

Agrobacterium と *Rhizobium* 間を移動する
巨大プラスミドと共生能発現

Intergeneric transfer of a symbiotic plasmid between *Agrobacterium* and *Rhizobium* and
expression of its symbiotic ability with leguminous plants

March 2008

中務 弘基

目次

概要	5
第 1 章：序論 1 共生窒素固定	
1-1 マメ科植物と根粒菌の共生	6
1-2 窒素固定遺伝子の制御	7
第 2 章：序論 2 遺伝情報の水平伝達	
2-1 transduction, transformation, and conjugation	9
2-2 Mobile genetic elements	10
2-3 共生遺伝子群の水平伝達	11
第 3 章： <i>Rhizobium</i> から <i>Agrobacterium</i> への pRt4Sa::Tn5- <i>mob</i> の接合伝達	
3-1 序	13
3-2 方法	15
3-2-1 菌株について	
3-2-2 Conjugation and plasmid profiles	
3-2-3 Southern hybridization	
3-2-5 クローバへの菌接種試験，及び窒素固定活性の測定	
3-3 結果	18
3-3-1 <i>Rhizobium</i> から <i>Agrobacterium</i> への pRt4Sa::Tn5- <i>mob</i> の移行	
3-3-2 <i>Agrobacterium</i> 接合伝達株における pRt4Sa::Tn5- <i>mob</i> の存在確認	
3-4 考察	19

第 4 章 : Afcs1 株における pRt4Sa::Tn5-*mob* の存在位置

4-1 序	21
4-2 方法	23
4-2-1 Pulsed-field gel electrophoresis (PFGE)	
4-2-2 Probe	
4-2-3 Afcs1 株のゲノムライブラリ作製とスクリーニング	
4-2-4 Sequencing	
4-3 結果	26
4-3-1 Afcs1 株における pRt4Sa::Tn5- <i>mob</i> の存在の確認	
4-3-2 Afcs1 株における pRt4Sa::Tn5- <i>mob</i> 組み込み位置の同定	
4-3-3 pRt4Sa::Tn5- <i>mob</i> と <i>int</i> gene 間の連結部位の塩基配列解析	
4-4 考察	29

第 5 章 : Afcs1 株から *Rhizobium* への

pRt4Sa::Tn5-*mob* の接合伝達

5-1 序	31
5-2 方法	32
5-2-1 Conjugation and plasmid profiles	
5-2-2 Southern hybridization	
5-2-3 クローバへの菌接種試験, 及び窒素固定活性の測定	
5-2-4 Pulsed-field gel electrophoresis (PFGE)	
5-3 結果	35
5-3-1 Afcs1 株と H1 株間における pRt4Sa::Tn5- <i>mob</i> の移行	
5-3-2 H1tr1 株における pRt4Sa::Tn5- <i>mob</i>	
5-4 考察	37

第 6 章：結論	39
謝辭	42
参考文献	43
Figure legends	55

概要

The symbiotic plasmid (pSym) of *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* 4S5, which carries Tn5-*mob*, was successfully transferred into *Agrobacterium tumefaciens* A136 by using a conjugation method. The resulting transconjugants induced the development of ineffective nitrogen-fixing nodules on the roots of white clover seedlings. Depending on the manner in which the pSym was retained, the transconjugants were divided into two groups of strains, Afp and Afcs. pSym was retained as a plasmid in the Afp strains but was integrated into *int* gene encoding phage-related integrase on the linear chromosome of *A. tumefaciens* A136 in strain Afcs1 (one of the Afcs strains) to form a symbiosis island. Conjugation was performed between strain Afcs1 and *R. leguminosarum* bv. *trifolii* H1 (a pSym-cured derivative of wild-type strain 4S), and the *Rhizobium* H1tr strains were screened as transconjugants. Eighteen of the H1tr strains induced effective nitrogen-fixing nodules on the roots of the host plants. pSym was transferred into all of the transconjugants, except for strain H1tr1, at the same size as pSym of strain 4S5. In strain H1tr1, pSym was integrated into the chromosome as a symbiosis island. These data suggest that pSym can exist among *Rhizobium* and *Agrobacterium* strains both as a plasmid and as a symbiosis island with transposon mediation.

第 1 章：序論 1

共生窒素固定

1-1 マメ科植物と根粒菌の共生

土壌微生物の一種である根粒菌は、マメ科植物の根に感染し根粒を形成する。根粒菌は根粒細胞内で、大気中の窒素分子をニトロゲナーゼによってアンモニアへ還元し植物へ供給する。一方で、植物は光合成産物を根粒菌に与える。

根粒菌が宿主植物の根に根粒を形成し、窒素固定を行うまでには、いくつかの段階がある。1) 根粒菌とマメ科植物間によるシグナル交換によって共生関係のパートナーであることを見分け、2) 根粒菌の根毛への付着、根毛細胞のカーリングが起きる。そして、3) 根毛細胞内を皮層細胞へ向かって伸長する感染糸を介して、根粒菌は植物細胞内へ進入していく。4) 感染糸が皮層細胞に到達すると、感染糸内の根粒菌は皮層細胞内へ放出され、根粒菌はバクテロイドと呼ばれる状態へと分化し、窒素固定を開始する。

根粒菌とマメ科植物の相互認識は、植物の根圏で恒常的に浸出されているフラボノイドと、根粒菌によって生成される Nod factor によって行われる。根粒菌で構成的に発現している NodD がフラボノイドと結合すると、Nod factor 合成酵素をコードする遺伝子、*nod*, *nol*, *noe genes* の上流にあるプロモーター部位に結合し、下流オペロンの転写を開始する。合成された Nod factor は、キチンオリゴマーを基本骨格とした lipo-chitooligosaccharides (LCOs; リポキトオリゴ糖) の一種で、菌種によって異なる修飾がなされている。その違いはマメ科植物と根粒菌間に存在する「宿主特異性」の要因の一つとなっていると考えられている。近年では、*Lotus japonicus* の *LjSYMRK*, *Medicago sativa* の *MtDmi2* など、Nod factor 認識に関係していると示唆される受容体型キナーゼの存在が報告され (Endre et al., 2002; Stracke et al., 2002), さらに根粒菌特異的に Nod factor 認識に関

わっていることが強く示唆されている受容体 (*NFR1*, *NFR5*) も報告されている (Madsen et al., 2003; Radutoiu et al., 2003)。マメ科植物は、根粒菌の Nod factor を感知すると、非常に早い段階で細胞膜の脱分極、細胞質のカルシウム濃度の周期的な変化 (Ca^{2+} スパイキング)、細胞骨格のアクチンの根毛先端部への蓄積を起こす。その後、2日〜4日の間に根毛はカーリングを起こし、感染糸形成が始まる。正常な感染糸形成には、感染糸通過中の根粒菌でも Nod factor の分泌が必要とされ (Schlaman et al., 1991)、根粒菌とマメ科植物の相互認識の初期段階以降でも何らかの役割を持つことが示唆されている。感染糸形成を促進する根粒菌側の因子は Nod factor の他、succinoglycan (exopolysaccharide I, EPSI) と galactoglucan (EPSII) が挙げられ、*exoH* 遺伝子変異株が異常な感染糸形成を引き起こす報告もある (Cheng et al., 1998)。一方、皮層細胞では細胞分裂が活性化し、根粒原基が形成される。また、宿主植物の根は、根粒菌の LCOs を感知して数時間後には、根粒原基を含む皮層細胞で初期ノジュリン遺伝子と称される *ENOD40* (Kouchi et al., 1993; Mergaert et al., 1993)、*ENOD12* (Scheres et al., 1990a)、*ENOD5* (Scheres et al., 1990b) などの遺伝子の発現が誘導される。

形成された感染糸を通して、根粒原基に達した根粒菌は、感染糸から放出される。この時、根粒菌は植物由来の peribacteroid membrane (ペリバクテロイド膜) に覆われた状態で、皮層細胞の細胞質中に放出され (Verma et al., 1996)、バクテロイドへと分化する。ペリバクテロイド膜内はヘモグロビンによって酸素分圧が低く抑えられ、バクテロイドが窒素固定を行うのに最も適した環境となっている。

1-2 窒素固定遺伝子の制御

宿主マメ科植物の根粒内でバクテロイドに分化した根粒菌は、非共生状態と生理活性を劇的に変化させ、主に窒素固定に関連する遺伝子の発現が上昇する

(Uchiumi et al., 2004)。この中には窒素固定反応を触媒するニトロゲナーゼ複合体をコードする *nifHDK* 遺伝子群、酸素分圧を感知し、根粒中での呼吸の電子伝達系に関連する遺伝子発現を制御する *fix* 遺伝子群が含まれる。

nifHDK によってコードされる nitrogenase 複合体は *nifH* にコードされる dinitrogenase reductase と、*nifD* と *nifK* にコードされる dinitrogenase からなる。dinitrogenase reductase は活性中心にヘムを保持したホモ二量体で、dinitrogenase に電子を供給する。dinitrogenase は $\alpha_2\beta_2$ のヘテロ四量体で、dinitrogenase reductase から電子を受け取り、窒素のアンモニアへの還元反応を触媒する。

nitrogenase 複合体は酸素に高い感受性を持ち、酸素によって容易に失活する。根粒内部では、植物の産生するヘモグロビンによって低酸素分圧環境が維持されており、根粒菌は、細胞内外の酸素分圧とアンモニウムレベルをモニターすることで、窒素固定関連遺伝子の転写制御を行っている。FixLJ-FixK カスケードは窒素固定細菌すべての機構で共通して保持されており、この制御系の最下流には *fixHOQP* (cytochrome terminal oxidase) など、微好気性環境下で活動するために必要な遺伝子群がある (David et al., 1988)。FixL はヘムを持つセンサーキナーゼで、酸素分子を捕らえるとリン酸化され、下流の FixJ をリン酸化する。FixJ はリン酸化されると、DNA 結合ドメインが露出し、*fixHOQP* の転写を促進する (Tuckerman et al., 2001)。さらに、*Sinorhizoibum meliloti* の場合は、FixJ は NifA の正の転写活性も制御しており、NifA は sigma factor σ^{54} と共に、*nifHDKE* などの転写活性を促進する (Dixon et al., 2004)。

第 2 章: 序論 2

遺伝情報の水平伝達

2-1 Transduction, transformation, and conjugation

バクテリアは、酵素やある種のタンパク質の遺伝子を含み、細胞内外を転移可能な mobile gene elements (MGEs) によって新たな表現型を獲得してきた。細胞外における MGEs の転移は horizontal gene transfer (HGT) と呼ばれ、transformation, conjugation, transduction の三種に大別できる (Fig. 1)。transduction とはバクテリオファージを介した遺伝情報の伝達をさし、水平伝達の範囲はバクテリオファージの宿主特異性に依存する。transformation は死んだ細菌などの DNA 鎖の取り込みを指し、40 種ほどの菌種において確認されている (Lorenz et al., 1994)。transformation 可能な状態は competence と呼ばれ、関連する遺伝子群は quorum sensing や nutritional signal 等によって厳密に制御されている (Claverys et al., 2002; Hamoen et al., 2003; MacFadyen et al., 2001)。DNA の輸送システムには、type IV pili (T4P) と Type II secretion systems (T2SSs) を構成するタンパク質が関係していることが示唆されていた (Graupner et al., 2000; Sparling, 1966; Stone et al., 1999)。しかし、T4P の線毛や線毛タンパク質 (pilin) と DNA 間の相互作用を示すデータは得られておらず (Long et al., 2003; Mathis et al., 1984; Rudel et al., 1995), モデルとして pseudopilus (Ψ -pilus) が提唱されている (Chen et al., 2003a)。conjugation は細胞間の直接的な遺伝情報の伝達を指し、ほぼ全てのバクテリアといくつかの古細菌で確認されている (Frost et al., 2005)。conjugation 関連遺伝子を保持する conjugative element は relaxase とその補助因子によって *oriT* (origin-of-transfer) より rolling-circle replication (RCR) 機構によって ssDNA を生成する。その後、ssDNA と relaxase は細胞膜結合性タンパク質である VirD4 へと渡され、type IV secretion system (T4SS) の pilus を介して受容株へと輸送される。

