

## 論文の内容の要旨

応用生命工学 専攻  
平成15年度博士課程 進学

氏 名 新谷 政己  
指導教員 山根 久和

論文題目 IncP-7 群カルバゾール分解プラスミド pCAR1 の分子遺伝学的研究

カルバゾール(CAR)は、環境汚染物質として知られる含窒素芳香族化合物である。これまでにCAR分解菌が多数単離され、特に*Pseudomonas resinovorans* CA10 株の有するCAR分解系 *car*遺伝子群とそれにコードされる酵素群については詳細に解析されてきた。一般的に、類似の分解系遺伝子群が数多くの分解菌より見出される場合、接合伝達性の分解プラスミドや、分解トランスポゾンといった可動性遺伝因子による遺伝子の水平伝播が起こっていると考えられる<sup>1)</sup>。CAR分解菌でも同様にCA10 株由来*car*遺伝子群と類似な遺伝子が多数の他のCAR資化菌から見つかるが、CA10 株の*car*遺伝子群はプラスミドpCAR1 上に局在することから、自然界でのCAR代謝系遺伝子群の分布にpCAR1 の寄与が考えられた。研究開始当初はpCAR1 についてはCAR代謝系遺伝子群以外の領域についての情報が無かったことから、その全体構造を明らかにするために、我々は199,035 bpの全塩基配列を決定した<sup>2)</sup>。その結果、接合伝達に必要なと推定される一連の*tra/trh*遺伝子群と、*car*遺伝子群を含む73-kbのクラスIIトランスポゾン(Tn4676 と命名)が見出され、*car*遺伝子群もpCAR1 自身とTn4676 によって水平伝播する可能性が示された。我々が明らかにしたpCAR1 の複製、分配、接合伝達に関与すると考えられる領域は、既知プラスミドの対応する領域と同一性が低く、pCAR1 は塩基配列情報未知の不和合性群(IncP群)に属すると推定された。これらの背景に基づいて本研究ではpCAR1 の複製・保持能の解析と、可動性遺伝因子としての機能解析を行った。

### 1. プラスミドpCAR1 の複製に必要な領域と不和合性群の決定<sup>3)</sup>

pCAR1 の塩基配列の解析と同一性検索によって、プラスミドの複製を開始するために必要と推定される遺伝子が見出され(*repA* と命名)、その直上流に染色体の複製開始点付近によく見られるA+Tに富む領域、12-bpおよび18-bpからなる反復配列(それぞれ12 merおよびiteronと命名)と、DnaA boxと推定される塩基配列が存在した(図)。さらに*repA* 周辺には複製に関与すると推定される他の読み枠も見出された。そこで、周辺領域を含む様々な長さのDNA断片と、選択マーカーとしてカナマイシン耐性遺伝子を連結したミニプラスミドを作製し、*Pseudomonas* 属細菌内で複製されるために必要な領域の絞込みを行った。その結果、*repA* とその直上流の配列のみがpCAR1 の複製に必要であり、複製開始点(*oriV*と命名)が*repA* 上流の約500 bpの領域に含まれることを明らかにした(図)。また*repA*と*oriV*が別のDNA鎖上に存在しても複製可能なことが判明した。さらにpCAR1は大腸菌内で複製されないことも併せて明らかにした。

