

論文の内容の要旨

応用生命工学専攻
平成 16 年度博士課程 進学
氏 名 宮腰 昌利
指導教員名 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 の機能発現制御機構の解析

石油中に含まれる含窒素芳香族化合物カルバゾールは変異原性や毒性を有する化合物である。グラム陰性細菌 *Pseudomonas resinovorans* CA10 株は、カルバゾールをアントラニル酸、カテコールを経て代謝し (Fig. 1A)、カルバゾールをアントラニル酸へ分解する酵素群およびアントラニル酸をカテコールに変換するジオキシゲナーゼはそれぞれ *car* 遺伝子群および *ant* 遺伝子群にコードされる (Fig. 1B)。*car*、*ant* 遺伝子群は全塩基配列 199,035 bp が既に解読されているプラスミド pCAR1 に存在する。以前の研究で、不和合性群 IncP-7 に属する pCAR1 は *Pseudomonas* 属細菌間で水平伝播することが可能であることが示されている。染色体の全塩基配列が解読されている土壌細菌 *Pseudomonas putida* KT2440 株は、CA10 株との接合伝達の結果、pCAR1 を獲得し、カルバゾールを代謝することが可能になった。

本研究では、pCAR1 が宿主細胞内でどのように機能を発現させるのかを解明することを目的として、まずカルバゾール代謝遺伝子群が有する特異的転写制御機構を明らかにするとともに、カルバゾールを炭素源として生育する際のプラスミドおよび染色体の遺伝子発現様式を網羅的に解析した。また、付加的なレプリコンであるプラスミドを保持することによる宿主染色体への影響を調べるため、pCAR1 を保持することに対して応答する染色体遺伝子の転写制御機構を解析した。

1. *Pseudomonas resinovorans* CA10 株におけるカルバゾール代謝遺伝子群の転写制御機構

ant 遺伝子群の転写は、アントラニル酸によって誘導され、AraC/XylS family に属するアクチベーターAntR に制御されるプロモーター P_{ant} から促進されることが既に示されている。一方で、*car* 遺伝子群には様々な遺伝子再編成の痕跡が見出されており、*car* 遺伝子群の上流に *ant* 遺伝子群の上流領域が挿入配列 ISPre1 を介して転移し、この領域に P_{ant} プロモーターが含まれている (Fig. 1B)。これまでに解析されているカルバゾール産生性グラム陰性細菌の中で *Janthinobacterium* sp. J3 株が保有する *car* 遺伝子群は、CA10 株のものと比較して構造遺伝子の塩基配列が非常に類似しているにもかかわらず、上流領域への ISPre1 の転移は見られない (Fig. 1B)。そこで、ISPre1 の転移による遺伝子構造の変化がもたらすカルバゾール代謝制御系の違いを明らかにするため、CA10 株、J3 株それぞれの *car* 遺伝子群の転写制御機構を解析した。

RT-PCR の結果 CA10 株由来 *car* 遺伝子群は約 12 kb に渡る転写単位を構成し、その転写は *ant* オペロンと同様に P_{ant} プロモーターから促進されることが示された。また、*car* 遺伝子群は構成的にも転写されることがレポーター解析の結果明らかになり、プライマー伸長法により新たに *car* 遺伝子群の上流に存在する構成的プロモーター P_{carAa} が同定された。一方、J3 株由来 *car* 遺伝子群は GntR family に属するリプレッサーCarR による制御を受けるプロモーター P_{u13} から転写が促進され、カルバゾールの中間代謝物である 2-hydroxy-6-oxo-6-(2'-aminophenyl)-hexa-2,4-dienoate (HOADA)によって転写が誘導されることが示された (Fig. 1B)。また、 P_{carAa} は何れの *car* オペロンにも保存されており、構成的に発現する代謝酵素群がカルバゾール中間代謝物であるそれぞれの転写誘導物質を生成することに寄与することが推測された。

