

論文の内容の要旨

応用生命工学 専攻
平成 20 年度博士課程 進学
氏 名 武田 俊春
指導教員名 山根 久和

論文題目

カルバゾール分解プラスミド pCAR1 上にコードされる核様体タンパク質の機能解析

核様体タンパク質 (NAPs, nucleoid-associated proteins)は細菌の細胞内に著量存在するタンパク質であり、DNA をコンパクトに折りたたむと共に、様々な遺伝子の転写制御に影響を及ぼすことが知られている。また、これら NAPs がプラスミド上にコードされる例も知られており、こうしたプラスミドが宿主細胞内に入ると、染色体・プラスミド双方にコードされる NAPs が協調的に機能し、遺伝子発現を制御することでプラスミド由来の難分解性物質分解能や重金属耐性、抗生物質耐性といった多様な形質を宿主に付与したり、染色体に由来する種々の機能を変動させたりすることとなる。すなわち、プラスミドの機能発現様式を理解するためには NAPs の機能についての理解が重要となるが、プラスミド上にコードされる NAPs についての研究は本博士論文研究開始当初はほとんど行われていないのが現状であった。そうした中、我々の研究グループでは、全塩基配列が解読済みのカルバゾール分解プラスミド pCAR1 をモデル土壌細菌 *Pseudomonas putida* KT2440 株に保持させ、プラスミド上にコードされる NAPs の役割・制御メカニズムについて解析を行ってきた。pCAR1 上には 3 つの NAPs (Pmr、Phu および Pnd)がコードされており、大腸菌で良く研究されている H-NS (*Pseudomonas* 属細菌の MvaT)の相同タンパク質である Pmr については高密度タイリングアレイを用いたトランスクリプトーム解析や結合位置の網羅的検出から、染色体・プラスミド双方の多数の遺伝子の転写制御に関わること、染色体由来の H-NS 様因子と相互作用することが明らかにされた。このような状況から、pCAR1 上の残る 2 つの NAPs

もプラスミド機能の発現において重要な役割を担っていると推測された。

以上の背景から、本研究では pCAR1 上にコードされる各 NAPs の役割に興味を持ち、これを明らかにすることを目的とした。まず基盤情報として、NAPs を保持するプラスミドの分布・特徴を解析した後に、pCAR1 上にコードされる Phu、Pnd の転写・発現様式および溶液中での性状を解析した。また Pmr を含む各 NAPs をコードする遺伝子を除去した破壊株を作製し、NAPs の除去が宿主に及ぼす影響を解析した。

1. 核様体タンパク質遺伝子を保持するプラスミドの分布とその特徴¹⁾

可動性遺伝子であるプラスミドの振る舞いや役割と、プラスミド上に NAPs 遺伝子が存在することの間に何らかの普遍的な関連性があるか否かについて興味を持たれたが、本研究開始当初はプラスミド由来の NAPs 研究自体が少なく、それらも特定のプラスミド由来の特定の NAPs の機能を追究するものに限られており、客観的考察は不十分・不可能であった。そこで、全塩基配列情報既知のプラスミドの配列情報データベースを取得し、NAPs 遺伝子を保持するプラスミドを網羅的に抽出すると共に、それらのサイズ、G+C 含量、接合伝達性等の特徴について考察を行った。

グラム陰性細菌由来の 1,382 個のプラスミドに対し、グラム陰性細菌由来の NAPs (Fis, H-NS, HU, IHF, Lrp, MvaT, NdpA) をクエリとして TBLASTN 解析を行った結果、136 個のプラスミド上に計 210 個の NAPs 遺伝子が存在していた。NAPs 遺伝子を 2 つ以上保持するプラスミド、1 つのみ保持するプラスミドの平均サイズはそれぞれ 790 kb、199 kb であり、1,382 個のプラスミドの平均サイズ (83 kb) よりも大きいことが明らかとなった。サイズの大きなプラスミドほど宿主細菌の転写ネットワークを乱し適合度を低下させるような遺伝子を有する可能性が高くなると共に、宿主細菌由来の NAPs の多くがプラスミド上に結合することで染色体上に結合する量が不足して転写ネットワークに乱れが生じ、宿主にとって負荷となることが予想される。つまりサイズの大きなプラスミドはプラスミドを保持することにより宿主に生じる負荷を軽減させるため、NAPs 遺伝子を保持する方が都合がよいという可能性が考えられた。

