

論文の内容の要旨

応用生命工学 専攻
平成21年度博士課程 進学
氏名 高橋 裕里香
指導教員名 山根 久和

論文題目 染色体機能調節因子としてのプラスミドの機能の解明

第1章 序論

プラスミドをはじめとする可動性遺伝因子は宿主の新規遺伝子の獲得を補助し、宿主の環境適応（進化）に大きな役割を担う。中でもプラスミドに関しては、約60年前にその存在が発見されて以来、それらの抗生物質耐性能や新規代謝能をコードする遺伝子の解析だけでなく、複製・分配・接合伝達といったプラスミドの維持や伝播を司る遺伝子の解析、それに基づく分類、有用なベクターの開発など、膨大な知見が蓄積している。しかし、こうした研究では、プラスミドの機能は様々な宿主内で同様であると盲目的に考え、宿主染色体の違いや周囲の環境によって変化する細胞内環境の違いを考慮しないことがほとんどであった。さらに、その細胞内環境もプラスミド自体の存在によってまた変化しうると予想される。プラスミドを保持することが“負荷”になる場合があることは古くから経験的に知られているが、プラスミドによって宿主細胞内に起こる変化の実体は未だ解明な部分が多い。そこで本研究では、IncP-7 群カルバゾール分解プラスミド pCAR1 とゲノム既知の *Pseudomonas* 属宿主3種 (*P. putida* KT2440 株, *P. aeruginosa* PAO1 株, *P. fluorescens* Pf0-1 株) をモデルとして、プラスミドが宿主細胞内で機能する様式を整理し、それが異なる宿主・異なるプラスミドでどこまで共通なのか明らかにすることを目的とした。

第2章 pCAR1 の保持に伴って変化する宿主の表現型の探索と宿主間での比較

宿主が示す表現型の変化の度合いが異なった場合、宿主ごとの pCAR1 のコピー数の違いが原因である可能性が考えられたため、まず各宿主でのコピー数を定量

PCR で測定した。その結果、コハク酸を唯一の炭素源とする液体無機培地（以下、特に明記しない限り本研究の解析はこの培養条件で行った）では生育段階に関わらず 3 宿主におけるコピー数は 1~3 でほぼ一定であることが示された。

そこで、Phenotype Microarray (Biolog 社) を用いて、pCAR1 を保持した際に宿主の呼吸量（細胞内還元力）が変化する培養条件を探索した。まず浸透圧・pH を変化した際に一部の条件で呼吸量の低下が認められたことから、pCAR1 を保持すると特定のストレスへの耐性が低下することが示された。また無機培地中の C 源（190 種）、N 源（95 種）、P 源（59 種）、S 源（35 種）を変化させた際には、KT2440 株で 66 条件、PAO1 株で 36 条件、Pf0-1 株では 31 条件で呼吸量の変化が認められ、その中のほぼ全ての条件で呼吸量が低下したことから、pCAR1 を保持すると細胞内の各化合物特異的な代謝が低下することが示された。宿主間で共通な傾向としては、KT2440 株と PAO1 株で α -ketoglutarate, fumarate, malate, acetate, lactate 等の TCA 回路とその周辺の代謝経路上の化合物を C 源として与えた際の呼吸量の低下が挙げられる（図 1）。Pf0-1 株ではこれらの条件でも呼吸量の低下がほとんど認められないことから、この変化は宿主ごとに発露の仕方が変化することも示された。KT2440 株においては、pCAR1 上の核様体タンパク質（NAPs）遺伝子である *pmr*, *phu*, *pnd* のいずれかを破壊すると、上記呼吸量の低下が若干回復することから、これらの代謝経路の活性低下の一因はこれらの NAPs にあることも示された。

