

論文の内容の要旨

応用生命工学専攻
平成 30 年度博士課程進学
氏 名 河野 響
指導教員 野尻 秀昭

論文題目 環境細菌に見出されたプラスミド非感受性の分子基盤

第 1 章 序論

細菌が環境汚染物質分解能などの様々な新規形質を獲得する場合を考えると、遺伝子の水平伝播（異なる個体間での移動）の寄与は非常に大きい。特にプラスミドの接合伝達は、一度に多くの遺伝子を搭載した長鎖 DNA を宿主（プラスミドを受け取った細菌）に導入するため、宿主の形質を大きく変えうる可能性が高く、特に重要である。

一方で、プラスミドの導入・その後の保持は宿主に生育負荷を及ぼすことが知られている。その結果として、細胞内でのプラスミドの保持されやすさ（stability）や細菌集団中でのプラスミド保持株の生き残りやすさ（fitness）が低下したという報告例は非常に多い。また、生育負荷を軽減するための変異が染色体やプラスミド上に生じる場合もあり [1]、生育負荷はゲノム進化の駆動力にもなり得る。このように生育負荷が及ぼす影響の知見は蓄積されてきてはいるが、その発生原因・機構については未解明な部分が非常に多い。

本研究ではプラスミド保持株の fitness に着目する過程で、環境細菌である *Pseudomonas resinovorans* CA10 株からプラスミド pCAR1 を脱落させた CA10dm4 株において、「プラスミド非感受性」という世界的にも報告のない新規性質を見出した。そこで、この性質の分子機構の解明、さらにはプラスミド保持への細胞応答に関する新たな知見の取得を目指した。

第 2 章 新規性質「プラスミド非感受性」の発見とその特性評価

CA10dm4 株に pCAR1 をはじめとした 10 種のプラスミド（pCAR1 以外は他の細菌から単離された経緯を持ち、その特徴やサイズが様々なもの）をそれぞれ保持させた際の fitness を評価した。その評価には、プラスミド保持株・非保持株を等量混合し、コハク酸を唯一の炭素源とする非選択的な培地で継代培養する過程で経時的に保持株の比率を測定する competition assay を用いた。その結果、対照として用いた *P. putida* KT2440 株で pCAR1 保持に伴う fitness の低下が確認された一方、CA10dm4 株ではいずれのプラスミドを保持した場合も fitness の低下が認められなかった（図 1）。なお、単独培養時に各プラスミド保持に伴う大幅な生育遅延が生じないこと、培養過程でのプラスミドの接合伝達頻度は無視できる程度であることを確認済である。以上より、CA10dm4 株は種々のプラスミドの保持を感じ

ていないように振る舞う「プラスミド非感受性」の宿主と結論付けた。

P. resinovorans 種の基準株である LMG 2274 株においても様々なプラスミド保持に伴う fitness の低下が認められず、この形質が *P. resinovorans* 種で保存される可能性も示唆された。

多くの場合、プラスミドの保持は fitness の低下を招き、かつその度合いは同一宿主であってもプラスミドの種類によって異なる。その一方でプラスミド非感受性の CA10dm4 株は、複数種の異なるプラスミドに共通して生育負荷を感じずに fitness の低下を回避することができ、その性質は通説とは一線を画すものである。以降ではこの新規性質の分子機構の解明を目指した。なお、以前の研究で生育負荷との関連が報告されていたプラスミドのコピー数やプラスミド獲得に伴うトランスクリプトームの変化を精査したものの、分子機構の解明の手掛かりは得られなかった。

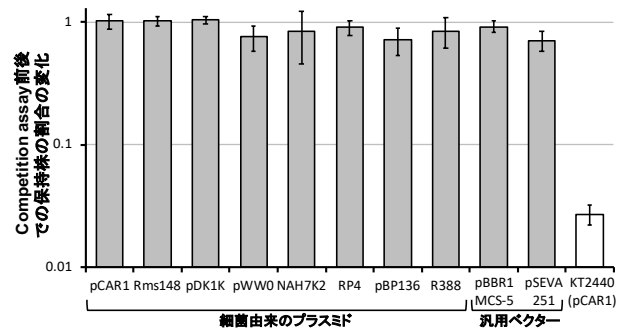


図 1. 様々なプラスミド保持時の CA10dm4 株の fitness 縦軸は「培養終了時の保持株の比率+培養開始時の保持株の比率」を示す。その値が 1 より小さいことは、保持株が培養過程で淘汰された (fitness が低い) ことを意味する。

