

プラスミドの接合伝達に関する遺伝因子・環境因子

Genetic Elements and Environmental Factors Involved in the Plasmid Conjugation

松井 一泰¹, 新谷 政己², 山根 久和¹, 野尻 秀昭^{1*}

KAZUHIRO MATSUI¹, MASAKI SHINTANI², HISAKAZU YAMANE¹ and HIDEAKI NOJIRI^{1*}

¹ 東京大学生物生産工学研究センター 〒113-8657 文京区弥生 1-1-1

² 理化学研究所バイオリソースセンター微生物材料開発室 〒351-0198 埼玉県和光市広沢 2-1

* TEL: 03-5841-3064 FAX: 03-5841-8030

* E-mail: anojiri@mail.ecc.u-tokyo.ac.jp

¹ Biotechnology Research Center, The University of Tokyo, 1-1-1 Yayoi, Bunkyo-ku, Tokyo 113-8657, Japan

² BioResource Center, Japan Collection of Microorganisms, RIKEN, 2-1 Wako, Hirosawa, Saitama 351-0198, Japan

キーワード: IncP-7 群プラスミド, 接合伝達, pCAR1

Key words: IncP-7 plasmid, conjugation, pCAR1

(原稿受付 2011年11月21日/原稿受理 2011年12月6日)

1. はじめに

プラスミドは様々な細菌間を接合伝達によって移動する可動性遺伝因子である。プラスミドは、薬剤耐性能や病原性など種々の遺伝子を伝播することで細菌の急速な進化・適応能の原動力となるため、古くから研究がなされてきた。それによれば、プラスミドの接合伝達は、宿主の置かれた環境の何らかの因子(温度・栄養条件など)に反応して開始される。自己伝達性プラスミドは *oriT* (origin of transfer), relaxase, type IV coupling protein (T4CP) からなる遺伝子領域で構成される MOB (Mobility) もしくは Dtr (DNA transfer and replication) と、タンパク質分泌機構である type IV secretion system (T4SS) を構成する MPF (mating pair formation) を持ち、MOB がプラスミド DNA の切断や複製を行い、MPF が供与菌と受容菌の菌体間を接着し、双方をつなぐ管状の接合橋を形成する。可動性プラスミドは MPF を持たず、なかには T4CP も持たないものもあり、細胞内の他の因子が持つ MPF を利用して接合伝達される。なお、接合伝達システムは relaxase の系統分類をもとに6つのファミリー (MOB_F, MOB_H, MOB_Q, MOB_C, MOB_R, MOB_V) に分類されている⁹⁾。

プラスミドの接合伝達では、まず、relaxase がプラスミド DNA の *oriT* 領域に結合し、二本鎖 DNA にニック(切れ目)を入れ、二本鎖を開裂する。この relaxase - 輸送 DNA 複合体は T4CP によって T4SS に連結され、T4CP が ATP を消費してタンパク質 - DNA 複合体を T4SS を通して受容菌に輸送する(図1)。受容菌内では、relaxase が供与菌から輸送される一本鎖 DNA のもう一方の末端を認識し、再環化する。プラスミドは受容菌内に侵入した後、受容菌からの制限・修飾系を回避し

ながら複製されることで初めて接合伝達が成立し、さらに安定に分配されることで、プラスミドを獲得した接合伝達体コロニーが得られる。

プラスミドの接合伝達の機構はほぼ共通であるにもかかわらず、その伝達頻度は、プラスミドの種類によって、また供与菌・受容菌の組合せ、接合の環境などによって著しく変化する³⁹⁾。腸チフスの原因細菌である *Salmonella enterica* serovar Typhi 由来の IncHI 多剤耐性プラスミドでは、接合に必要な遺伝子の転写が低温下で誘導されること¹⁾、また、IncF プラスミドは長く柔らかい性繊毛を持ち液体中で接合しやすく、IncP プラスミドは短く硬い性繊毛を持ち固体表面上で接合しやすい、といった性繊毛の性質によって液体中・固体表面上での接合の生じやすさが異なること³⁹⁾ は解っているが、未だその理由の大半は不明である。つまり接合伝達の成否を決める環境因子とその作用機構について知見は不足していると言って良い。

2. 自己伝達性プラスミド pCAR1

筆者らの研究室では、原油中に含まれるヘテロ環式芳香族化合物 carbazole を唯一の炭素源・窒素源・エネルギー源として生育可能な *Pseudomonas resinovorans* CA10 株を活性汚泥中から単離し、その詳細な解析を行ってきた²³⁾。難分解性物質の分解遺伝子群もプラスミドによって細菌間を水平伝播することが多いが^{7,25,26,40)}、CA10 株の carbazole 代謝に必要な酵素をコードする *car* 遺伝子群もプラスミド pCAR1 上に存在していた^{24,28,29)}。筆者らのグループでは pCAR1 の全長約 200 kb の全塩基配列を決定し^{21,37)}、pCAR1 がプラスミドの不和合性群という分類上 IncP-7 群に属することを示した³³⁾。また、塩