以上から、ISPre1 の転移を介して P_{u13} プロモーターが P_{ant} プロモーターに置換された結果、アントラニル酸代謝制御系と同調する CA10 株由来 *car* オペロンが形成されたことが示された。

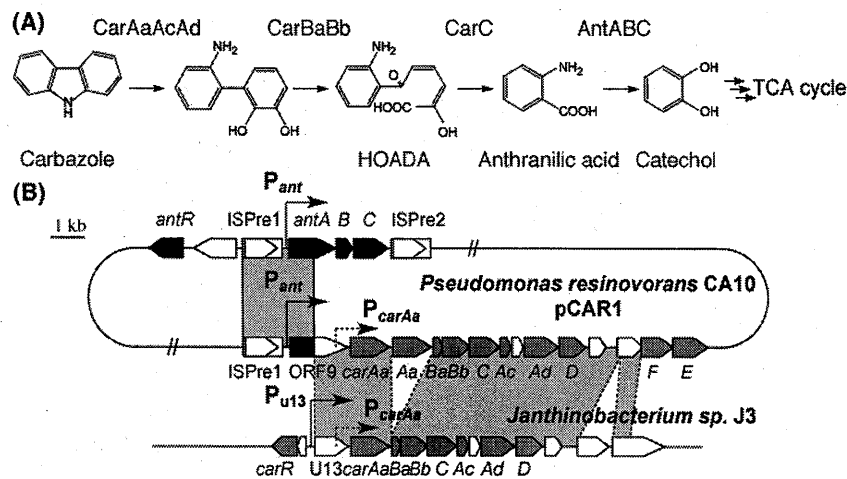


Fig. 1. (A) 細菌のカルバゾール代謝経路。(B) *P. resinovorans* CA10 株由来 *car*, *ant* オペロン、*Janthinobacterium* sp. J3 株由来 *car* オペロンの遺伝子構造。影付の領域はほぼ塩基配列が相同な領域を示す。実線の矢印は誘導性プロモーター、波線は構成的プロモーターを表す。

2. カルバゾールを炭素源として生育する *Pseudomonas putida* KT2440(pCAR1)株のプラスミド・染色体の網羅的遺伝子発現様式の解析

pCAR1 を保持する宿主細胞においてカルバゾールが代謝されるには、プラスミド上の代謝オペロンが誘導されるだけでなく、宿主染色体に存在する遺伝子が協調的に発現されなければならない。カルバゾールを代謝する際に発現変動するプラスミド遺伝子および染色体遺伝子を探索するため、カルバゾールもしくはコハク酸を炭素源として培養した KT2440(pCAR1)株の対数増殖期におけるトランスクリプトームをマイクロアレイ解析により比較した。

プラスミドに存在する 190 個の ORF の内、カルバゾール培養時に 69 個が有意な発現変動を示し (p 値 0.05 以下)、その内 52 個が発現誘導された。一方、染色体に存在する ORF の内 166 個が有意な発現変動を示したが、その内カルバゾール培養時に 76 個が発現誘導、90 個が発現抑制された。pCAR1 に存在する *car*、*ant* 遺伝子群は最も顕著な発現誘導を示し、加えてその制御遺伝子 *antR* も発現誘導された。また、染色体に存在するカテコール以降の代謝に関与する *cat*、*pca* 遺伝子群がカルバゾール培養時に発現誘導されたことから、KT2440(pCAR1)株においてもこれらの遺伝子群がカルバゾール代謝経路下流を担うことが示された。一方で、タンパク質合成およびエネルギー代謝に関与する染色体遺伝子の多くがカルバゾール培養時に発現抑制された。さらに、様々なストレス応答に関与する遺伝子の転写に必要な RNA ポリメラーゼシグマ因子をコードする *algT*、*rpoH*、*rpoS* がカルバゾール培養時に発現誘導された。

