

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

岩田 修

目次

目次

略語表

論文の内容の要旨

i

## 第1章 序論

### 1-1. 原核生物における基本的な転写制御機構について

1-1-1. $\sigma$ 因子によるプロモーター認識を利用した転写制御機構	1
1-1-2. $\sigma^{70}$ ファミリーによる転写制御機構	3
1-1-3. $\sigma^{54}$ による転写制御機構	3
1-1-4. $\sigma^{54}$ -dependent activatorによる $\sigma^{54}$ 依存的プロモーターの転写活性化	6
1-1-5. $\sigma$ 因子研究における今後の課題	7

### 1-2. small RNAを介した翻訳制御機構について

1-2-1. small RNA研究の経緯とその機能	9
1-2-2. RNA結合タンパク質をトラップする機能をもつsmall RNA	9
1-2-3. 目的のmRNAに相補的に結合するsmall RNA	10
1-2-4. small RNA 研究における今後の課題	11

### 1-3. 原核生物に特徴的なシグナル伝達機構・二成分制御系

1-3-1. 二成分制御系の概要	13
1-3-2. 環境刺激を受容するsensor kinase	13
1-3-3. シグナルを遺伝子発現の変化へとつなげるresponse regulator	14
1-3-4. 詳細な研究が行われた二成分制御系について	16
1-3-5. 二成分制御系研究における今後の課題	16

### 1-4. 分解プラスミドに関する研究

1-4-1. 染色体外遺伝因子としてのプラスミド	18
1-4-2. 分解プラスミド研究の歴史	18
1-4-3. 分解系遺伝子群の発現制御に関する研究の概要	18
1-4-4. 分解プラスミド研究における今後の課題	19

### 1-5. カルバゾール分解プラスミドに関する研究

1-5-1. pCAR1 の発見と当研究室における解析の経緯	20
1-5-2. カルバゾール分解系遺伝子群の転写制御解析	20
1-5-3. 異なる宿主間における比較解析	21
1-5-4. pCAR1 の宿主域に関する研究	23

### 1-6. 本研究の目的

23

第2章 プラスミド由来カルバゾール分解系制御遺伝子 <i>antR</i> の発現制御機構とその宿主依存性	
2-1. 緒言	24
2-2. 材料と方法	24
2-3. 結果と考察	38
2-3-1. モデル宿主 <i>P. putida</i> KT2440 を中心とする解析	
2-3-1-1. スクリーニングに最適なレポータープラスミドの作製及び検討	38
2-3-1-2. オートレギュレーションによる転写活性化の検討	38
2-3-1-3. PAO1破壊株ライブラリーを用いた <i>antR</i> の転写活性化に必要な宿主因子の同定	43
2-3-1-4. KT2440における <i>cbrB</i> 破壊株を用いた <i>antR</i> の転写活性化能の検討	47
2-3-1-5. $P_{antR}$ プロモーターの炭素飢餓および窒素飢餓条件による誘導の検討	50
2-3-1-6. <i>antR</i> の転写活性化に必要なシス配列の同定	50
2-3-1-7. CbrBの発現精製構築とゲルシフトアッセイによる解析	53
2-3-1-8. CbrBの活性制御機構についての考察	54
2-3-1-9. small RNA <i>CrcZ</i> による <i>antR</i> の翻訳制御の検討	54
2-3-1-10. <i>antR</i> の予想発現制御モデルの構築	61
2-3-1-11. CbrBおよびAntRによる $P_{antR}$ プロモーター活性化機構の推察	63
2-3-2. 異なる宿主 ( <i>P. aeruginosa</i> PAO1) における発現制御ネットワーク変化の解析	
2-3-2-1. <i>P. aeruginosa</i> PAO1における pCAR1上 <i>antR</i> の転写制御	67
2-3-2-2. RACE解析による <i>antR</i> <sub>PA</sub> の転写開始点の決定	69
2-3-2-3. $P_{antRPA}$ プロモーターの5' deletion解析およびmutation解析	69
2-3-2-4. <i>antR</i> および <i>antR</i> <sub>PA</sub> のアントラニル酸に対する転写誘導プロファイル比較	72
2-3-2-5. 異なる宿主を用いた分解関連遺伝子の転写誘導プロファイル比較	72
2-3-2-6. アントラニル酸による <i>cbrB</i> の転写誘導あるいはリン酸化への影響の検討	73
2-3-2-7. モデル宿主3種における分解力の違いについての総合的な考察	78
2-3-2-8. pCAR1の分解系遺伝子群の発現に機能するAntRオルソログの考察	79
2-3-3. <i>Pseudomonas</i> 属以外における <i>antR</i> の転写活性化ポテンシャルの検証	
2-3-3-1. <i>antR</i> の転写活性化に重要な各コンポーネントの保存性	83
2-3-3-2. pCAR1の宿主およびその候補における <i>antR</i> の転写制御について	87
2-3-3-3. <i>antR</i> の転写活性化ポテンシャル測定結果からの考察	87
第3章 総括と展望	90
参考文献	93
謝辞	

## 略語表

AN	Anthranilate
Ap	Ampicillin
bEBP	Bacterial enhancer binding protein
bp	Base pares
CAR	Carbazole
CbrA	Carbon regulation A
CbrB	Carbon regulation B
Cm	Chloramphenicol
COG	Clusters of Orthologous Groups of protein
DIG	Digoxigenin
DMF	Dimethyl formamide
DMSO	Dimethyl sulfoxide
Gm	Gentamicin
HTH	Helix-turn-helix
Km	Kanamycin
NAPs	Nucleoid associated proteins
ORF	Open reading frame
PCR	Polymerase chain reaction
RNAP	RNA polymerase
rpm	Round per minute
RR	Response regulator
SDS	Sodium dodecylsulfate
SK	Sensor kinase
SUC	Succinate
Tc	Tetracycline
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethane
UAS	Upstream activation sequences
X-gal	5-bromo4-chloro-3-indolyl- $\beta$ -D-galactoside

## 論文の内容の要旨

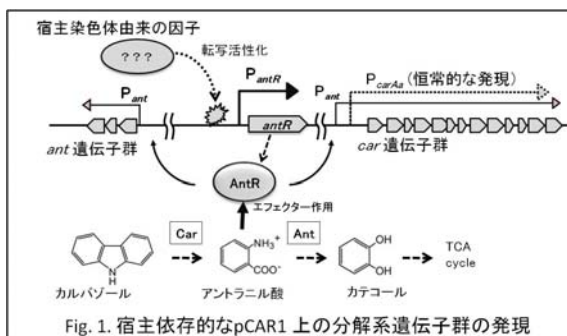
応用生命工学 専攻  
平成 21 年度博士課程 入学  
氏 名 岩田 修  
指導教員名 野尻 秀昭

