

原著論文 (通常論文)

異なる栄養条件下におけるプラスミドの接合伝達頻度の比較解析

Comparisons of Conjugation Frequency in Different Environmental Conditions

新谷 政己<sup>1,2,3</sup>, 李 美英<sup>2</sup>, 松井 一泰<sup>2</sup>, 大熊 盛也<sup>1</sup>, 岡田 憲典<sup>2</sup>, 野尻 秀昭<sup>2\*</sup>  
MASAKI SHINTANI, MEI YING LI, KAZUHIRO MATSUI, MORIYA OHKUMA, KAZUNORI OKADA and HIDEAKI NOJIRI

<sup>1</sup> 独立行政法人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 〒305-0074 茨城県つくば市高野台 3-1-1

<sup>2</sup> 東京大学生物生産工学研究センター 〒113-8657 東京都文京区弥生 1-1-1

<sup>3</sup> 現住所: 静岡大学工学部物質工学科 〒432-8561 静岡県浜松市中区城北 3-5-1

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

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

<sup>1</sup> Japan Collection of Microorganisms, RIKEN BioResource Center, 3-1-1 Koyadai, Tsukuba Ibaraki 305-0074, Japan

<sup>2</sup> Biotechnology Research Center, The University of Tokyo, 1-1-1 Yayoi, Bunkyo-ku, Tokyo 113-8657, Japan

<sup>3</sup> Present address: Department of Materials Science and Chemical Engineering, Faculty of Engineering, Shizuoka University, 3-5-1 Johoku, Naka-ku, Hamamatsu 432-8561, Japan

(原稿受付 2012年10月30日 / 原稿受理 2012年11月22日)

Conjugation frequency of two kinds of plasmids in different nutrient conditions was compared to each other. IncP-7 plasmid pCAR1 and IncP-9 plasmid NAH7 were used as model plasmids, and mating assays were performed in liquid condition between a donor *Pseudomonas putida* and a recipient *P. putida* or *Pseudomonas resinovorans* (one-to-one mating assays). The frequency of NAH7 transfer to *P. resinovorans* was significantly low regardless of the composition of liquid in which mating assays were performed. Mating assays between the donor and the two recipients mixture were also performed (one-to-two mating assays). Each recipient was distinguished by expression of different fluorescent protein (GFP and DsRed) whose genes were introduced into each recipient chromosome. Tendency of conjugation frequency of one-to-two mating assays coincided with the result of one-to-one mating assays. These experimental systems can be applied to find not only the preference conditions for plasmid transfer, but also a host- or plasmid-factor involved in plasmid transfer between different kinds of bacteria.

キーワード: プラスミド, 接合伝達, *Pseudomonas* 属細菌

Key words: plasmid, conjugative transfer, *Pseudomonas*

1. 緒 言

細菌のプラスミドは、染色体とは独立して自律複製可能な遺伝因子である<sup>6)</sup>。接合伝達性プラスミドは、細菌どうしの接触 (接合) を介してプラスミドをもつ細胞 (供与菌) からもたない細胞 (受容菌) に複製を伴いながら移動することができる (接合伝達)。受容菌は、接合伝達によってプラスミド上の遺伝情報を獲得し、抗生物質耐性能や物質代謝能、病原性など新たな形質を得ることが可能なため、プラスミドは細菌の急速な進化・適応能を担う重要な遺伝因子といえる<sup>3,11,24)</sup>。このような観点から、プラスミドの接合伝達現象については古くから研究されており、大腸菌の F プラスミドを中心に、その分子機構や制御機構の詳細が解明されつつある<sup>3,4)</sup>。

一方、土壌や河川、動植物の体内など、複数の細菌が混在するような実環境中においても、プラスミドの接合伝達が生じると報告されているが<sup>20,27)</sup>、実際にどのよう

