

セパシア菌ゲノムの構造と多様化・進化に関する研究

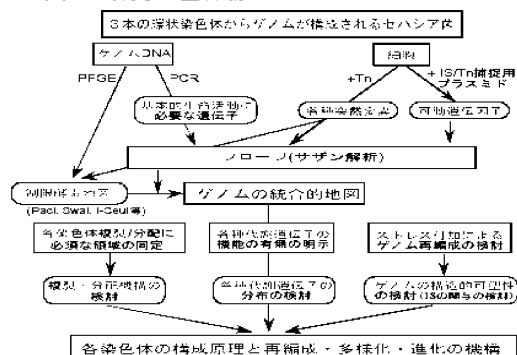
●津田 雅孝¹⁾ ◆永田 裕二¹⁾ ◆澤田 宏之²⁾

1) 東北大学大学院生命科学研究所 2) 独立行政法人農業環境技術研究所

＜研究の目的と進め方＞

環境常在性でβ-プロテオバクテリアに属するセパシア菌 (*Burkholderia cepacia*) 群は、易感染患者に重篤な肺炎を発症させる起病菌であるが、動植物への病原性、高度の抗生物質耐性、植物病原菌駆除能、難分解性環境汚染物質も含む多種多様な有機化合物資化能の特色も併せ持つとともに、ゲノムが通常2-4本の環状染色体から構成される特徴を示す。本菌群に属する *B. multivorans* の ATCC 17616 株のゲノムは、3.4 Mb、2.5 Mb、0.9 Mb の3本の環状染色体と170 kbの環状プラスミドから構成される。そして、本菌株の生育環境変動に伴い大規模で多様かつ高頻度でおきる各染色体の再編成現象とその結果としての容易な新規形質獲得が、本菌の迅速な適応・進化に貢献していると示唆されている。本研究では、各染色体の構成原理と構造的動態、そして再編成と多様化、進化を司る分子機構の実験的提示を目的とし、まず、本株の宿主-ベクター系や効率的突然変異誘発系をはじめとする様々な分子遺伝学的解析系を構築した。遺伝子の構造と機能の相関関係を明示できるこれら手法を有効に用いて、(1)各染色体の構造と機能の解明、(2)ゲノム構造の高度可塑性とゲノム進化に対する可動遺伝子の役割、(3)3本の染色体の複製・分配の分子機構を、検討した(図1)。また、本菌群のヒトへの病原性発揮の解明のみならず、他の動植物との相互作用や物質分解能の全容の解明、そして、複数染色体をもつ細菌のゲノム進化や新規形質獲得の検討を包括的に実施するためには、全ゲノムの塩基配列を決定し、これをもとに体系的な研究を行うことが極めて有効であることを踏まえ、研究期間の後半段階から本株全ゲノム配列の決定とその解析にも取り組んだ。

図1. 研究の全体像



＜研究開始時の研究計画＞

- (1) 同定予定遺伝子の構造-機能相関関係を明瞭に提示することをめざす研究の円滑かつ着実な進展には、ATCC 17616株での様々な分子遺伝学的解析系の確立とその利用が不可欠である。そこで、ATCC 17616株において、宿主-プラスミドベクター系、組換えプラスミドの本株への形質転換または接合による効率的移入系、そして、本株ゲノム上の任意の野生型遺伝子の効率的かつ特異的破壊系を確立する。
- (2) ATCC 17616株ゲノムの物理的地図が曖昧であったこ