基配列情報から推定された pCAR1 の複製・保持・接合伝達に関わる機能の基本性質を明らかにした³⁶⁾。これは IncP-7 群プラスミドの基本機能を詳細に解析した最初の例であった。IncP-7 群プラスミドは土壌・水圏・動物体内など環境に広く分布する *Pseudomonas* 属細菌間を接合伝達によって移動する¹²⁾。IncP-7 群のプラスミドとしては、toluene/xylene 分解プラスミド pWW53³⁸⁾、pDK1^{13,41)} や naphthalene 分解プラスミド pND6-1¹⁷⁾、pAK5、pFME4、pFME5、pNK33、pNK43、pOS18、pOS19¹¹⁾ など近年急速に報告例が増加しており、環境中での分解関連遺伝子の重要な運び手の一つであることが示されつつある。

3. IncP-7 群プラスミドの接合伝達関連遺伝子と接合伝達

pCAR1 上には、*Proteus vulgaris* の Rts1 (IncT)²²⁾、

Salmonella typhi の R27 (IncHI)^{14,31)}、*Providencia rettgeri* の R391²⁾、*S. enterica* の SG11³⁾ の接合伝達に関する Trh タンパク質や Tra タンパク質とアミノ酸レベルで 19 ~ 50% の相同性を示す ORF が存在する (図 2)。また、同じ IncP-7 群に属する自己伝達性プラスミド pDK1 上には、それらと 83 ~ 99% の高い相同性を示す遺伝子群が存在する (図 2)。

ORF121_{pCAR1} がコードするタンパク質 (全長 900 アミノ酸) の N 末端側 373 アミノ酸は、R391 と R27 の TraI タンパク質 (それぞれ全長 717 アミノ酸と 1,012 アミノ酸) の N 末端側とそれぞれ 36% と 32% の相同性を有する。R27 の TraI_{R27} は relaxase に保存された 3 つのモチーフ (I ~ III) を持ち、oriT の位置で DNA に nick を入れ接合伝達を開始する機能を持つ relaxase であると考えられている^{18,31)}。ORF121_{pCAR1} タンパク質上には、relaxase のモチーフ I と II は明確には見いだせないが、

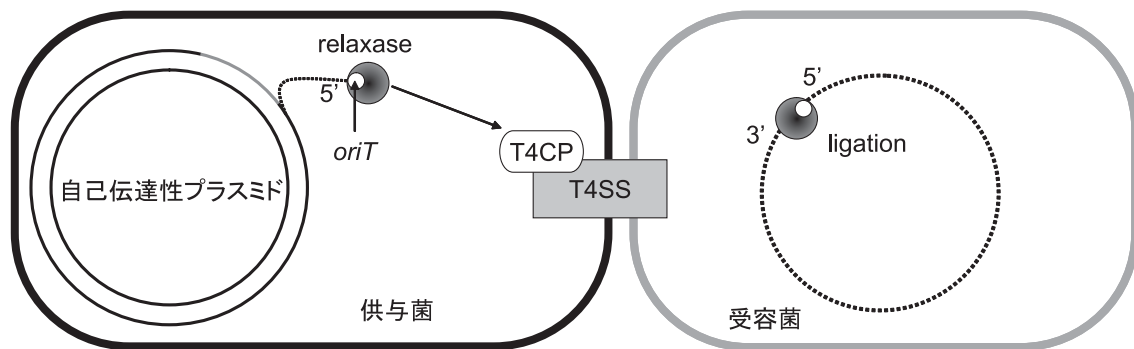


図 1. 接合伝達のモデル。

Relaxase が oriT からプラスミドの二本鎖 DNA を開裂し、ATPase 活性を持つ T4CP と相互作用することで、T4SS から受容菌へと一本鎖 DNA を輸送する。