なプラスミドが、どのような細菌間を、どの程度の頻度で接合伝達するのかという点については不明な点が多い。また、供与菌・受容菌種類ずつの接合伝達頻度を測定した研究報告は数多くなされているが、その実験条件は報告ごとに異なる場合が多く、同じプラスミドについての報告であっても、環境条件の違いによってその接合伝達頻度がどれくらい変化するのかを単純に比較することは難しいのが実情である。さらに、細菌を複数種混合した受容菌群に対する接合実験の報告例は少なく、どのような細菌により接合伝達しやすいのかといった情報も乏しい。

そこで本研究では、環境条件の違いが異なるプラスミドの接合伝達頻度に及ぼす影響を調べるとともに、2種類の受容菌を混合した際に、どちらの受容菌により接合伝達しやすいのかを調べる実験系の構築を目的とした。モデルプラスミドとして、複素環式芳香族化合物、カルバゾールの分解能を宿主に与える不和合性群 IncP-7 群

に属する pCAR1<sup>10,18)</sup> と、ナフタレン分解能を宿主にもたらす IncP-9 群プラスミド NAH7 を用いた。pCAR1<sup>8,26)</sup>、NAH7<sup>25)</sup> とともに全塩基配列が決定されており、それぞれ *Pseudomonas* 属細菌を主要な宿主とすることが明らかになっている<sup>9,18)</sup>。また、環境条件の例として栄養源の違いによる接合伝達頻度の変化を調査した。

## 2. 材料と方法

### 2.1. 培地および培養条件

本研究で用いた細菌の培養には LB<sup>15)</sup>、LB を 2 倍に希釈したもの (1/2LB)、およびリン酸バッファー (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 2.2 g/L, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.8 g/L, NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> 3.0 g/L) に CaCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O 0.01 g/L, MgSO<sub>4</sub>·6H<sub>2</sub>O 0.2 g/L, FeCl<sub>3</sub>·6H<sub>2</sub>O 0.01 g/L を添加し (NMM-4<sup>22)</sup>), コハク酸ナトリウムを終濃度 0.1% (w/v) となるように添加した培地を用いた。特に記述がない限り、大腸菌は 37°C で、*Pseudomonas* 属細菌は 30°C で培養した。平板培地には終濃度 1.6% となるように精製寒天末 (nakalai tesque) を添加して作製した。抗生物質はアンピシリン (Ap), カナマイシン (Km), ゲンタマイシン (Gm), リファンピシン (Rif) をそれぞれ終濃度 100 μg/ml (Ap), 50 μg/ml (Km), 30 μg/ml (Gm), 25 μg/ml (Rif) となるように培地に添加した。

### 2.2. 供与菌・受容菌の準備

本実験で用いたプラスミド pCAR1::rfp (以下 pCAR1 と記載)<sup>16)</sup> および NAH7K2 (以下 NAH7 と記載) は<sup>12)</sup>, Km 耐性遺伝子をプラスミド上に有する。また、pCAR1 については、赤色蛍光タンパク質 RFP (DsRed) を発現する遺伝子が P<sub>A1/04/03</sub> プロモーター下流から転写されるため<sup>9)</sup>, その発現を抑制する LacI をコードする遺伝子を染色体上に組込んだ供与菌を使用した (*P. putida* SM1443<sup>9)</sup>)。接合実験の結果が lacI 遺伝子の挿入の有無による影響を受けないように、いずれのプラスミドについても SM1443 株を供与菌とし、供与菌・受容菌 1 種類ずつの接合実験には、*P. putida* KT2440RG 株および *P. resinovorans* CA10dm4RG 株を受容菌として用いた (いずれも Rif および Gm 耐性<sup>17)</sup>)。