とから、制限酵素を用いて、さらに明瞭な物理地図をrrmオペロンの存在位置決定も含めて作製する。

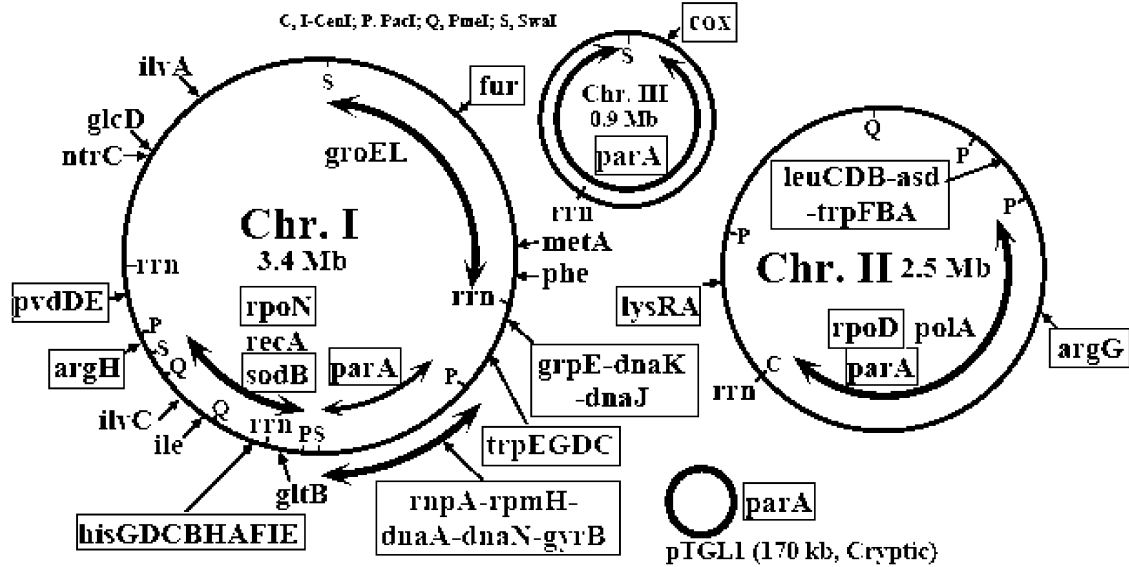
- (3) 各染色体の複製や分配に必要な領域に関して、*Ralstonia solanacearum*などの近縁細菌種の塩基配列を参考にPCRを用いて取得後、さらに、その近傍領域も取得する。当該領域の詳細構造を明らかにするとともに、これら領域の複製能や分配能を解析する。
- (4) DNA修復や転写、翻訳などのセントラルドグマ関連で必須と想定される各種タンパク質をコードする遺伝子に関して、近縁細菌種等の塩基配列を参考にし、PCRを用いて取得し、さらにはその近傍領域も取得後、当該領域の詳細構造を明らかにする。また、これら遺伝子の各染色体上での位置とゲノム上でのコピー数を決定する。さらに、同定遺伝子の必須性をゲノム遺伝子の破壊で検討する。
- (5) ATCC 17616株において、転移能を保持している可動遺伝子の効率的捕捉系を構築後、これを用いて、種々の可動遺伝子を取得し、各可動遺伝子を解析するとともに、各染色体上でのコピー数と分布を提示する。また、*Burkholderia*属細菌の複数種株での各ISの分布を調べ、IS分布の観点から、これら細菌株の進化的類縁関係を提示する。さらに、ATCC 17616株細胞への各種ストレス負荷時の各可動遺伝子の挙動を検討する。
- (6) ATCC 17616株において、トランスポゾンによるゲノムのランダムな突然変異誘発系を確立する。この際、トランスポゾンとして、ゲノム上での挿入部位の物理的地図を決定することが容易であり、かつ、挿入部位近傍領域DNAのクローニングと塩基配列決定が容易であるものを用いる。本トランスポゾンを用いて、各種アミノ酸生合成欠損突然変異株やコハク酸を炭素源にできない突然変異株、そして、生存・増殖に必要な元素である鉄の獲得と代謝に欠損を持つ突然変異株の取得を行う。そして、挿入を受けた遺伝子並びにその近傍領域の詳細な構造を決定するとともに、ゲノム上での分布とコピー数を明らかにする。また、鉄代謝関連の遺伝子群に関しては、その発現制御も検討する。

- (7) 研究期間後半において、ショットガン法によるATCC 17616株全ゲノム配列決定作業が開始されたことから、この作業で得られたコンティグ配列の解析を行うとともに、我々が独自に得てきた配列情報との対応付けを実施する。

＜研究期間の成果＞

- (1) ATCC 17616株において、不和合性の異なる2種の広宿主域プラスミドベクター系が有用であることを見出した。また、エレクトロポレーションによる本株の効率的形質転換系とともに、組換えプラスミドを大腸菌から接合によってATCC 17616株へ効率的移入する系を確立した。さらに、大腸菌プラスミドにクローニングしたATCC 17616株野生型遺伝子を破壊後、破

図 2. *B. multivorans* ATCC 17616株のゲノム地図

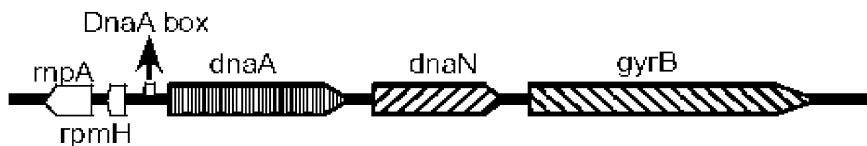


壊遺伝子をATCC 17616株ゲノムの野生型遺伝子と相同組換えで容易に置換する系を確立した。(成果発表リスト2, 6)