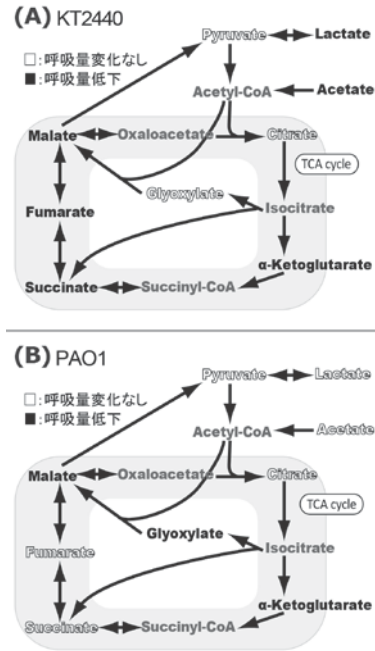


図1. pCAR1を保持した際に呼吸量が低下する基質（C源として）

第 3 章 pCAR1 の保持により転写変動する宿主染色体遺伝子の探索と宿主間比較

pCAR1 保持株と非保持株について、対数期から定常期までの 4 経時点での染色体トランスクリプトームデータをタイリングアレイによって取得し、転写プロファイルの相違度を基準として pCAR1 を保持した際に転写変動した遺伝子を選抜した。その結果、KT2440 株で 1,240 個、PAO1 株で 241 個、Pf0-1 株で 92 個の ORF が選抜された。この転写変動した ORF の数の傾向は、第 2 章で述べた解析において pCAR1 の保持により呼吸量が低下した培養条件の数の傾向、及び各宿主において pCAR1 保持株と非保持株とを混合培養した際に pCAR1 保持株が淘汰される速度の傾向（当研究室 Takase ら、未発表データ）と一致しており、pCAR1 を保持する際の負荷が KT2440 株 > PAO1 株 > Pf0-1 株の順に大きいことが示された。

選抜された ORF の内容を宿主間で比較するため、(1) 3 宿主での保存性、(2) 転写プロファイルの傾向、(3) 機能の観点から分類した。対数期よりも定常期で pCAR1 を保持した際の転写変動が大きいという傾向は 3 宿主共通であったが、Pf0-1 株で転写変動した ORF は Pf0-1 株固有の遺伝子が多い一方で、KT2440 株と PAO1 株で

は3宿主に保存されたORFが多く、2株でその内容も類似していた。KT2440株とPAO1株では、F-type ATPase (*atp*), RNAP core (*rpo*), succinate dehydrogenase (*sdh*) 等の本来対数期に盛んに転写され定常期に入ると完全に抑制される多くの遺伝子が、pCAR1を保持すると完全には抑制されなくなっていた。この傾向は *pmr* 遺伝子を破壊したKT2440(pCAR1)株でさらに亢進したことから、この脱抑制現象にPmrは負的作用を有することが示された。さらに3宿主に保存されている遺伝子でもKT2440株のみで転写変動しているものも多かった。

第4章 宿主によって転写パターンの変化するpCAR1上の遺伝子の探索と解析

pCAR1の負荷の大きさが3宿主で異なる原因の一つとして、pCAR1上の遺伝子の転写状況が宿主ごとに異なる可能性が考えられたため、pCAR1自身の転写パターンを3宿主間で比較した。pCAR1上の全74個の転写単位の中で、54個の転写プロファイルは3宿主ではほぼ共通だったが、17個は宿主によって異なる転写プロファイルを示し、転写パターンによって (A) PAO1株とPf0-1株では対数期特異的だがKT2440株では恒常的、(B) KT2440株とPAO1株では定常期特異的だがPf0-1株では転写なし、(C) KT2440株のみで転写あり、(D) 宿主ごとに転写パターンが異なる、の4つのグループに分類された (図2)。(D)は核様体タンパク質をコードする遺伝子であり量的な差が、宿主染色体由来の核様体タンパク質の質的・量的な違いと相

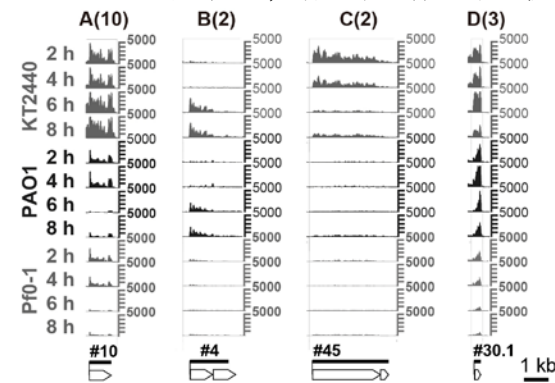


図2. 宿主によって転写プロファイルが変化した転写単位の例。各グループの代表となる転写単位のRNAマップを1つずつ示し、カッコ内にそのグループに含まれる転写単位の数を表す。

乗的に機能して、宿主ごとに固有の形質を出現させる可能性が示唆された。一方、(A)~(C)にはトランスポゾンや挿入配列の *transposase* や *resolvase* が多く含まれていた。これらの転写プロファイルの傾向から、KT2440株ではpCAR1から転写される転写単位の数が多く転写される時期も長いことがpCAR1を保持した際の負荷が他の2株より大きい原因の一つなのではないかと推測された。