受容菌 2 種類を混合して行う接合実験には、Rif 自然耐性の *P. putida* KT2440 株 および *P. resinovorans* CA10dm4 株に、それぞれ赤色蛍光タンパク質 (DsRed) と緑色蛍光タンパク質 (GFP) を発現する遺伝子を、ミニトランスポゾン Tn7 を用いて染色体上に転移させた菌株を以下のように作製して用いた。各蛍光タンパク質を Tn7 内部に有するプラスミド (miniTn7(Gm)P<sub>A1/04/03</sub> gfp-a, miniTn7(Gm)P<sub>A1/04/03</sub> DsRedExpress-a)<sup>7)</sup> のいずれかと、Tn7 を染色体上の glmS (グルコサミン合成酵素をコード) の 3' 末端に特異的に転移させるプラスミド (pUX-BF13, トランスポザーゼを供給)<sup>7)</sup>, これらのプラスミドを受容菌に伝達させるためのヘルパープラスミド (pRK2013<sup>20)</sup>) それぞれを有する計 3 種類の大腸菌と、受容菌をフィルター上で接合させた。フィルター接合は、孔径 0.22 μm のメンブレンフィルター (Advantec) を用いて行った。供与菌・受容菌をそれぞれ一晩培養した後、1 ml の培養液を遠心・洗菌し、再度 200 μl の滅

菌済リン酸バッファーに懸濁し、混合液を LB 平板培地上にのせたフィルター上に滴下して、30°C で一晩静置して行った。その後、フィルターを 50 ml 容コニカルチューブに回収し、再度滅菌済リン酸バッファーに懸濁後、適宜希釈して選択培地に塗布した。出現したコロニーを単離し、それぞれ赤色・緑色蛍光を示すことを確認後、それぞれ KT2440DsRed および CA10dm4GFP として用いた。

### 2.3. 各プラスミドの接合伝達頻度の比較実験

各プラスミドの接合伝達頻度はいずれも液体中で接合実験を行って比較した。供与菌・受容菌を LB 液体培地で一晩培養後、濁度 (optical density) OD<sub>600</sub> が供与菌 0.2, 受容菌 2.0 となるように希釈し、それぞれ 200 μl のリン酸バッファーに懸濁して 2 ml 容チューブ (エッペンドルフ) 内で混合した。チューブのフタは取り外し、通気のためにフィルム (Thermo Gas Permeable Adhesive seals) をチューブ上部に貼って 30°C で 3 時間静置した。その後、混合液を適宜希釈して、供与菌と接合伝達体とが生育する培地 (Km を含む LB) と、接合伝達体のみが生育する培地 (Gm, Km, Rif を含む LB) とに塗布し、出現したコロニー数を測定した。接合伝達頻度は、供与菌 1 コロニーあたりの接合伝達体のコロニー数によって算出した。また、2 種類の受容菌を混合した場合の接合実験は、各受容菌の OD<sub>600</sub> を 2.0 となるように希釈した後、100 μl ずつを混合した 200 μl を受容菌群とし、受容菌全体の菌体数を上記の供与菌と受容菌 1 種類ずつの接合実験時と揃えた上で、供与菌 200 μl と接合させ、同様に選択培地に塗布した。その後、ダークリーダー (BM Equipment Co., Ltd) を用いてコロニーの緑色・赤色蛍光を観察し、どちらの受容菌に接合伝達したかを調べた。なお、pCAR1 上の RFP (=DsRed) は、これら 2 種類の受容菌いずれにおいても発現するが、コロニー出現後、GFP の蛍光の方が DsRed よりも早い段階で検出される<sup>7)</sup> ため、先に緑色蛍光を示したコロニーを CA10dm4GFP と判断した。

### 2.4. 統計処理

本研究で求めた接合伝達頻度については、独立した 5 連の接合実験を行い、その相乗平均をグラフに示した。それぞれの供与菌・受容菌の組み合わせで、3 つの接合条件に有意差があるかを Kruskal-Wallis 法にて検定し、Steel-Dwass 法を用いて多重比較検定をした。有意水準は  $P < 0.05$  とした。

## 3. 結果

いずれの接合実験も、供与菌を *P. putida* KT2440 株の派生株、SM1443 株とし、受容菌は *P. putida* KT2440 株と、*P. resinovorans* CA10dm4 株に選択マーカー (抗生物質耐性または蛍光タンパク質の発現) を付与した派生株を用いて行った。