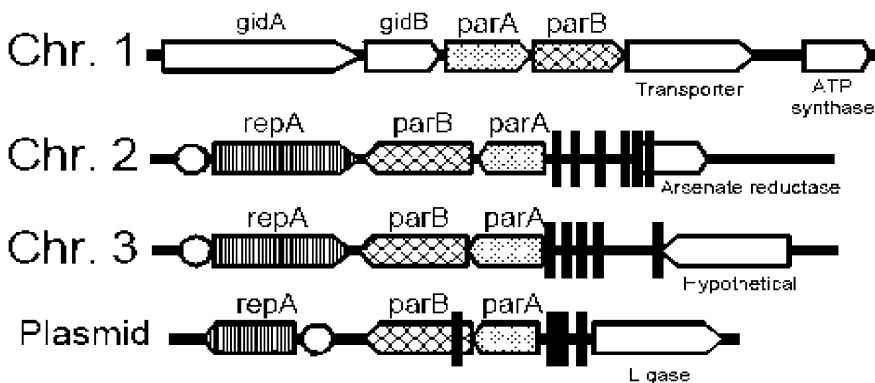
- (2) PacI, PmeI, SwaI, I-CeuIの制限酵素によるATCC 17616株ゲノムDNAの切断とその後のPulsed-Field Gel Electrophoresis (PFGE)法による解析で、3本染色体の物理地図を決定した。3.4 Mb、2.5 Mb、0.9 Mb染色体地図上には、3コピー、1コピー、1コピーのrrnオペロンが各々存在していた。(図2) (成果発表リスト2)
- (3) 3本環状染色体の各々の複製・分配に関与するDNA領域をPCRとその後のPCRウォーキング等により取得し、構造解析を行った。3.4 Mb染色体には、染色体複製イニシエータータンパク質をコードするdnaAが含まれる領域が存在した。rnpA-rpmH-dnaA-dnaN-gyrB構造を持っていた本領域は1コピーのDnaA boxのみを有していたが、複製起点活性を示さなかった。このdnaA領域から約80 kb離れたところに、通常の細

菌染色体の分配装置遺伝子と高い相同性を示すparA-parB遺伝子群が存在し、parA上流にはgidABクラスターが存在していた。一方、2.5 Mb染色体と0.9 Mb染色体の複製・分配に関わる遺伝子領域は、いずれもparA-parB-repAの構造を持つとともにparA直上流領域に14塩基の複数繰り返し構造が存在し、これが染色体分配にシスに働くparSと想定された。両染色体のparA-parB-repA領域は巨大プラスミドの複製・分配領域の構造と酷似しており、RepAが複製タンパク質で、repA直上流に複製起点があると示唆された。これらの解析を踏まえ、3.4 Mb染色体は通常細菌の染色体に相当し、他2本の染色体はプラスミド型の複製・分配装置を持つと結論した。3.4 Mb染色体のparB破壊株を作製して解析した結果、本染色体の分配装置が細胞の生存に必須でないことを予備的成果ながら示した。一方、2.5 Mb染色体と0.9 Mb染色体の各parB破壊株の取得は成功せず、両染色体のParBには機能

dnaA領域 (Chr. 1)



分配装置遺伝子領域



繰り返し配列

Chr. 1
 TTTATGCGCATAAA
 TTTGTGCGCATAAA
 TTTGTGCGCATAAA
 TTTATGCGCATAAA
 TTTATGCGCATAAG
 TTTATGCGCATAAA

Chr. 2
 TTGTCACGTGACAA
 TTGTTACGTGACAA
 TTGTTACGTGACAA
 TTGTCACGTGACAA
 TTGTCACGTGACAA

Plasmid
 TTGGCTCGAGCCAA
 TTGGCTCGAGCCAA
 TTGGCTCGAGCCAA
 TTGGCTCGAGCCAA

図3. 複製・分配に関する領域の構造

2.4 Mb染色体 (Chr. 2)、0.9 Mb染色体 (Chr. 3)、Plasmidの図において、丸は推定複製起点を、縦棒は14 bpの繰り返し配列を示す。parA遺伝子直上流の繰り返し配列がparSと推定された。

的互換性がなく、独立の分配装置をもつことが強く示唆された。(図3) (成果発表リスト4, 6, 7)

