を調べた (Fig. 4, Table IV). この pCM701 は、コピー数は著しく増加し、pKYM との不和合性を失っていた。

In Vitro での P_L プロモーターからの RNA 合成

CAT 遺伝子を用いた解析により、不和合性領域内には、互いに逆向き of P_L, P_R プロモーターが存在することが分かった。 *In vitro* でのプロモーター活性を測定した結果、P_L プロモーターの存在は、 *in vitro* の系でも確認できた。

dl 16 及び dl 24 (Fig. 1) を *Bgl* II とベクターの pBR322 内の *Bam* HI で切断した DNA 断片 (Fig. 5) を鋳型として RNA 合成を行い、産物をアクリルアミド尿素電気泳動¹⁷⁾で確認した。

Fig. 5. DNA Fragments Used for the *in Vitro* Transcription

Fig. 4. Agarose Gel Electrophoresis of the Plasmid DNA Recovered from the Cells Carrying Copy Mutants

Plasmid DNAs were recovered from *E. coli* HI1006 *recA* and were electrophoresed in agarose gel as described in the text. All DNAs were digested with *Hind* III to make them linear. pSC101 DNA was used as an internal marker. Lane 1: DNA recovered from the cells carrying pCM701. Lane 2: DNA recovered from the cells carrying dl 13 which is a derivative of pKYM whose *inc-ori* structure is the same as pKYM (control). Lane 3: DNA recovered from the cells carrying dl 13 cop 3.

Fig. 6 に示すように dl 16 では約 180 塩基の、dl 24 では約 120 塩基の転写産物が認められた (Fig. 6, lane 2, 3). この RNA は, *rep* 蛋白質の m-RNA とは逆向きで, 682 番から 653 番の P_L プロモーターで開始されていることが推察された.

一方, P_R プロモーターを検出するために dr 9 を *Bgl* II とベクターの pBR322 の *Bam* HI で切断した DNA 断片 (Fig. 5) を鋳型として反応したが, 予想された約 110 塩基の P_R プロモーターからの転写産物は認められなかった (Fig. 6, lane 4).

考 察

本報告で我々は, プラスミド pKYM の不和合性を発揮する領域は, dl 15 から dr 8 の間の 304 塩基対であることを示し, この領域内に互いに逆向きのプロモーター (P_R , P_L) が存在することを *in vivo* で示した (Fig. 1). P_L プロモーターの活性は *in vitro* でも確認できたが, P_R プロモーターの活性を *in vitro* で検出することはできなかった (Fig. 6). P_R プロモーターが *in vitro* で確認できなかったにもかかわらず, *in vivo* の CAT の定量では P_L と同じ程度の活性が検出された (Fig. 3). この原因として次のことが考えられる. ① P_R による m-RNA 合成は少ないが安定性が高い. ② 翻訳効率が高い. ③ *In vitro* の系では欠けていた何らかの因子が P_R プロモーターからの転写に必要である. これらの可能性のうちどの機構によるかは, 今後の研究課題である.

また, この 2つのプロモーターの間には, ステム・ループ構造をとりうる塩基配列があり (Fig. 1), この構造を欠失したプラスミド (pCM701) や, *Hin* dII 切断部位を含んでいるステム・ループ構造のステムの部分に塩基置換の導入されたプラスミド (dl 13 cop 3) のコピー数が増加し, また不和合性がなくなったことから (Table IV), 不和合性の発揮は, P_R , P_L プロモーターから転写されるお互いに逆向きの RNA の, このステム・ループ構造を介しての相互作用によることが推察される. ステムに置換の入った dl 13 cop 3 のステム・ループ構造の安定性を Tinoco らの方法²²⁾で塩基対形成によるエネルギー減少量で計算してみると, 野生型は -25.4 kcal/mol dl

Fig. 6. Radioautogram of the *in Vitro* Transcripts

Autoradiogram of the transcripts prepared using the three fragments mentioned below after polyacrylamid-urea gel electrophoresis. The methods were described in the text. Lane 1 is the digest of pBR322 with *Hpa*II (size marker). Lane 2 is the transcript with dl 16 fragment as template. Lane 3 is that with dl 24 fragment. Lane 4 is that with dr 9 fragment.

Fig. 7. A Scheme of the Mechanism of Incompatibility and the Regulation of Copy Number of Plasmid pKYM

Two promoters are present in this *inc* region. P promoter initiates the synthesis of m-RNA of *rep* protein and P promoter initiates copRNA. These RNAs interact through the stem and loop structures present around *Hind*II site and regulate the synthesis of *rep* protein. *Rep* protein binds *ori* region and initiates the DNA replication, the competition of *ori* for *rep* protein regulates the copy number and exerts the incompatibility.

13 cop 3 は -16.2 kcal/mol となり, dl 13 cop 3 の方が明らかに不安定であった。

P_R プロモーターは, $pKYM$ の複製に必要な *rep* 遺伝子の転写を行い, *m*-RNA を合成すると考えられるが, この *m*-RNA と P_L プロモーターから合成された逆向きの RNA (cop RNA) が相互作用して, *rep* *m*-RNA の *m*-RNA としての活性を低下させることにより, *rep* 蛋白質の量を調節しプラスミドのコピー数を調節しているものと思われる。以上の結果をまとめたこのプラスミドのコピー数の調節モデルを Fig. 7 に示す。このように RNA-RNA 相互作用で蛋白合成を調節している例は, プラスミド R1 の *repA* や,⁶⁾ 大腸菌の外膜蛋白質 *ompF* の発現調節²¹⁾などで認められている。

