

論文の内容の要旨

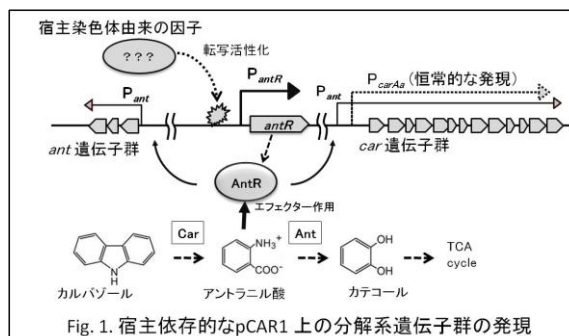
応用生命工学 専攻
平成 21 年度博士課程 入学
氏 名 岩田 修
指導教員名 野尻 秀昭

論文題目

プラスミド由来カルバゾール分解系制御遺伝子 *antR* の
発現制御機構と宿主依存性の解析

本研究における背景・目的

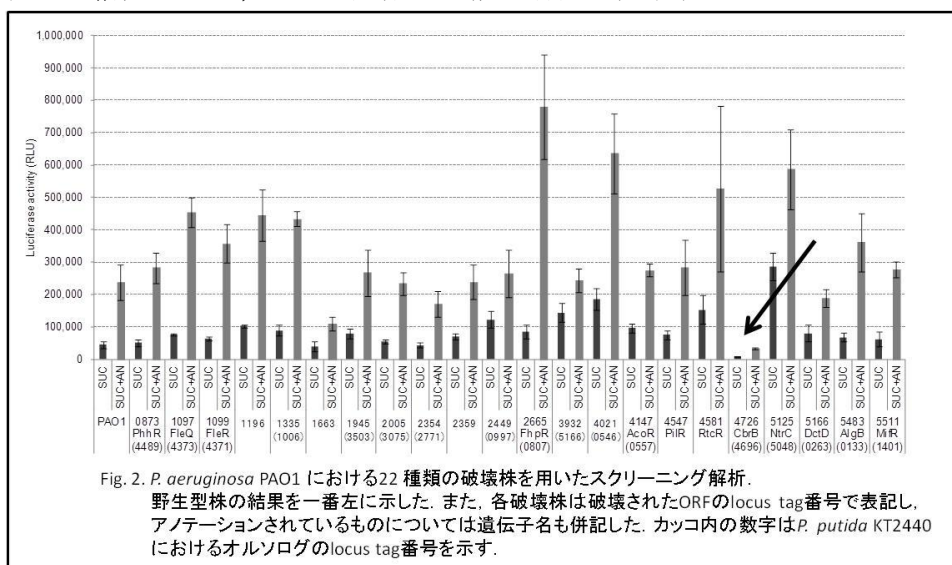
分解プラスミド pCAR1 は主に *Pseudomonas* 属を宿主とし、カルバゾール分解能を付与する。カルバゾールは石油中に含まれる含窒素芳香族化合物であり、pCAR1 上にコードされている分解系遺伝子群 (*car*, *ant* 遺伝子群) の発現により、アントラニル酸、カテコールを経由して分解される。これまでにモデル宿主 *Pseudomonas putida* KT2440 を用いた解析によって、AraC/XylS family に属する転写因子 AntR がそれら分解系遺伝子群の転写を制御するマスターレギュレーターであることが明らかにされている (Fig. 1)。また、分解系遺伝子のプロモーターについても詳細に解析され、恒常的に発現する P_{carAa} プロモーターに加えて、誘導的な P_{ant} プロモーターからの転写が活性化されることで、宿主は強力な分解能を発揮することが分かっている。その際には、中間代謝産物であるアントラニル酸が AntR のエフェクターとして作用することで誘導的な転写が起きる。また、直近の解析からは *antR* 自身のプロモーターが σ^{54} 依存的な転写



制御下にあることが判明し、その活性化には別途 σ^{54} -dependent activator が必要であることが明らかになっていた。しかし、pCAR1 上に当該遺伝子がコードされていないことから *antR* の転写制御は宿主染色体由来の因子が関与することがこれまで予想されていた (Fig. 1)。このことは *antR* の転写制御が宿主依存的であることを示すとともに、pCAR1 が接合伝達により異なる宿主へ移動すると、各宿主に応じた *antR* の転写制御が行われることを示唆している。そして、その関与する因子の発現量や質においてカルバゾール分解系遺伝子群の制御が変動する可能性を意味している。このような宿主依存性に着目し、あるプラスミドが宿主を変えることでそこにコードされている遺伝子の制御がどのような影響を受けるのかという評価をした例は知る限りない。そこで本研究では、*antR* の転写制御を担う宿主因子について同定するとともに、転写制御機構の宿主依存性というユニークな性質に着目し、宿主が変化した際に *antR* を中心とした分解系遺伝子群の発現系がどのように機能変化するかを評価することを目的とした。