(4) PCRを用いて、*polA*, *rpoD*, *dnaK*, *recA*等の基本的生命活動に関与する10種程の遺伝子を単離し、そのうちの幾つかについてPCRウォーキング等で周辺領域も取得した。これらの解析の結果、2.5 Mb染色体上に*rpoD*が存在し、そのすぐ上流に*polA*や*dnaG*、そしてリボゾームタンパク質をコードする*rpsU*が存在していることが判明した。また、これらの基本的生命活動に極めて重要な遺伝子はゲノム上で重複していないことをサザン解析で示した。従って、プラスミド型複製・分配装置を持つ本2.5 Mb染色体は、他細菌のプラスミド型複製・分配装置を有する副染色体と異なり、生存にとりわけ重要かつ必須な遺伝子を担う特色を見出した。一方、主要シャペロンDnaKをコードする3.4 Mb染色体上のDNA領域の解析を行い、*grpE-dnaK-dnaJ*という構造を見出すとともに、3遺伝子は熱誘導性プロモーターから転写されるオペロン構造を持つと示唆された。また、*dnaJ*挿入突然変異株は、無機最小培地で著しい生育阻害を示したものの増殖可能であったことから、DnaJ機能は本菌に必須ではないと結論した。(成果発表リスト4, 6)

(5) 実際に転移能を有している複数の可動遺伝因子をATCC 17616株から独立かつ効率よく取得するとともに、各遺伝因子の転移を定量化できる遺伝学的手法を確立した(図4)。本手法を用いて独立に取得した97の可動遺伝因子を解析したところ、既知の挿入配列(IS)が4種(IS401, IS402, IS406, IS407)あり、残りの4種(IS408, ISBmu1, ISBmu2, ISBmu3)は新規のISであった。後者のうち、ISBmu2はIS5群、残りの3種はIS21群に属していた。ゲノム上での8種のISのコピー数を検討したところ、ISBmu2が9コピーと最も多く、残りは数コピー以下であった。また、ATCC 17616細胞に高温ストレス、酸素ストレス、そして飢餓ストレスを負荷したときのISの転移を検討したところ、高温ストレス負荷時でのみISの転移頻度が7倍以上上昇した。一方、8種のISに関してBurkholderia属の他4種株での分布を検討したところ、IS407は4種のいずれにも存在し、Burkholderia属細菌の進化的成立後の早い時期に本属に定着したことが示唆された。さらに、ATCC

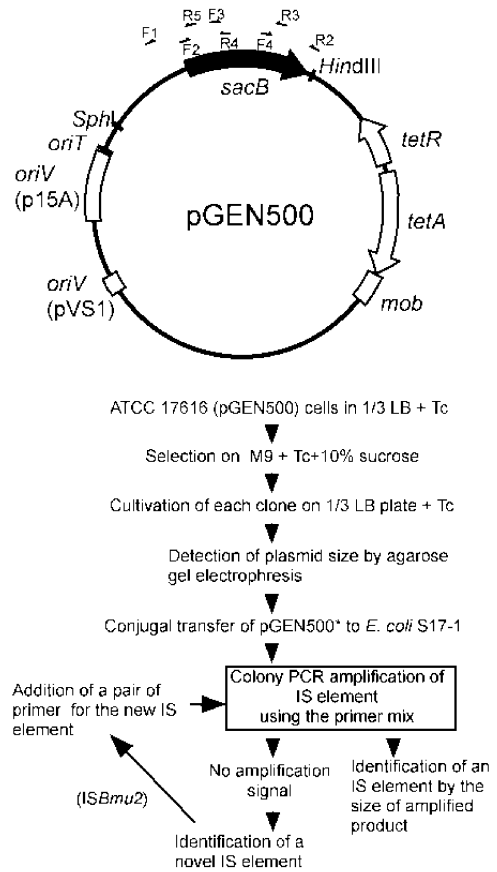


図4. IS捕捉用プラスミドとIS捕捉の流れ
F1-F4, R2-R5はプライマー結合部位

17616株はBurkholderia属細菌としては比較的多種類のISを持っていることも判明した。また、0.9 Mb染色体はこれらのISが局在する傾向が強く、上記遺伝学的捕捉系では転移能を検出できなかった複数種のISや欠損型ISがクラスターを成して存在する領域を見出した。前者IS種には、本研究対象株が属するβ-プロテオバクテリアでのみ転移能を示すIS1071も含まれていた。(成果発表リスト3, 5)