また、H-NS ホモログ遺伝子を有するプラスミドは G+C 含量が低い傾向があった。H-NS は A+T-rich な領域に好んで結合するため、比較的サイズが大きく G+C 含量が低いプラスミドが宿主細胞内に入ると、各種 NAPs のうち特に H-NS が不足し宿主に負荷を与えると考えられた。すなわち、不足分を補うために低 G+C 含量プラスミドは H-NS 遺伝子を持つ方が有利であると考えられた。

さらにプラスミドの接合伝達に必須な relaxase 配列の有無に基づき、プラスミドの伝達性と NAPs 遺伝子の有無に関連があるか否かを調べた。その結果、NAPs 遺伝子を有するプラスミドの方が relaxase 遺伝子を保持する傾向があることが明らかとなった。このことは、グラム陰性細菌由来プラスミドの接合伝達関連遺伝子群はサイズが大きく、そのため接合伝達性プラスミドが必然的にサイズが大きい傾向があることと関連があ

ると考えられるが、NAPs が多数の遺伝子の転写を制御する *global regulator* として働くことを考慮するとプラスミドの伝達にも関与していると推測された。

2. 核様体タンパク質 Pnd、Phu の発現解析

Pnd は NdpA ホモログであるが、NdpA はグラム陰性細菌内で広く保存されるものの研究例が少なく機能がほとんど不明なタンパク質であった。また Phu は HU ホモログであり、HU は主に大腸菌での研究から二量体を形成し湾曲した DNA 領域に結合すること、様々な遺伝子の転写制御に影響を与えることが明らかとなっていたが、プラスミド上にコードされる HU の機能を追究した研究例は本研究開始当初まで存在しなかった。そのため Pnd および Phu の解析を行うことで NAPs の機能に関する有用な新知見が得られるものと期待された。

まず pCAR1 を保持する *P. putida* KT2440 株を用いて転写レベルの解析を行った結果、*pnd*、*phu* はいずれも対数増殖期をピークとして構成的に転写されることが明らかとなった。また *phu* は翻訳開始点の 70 塩基上流に転写開始点を持ち、その 5' 上流域には σ^{70} 因子の結合配列が見出された。一方、我々のグループで以前行われたタイリングアレイ解析により *pnd* の転写レベルは *pmr* および *phu* よりも低いことが明らかとなっており、本研究でも *pnd* の転写開始点の決定には至っていない。次に His タグ融合 Pnd、Phu 発現株を作製し翻訳レベルの解析を行った。各株をコハク酸を唯一の炭素源とする無機液体培地で培養し、経時的にサンプリングした菌体から可溶性タンパク質を抽出してウェスタンブロッティング解析に供した。その結果、Phu、Pnd いずれも可溶性タンパク質 1 μg 中に少なくとも 1.1 ng 以下しか存在していないことが明らかとなった。

さらに His タグ融合 Pnd、Phu の大腸菌での発現・精製系を構築した。ゲルろ過クロマトグラフィーおよびクロスリンク法により、Phu は溶液中で二量体を形成していることが示された。*phu* の転写プロファイルおよび Phu の性状はいずれも大腸菌と *Pseudomonas* 属細菌における染色体由来 HU タンパク質の性質と一致していたことから、Phu は HU と配列の相同性を示すだけでなく、類似の機能・役割を有しているものと考えられた。一方、Pnd については明瞭な結果ではないものの溶液中で三量体を形成する可能性が示唆された。NdpA の多量体形成能を解析した研究例は現在までに無く、今後は立体構造解析などによる正確な性状の把握が期待される。