### 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

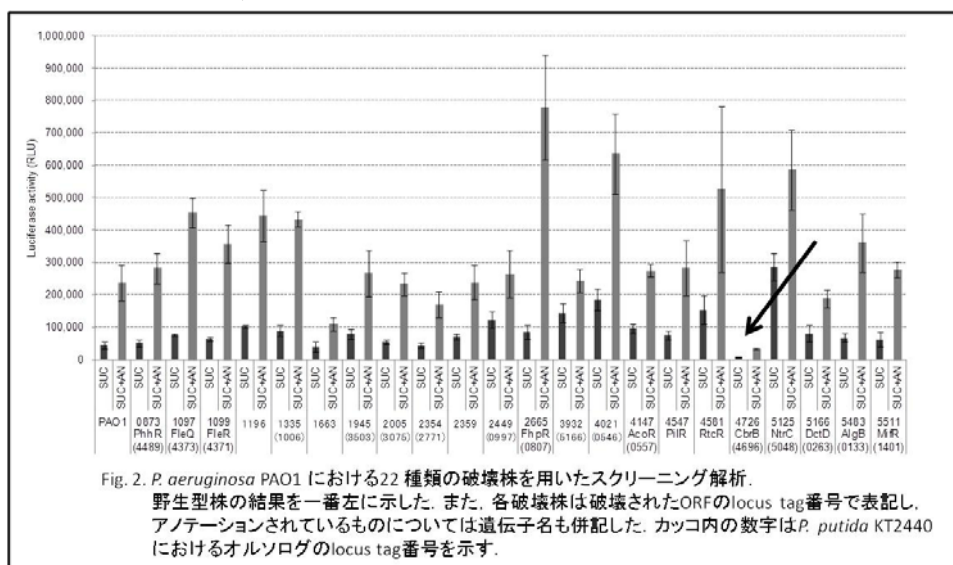
分解プラスミド pCAR1 は主に *Pseudomonas* 属を宿主とし、カルバゾール分解能を付与する。カルバゾールは石油中に含まれる含窒素芳香族化合物であり、pCAR1 上にコードされている分解系遺伝子群 (*car*, *ant* 遺伝子群) の発現により、アントラニル酸、カテコールを経由して分解される。これまでにモデル宿主 *Pseudomonas putida* KT2440 を用いた解析によって、AraC/XylS family に属する転写因子 AntR がそれら分解系遺伝子群の転写を制御するマスターレギュレーターであることが明らかにされている (Fig. 1)。また、分解系遺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  $\sigma^{54}$  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  $\sigma^{54}$ -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  $\sigma^{54}$ -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  $\sigma^{54}$ -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  $\sigma^{54}$ -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。

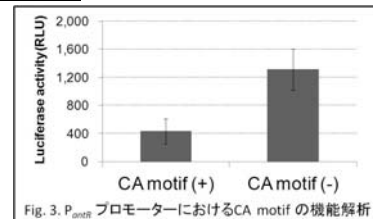


Fig. 3. *P. antR* プロモーターにおける CA motif の機能解析

### 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<sub>PA</sub>*) 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<sub>PA</sub>* は pCAR1 上の *P<sub>ant</sub>* 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<sub>PA</sub>* 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<sub>PA</sub>* の転写様式が  $\sigma^{70}$  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  $\sigma^{54}$  と  $\sigma^{70}$  の 2 種の  $\sigma$  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。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<sub>PA</sub>* 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。

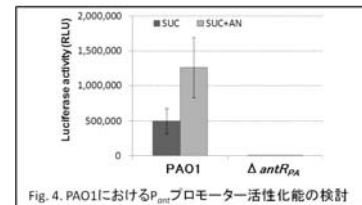


Fig. 4. PAO1における *P<sub>ant</sub>* プロモーター活性化能の検討

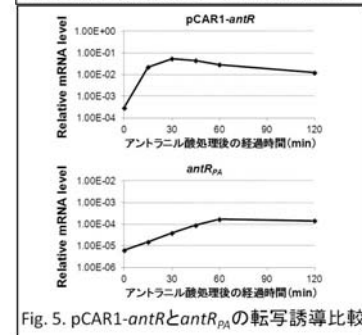


Fig. 5. pCAR1-*antR* と *antR<sub>PA</sub>* の転写誘導比較

### 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  $\sigma^{54}$  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。

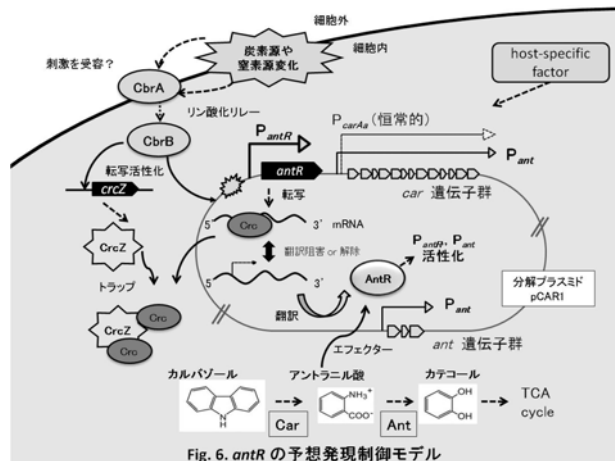


Fig. 6. *antR* の予想発現制御モデル



# 第 1 章

## 序論

### 1-1. 原核生物における基本的な転写制御機構について

#### 1-1-1. $\sigma$ 因子によるプロモーター認識を利用した転写制御機構

生命科学におけるセントラルドグマが提唱され、すでに 50 年以上が経過するに至った。その間、真核生物および原核生物を問わず、DNA にコードされた情報がどのような過程を経てタンパク質として発現し、機能するのかということが研究されてきている。特に制限酵素を利用した DNA 操作が可能になってから、著しい進展をみせている。そして、今日までに真核生物と原核生物を含め、各種生物が遺伝子の複製・転写や翻訳の過程において多様な仕組みを持ち合わせていることが解明されており、膨大な知見が集積しつつある。

そういった中で、原核生物における遺伝子発現システムについても詳細な解析が行われてきており、真核生物と比較して多くの違いが存在することがすでに明らかになっている。特に原核生物における転写の仕組みについて焦点をあてると、真核生物と同様にその開始に RNA polymerase (RNAP) を必要とするが、転写開始部位の認識に  $\sigma$  因子が必要となるのが特徴的である。また、細菌における RNAP は DNA を鋳型として mRNA を合成することはできるが、転写開始部位を認識することができないため単独で転写を開始することができない。そのため、 $\sigma$  因子と呼ばれる RNAP のコア部分と相互作用するファクターが転写開始に必要となる。そして、これまでに複数種類の  $\sigma$  因子の存在が明らかになり、それぞれが特異的なプロモーター配列を認識することが報告されている (Helmann & Chamberlin, 1988)。これにより、RNAP は共通で  $\sigma$  因子が別の種類に変わることによって多数の遺伝子群の on/off を制御し、効率的な遺伝子の発現調節が可能となっている。全ての遺伝子についてプロモーター解析が行われたわけではないが、これまでの知見から、原核生物における転写様式は大きく  $\sigma^{70}$  ファミリー依存的な制御機構あるいは  $\sigma^{54}$  依存的な制御機構に分けることができる。各遺伝子のプロモーター構造は原則それに対応したものとなっているといえる (Fig. 1-1)。本博士論文の研究は *Pseudomonas* 属細菌中の遺伝子を研究対象としており、その転写制御機構の解明を研究目的の 1 つとしていることから、必然的に  $\sigma$  因子と密接した関連性があることになる。そこで、以下  $\sigma$  因子に関するこれまでの知見について特に本研究と関連深い  $\sigma^{54}$  を中心に記す。