第 3 章 プラスミド感受的な変異株の取得とその原因解析

CA10dm4(pCAR1)株ゲノム上のランダムな位置にトランスポゾン (Tn) が挿入された変異株ライブラリーを作製し、原因因子が失われたことでプラスミド非感受性を発揮できずに fitness が低下した「pCAR1 感受的な」変異株の取得を試みた。Competition assay をベースとしたスクリーニング系を構築し、3,200 変異株から二株の目的の変異株 (#2, #4 株) を取得した。なお、Tn の挿入が単独培養時の生育速度やプラスミドの stability に影響しないことは確認済である。#2 株では染色体上のプロフェージ領域上の機能未知遺伝子の内部に、#4 株では染色体上のセンサータンパク質をコードする遺伝子の内部に Tn が挿入されていた。なお、両変異株が pCAR1 以外のプラスミド (RP4, NAH7K2) を保持した場合にも fitness が低下することを実証した上で、これらを「プラスミド感受的な」変異株と結論付けた。

次に、変異株がプラスミド感受性を示した原因を転写レベルから探索するために、野生型株と両変異株を RNA-Seq 解析に供した。その結果、野生型株と比較して両変異株で共通して転写抑制された遺伝子が 62 個と多く検出された (図 2)。なお 62 個の中には、硫黄代謝に関与する遺伝子群 (*cys*, *tau*, *ssu* 等の operon) や三つの転写制御因子 PCA10_30000, 40590, 40680 が含まれていた。なお、これら三つは互いに高い相同性 (塩基配列レベルで 78%以上、アミノ酸配列レベルで 65%以上) を示す。この結果は、異なる遺伝子が破壊された両変異株が類似の機構によりプラスミド感受性を示したことを示唆する。この類似の機構を解明することで、プラスミド非感受性に重要なシグナル経路を同定できる可能性が高いと考え、第 4 章では共通して転写抑制された 62 遺伝子に着目した。

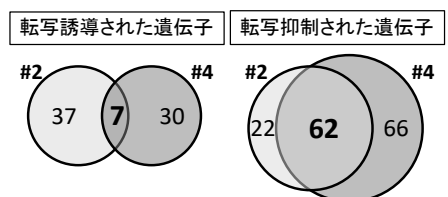


図 2. 二株の変異株で転写変動した遺伝子の包含関係

第4章 プラスミド非感受性の発揮に必要な転写制御ネットワークの解明

Pseudomonas 属細菌を含むグラム陰性細菌では、主要転写制御因子 CysB が硫黄代謝系の転写制御を担う。つまり硫黄代謝の遺伝子群が転写抑制されたプラスミド感受的な両変異株では、CysB の転写制御様式が変化した可能性が考えられた。そこで CysB の機能解析の一環として、下流の遺伝子群 (CysB レギュロン) の同定を行った。なお、硫黄飢餓条件下で CysB の転写活性化能は劇的に上昇し、CysB レギュロンの強力な転写誘導がなされる特徴を踏まえ、野生型株において硫黄飢餓条件下で転写誘導され、かつ *cysB* 破壊株で転写抑制される遺伝子を RNA-Seq 解析により探索した。実際に染色体上の 88 遺伝子を CysB レギュロンとして同定した。興味深いことに、感受的に変化した両変異株で共通して転写抑制された 62 個の遺伝子のうち 58 個は CysB レギュロンに属していた (図 3)。先述の硫黄代謝系のオペロンや三つの転写制御因子 (PCA10_30000, 40590, 40680) も 58 遺伝子の中に含まれていた。また残りの CysB レギュロン (30 遺伝子) の大部分も両変異株で転写抑制される傾向にあった。*cysB* の転写量は野生型株と両変異株で同程度であることを踏まえた上で、両変異株では CysB の転写活性化能の低下が生じたと結論付けた。

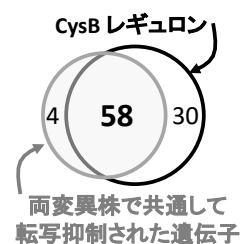


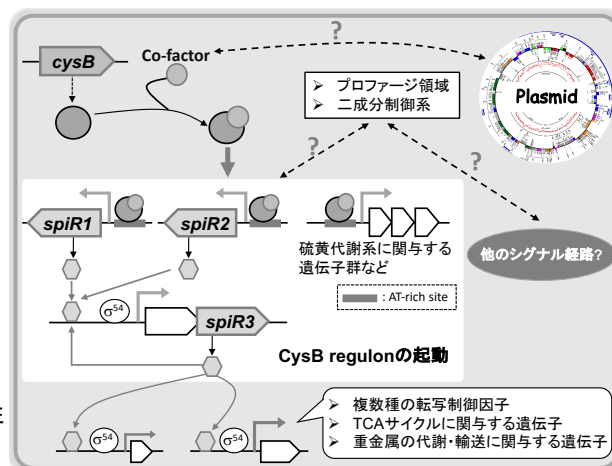
図 3. CysB レギュロンの特徴

次に、CysB 制御下にある三つの転写制御因子のプラスミド非感受性への関与を検証するために、各遺伝子の破壊株 (単独・二重・三重) を作製しプラスミド保持時の fitness を評価した。その結果、PCA10_40680 を破壊した場合にのみ pCAR1 を含む様々なプラスミドの保持に伴う fitness の低下が確認された。従ってこの因子がプラスミド非感受性発揮に重要な役割を担うと結論付け、その上流/下流の機構解明に取り組んだ。