3. pCAR1 由来 NAPs 遺伝子破壊が宿主に与える影響の解析

pCAR1 上にコードされる 3 つの NAPs の機能を明らかにするため、各々をコードする遺伝子を除去した破壊株を作製し、表現型やトランスクリプトームの変化を解析した。

まず各遺伝子の単独破壊株を作製し、コハク酸を炭素源とする無機液体培地での生育や軟寒天培地での運動性、プラスミドの保持率といった表現型を調べたが、いずれも野生株との差異は認められなかった。一方、NAPs 遺伝子を 2 つ除去した二重破壊株を作

製したところ、*pmr* と *pnd*、*pmr* と *phu* の二重破壊株では継代培養を経ることで pCAR1 の構造変化および脱落が生じる頻度が高くなることが明らかとなった。この表現型は各株への *pmr* の導入により相補されたことから、各 NAPs 遺伝子破壊に起因するものであることが強く示唆された。これら二重破壊株では他にもバイオフィーム中で宿主菌体の糸状化が促進されること、*pmr* の相補によりこの表現型が消失することが明らかとなりつつある（当研究室、李ら、未発表データ）。

次に作製した破壊株を BIOLOG 社製 Phenotype MicroArray に供し、利用できる基質や浸透圧ストレス耐性、pH 耐性など 576 条件での表現型を解析した。その結果 *pmr*、*pnd*、*phu* 単独破壊株はそれぞれ野生株と比較して 10、1、4 個の条件で異なる表現型を示した。また *pmr* と *pnd* の二重破壊株は *pmr*、*pnd* 単独破壊株と比較してそれぞれ 12、16 個の条件で、*pmr* と *phu* の二重破壊株は *pmr*、*phu* 単独破壊株と比較してそれぞれ 23、19 個の条件で異なる表現型を示した。すなわち、二重破壊株では単独破壊株よりも多くの条件で表現型の変動が検出された。さらに 3 つの NAPs 遺伝子の転写量が共に最大となる対数増殖期まで各株を培養し、高密度タイリングアレイを用いた RNA マッピング解析を行ってトランスクリプトームを比較した結果、*pmr* 単独破壊株および二重破壊株では多くの遺伝子の転写変動が検出された。各解析は培養条件が異なるため同列に議論することはできないが、トランスクリプトーム解析で転写変動遺伝子が多く抽出された破壊株ほど Phenotype MicroArray 解析で変動した表現型の数も多い傾向が見出された。また *pmr*、*pnd*、*phu* のレギュロン間で多くの重複が認められたことから、各 NAPs は協調的に機能し転写制御を行っている可能性が示唆された。二重破壊株で pCAR1 の構造が不安定化する表現型は *pmr* ともう 1 つの NAPs 遺伝子を除去した株でのみ見出され、*pnd* と *phu* の二重破壊株では認められなかったことも考慮すると、菌体内では pCAR1 由来の 3 つの NAPs のうち Pmr が中心となって機能し Pnd および Phu が補佐的に働くことで、多数の遺伝子について協調的な転写制御を行っていることが推測された。

4. まとめと今後の展望

本研究により、pCAR1 上の 3 つの NAPs が協調的に転写ネットワーク制御を行っていることが示唆された。今後は各 NAPs 間のタンパク質レベルでの相互作用の有無を明らかにすると共に、染色体上およびプラスミド上への結合能、染色体由来の NAPs との相互作用の有無についても解析を行うことで、NAPs がプラスミド上にコードされる意義に迫ることができるものと期待される。

文献

1) Takeda, T., Yun, C.-S., Shintani, M., Yamane, H., and Nojiri, H. 2011. Distribution of Genes Encoding Nucleoid-Associated Protein Homologs in Plasmids. *International Journal of Evolutionary Biology*. in press.