22 種類の破壊株解析による宿主因子 (*cbrB* 遺伝子) の同定

pCAR1 の宿主として我々の研究グループでも解析に用いている *P. aeruginosa* PAO1 は、ゲノムの塩基配列が既知であり、22 種類の σ^{54} -dependent activator を持つことが明らかにされている。また、米国ワシントン大学から破壊株ライブラリーが頒布されていることから、本研究においては、まず *P. aeruginosa* PAO1 の 22 種類の σ^{54} -dependent activator 遺伝子破壊株を用いて *antR* の転写活性化を担う宿主因子のスクリーニングをレポーター解析により行った。レポータープラスミドは、*antR* 遺伝子上流プロモーター領域と ORF の下流にルシフェラーゼ遺伝子をつないだものを用いた。解析にあたっては、非誘導条件としてのコハク酸処理 (SUC) と誘導条件としてコハク酸にアントラニル酸を加えた処理 (SUC + AN) の 2 条件下で 3 h 培養後、各株のルシフェラーゼ活性を比較検討した。その結果、*cbrB* (PA4726) 破壊株において活性が両条件下で最も顕著に低下したことから (Fig. 2)、CbrB による *antR* の転写制御が予想された。そこで *P. putida* KT2440 において *cbrB* 破壊株を改めて作製し、レポーター解析を行ったところ、非誘導条件での活性がおよそ 1 割程度まで低下し、かつ誘導条件における誘導倍率も 2 倍程度 (本来は約 4~5 倍) となり、PAO1 同様に大幅に活性が低下することが示された。



Pseudomonas 属においてゲノム既知の 10 種 34 株は全て *cbrB* 相同遺伝子を持つが、それらのアミノ酸配列は全てにおいて 80% 以上の identity を持ち、加えて重要なドメインはほぼ完全に保存されている。このことから、宿主共通で CbrB が *antR* の転写制御に共通して関与していると考えられた。

CbrB による *antR* の転写および翻訳段階における 2 段階制御

CbrB は CbrA-CbrB 二成分制御系を構成する response regulator であり、NtrC family に属する σ^{54} -dependent activator である。これまでに *P. aeruginosa* PAO1 を用いた解析から CbrA-CbrB は細胞内の炭素源と窒素源のバランス変化に応答して、多数の遺伝子発現を制御する global regulator であることが報告されている。特に CrcZ と呼ばれる small RNA の発現を担い、それが翻訳阻害機能をもつ Crc タンパク質をトラップすることで一連の遺伝子の翻訳阻害を解除することが明らかにされている (Fig. 6 参照)。また、翻訳阻害を受ける遺伝子は翻訳開始点付近に Crc が結合する CA motif と呼ばれる配列 (AACAAACA) を有することが既に提唱されている。ここで *antR* においてもそれに近似した配列 (AACAAAGAA) が存在することから、CA motif と同様の機能を持つのか検証することとした。この類似配列に変異を導入したレポータープラスミドを作製し、pCAR1 を保持する KT2440 を用いてレポーター解析をコハク酸条件下で行った。その結果、CA motif が変異により失われることでルシフェラーゼ活性が上昇するのを確認できた (Fig. 3)。これは CbrB が *antR* に対しては転写段階だけでなく、翻訳阻害の解除を介した制御にも関与していることを示唆するものであり、2 段階の制御により発現量の厳密なコントロールが行われていると推測される。

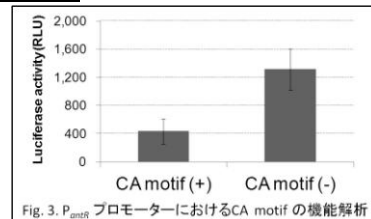


Fig. 3. *P. antR* プロモーターにおける CA motif の機能解析

異なる宿主における発現制御ネットワークの変化

P. aeruginosa PAO1 は染色体上にアミノ酸レベルで相同性 59% の *antR* オルソログ (以後、*antR_{PA}*) が存在しており、AntR と類似の機能をもつ可能性が考えられた。実際に、*AntR_{PA}* は pCAR1 上の *P_{ant}* プロモーターを活性化することから (Fig. 4)、PAO1 細胞内での pCAR1 上の分解系転写制御を考える時は、その存在を考慮に入れる必要がある。*antR_{PA}* について 5' RACE 解析を行い翻訳開始点 50 bp 上流に転写開始点が存在することを明らかにしたところ、転写開始点上流に -35, -10 element に相当する配列が存在し、*antR_{PA}* の転写様式が σ^{70} 依存的であることを見出した。すなわち、PAO1 での pCAR1 上の分解系遺伝子群の発現制御は σ^{54} と σ^{70} の 2 種の σ 因子によって制御され、KT2440 での場合と異なることが示された。