2-2 Mobile genetic elements

バクテリアゲノムには、水平伝達可能なプラスミド、主染色体に保持されている遺伝要素 (genome island) が数多く存在する。これらは抗生物質耐性、代謝酵素等の遺伝情報を含み、HGTによって受容株 (recipient) へ新たな表現型を付与する。このような、ゲノム内または菌体外を移動することが可能な DNA の領域は mobile genetic elements (MGEs) と呼ばれる。MGEs にはゲノム内を転移する transposon, insertion sequence, mobile gene cassette や、菌体外へと伝達される conjugative elements [conjugative plasmids, conjugative transposon (CTn)] に分類される。“conjugative transposon”とは、tetracycline 耐性を付与する Tn916 (Franke et al., 1981) や、tetracycline 耐性と erythromycin 耐性を付与するグラム陰性菌 *Bacteroides* 種の CTnDOT (Bedzyk et al., 1992) が、transposon の様に宿主染色体の様々な位置への組込みが確認された経緯から名付けられた。しかし、実際は CTn の組み込みターゲットは tRNA や、A+T-rich 領域など多岐にわたるものの (Burrus et al., 2004)、いずれもインテグラーゼによる組込みであり (Burrus et al., 2002)、DDE モチーフを保持した transposase によるトランスポゾンの組込み機構とは全く異なるものであった。CTn のもたらす表現型は、抗生物質耐性だけでなく sucrose 代謝系を付与するものも発見されている (Hochhut et al., 1997)。これらは全て自己伝達可能で、インテグラーゼによって宿主染色体へ組み込まれ、宿主へ新たな表現型を付与する遺伝因子であり、組込みターゲットの部位特異性を除けば、*clc* (chlorocatechol 分解能) (Ravatn et al., 1998) や *bph-sal* (biphenyl and salicylate 分解能) (Nishi et al., 2000)、symbiosis island (Sullivan et al., 2002) 等と同様の挙動を示す。現在、これらは integrative and conjugative elements (ICEs) と分類され、*Mesorhizobium loti* R7A の共生アイランドは ICEMISym^{R7A} と名付けられている (Burrus et al., 2002)。

2-3 共生遺伝子群の水平伝達

根粒菌の共生関連遺伝子群の存在様式は属によって異なっている。*Rhizobium* 属, *Sinorhizobium* 属はプラスミド上に共生関連遺伝子群を保持し (共生プラスミド, symbiotic plasmid; pSym), *Mesorhizobium* 属と *Bradyrhizobium* 属は主染色体上に巨大なクラスターとして保持している (共生アイランド, symbiosis island)。これらのサイズは, pSym では *Sinorhizobium meliloti* 1021 pSymA の約 1.3 Mb (Galibert et al., 2001) から, *Rhizobium etli* CFN42 p42d の約 370 kb (González et al., 2006), 共生アイランドでは *Bradyrhizobium japonicum* USDA110 の約 600 kb からと *Mesorhizobium loti* R7A の約 500 kb と, ICEs に属するものとしても非常に大きい。

これらの pSym, 及び共生アイランドには水平伝達可能なものが存在する。pSym では, pSym と自己伝達能を保持するプラスミド間の部位特異的組換えによって生じた fusion replicon が, 自己伝達可能なプラスミドとして水平伝達される例も報告されている (Brom et al., 2004)。また, Kinkle ら (1991) は土壌中で *Sinorhizobium fredii* USDA201 の pSym である pJB5JI が *Rhizobium leguminosarum* 6015 へ移行することを確認しており, *R. leguminosarum* bv. *trifolii* ICMP2163 の pSym も自己伝達能を保持していることが明らかとなっている (Rao et al., 1994)。また, 共生アイランドでは, tRNA をターゲットとした部位特異的組換えによって, 主染色体内へと組み込まれたものであると考えられており (Kaneko et al., 2000; Kaneko et al., 2002), *M. loti* R7A の共生アイランド ICEMISym^{R7A} では, T4SS や relaxase, conjugation に必要な coupling protein の存在も示され (Sullivan et al., 2002), 水平伝達能や主染色体からの切り出しが菌体密度依存性であることも確認されている (Ramsay et al., 2006)。

これまで, *Methylobacterium* 属 (Sy et al., 2001), *Devosia* 属 (Rivas et al., 2002), β -proteobacteria に属する菌 (Chen et al., 2001; Moulin et al., 2001) など, 根粒菌に

属さない菌種からも窒素固定関連遺伝子の保持が確認されている。また、近年、pSym と Ti/Ri プラスミドをともに保持し、*Phaseolus vulgaris* へわずかながら窒素固定活性を示す根粒を形成し、根粒菌と遺伝系統的に近縁な *Agrobacterium rhizogenes* へ分類される菌株も発見されている (Velázquez et al., 2005)。しかし、これら共生菌株が、自然環境下で共生窒素固定関連遺伝子をどのような機構で獲得し、ゲノムに保持しているのかは不明である。実験室レベルでも、*Agrobacterium* に共生窒素固定関連遺伝子群を人為的に導入し、共生能を獲得させる試みも数多くなされてきた (Abe et al., 1998; Hooykaas et al., 1982; Hooykaas et al., 1981; Mavingui et al., 1998)。しかし、いずれもその遺伝子群の宿主に対し窒素固定活性を示す根粒を着生した報告はほとんどない (Martínez et al., 1987)。根粒菌に分類される菌種の共生窒素固定能獲得についての研究は、植物と微生物の相互作用の進化や、共生窒素固定細菌の多様性などの点から非常に重要であるが、未だ不明な点が多く残されている。

第3章： *Rhizobium* から *Agrobacterium* への

pRt4Sa::Tn5-mob の接合伝達

3-1 序

根粒菌がマメ科植物と共生窒素固定を行うために必要な遺伝子群は、クラスターを形成している。各クラスターはある領域内にまとまって存在しており、プラスミド上に存在する場合を共生プラスミド (Symbiotic plasmid; pSym), また主染色体上に存在している場合, その領域は共生アイランド (Symbiosis island) と呼ばれる。*Rhizobium* 属, *Sinorhizobium* 属は pSym として, *Mesorhizobium* 属, *Bradyrhizobium* 属, *Azorhizobium* 属は共生アイランドとして共生関連遺伝子群を保持している。

pSym, 共生アイランド, 双方とも水平伝達されることが明らかとなっている。Kinkle ら (1991) は土壌中で *Sinorhizobium fredii* USDA201 の pSym である pJB5JI が *Rhizobium leguminosarum* 6015 へ移行することを確認しており, また, *R. leguminosarum* bv. *trifolii* ICMP2163 の pSym は自己伝達能を保持していることが明らかとなっている (Rao et al., 1994)。*R. etli* CFN42 の pSym である p42d は, 自己伝達能を保持しているプラスミド p42a と部位特異的組換えによって cointegrate 構造を形成し, 自己伝達可能なプラスミドとして水平伝達されることが明らかとなっている (Brom et al., 2004)。

マメ科植物の根粒より単離され, 根粒形成能, または共生窒素固定能を保持している菌種が, 既知の根粒菌には属さないという報告は, 根粒形成能や窒素固定関連遺伝子の水平伝達を裏付けるものである。Sy ら (2001) は *Crotalaria* の根粒より *Methylobacterium* 属の菌を単離し, *Methylobacterium nodulans* と名付けた。メタノール脱水素酵素をコードする *mxoF* と, Nod ファクター生合成に関与する acyltransferase をコードする *nodA* を保持していた。*M. nodulans* ORS2060 の

NodA は、分子系統的には *Bradyrhizobium* の NodA と近く、*Crotalaria podocarpa* と *C. perrottetii* の根に窒素固定可能な無限型根粒を形成する。また、熱帯多雨地方の水性マメ科植物である *Neptunia natans* の根粒から単離された *Devosia riboflavina* が、*Rhizobium tropici* と近縁な *nod* 遺伝子群と *nif* 遺伝子群をプラスミド上に保持していることが報告されている (Rivas et al., 2002)。*nod* と *nif* 遺伝子は、根粒形成可能な β -proteobacteria も保持していることが報告されている (Chen et al., 2001; Moulin et al., 2001)。Chen ら(2003b)は *Mimosa* から単離した *Ralstonia taiwanensis* の二種菌株について、 α -proteobacteria の *nod* 遺伝子と、 β -proteobacteria 由来の *nifH* 遺伝子の両方を保持している菌を発見している。これは、 β -proteobacteria に属する窒素固定細菌に、*nod* 遺伝子群が水平伝達され、共生能を獲得したことを示唆している。しかし、これらの根粒菌に属さない共生菌株が、共生関連遺伝子をどのような機構で獲得し、ゲノムに保持しているのかを解析した報告はない。

本章では、非共生菌種の共生能獲得について調査するため、クローバ根粒菌の共生プラスミド(pRt4Sa)を Tn5-*mob* の挿入により可動化させた株 *R. l. bv. trifolii* 4S5 を用い、病原性プラスミド pTi を消去した *A. tumefaciens* A136 へ移行させた。得られた *Agrobacterium* 接合伝達株における pRt4Sa::Tn5-*mob* の移行と、ホワイトクローバとの共生能について調査し、報告する。

3-2 方法

3-2-1 菌株について

本研究に用いた菌株，及びプラスミドは Table 1 に示した。

R. l. bv. trifolii 4S はクローバ根粒菌野生株である (Higashi et al., 1980)。*Escherichia coli* MM294 (pRK2013) (Figurski et al., 1979) は *tra* 遺伝子を含む pRK2013 を保持しており，triparental mating において helper として用いた株である。*E. coli* VCS257 (pC4S8) は 4S 株の保持する *nod* 領域の一部 (ca. 17.7-kb) をクローニングした株 (Abe et al., 1998) であり，Southern hybridization のプローブ作製に用いた。*R. l. bv. trifolii* 4S5 は *E. coli* S17-1 を donor とした biparental mating により Tn5-*mob* を挿入することで，4S 株の共生プラスミド pRt4Sa を可動化した株である (Abe et al., 1998)。*R. l. bv. trifolii* H1 は 4S 株より pRt4Sa を消去した株である (Higashi et al., 1983)。*Agrobacterium tumefaciens* A136 は *A. tumefaciens* C58 より病原性プラスミド pTi を消去した株である (Watson et al., 1975)。

R. l. bv. trifolii は YM 培地 (Keele et al., 1969) を用い，28°C で培養した。*Agrobacterium* と *E. coli* は LB 培地を用い，それぞれ 28°C と 37°C で培養した。実験操作に用いる菌株は，適切な抗生物質を加えた TY 液体培地 (Beringer, 1974) で振盪培養したものを使用した。抗生物質は，以下の終濃度になるよう添加した。nalidixic acid は 25 µg/ml，kanamycin は 50 µg/ml，rifampicin は 50 µg/ml，tetracycline は 10 µg/ml。pCR2.1 を用いたクローンの選抜には carbenicillin 100 mg/ml，又は kanamycin 50 mg/ml を添加した培地を使用した。

3-2-2 Conjugation and plasmid profiles

Figure 2 にスキームを示した。4S5 株を donor，A136 株を recipient，MM294 (pRK2013) 株を helper として用いた。それぞれに，適切な抗生物質を添加した TY 液体培地で，一夜振盪培養したものを滅菌水で洗浄し，培地と等量の滅菌水

に懸濁した。各菌液を helper 100 μ l, donor 200 μ l, recipient 200 μ l (helper : donor : recipient = 1 : 2 : 2) の割合で混和した。この菌液を遠心集菌し、上清を取り除き、200 μ l の滅菌水に再懸濁した。そのうち 50 μ l を、抗生物質を添加していない TY 培地上に乗せた、滅菌済みの孔径 0.45 μ m のフィルター (Millipore, Bedford, MA) 上に移し、16 h, 28°C で一夜培養した。フィルター上で増殖した菌体を 1 ml の滅菌水に懸濁し、遠心集菌の後、適切な抗生物質を添加した 5ml の LB 液体培地で、5 日間振盪培養した。培養した菌液は滅菌水で洗浄後、 10^6 – 10^7 cell/ ml の菌体濃度へ希釈し、ホワイトクローバの芽生えに接種した。5 週間後、内海らの方法 (Uchiumi et al., 1995) を用いて、形成された根粒より菌株を単離し、抗生物質を添加した LB 培地に塗り広げた。得られた *Agrobacterium* 接合伝達株は、阿部らの報告で示された方法に従って (Abe et al., 1998), random amplified polymorphic DNA genotyping (RAPD) にて *Agrobacterium* であることを確認した。得られた菌株は Af 株と名付けた。pRt4Sa::Tn5-*mob* の接合伝達効率は rifampicin, kanamycin を選択マーカーとして選抜した *Agrobacterium* 接合伝達株数を、フィルター上の供与株数で除して算出した。

得られた *Agrobacterium* 接合伝達株における、プラスミドの移行は、Casse ら (1979) によるプラスミド抽出方法を用い、アガロースゲル電気泳動 (0.7% agarose, 100V, 90min) によって検出した。

3-2-3 Southern hybridization

プローブは *R. l. bv. trifolii* 4S の *nodBADF* 領域を、pC4S8 (Abe et al., 1998) を鋳型とした polimerase chain reaction (PCR) で増幅して用いた。プライマーは 4S_nodF; 5'-TCAACGATACAATCGACTCCG-3' と 4S_nodR; 5'-TACGATTCTCAA GCGCCGCTC-3' を用いた。プローブは Megaprime DNA Labelling System (GE Healthcare UK Ltd., Buckinghamshire, U.K.) を使用し、 $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]$ dCTP を用いてラベ