上で作製したミニプラスミドを既知の12種のIncP群プラスミドを有する菌株に対して挿入し、2

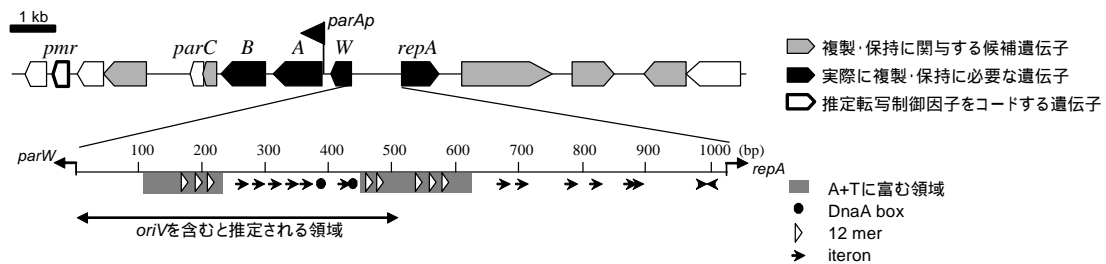


図. pCAR1上のrepA-oriV-parWABC周辺領域

つのプラスミドの共存を確かめる不和合性試験を行ったところ, IncP-7 群に属する薬剤耐性プラスミド Rms148 と共存できなかった. また pCAR1 の repA-oriV 領域をプローブとしたサザン解析でも Rms148 のみに強いシグナルが検出できたことから, pCAR1 が IncP-7 群プラスミドであると結論した. pCAR1 の塩基配列決定以前に IncP-7 群に属するプラスミドの塩基配列情報は無く, 複製に必要な複製開始タンパクと, そのターゲットとなる DNA 領域を決定した初めての例である.

## 2. 可動性遺伝因子としてのpCAR1 の解析<sup>3), 4), 5), 6)</sup>

これまでにCA10 株のcar遺伝子群ホモログは他の複数のCAR分解菌より見出されていた. そこで7株のCAR分解菌についてcar遺伝子群の局在性を調べ, 周辺の遺伝子領域をpCAR1 や Tn4676 と遺伝子レベルで比較した. その結果, 1株はTn4676 内部の約 55-kbの遺伝子領域を保持していたが<sup>4)</sup>, 3株はpCAR1 と酷似したプラスミドを有しており, さらに残りの3株はTn4676 を染色体上に保持していた<sup>5)</sup>. さらにpCAR1 とその遺伝子構造についてpCAR1 との違いが見出されないプラスミドpCAR2 を保持する*P. putida* HS01 株においては, 実際に宿主内部でプラスミド上のTn4676 が染色体上に転移する現象を見出した<sup>5)</sup>. 以上のことはpCAR1 やTn4676 がcar遺伝子群の異なる細菌間の水平伝播に寄与することを示唆している. そこで可動性遺伝因子としてのpCAR1 およびTn4676 の解析をより詳細に行った.

まずTn4676 のトランスポゼースとレゾルベースおよび推定制御タンパクをコードするmpAc, mpSTおよびmpCと推定逆向き繰り返し配列IR-aおよびIR-fを含むDNA領域に, ゲンタマイシン耐性遺伝子を組込んだミニトランスポゾン構築した. その後, 大腸菌内でRP4 およびR388 を標的プラスミドとするmating out法を用いてミニトランスポゾンの転移能を検証した. その結果, 接合伝達したプラスミドあたり約  $10^{-5}$  の頻度で転移が認められた.

次にpCAR1 の接合伝達性を解析するために, *Pseudomonas* 属細菌を中心とした様々な受容菌に対しpCAR1 の接合実験を行った. この際pCAR1 を脱落させたCA10 株 (CA10dm4 株と命名) を作製し, 受容菌の1つとして用いた. その結果, pCAR1 はCA10dm4 株と*P. putida* KT2440 株には高い頻度 (供与菌当たり  $10^{-1}$ ~ $10^{-3}$ 程度) で伝達した<sup>3), 6)</sup>. これらの結果から, pCAR1 とTn4676 が異なる細菌間でのcar遺伝子群の水平伝播装置として実際に機能しうることが実験的に証明された.

一方, *P. putida* HS01 株の有するpCAR2 は, pCAR1 が伝達しない*P. chlororaphis* や*P. fluorescens* に対しても接合伝達を検出できたが, pCAR2 をpCAR1 の元の宿主であるCA10dm4 株やKT2440 株に移し, これらの菌株を供与菌とすると, pCAR1 と同じ傾向を示した. 従って, pCAR1 とpCAR2 は*Pseudomonas* 属の菌株間で約  $10^{-5}$ ~ $10^{-7}$ 程度の頻度で同様の接合伝達能を有するが, 供与菌と受容菌の組み合わせによってはさらに大きく接合伝達頻度が変化することが示