(6-1) ゲノム地図上での挿入部位同定と挿入部位近傍DNA

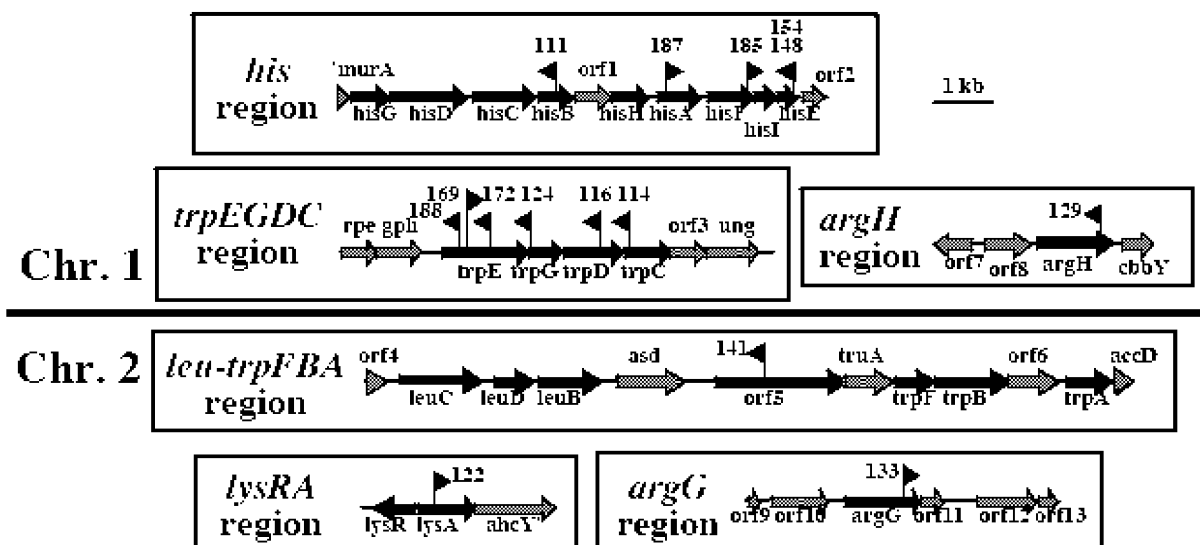


図5. ATCC 17616株のアミノ酸生合成系遺伝子群の構造

旗印はTnMod-RTaの挿入部位とその方向を示す。

領域のクローニングが容易なTn5誘導体TnMod-RTp'を用いて、本トランスポゾンがゲノムに挿入された約5,000株を独立に取得した。8%程の株はコハク酸最小培地での生育能を欠損した突然変異体であり、このうち、23株はアミノ酸要求性を示し、残りの22株はコハク酸を炭素源にできなくなった突然変異体であった。栄養要求性突然変異体の約半数がヒスチジンまたはトリプトファン要求性であったことから、両アミノ酸生成に関わるゲノムDNA断片を取得し、さらに詳細な解析を行った。ヒスチジン生成に必要な全9個のhis遺伝子は、3.4 Mb染色体上でクラスターを形成して存在していた。一方、トリプトファン生成系の前段階に関わる4つのtrp遺伝子は3.4 Mb染色体上で、それ以降の段階に関わる3つの遺伝子trpFBAは2.5 Mb染色体上で、それぞれクラスターを形成していた。また、この過程において、trpFBA上流にはロイシン生成に必要なleuCDB遺伝子群や細胞壁や多様なアミノ酸生成に関わるasd遺伝子が存在することも見いだされた。また、アルギニン生成系遺伝子群も3.4 Mb染色体と2.5 Mb染色体に分散して存在すること、そして、リジン生成に関与するlysRAは2.5 Mb染色体に存在することを示した。これら遺伝子群は近縁β-プロテオバクテリアである*R. solanacearum*のそれらと相関性が高く、また遺伝子の並び方も類似していた。ゲノムが2本環状染色体から構成される*R. solanacearum*では、上記アミノ酸生成系遺伝子群は主染色体に存在するが、その擬似遺伝子がプラスミド型複製・分配装置を持つ副染色体上に存在することが多い。これに対し、ATCC 17616株では、プラスミド型複製・分配装置を持つ2.5 Mb染色体上に各種アミノ酸生成系遺伝子が1コピーのみ存在することが判明した。この知見からも、基本的代謝に果たす2.5 Mb染色体の重要性が明らかになった。また、他の栄養要求性突然変異では、窒素代謝特異的なRNAポリメラーゼシグマ因子のRpoNや窒素代謝統括的転写制御因子NtrCの遺伝子にトランスポゾンの挿入があった。他方、コハク酸を炭素源にできなくなった突然変異は解糖系の幾つかの酵素遺伝子にトランスポゾンの挿入があった。これら同定した窒素代謝と解糖系の遺伝子はいずれも3.4 Mb染色体に存在した。(図5) (成果発表リスト2,6)

