

論文審査の結果の要旨

申請者氏名 新谷 政己

一般に、類似の分解系遺伝子群が異なる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。*Pseudomonas resinovorans* CA10 株は、環境汚染物質として知られる含窒素芳香族化合物、カルバゾール(CAR)を分解可能であり、その分解系遺伝子群、*car* 遺伝子群をプラスミド pCAR1 上に保持する。これまでに *car* 遺伝子群の水平伝播が自然界で生じることが示唆されており、この現象に pCAR1 の寄与が考えられた。申請者はまず、pCAR1 の全体構造を明らかにするために 199,035 bp の全塩基配列を決定した。その結果、接合伝達に必要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* 遺伝子群が pCAR1 自身と Tn4676 によって水平伝播する可能性が示された。さらに 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相同性が低く、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。本論文は以上の背景に基づき、pCAR1 の複製・保持能と、可動性遺伝因子としての機能についての研究をまとめた4章と、後述するマイクロアレイ解析についてまとめた1章を加えた5章から構成される。

第1章では、古典的な分解プラスミドの研究における知見を述べるとともに、大量の塩基配列情報が解読されはじめた後の研究の推移と問題点をまとめ、本論文の研究の目的と意義を述べている。

第2章では、pCAR1 の複製に必要な遺伝子が *repA* のみであることを示し、複製開始点 *oriV* を含む領域を *repA* 上流の約 345 bp まで絞りこんだ。また *repA* と *oriV* が別の DNA 鎖上に存在しても複製可能なことを示すとともに、pCAR1 のミニプラスミドを用いて不和合性試験を行い、pCAR1 が IncP-7 群に属することを示した。本章の結果は、pCAR1 は IncP-7 群プラスミドとして塩基配列を明らかにし、複製に必要な複製開始タンパク RepA 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。

第3章では、*car* 遺伝子群の水平伝播機構の解明を試みている。まず、これまでに単離された CA10 株の *car* 遺伝子群ホモログを有する、他の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、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。また pCAR1 と酷似した遺伝子構造をもつ pCAR2 の宿主、*P. putida* HS01 株内部で pCAR2 上の Tn4676 が染色体上に転移する現象も見出した。さらにミニ Tn4676 の転移能を mating out 法によって検証することに成功し、また pCAR1 が接合伝達性プラスミドであることも示した。申請者によって、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実験的に示すことに成功した。また pCAR1 と、

P. putida HS01 株の有する pCAR2 との接合伝達性の比較により、プラスミドの供与菌と受容菌の組み合わせによって大きく接合伝達頻度が変化することを見出した。この原因を探るため、pCAR1・pCAR2 の接合伝達に関与すると推定された *tra/trh* 遺伝子群について、異なる宿主間で転写量の比較を定量的 RT-PCR によって試みたが、接合伝達頻度の変化との相関を見出すことはできなかった。申請者は接合伝達頻度の変化には 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あると考えている。

第4章では、プラスミドの安定化に必要な分配機構(partition)について解析を試みている。既知の分配機構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 配列が必要だが、pCAR1 上には、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特異的な *par* 遺伝子群(*parWABC*)が存在していた。申請者によって pCAR1 の安定化に *par* 遺伝子群が寄与するかどうか解析され、その安定性に ParWAB が必要であることが示された。またプラスミドの安定な保持には、*par* 遺伝子群の適切な発現が重要であるため、転写レベルにおける解析を試みている。その結果、RT-PCR 解析によって *parWABC* が少なくとも1つの転写単位を構成し、レポータープラスミドを用いたプロモーター解析によって、*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(*parAp* と命名)が存在することが判明した。

第5章では、2~4章で明らかにしたプラスミドの基本機能を担う遺伝子を中心として、pCAR1 上の遺伝子発現の様々な生育条件下における発現変動を網羅的に解析するために、マイクロアレイ解析を試みた。申請者は 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)株を対象として実験を試みている。プラスミドの基本機能を担う遺伝子発現は、細胞の増殖期に依存して発現する場合が多い。そこで早期対数増殖期と定常期まで培養した菌体より全 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(*pmr* と命名)が抽出された。*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 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。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を行っている。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。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 1/3 に減少していた。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推定された。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、極めて新しい知見である。

以上、本論文は、pCAR1 と Tn4676 によって *car* 遺伝子群が水平伝播しうることを実験的に証明し、これまでに全く未解明であった IncP-7 群プラスミドの諸性質を世界で初めて明らかにした。さらに pCAR1 の塩基配列情報を利用した新しい視点からのマイクロアレイ解析を試みており、学術上および応用上貢献するところが少なくない。よって審査委員一同は本論が博士(農学)の学位論文として価値あるものと認めた。