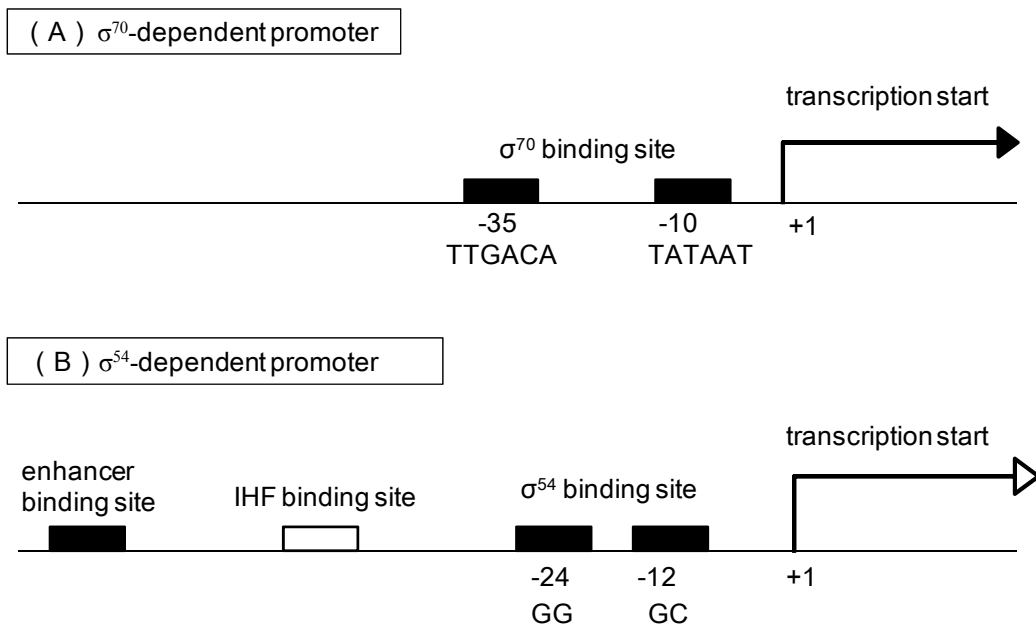


Fig. 1-1. 原核生物における 2 種類の転写制御機構に対応するプロモーター構造

(A)  $\sigma^{70}$  依存的な転写制御にともなう遺伝子のプロモーター構造(Feklistov & Darst, 2011)  
 転写開始点のそれぞれ約 35 bp および 10 bp 上流に  $\sigma^{70}$  が認識結合する配列が存在する. *E. coli* における結合コンセンサス配列はそれぞれ (-35 TTGACA, -10 TATAAT) となっている(Hawley & McClure, 1983).

(B)  $\sigma^{54}$  依存的な転写制御にともなう遺伝子のプロモーター構造(Shingler, 2011)  
 転写開始点のそれぞれ 12 bp および 24 bp 上流に  $\sigma^{54}$  が認識結合する配列が存在する. 特に (-24 GG, -12 GC) 配列が強く保存されている(Barrios *et al.*, 1999). また, 転写開始点上流にエンハンサータンパク質が結合するサイトが存在し, その多くは 100 ~200 bp 上流に存在するが様々である(Cases *et al.*, 2003). さらに, 分解プラスミドの 1 つである TOL プラスミドにおいては DNA-bending 機能をもつ IHF が結合する配列が存在し, エンハンサータンパク質と  $\sigma^{54}$ -RNAP を物理的に近接させ転写を活性化させることが報告されている(Bertoni *et al.*, 1998).

### 1-1-2. $\sigma^{70}$ ファミリーによる転写制御機構

*Escherichia coli* はその扱いやすさから、原核生物における研究対象として最適であり、これまで多くの解析が行われてきた。そして、その *E. coli* をはじめとする原核生物において、ハウスキーピング遺伝子を含めて大多数の遺伝子の転写に関与しているのが *rpoD* 遺伝子にコードされた  $\sigma$  因子である。*E. coli* における RpoD は分子量 70,263 のタンパク質で、その分子量をもとに  $\sigma^{70}$  と一般的に呼ばれることが多い。 $\sigma$  因子の研究は、各種細菌で広範囲に解析が進んでいるが、 $\sigma^{70}$  の保存性が高いことから *E. coli* における結果をもとに他細菌における  $\sigma^{70}$  の役割を類推することが可能となっている。また、 $\sigma^{70}$  (*rpoD*) の他に、熱ショックなどのストレスに応答する一群の遺伝子に特異的な  $\sigma^{32}$  (*rpoH*) や窒素代謝に関する遺伝子に特異的な  $\sigma^{54}$  (*rpoN*)、定常期における遺伝子の転写を担う  $\sigma^{38}$  (*rpoS*) 等、複数の  $\sigma$  因子の存在が知られている。後述する  $\sigma^{54}$  を除く全ての  $\sigma$  因子は  $\sigma^{70}$  ファミリーに属しており、アミノ酸配列からタンパク質構造の各領域で非常に高い類似性がみられる。

さらに、 $\sigma^{70}$  が特定のプロモーター配列とどのように相互作用するのかについても構造生物学的なアプローチから解析が進んでいる。 $\sigma^{70}$  ファミリーは region 1 から region 4 までの 4 つの region に分けることができ (Fig. 1-2A), region 2 と region 4 の一部, それに region 3 は転写開始点上流 10 bp と 35 bp に存在する結合配列をそれぞれ認識することが分かっている (Murakami & Darst, 2003)。また region 1 はその領域を欠失するとより転写開始に必要な複合体形成が促進されることから autoinhibitory domain として機能すると考えられているが、その一方で複合体形成後の転写開始がほとんど機能しなくなることから、複合体の安定性に重要な region とされている (Borukhov & Severinov, 2002)。

$\sigma^{70}$  が認識するプロモーター配列は特に -35 / -10 element と呼ばれており、*E. coli* における保存性についての解析結果をもとにコンセンサス配列 (それぞれ -35 TTGACA, -10 TATAAT) が提唱されるに至っている (Hawley & McClure, 1983)。本研究を通して用いる *Pseudomonas aeruginosa* や *Pseudomonas putida* についても *E. coli* と類似したコンセンサス配列が存在しており、それぞれ (-35 TTGaCc, -10 TAtAAT), (-35 TTGACC, -10 TATAcT) が存在している (Marques, 2004)。なお、上記のコンセンサス配列においては解析対象とした 40 遺伝子において、保存性が 40% 以上ある塩基を大文字で示し、それ以下のものを小文字で示してある。

### 1-1-3. $\sigma^{54}$ による転写制御機構

一方で、 $\sigma^{70}$  ファミリーと配列類似性のない  $\sigma^{54}$  (*rpoN*) についても古くから研究されてきた。 $\sigma^{54}$  はグラム陰性細菌である *E. coli* や *P. aeruginosa* だけでなく、グラム陽性細菌である *Bacillus subtilis* などのゲノムにおいてもホモログが広く存在している (Barrios *et al.*, 1999)。

既述の  $\sigma^{70}$  依存的な転写制御機構と比較して、①ドメイン構造およびそれに対応したプロモーターにおける認識配列の違い、②転写活性化に  $\sigma^{54}$ -dependent activator (文献中では

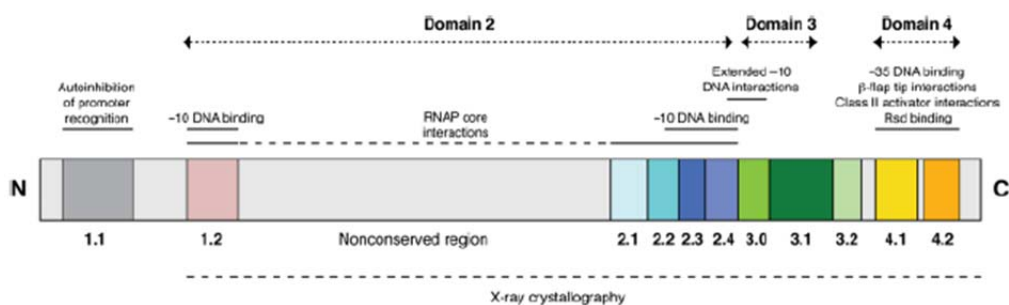
bacterial enhancer binding protein を表す、bEBP と表記されることも多い) と呼ばれるアクチベータータンパク質を必要とすることが特徴であり、 $\sigma^{70}$  による転写制御とは別の機構によって下流の遺伝子が制御されている(Merrick, 1993).

$\sigma^{54}$  の構造的な特徴については region I から region III の 3 つの domain に分けることができる (Fig. 1-2B). region I は  $\sigma^{54}$ -dependent activator との相互作用部位であり, region III は RNAP 及び DNA との結合ドメインであり, region II はリンカーであることが分かっている(Cannon *et al.*, 1997; Hong *et al.*, 2009).

また, 転写開始点上流 12 bp と 24 bp を中心とした  $\sigma^{54}$  結合配列 (-24 TTGGCACG - NNNN - TTGC -12) を認識するのが特徴であり, 特に下線部分の配列は保存性が高いとされている(Abril *et al.*, 1991; Barrios *et al.*, 1999).