(6-2) 上記TnMod-RTp'挿入株ライブラリーから、鉄の獲得や代謝が異常になった突然変異体を取得し、鉄キレーターであるシデロフォアの合成酵素遺伝子にトランスポゾンが挿入された複数の変異株が見いだされた。野生型株ではシデロフォアの産生は鉄存在条件で抑制されたが、本条件でもシデロフォア産生が恒常的になった挿入変異株が見いだされ、本変異は鉄レギュロンの統括的転写制御因子遺伝子であるfurに存在した。緑膿菌を含む多くの環境細菌株ではFur機能が未知の機構により必須であり、Fur機能完全欠損変異株が取得できないために、Furが示すとされる多面的機能の明確な提示が困難である。一方、ATCC 17616株ではFur機能完全欠損変異が取得できたことから、fur欠損変異株を用いてFur機能の多面性を検討した。その結果、本株のFurは高鉄濃度で、シデロフォアとともにリパーゼの産生を抑制すること、そして、酸素ストレス耐性蛋白質群のカタラーゼ、ペルオキシダーゼ、そして、鉄含有スーパーオキシドジスムター

ゼSodBの発現を正に制御することを示した。さらに、本株がTCAサイクルの複数化合物を含む16種を炭素源(グルコース、イソクエン酸、コハク酸など)として利用するためにもFur機能は必須であることを見いだした。これらのことより、本株のFurは、鉄獲得に直接関与する機能のみならず、細胞の基本的代謝機能の発現にも多面的に関わることを明示した。高鉄濃度でのFurによるSodB発現の上昇はsodBの転写脱抑制に起因するものであったが、精製したFurタンパク質のsodBプロモーター領域への結合は検出できず、Furが未知の介在因子の作用を介してsodBの転写を制御するという多段階発現制御系の存在が強く示唆された。また、炭素源資化能を検討している過程で、安息香酸ジオキシゲナーゼ遺伝子の発現は、グルコースによりカタボライト抑制されることを示唆する結果が得られた。(成果発表リスト1,2,7)

(7) 上記の研究過程で独自に本菌ゲノムの130 kb程の塩基配列を決定していたが、ショットガン法での本菌株全ゲノム塩基配列作業が2004年から開始され、2004年度末までに冗長度8.4倍の配列が得られた。なお、その後のフィニッシング作業により、2005年秋に全塩基配列の決定に至り、現在アノテーション作業を進めている。2004年度末の段階でのアセンブルから、1 kb以上のコンティグ53個を得、これらコンティグの合計サイズは7.0 MbでPFGE解析でのサイズと一致し、5つというrRNAオペロンのコピー数や4つのレプリコンの大きさは以前に得られていたデータと一致した。また、コンティグ配列の中には、(i)金属プロテアーゼやリパーゼ、ヘモリジン、べん毛、III型分泌装置等のヒトや動物への病原性発揮に関連する各種因子の遺伝子、(ii)植物細胞壁成分の分解酵素遺伝子、(iii)リグニンモノマーであるバニリン酸のほか、安息香酸やパラヒドロキシ安息香酸、フタル酸を初めとする各種芳香族化合物の分解に関わる酵素遺伝子群、(iv)鉄の獲得に関わるシデロフォア合成酵素群や鉄の細胞内貯蔵に関わるバクテリオフェリチンや各種の活性酸素種の解毒酵素であるカタラーゼやペルオキシダーゼ、SodBをコードする遺伝子、硝酸/亜硝酸呼吸系をコードする遺伝子を見いだした。一方、Furが結合すると推定されるコンセンサス配列が29コピー以上存在することが示唆されるとともに、類縁細菌でIV型分泌装置をコードするゲノミックアイランド内の大半部分と高い相関性を持つ領域も見いだされた。また、コンティグと我々が独自に決定してきたコスミドクローンとの対応付けを行うことで、2.4 Mb染色体は、安息香酸やパラヒドロキシ安息香酸、フタル酸を初めてする各種芳香族化合物分解酵素遺伝子群や、嫌気呼吸と窒素代謝の統括的転写制御因子をコードするfmrを担うことも判明した。(成果発表リスト7)

