

[別紙 2]

論文審査の結果の要旨

申請者氏名 岩田 修

IncP-7 群プラスミド pCAR1 は主に *Pseudomonas* 属を宿主とし、宿主にカルバゾール分解能を付与する分解プラスミドである。カルバゾールは原油中に含まれる含窒素芳香族化合物で、pCAR1 上にコードされる分解系遺伝子群 (*car*, *ant* 遺伝子群) の発現により、アントラニル酸、カテコールを経て分解される。これまでに、*Pseudomonas putida* KT2440 を宿主とした解析から、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。また、直近の解析から、*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示された。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予想されていた。これらの事実は *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と質に応じてカルバゾール分解系遺伝子群の転写制御が変化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。そこで本博士論文研究では、*antR* の転写制御を担う宿主因子の同定を行うとともに、宿主が変化した際に *antR* を中心とした分解系遺伝子群の転写制御様式がどのように変化するかを評価することを目的としている。

本論文は 3 章から構成されている。序論である第 1 章では、原核生物における遺伝子の転写制御機構について述べられている。特に σ^{54} 依存的な転写制御機構について理解を深めるために σ^{70} 依存的機構と比較しながら記述されている。また本研究中でも登場する small RNA や二成分制御系についても具体例を挙げながら既報の情報の詳細を示し、第 2 章を深く理解する一助となるよう構成されている。

本論となる第 2 章は、大きく前半と後半に分けることができる。

前半では、複数のモデル宿主を用いて、*antR* の発現制御機構の基本モデルを明らかにした。特に、*antR* の転写を活性化する宿主因子の決定に当たっては、*P. aeruginosa* PAO1 における 22 種類の σ^{54} -dependent activator 破壊株を利用したレポーター解析を行い、*cbrB* (PA4726) 破壊株におけるルシフェラーゼ活性が野生型株と比較して最も顕著に低下することを示した。また、*P. putida* KT2440 における *cbrB* 破壊株においても PAO1 と同様の結果が得られ、ゲノム既知の *Pseudomonas* が持つ CbrB 相同遺伝子間の保存性の高さから、

多くの宿主で共通に CbrB が *antR* の転写制御に関与する可能性が高いことを明らかにした。続く、promoter deletion assay からは、*antR* プロモーターにおける転写活性化に重要な領域が転写開始点上流 245 bp 付近に存在し、当該領域に CbrB の結合コンセンサス配列に似た配列を見出すことができた。その一方で、炭素源の代謝に関与する遺伝子の中には、Crc と呼ばれる RNA 結合タンパク質がその mRNA 中の CA motif に結合し、翻訳が阻害されるものがある。*antR* の上流領域にも CA motif に近似した配列が存在し、その機能について変異を導入したレポータープラスミドを用いて検証したところ、Crc 結合領域として機能することが示唆された。近年 Crc を介した翻訳阻害の解除に CbrB が関与するという別グループの研究報告も合わせて考えることで、CbrB は *antR* に対して直接転写を活性化するだけでなく、間接的に翻訳段階の制御にも関与していることが示唆され、CbrB による 2 段階の *antR* 発現制御モデルの構築に至っている。

第 2 章後半では、分解系遺伝子群の発現に重要な AntR と CbrB のホモログをもつ細菌に着目し、宿主が変わることによる発現制御ネットワークの機能変化を評価した。その結果、PAO1 の染色体上に存在する *antR* ホモログは pCAR1 上の P_{ant} や P_{antR} プロモーターを活性化する機能を持つことが明らかになり、pCAR1 上の分解系遺伝子群の発現は宿主染色体上の *antR* 遺伝子産物によって影響される可能性を示した。実際に、アントラニル酸誘導条件下での定量 RT-PCR 解析からは、PAO1 における *antA* 遺伝子の転写誘導が KT2440 などと比較して緩やかに起きるという興味深い現象を見出している。

また、CbrB については、*Pseudomonas* 属以外にも *Halomonas* 属細菌が約 60% の identity のホモログを持つ一方で、pCAR1 の宿主である *Delftia* 属細菌ゲノムからはその存在が見出されなかった。そこで、それら各細菌を対象として *antR* の発現制御系がどのように機能変化するのかレポーター解析にて比較した。その結果、*Delftia* 属細菌においては予想通り顕著な転写活性が見られず、CbrB に代わる発現制御機構が存在しないことが示されると共に、先に示した発現制御モデルが妥当であることも明らかになった。また、*Halomonas* 属細菌においても顕著な活性が見られず、80% 以上の identity をもつ *Pseudomonas* 属間の CbrB のように高度な保存性が要求されることも示された。これらの結果から、CbrB ホモログを持つ株においても一様に *antR* が発現するのではなく、細菌によっては機能しないことが示された。

以上、本研究は宿主依存的というユニークな性質をもつ *antR* の発現制御系の全容を明らかにするとともに、分解遺伝子を載せるプラスミドが接合伝達を介して異なる宿主に移動することで、その制御様式が機能変化することを見出したもので、既存の多くのプラスミド研究のように 1 つの宿主を用いただけでは得られなかったプラスミドの振舞いについての新規な知見を提供したものである。このような情報は、宿主特異的なプラスミドの振舞いの実態の解明に向けての新たな観点から議論に重要な基盤情報をもたらすものと期待され、産業上、応用上重要なものである。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あるものと認めた。