$\sigma^{70}$  についてはその大部分の結晶構造情報が利用可能となっており, RNAP との相互作用を含めた転写開始がどのような構造的変化を伴って起きるのかまで詳細に解かれている (Murakami & Darst, 2003). その一方で,  $\sigma^{54}$  については-24 element を認識する RpoN domain の構造学的な情報が得られており(Doucleff *et al.*, 2007), 特異的な配列を認識するモデル構造 (Fig. 1-3) が提唱されているものの, -12 element との相互作用についての情報が乏しく, 今後のさらなる解析に期待したいところである.

A.



B.

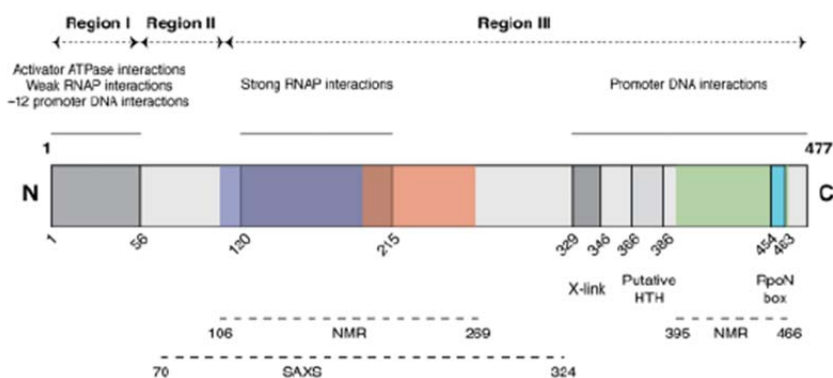


Fig. 1-2. 2種類の $\sigma$ 因子におけるドメイン構造とその機能比較(Ghosh *et al.*, 2010)

(A)  $\sigma^{70}$ におけるドメイン構造の模式図を表す. 4つの region (図中では domain と表記) から構成され, さらにその region も細分化されて機能解析が行われている. 各細分化されて解析された region を色分けして示し, 分かっている機能を併せて示した. また, これまでに構造生物学的解析の結果が報告されている領域をドメイン構造の下に示した.

(B)  $\sigma^{54}$ におけるドメイン構造の模式図を表す. 3つの region から構成されており, 各 region における機能を示した. また, 構造生物学的解析の結果についても (A) と同様にドメイン構造の下に示されている.

C.

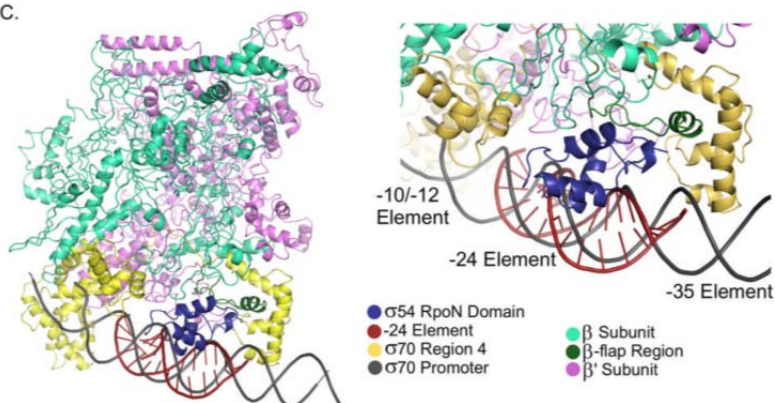


Fig. 1-3.  $\sigma^{70}$ および $\sigma^{54}$ における DNA との複合体形成モデル(Doucleff *et al.*, 2007)

DNA との相互作用に重要な  $\sigma^{70}$ における region 4 (主に-35 element を認識) を黄色で表し,  $\sigma^{54}$ における RpoN domain (-24 element を認識する) を青色で表す. 左図は  $\sigma^{70}$ および  $\sigma^{54}$ を同時に示し, 各  $\sigma$ 因子と DNA との複合体形成モデルを表す. 右図は,  $\sigma^{54}$ と DNA の結合に関連した領域について特に拡大表示した.

#### 1-1-4. $\sigma^{54}$ -dependent activator によるプロモーターの転写活性化

$\sigma^{54}$  依存的な転写制御機構の解析を進める上で考えなければいけないことは、その転写活性化に  $\sigma^{54}$ -dependent activator が必要となることである。これは  $\sigma^{70}$  ファミリーと違って、転写開始を行うにあたって必要な開鎖複合体の形成を自発的に行うことができないことに起因する。そのため、開鎖複合体形成に ATP を分解できる機能 (AAA+ domain) をもつ  $\sigma^{54}$ -dependent activator が必要となる。AAA+ domain はその機能の多様性にちなんだ名前 (ATPase Associated with various cellular Activities) であり、ATP の結合認識および加水分解に必要である。ATP の加水分解によって得られるエネルギーを通して様々な機能を発揮するが、 $\sigma^{54}$ -dependent activator においては DNA 鎖を開くためにエネルギーが利用される。

$\sigma^{54}$ -dependent activator とはどのようなタンパク質をさすのかについての明確な定義は文献中に示されていないが、AAA+ domain を含むタンパク質の中で特に  $\sigma^{54}$  と相互作用する GAFTGA motif を持ち合わせるものが必要十分条件と考えるのが妥当である。代表的なものとしては、*E. coli* における窒素代謝制御に関与する NtrC や炭素源のトランスポーターの制御に関与する DctD が挙げられる (de Lorenzo *et al.*, 1991; Merrick, 1983; Ronson *et al.*, 1987)。

$\sigma^{54}$ -dependent activator は多少の例外はあるものの基本的には 3 つの機能ドメインからなっており、N 末端側からそれぞれ regulatory domain,  $\sigma^{54}$  activation domain (AAA+ domain), DNA binding domain に分かれている (Beck *et al.*, 2007) (Fig. 1-4)。Regulatory domain はシグナルを受け取り、それに応答して自身の活性を制御する domain である。また、ダイマーの形成にあたって regulatory domain が重要である。

$\sigma^{54}$  activation domain は鋳型となる DNA の鎖を開くために必要な domain ではあるが、その中には幾つかの motif が含まれている。例えば、上述の GAFTGA motif は  $\sigma^{54}$  を認識しており、Walker A および Walker B motif はそれぞれ ATP の結合と加水分解に関与している領域である。

また、転写開始点上流の 100~200 bp に結合することが多く、その領域を特にエンハンサー配列あるいは UAS (upstream activation sequences) という。多くの場合、UAS は 2 量体化したタンパク質が結合できるような inverted repeats であることが多い。例えば、これまでに提唱されている *E. coli* の NtrC の結合コンセンサス配列は TGCACC · NNNNNN · GGTGCA となっている (Hervas *et al.*, 2008)。また NtrC や PspF など多くの  $\sigma^{54}$ -dependent activator は活性化されると、通常ダイマー状態からヘキサマーで存在するようになり、その状態で RpoN-binding site における  $\sigma^{54}$ -RNAP に物理的に隣接することで、転写開始に必要な open complex の形成が行われる (Fig. 1-5)。

NtrC をはじめとした多く  $\sigma^{54}$ -dependent activator の研究結果から UAS の存在は、 $\sigma^{54}$  依存的な転写制御について考察する上では前提条件として認識されるようになった。しかし、UAS を必要とせずに転写を制御するアクチベーターの例も *Helicobacter pylori* や

*Chlamydia trachomatis* 等で明らかになっている(Beck *et al.*, 2007). これらのタンパク質はそもそも C 末端領域において DNA binding motif である HTH (helix-turn-helix) motif が存在しないことから, エンハンサー領域に結合することなく直接 open complex の形成に関与すると考えられている.