### 3.1. 供与菌・受容菌 1 種類ずつを用いた接合実験の結果

供与菌・受容菌 1 種類ずつを用いた接合実験におい

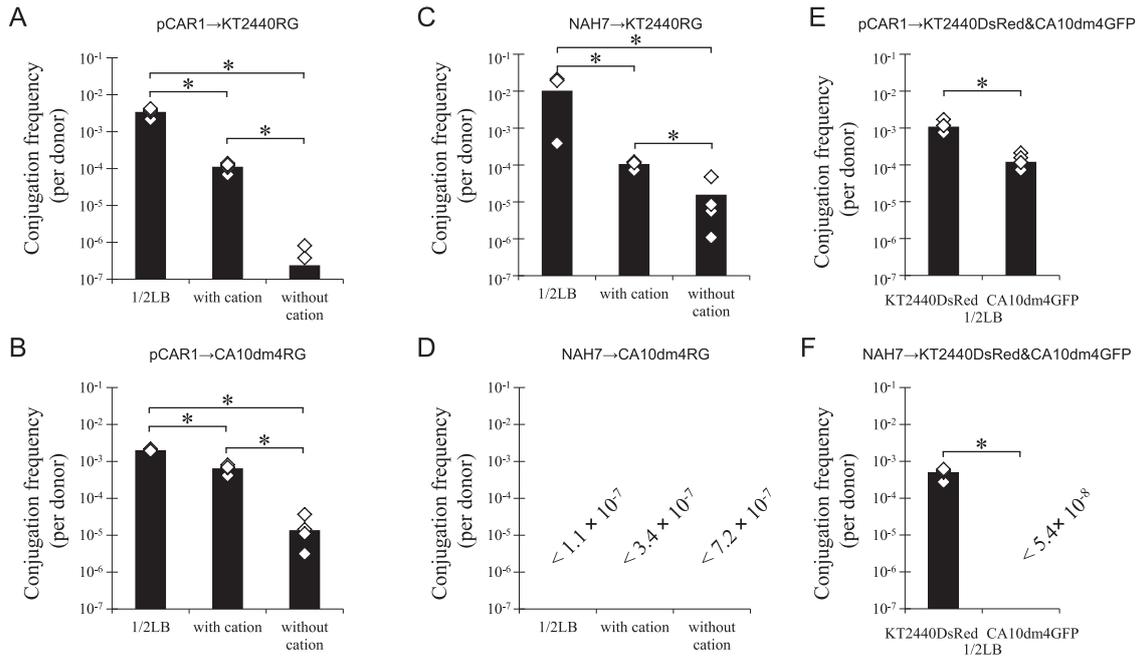


Fig. 1. Conjugation frequency of pCAR1 and NAH7 in one-to-one liquid mating assays (panels A to D) or one-to-two liquid mating assays (panels E and F) in different compositions. *P. putida* SM1443 was used as a donor of pCAR1 (panels A, B, E) or NAH7 (panels C, D, F), and *P. putida* KT2440RG (panels A and C) or *P. resinovorans* CA10dm4RG (panels B and D) was used as a recipient. Mating assays between the donor and two recipients mixture were performed in the same condition (panels E and F) and each conjugation frequency of pCAR1 (panel E) or NAH7 (panel F) were shown. The donor and recipient were mixed in 1/2LB, phosphate buffer with or without cations ( $\text{Ca}^{2+}$  and  $\text{Mg}^{2+}$ ). The mean of conjugative frequency obtained in five times experiments and diamonds showed the frequency of each experiment. Asterisks indicate significant difference ( $P < 0.05$ ) among the three different conditions.