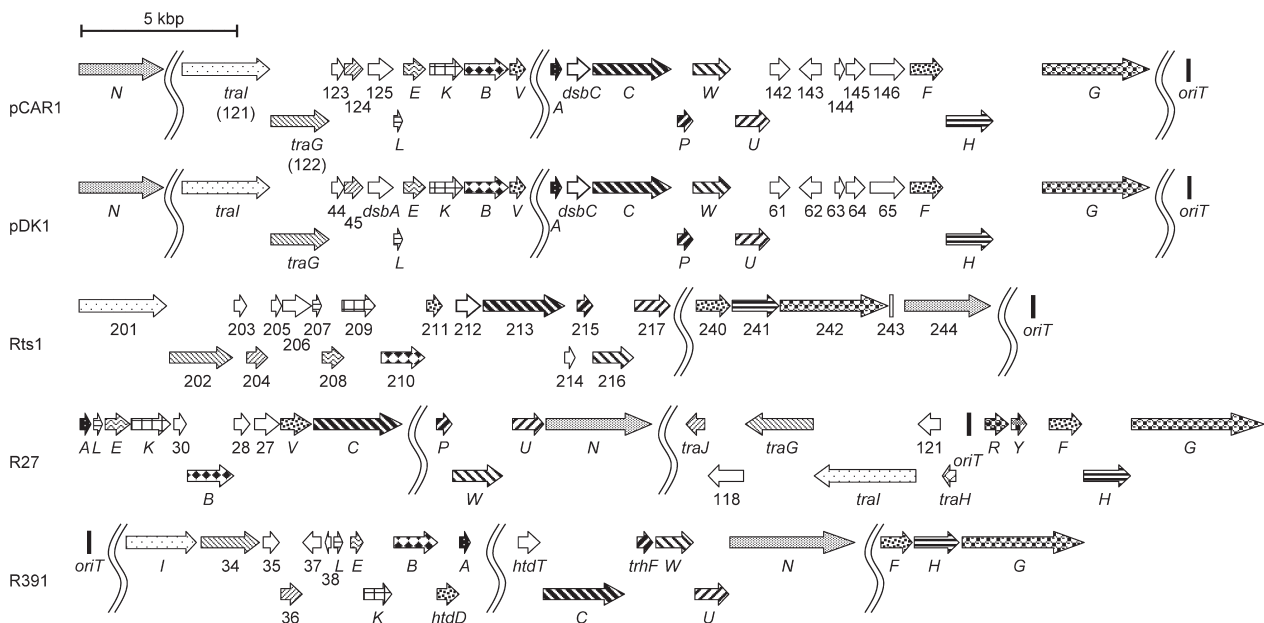


図 2. pCAR1^{21,42)}、pDK1⁴¹⁾、R27^{10,14,15)}、R391^{2,4)}、Rts1²²⁾ の接合伝達関連遺伝子群の構造比較。

同じ模様・矢印は相同性のある遺伝子を表し、矢印の方向に転写される。矢印の下の英数字は遺伝子名または ORF を表し、pCAR1、pDK1、R27 は 'trh' を、R391 は 'tra' を省略して表記している。例えば pCAR1 の N は trhN を表し、123 は ORF123 を表す。波線は間の塩基配列を省略していることを表す。

モチーフ III は保存されていた。一方、ORF122_{pCAR1} がコードするタンパク質は R391 の TraD_{R391} と R27 の TraG_{R27} とそれぞれ全長で 47% と 28% の相同性を示した。R27 の TraG_{R27} は 2 つの膜貫通ドメインと ATP/GTP 結合モチーフ A を持ち、RP4 の TraG_{RP4} や F プラスミドの TraD_F のように anchoring/coupling タンパク質であると考えられている⁴³⁾。pCAR1 の ORF122_{pCAR1} にも ATP/GTP 結合モチーフ A が存在する。上で述べた特徴は、ORF121_{pCAR1} と ORF122_{pCAR1} は接合時にそれぞれ relaxase と anchoring/coupling タンパク質として機能することを示唆している。そこで ORF121_{pCAR1} と ORF122_{pCAR1} を *traI_{pCAR1}* と *traG_{pCAR1}* と命名した^{21,42)}。先に述べた Garcillan-Barcia らの分類に基づく、pCAR1 の TraI_{pCAR1} の相同性に基づいて pCAR1 の接合伝達システムは MOB_H に分類される⁹⁾。

Rts1 の *oriT* 領域 (455 bp) は ORF251_{Rts1} と ORF252_{Rts1} の遺伝子間領域に存在する。pCAR1 の ORF155_{pCAR1} は Rts1 の ORF252_{Rts1} と 43% の相同性を示す。pCAR1 の TraI_{pCAR1} と Rts1 の TraI_{Rts1} が高い相同性を示すことから、これら 2 つのプラスミドの *oriT* も互いに相同性があると思われる。実際に、pCAR1 の ORF155_{pCAR1} 近傍に 465 bp からなる推定 *oriT* 領域が存在し、Rts1 の *oriT* 領域と 42% の相同性を示した。Rts1 の *oriT* 領域には Tra タンパク質が認識すると思われる 3 つの逆方向反復配列が存在するが、pCAR1 上の推定 *oriT* 領域にも 2 つの逆方向反復配列が存在する^{21,42)}。

ORF145_{pCAR1} と ORF146_{pCAR1} は Rts1 と R391 上にコードされる機能未知タンパク質と部分的な相同性を示した。ORF145_{pCAR1} と ORF146_{pCAR1} を欠失した pCAR1 を保持する *P. putida* KT2440 株から、pCAR1 を保持しない KT2440 株への接合伝達頻度は、野生型の pCAR1 と比較して約 1/100 以下まで減少することが示されている (Shintani et al., unpublished data)。IncP-7 群プラスミドのミニレプリコンを *Pseudomonas* 属細菌内にエレクトロポレーションによって導入した結果、接合伝達では IncP-7 群プラスミドを受容できない細菌であっても、ミニレプリコンを有する形質転換体が得られた⁴²⁾。このことは、複製能によって決められる IncP-7 群プラスミドの宿主域の方が、接合伝達能によって決められる宿主域