ルした。ハイブリダイゼーションは 5 × SSC (1 × SSC is 0.15M NaCl and 0.015M sodium citrate), 10 × Denhardt's solution (0.1% Ficoll, 0.1% PVP, 0.1% BSA), 0.2% BSA, 50% formamide, 0.5% SDS, 50 µg/ml salmon sperm DNA を用い, 45°C, overnight の条件で行った。ハイブリダイゼーション後のフィルターは 0.1 × SSC, 0.1% SDS を使用し, 65°C で洗浄した。

3-2-5 クローバへの菌接種試験, 及び窒素固定活性の測定

根粒着生, 及び窒素固定活性測定のための宿主植物として, ホワイトクローバ (*Trifolium repens* L. cv. *Ladino*) を使用した。種子は表面殺菌のため 0.5% NaClO と 0.1% Tween 20 で 30 min 振盪し, 滅菌水で洗浄したものを使用した。0.7% agar plate 上に播種し, 暗所で 24 h, 24°C でインキュベートした。0.7% agar を含む Fåhraeus 培地 (Fåhraeus, 1957) 上に植え, 10^7 ~ 10^8 cell/ml の濃度の菌液をホワイトクローバの根に接種後, 24°C, 明期 14 h の条件下で培養した。接種用の菌体懸濁液は TY 液体培地で対数増殖期後期まで培養し, S.D.W.で洗浄したものをを用いた。

窒素固定活性はアセチレン還元活性 (Hardy et al., 1968) を Gas chromatography GC-3BF (Shimadzu, Kyoto, Japan) で測定した。カラムは Porapak N, カラムサイズ; 3 mm × 100 cm を用い, effluent gas は N₂, 50 ml/min, 検出温度; 60°C の条件で分析し, 検出器は FID を用いた。

3-3 結果

3-3-1 *Rhizobium* から *Agrobacterium* への pRt4Sa::Tn5-mob の移行

pRt4Sa::Tn5-mob を *Agrobacterium* へ移行させるため、4S5 株を donor, A136 株を recipient, MM296 (pRK2013) 株を helper とし, triparental mating を行った (Fig. 2)。得られた *Agrobacterium* 接合伝達株は Af 株と名付けた。Af 株は 4S5 株が耐性を持つ nalidixic acid を添加した YM 培地上で増殖できず、ホワイトクローバの根に白色の無効根粒を形成した。なお, Triparental mating による, pRt4Sa::Tn5-mob の水平伝達効率は 1.56×10^{-7} /recipient cell であった。

3-3-2 *Agrobacterium* 接合伝達株における pRt4Sa::Tn5-mob の存在確認

Af 株よりランダムに菌株を選択し, pRt4Sa::Tn5-mob の移行を確認した。pRt4Sa::Tn5-mob と同サイズのプラスミドが検出された株と, 検出されない株が存在していることが明らかとなった (Fig. 3A)。前者を Afp 株, 後者を Afcs 株とした。以下の実験では, 各グループの代表として, Afp1 株と Afcs1 株を使用した。*R. leguminosarum* bv. *trifolii* 4S の *nodBADF* をプローブとした Southern hybridization を行ったところ, Afp1 株は pRt4Sa::Tn5-mob と total DNA 断片にハイブリダイズしたが, Afcs1 株においては total DNA 断片にのみハイブリダイズしていた (Fig. 3B)。

3-4 考察

本研究では、pRt4Sa を Tn5-mob により可動化させた *R. l. bv. trifolii* 4S5 を donor として用いた triparental mating によって、*Agrobacterium* へ pRt4Sa::Tn5-mob を移行させた。得られた *Agrobacterium* 接合伝達株 Af は、ホワイトクローバに無効根粒を形成した (Fig. 2 C to E)。これまでも *A. tumefaciens* に共生遺伝子群を移行させた報告があるが、共生窒素固定能は確認されていない (Abe et al., 1998; Martínez et al., 1987)。しかし、Martínez ら (1987) の報告によると、*Rhizobium tropici* CFN299 株の共生プラスミドを保持する *Agrobacterium* 接合伝達株が、温度依存的に *Phaseolus vulgaris* に有効根粒を形成している。また、*R. tropici* CFN299 株の共生プラスミドを保持する *Sinorhizobium meliloti* を *P. vulgaris* に接種した場合、窒素固定を行わない根粒が形成された (Noel et al., 1984)。*Agrobacterium* は窒素固定関連遺伝子の転写因子である σ^{54} を保持している。クローバにおける共生窒素固定能の発現には、pRt4Sa::Tn5-mob のみではなく、他の二本のプラスミド、また主染色体上に存在する遺伝的要因が重要であることが示唆される。

Mating 後の mixture をホワイトクローバに接種し、形成された根粒より単離した Af 株には、移行させた pRt4Sa::Tn5-mob がプラスミドとして検出できた株 (Afp 株) と、検出されない株 (Afcs 株) が存在していた (Fig. 3 A と B)。Afcs1 株においては、Afp1 株同様、ホワイトクローバの根に無効根粒を形成したが (Fig. 3 D)、4S 株の *nodBADF* は total DNA 断片にのみハイブリダイズした (Fig. 3 B)。これらの結果より、Afcs1 株では、移行させた pRt4Sa::Tn5-mob は主染色体内に組み込まれた可能性がある。また、Afp1 株の Southern hybridization (Fig. 3 B) では、プラスミドのみならず total DNA 断片にも *nodBADF* の存在が検出された。これは、total DNA 断片と同サイズにまで切断された pRt4Sa::Tn5-mob が、この画分に含まれているためである。しかし、プラスミド状態の pRt4Sa::Tn5-mob が、培養中に主染色体へ組み込まれるという状態をとっていることも考えられ、詳

細な調査が必要である。

なお、*R. leguminosarum* bv. *trifolii* 4S5 と *A. tumefaciens* A136 を接合し、Rifampicin, Kanamycin 耐性を選択マーカーとして *Agrobacterium* 接合伝達株を 36 株無作為について、pRt4Sa::Tn5-*mob* の存在様態を検討したが、いずれもプラスミドとして存在しており、Afcs1 株のように、染色体に組み込まれたことが予想される菌株を見いだすことはできなかった。このことから、pRt4Sa::Tn5-*mob* の主染色体への組み込み頻度が低いことが予想される。

第 4 章：Afcs1 株における pRt4Sa::Tn5-mob の存在位置

4-1 序

原核生物のゲノムには、水平伝達可能で、且つ主染色体に保持されている遺伝要素が数多く存在する。溶原化した状態の lambda phage DNA, tetracycline 耐性を付加するグラム陽性菌 *Enterococcus faecalis* の Tn916 (Franke et al., 1981) や、tetracycline 耐性と erythromycin 耐性を付与するグラム陰性菌 *Bacteroides* 種の CTnDOT, さらに、腸内細菌 *Salmonella senftenberg* で発見された sucrose 代謝系を付与する CTnscr94 (Hochhut et al., 1997) などが挙げられる。これらは、いずれもファージ様インテグラーゼによってバクテリアの染色体へと組み込まれ、接合伝達の際には主染色体より切り出され、水平伝達される。近年、Burrus (2002) らにより、これらの因子を integrative and conjugative elements (ICEs) と分類することが提唱された。ICEs の定義としては、i) 宿主の染色体より部位特異的組換えによって切り出され、一時的に環状構造をとり、ii) 接合によって水平伝達され、iii) 調節因子 (tetracycline 耐性や sucrose 代謝系など) を授与株に付与することである。

根粒菌の共生関連遺伝子群はプラスミド、または主染色体上にクラスターを形成している。*Mesorhizobium* 属と *Bradyrhizobium* 属では、主染色体上に巨大なクラスターを形成し、共生アイランド (symbiosis island) と呼ばれている。これらはいずれの場合も、phenylalanine tRNA をターゲットとした部位特異的組換えによって、主染色体内へと組み込まれたものであると考えられている (Kaneko et al., 2000; Kaneko et al., 2002)。また、*M. loti* R7A の共生アイランドは自然環境下における伝達が確認され (Sullivan et al., 1998), P4-family integrase をコードする *intS* が切り出しと組込みに関わっており、菌体密度依存的に制御されていることが報告されている (Ramsay et al., 2006)。

tRNA 遺伝子をターゲットとした DNA フラグメントの組み込みと切り出しについては、溶原性ファージでよく研究されている。*R. l. bv. trifolii* 4S を宿主とする溶原性ファージ ϕ U の溶原化では、tRNA 遺伝子とファージゲノムのインテグラーゼ遺伝子が、部位特異的組換えに関わる (Uchiumi et al., 1998; Uchiumi et al., 1995)。ファージ ϕ U の attachment site (*attP*) と 4S 株の *nod* 遺伝子を導入したプラスミド pCINod1 を構築し、H1 株 (4S 株の共生プラスミド消去株) へ移行させると、ファージ ϕ U DNA が宿主である 4S 株に組み込まれる時と同様の様式で、H1 株の主染色体内へ組み込まれた。プラスミドの組み込まれた菌株は、根粒形成能を回復し、tRNA 遺伝子とインテグラーゼが共生アイランドの組み込みに関係していることが示唆された。

本章では、根粒形成能を示すにもかかわらず、pRt4Sa::Tn5-*mob* がプラスミドとして検出されなかった *Agrobacterium* 接合伝達株 Afcs1 株における、pRt4Sa::Tn5-*mob* の組み込み位置について、詳細に解析したので報告する。

4-2 方法

4-2-1 Pulsed-field gel electrophoresis (PFGE)

プラグの作製は Rice ら (1999) の方法を一部改変して行った。TY 液体培地で対数増殖期後期まで培養した菌液 50 μ l を取り, 30 sec ボイルした後, 氷水で急冷した。滅菌水で洗浄後, 集菌し, 上清を捨て, 100 μ l EET buffer [100 mM EDTA, 10 mM EGTA in 10 mM Tris-HCl (pH8.0)] に懸濁した。菌体は EET buffer に懸濁した。菌懸濁液と等量の 65°C, 1.6% Chromosomal Grade Agarose (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA) を混和し, plug-molds (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA) に流し込んで完全に固化させた。agarose plug は, 1 ml EET-LS buffer (1ml of EET buffer containing 200 μ g/ml lysozyme and 0.05% N-lauroylsarcosine sodium salt) を含む, 滅菌 50 ml 遠心チューブで 37°C, 3 h インキュベートした。バッファーを捨てた後, 1 ml EET-SP buffer [1 ml of EET buffer containing 1 mg/ml proteinase K and 1.0% (w/v) sodium lauryl sarcosine] を加え, 50 °C で一夜インキュベートした。次に, バッファーを捨て, 40 ml TE buffer (pH8.0) にて 30 min 静置する操作を 4 回繰り返すことで, agarose plug を洗浄した。agarose plug は, 滅菌した 4 °C TE buffer 中で保存した。制限酵素処理する際, 各 agarose plug は適当なサイズに切ったものを使用し, 前処理として 500 μ l の適切な制限酵素バッファー中で 20 min, 室温でインキュベートした。制限酵素は 50 U 使用し, *PacI* は 37 °C, *SwaI* は 25 °C で over night インキュベートした。

PFGE は CHEF Mapper electrophoresis system (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA) を用いて行った。泳動条件は 1% Chromosomal Grade Agarose (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA), 12°C の 0.5 \times TBE buffer で行い, 電圧 6V/cm, 20 h, 20-120 sec, pulse time とした。サイズマーカーは *Saccharomyces cerevisiae* standard (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, U.S.A.) を用いた。

DNA フラグメントは 0.5 µg/ml ethidiumbromide で 30 min 染色し, 260 nm の波長の紫外線で検出した。

4-2-2 Probe

サザンハイブリダイゼーションのプローブは polymerase chain reaction (PCR) によって得た。PCR 産物は pCR2.1 (Invitrogen, Carlsbad, CA, U.S.A.) にクローニングした。*Agrobacterium* 主染色体の tRNA を含む領域の増幅 (b, c, f, j と名付けた) は, *A. tumefaciens* A136 の total DNA を鋳型とし, 以下のプライマーを用いて増幅した。probe b ; 5'-CCCGCTATCATGCAGCATTT-3' と 5'-GATCGTCTCGCCCTATCATA-3', probe c ; 5'-GGTTTGCACAGCGTATGTA-3' と 5'-GCTCGATCGACTTCTTCGTT-3', probe f ; 5'-TGTCGCCCCGCATTTTTCAA-3' と 5'-GGAAGCACAGCAATGTGTGA-3', probe j ; 5'-CTGAAGGCGCTTCTGGA AAA-3' と 5'-GCTTGGCAACGCAGGAAAAA-3'。 *A. tumefaciens* A136 の linear chromosome の *Sna*BI, または *Xba*I フラグメントの一部 (S5, X15, X16-17, S5-2) は以下のプライマーを用いた。probe S5 ; 5'-CGAGCTAGTGAAGCTCTTCA-3' と 5'-GACAAGGCCAAGGCTAGATT-3', probe X15 ; 5'-GCTTTGATCGAGGGTCTGA A-3' と 5'-CTGCTTGCCTGCACGATTTT-3', probe X16-17 ; 5'-GGCATCTGCACGA TGGAATA-3' と 5'-GATCAGTTCGGCCCATTTCT-3', probe S5-2 ; 5'-GTCGCATCT CGTCTCATACA-3' と 5'-GGCATAACGTCCAAAACGGTT-3'。