て、各菌体を混合する液体を、栄養源を多く含む 1/2LB にした場合、炭素源と多くのミネラルを含まないリン酸バッファーにした場合、およびリン酸バッファーに二価の陽イオン ( $\text{Ca}^{2+}$  と  $\text{Mg}^{2+}$ ) を添加した場合の接合伝達頻度について Fig. 1A-D に示した。なお、二価の陽イオンの添加効果については、過去の我々の研究で、pCAR1 の接合伝達を促すことが明らかになっていた<sup>19,28</sup>。実際、本研究においても、受容菌に KT2440RG 株を用いた際、陽イオンの添加の有無によって、接合伝達頻度に有意な違いが認められ (Fig. 1A)、陽イオンを加えない場合 ( $2.4 \times 10^{-7}$ ) に比べ、陽イオンを添加したバッファー内の伝達頻度 ( $1.1 \times 10^{-4}$ ) は 400 倍程度上昇した。また、1/2LB 内における頻度 ( $3.4 \times 10^{-3}$ ) は、陽イオンを加えたバッファー内における頻度よりも有意に高かった。また、CA10dm4RG 株を受容菌とした場合にも、接合伝達頻度に有意な違いが認められ (Fig. 1B)、陽イオンを添加した場合、陽イオンを添加していないバッファー内での頻度 ( $1.4 \times 10^{-5}$ ) より有意に上昇した ( $6.5 \times 10^{-4}$ )。また、1/2LB 内における接合伝達頻度 ( $2.0 \times 10^{-3}$ ) の方が、陽イオンを添加したバッファー内の接合伝達頻度よりも有意に高かった。

NAH7 については、KT2440RG 株を受容菌とした場合、陽イオンを添加していないリン酸バッファー内における接合伝達頻度 ( $1.6 \times 10^{-5}$ ) のばらつきが大きかったものの、陽イオンを添加した場合 ( $1.1 \times 10^{-4}$ ) には (pCAR1 同様) 有意な違いが認められた (Fig. 1C)。また、栄養源の豊富な 1/2LB 内の頻度 ( $1.0 \times 10^{-2}$ ) はそれらと比

べても有意に高かった。一方、CA10dm4 株を受容菌として用いた場合には接合伝達体はいずれの条件においても検出限界以下であった (Fig. 1D)。

### 3.2. 2 種類の受容菌を混合して作製した細菌群に対する接合実験の結果

実環境においては通常 2 種類以上の受容菌候補株が存在することは自明であるが、供与菌・受容菌 1 種類ずつを用いて行った接合実験の結果がそのような実環境下で起こっている現象をそのまま反映しているのかどうかは明瞭でない。そこで、まず 2 種類の受容菌が同時に存在する場合、供与菌・受容菌 1 種類ずつの接合実験の結果と違いがあるのかどうかを調べるため、供与菌との接合時に、KT2440DsRed 株と CA10dm4GFP 株を 1 : 1 の割合で混合して実験を行った。液体接合は 1/2LB 中で行った (Fig. 1EF)。その結果、pCAR1 の供与菌あたりの接合伝達頻度は、それぞれ KT2440DsRed 株に対して  $1.1 \times 10^{-3}$ 、CA10dm4GFP 株に対して  $1.2 \times 10^{-4}$  と有意な違いが認められた。また、この頻度は供与菌・受容菌 1 種類ずつを接合させた結果と比べると (Fig. 1AB, KT2440RG 株に対して  $3.4 \times 10^{-3}$ 、CA10dm4RG 株に対して  $2.0 \times 10^{-3}$ )、いずれも低下していた。一方、NAH7 については、2 種類の受容菌が同時に存在しても、CA10dm4GFP 株に対する接合伝達頻度は検出限界以下であり、KT2440DsRed 株への伝達のみが頻度  $5.0 \times 10^{-4}$  で検出された (Fig. 1F)。この頻度は、供与菌・受容菌 1 種類ずつの接合実験における KT2440RG 株への頻度