よりも広く、接合伝達の成否によって IncP-7 群プラスミドの宿主域が決められることを示している^{33,42)}。

IncHI プラスミドの性繊毛は「柔かく」、接合伝達頻度は土壌のような「固い」環境中に比べて水環境の方が高いという性質がある¹⁶⁾。このことから、IncHI の性繊毛と相同性のある pCAR1 の性繊毛も「柔かく」、水環境中において効率的に接合伝達すると考えられる。IncHI プラスミドのもう一つの特徴として、温度依存的な接合伝達機構があり、接合伝達頻度が 25 ~ 30°C で最大となり、温度が上昇するにつれて減少する²⁷⁾。また、R27 には核様体タンパク質 (nucleoid-associated proteins, NAPs) の一種である H-NS (Histone-like Nucleoid Structuring) 様タンパク質と、H-NS のホモログであり DNA 結合領域を欠失した Hha 様タンパク質 (大腸菌内での温度、浸透圧依存的な病原遺伝子の発現に関与するタンパク質) がコードされているが³¹⁾、R27 上の NAPs や大腸菌染色体上の NAPs を破壊すると、野生型 R27 は接合伝達できない 33°C でも接合伝達が可能となる⁸⁾。しかし、*P. putida* HS01 株から *P. fluorescens* IAM-112022RG 株への pCAR1 の接合伝達頻度は 25°C、37°C、42°C の条件下では差は認められず³²⁾、pCAR1 の接合伝達機構が IncHI プラスミドとは異なる可能性が示唆されている。また、実験室内環境で *Pseudomonas* 属に属する 5 株の pCAR1 の保持菌 (供与菌) と *Pseudomonas* 属・非 *Pseudomonas* 属細菌 10 株との接合実験を行ったところ、供与菌の種類によって pCAR1 の接合伝達頻度が変化すること、*P. putida* HS01 株を供与菌とした際には、*P. resinovorans* CA10 株や *P. putida* KT2440 株を供与菌とした場合よりも接合伝達体が検出される受容菌の種類が多いことが示された³²⁾ (表 1)。この実験では、*Pseudomonas* 属細菌以外への pCAR1 の接合伝達は認められなかった。また、*P. putida* KT2440 株を供与菌にした場合のように、受容菌の組み合わせによっては同じ種への接合伝達を検出できない例もあった。

4. 環境中における pCAR1 の接合伝達と宿主域

IncP-7 群プラスミドは一般に狭宿主域であり、主に *Pseudomonas* 属細菌を宿主とすると考えられていた¹²⁾。

表 1. 異なる供与菌における pCAR1 の接合伝達頻度^{a)}

	HS01	DS1	JCM2778	KT2440K	CA10
<i>Burkholderia</i> sp. PJ310GK	-	-	-	-	-
<i>Comamonas testosteroni</i> JCM 5832 ^T	-	-	-	-	-
<i>Escherichia coli</i> CAG18620 (ME8878)	-	-	-	-	-
<i>Pseudomonas. putida</i> DS1RG	+++	+++	+	-	-
<i>P. chlororaphis</i> subsp. <i>chlororaphis</i> JCM 2778 ^T	+	+	+	-	-
<i>P. putida</i> KT2440RG	+	+	+	+++	++
<i>P. resinovorans</i> CA10dm4RG	++	++	++	++	+++
<i>P. fluorescens</i> JCM 5963 ^T	+	+	+	-	-
<i>P. putida</i> JCM 13063 ^T	+	+	+	-	-
<i>P. stutzeri</i> JCM 5965 ^T	+	+	+	-	-

^{a)} 接合伝達頻度は <10⁻⁷ per donor (検出限界以下) を -, 10⁻⁷ ~ 10⁻⁵ per donor を +, 10⁻⁵ ~ 10⁻³ per donor を ++, 10⁻³ ~ 10⁻¹ per donor を +++ と表記した。

しかし、環境試料（雑多な環境細菌を含む混合物）を受容菌群として接合実験を行ったところ、carbazole存在下という選択圧下では *Pseudomonas* 属細菌が接合伝達体として多く検出されたものの、非選択圧下では *Stenotrophomonas* 属細菌のみが接合伝達体として検出された³⁴⁾。 *Pseudomonas* 属以外の細菌が IncP-7 群プラスミドを保持することは、この実験において初めて見いだされた事象である。これまでの実験室内環境での接合実験では、*P. putida* KT2440 (pCAR1) から *Stenotrophomonas* 属細菌への接合伝達は認められていないことから (Shintani et al., unpublished data), 自然環境中の何らかの物質が接合伝達を促進した可能性や、他の細菌を経由して pCAR1 が水平伝播した可能性が考えられる。また、carbazole 非存在下で *Pseudomonas* 属細菌以外が主要な宿主であった事実から考えると、特別な選択圧がかからない自然環境下では、必ずしも *Pseudomonas* 属細菌が IncP-7 群プラスミドの主要な宿主ではない可能性が考えられる。すなわち、*Pseudomonas* 属細菌は人為的な培地での生育の早さなどのバイアスによって、より頻繁に IncP-7 群プラスミドの宿主として検出されたもので、実際の自然環境中では IncP-7 群プラスミドはより広範な細菌に保持されていると推測されている³⁴⁾。

また、我々は pCAR1 のモデル環境中での振る舞いを調べるために、実際の土壌や環境水を模したモデル環境試料に carbazole を添加後、pCAR1 を保持する *P. putida* と 15 株の pCAR1 非保持菌株を接種し、carbazole 残存量変化、菌体数変化、接合伝達のモニタリングを行っ