#### 1-1-5. $\sigma$ 因子研究における今後の課題

ここまで原核生物における転写制御機構について,  $\sigma$  因子に焦点をあてて紹介したが, その基本的な機能と作用機序については既に明らかにされているといえる. ただ,  $\sigma^{54}$  依存的な転写制御に必要とされる  $\sigma^{54}$ -dependent activator については, 代表的なものについては解析されている一方で未解析のものが少なくない. それは細菌によってゲノム中にコードされている数および種類が違うことが一因と考えられる. 例えば, 本研究の対象である *P. putida* KT2440 におけるゲノム配列情報をもとに予測すると, 全部で 22 種類の  $\sigma^{54}$ -dependent activator が存在することが分かっている(Cases *et al.*, 2003). その一方で *E. coli* K-12 においては 12 種類が予測されており(Studholme & Dixon, 2003), *Pseudomonas* 属は相対的に多くの  $\sigma^{54}$ -dependent activator を持っていることが分かる. また, 同じ *E. coli* においても O157:H7 においてはアセト酢酸代謝を制御する AtoC が保存されていない等, 株間の違いも存在する. 一方で, *Helicobacter pylori* においては鞭毛運動を制御に関与する FlgR が唯一の  $\sigma^{54}$ -dependent activator とされている(Spohn & Scarlato, 1999). 今後はこういった各細菌固有の因子について解析が進むことで, それぞれの細菌がもつ巧みな環境適応戦略などについて新たな知見が得られる可能性がある.

また, NtrC のように詳細な研究がなされている因子であっても, global regulator であるがゆえにレギュロンの正確な同定が難しく, 一通り網羅的に行われた解析データについて個々の遺伝子レベルでどこまで対応しているか, 場合によっては再検証が求められる可能性もある. さらに, HTH motif を持ちながら UAS への結合を介さないでプロモーター活性を制御する新規な制御機構の可能性が報告されるなど(Porra *et al.*, 2009), これまで以上により正確な実体把握が求められている. UAS への結合を介さない場合, どういった機構で特異的に下流遺伝子の転写を活性化させるのかは興味深い点であるが, 未解明のままである. こういったエンハンサー領域を必要としない転写活性化様式は, ゲノムサイズの縮小につながると考えられているが, どのような生物学的意義があるかははっきりとしていないのが現状であり, 今後の詳細な解析に期待したい.

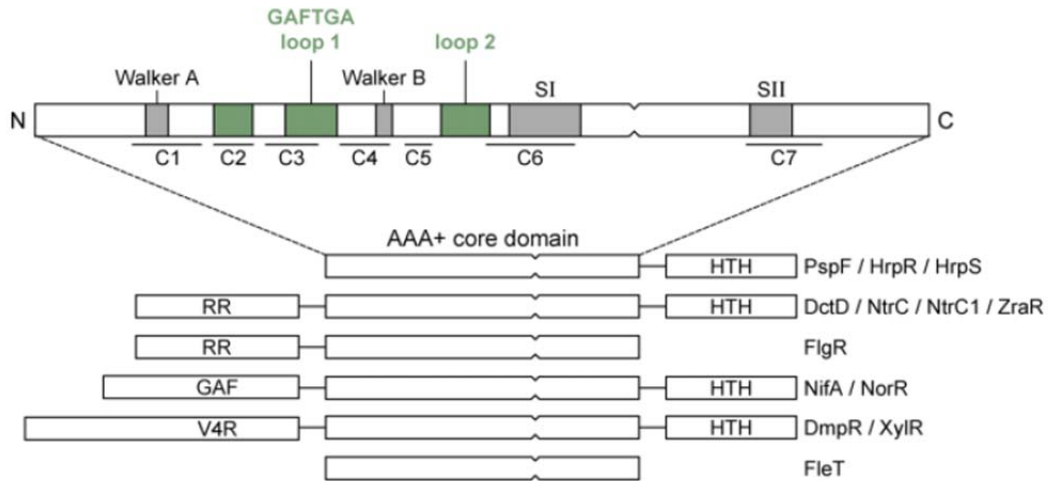


Fig. 1-4. 代表的な  $\sigma^{54}$ -dependent activator における構造(Shingler, 2011)

各 activator は中央に AAA+ domain を持ち、かつ GAFTGA motif が存在するのが特徴である。N 末端はシグナルを感知する domain である場合が多く、二成分制御系(後述)のレスポンスレギュレーターを構成する場合もある。また C 末端も多様化しており、DNA に結合するための HTH domain を持たないものも存在する。

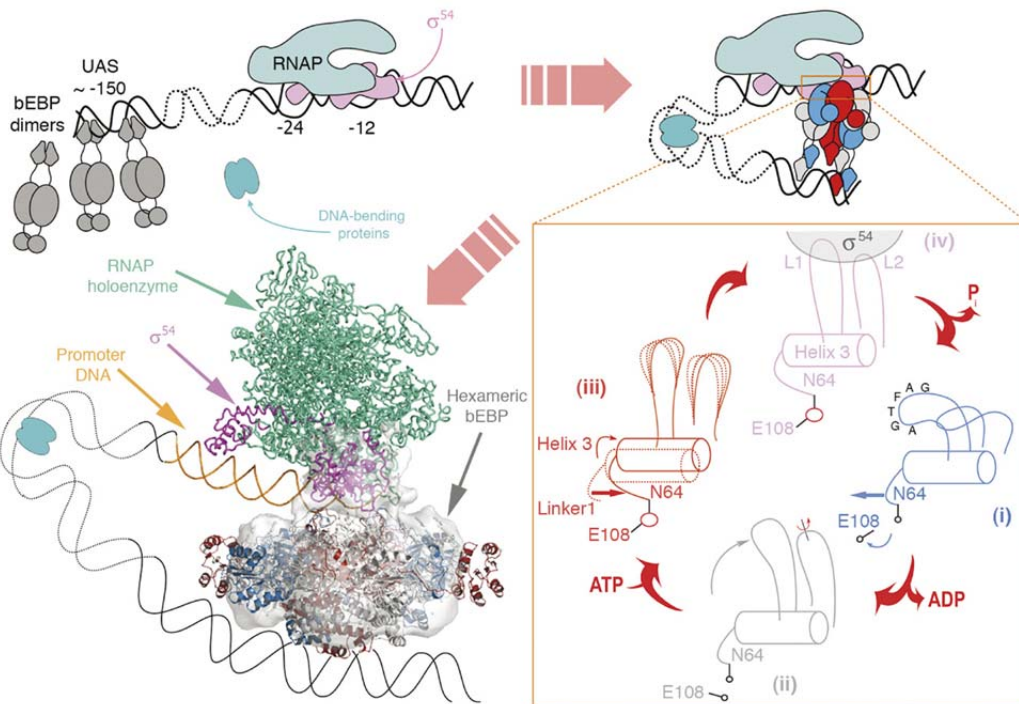


Fig. 1-5.  $\sigma^{54}$ -dependent activator による  $\sigma^{54}$  依存的なプロモーターの活性化機構 (Rappas *et al.*, 2007)

$\sigma^{54}$ -RNAP 複合体が目的遺伝子のプロモーターを認識し結合することで closed complex を形成する。さらに NtrC をはじめとして多くのものは活性化されることで、多量体を形成する。多量体を形成した  $\sigma^{54}$ -dependent activator (図中における bEBP) が  $\sigma^{54}$ -RNAP に近接することで、転写開始に必要な open complex が形成され、転写が始まる。



## 1-2. small RNA を介した翻訳制御機構について

### 1-2-1. small RNA 研究の経緯とその機能

次世代シーケンサーや高密度タイリングアレイをはじめとした新たな解析技術の登場は、微生物学をはじめ生命科学全体において、より高精度かつ広範囲のバイオインフォマティクスからのアプローチを可能とした。特にゲノム情報とトランスクリプトーム解析の組み合わせにより、未知の遺伝子の発見はもちろん、各種生物における遺伝子発現変化についても詳細に検討することが可能となった。