4-2-3 Afcs1 株のゲノムライブラリ作製とスクリーニング

Agrobacterium 接合伝達株 Afcs1 のゲノムライブラリ構築には Lambda FIX[®] II/*Xho*I partial fill-in vector kit と Gigapack[®] III Gold-4 Packaging extract (Stratagene, La Jolla, CA, U.S.A.) を用いた。pRt4Sa::Tn5-*mob* と *Agrobacterium* linear

chromosome の連結部位を含むファージクローンは、S5-2 フラグメントをプローブとした two-step plaque hybridization によって選抜した。Afcs1 ゲノムライブラリを LB 培地にインディケーターと共に重層し、37°C で一夜培養した。生じたプラークをナイロンメンブレン (Immobilon-Ny+; Millipore, Billerica, MA, U.S.A.) に転写し、Southern hybridization に用いた。2 回目のスクリーニングは、1 回目のプラークをシングルプラークが得られるように重層し、初回と同様の条件でスクリーニングした。

選抜したファージクローンは pRt4Sa::Tn5-*mob* の両側の連結部位を含むクローンが含まれているため、universal oligonucleotide primer (T3 または T7) と S5-2R, また S5-2F と、*TaKaRa LA Taq* (TaKaRa, Ohtsu, Japan) を用いた long and accurate PCR を行い、増幅産物の有無でクローンが含む連結部位を判断した。PCR サイクルは 5 min, 94°C for the first denaturation, 20 sec at 94°C, 30 sec at 53°C, 8 min at 68°C を 30 cycles, 最終伸長反応 10 min at 68°C で行った。この過程によって増幅されたフラグメントは、pCR2.1 にサブクローニングし、次の実験に用いた。

4-2-4 Sequencing

シーケンス反応は BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit ver. 3.1 (Applied Biosystems, Foster City, CA, U.S.A.) を使用した。解析は ABI Prism 310 又は 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA, U.S.A.) を用いた。塩基配列、アミノ酸配列は FASTA (Lipman et al., 1985; Pearson et al., 1988) と NCBI BLAST (Altschul et al., 1997) を用いて解析した。

4-3 結果

4-3-1 Afcs1 株における pRt4Sa::Tn5-mob の存在の確認

Afcs1 株における pRt4Sa::Tn5-mob の存在を確認するため、A136 株、Afp1 株、Afcs1 株の total DNA を、8 塩基認識の制限酵素 *SwaI*, *PacI* によって消化し、Pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) によってフラグメントパターンを比較した。*SwaI*, *PacI* 消化により生じる、A136 株のフラグメントサイズを、*A. tumefaciens* C58 株の全塩基配列情報 (Goodner et al., 2001; Wood et al., 2001) に基づいて予測し、Afp1 株、Afcs1 株のフラグメントパターンと比較した。Afcs1 株特異的に消失したフラグメントが検出された場合、そのフラグメントの領域内で pRt4Sa::Tn5-mob の組込みが起きたと判断した。

その結果、*PacI* 消化産物の比較では、Afcs1 株は 980-kb の *PacI* フラグメントが消失し、新たにおよそ 1336-kb のフラグメントが検出された (Fig. 4)。Afcs1 株の *SwaI* 消化産物では、779-kb の *SwaI* フラグメントが消失し、約 612-kb と 534-kb の二本の特異的なフラグメントが検出された (Fig. 4)。消失した 980-kb (*PacI*) と 779-kb (*SwaI*) のフラグメントは *A. tumefaciens* C58 の linear chromosome の 706,712 から 1,330,851 bp を共通の領域として含んでおり (Fig. 5 G), pRt4Sa::Tn5-mob が *Agrobacterium* linear chromosome に組み込まれていると判断した。Afp1 株の *SwaI* 消化産物においては、pRt4Sa::Tn5-mob 由来と考えられる、約 325-kb のフラグメントが検出された (Fig. 4)。

4-3-2 Afcs1 株における pRt4Sa::Tn5-mob 組み込み位置の同定

A136 株と Afcs1 株のゲノム DNA を *XbaI*, 又は *SnaBI* で消化し、*SwaI*, *PacI* の場合と同様の原理で、組込みが起きた部位を含む領域を絞り込んだ。フラグメントの特定は、*SnaBI*, または *XbaI* の任意のフラグメントに対応するプロー

ブを用いた Southern hybridization により行った。各プローブと制限酵素部位の位置関係は Fig. 5 G に示した。

Mesorhizobium loti MAFF303099 と *Bradyrhizobium japonicum* USDA110 の共生アイランドが tRNA をターゲットとして挿入されている (Kaneko et al., 2000; Kaneko et al., 2002) ことを考慮し, *Agrobacterium* 染色体上の 706.7~1330.8 kb 領域内に位置する 12 の tRNA gene をプローブとした Southern hybridization を行ったが, tRNA gene をターゲットとした pRt4Sa::Tn5-mob の組み込みを示す結果は得られなかった (Fig. 5 B)。

*Sna*BI フラグメント (133.6-kb) の一部をプローブ (S5, X15, X16-17; Fig. 4G) とした Southern hybridization を行ったところ, Afcs1 株 *Sna*BI 消化産物において, プローブ S5 と, プローブ X15 (または X16-17) を用いた場合で, 異なるフラグメントにハイブリダイズした (Fig. 5 C~E)。さらに, integrase gene (*int* gene) をプローブ (S5-2) としたところ, Afcs1 株 *Sna*BI 消化産物において, プローブ S5, 及びプローブ X15 と X16-17 で検出されたフラグメントが同時に検出された (Fig. 5 F)。また, Afcs1 株 *Xba*I 消化産物においても, 特異的な二つのフラグメントが検出された。これらの結果から, *Agrobacterium* の linear chromosome の *int* gene が, 移行させた pRt4Sa::Tn5-mob の組み込みのターゲットであると判断した。

4-3-3 pRt4Sa::Tn5-mob と *int* gene 間の連結部位の塩基配列解析

Afcs1 株の解析結果による pRt4Sa::Tn5-mob の連結部位の物理地図は Figure 5 に示した。*int* gene と pRt4Sa::Tn5-mob の左右連結部位の塩基配列を解析したところ, 左連結部位には *Agrobacterium* linear chromosome の *int* gene の 406-bp (926,945 ~ 927,350 bp) が存在していた。一方, 右連結部では同遺伝子の 794-bp (927,342 ~ 928,135 bp) が存在し, 左右連結部位の塩基配列の比較から *int* gene は 927,342 ~ 927,350 bp にあたる 9 bp が重複していることが判明した (Fig. 7)。

さらに、左末端部の *int* gene の上流には Tn5 を構成する挿入配列 IS50R が 3'方向で存在し、右末端部位の *int* gene の下流には、pRt4Sa に挿入した Tn5-*mob* が、IS50R を *int* gene 方向に向いて存在していた (Fig. 6, 7)。つまり、Afcs1 株の linear chromosome に組み込まれた pRt4Sa::Tn5-*mob* は同方向の IS50R によって挟まれていた。*int* gene の 9 bp の重複が生じていたことも含め、これら両連結部位の構造は IS50 やトランスポゾン Tn5 の挿入後のターゲット部位に確認される特徴的な構造である (Fig. 8)。以上の結果から、pRt4Sa::Tn5-*mob* は Tn5 (IS50) の挿入機構で Afcs1 株の linear chromosome へ組み込まれたと判断した。

左連結部位では IS50R の上流に、pSUP5011 (Simon, 1984) の配列が存在していた (Fig. 6)。pRt4Sa::Tn5-*mob* の右連結部位の Tn5-*mob* の下流には、51 アミノ残基と 162 アミノ残基の二つの open reading frame (ORF) の一部が存在し (Fig. 6)、これらの ORF は、それぞれ *Bradyrhizobium japonicum* USDA110 株 ABC transporter permease protein (約 66% identity, 80% similarity) と ABC transporter substrate-binding protein (約 75% identity, 87% similarity) と相同性を示し、*Agrobacterium* に存在しない塩基配列であることから、pRt4Sa::Tn5-*mob* の右末端部であると判断した。

4-4 考察

A136 株と Afcs1 株の *Swa*I, *Pac*I 消化産物の PFGE 像の結果 (Fig. 4), 及び *Sna*BI, *Xba*I 消化産物に対する *int* gene をプローブとした Southern hybridization の結果より (Fig. 5F), 移行させた pRt4Sa::*Tn5-mob* が linear chromosome の *int* gene に組み込まれたことが明らかとなった。さらに, Afcs1 株のゲノムライブラリーによる, pRt4Sa::*Tn5-mob* と *int* gene の結合部位を詳細に解析したところ, 各連結部位の linear chromosome には *int* gene の 9 bp が重複し, pRt4Sa::*Tn5-mob* の両末端には同方向の IS50R が存在していた (Fig. 6)。本研究の結果は, 共生関連遺伝子群の共生アイランド化が, これまでに報告されているような, インテグラーゼの部位特異的組換えによる tRNA 遺伝子への組み込みに限らず, transposase もその要因となることを示す重要な知見である。

PFGE 像において, Afp1 株のみで検出された pRt4Sa::*Tn5-mob* を示すフラグメントが, Afcs1 株では検出されなかった。このことは, Afp1 株と Afcs1 株では, pRt4Sa::*Tn5-mob* がそれぞれプラスミドまたは linear chromosome へ組み込まれた状態で安定に保持されていることを示している。

pRt4Sa::*Tn5-mob* は Afcs1 株の linear chromosome の *int* gene に, Tn5 の機構で挿入されたと判断した。Tn5 の挿入ターゲットとなる 9 bp の DNA 配列には, ある程度の傾向 (A-GNTYWRANC-T) が存在することが明らかとなっている (Ason et al., 2004; Goryshin et al., 1998; Lodge et al., 1988) が, その偏りはほぼランダムであるといえる。本論において組込みのターゲットとなった *int* gene のプライマーを用い, Afcs 株の一つである Afcs2 株 DNA を鋳型とした PCR によって評価を行ったところ, *int* gene は増幅され, pRt4Sa::*Tn5-mob* が他のターゲットに組み込まれたと判断される結果を得ている。

また, pRt4Sa::*Tn5-mob* 右末端側の IS50R の上流には, pSUP5011 の配列が存

在していた (Fig. 6)。pSUP5011 は、4S 株へ *Tn5-mob* を挿入する際、biparental mating に用いた donor である *E. coli* S17-1 が保持していたものである (Abe et al., 1998)。pSUP5011 が pRt4Sa::*Tn5-mob* と cointegrate してしまったことが、Afcs1 株における、pRt4Sa::*Tn5-mob* の IS50 を介した組込みを助長する要因となった可能性もある。

第 5 章：Afcs1 株から *Rhizobium* への

pRt4Sa::Tn5-*mob* の接合伝達

5-1 序

ほとんどの細菌は、様々な環境ストレスへの適応、また新たな表現型を、plasmid や transposable element (transposon, insertion sequence), gene cassette, phagemid の水平伝達を介して獲得する。水平伝達の対象となる遺伝要素は、抗生物質耐性遺伝子だけに限らず、代謝系関連の遺伝子 (Hochhut et al., 1997; Ravatn et al., 1998), 病原性遺伝子 (Hacker et al., 2000), 共生関連遺伝子 (Sullivan et al., 1998) も含まれる。これらは水平伝達後、プラスミド、または宿主染色体に組み込まれて保持され、conjugative element (conjugative plasmid, conjugative transposon) と呼ばれている。