た³⁵⁾。その結果、接合伝達体はモデル水環境中から検出されたが、モデル土壌中からは検出されなかったことから、pCAR1 は水環境中で伝達し易いことが示唆された。モデル水環境の成分分析の結果、接合伝達体が出現した河川水や湖沼水と比較して、接合伝達体が出現しなかった対照区（リン酸系バッファー）では Cl⁻, SO₄²⁻, Ca²⁺, Mg²⁺, Fe²⁺ が検出されなかった（表 2）。そこで、リン酸バッファーにこれらのイオンを添加し接合実験を行ったところ、Ca²⁺ もしくは Mg²⁺ を添加した際に接合伝達体が出現した（表 3）。添加するイオンの濃度を表 3 の 1/10 に減少させても接合伝達体を検出されたことから、少なくとも 39.9 μM の Ca²⁺ もしくは 37 μM の Mg²⁺ が存在すれば、pCAR1 が接合伝達することが示された³⁵⁾。対照的に、スラリー状のモデル土壌の上部に溜まった水層に存在するフミン酸が pCAR1 の接合伝達を阻害する現象も観察されている。フミン酸は二価の陽イオンをキレートすることが知られていることから、水層の Ca²⁺, Mg²⁺ イオン濃度が pCAR1 の接合伝達には不十分であったことが上記の阻害効果の原因と思われる。また、接種する pCAR1 保持菌株を *P. chlororaphis*, *P. fluorescens*, *P. resinovorans* に変えて同様の実験を行ったところ、*P. chlororaphis* を pCAR1 保持菌株として接種したサンプルのみ接合伝達体が出現した。興味深いことに、出現した接合伝達体は *P. putida* を pCAR1 保持菌株として接種したときと同様、すべて *P. resinovorans* であった^{35,36)}。各モデル環境試料中に接種した pCAR1 の宿主とそれ以外の細菌 15 株には、供与菌・受容菌を一種類

表 2. モデル水環境に存在する各種イオン濃度^a (μM)

イオン	リン酸バッファー	河川水	湖沼水
Cl ⁻	0	2,310	420
SO ₄ ²⁻	0	501	132
NH ₄ ⁺	37,400	394	2.77
NO ₃ ⁻	37,600	85.5	61.3
PO ₄ ³⁻	21,400	6.32	6.95
Na ⁺	31,000	2,460	605
K ⁺	5,860	194	61.4
Ca ²⁺	0	402	147
Mg ²⁺	0	391	317
Fe ²⁺	0	<1.79	<1.79

^a リン酸バッファーは試薬への不純物の混入がないと仮定した場合の各イオンの濃度、その他は実測値を示す。

表 3. モデル水環境に添加した各種イオン濃度^a (μM) と接合伝達の成否

イオン	リン酸バッファー	+CaCl ₂	+MgSO ₄	+Ca(NO ₃) ₂	+Mg(NO ₃) ₂	+KCl	+Na ₂ SO ₄
Cl ⁻	0	790	0	0	0	1020	0
SO ₄ ²⁻	0	0	385	385	0	0	708
Ca ²⁺	0	399	0	399	0	0	0
Mg ²⁺	0	0	370	0	370	0	0
Fe ²⁺	0	0	0	0	0	0	0
接合 ^b	No	Yes	Yes	Yes	Yes	No	No

^a リン酸バッファーは試薬への不純物の混入がないと仮定した場合の各イオンの濃度、その他は実測値を示す。

^b No は接合伝達体を検出限界以下 (5.0×10^2 CFU/ml), Yes は接合伝達体を検出されたことを表す。

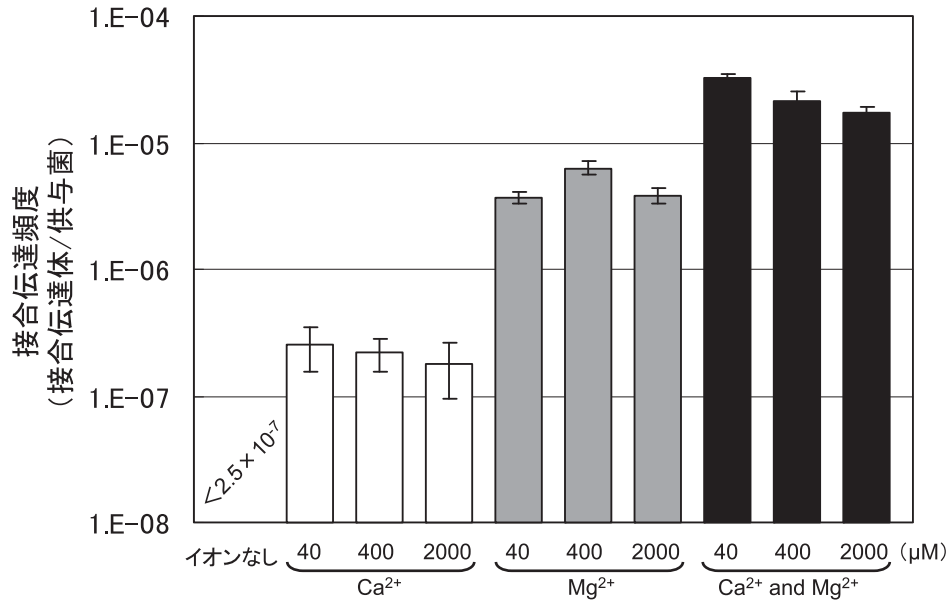


図3. 各イオン濃度における接合伝達頻度.