そういった技術背景をもとに、急速に知見が集まっているのが small RNA による発現制御である。特にゲノム全体をカバーするマイクロアレイによる転写プロファイル解析は、遺伝子がコードされている領域だけでなく遺伝子間領域におけるプロファイルについても観察を可能とした。遺伝子間領域からの転写産物について機能解析がされた結果、翻訳されずに RNA 自体で機能する small RNA が多く発見されることとなった。さらに、発見された RNA 配列をもとに解読されているゲノム情報と照らし合わせることも可能となり、現在では small RNA 候補が多数予想されるに至っている。

2001 年の時点で *E. coli* においては 11 種類の small RNA が発見されていたが、さらに 30 以上の候補が存在することがその後明らかとなった。また、他種においても *in silico* における解析含めて合計 150 以上が発見されるに至った(Livny & Waldor, 2007)。2008 年にはバクテリオファージなどに対する防御機構としての CRISPR システムが発見されるなど(Sorek *et al.*, 2008)、今後もより興味深い因子が発見される可能性が高い分野であるといえる。本序論においては、作用機序の観点から大きく 2 種類に分けられる small RNA について、特に本研究と関連の深い因子に焦点をあてながら以下それぞれ概説することで、次章以降の一助となるように努めた。なお、small RNA の分野に関連する表記として、機能をもった転写産物をイタリック体ではなくタンパク質のようにブロック体で表記することが多く、本博士論文を通してその記述方法を踏襲することとした。

### 1-2-2. RNA 結合タンパク質をトラップする機能をもつ small RNA

small RNA は他の一般的な遺伝子と異なり、翻訳されることなく転写された RNA の状態で機能を持つ。その機能としては、制御対象である遺伝子の mRNA からタンパク質が翻訳されるのを阻害するものであることがこれまでに分かっている。翻訳阻害の作用機序は、大きく 2 タイプに分けることができ、1 つは RNA 結合タンパク質が目的の遺伝子の mRNA に結合することで翻訳の阻害が起きる。この際に、small RNA はその翻訳を阻害する RNA 結合タンパク質をトラップして結果的に脱抑制を図る。もう 1 つは、target mRNA と相補的な配列をもつ RNA が結合することでその翻訳の阻害あるいは mRNA の分解が促進される。

前者のタイプで解析が進んでいる例としては、*E. coli* や *P. aeruginosa* などにおける Csr/Rsm システムが挙げられる。small RNA である CsrB (RsmY/Z) が、mRNA に結合

して翻訳阻害機能をもつ CsrA (RsmA) をトラップすることで、翻訳阻害の解除が起きる (Liu *et al.*, 1997). その結果、バイオフィーム形成や細胞の運動能に関連する遺伝子の発現調節がなされる. *csrB* の転写は BarA/UvrY (GacS/GacA) 二成分制御系によって制御されており (Suzuki *et al.*, 2002), pH 等の環境変化が関与していることが予想されている (Mondragon *et al.*, 2006).

同様の機構をもつものとして、カタボライト抑制に関与する small RNA である CrcZ が *Pseudomonas* 属において広く存在する. CrcZ は 407 塩基からなるが、内部には CA motif が 5 箇所存在しており、それにより RNA 結合タンパク質である Crc をトラップすることができる (Fig. 1-6). その結果、標的遺伝子の mRNA に結合する Crc が相対的に減少する. 翻訳阻害は開始コドン周辺に存在する CA-rich な配列 (CA motif と呼ばれている) を Crc が認識し結合することで起きることも分かっている. *crcZ* の転写制御は上流にある炭素源あるいは窒素源をモニターする CbrA-CbrB 二成分制御系が行っており (Sonnleitner *et al.*, 2009), カタボライト抑制についても炭素源変化に対応した CbrA-CbrB を介した一連のシグナル応答の結果の 1 つと予想される.

Crc は *Pseudomonas* 属において global regulator として働いており、4 種の *Pseudomonas* 属のゲノム情報をもとにした予測では少なくとも 12 遺伝子が共通のレギュロンとして存在することが分かっている (Browne *et al.*, 2010). *in vitro* の実験を通しては Crc は *P. putida* KT2440 染色体上のベンゼン代謝系のレギュレーターである *benR* 遺伝子に作用することが確かめられている (Moreno & Rojo, 2008). さらに、それだけでなくトルエン分解プラスミド pWW0 上にコードされている複数の遺伝子にも作用することが分かっている (Moreno *et al.*, 2010). 外来因子であるプラスミド上の遺伝子制御は、いわゆる宿主に負荷のかかる遺伝子の発現を防ぐための防御機構と考えられなくもない. 今後、pWW0 以外の他のプラスミドとの相互作用についても興味を持たれるところである. また、*P. putida* においては CrcZ に加えて、同様の機能をもつ CrcY (368 塩基で CrcZ と 66 % similarity をもつ) が存在することが報告された (Moreno *et al.*, 2012). CrcY については CbrA-CbrB の制御下ないと考えられており、どの様な使い分けがなされているのか興味深い. 低温 (10°C) 条件下やクエン酸を含む最少培地での培養条件下では 2 つの small RNA の転写量がともに増加することから、同じシグナルを感知していると予想されている (Fonseca *et al.*, 2012). プラスミドの宿主としての観点から考えると、各宿主特異的にこういった global regulator が存在することは、例え同じプラスミドであっても、そこにコードされる遺伝子の発現は宿主間で必ずしも同じでないことを説明する一因になりうると考えられる.

### 1-2-3. 目的の mRNA に相補的に結合する small RNA

一方で、相補的な mRNA に結合することで機能する small RNA としては *P. aeruginosa* PAO1 における鉄応答に関与する PrrF (*E. coli* における *ryhB* ホモログ) が挙げられる.

当初は鉄への応答として転写因子である Fur (Ferric uptake regulator) を介して下流にある遺伝子の転写量が正に制御されることが報告されていたが、その一方で Fur を介して負に制御されるも遺伝子も存在しており、その機構については未解明であった。しかし、上述の small RNA PrrF が Fur 依存的に転写されると、特定の遺伝子の mRNA に相補的な配列を利用して、mRNA の分解を誘導することが分かり、目的の遺伝子が負に制御される機構が明らかとなった(Wilderman *et al.*, 2004)。PrrF は遺伝子間領域にタンデムに存在しており (PrrF1 及び PrrF2), 同じ機能をもつとされる。Fe-superoxide dismutase や succinate dehydrogenase を制御するとされている。その一方で、本研究においても登場する PAO1 染色体にコードされるアントラニル酸分解に関与する *ant* 遺伝子や *cat* 遺伝子にも作用することが分かっており(Oglesby *et al.*, 2008) (Fig. 1-7), 興味深い。また small RNA が結合することで mRNA の分解が起きやすくなるのは RNase がリクルートされるためだと考えられている。

#### 1-2-4. small RNA 研究における今後の課題

以上が small RNA を対象とした細菌における post-transcriptional な制御系についての概要である。前述の転写活性化機構と合わせて考えると、ある遺伝子が実際にタンパク質として機能するまでには、転写制御と翻訳制御の 2 段階で制約を受ける可能性があることがわかる。そして、その制約を受ける遺伝子はカタボライト抑制や炭素源となる芳香族化合物の代謝に関与していることが多いといえる。そのため、これまで解析が行われた代謝に関与する遺伝子については、改めて small RNA という観点を加えてその発現制御機構をみてみることで、新たな制御ネットワークが見えてくるかもしれない。