Cop RNA の転写開始点は, だいたい 645 番 (Fig. 1) と考えられるので, この RNA 内には *rep* *m*-RNA の シャイン・ダルガルノ配列²³⁾ (689 番—694 番) は含まれず, プラスミド R1 の場合と同様である。RNA-RNA 相互作用によりできた 2 本鎖が, それ以後の転写を阻害するのか, あるいは翻訳を阻害するのかは分からないが, もし, 翻訳阻害だとするとリボゾーム結合部位が 2 本鎖になっていなくても阻害することになる。Fig. 3 に示すように, CAT 活性は, RNA-RNA 相互作用が起こり得る pRCM dr 8 では, 相互作用のない pRCM dr 9 に比べて約半分であり, これらの RNA が相互作用をしていることを示唆している。

不和合性の発揮には, P_R プロモーターより左側の 429 番までの領域も関係している (Table II)。この領域は, *ori* 領域でもある。cop RNA の転写は, この領域の手前で終結していると考えられるが (Fig. 3; pLCM dl 18), 塩基配列上には転写ターミネーターの構造²⁴⁾は見出せない。

ori 領域は, *rep* 蛋白質と結合すると考えられるが, この *ori* 領域内の dl 16, dl 17, dl 19 及び dl 20 は不和合性を示さず, P_R プロモーターを欠失した dl 21, dl 23 及び dl 24 は再び不和合性を発揮した (Table II)。したがって, *rep* 蛋白質の結合部位と考えられる *ori* 領域内の 430 番 (dl 15) と 468 番 (dl 16) の間に *rep* 蛋白質が結合すると細胞内の *rep* 蛋白質が減少し不和合性を示すが, *ori* 活性を失った 468 番 (dl 16) から 502 番 (dl 20) までの欠失変異体は, *rep* 蛋白質結合部位を欠失したが P_R プロモーターは残っているため, *rep* 蛋白質は正常に合成されると考えられる。したがって, 不和合性が発揮されなくなったと考えられる。512 番まで欠失した dl 21 で再び不和合性が発揮されるのは, *rep* 蛋白質結合部位を欠失すると共に P_R プロモーターも欠失し, *rep* 蛋白質が合成されなくなり, P_L プロモーターのみが残ったためと考えられる。右から削った dr 14 は, *ori* 領域があるにもかかわらず, 不和合性は示さない (Table III)。この理由は, dr 14 では P_L プロモーターがなく cop RNA の合成が起これないためと考えられる。

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) K. Yamaguchi, Y. Masamune, *Mol. Gen. Genet.*, **200**, 362 (1985).
- 2) R. Kelley, D. Bastia, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **82**, 2574 (1985).
- 3) B. C. Kline, J. Trawick, *Mol. Gen. Genet.*, **192**, 408 (1983).
- 4) A. L. Abeles, *J. Biol. Chem.*, **261**, 3548 (1986).
- 5) S. Molin, K. Nordström, *J. Bacteriol.*, **141**, 111 (1980).
- 6) S. Sugiura, S. Nakatani, Y. Mizukami, T. Hase, H. Hirokawa, Y. Masamune, *J. Biochem.*, **96**, 1193 (1984).
- 7) T. Hirose, S. Sugiura, H. Shibata, T. Hase, Y. Nakanishi, Y. Masamune, *Yakugaku Zasshi*, **108**, 886 (1988).
- 8) M. Higashi, M. Hata, K. Yamaguchi, Y. Masamune, *J. Gen. Appl. Microbiol.*, **32**, 433 (1986).
- 9) M. J. Casadaban, S. N. Cohen, *J. Mol. Biol.*, **138**, 179 (1980).
- 10) K. Yamaguchi, M. Yamaguchi, *Gene*, **29**, 211 (1984).
- 11) J. Brosius, *Gene*, **27**, 151 (1984).
- 12) C. Yanisch-Perron, J. Vieira, J. Messing, *Gene*, **33**, 103 (1985).
- 13) W. V. Shaw, "Methods in Enzymology," Vol. 43, ed. by J. H. Hash, Academic Press, 1975, pp. 737—755.
- 14) M. Bradford, *Anal. Biochem.*, **72**, 248 (1976).

-
- 15) T. Hase, Y. Masamune, *J. Biochem.*, **90**, 149 (1981).
 - 16) K. Hasunuma, M. Sekiguchi, *Mol. Gen. Genet.*, **154**, 225 (1977).
 - 17) M. D. Biggin, T. J. Gibson, C. F. Hong, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **80**, 3963 (1983).
 - 18) M. E. Mulligan, D. K. Hawley, R. Entriken, W. R. McClure, *Nucleic Acids Res.*, **12**, 789 (1984).
 - 19) M. Givskov, S. Molin, *Mol. Gen. Genet.*, **194**, 286 (1984).
 - 20) J. Tomizawa, T. Itoh, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **78**, 6096 (1981).
 - 21) T. Mizuno, M.-Y. Chou, M. Inoue, *Proc. Jpn. Acad.*, **59**, 335 (1983).
 - 22) I. Tinoco, Jr., P. N. Borer, B. Dengler, M. D. Levine, O. C. Uhlenbeck, D. M. Crothers, J. Gralla, *Nature (London)*, **246**, 40 (1973).
 - 23) J. Shine, L. Dalgarno, *Nature (London)*, **254**, 34 (1975).
 - 24) T. Platt, *Cell*, **24**, 10 (1981).
 - 25) F. Bolivar, R. L. Rodoriguez, P. J. Greene, M. C. Betlach, H. L. Heyneker, M. W. Boyer, J. H. Crosa, S. Falkow, *Gene*, **2**, 95 (1977).
 - 26) M. Demerec, E. A. Adelberg, A. J. Clark, P. E. Hartman, *Genetics*, **54**, 61 (1966).