横軸は各イオンの濃度、縦軸は接合伝達頻度（接合伝達体数／供与菌数）を表す。イオンなし：Ca²⁺、Mg²⁺ 無添加，Ca²⁺：Ca²⁺ 単独添加，Mg²⁺：Mg²⁺ 単独添加，Ca²⁺ and Mg²⁺ each：Ca²⁺、Mg²⁺ 両方添加，イオンの上の数字は添加したイオンの終濃度（μM），イオンなし上部の数字は検出限界を表す。接合伝達頻度は独立した3回の実験の平均値を，標準偏差と共に示す。

ずつ用いた接合実験では pCAR1 が接合伝達可能な組み合わせが複数存在するにもかかわらず³²⁾，試料から接合伝達体を検出できたのは，そのうちの一部にとどまった。従って pCAR1 の宿主によっては陽イオンの存在がその接合伝達に寄与しない可能性も考えられる。これらのことは，二価の陽イオンが環境中での pCAR1 の宿主域にも影響を与えている可能性を示唆している。

5. Ca²⁺ と Mg²⁺ が pCAR1 の接合伝達頻度に及ぼす影響の評価

Ca²⁺ と Mg²⁺ が pCAR1 の接合伝達頻度に及ぼす影響を評価するために，*Pseudomonas putida* SM1443 (pCAR1::rfp) 株³⁴⁾ を供与菌，*P. putida* KT2440RG 株³²⁾ を受容菌として，Ca²⁺ と Mg²⁺ の濃度を調整したリン酸バッファー中で液体接合（供与菌と受容菌の混合懸濁液を静置し，液体中で接合伝達を行う方法）を行った。その結果，Ca²⁺ と Mg²⁺ はどちらも接合伝達頻度を上昇させること，単独添加による効果は Ca²⁺ よりも Mg²⁺ の方が大きいこと，Ca²⁺ と Mg²⁺ を両方添加することで接合伝達頻度が相乗的に上昇することが明らかとなった（図3）。また，各イオンは 40 μM 以上添加しても接合伝達頻度の上昇は見られなかったが，これはリン酸バッファー中には多量の PO₄³⁻ が存在することから，二価の陽イオンを一定以上加えると沈殿物を生じてしまうことが原因であると思われる。

6. トランスポゾン破壊株ライブラリを用いた新規接合関連遺伝子の探索

これまでに接合伝達機構について詳細な研究がされている IncW プラスミド R388⁵⁾ において，Ca²⁺ と Mg²⁺

が IncW プラスミドの接合伝達に必要な ATPase である TrwD と他の細菌の細胞膜との相互作用を促進し，その効果は Ca²⁺ の方が Mg²⁺ より高いことが報告されている²⁰⁾。F プラスミドにおいても，接合伝達の際にプラスミドの切断を行う酵素 relaxase の *in vitro* における活性に二価の陽イオンが必須であることが示されている¹⁹⁾。しかし，pCAR1 を用いた本研究以外に環境中において二価の陽イオンが重要であるとの報告例は無いことや，R388 や IncP-1 プラスミドの pB10³⁰⁾ 等の他のプラスミドでは環境中の二価陽イオンの有無で接合伝達頻度に差が検出できないこと（Matsui et al., unpublished data）から，IncP-7 プラスミドには IncW や F プラスミドとは異なる二価の陽イオンを必要とする理由があると考えられる。そこで現在は，トランスポゾン挿入変異を利用したプラスミド供与菌，及び受容菌の破壊株ライブラリをプラスポゾン⁶⁾ を用いて作製し，Ca²⁺、Mg²⁺ 存在・非存在下で接合実験を行うことで，プラスミドの接合伝達に関与する遺伝子，特に二価の陽イオンに関する遺伝子の探索を行っている。これまでに二価の陽イオン依存性ではないものの，受容菌の破壊株ライブラリから接合伝達頻度を検出限界以下まで減少させる遺伝子候補が，供与菌（プラスミド上）からは接合伝達頻度を上昇させる破壊株が得られている。

上でも述べたように，二価の陽イオンを添加しても接合伝達現象が起こらない（検出できるまでに頻度が上がらない？）宿主が存在することから，特定の宿主内で影響を受ける特別なタンパク質があるのかもしれない。つまり，本研究でターゲットとするタンパク質は，従来の接合伝達現象に必須なものではないかもしれないが，宿主によって挙動を変化させ，その宿主域を変えうる，新たな因子の発見が期待される。