〈国内外での成果の位置づけ〉

(1) 研究実施期間途中において、2本染色体を持つ別のBurkholderia属細菌株やその近隣属細菌株での全塩基配列が公表された。しかし、セントラルドグマ関連をはじめとする各種遺伝子が、重複化や擬遺伝子化することなく、通常細菌主染色体の相当する染色体とプラスミド型複製・分配装置を持つ副染色体という2つの染色体に散在するという特色を明示したのは本研究でのATCC 17616株が最初の例である。また、ゲノムが

多重染色体構造をとる細菌での各染色体の複製・分配に関して突然変異体等を用いた実験的研究はコレラ菌のみであった。本研究では、予備的ではあるものの、(a) 3.4 Mb染色体の分配装置が細胞の生存に必須でないこと、そして、(b) 2.5 Mb染色体と0.9 Mb染色体には機能的に互換性のない別々の分配装置があることを示した点に意義がある。

- (2) 本研究で確立したIS捕捉系は、複数種のISの転移を同時にかつ容易に定量化できるシステムである。この系を用いることで、高温ストレスが複数のISの転移頻度を同時に上昇させることを世界に先駆けて示した。本IS捕捉系は様々な細菌種の多様な可動遺伝因子にも適用可能であることから、他細菌でも同様の検討をすることで、ATCC 17616株での知見の普遍性や独自性の検証が可能になった。
- (3) ATCC 17616株の鉄レギュロン発現やカタボライト抑制に関して、他の主要モデル微生物には見られない特色を見出した。また、本カタボライト抑制系は、ATCC 17616株が属する多くの β -プロテオバクテリアで広範に存在する予備的知見を得た。ATCC 17616株での遺伝子発現制御を今後ゲノムレベルで行うことで、新規性のある発現制御機構を提示できる可能性が高い。
- (3) 米国においては環境細菌を対象にしたゲノム解析とその後の研究がこの2-3年の間に急速に進展しているが、国内においては、環境細菌のゲノム解析例はたいへん乏しく、また、academic societiesでの成果の共有は皆無に近い。これに対し、ATCC 17616株に関しては、societiesでの成果共有を前提にしたゲノム解析であり、上記のような基礎学問的にも興味深いゲノムの構造と機能を持つとともに、多様な応用学問分野にも重要な生物学的特徴を備えている。また、ATCC 17616株を用いて、ゲノム情報の発現を実験室系と生態系の双方で比較検討し、ゲノムと環境の相互作用を解明する研究に着手しており、本研究実施期間の成果が、このような新たな方向性を持った今後の微生物ゲノム研究の基盤となる。

達成できなかったこと、予想外の困難、その理由

研究開始当初、2.5 Mb染色体内で欠失可能と報告されていたlysRAを含む0.8 Mb領域について、様々な環境変動時での欠失様式を検討することを計画した。この欠失は偶然見つかったものであったことから、本研究では、細胞に条件致死を賦与できる遺伝子マーカーをlysRAに挿入後、本マーカーが喪失した誘導体細胞を選択することを試みた。再三の試行後も目的欠失株の取得には至らなかった。また、報告されていた欠失株の入手も困難であった。現在実施している2.4 Mb染色体支配遺伝子のアノテーションにより、達成できなかった理由が明らかにできよう。プラスミドの伝達に必要な遺伝子群を0.9 Mb染色体に賦与した誘導体染色体を作製し、類縁細菌株への伝達を検討することで、本染色体の複製・分配に関する知見を得ることを計画したが、本染色体の複製・分配に必要な領域のクローン化と構造解析ができたことから、本計画実施は回避した。TnMod-RTp⁺が0.9 Mb染色体に挿入された例は、各種のスクリーニングにおいても見いだされなかった。チトクロームcオキシダーゼ遺伝子が本染色体に担われていることを偶然見いだしたが、その以外に基本的生命活動や各種生合成系の遺伝子が本染色体に存在しないことが、このような現象の根底にあると想定された。本染色体支配遺伝子のアノテーションでこの想

