

論文審査の結果の要旨

申請者氏名

宮腰 昌利

原核生物においてプラスミドは染色体とは独立のレプリコンであり、宿主に難分解性物質代謝能などの様々な形質を付与する。石油中に含まれる含窒素芳香族化合物カルバゾールを代謝するグラム陰性細菌 *Pseudomonas resinovorans* CA10 株は分解プラスミド pCAR1 を有し、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をそれぞれコードする *car* オペロンおよび *ant* オペロンは pCAR1 上に存在する。pCAR1 の全塩基配列 199,035 bp が既に解読されており、pCAR1 の分子遺伝学的研究により pCAR1 が不和合性群 IncP-7 に属し、*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 株との接合伝達により pCAR1 を獲得し、カルバゾールおよびアントラニル酸を代謝することが可能になる。

本論文は、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、カルバゾール代謝オペロンの代謝経路特異的な転写制御機構、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網羅的転写様式、ならびに pCAR1 を保持することに対して応答する染色体の網羅的転写様式を解析したものであり、全 5 章から構成される。

分解プラスミドのゲノム研究の現状とその後のポストゲノム研究の必要性と方法論を述べた序論に引き続き、第 2 章では、CA10 株における *car* オペロンの転写制御機構を解析している。pCAR1 上に存在する *car* オペロンは約 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を明らかにした。また、*car* オペロンは構成的にも転写されることを明らかにし、新たに *car* オペロンの上流に存在する構成的プロモーター P_{carAa} を同定した。さらに、他のカルバゾール資化性グラム陰性細菌 *Janthinobacterium* sp. J3 株から単離された非常に類似性が高い遺伝子構造を有する *car* オペロンが、pCAR1 上の *car* オペロンとは転写制御系が異なることを明らかにし、pCAR1 上において遺伝子再編成に伴う P_{ant} プロモーターの獲得によりアントラニル酸代謝制御系と同調するカルバゾール代謝制御系が形成されたことを示した。

第 3 章では、カルバゾールを代謝する際に発現変動する pCAR1 上および染色体上の遺伝子を探索するため、カルバゾールを炭素源として培養した KT2440(pCAR1) 株の対数増殖期における網羅的転写様式を、比較する炭素源としてコハク酸を用いて高密度 DNA マイクロアレイにより解析している。カルバゾール生育時における *car*、*ant* オペロンの発現誘導の他に、染色体上にコードされるカテコール代謝酵素群の発現誘導やストレス応答誘導など、カルバゾールを炭素源として生育する宿主細胞内における pCAR1 と染色体との協調的な転写ネットワークを明らかにした。さらに、*car*、*ant* オペロンのアクチベーターをコードする *antR* 遺伝子が RpoN 依存性プロモーターから転写されることを明らかにし、pCAR1

を保持する宿主細胞のカルバゾール代謝能は宿主染色体ゲノムの性質に大きく依存する可能性を示唆した。

第4章では、pCAR1を保持することによって宿主染色体上の遺伝子がどのように発現変動するかを調べるため、コハク酸を炭素源として培養したKT2440株とKT2440(pCAR1)株を比較し、pCAR1を保持することによる染色体の網羅的転写様式を解析している。その結果、pCAR1を保持するときに特異的に転写活性化される機能未知遺伝子PP3700を発見した。PP3700は細胞分裂においてプラスミドの能動的分配に関与するParAに類似するATPaseドメインを有していた。転写解析によりPP3700の転写活性化を誘導するタンパク質がpCAR1上にコードされるParAであり、さらにPP3700タンパク質自身によっても転写活性化されることが明らかになった。以上から、pCAR1を保持することにより転写活性化されるPP3700がpCAR1の能動的分配に関与する宿主因子である可能性が示唆された。

以上、本論文は全塩基配列が解読されているIncP-7群カルバゾール分解プラスミドpCAR1を材料に、プラスミド上の分解遺伝子が適切に発現され、さらにプラスミドが独立したレプリコンとして複製、保持されるために必要な宿主染色体との相互作用の網羅的解析に道筋をつけたもので、学術上ならびに応用上貢献するところ大である。よって審査委員一同は本論文が博士（農学）の学位論文として価値があるものと認めた。