文 献

- 1) Alonso, G., K. Baptista, T. Ngo, and D.E. Taylor. 2005. Transcriptional organization of the temperature-sensitive transfer system from the IncHI1 plasmid R27. *Microbiology*. 151: 3563–3573.
- 2) Böltner, D., C. MacMahon, J.T. Pembroke, P. Strike, and A.M. Osborn. 2002. R391: a conjugative integrating mosaic comprised of phage, plasmid, and transposon elements. *J. Bacteriol.* 184: 5158–5169.
- 3) Boyd, D., G.A. Peters, A. Cloeckaert, K.S. Boumedine, E. Chaslus-Dancla, H. Imberechts, and M.R. Mulvey. 2001. Complete nucleotide sequence of a 43-kilobase genomic island associated with the multidrug resistance region of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium DT104 and its identification in phage type DT120 and serovar Agona. *J. Bacteriol.* 183: 5725–5732.
- 4) Ceccarelli, D., A. Daccord, M. René, and V. Burrus. 2008. Identification of the origin of transfer (*oriT*) and a new gene required for mobilization of the SXT/R391 family of integrating conjugative elements. *J. Bacteriol.* 190: 5328–5338.
- 5) Datta, N. and R.W. Hedges. 1972. Trimethoprim resistance conferred by W plasmid in Enterobacteriaceae. *J. Gen. Microbiol.* 72: 349–355.
- 6) Dennis, J.J. and G.J. Zylstra, 1998. Plasposons: modular self-cloning minitransposon derivatives for rapid genetic analysis of gram-negative bacterial genomes. *Appl. Environ. Microbiol.* 64: 2710–2715.
- 7) Dennis, J.J. 2005. The evolution of IncP catabolic plasmid. *Curr. Opin. Biotechnol.* 16: 291–298.
- 8) Forns, N., R.C. Baños, C. Balsalobre, A. Juárez, and C. Madrid. 2005. Temperature-dependent conjugative transfer of R27: role of chromosome- and plasmid-encoded Hha and H-NS proteins. *J. Bacteriol.* 187: 3950–3959.
- 9) Garcillan-Barcia, M.P., M.V. Francia, and F. de la Cruz. 2009. The diversity of conjugative relaxases and its application in plasmid classification. *FEMS Microbiol. Rev.* 33: 657–687.
- 10) Gilmour, M.W., N.R. Thomson, M. Sanders, J. Parkhill, and D.E. Taylor. 2004. The complete nucleotide sequence of the resistance plasmid R478: defining the backbone components of incompatibility group H conjugative plasmids through comparative genomics. *Plasmid*. 52: 182–202.
- 11) Izmalkova, T.Y., O.I. Sazonova, S.L. Sokolov, I.A. Kosheleva, and A.M. Boronin. 2005. The P-7 incompatibility group plasmids responsible for biodegradation of naphthalene and salicylate in fluorescent *Pseudomonads*. *Microbiology (Pleiadis Publishing)* 74: 342–348.
- 12) Jacoby, G.A. 1986. Resistance plasmids of *Pseudomonas*, pp. 265–293. In: Sokatch JR (ed) *The bacteria*. Vol. X. Academic Press, Orlando, FL.
- 13) Kunz, D.A. and P.J. Chapman. 1981. Isolation and characterization of spontaneously occurring TOL plasmid mutants of *Pseudomonas putida* HS1. *J. Bacteriol.* 146: 952–964.
- 14) Lawley, T.D., M.W. Gilmour, J.E. Gunton, L.J. Standeven, and D.E. Taylor. 2002. Functional and mutational analysis of conjugative transfer region 1 (Tra1) from the IncHI1 plasmid R27. *J. Bacteriol.* 184: 2173–2180.
- 15) Lawley, T.D., M.W. Gilmour, J.E. Gunton, D.M. Tracz, and D.E. Taylor. 2003. Functional and mutational analysis of conjugative transfer region 2 (Tra2) from the IncHI1 plasmid R27. *J. Bacteriol.* 185: 581–591.
- 16) Lawley, T.D., B.M. Wilkins, and L.S. Frost. 2004. Bacterial conjugation in gram-negative bacteria, pp. 203–226. In E. Funnell and G.J. Philips (eds.), *Plasmid Biology*. ASM Press, Washington, D.C.
- 17) Li, W., J. Shi, X. Wang, Y. Han, W. Tong, L. Ma, B. Liu, and B. Cai. 2004. Complete nucleotide sequence and organization of the naphthalene catabolic plasmid pND6-1 from *Pseudomonas* sp. strain ND6. *Gene* 336: 231–240.
- 18) Llosa, M., S. Bolland, and F. de la Cruz. 1994. Genetic organization of the conjugal DNA processing region of the IncW plasmid R388. *J. Mol. Biol.* 235: 448–464.
- 19) Lujan, S.A., L.M. Guogas, H. Ragonese, S.W. Matson, and M.R. Redinbo. 2007. Disrupting antibiotic resistance propagation by inhibiting the conjugative DNA relaxase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 30: 12282–12287.
- 20) Machón, C., S. Rivas, A. Albert, F.M. Goñi, and F. de la Cruz. 2002. TrwD, the hexameric traffic ATPase encoded by plasmid R388, induces membrane destabilization and hemifusion of lipid vesicles. *J. Bacteriol.* 184: 1661–1668.
- 21) Maeda, K., H. Nojiri, M. Shintani, T. Yoshida, H. Habe, and T. Omori. 2003. Complete nucleotide sequence of carbazole/dioxin-degrading plasmid pCAR1 in *Pseudomonas resinovorans* strain CA10 indicates its mosaicism and the presence of large catabolic transposon Tn4676. *J. Mol. Biol.* 326: 21–33.
- 22) Murata, T., M. Ohnishi, T. Ara, J. Kaneko, C.G. Han, Y.F. Li, K. Takashima, H. Nojima, K. Nakayama, A. Kaji, Y. Kamio, T. Miki, H. Mori, E. Ohtsubo, Y. Terawaki, and T. Hayashi. 2002. Complete nucleotide sequence of plasmid Rts1: implications for evolution of large plasmid genomes. *J. Bacteriol.* 184: 3194–3202.
- 23) Nojiri, H. Structural and molecular genetic analyses of the bacterial carbazole degradation system. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* in press.
- 24) Nojiri, H., H. Sekiguchi, K. Maeda, M. Urata, S. Nakai, T. Yoshida, H. Habe, and T. Omori. 2001. Genetic characterization and evolutionary implications of a *car* gene cluster in the carbazole degrader *Pseudomonas* sp. strain CA10. *J. Bacteriol.* 183: 3663–3679.
- 25) Nojiri, H., M. Shintani, and T. Omori. 2004. Divergence of mobile genetic elements involved in the distribution of xenobiotic-catabolic capacity. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 64: 154–174.
- 26) Ogawa, N., Chakrabarty, A.M., and Zaborina, O. 2004. Degradative plasmids, pp. 341–376. In E. Funnell and G.J. Philips (eds.), *Plasmid Biology*. ASM Press, Washington, D.C.
- 27) Rodriguez-Lemoine, V., A.E. Jacob, R.W. Hedges, and N. Datta. 1975. Thermosensitive production of their transfer systems by group S plasmids. *J. Gen. Microbiol.* 86: 111–114.
- 28) Sato, S., N. Ouchiyama, T. Kimura, H. Nojiri, H. Yamane, and T. Omori. 1997a. Cloning of genes involved in carbazole degradation of *Pseudomonas* sp. strain CA10: nucleotide sequences of genes and characterization of *meta*-cleavage enzymes and hydrolase. *J. Bacteriol.* 179: 4841–4849.
- 29) Sato, S., J.W. Nam, K. Kasuga, H. Nojiri, H. Yamane, and T. Omori. 1997b. Identification and characterization of genes encoding carbazole 1,9a-dioxygenase in *Pseudomonas* sp. strain CA10. *J. Bacteriol.* 179: 4850–4858.
- 30) Schlüter, A., H. Heuer, R. Szczepanowski, L.J. Forney, C.M. Thomas, A. Pühler, and E.M. Top. 2003. The 64,508 bp IncP-1β antibiotic multiresistance plasmid pB10 isolated from a wastewater treatment plant provides evidence for recombination between members of different branches of the IncP-1β group. *Microbiology* 149: 3139–3153.
- 31) Sherburne, C.K., T.D. Lawley, M.W. Gilmour, F.R. Blattner, V. Burland, E. Grotbeck, D.J. Rose, and D.E. Taylor. 2000. The complete DNA sequence and analysis of R27, a large IncHI plasmid from *Salmonella typhi* that is temperature sensitive for transfer. *Nucl. Acids Res.* 28: 2177–2186.
- 32) Shintani, M., H. Habe, M. Tsuda, T. Omori, H. Yamane, and H. Nojiri. 2005. Recipient range of IncP-7 conjugative plasmid pCAR2 from *Pseudomonas putida* HS01 is broader than from other *Pseudomonas* strains. *Biotechnol. Lett.* 27: 1847–1853.
- 33) Shintani, M., H. Yano, H. Habe, T. Omori, H. Yamane, M. Tsuda, and H. Nojiri. 2006. Characterization of the replication, maintenance, and transfer features of the IncP-7 plasmid pCAR1, which carries genes involved in carbazole and dioxin degradation. *Appl. Environ. Microbiol.* 72: 3206–3216.