また、small RNA は発見が 2000 年以降であることが多く、その研究の歴史自体が浅いものでもあることから、現在進行形で各 small RNA のレギュロンについて吟味されている段階にある。ただ、そういった網羅的な解析は主に各細菌の染色体上にコードされた遺伝子が主な対象とされている状況であり、今後はその細菌が保持する可能性がある各プラスミドについても合わせて評価されることが重要であると考えている。特に、後述する分解プラスミドにコードされている分解系の遺伝子は基本的に炭素源の代謝ネットワークに関与することから、pWW0 以外にも多くのプラスミドで small RNA の発現制御を受けている遺伝子が見つかる可能性が高く、今後の解析に期待したい。



### 1-3. 原核生物に特徴的なシグナル伝達機構-二成分制御系

#### 1-3-1. 二成分制御系の概要

原核生物は既述の転写制御機構を利用して、生存のために必要な遺伝子を発現させている。その一方で、常に変化する外界の環境に応じて細胞内環境を適切に保つためには、生物は細胞外のシグナルを感知して細胞内の遺伝子発現プロファイルを変化させる必要があり、それを行うにあたって原核生物は二成分制御機構というシグナル伝達機構を利用している。二成分制御系はその名前が示す通り、**sensor kinase** 及び **response regulator** の二因子からなるシグナル伝達系である。一般的には **sensor kinase** が環境変化からくる刺激を受容すると、そのヒスチジン残基の自己リン酸化が起きる。そして、そのシグナルは **phospho-relay** (リン酸化が伝わること) を介して **response regulator** に伝わる (Fig. 1-8)。なお、**response regulator** においてはその N 末端にあるアスパラギン酸残基がリン酸化される。二成分制御系はゲノム情報が分かればそのアミノ酸配列やゲノム上での並び方から、各種生物がどのようなものを持っているかを比較的予想しやすい。実際に各種の細菌において解読されたゲノム情報をもとに、どの程度ゲノム上にコードされているのかを比較してみると、その数は種によって様々であることが分かっている。細菌は平均で 52 の二成分制御因子をもつことが分かっているが、*E. coli* のゲノム解読株では 30 の **sensor kinase** と 32 の **response regulator** を持っているのに対して、*Mycoplasma genitaliu* や *Methanococcus jannaschii* ではコードする遺伝子が全くない。本研究の解析対象の 1 つである *P. aeruginosa* においては 64 個の **sensor kinase** と 72 個の **response regulator** を持っており (Utsumi & Igarashi, 2012)、各種細菌において環境変化への応答が異なることを示唆していることは  $\sigma^{54}$ -dependent activator と同様に興味深い。また、**response regulator** であり、かつ前述の  $\sigma^{54}$ -dependent activator として働く因子が本研究において登場することから、二成分制御系についての理解も同等に重要であると考え、以下、関連する項目について本序論の一項目とした。

#### 1-3-2. 環境刺激を受容する **sensor kinase**

**Sensor kinase** は大きく分けて刺激 (環境変化) を受容する **input domain** とその刺激に応答してリン酸化が起きる **autokinase domain** に分けられる。受容する刺激の種類も変化に富んでおり、細胞外に存在する物質を感知する場合もあれば、細胞内の特定の物質がシグナル物質となる場合もある。そのため、膜貫通ドメインを持ち構造の一部を細胞外に露出させるタイプがある一方で、そのようなドメインを持ち合わせていないものも存在する (Fig. 1-9)。ただ、多くの **sensor kinase** は **PAS domain** と呼ばれる領域でシグナルを受容し、**autokinase domain** の自己リン酸化がおきる。これまで多くの種類の **sensor kinase** が解析され、細菌が酸素や温度などをはじめとして様々な外的環境を実際に感知していることが明らかとなってきている。ただ、その一方でどのような変化を受容しているのかが不明なものも数多く存在しており、今後の解析が期待される。

### 1-3-3. シグナルを遺伝子発現の変化へとつなげる response regulator

Sensor kinase からリン酸化を伝達されることで response regulator は活性化状態となる。活性化状態では、例えば転写活性化に必要なドメインが露出したりすることで、下流の遺伝子の転写を活性化することとなる。Response regulator がどのようなタンパク質として機能するかをその配列をもとに予測すると、大半が DNA-binding protein として働くであろうことが分かっている(Gao *et al.*, 2007).

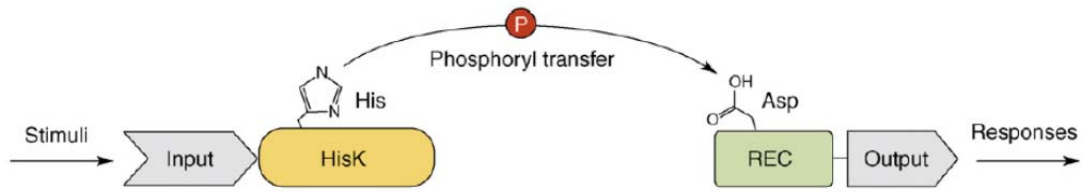


Fig. 1-8. 二成分制御系によるシグナル伝達の概要(Gao *et al.*, 2007)

二成分制御系は環境刺激を受け取る sensor kinase と、その sensor kinase からシグナルを受け取る response regulator から構成される。Response regulator はシグナルを受け取ると、遺伝子の発現プロファイルなどを変化させる。シグナル伝達はリン酸化リレーを通して行われ、HK および RR はそれぞれヒスチジン、アスパラギン酸残基がリン酸化される。

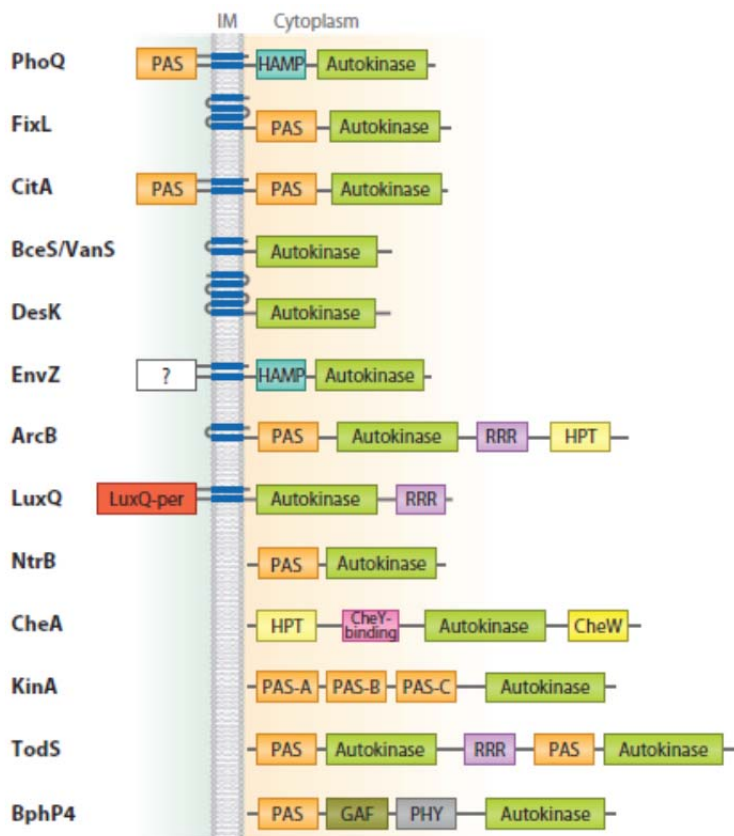


Fig. 1-9. 配列構造から予測する各種 sensor kinase のドメイン構造比較(Krell *et al.*, 2010)

これまでに解析されている代表的な sensor kinase のドメイン構造を、その配列から予測し模式的に表したもの。多くの sensor kinase は PAS domain でシグナルを受容し、autokinase domain によって自己リン酸化が起きる。