第5章 プラスミドの保持により転写変動する染色体遺伝子のプラスミド間比較

pCAR1を保持した際の宿主染色体の転写変動が他のプラスミドでも共通する現象なのか否かを評価するため、RP4 (IncP-1, 60 kb), NAH7 (IncP-9, 82 kb) をそれぞれ保持する *P. putida* KT2440株を作製し、各プラスミド保持株の対数期と定常期の染色体トランスクリプトームデータを取得した。同じ生育段階のプラスミド非保持株のデータと比較したところ、転写変動した遺伝子 (fold change ≥ 4) の数はRP4保持株で574個、NAH7保持株で322個であり、同じ方法で解析したpCAR1保持株での数(89個)と比較して多かった。さらに各生育段階で誘導されたものと抑制されたものに分類してみると、pCAR1を保持した際には誘導された遺伝子が多いのに対し、RP4・NAH7では抑制

された遺伝子が多いこと、また pCAR1 保持株で変動した遺伝子には機能既知なものが多い一方、RP4・NAH7 で変動した遺伝子は機能未知なものが多く pCAR1 で変動したものと共通性が少ないことも示された (図 3)。しかし、興味深い点として pyrroloquinoline quinone (PQQ) 合成遺伝子と PQQ 含有酵素遺伝子を含む 1 領域が 3 種のプラスミド保持株で共通して誘導されており (図 3A, ベン図の共通部分に相当)、全く種類の異なるプラスミドでも宿主に共通の反応を引き起こすことが示された。

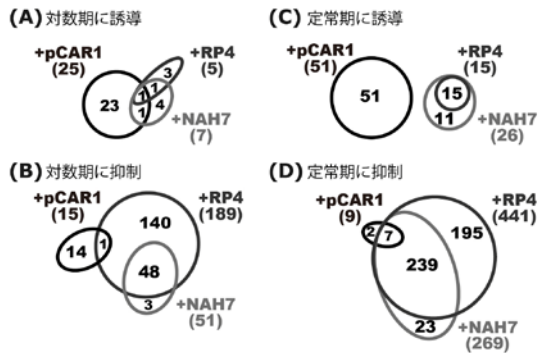


図3. 3種のプラスミドによってそれぞれ転写変動する遺伝子の包含関係

第 6 章 総括と展望

本研究で検出した pCAR1 を保持した際に起こる変化を、以上の文中で取り上げなかった現象も含めて、以下の図 4 に模式的に示した。プラスミド上にコードされた遺伝子が発現する影響だけでなく、宿主染色体上の遺伝子の発現を変化させる影響、さらにそれらによって細胞内物質質量が変化したことによって引き起こされる影響を検出した。pCAR1 を保持した 3 宿主の比較では、宿主の変化は KT2440 株で一番大きかったが、KT2440 株を宿主として他のプラスミドを保持した際の変化と比較すると、pCAR1 による影響は比較的小さいことが示された。本研究は、これまで茫漠と語られてきた“プラスミドの負荷”の実体を明らかにしたものであるが、その負荷の宿主間・プラスミド間での共通性を検討したものととも言える。さらに、これらの現象への pCAR1 上の NAPs の関与を検討し、NAPs が関与する現象と関与しない現象両方を見出した (図 4)。今後、本研究で発見したプラスミドと宿主の相互作用に基づく変化の分子メカニズムを詳細に解析することで、細菌の機能進化や生き残りに重要なプラスミドの働きを正しく理解する基盤情報となると期待される。

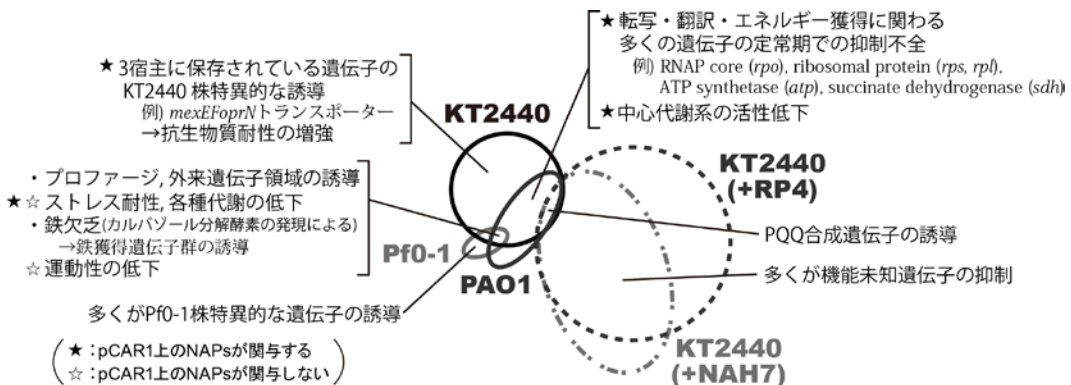


図4. プラスミドが宿主に与える影響の宿主間での比較とプラスミド間の比較