された<sup>6)</sup>。RT-PCR解析に基づく、pCAR1 およびpCAR2 において接合伝達に関与すると推定された*tra/trh*遺伝子群は4つのオペロンから構成されるが、各オペロン上の遺伝子を標的とした定量的RT-PCRによってpCAR1 およびpCAR2 を保持する各供与菌におけるmRNAの量を比較しても、大きな転写量の変化はなかった<sup>6)</sup>。このため、供与菌を変えた際の接合伝達性の変化は*tra/trh*遺伝子群の転写量の違いに起因せず、pCAR1 上の他の遺伝子や、供与菌内の制限・修飾系機構などの宿主因子が関与する可能性が示唆された。

### 3. pCAR1 の安定な保持に寄与する遺伝子群の解析<sup>3)</sup>

一般に知られるプラスミドの安定化に必要な分配機構(partition)には、プラスミド上の遺伝子にコードされる ATPase(ParA)と DNA 結合タンパク質(ParB)の2つのタンパク質と、1つの動原体様の DNA 配列が必要である。pCAR1 上 *repA* 上流からもこれらの2つ遺伝子と相同性を示す読み枠(*parA*, *parB* と命名)が見出されたが、同一オペロンと考えうる *parA* 直上流と *parB* 直下流に、機能については全く未解明の *parW* および *parC* が存在していた(図)。これらの読み枠はpCAR1 の塩基配列発表後に報告された IncP-7 群プラスミド(pWW53, pND6-1, pL6.5)に共通して見出されることから、IncP-7 群に特異的な高い安定性を担う可能性が示唆された。そこでプラスミドの安定化にこれらの *par* 遺伝子群が寄与するかどうかを解析した。まず pCAR1 の *repA-oriV* のみを含むミニプラスミドと、*repA-oriV-parWABC* を含むミニプラスミドを作製後、*Pseudomonas* 属細菌内における安定性を比較した。その結果、前者が急速に脱落したのに対し、後者は極めて安定に保持され、*par* 遺伝子群が pCAR1 の安定性に必要であることが示された。次に、どの遺伝子が安定化に必要なのかを決定するため、各 *par* 遺伝子をフレームシフト変異によって破壊したミニプラスミドを作製し、同様に安定性について調べた。その結果 *parC* を欠損してもプラスミドは安定であったが、*parW*, *parA* および *parB* それぞれに変異を入れたミニプラスミドはいずれも不安定化した。各 *par* 遺伝子を広宿主域ベクター上の構成的に発現するプロモーター下流に挿入したプラスミドを用いて相補実験を行ったところ、ParW, ParA および ParB を単独に相補した場合には安定性が10%以下の回復に留まったが、*parWAB* 全体を含むプラスミドを用いて相補した場合、各プラスミドの安定性が50~70%程度回復した。以上より pCAR1 の安定性には ParWAB が必要であることが示された。

プラスミドの安定性を維持するためには*parWAB*遺伝子の適切な発現が重要であることから、*par*遺伝子群の転写単位を調べるため、pCAR1 を保持する菌体より全RNAを抽出してRT-PCR解析を行ったところ、*parWABC*が少なくとも1つのオペロン(*par*オペロン)として転写されていた。次に、*parW*, *parA*および*parB*各上流のDNA領域をルシフェラーゼ遺伝子の直上流に連結したレポータープラスミドを構築し、プロモーター活性の解析を行った。その結果、*parW*開始コドン上流に弱いプロモーターが、*parA*開始コドン上流に強いプロモーターが存在していることが判明した。*parA*上流についてさらに詳細に解析したところ、98 bpまでに強いプロモーターが存在していることが判明した(*parAp*と命名)。また*parA*上流のDNA領域についてプライマー伸張反応を行ったところ、*parA*開始コドン上流 25 bpの位置に転写開始点が存在した。さらに、レポーターアッセイを詳細に行い<sup>70)</sup>因子が結合すると推定される、-35, -10 プロモーター配列を見出した。