Conjugative transposon とは、接合伝達可能であり、ゲノム内で転移する Tn916 (Clewell et al., 1995) 等の挙動から生じたものである。しかし実際は、転移の際、部位特異的に切り出され、インテグラーゼを介して A+T-rich な配列をターゲットとして組み込まれた結果であり (Burrus et al., 2002), DDE モチーフを保持した transposase を介したトランスポゾンの機構とは全く異なるものであった。これまで、自己伝達能を持ち、チロシンまたはセリンリコンビナーゼに属するインテグラーゼを介して組み込まれ、宿主にある表現型を付与する遺伝因子がいくつか発見され、総称して integrative and conjugative elements (ICEs) とすることが提唱されている。*Mesorhizobium loti* の共生アイランドも ICEs に属しており、*M. loti* R7A の共生アイランドは ICEMISym^{R7A} と名付けられている (Burrus et al., 2002)。

本章では、Afcs1 株を供与株とし、linear chromosome に組み込まれた pRt4Sa::Tn5-*mob* の H1 株への移行を試みた。得られた *Rhizobium* 接合伝達株の共生能と、移行した pRt4Sa::Tn5-*mob* について考察する。

5-2 方法

5-2-1 Conjugation and plasmid profiles

Figure 2 にスキームを示した。Afcs1 株を donor, H1 株を recipient, MM294 株を helper として用いた。それぞれに、適切な抗生物質を添加した TY 培地で、一夜振盪培養したものを滅菌水で洗浄し、培地と等量の滅菌水に懸濁した。各菌液を helper 100 μ l, donor 200 μ l, recipient 200 μ l (helper : donor : recipient = 1 : 2 : 2) の割合で混和した。この混合菌液を遠心集菌し、上清を取り除き、200 μ l の滅菌水に再懸濁した。50 μ l を抗生物質無添加の TY 培地上に乗せた、滅菌済みの孔径 0.45 μ m のフィルター (Millipore, Bedford, MA) 上に移し、16 h, 28°C で一夜培養した。フィルター上の菌を 1 ml の滅菌水に懸濁し、遠心集菌の後、1 ml の滅菌水に再懸濁した。適切な抗生物質を添加した YM 培地で、5 日間、28°C で培養した。生じたコロニーは kanamycin (50 μ g/ml) と nalidixic acid (25 μ g/ml) を含む YM 培地にナンバリングした。各コロニーはホワイトクローバの芽生えに接種し、5 週間後、内海らの方法 (Uchiumi et al., 1995) に従って、形成された根粒の破碎液を調整し、kanamycin と nalidixic acid を添加した YM 培地で、再度シングルコロニーを単離した。

得られた *Rhizobium* 接合伝達株から、Casse ら (1979) の方法に従って粗プラスミドを抽出し、電気泳動によって移行したプラスミドの有無を確認した。電気泳動は 0.7% agarose, 100V, 90min の条件とした。接合伝達株は、阿部ら (Abe et al., 1998) による、random amplified polymorphic DNA genotyping (RAPD) によって *R. leguminosarum* bv. *trifolii* H1 由来であることを確認した。

5-2-2 Southern hybridization

プローブは *R. l.* bv. *trifolii* 4S の *nodBADF* 領域を、pC4S8 (Abe et al., 1998) を

鋳型とした polimerase chain reaction (PCR) で増幅して用いた。プライマーは 5'-TCAACGATACAATCGACTCCG-3' と 5'-TACGATTCTCAAGCGCCGCTC-3' を用いた。プローブは Megaprime DNA Labelling System (GE Healthcare UK Ltd., Buckinghamshire, U.K.) を用い, [α -³²P] dCTP でラベルした。ハイブリダイゼーションは 5 × SSC (1 × SSC is 0.15M NaCl and 0.015M sodium citrate), 10 × Denhardt's solution (0.1% Ficoll, 0.1% PVP, 0.1% BSA), 0.2% BSA, 50% formamide, 0.5% SDS, 50 µg/ml salmon sperm DNA を用い, 45°C, overnight の条件で行った。フィルターは 0.1 × SSC, 0.1% SDS を使用し, 65°C で洗浄した。

5-2-3 クローバへの菌接種試験, 及び窒素固定活性の測定

ホワイトクローバ (*Trifolium repens* L. cv. *Ladino*) を使用した。種子は表面殺菌のため 0.5% NaClO と 0.1% Tween 20 で 30 分間, 室温で振盪し, 滅菌水で洗浄したものを使用した。0.7% agar plate 上に播種し, 暗所で 24 h, 24°C でインキュベートした。0.7% agar を含む Fåhraeus 培地 (Fåhraeus, 1957) 上に植え, 10⁷~10⁸ cell/ml の濃度の菌液をホワイトクローバの根に接種後, 24°C, 明期 14 h の条件下で培養した。菌液は TY 液体培地で対数増殖期後期まで培養し, S.D.W. で洗浄したものをを用いた。

窒素固定活性はアセチレン還元活性 (Hardy et al., 1968) を Gas chromatography GC-3BF (Shimadzu, Kyoto, Japan) で測定した。カラムは Porapak N, カラムサイズ; 3 mm × 100 cm を用い, effluent gas は N₂, 50 ml/min, 検出温度; 60°C の条件で分析し, 検出器は FID を用いた。

5-2-4 Pulsed-field gel electrophoresis (PFGE)

プラグの作製は Rice ら (1999) の方法を一部改変して行った。TY 液体培地で対数増殖期後期まで培養した菌液 50 µl を取り, 30 sec ボイルした後, 氷水で

急冷した。滅菌水で洗浄後、集菌し、上清を捨て、100 µl EET buffer [100 mM EDTA, 10 mM EGTA in 10 mM Tris-HCl (pH8.0)] に懸濁した。菌体は EET buffer に懸濁した。菌懸濁液と等量の 65°C, 1.6% Chromosomal Grade Agarose (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA) を混和し、plug-molds (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA) に流し込んで完全に固化させた。agarose plug は、1 ml EET-LS buffer (1ml of EET buffer containing 200 µg/ml lysozyme and 0.05% N-lauroylsarcosine sodium salt) を含む、滅菌 50 ml 遠心チューブで 37°C, 3 h インキュベートした。バッファを捨てた後、1 ml EET-SP buffer [1 ml of EET buffer containing 1 mg/ml proteinase K and 1.0% (w/v) sodium lauryl sarcosine] を加え、50 °C で一夜インキュベートした。次に、バッファを捨て、40 ml TE buffer (pH8.0) にて 30 min 静置する操作を 4 回繰り返すことで、agarose plug を洗浄した。agarose plug は、滅菌した 4 °C TE buffer 中で保存した。制限酵素処理する際、各 agarose plug は適当なサイズに切ったものを使用し、前処理として 500 µl の適切な制限酵素バッファ中で 20 min, 室温でインキュベートした。制限酵素は 50 U 使用し、*PacI* は 37 °C, *SwaI* は 25 °C で over night インキュベートした。

PFGE は CHEF Mapper electrophoresis system (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA) を用いて行った。泳動条件は 1% Chromosomal Grade Agarose (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA), 12°C の 0.5 × TBE buffer で行い、電圧 6V/cm, 20 h, 20-120 sec, pulse time とした。サイズマーカーは *Saccharomyces cerevisiae* standard (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, U.S.A.) を用いた。

DNA フラグメントは 0.5 µg/ml ethidiumbromide で 30 min 染色し、260 nm の波長の紫外線で検出した。

5-3 結果

5-3-1 Afcs1 株と H1 株間における pRt4Sa::Tn5-mob の移行

H1 株を recipient, Afcs1 株を donor として triparental mating を行い, Afcs1 株の linear chromosome に組み込まれた pRt4Sa::Tn5-mob の移行を試みた。その結果, 57 菌株が得られ, RAPD 法により全て *Rhizobium* 由来であることを確認し, H1tr-strains と名付けた。全 H1tr-strains はホワイトクローバに窒素固定活性を有する根粒を形成し (Fig. 9 A, B), 4S5 株によって形成された根粒と同程度の窒素固定能を示すことを確認した。H1tr-strains のうち 18 株をランダムに選抜して H1tr1~ H1tr18 株とした。それぞれの菌株から total DNA を抽出し, pRt4Sa::Tn5-mob の移行確認を行った。17 株については, pRt4Sa::Tn5-mob と同サイズのプラスミドが検出されたが, H1tr1 株では pRt4Sa::Tn5-mob が検出されなかった (Fig. 9 D)。pRt4Sa::Tn5-mob と同サイズのプラスミドが検出された菌株の一つである H1tr7 株と, 検出されなかった H1tr1 株に対し, 4S 株の *nodBADF* をプローブとした Southern hybridization を行った。その結果, H1tr7 株では移行が検出されたプラスミドと total DNA 断片にハイブリダイズし, H1tr1 株では total DNA 断片にのみシグナルが検出された (Fig. 9 E)。

5-3-2 H1tr1 株における pRt4Sa::Tn5-mob

H1tr1 株ゲノム中に Afcs1 株より移行した pRt4Sa::Tn5-mob が保持されていることを確認するため, *R. leguminosarum* bv. *trifolii* 4S 株と 4S5 株, 及び H1tr1 株の total DNA の *Swa*I, 及び *Pac*I 消化産物を PFGE により分離し, 4S 株の *nodBADF* をプローブとした Southern hybridization を行った。その結果, H1tr7 株では 4S 株, 4S5 株同様, pRt4Sa::Tn5-mob に相当するフラグメントへの *nodBADF* がハイブリダイズが検出されたが, H1tr1 株では異なるフラグメントへのハイブリダイ

ズが検出された (Fig. 10 B)。このフラグメントのサイズは 610-kb 以上であり、また、単一のフラグメントとして検出されていたことから、pRt4Sa::Tn5-*mob* が完全な状態で H1 株の主染色体に挿入されていたものと推測できる。

5-4 考察

Afcs1 株を供与株, H1 株を受容株とした triparental mating の結果, *Rhizobium* 接合伝達株 H1tr-strains を得ることができた。また, H1tr-strains はホワイトクローバに *R. leguminosarum* bv. *trifolii* 4S5 株と同程度の窒素固定活性を有する根粒を形成した (Fig. 9 A, B)。18 株中 17 株では pRt4Sa::Tn5-mob と同サイズのプラスミドの移行を確認し (Fig. 9 C, D), 一方, H1tr1 株では pRt4Sa::Tn5-mob が主染色体内へ組み込まれていることが示唆された (Fig. 10 A, B)。再移行した pRt4Sa::Tn5-mob の存在形態によらず, ホワイトクローバに窒素固定活性を有する根粒を形成したことは, *R. leguminosarum* bv. *trifolii* 4S の共生プラスミド pRt4Sa 上の遺伝子が不足, Afcs1 株の linear chromosome で共生アイランドとして, 不足なく保持されていたことを示している。

pRt4Sa::Tn5-mob の転移の際も, 他の conjugative element 同様, 前段階として linear chromosome から切り出され環状化することが考えられる。linear chromosome からの切り出し経路としては, pRt4Sa::Tn5-mob の両末端に同方向の IS50R が存在することから, IS50R 間における相同組換えによる経路と, Tn5 の IS50R にコードされている transposase による head-to-tail 構造をとる経路が考えられる。Mavingui ら (1998) によると, *Rhizobium tropici* の共生プラスミドでは, 同方向の *ISRtr1* が両末端に存在する共生関連遺伝子を含む 60-kb の領域 (AMP^RtrCFN299pc60) が, 何らかの理由によってプラスミド上に複製されることがあると報告している。AMP^RtrCFN299pc60 は mob 遺伝子を挿入することで可動化し, *Agrobacterium* へ水平伝達可能であった。切り出しについては *ISRtr1* 間の相同組換えと考えられている。また, 挿入配列 (IS) が同一レプリコン内で同方向の重複が生じた場合のもう一つの挙動として, 互いの inverted repeats (IR) を連結し, tandem dimer (head-to-tail dimers) を持つ環状 DNA としての切り出し

が挙げられる。この様な経路による切り出しは, IS30 (Szeverenyi et al., 2003), IS21 (Reimann et al., 1989) を始め, いくつかの IS で確認されているが (Prudhomme et al., 2002; Reimann et al., 1989; Szeverenyi et al., 2003; Turlan et al., 2000), IS50 では確認されていない。IS21 で構成された head-to-tail dimer を保持する replicon は高効率で fusion replicon (cointegration) を引き起こすことが知られている (Berger et al., 2001)。しかし, Afcs1 株における pRt4Sa::Tn5-mob の切り出し機構において結論を出すためには, より詳細な調査が必要である。

H1tr1 株は, pRt4Sa::Tn5-mob が主染色体に組み込まれたにもかかわらず (Fig. 10 A, B), 窒素固定能を示す根粒を形成した。PFGE の結果からも, 主染色体に組み込まれた pRt4Sa::Tn5-mob はプラスミドとして切り出されることなく, 安定に保持されているといえる (Fig. 10 A, B)。代謝系関連遺伝子 (Hochhut et al., 1997; Ravatn et al., 1998), 病原性遺伝子 (Hacker et al., 2000) 等, 一連の replicon はインテグラーゼによる部位特異的組換えで宿主ゲノムに組み込まれている。本論の結果は, ゲノムからの共生窒素固定関連遺伝子の切り出しや組込みに, トランスポゾンや IS が関与していることを示している。トランスポゾンや IS が細菌に普遍的に存在することを考慮すると, 根粒菌の遺伝的多様性を生み出す大きな要因の一つであることは十分に考えられる。