(Fig. 1C,  $1.0 \times 10^{-2}$ ) と比べると低下した。

#### 4. 考 察

本研究では、異なる環境条件下の接合伝達頻度の違いを比較するとともに、2種類の受容菌が混在してもその接合伝達頻度を個別に測定できる実験系を構築した。

注目すべき結果として、NAH7の接合伝達頻度が、受容菌をCA10dm4RG株にした場合に著しく低下し、検出限界以下になったことが挙げられる。この傾向は2種類の受容菌を混合させても同様であった。NAH7はIncP-9群、MOB<sub>F</sub>クラス、MPF<sub>T</sub>タイプに分類される<sup>23)</sup>。これらと分類上同一のグループに属するトルエン分解プラスミドpWW0 (*P. putida* mt-2株由来)は、固体上で接合した方が液体中での接合伝達頻度よりも18倍高く<sup>1)</sup>、同じグループのナフタレン分解プラスミドpCg1 (*P. putida* Cg1株由来)についても、固体上の方が10~100倍高い接合伝達頻度を示す<sup>13)</sup>という報告がなされている。従って、NAH7も固体上の接合伝達頻度の方が高いことが予想されるが、NAH7を有する供与菌と、受容菌としてKT2440RG株、またはCA10dm4RG株とを用いて平板培地上でフィルター接合させても、CA10dm4RG株に対する接合伝達頻度の低下が認められた(筆者ら、未発表データ)。従って、本研究で見出したNAH7の接合伝達頻度が受容菌をCA10dm4RG株にした場合に著しく低下する現象は、固体上か液体中かという接合時の条件にかかわらず生じると考えられる。

pWW0は、供与菌と受容菌の組合せによってはその接合伝達頻度が受容菌あたり検出限界以下( $10^{-8}$ 以下)から1近くまで上昇すると報告されている<sup>14)</sup>。本報告と本研究とは、「供与菌あたりの頻度」と「受容菌あたりの頻度」という違いがあることを考慮しても、NAH7と同一の分類群に属するプラスミドは、供与菌と受容菌の組合せによってその接合伝達頻度が変化する可能性が高い。さらにNAH7は*Pseudomonas*属細菌から大腸菌にも、また逆に大腸菌から*Pseudomonas*属細菌にも接合伝達可能であるが、その際にNAH7上の*traDEF*を破壊すると大腸菌から*P. putida* KT2440株への接合伝達が成立しなくなることが報告されている<sup>9)</sup>。この原因についてはまだ解明されていないが、供与菌と受容菌が同一の菌株に由来する場合と、異なる菌株に由来する場合とでは、プラスミド上の接合伝達に必要な遺伝子(群)が異なることを示している。一方、本研究では、NAH7上に接合伝達に必要な遺伝子群が完全な形で揃っているにもかかわらず、受容菌を変えた場合に接合伝達頻度が著しく低下した。この結果は、受容菌側にその頻度を低下させる原因があることを示唆している。今後、プラスミドを受け取りにくくなるKT2440変異株や、プラスミドを受け取りやすくなるCA10dm4変異株をスクリーニングする等の詳細な研究によって、異なる供与菌、受容菌の組合せにおける接合伝達機構の違いを明らかにできるものと期待される。

pCAR1を用いた接合実験において、受容菌をKT2440株とした場合に、二価の陽イオンを添加していないリン酸バッファー内では接合伝達頻度が著しく低下した。陽イオンがKT2440株間におけるpCAR1の接合伝達を促

進することは我々が既に報告したが<sup>19,28)</sup>、本研究において、受容菌をCA10dm4RG株とした場合にも認められた(Fig. 1B)。今後、CA10dm4株を供与菌とした場合の陽イオンの添加効果について調べる必要がある。一方、NAH7についても、陽イオンの添加効果に有意な違いが認められたものの、その接合伝達頻度のばらつきがやや大きく、pCAR1の場合と比べるとその効果については明瞭でない。このように伝達頻度が安定しないのは、先述したように、NAH7は固体表面における接合伝達に適する接合伝達機構を有しており、液体中での接合は供与菌と受容菌の接着が安定しないことに起因するのかもしれない。