マイクロアレイ解析によりカルバゾール培養時における *antR* の発現誘導が検出されたが、*antR* の転写制御機構は未だ明らかになっていなかった。プライマー伸長法により *antR* の転写開始点を同定したところ、*antR* は RpoN 依存性プロモーターから転写されることが示された。一般に RpoN 依存性プロモーターの転写には NtrC family に属するアクチベーターが必須であるが、pCAR1 は NtrC family のタンパク質をコードしていない。このことから、pCAR1 に存在するカルバゾール代謝オペロンが転写活性化されるためには、*antR* のアクチベーターが宿主染色体にコードされていなければならないことが示唆された。KT2440 株染色体には 22 種の NtrC family 制御遺伝子が存在しており、現在 *antR* プロモーターに特異的に作用するアクチベーターを探索している。

本研究により、宿主細胞内においてカルバゾール代謝オペロンの主要な転写制御因子である *AntR* が発現するかどうかは、宿主の染色体ゲノムの性質に大きく依存することが明らかになった。プラスミドを始めとする可動性遺伝因子が水平伝播した結果、宿主の染色体ゲノムの性質に依存して発現制御系が変化することが予想されるが、pCAR1 を保持する異種宿主間で pCAR1 トランスクリプトームに違いが見出されるかどうか興味を持たれる。

3. pCAR1 の保持に応答する *Pseudomonas putida* KT2440 株染色体遺伝子の転写制御機構

プラスミドは細胞内で染色体とは別個に自律増殖するレプリコンであり、独立した複製、維持機構を有する。プラスミドを保持することは、発現させるべきタンパク質量の増加、プラスミドにコードされる DNA 結合性タンパク質による転写制御、タンパク質間相互作用の機会の増加など、予期せずに宿主細胞の生理機能を改変させる可能性を秘めている。そこで、KT2440 株が pCAR1 を保持することによって染色体遺伝子がどのように発現変動するか調べるため、コハク酸を炭素源として培養した KT2440 株と KT2440(pCAR1)株の対数増殖期におけるトランスクリプトームを比較した。

pCAR1 の保持により KT2440 株染色体に存在する 34 個の ORF が有意な発現変動を示し (倍率変動 1.5 以上、 p 値 0.05 以下)、23 個は発現誘導され、11 個は発現抑制された。この内、最も顕著な発現誘導を示した機能未知遺伝子 PP3700 は、N 末端の XRE family の helix-turn-helix (HTH) 型 DNA 結合ドメインとともに、染色体やプラスミドの能動的分配に関与する ParA に類似した Walker 型 ATPase ドメインを有するタンパク質をコードすると推定された。

プライマー伸長法により、PP3700 の転写開始点を同定するとともに、PP3700 の転写が pCAR1 を保持する時に特異的に誘導されることを明らかにした。レポーター解析の結果、その転写誘導には転写開始点を+1 として-50 までのプロモーター領域が必要であることが示され、-50 から -38 の領域に回文様配列が見出された。また、KT2440 株において PP3700 を過剰発現させることによって PP3700 プロモーターが転写活性化されたことから、PP3700 は PP3700 タンパク質自身によって発現誘導されることが示された。また、pCAR1 の能動的分配に関与する ParA を過剰発現させることによって PP3700 プロモーターはより強く転写活性化された。このことから、pCAR1 と宿主染色体の間に ParA family タンパク質を介した特異的な転写制御機構が存在することが明らかになった。

本研究ではマイクロアレイを用いた機能ゲノム学的手法により、レプリコンの能動的分配機構に関与すると考えられる染色体支配の新規 ParA ホモログ PP3700 を発見した。プラスミドの発見以来、細胞分裂におけるプラスミドの能動的分配には特異的な宿主因子が関与することが予想されていたが、このような宿主因子は変異株スクリーニングなど従来の手法では未だに同定されていない。腸内細菌を除く細菌ゲノムには普遍的に複数の ParA ホモログが存在しており、これらが特異的に誘導される条件に加えて能動的分配においてどのように機能するのか、更なる研究が必要である。