第 6 章：結論

根粒菌は、マメ科植物の根に根粒を形成し、大気中の窒素分子をアンモニウムイオンへ還元し、宿主である植物へ供給している。植物との共生窒素固定に必要な根粒菌側の遺伝子である *nod genes*, *nif genes* は、*Rhizobium* や *Sinorhizobium* では巨大なプラスミド（共生プラスミド; pSym）上に、*Mesorhizobium* や *Broadyrhizobium* では染色体上にクラスターを形成して（共生アイランド）存在する。共生プラスミド、及び共生アイランドは自己伝達能を持つものも存在し (Brom et al., 2004; Rao et al., 1994), 根粒菌に属さない共生菌種も根粒から単離されている (Moulin et al., 2001; Sullivan et al., 1995; Sy et al., 2001; Velázquez et al., 2005)。

本論では、pSym の異種菌株間における水平伝播と、植物との共生能の発現について調査するため、Tn5-*mob* で可動化させた *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* 4S5 の pSym (pRt4Sa::Tn5-*mob*) を、*Agrobacterium tumefaciens* A136 (pTi 消去株) へと接合伝達した (Fig. 2)。伝達効率は 1.56×10^{-7} events/recipient cell であった。得られた *Agrobacterium* 接合伝達株は、ホワイトクローバの根に白色の窒素固定活性のない根粒を多数形成した (Fig. 3 C, D)。 *Agrobacterium* 接合伝達株からプラスミドを抽出し、pRt4Sa::Tn5-*mob* の移行を確認したところ、移行した pRt4Sa::Tn5-*mob* が検出される株 (Afp 株) と、検出されない株 (Afcs 株) に分けられた (Fig. 3 A, B)。Afcs 株の一つである Afcs1 株を用いて、移行した pRt4Sa::Tn5-*mob* の存在を Pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) で解析したところ、Afcs1 株では pRt4Sa::Tn5-*mob* が linear chromosome に組み込まれていることが示唆される結果が得られた (Fig. 4)。PFGE と Southern hybridization によって pRt4Sa::Tn5-*mob* の組込み位置について詳細に解析したところ、Afcs1 株 linear chromosome の *int* gene に組み込まれていることを確認した (Fig. 5)。さらに、

Afcs1 株のゲノムライブラリーを作製し、pRt4Sa::Tn5-*mob* と *int* gene の連結部位を解析した。その結果、組み込まれた pRt4Sa::Tn5-*mob* の両末端には、Tn5 の挿入配列 (insertion sequence ; IS) である IS50R が同方向で存在し (Fig. 6), これら IS50R の linear chromosome 側の近傍には、組み込みターゲットとなった *int* gene 中の 9 bp の重複がみられた (Fig. 7)。以上の結果は、Afcs1 株においては、*Agrobacterium* に移行させた pRt4Sa::Tn5-*mob* が Tn5 (IS50R) を介して linear chromosome の *int* gene に組み込まれ、共生アイランド化していることを示している。

次に、Afcs1 株を donor とし、*R. leguminosarum* bv. *trifolii* H1 (*R. leguminosarum* bv. *trifolii* 4S より pSym を消去した株) を recipient とした接合伝達により、*Rhizobium* 接合伝達株 H1tr 株を得た (Fig. 1)。全ての H1tr 株はホワイトクローバに窒素固定能のある根粒を形成することを確認した (Fig. 9 A, B)。これらの株より 18 株をランダムに選択し、pSym の再移行について調査したところ、1 株 (H1tr1 株) を除く 17 株 (H1tr2~H1tr18 株) で、4S5 株の pRt4Sa::Tn5-*mob* と同サイズのプラスミドが検出できた (Fig. 9 D, E)。これは、Afcs1 株の共生アイランド化した pRt4Sa::Tn5-*mob* が linear chromosome より切り出され、H1 株へと移行し、再びプラスミドの形態を取り得ることを示す結果である。linear chromosome からの pRt4Sa::Tn5-*mob* の切り出しは、両末端の IS50R 間における相同組換えが予想されるが、詳細な解析が必要である。一方、H1tr1 株では、Afcs1 株と同様に、移行した pRt4Sa::Tn5-*mob* が H1 株の主染色体に組み込まれていることを Pulsed-field gel electrophoresis と Southern hybridization によって確認した (Fig. 10)。これは、Afcs1 株が水平伝達によって獲得した pRt4Sa::Tn5-*mob* を、共生能が機能する状態、且つ再移行可能な共生アイランドとして linear chromosome に保持していることを示す結果である。加えて、*Agrobacterium* 接合伝達株が根粒形成能のみを示し、窒素固定能を示さなかったことは、窒素固定

能関連遺伝子，及びそれと同じプロモーターで制御を受けている遺伝子が *Agrobacterium* 接合伝達株内で機能していないことを示唆している。

根粒菌ゲノム上には多くの IS が確認され (Freiberg et al., 1997; Gottfert et al., 2001; Kaneko et al., 2000; Kaneko et al., 2002)，ゲノムの構造比較によって IS が共生関連遺伝子の転移や再構築に関わっていることが示唆されていた (Uchiumi et al., 2004)。本論の Afcs1 株において確認された，Tn5 (IS50) の挿入機構を介した共生プラスミドの共生アイランド化は，トランスポゾンや IS が共生遺伝子群の存在形態に関わり，根粒菌の遺伝的多様性を生み出す一因となっていることを示すものである。

謝辞

本研究の遂行と取りまとめにあたり、終始懇切なるご指導を賜った鹿児島大学理学部生命化学科生命機能講座 阿部美紀子教授，内海俊樹准教授，九町健一助教に、この場を借りて、深甚なる謝意を表したいと思います。

本論の審査過程において、数々の御助言と御指導賜りました，鹿児島大学理学部生命化学科有機生化学講座 坂井雅夫准教授に厚く御礼申し上げます。

また，本研究における議論，検討にあたり，御教示並びに御激励を賜りました，鹿児島大学名誉教授 東四郎博士，並びに，佐賀大学農学部 鈴木章弘准教授に深謝申し上げます。

最後に，この博士後期課程の生活において，大きな負担を強いたにもかかわらず支え続けてくれた家族に，深い感謝の気持ちを示したいと思います。ありがとうございました。

参考文献

- Abe, M., Kawamura, R., Higashi, S., Mori, S., Shibata, M. and Uchiumi, T. 1998. Transfer of the symbiotic plasmid from *Rhizobium leguminosarum* biovar *trifolii* to *Agrobacterium tumefaciens*. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 44: 65-74.
- Altschul, S. F., Madden, T. L., Schaffer, A. A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W. and Lipman, D. J. 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* 25: 3389-3402.
- Ason, B. and Reznikoff, W. S. 2004. DNA sequence bias during Tn5 transposition. *J. Mol. Biol.* 335: 1213-1225.
- Bedzyk, L. A., Shoemaker, N. B., Young, K. E. and Salyers, A. A. 1992. Insertion and excision of *Bacteroides* conjugative chromosomal elements. *J. Bacteriol.* 174: 166-172.
- Berger, B. and Haas, D. 2001. Transposase and cointegrase: specialized transposition proteins of the bacterial insertion sequence IS21 and related elements. *Cell. Mol. Life Sci.* 58: 403-419.
- Beringer, J. E. 1974. R factor transfer in *Rhizobium leguminosarum*. *J. Gen. Microbiol.* 84: 188-198.
- Brom, S., Girard, L., Tun-Garrido, C., García-de los Santos, A., Bustos, P., González, V. and Romero, D. 2004. Transfer of the symbiotic plasmid of *Rhizobium etli* CFN42 requires cointegration with p42a, which may be mediated by site-specific recombination. *J. Bacteriol.* 186: 7538-7548.
- Burrus, V., Pavlovic, G., Decaris, B. and Guedon, G. 2002. Conjugative transposons: the tip of the iceberg. *Mol. Microbiol.* 46: 601-610.
- Burrus, V. and Waldor, M. K. 2004. Shaping bacterial genomes with integrative and

- conjugative elements. *Res. Microbiol.* 155: 376-386.
- Casse, F., Boucher, C., Julliot, J. S., Michel, M. and Denarie, J. 1979. Identification and characterization of large plasmid in *Rhizobium meliloti* using agarose gel electrophoresis. *J. Gen. Microbiol.* 113: 229-242.
- Chen, I. and Dubnau, D. 2003a. DNA transport during transformation. *Front. Biosci.* 8: s544-556.
- Chen, W. M., Laevens, S., Lee, T. M., Coenye, T., De Vos, P., Mergeay, M. and Vandamme, P. 2001. *Ralstonia taiwanensis* sp. nov., isolated from root nodules of *Mimosa* species and sputum of a cystic fibrosis patient. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 51: 1729-1735.
- Chen, W. M., Moulin, L., Bontemps, C., Vandamme, P., Béna, G. and Boivin-Masson, C. 2003b. Legume symbiotic nitrogen fixation by β -proteobacteria is widespread in nature. *J. Bacteriol.* 185: 7266-7272.
- Cheng, H. P. and Walker, G. C. 1998. Succinoglycan is required for initiation and elongation of infection threads during nodulation of alfalfa by *Rhizobium meliloti*. *J. Bacteriol.* 180: 5183-5191.
- Claverys, J. P. and Havarstein, L. S. 2002. Extracellular-peptide control of competence for genetic transformation in *Streptococcus pneumoniae*. *Front. Biosci.* 7: d1798-1814.
- Clewell, D. B., Flannagan, S. E. and Jaworski, D. D. 1995. Unconstrained bacterial promiscuity: the Tn916-Tn1545 family of conjugative transposons. *Trends Microbiol.* 3: 229-236.
- David, M., Daveran, M. L., Batut, J., Dedieu, A., Domergue, O., Ghai, J., Hertig, C., Boistard, P. and Kahn, D. 1988. Cascade regulation of *nif* gene expression in *Rhizobium meliloti*. *Cell.* 54: 671-683.

- Dixon, R. and Kahn, D. 2004. Genetic regulation of biological nitrogen fixation. *Nat. Rev. Microbiol.* 2: 621-631.
- Endre, G., Kereszt, A., Kevei, Z., Mihacea, S., Kalo, P. and Kiss, G. B. 2002. A receptor kinase gene regulating symbiotic nodule development. *Nature.* 417: 962-966.
- Fåhræus, G. 1957. The infection of clover root hairs by nodule bacteria studied by a simple glass slide technique. *J. Gen. Microbiol.* 16: 374-381.
- Figurski, D. H. and Helinski, D. R. 1979. Replication of an origin-containing derivative of plasmid RK2 dependent on a plasmid function provided in *Trans. Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 76: 1648-1652.
- Franke, A. E. and Clewell, D. B. 1981. Evidence for a chromosome-borne resistance transposon (Tn916) in *Streptococcus faecalis* that is capable of "conjugal" transfer in the absence of a conjugative plasmid. *J. Bacteriol.* 145: 494-502.
- Freiberg, C., Fellay, R., Bairoch, A., Broughton, W. J., Rosenthal, A. and Perret, X. 1997. Molecular basis of symbiosis between Rhizobium and legumes. *Nature.* 387: 394-401.
- Frost, L. S., Leplae, R., Summers, A. O. and Toussaint, A. 2005. Mobile genetic elements: the agents of open source evolution. *Nat. Rev. Microbiol.* 3: 722-732.
- Galibert, F., Finan, T. M., Long, S. R., Puhler, A., Abola, P., Ampe, F., Barloy-Hubler, F., Barnett, M. J., Becker, A., Boistard, P., Bothe, G., Boutry, M., Bowser, L., Buhrmester, J., Cadieu, E., Capela, D., Chain, P., Cowie, A., Davis, R. W., Dreano, S., Federspiel, N. A., Fisher, R. F., Gloux, S., Godrie, T., Goffeau, A., Golding, B., Gouzy, J., Gurjal, M., Hernandez-Lucas, I., Hong, A., Huizar, L., Hyman, R. W., Jones, T., Kahn, D., Kahn, M. L., Kalman, S., Keating, D. H., Kiss, E., Komp, C., Lelaure, V., Masuy, D., Palm, C., Peck, M. C., Pohl, T. M.,