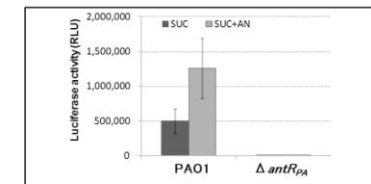


Fig. 4. PAO1 における *P_{ant}* プロモーター活性化能の検討

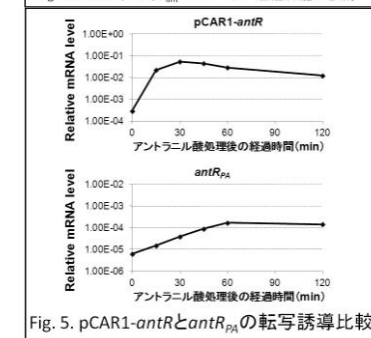


Fig. 5. pCAR1-*antR* と *antR_{PA}* の転写誘導比較

さらに、pCAR1 を保持する PAO1 を用いて 2 種類の *antR* についてアントラニル酸処理時の経時的な転写誘導プロファイルを定量 RT-PCR にて比較した。その結果、pCAR1-*antR* の転写は *antR_{PA}* と比較して早期に誘導が起きており、両者の応答性に違いが存在することが分かった (Fig. 5)。こういった因子の存在は、各宿主において pCAR1 保持による分解能力の付与が必ずしも一様でなく、その発現条件や時期が各宿主特異的であることを示唆するものである。

CbrB オルソログをもつ各種細菌における *antR* 転写活性化能の可能性の検討

本研究により、*antR* の転写活性化には宿主染色体上に *cbrB* 遺伝子がコードされていることが必要であることが明らかになったが、KT2440 由来 CbrB のアミノ酸配列をもとに blast サーチによるオルソログの分布を調べると、ゲノム既知の *Pseudomonas* 属細菌に加えて、窒素固定細菌 *Azotobacter vinelandii* DJ や好塩細菌 *Halomonas elongata* DSM2581 等においても相同性がそれぞれ 78%, 61% の相同性を持ち合わせるものが存在していた。そこで、CbrB オルソログをもつ細菌において *antR* の転写活性化ポテンシャルを検証するため、各株にレポータープラスミドあるいは染色体組み込み型レポーターを持たせた株でのルシフェラーゼ活性の比較解析を現在行っている。またオルソログを持たない細菌についても代替的なネットワークが存在するかを確認するため、併せて解析を行っている。pCAR1 上の分解系遺伝子群のように、特定の染色体因子の存在を前提とする発現系は、その分解能を獲得できる宿主を限定することに他ならず、pCAR1 が宿主依存的な制御系をもつことによる生物学的意義及び進化的な理由に興味を持たれる。

総括と展望

本研究では、主に *P. putida* KT2440 を用いた解析を通して *Pseudomonas* 属の宿主共通で CbrB が pCAR1 上 *antR* の σ^{54} 依存的な転写活性化に関与することを発見した。また、CbrB による *antR* 制御は転写と翻訳の 2 段階で行われる可能性があることを明らかにした。そして、炭素源の変化というシグナルが CbrA-CbrB 二成分制御系を介して、最終的に AntR による分解系遺伝子群の発現誘導に至るといふ基本的な発現制御モデルを構築するに至った (Fig. 6)。また *P. aeruginosa* PAO1 における染色体上の *antR* オルソログのように、宿主が変わることで各宿主固有の因子がプラスミド上の発現制御ネットワークに影響を与える可能性があることを見出した。さらに解読されたゲノム情報から、*Pseudomonas* 属以外の細菌においても *antR* 転写制御に必要なコンポーネントが揃っていることが判明した。今後、宿主・非宿主を含めて多様な細菌内で *antR* の発現制御がどのように機能変化するのかについて評価する必要がある。また、本研究の結果は、プラスミド上の遺伝子の発現を宿主に委ねることが、宿主あるいはプラスミドにとってどのような意義があるのかを理解する一助となるのではないかと考えている。さらに、応用的利用を見据えた分解プラスミドという観点からの研究についても、同じプラスミドでもそれを保持する宿主が異なることで制御ネットワークが機能変化することについてのより包括的な知見が得られることで、今後の実環境中の汚染浄化を目指す上でのプラットフォーム構築につながると期待される。

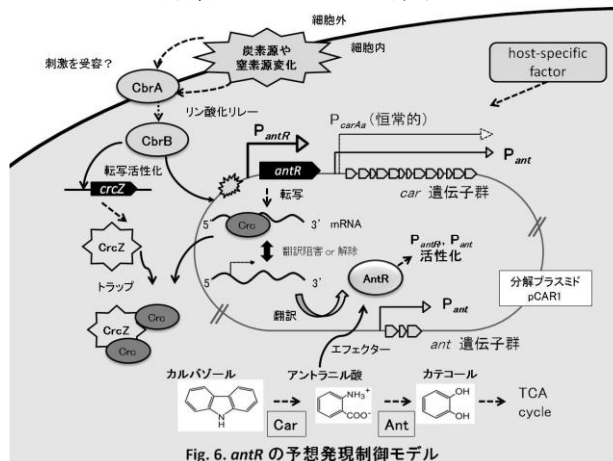


Fig. 6. *antR* の予想発現制御モデル