2種類の受容菌を混合後、供与菌と接合させたところ、pCAR1、NAH7ともに、供与菌・受容菌が1種類ずつを用いた場合と比べ、頻度はやや低下したものの、同様の傾向を示した。この結果は、2種類以上の受容菌を混合した細菌集団においても、対象細菌への接合伝達頻度を求め、条件ごとに比較可能な実験系を構築できたことを意味している。また、頻度が低下したのは、受容菌の数自体が、1種類の受容菌を用いた場合に比べて1/2になっていることに起因するのかもしれない。本稿で適用した条件は限られているが、今後発現する蛍光タンパク質の違いによって受容菌を区別する実験系を用い、どのような条件下で、どちらにより接合伝達しやすいかを調べられる可能性が高い。我々の以前の研究で、pCAR1の受容菌として15種類の菌株を混合し、陽イオンを添加したリン酸バッファー内でpCAR1を接合伝達させたところ、*P. resinovorans*のみが受容菌として得られた<sup>19,21)</sup>。一方、本研究では、KT2440株とCA10dm4株とを混合した受容菌を用い、1/2LB内で接合させると、KT2440株への接合伝達頻度の方が高かった(Fig. 1E)。2種類の受容菌を混合後、リン酸バッファー中で陽イオンの有無によって、どちらの受容菌に接合伝達しやすいかを調べれば、CA10dm4株がプラスミドを受け取りやすいのか、CA10dm4株がプラスミドを受け取る際の陽イオンの添加効果が高いのか明らかになるかもしれない。従来、2種類の受容菌を混合した上で各々に対する接合伝達頻度を調べる実験は、接合伝達体を選別するための抗生物質耐性マーカーをプラスミド・受容菌の双方に付与し、かつ接合伝達体の選択培地を別々に作製する必要があった。本研究のように、受容菌を区別するのに、抗生物質耐性能ではなく蛍光タンパク質を利用すれば、2種類(以上)の受容菌に由来する接合伝達体を同一の選択培地上で検出できるため、実験がより簡便になり、多くの接合条件について調べられるというメリットがある。この実験系を利用すれば、これまで研究対象とされにくかった複数の受容菌が存在する場合の各々に対する接合伝達頻度の比較が可能になり、異種細菌間の接合伝達に必要な宿主・プラスミド因子の探索・同定へとつながるものと期待される。

#### 5. 謝 辞

NAH7を提供していただきました東北大学大学院生命科学科学研究科、津田雅孝教授に深く感謝申し上げます。また、細菌の染色体上に*gfp*および*dsRed*を、ミニTn7

を利用して転移させるシステムを分譲していただいたデンマーク工科大学の Søren Molin 教授に感謝申し上げます。本研究の一部は独立行政法人理化学研究所の基礎科学特別研究員制度と JSPS 科研費 2480087 の助成を受けて行われました。