- Portetelle, D., Purnelle, B., Ramsperger, U., Surzycki, R., Thebault, P., Vandebol, M., Vorholter, F. J., Weidner, S., Wells, D. H., Wong, K., Yeh, K. C. and Batut, J. 2001. The composite genome of the legume symbiont *Sinorhizobium meliloti*. *Science*. 293: 668-672.
- González, V., Santamaría, R. I., Bustos, P., Hernández-González, I., Medrano-Soto, A., Moreno-Hagelsieb, G., Janga, S. C., Ramírez, M. A., Jiménez-Jacinto, V., Collado-Vides, J. and Dávila, G. 2006. The partitioned *Rhizobium etli* genome: genetic and metabolic redundancy in seven interacting replicons. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 103: 3834-3839.
- Goodner, B., Hinkle, G., Gattung, S., Miller, N., Blanchard, M., Quorllo, B., Goldman, B. S., Cao, Y., Askenazi, M., Halling, C., Mullin, L., Houmiel, K., Gordon, J., Vaudin, M., Iartchouk, O., Epp, A., Liu, F., Wollam, C., Allinger, M., Doughty, D., Scott, C., Lappas, C., Markelz, B., Flanagan, C., Crowell, C., Gurson, J., Lomo, C., Sear, C., Strub, G., Cielo, C. and Slater, S. 2001. Genome sequence of the plant pathogen and biotechnology agent *Agrobacterium tumefaciens* C58. *Science*. 294: 2323-2328.
- Goryshin, I. Y., Miller, J. A., Kil, Y. V., Lanzov, V. A. and Reznikoff, W. S. 1998. Tn5/IS50 target recognition. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 95: 10716-10721.
- Gottfert, M., Rothlisberger, S., Kundig, C., Beck, C., Marty, R. and Hennecke, H. 2001. Potential symbiosis-specific genes uncovered by sequencing a 410-kilobase DNA region of the *Bradyrhizobium japonicum* chromosome. *J. Bacteriol.* 183: 1405-1412.
- Graupner, S., Frey, V., Hashemi, R., Lorenz, M. G., Brandes, G. and Wackernagel, W. 2000. Type IV pilus genes *pilA* and *pilC* of *Pseudomonas stutzeri* are required for natural genetic transformation, and *pilA* can be replaced by corresponding

- genes from nontransformable species. *J. Bacteriol.* 182: 2184-2190.
- Hacker, J. and Kaper, J. B. 2000. Pathogenicity islands and the evolution of microbes. *Annu. Rev. Microbiol.* 54: 641-679.
- Hamoen, L. W., Venema, G. and Kuipers, O. P. 2003. Controlling competence in *Bacillus subtilis*: shared use of regulators. *Microbiology.* 149: 9-17.
- Hardy, R. W. F., Holsten, R. D., Jackson, E. K. and Burns, R. C. 1968. The acetylene-ethylene assay for N₂ fixation: Laboratory and field evaluation. *Plant Physiol.* 43: 1185-1207.
- Higashi, S. and Abe, M. 1980. Promotion of infection thread formation by substances from *Rhizobium trifolii*. *Appl. Environ. Microbiol.* 39: 297-301.
- Higashi, S., Uchiumi, T. and Abe, M. 1983. Elimination of *Rhizobium* infectivity by temperature treatment. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 29: 281-285.
- Hochhut, B., Jahreis, K., Lengeler, J. W. and Schmid, K. 1997. CTnscr94, a conjugative transposon found in enterobacteria. *J. Bacteriol.* 179: 2097-2102.
- Hooykaas, P. J., Snijdwint, F. G. and Schilperoort, R. A. 1982. Identification of the Sym plasmid of *Rhizobium leguminosarum* strain 1001 and its transfer to and expression in other rhizobia and *Agrobacterium tumefaciens*. *Plasmid.* 8: 73-82.
- Hooykaas, P. J. J., Brussel, v., Dulk-Ras, H. d., Slogteren, G. M. S. v. and Schilperoort, R. A. 1981. Sym plasmid of *Rhizobium trifolii* expressed in different rhizobial species and *Agrobacterium tumefaciens*. *Nature.* 291: 351-353.
- Kaneko, T., Nakamura, Y., Sato, S., Asamizu, E., Kato, T., Sasamoto, S., Watanabe, A., Idesawa, K., Ishikawa, A., Kawashima, K., Kimura, T., Kishida, Y., Kiyokawa, C., Kohara, M., Matsumoto, M., Matsuno, A., Mochizuki, Y., Nakayama, S., Nakazaki, N., Shimpo, S., Sugimoto, M., Takeuchi, C., Yamada, M. and Tabata, S. 2000. Complete genome structure of the nitrogen-fixing symbiotic bacterium

- Mesorhizobium loti*. *DNA Res.* 7: 331-338.
- Kaneko, T., Nakamura, Y., Sato, S., Minamisawa, K., Uchiumi, T., Sasamoto, S., Watanabe, A., Idesawa, K., Iriguchi, M., Kawashima, K., Kohara, M., Matsumoto, M., Shimpo, S., Tsuruoka, H., Wada, T., Yamada, M. and Tabata, S. 2002. Complete genomic sequence of nitrogen-fixing symbiotic bacterium *Bradyrhizobium japonicum* USDA110. *DNA Res.* 9: 189-197.
- Keele, B. B., Jr., Hamilton, P. B. and Elkan, G. H. 1969. Glucose catabolism in *Rhizobium japonicum*. *J. Bacteriol.* 97: 1184-1191.
- Kinkle, B. K. and Schmidt, E. L. 1991. Transfer of the Pea Symbiotic Plasmid pJB5JI in Nonsterile Soil. *Appl. Environ. Microbiol.* 57: 3264-3269.
- Kouchi, H. and Hata, S. 1993. Isolation and characterization of novel nodulin cDNAs representing genes expressed at early stages of soybean nodule development. *Mol. Gen. Genet.* 238: 106-119.
- Lipman, D. J. and Pearson, W. R. 1985. Rapid and sensitive protein similarity searches. *Science.* 227: 1435-1441.
- Lodge, J. K., Weston-Hafer, K. and Berg, D. E. 1988. Transposon Tn5 target specificity: preference for insertion at G/C pairs. *Genetics.* 120: 645-650.
- Long, C. D., Tobiason, D. M., Lazio, M. P., Kline, K. A. and Seifert, H. S. 2003. Low-level pilin expression allows for substantial DNA transformation competence in *Neisseria gonorrhoeae*. *Infect. Immun.* 71: 6279-6291.
- Lorenz, M. G. and Wackernagel, W. 1994. Bacterial gene transfer by natural genetic transformation in the environment. *Microbiol. Rev.* 58: 563-602.
- MacFadyen, L. P., Chen, D., Vo, H. C., Liao, D., Sinotte, R. and Redfield, R. J. 2001. Competence development by *Haemophilus influenzae* is regulated by the availability of nucleic acid precursors. *Mol. Microbiol.* 40: 700-707.

- Madsen, E. B., Madsen, L. H., Radutoiu, S., Olbryt, M., Rakwalska, M., Szczyglowski, K., Sato, S., Kaneko, T., Tabata, S., Sandal, N. and Stougaard, J. 2003. A receptor kinase gene of the LysM type is involved in legume perception of rhizobial signals. *Nature*. 425: 637-640.
- Martínez, E., Palacios, R. and Sánchez, F. 1987. Nitrogen-fixing nodules induced by *Agrobacterium tumefaciens* harboring *Rhizobium phaseoli* plasmids. *J. Bacteriol.* 169: 2828-2834.
- Mathis, L. S. and Scocca, J. J. 1984. On the role of pili in transformation of *Neisseria gonorrhoeae*. *J. Gen. Microbiol.* 130: 3165-3173.
- Mavingui, P., Laeremans, T., Flores, M., Romero, D., Martinez-Romero, E. and Palacios, R. 1998. Genes essential for nod factor production and nodulation are located on a symbiotic amplicon (AMP Rtr CFN299pc60) in *Rhizobium tropici*. *J. Bacteriol.* 180: 2866-2874.
- Mergaert, P., Van Montagu, M., Prome, J. C. and Holsters, M. 1993. Three unusual modifications, a D-arabinosyl, an N-methyl, and a carbamoyl group, are present on the Nod factors of *Azorhizobium caulinodans* strain ORS571. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 90: 1551-1555.
- Moulin, L., Munive, A., Dreyfus, B. and Boivin-Masson, C. 2001. Nodulation of legumes by members of the β -subclass of Proteobacteria. *Nature*. 411: 948-950.
- Nishi, A., Tominaga, K. and Furukawa, K. 2000. A 90-kilobase conjugative chromosomal element coding for biphenyl and salicylate catabolism in *Pseudomonas putida* KF715. *J. Bacteriol.* 182: 1949-1955.
- Noel, K. D., Sanchez, A., Fernandez, L., Leemans, J. and Cevallos, M. A. 1984. *Rhizobium phaseoli* symbiotic mutants with transposon Tn5 insertions. *J. Bacteriol.* 158: 148-155.

- Pearson, W. R. and Lipman, D. J. 1988. Improved tools for biological sequence comparison. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 85: 2444-2448.
- Prudhomme, M., Turlan, C., Claverys, J. P. and Chandler, M. 2002. Diversity of Tn4001 transposition products: the flanking IS256 elements can form tandem dimers and IS circles. *J. Bacteriol.* 184: 433-443.
- Radutoiu, S., Madsen, L. H., Madsen, E. B., Felle, H. H., Umehara, Y., Grønlund, M., Sato, S., Nakamura, Y., Tabata, S., Sandal, N. and Stougaard, J. 2003. Plant recognition of symbiotic bacteria requires two LysM receptor-like kinases. *Nature.* 425: 585-592.
- Ramsay, J. P., Sullivan, J. T., Stuart, G. S., Lamont, I. L. and Ronson, C. W. 2006. Excision and transfer of the *Mesorhizobium loti* R7A symbiosis island requires an integrase IntS, a novel recombination directionality factor RdfS, and a putative relaxase RlxS. *Mol. Microbiol.* 62: 723-734.
- Rao, J. R., Fenton, M. and Jarvis, B. D. W. 1994. Symbiotic plasmid transfer in *Rhizobium leguminosarum* bioover *trifolii* and competition between the inoculant strain ICMP2163 and transconjugant soil bacteria. *Soil Biol. Biochem.* 26: 339-351.
- Ravatn, R., Studer, S., Zehnder, A. J. and van der Meer, J. R. 1998. Int-B13, an unusual site-specific recombinase of the bacteriophage P4 integrase family, is responsible for chromosomal insertion of the 105-kilobase *clc* element of *Pseudomonas* sp. Strain B13. *J. Bacteriol.* 180: 5505-5514.
- Reimann, C., Moore, R., Little, S., Savioz, A., Willetts, N. S. and Haas, D. 1989. Genetic structure, function and regulation of the transposable element IS21. *Mol. Gen. Genet.* 215: 416-424.
- Rice, D. H., McMenam, K. M., Pritchett, L. C., Hancock, D. D. and Besser, T. E.