- 34) Shintani, M., N. Fukushima, M. Tezuka, H. Yamane, and H. Nojiri. 2008a. Conjugative transfer of the IncP-7 carbazole degradative plasmid, pCAR1, in river water samples. *Biotechnol. Lett.* 30: 117–122.
- 35) Shintani, M., K. Matsui, T. Takemura, H. Yamane, and H. Nojiri. 2008b. Behavior of the IncP-7 carbazole-degradative plasmid pCAR1 in artificial environmental samples. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 80: 485–497.
- 36) Shintani, M., H. Yamane, and H. Nojiri. 2010. Behavior of various hosts of the IncP-7 carbazole-degradative plasmid pCAR1 in artificial microcosms. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 74: 343–349.
- 37) Takahashi, Y., M. Shintani, H. Yamane, and H. Nojiri. 2009. The complete nucleotide sequence of pCAR2: pCAR2 and pCAR1 were structurally identical IncP-7 carbazole degradative plasmid. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 73: 744–746.
- 38) Tsuda, M. and H. Genka. 2001. Identification and characterization of Tn4656, a novel class II transposon carrying a set of toluene-degrading genes from TOL plasmid pWW53. *J. Bacteriol.* 183: 6215–6224.
- 39) van Elsas, J.D., J. Fry, P. Hirsch and S. Molin. 2000. Ecology of plasmid transfer and spread, pp. 175–206. In C.M. Thomas. (ed.). *The Horizontal Gene Pool.* harwood academic publishers.
- 40) Williams, P.A., Jones, R.M., and Zylstra, G. 2004. Genomics of catabolic plasmids, pp. 165–195. In J.L. Ramos. (ed.), *Pseudomonas*, Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York.
- 41) Yano, H., C.E. Garruto, M. Sota, Y. Ohtsubo, Y. Nagata, G.J. Zylstra, P.A. Williams, and M. Tsuda. 2007. Complete sequence determination combined with analysis of transposition/site-specific recombination events to explain genetic organization of IncP-7 TOL plasmid pWW53 and related mobile genetic elements. *J. Mol. Biol.* 369: 11–26.
- 42) Yano, H., M. Miyakoshi, K. Ohshima, M. Tabata, Y. Nagata, M. Hattori, and M. Tsuda. 2010. Complete nucleotide sequence of TOL plasmid pDK1 provides evidence for evolutionary history of IncP-7 catabolic plasmids. *J. Bacteriol.* 192: 4337–4347.
- 43) Zatyka, M. and C.M. Thomas. 1998. Control of genes for conjugative transfer of plasmids and other mobile elements. *FEMS Microbiol. Rev.* 21. 291–319.