### 引用文献

- 1) Bradley, D.E. and P.A. Williams. 1982. The TOL plasmid is naturally derepressed for transfer. *J. Gen. Microbiol.* 128: 3019–3024.
- 2) Figurski, D.H. and D.R. Helinski. 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.
- 3) Frost, L., R. Lepplae, A. Summers, and A. Toussaint. 2005. Mobile genetic elements: the agents of open source evolution. *Nat. Rev. Microbiol.* 3: 722–732.
- 4) Frost, L.S. and G. Koraimann. 2010. Regulation of bacterial conjugation: balancing opportunity with adversity. *Future Microbiol.* 5: 1057–1071.
- 5) Haagensen, J.A., S.K. Hansen, T. Johansen, and S. Molin. 2002. *In situ* detection of horizontal transfer of mobile genetic elements. *FEMS Microbiol. Ecol.* 42: 261–268.
- 6) Helinski, D.R. 2004. Introduction to plasmids: a selective view of their history. pp. 1–21. In B.E. Funnell and G.J. Phillips (eds.) *Plasmid biology*. ASM Press, Washington D.C., U.S.A.
- 7) Lambertsen, L., C. Sternberg, and S. Molin. 2004. Mini-Tn7 transposons for site-specific tagging of bacteria with fluorescent proteins. *Environ. Microbiol.* 6: 726–732.
- 8) 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 mosaicity and the presence of large catabolic transposon Tn4676. *J. Mol. Biol.* 326: 21–33.
- 9) Miyazaki, R., Y. Ohtsubo, Y. Nagata, and M. Tsuda. 2008. Characterization of the *traD* operon of naphthalene-catabolic plasmid NAH7: a host-range modifier in conjugative transfer. *J. Bacteriol.* 190: 6281–6289.
- 10) Nojiri, H. 2012. Structural and molecular genetic analyses of the bacterial carbazole degradation system. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 76: 1–18.
- 11) 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.
- 12) Ono, A., R. Miyazaki, M. Sota, Y. Ohtsubo, Y. Nagata, and M. Tsuda. 2007. Isolation and characterization of naphthalene-catabolic genes and plasmids from oil-contaminated soil by using two cultivation-independent approaches. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 74: 501–510.
- 13) Park, W., C.O. Jeon, A.M. Hohnstock-Ashe, S.C. Winans, G.J. Zylstra, and E.L. Madsen. 2003. Identification and characterization of the conjugal transfer region of the pCg1 plasmid from naphthalene-degrading *Pseudomonas putida* Cg1. *Appl. Environ. Microbiol.* 69: 3263–3271.
- 14) Ramos-Gonzalez, M.I., E. Duque, and J.L. Ramos. 1991. Conjugational transfer of recombinant DNA in cultures and in soils: host range of *Pseudomonas putida* TOL plasmids. *Appl. Environ. Microbiol.* 57: 3020–3027.
- 15) Sambrook, J. and D.W. Russell. 2001. *Molecular cloning: a laboratory manual*, 3rd edn. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
- 16) Shintani, M., N. Fukushima, M. Tezuka, H. Yamane, and H. Nojiri. 2008. Conjugative transfer of the IncP-7 carbazole degradative plasmid, pCAR1, in river water samples. *Biotechnol. Lett.* 30: 117–122.
- 17) Shintani, M., H. Habe, M. Tsuda, T. Omori, H. Yamane, 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.
- 18) 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.
- 19) Shintani, M., K. Matsui, T. Takemura, H. Yamane, and H. Nojiri. 2008. Behavior of the IncP-7 carbazole-degradative plasmid pCAR1 in artificial environmental samples. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 80: 485–497.
- 20) Shintani, M., Y. Takahashi, H. Yamane, H. Nojiri. 2010. The behavior and significance of degradative plasmids belonging to Inc groups in *Pseudomonas* within natural environments and microcosms. *Microbes Environ.* 25: 253–265.
- 21) 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.
- 22) Shintani, M., T. Yoshida, H. Habe, T. Omori, and H. Nojiri. 2005. Large plasmid pCAR2 and class II transposon Tn4676 are functional mobile genetic elements to distribute the carbazole/dioxin-degradative *car* gene cluster in different bacteria. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 67: 370–382.
- 23) Smillie, C., M.P. Garcillán-Barcia, M.V. Francia, E.P. Rocha, and F. de la Cruz. 2010. Mobility of plasmids. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 74: 434–452.
- 24) Sota, M. and E.M. Top. 2008. Horizontal gene transfer mediated by plasmids. pp. 111–181. In G. Lipps (ed). *Plasmids: Current Research and Future Trends*. Horizon Scientific Press, U.K.
- 25) Sota, M., H. Yano, A. Ono, R. Miyazaki, H. Ishii, H. Genka, E.M. Top, and M. Tsuda. 2006. Genomic and functional analysis of the IncP-9 naphthalene-catabolic plasmid NAH7 and its transposon Tn4655 suggests catabolic gene spread by a tyrosine recombinase. *J. Bacteriol.* 188: 4057–4067.
- 26) 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 plasmids. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 73: 744–746.
- 27) 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, Amsterdam.
- 28) 松井一泰, 新谷政己, 山根久和, 野尻秀昭. 2011. プラスミドの接合伝達に関する遺伝因子・環境因子. *環境バイオテクノロジー学会誌*, 11: 69–75.