### 4. マイクロアレイ解析を用いたpCAR1 上における遺伝子の発現解析

上で述べたようなプラスミドの基本機能は宿主染色体との何らかの(相互)作用により制御されていると考えられる。そこで我々は、様々な宿主において pCAR1 と染色体上の全遺伝子がどのよ

うな協調的発現をしているか網羅的に解析することを最終目的として、マイクロアレイ解析を開始した。本研究ではその第一歩として pCAR1 をゲノム配列が解読済みの *P. putida* KT2440 株に接合伝達させた KT2440(pCAR1)株を対象としてマイクロアレイ解析を行った。まずコハク酸を炭素源として、それぞれ早期対数増殖期と定常期まで培養した各菌体より全 RNA を抽出してマイクロアレイ解析に供したところ、変動が顕著に大きかった pCAR1 上の遺伝子として、*parABC* と ORF70 (図; *pmr* と命名) が抽出された (いずれも早期対数増殖期に 3 倍以上増大)。 *pmr* 産物は *P. aeruginosa* PAO1 株より見出された転写制御因子 MvaT や大腸菌における histone like-nucleoid structuring (H-NS) タンパク質と相同性を示すが、これらのタンパク質は複数の遺伝子の発現を制御することが知られている。また、これまでに pCAR1 上からは相同性検索によって推定された転写制御因子の候補が *pmr* を含めて 3 つしか見出されず、このうち 1 つは CAR 代謝系に特異な転写制御因子であることが判明している。従ってこの *pmr* 産物が pCAR1 上の遺伝子の転写制御に関与する可能性が考えられたため、*pmr* 破壊株を作製し、破壊株と野生株の早期対数増殖期における遺伝子発現の相違をマイクロアレイ解析によって比較した。その結果、最も顕著に発現が変化した遺伝子として *parA* および *parB* が抽出された (破壊株において野生株の約 8 倍発現量が低下)。さらに破壊株と野生株における *parAp* 活性をレポーターアッセイによって比較したところ、破壊株における *parAp* 活性が野生株に比べて約 7 倍低かった。この結果より *pmr* 産物が *par* オペロンの転写を正に制御することが確認された。また、破壊株と野生株においては、他の遺伝子についても発現強度の変化が複数観察され、*pmr* 産物が複数の遺伝子の発現制御に関与する可能性が示唆された。このように H-NS 様の転写制御因子をコードする遺伝子が IncP 群プラスミドから見出された報告例は未だなく、その機能の詳細な解明が待たれる。

#### まとめ

本研究によって、pCAR1 はプラスミドとしても、また内部のトランスポゾンによっても *car* 遺伝子群の水平伝播装置として機能しうることが実験的に証明された。また複製、保持および接合伝達についてほとんど未解明であった IncP-7 群プラスミドの諸性質が明らかになった。既知の分解プラスミドのうち、これらの性質が詳細に解析されたものは IncP-1 と IncP-9 群のみであったが、本研究によって、この 2 つのタイプとは全く異なる性質を有する第 3 の分解プラスミド群を提唱することができた。またマイクロアレイ解析の結果、pCAR1 上の *pmr* がプラスミドの保持能に必要な遺伝子の発現制御を行うことが推定されたが、これはプラスミドの安定化における新規の制御機構の存在を示唆している。また、pCAR1 の塩基配列情報を用いたマイクロアレイ解析を確立したことによって、今後プラスミドの有無によって影響される染色体上の遺伝子の発現変動や、異なる生育条件における染色体とプラスミド上の遺伝子の発現の相関を解析するなど、新しい視点からの解析が可能となり、さらなる研究の発展が期待される。

- (1) Nojiri, H., Shintani, M. et al., 2004. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **64**: 154-174.
- (2) Maeda, K., Nojiri, H., Shintani, M. et al., 2003. *J. Mol. Biol.* **326**: 21-33.
- (3) Shintani, M. et al. *Appl. Environ. Microbiol.* submitted.
- (4) Shintani, M. et al., 2005. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **67**: 370-382.
- (5) Shintani, M. et al., *Biotechnol. Lett.* **27**: 1847-1853.
- (6) Shintani, M. et al., 2003. *Biotechnol. Lett.* **25**: 1255-1261.