1999. Genetic subtyping of *Escherichia coli* O157 isolates from 41 Pacific Northwest USA cattle farms. *Epidemiol. Infect.* 122: 479-484.
- Rivas, R., Velázquez, E., Willems, A., Vizcaíno, N., Subba-Rao, N. S., Mateos, P. F., Gillis, M., Dazzo, F. B. and Martínez-Molina, E. 2002. A new species of *Devosia* that forms a unique nitrogen-fixing root-nodule symbiosis with the aquatic legume *Neptunia natans* (L.f.) druce. *Appl. Environ. Microbiol.* 68: 5217-5222.
- Rudel, T., Facius, D., Barten, R., Scheuerpflug, I., Nonnenmacher, E. and Meyer, T. F. 1995. Role of pili and the phase-variable PilC protein in natural competence for transformation of *Neisseria gonorrhoeae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 92: 7986-7990.
- Scheres, B., Van De Wiel, C., Zalensky, A., Horvath, B., Spaink, H., Van Eck, H., Zwartkruis, F., Wolters, A. M., Gloudemans, T., Van Kammen, A. and et al. 1990a. The *ENOD12* gene product is involved in the infection process during the pea-*Rhizobium* interaction. *Cell.* 60: 281-294.
- Scheres, B., van Engelen, F., van der Knaap, E., van de Wiel, C., van Kammen, A. and Bisseling, T. 1990b. Sequential induction of nodulin gene expression in the developing pea nodule. *Plant Cell.* 2: 687-700.
- Schlaman, H. R., Horvath, B., Vijgenboom, E., Okker, R. J. and Lugtenberg, B. J. 1991. Suppression of nodulation gene expression in bacteroids of *Rhizobium leguminosarum* biovar *viciae*. *J. Bacteriol.* 173: 4277-4287.
- Simon, R. 1984. High frequency mobilization of gram-negative bacterial replicons by the *in vitro* constructed Tn5-Mob transposon. *Mol. Genet. Genomics.* 196: 413-420.
- Sparling, P. F. 1966. Genetic transformation of *Neisseria gonorrhoeae* to streptomycin

- resistance. *J. Bacteriol.* 92: 1364-1371.
- Stone, B. J. and Kwaik, Y. A. 1999. Natural competence for DNA transformation by *Legionella pneumophila* and its association with expression of type IV pili. *J. Bacteriol.* 181: 1395-1402.
- Stracke, S., Kistner, C., Yoshida, S., Mulder, L., Sato, S., Kaneko, T., Tabata, S., Sandal, N., Stougaard, J., Szczyglowski, K. and Parniske, M. 2002. A plant receptor-like kinase required for both bacterial and fungal symbiosis. *Nature.* 417: 959-962.
- Sullivan, J. T., Patrick, H. N., Lowther, W. L., Scott, D. B. and Ronson, C. W. 1995. Nodulating strains of *Rhizobium loti* arise through chromosomal symbiotic gene transfer in the environment. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 92: 8985-8989.
- Sullivan, J. T. and Ronson, C. W. 1998. Evolution of rhizobia by acquisition of a 500-kb symbiosis island that integrates into a phe-tRNA gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 95: 5145-5149.
- Sullivan, J. T., Trzebiatowski, J. R., Cruickshank, R. W., Gouzy, J., Brown, S. D., Elliot, R. M., Fleetwood, D. J., McCallum, N. G., Rossbach, U., Stuart, G. S., Weaver, J. E., Webby, R. J., De Bruijn, F. J. and Ronson, C. W. 2002. Comparative sequence analysis of the symbiosis island of *Mesorhizobium loti* strain R7A. *J. Bacteriol.* 184: 3086-3095.
- Sy, A., Giraud, E., Jourand, P., Garcia, N., Willems, A., de Lajudie, P., Prin, Y., Neyra, M., Gillis, M., Boivin-Masson, C. and Dreyfus, B. 2001. Methylotrophic *Methylobacterium* bacteria nodulate and fix nitrogen in symbiosis with legumes. *J. Bacteriol.* 183: 214-220.
- Szeverenyi, I., Nagy, Z., Farkas, T., Olasz, F. and Kiss, J. 2003. Detection and analysis of transpositionally active head-to-tail dimers in three additional *Escherichia*

- coli* IS elements. *Microbiology*. 149: 1297-1310.
- Tuckerman, J. R., Gonzalez, G. and Gilles-Gonzalez, M. A. 2001. Complexation precedes phosphorylation for two-component regulatory system FixL/FixJ of *Sinorhizobium meliloti*. *J. Mol. Biol.* 308: 449-455.
- Turlan, C., Ton-Hoang, B. and Chandler, M. 2000. The role of tandem IS dimers in IS911 transposition. *Mol. Microbiol.* 35: 1312-1325.
- Uchiumi, T., Abe, M. and Higashi, S. 1998. Integration of the temperate phage ϕ U into the putative tRNA gene on the chromosome of its host *Rhizobium leguminosarum* biovar *trifolii*. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 44: 93-99.
- Uchiumi, T., Higashi, S. and Abe, M. 1995. Nodule formation by clover-*Rhizobium* carrying chromosomal *nod* genes. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 41: 11-21.
- Uchiumi, T., Ohwada, T., Itakura, M., Mitsui, H., Nukui, N., Dawadi, P., Kaneko, T., Tabata, S., Yokoyama, T., Tejima, K., Saeki, K., Omori, H., Hayashi, M., Maekawa, T., Sriprang, R., Murooka, Y., Tajima, S., Simomura, K., Nomura, M., Suzuki, A., Shimoda, Y., Sioya, K., Abe, M. and Minamisawa, K. 2004. Expression islands clustered on the symbiosis island of the *Mesorhizobium loti* genome. *J. Bacteriol.* 186: 2439-2448.
- Velázquez, E., Peix, A., Zurdo-Piñeiro, J. L., Palomo, J. L., Mateos, P. F., Rivas, R., Muñoz-Adelantado, E., Toro, N., García-Benavides, P. and Martínez-Molina, E. 2005. The coexistence of symbiosis and pathogenicity-determining genes in *Rhizobium rhizogenes* strains enables them to induce nodules and tumors or hairy roots in plants. *Mol. Plant. Microbe Interact.* 18: 1325-1332.
- Verma, D. P. and Hong, Z. 1996. Biogenesis of the peribacteroid membrane in root nodules. *Trends Microbiol.* 4: 364-368.
- Watson, B., Currier, T. C., Gordon, M. P., Chilton, M. D. and Nester, E. W. 1975.

Plasmid required for virulence of *Agrobacterium tumefaciens*. *J. Bacteriol.* 123: 255-264.

Wood, D. W., Setubal, J. C., Kaul, R., Monks, D. E., Kitajima, J. P., Okura, V. K., Zhou, Y., Chen, L., Wood, G. E., Almeida, N. F., Jr., Woo, L., Chen, Y., Paulsen, I. T., Eisen, J. A., Karp, P. D., Bovee, D., Sr., Chapman, P., Clendenning, J., Deatherage, G., Gillet, W., Grant, C., Kutayavin, T., Levy, R., Li, M. J., McClelland, E., Palmieri, A., Raymond, C., Rouse, G., Saenphimmachak, C., Wu, Z., Romero, P., Gordon, D., Zhang, S., Yoo, H., Tao, Y., Biddle, P., Jung, M., Krespan, W., Perry, M., Gordon-Kamm, B., Liao, L., Kim, S., Hendrick, C., Zhao, Z. Y., Dolan, M., Chumley, F., Tingey, S. V., Tomb, J. F., Gordon, M. P., Olson, M. V. and Nester, E. W. 2001. The genome of the natural genetic engineer *Agrobacterium tumefaciens* C58. *Science.* 294: 2317-2323.

Figure legends

Figure 1. Schematic presentation of horizontal gene transfer.

There are three pathways for horizontal gene transfer. Transduction is a specific horizontal gene transfer, as bacteriophages have a limited host range. Transformation can be considered the only prokaryotic horizontal gene transfer process. Approximately 90 transformable bacterial species have been identified, but not all are known to be competent for DNA uptake in the natural environment. Transformation involves the induction of competence, DNA binding, DNA fragmentation, DNA uptake and stable maintenance of the acquired DNA either by recombination or by recircularization of plasmid DNA. Conjugation means that the transfer of DNA between bacterial cells after cell-cell contact. Conjugation is mediated by mobile genetic elements (usually plasmids or transposons) and is unidirectional and conservative (a copy of the DNA remains in the donor strain).

Figure 2. Schematic presentation of pSym transfer by conjugation between *Rhizobium* and *Agrobacterium*.

Agrobacterium transconjugant Afp and Afcs strains were generated by the first conjugation procedure, and the *Rhizobium* transconjugant H1tr strains were generated by the second. Km, kanamycin; Rif, rifampicin; Nal, nalidixic acid.

Figure 3. Plasmid profile and nodulation of *Agrobacterium* strains.

(A) Agarose gel electrophoresis of total DNA from the *Agrobacterium* strains. (B) Southern hybridization using *nodBADF* of *R. leguminosarum* bv. *trifolii* 4S as a probe. (C) Root nodules formed by *Agrobacterium* transconjugant Afp1 in white clover. (D)

Root nodules formed by Afcs1. (E) Root nodules induced by *R. leguminosarum* bv. *trifolii* 4S5. All plants are shown 5 weeks after inoculation. Bar = 1 cm. Closed arrowheads in panels (A) and (B) indicate pRt4Sa::Tn5-*mob*. Open arrowheads in panel (B) indicate fragmented DNA containing both chromosomal and plasmid DNA.

Figure 4. Pulsed-field agarose gel electrophoresis of *PacI* and *SwaI* digests of genomic DNA from the *Agrobacterium* strains.

Agrobacterium transconjugant Afcs1 lacks the 980-kb (*PacI*) and 779-kb (*SwaI*) fragments (indicated by asterisks), and carries two fragments (~612 kb and ~534 kb; closed arrowheads) in the *SwaI* digest. Specific fragment (~325 kb; open arrowhead) in the *SwaI* digests of *Agrobacterium* transconjugant Afp1 were identified as the linear form of pRt4Sa::Tn5-*mob*. Lane M, size markers.

Figure 5. Identification of the integration site of pRt4Sa::Tn5-*mob* in the linear chromosome of *Agrobacterium*.

(A) Pulsed-field gel of the *SnaBI*- and *XbaI*-digests of genomic DNA from *Agrobacterium* strains. (B) to (D) Southern hybridization of the *SnaBI* and *XbaI* digests of genomic DNA from *Agrobacterium* strains. The probes used are named at the bottom of each panel. (F) Physical map of the restriction sites and locations of the probes for identifying the integration site at the 706.7 and 1330.9 kb positions in the linear chromosome of *Agrobacterium*. Closed arrowheads indicate *SnaBI* restriction sites. Open arrowheads indicate *XbaI* restriction sites. Probes S5, X15, X16-17, and S5-2 lack tRNA genes. Probe S5-2 includes the entire *int* gene. Lane M, size markers.

Figure 6. Physical map of the left and right junctions of the pRt4Sa::Tn5-*mob* and the

linear chromosome of *Agrobacterium* transconjugant Afcs1.

A portion (406-bp) of the *int* gene of *A. tumefaciens* (positioned between base pairs 926,945 and 927,350) is located at the left junction, while another portion (794-bp) of the gene (positioned between base pairs 927,342 and 928,135) is located at the right junction. The targeted *int* gene is indicated by the hatched box. At the left end of pRt4Sa::Tn5-*mob*, IS50R and the sequences of pSUP5011 are located downstream of the another portion of the *int* gene. At the right end of pRt4Sa::Tn5-*mob*, the entire Tn5-*mob* is inserted, and two open reading frames are located upstream of the divided *int* gene. These open reading frames are homologous to *Bradyrhizobium japonicum* ABC transporter permease protein and to *B. japonicum* ABC transporter substrate-binding protein. *Amp*, ampicillin resistance gene; *cm*, chloramphenicol acetyltransferase gene; *tet*, tetracycline resistance gene.

Figure 7. Scheme for the both junction regions of pRt4Sa::Tn5-*mob* and comparison of their sequences.

The integrated pRt4Sa::Tn5-*mob* into *Agrobacterium* linear chromosome was flanked with the divided *int* gene (406 bp at left and 794 bp at right) and the IS50R sequences in the same orientation at both junctions. Comparison of the sequences between the both junctions revealed that nine base pairs of the *int* gene were duplicated at both junctions.

Figure 8. Tn5 structure and schematic diagram of the Tn5 transposition mechanism.

(A) Tn5 structure. Transposable insertion sequence IS50s bracket three antibiotic resistance genes, kanamycin and neomicyn (*km/nm*), bleomycin (*bm*), streptomycin (*str*). The IS50 elements are defined by two 19 bp sequences termed the outside end (OE) and

inside end (IE). One of the elements, IS50R, encodes transposon (Tnp) and an inhibitor (Inh) of transposition. (B) Tn5 transposition mechanism. Synaptic complexes are formed after Tnp binds to the ends and then dimerizes forming both Tnp-Tnp. The released synaptic complex then captures target DNA (9 bp) and strand transfer occurs. After strand transfer complex disengagement, the host fills in the two 9 bp gaps at either end of the integrated gaps.

Figure 9. Root nodules induced by *Rhizobium* strains, and characterization of plasmids in *Rhizobium* strains.

Root nodules induced by *Rhizobium* transconjugants (A) H1tr1 and (B) H1tr7 and by (C) *R. leguminosarum* bv. *trifolii* 4S5. Host white clover seedlings were cultivated for 35 days after inoculation with each bacterial strain. (D) Agarose gel electrophoresis of total DNAs isolated from the *Rhizobium* strains. (E) Southern hybridization using the *nodBADF* region of *R. leguminosarum* bv. *trifolii* 4S as the probe. Bars in panels (A) to (C) = 1 cm. Closed arrowheads in panels (D) and (E) indicate pRt4Sa::Tn5-*mob*. Open arrowheads in panel (E) indicate total DNA fragments hybridized with the *nod* gene probe.

Figure 10. Agarose gel electrophoresis and Southern hybridization of *PacI* and *SwaI* digests of genomic DNA from *Rhizobium* strains.

(A) and (C) Pulsed-field gel of the *PacI* or *SwaI* digests of *Rhizobium* strains. (B) and (D) Southern hybridization using the *nodBADF* region of *R. leguminosarum* bv. *trifolii* 4S as the probe. Asterisks in panels (A) and (C) indicate the fragments hybridized with the *nod* gene probe in panels (B) and (D). No hybridized fragment was detected in strain H1. Lane M, size markers.