過去に当グループで、CA10dm4(pCAR1)株を用いた TSS-Seq 解析により pCAR1 上の転写開始点 (TSS) の網羅的決定が行われた。その際に取得済の染色体上のマッピングデータを解析し、PCA10_30000, 40590 それぞれの TSS とその上流のプロモーター (-10/-35 box) を決定した。さらに-35 box 付近に大腸菌で提唱された CysB の結合領域 (30~40 bp の AT-rich な配列) が見出されたため、これら二因子は CysB の直接の制御下にあることが示唆された。一方で PCA10_40680 の上流には CysB の結合領域は見出されず、間接的な制御が示唆された。三つの転写制御因子のホモログ (*P. aeruginosa* PAO1 株の *sfnR1*, *sfnR2*) に関する報告を踏まえると、PCA10_40680 の転写は PCA10_30000, 40590 に制御されると共に、PCA10_40680 自身にも制御される可能性が示唆された。そこで、レポーター解析により同定した PCA10_40680 のプロモーター領域と各精製タンパク質の結合能をゲルシフトアッセイにより評価した。その結果、いずれのタンパク質にも結合能が確認され、CysB 直接の制御下に PCA10_30000, 40590 が、さらにそれらの下流に PCA10_40680 が存在し、かつ PCA10_40680 は自身の制御も担うという階層構造が明らかになった。なお、PCA10_30000, 40590, 40680 は他の *Pseudomonas* 属細菌で硫黄代謝に関与する転写制御因子 SfnR と非常に相溶性が高いため、それぞれを *spiR1*, 2, 3 (*SfnR*-like regulator related to plasmid-insensitivity) と名付けた。

spiR3 破壊株を用いた RNA-Seq 解析により、その下流に複数の転写制御因子、TCA サイクルや重金属の排出・代謝に関与する遺伝子群を同定した。以上の結果を総合すると、CA10dm4 株でのプラスミド非感受性の発現には、図 4 に示す CysB を中心とした転写制御ネットワークが重要であることを明らかにした。

図 4. 解明したプラスミド非感受性に重要な転写制御ネットワーク



第 5 章 培養過程での競合相手の存在が宿主のトランスクリプトームに及ぼす影響の評価

単独培養時のプラスミド保持株のトランスクリプトーム解析から、fitness に関する重要な知見の取得に成功した。しかし fitness は競合培養系で決定付けられるものであり、各株のトランスクリプトームが単独培養・競合培養の双方の系で類似であるかに興味を持たれた。そこで、GFP 蛍光を発するプラスミド保持株（野生型株、変異株#2, #4 の三種を利用）と非保持株の競合培養系から、一細胞レベル解析用の cell sorter を用いて蛍光強度を指標に保持株のみを分取したのち、total RNA 抽出・RNA-Seq 解析を行う系を新たに構築した。なお対照として、各株の単独培養を同様に cell sorter を通して RNA-Seq 解析に供した。

今までの施行により野生型株と#2 株に関して解析可能なデータを取得出来たが、#4 株に関しては十分なリード数が得られなかった。十分なリード数が得られたデータのみを用いて解析を行ったところ、プラスミド保持株のトランスクリプトームは培養系の違い（競合相手である非保持株の存在）に大きく影響を受けない可能性が示唆された。

総括と展望

本研究では、「プラスミド非感受性」という新規性質の発見からその機構解析までを一貫して取り組んだ。プラスミド非感受性を示す宿主の新たな発見は、実環境中でのプラスミド保持株やプラスミド自身の真の挙動を理解する上で非常に重要な生態学的知見である。また、プラスミド非感受性発現の一翼を担う硫黄代謝系の調節を介した転写制御機構の同定に成功した。これは硫黄代謝系の細胞生理に関わる新たな機能的側面の発見でもあり、今後は代謝レベルでの解析などを通じて、その機能や意義がより明確になることが期待される。

物質生産などに利用される宿主ベクター系は、「プラスミドの保持が生育負荷をもたらす」という前提の下で設計・使用されてきた。プラスミド非感受性の発見はその前提を覆し得るものであり、その性質自身および分子基盤は新たなプラスミド非感受的な（プラスミド使用時に抗生物質などの選択圧が不要な）宿主開発にも応用可能であると考えている。

[1] Kawano *et al.*, (2020) A Novel Small RNA on the *Pseudomonas putida* KT2440 Chromosome Is Involved in the Fitness Cost Imposed by IncP-1 Plasmid RP4. *Front. Microbiol.*, **11**:1328.