定の妥当性が明らかになる。

〈今後の課題〉

本研究開始時には、ATCC 17616株全ゲノム配列の解読計画がなかったため、種々の分子遺伝学的解析に立脚した研究を基本的には実施してきた。本研究期間終了後の2005年秋に全ゲノム配列決定に至り、現在、アノテーション作業の早期の終了をめざしている。本研究期間と2005年度に、強い病原性を持つとともに、2ないし3本の染色体を持つ3株のBurkholderia属細菌の全ゲノム配列が外国で解読された。これら3株とATCC 17616株のゲノム構造を詳細に比較することで、本属細菌の各染色体の構成原理、再編成・多様化に関する知見を得ることができよう。また、他株に比べて分子遺伝学的解析が整備されたATCC 17616株を用いることで、再編成や多様化を規定する分子機構提示にまで至る可能性を大きく秘めていることから、当該機構の解明を目指す。

細胞分裂に伴い、必須機能を担う複数レプリコンが同調的に複製し、娘細胞に正確に分配されていくことは、細菌に限らず全細胞性生物の生命活動維持の継続に必須である。このような複製・分配の分子機能を追求するに当たりBurkholderia属細菌は優れた研究対象になりうる基礎的知見を本研究で示したことから、今後、ATCC 17616株の2.4 Mbと0.9 Mb染色体の複製・分配に関する分子遺伝学的並びに細胞生物学的検討を行う予定である。

ATCC 17616株の鉄レギュロン発現やカタボライト抑制に関しては、上述のように、他の主要モデル微生物には見られない特色がある。全ゲノム配列決定が終了したことも踏まえ、マイクロアレイを基盤にしたゲノムレベルでの鉄レギュロンやカタボライト抑制構成遺伝子群の同定と、これら遺伝子の発現制御の階層性の検討を行う。並行して、Furなどの統括的発現制御因子と直接相互作用するDNA領域を分子生物学的手法で取得・解析し、両者の知見をもとにシステムとしての細菌細胞が示す鉄応答やカタボライト抑制の全貌の提示をめざす。

本研究で対象としたATCC 17616株は土壌細菌である。土壌細菌が本来の複合生物自然生態系で示すゲノム情報発現は、実験室内での単一培養条件系での発現とは様相を別にしてしまうと漠然ながら示唆されている。ATCC 17616株のゲノム情報が解明されたという利点を生かし、本株ゲノム情報の発現を実験室系と生態系の双方で比較検討し、ゲノムと環境の相互作用を解明する研究が今後の重要な課題のひとつである。このような微生物ゲノム情報を用いた先導的な研究において、本研究実施期間の成果は極めて有効に活用できよう。

〈研究期間の全成果公表リスト〉

論文

1. 202271701
T. Shigematsu, J. Fukushima, M. Oyama, M. Tsuda, S. Kawamoto, and K. Okuda: Iron-mediated regulation of alkaline proteinase production in *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiol. Immunol.* 45, 579-590 (2001).
2. 303211501
H. Komatsu, Y. Imura, A. Ohori, Y. Nagata, and M. Tsuda: Distribution and organization of auxotrophic genes on the multichromosomal genome of *Burkholderia multivorans* ATCC17616. *J. Bacteriol.* 185, 3333-3343 (2003).
3. 0602031636
Y. Ohtsubo, H. Genka, H. Komatsu, Y. Nagata, and M.

Tsuda: High-temperature-induced transposition of IS elements in *Burkholderia multivorans* ATCC 17616. *Appl. Environ. Microbiol.* 71, 1822-1828 (2005).

4. 0602031640

Y. Nagata, M. Matsuda, H. Komatsu, Y. Imura, H. Sawada, Y. Ohtsubo, and M. Tsuda: Organization and localization of the *dnaA* and *dnaK* gene regions on the multichromosomal genome of *Burkholderia multivorans* ATCC 17616. *J. Biosci. Bioeng.* 99, 603-610 (2005).

5. 0602051559

M. Sota, H. Yano, Y. Nagata, Y. Ohtsubo, H. Genka, H. Anbutsu, H. Kawasaki, and M. Tsuda: Functional Analysis of unique class II insertion sequence IS1071. *Appl. Environ. Microbiol.* 72, 291-297 (2006).

その他顕著なもの、

6. 0404061328

津田雅孝, 小松春伸, 大坪嘉行, 永田裕二: 環境細菌ゲノムと環境DNA. *J. Environ. Biotechnol.* 3, 69-78 (2004).

7. 0602031650

永田裕二, 津田雅孝: メタゲノムの発想に基づいた新規環境汚染物質分解酵素遺伝子へのアプローチ. *化学と生物*43, 33-42 (2005).