#### 1-3-4. 詳細な研究が行われた二成分制御系について

##### ①トルエン分解を担う二成分制御系 TodS・TodT

TodS-TodT はトルエン分解に関与する *tod* operon の転写制御を担う二成分制御系であり、最上流にあるシグナル分子の正体から、それが最終的に *tod* operon の発現に結びつくまでの一連の流れが明らかになっている貴重な二成分制御系である。まず、トルエンをはじめとした芳香族化合物を sensor kinase である TodS が受容することで、TodS の自己リン酸化が起きる。そして、リン酸化が response regulator である TodT へと伝わる。リン酸化された TodT は *tod* box と呼ばれる配列を認識して結合し、下流の遺伝子の転写活性化が起きる (Fig. 1-10)。

##### ②細胞内の窒素バランスをモニターする二成分制御系 NtrB-NtrC

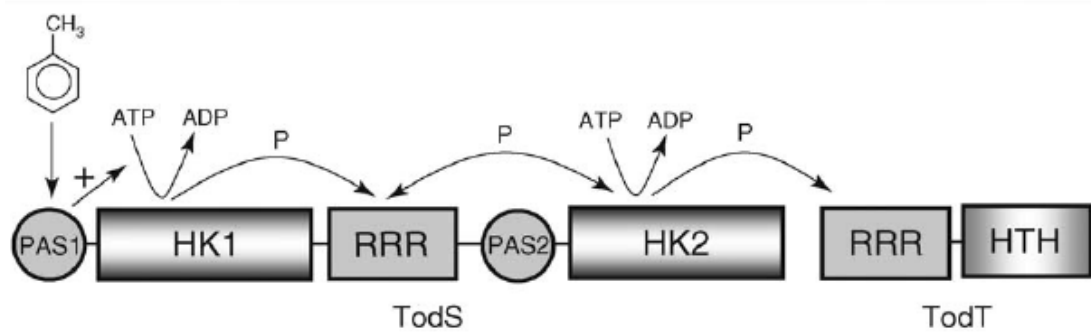
$\sigma^{54}$ -dependent activator に属する response regulator で構成される制御系としては、NtrB-NtrC (nitrogen regulatory protein) が詳細に解析されている。NtrB および NtrC は当初それぞれ NRII, NRI という呼称であったが、1990 年前後を境に現在の名前に変更され、以後それで定着している。そのシグナル伝達系は細胞内の窒素源センサーとしての役割を持っており、窒素源が不足した状態で数多くの遺伝子の転写を調節する NtrC は global regulator ということもできる。NtrB-NtrC のリン酸化による活性化には、上流にさらに 2 つのタンパク質 (PII と UT/UR) が働いており、細胞内のグルタミン酸濃度が低下すると NtrB のリン酸化を促す方向に機能する。

#### 1-3-5. 二成分制御系研究における今後の課題

二成分制御系のこれまでの研究をしてみると、response regulator 破壊株を用いてその制御下にある遺伝子についての解析をすることが比較的多い。その一方で、sensor kinase の研究は膜タンパク質としての研究の難しさから、response regulator と比較して解析が遅れることが多い。また、それと合わせてシグナル伝達経路の最上流に位置するシグナル分子の正体の解明についても、一部の系を除いて進展が見られないことが多かった。これまでに酸素濃度や浸透圧など、各二成分制御系が感知しているシグナルが明らかになっているものもあるが、いまだそのシグナルが明らかになっていないものも多く、まだ解析の余地が残っている分野である。最近では、プラスミド上遺伝子への干渉(Vitale *et al.*, 2008)や前述した NtrC のように十分解析が行われている二成分制御系においてもこれまでに見つかっていなかった下流遺伝子の制御(Porra *et al.*, 2009)などが発見されており、その奥深さを改めて認識させられる。

また、二成分制御系は原核生物に典型的なシステムであることを考えると、当該分野での基礎的な研究は、例えば既存の抗生物質に変わる抗菌剤の開発などに役立つことも考えられることから、そういった視点を含めて今後の解析が進むことを期待したい分野である。





**Fig. 1-10. TodS-TodT 二成分制御系によるシグナル伝達の流れ**

sensor kinase である TodS が PAS domain でシグナル分子であるトルエンなどを感知する。すると autokinase domain (HK1) において自己リン酸化が起き、それが response regulator receiver domain (RRR), 2 つ目の autokinase domain (HK2) へと伝わる。その後, response regulator である TodT の receiver domain へと伝わり, 最終的には tod operon の転写活性へとシグナルが伝わる。

## 1-4. 分解プラスミドに関する研究

### 1-4-1. 染色体外遺伝因子としてのプラスミド

プラスミドは染色体外遺伝因子であり、宿主に多様な形質を付加することが知られている。生命科学においては、目的に合わせて大腸菌などの形質転換体を作製する際にプラスミドベクターとして広く活用されている。この時に、抗生物質マーカールを利用することが多いが、それはプラスミドベクター上にコードされている抗生物質耐性遺伝子の発現を利用したものである。自然界においてプラスミドは遺伝子の水平伝播を担う一要因であり、ある宿主にとっては環境に適応するための因子と促えることもできる。特に **xenobiotic compounds** を分解する能力を宿主に付与するプラスミドは「分解プラスミド」と呼ばれ、宿主の進化および環境浄化の観点から、当研究室を含めて多数のグループによって研究が進められている。

ところで、これまでに発見された多くのプラスミドの分類にあたっては不和合性が基準となっている。これは複製・保持機構が同一のプラスミド同士は、同じ宿主内で共存することができない性質 (**Incompatibility**) を利用したものであり、例えば *E. coli* におけるプラスミドであれば **IncA ~ IncZ** や *Pseudomonas* 属におけるプラスミドであれば、**IncP1 ~ IncP14** といった分類がなされている。以下、分解プラスミド研究についての現状と今後について述べる。

### 1-4-2. 分解プラスミド研究の歴史

分解プラスミドの研究は 1970 年代にすでにスタートしており、*P. putida* におけるサリチル酸やナフタレンの分解がプラスミドに起因するものであることをはじめとして、今日でも研究されているトルエン分解プラスミド **pWW0** も 1974 年にはすでに報告されている。その後、多くの分解プラスミドが単離され **IncP-1** をはじめとして、**IncP-2, IncP-7, IncP-9** グループなどに属するプラスミドが発見されるに至っている (**Shintani et al., 2010**)。

また、各分解プラスミドは発見と同時に、そこにコードされる分解酵素の基質特異性とその分解経路についての研究が精力的に行われた。その結果、トルエンを含め多くの芳香族化合物はいわゆるプラスミド上のみコードされている初発酸化酵素による反応を起点とした **upper pathway** とそれに続く芳香環の開裂を伴う **meta pathway** といった数段階の経路を経由して分解されることが分かった。分解されてできた中間代謝産物は、宿主がもつ  **$\beta$ -keto adipate pathway** などにより最終的には宿主の代謝系に取り込まれることとなる。

### 1-4-3. 分解系遺伝子群の発現制御に関する研究の概要

分解プラスミドをもつ分解菌を応用的に利用して **bioremediation** を行うことを考えると、肝要なのは目的の汚染物質を分解するために必要な遺伝子 (群) が的確に発現することである。そのため、分解菌における分解系遺伝子群の発現制御についても古くから研究が行われている。

特に芳香族化合物に関する分解系の発現制御機構については、染色体上、プラスミド上問わず多く報告されており (Tropel & van der Meer, 2004), レギュレーターの同定に始まりプロモーター解析や結晶構造解析まで網羅的に行われている。また多くの場合、中間代謝産物がエフェクターとしての機能を持ち、転写を正に制御することが明らかとなっている。

芳香族化合物を分解する酵素の転写制御を担う転写因子は、大きく幾つかのグループに分けることができるが、一般的には LysR ファミリーや二成分制御系に属するものが多く報告されている (Tropel & van der Meer, 2004)。最も多くの因子が発見されているのが、LysR ファミリーに属するものでそれぞれカテコール、ポリ塩素化ビフェニルの分解を制御する CatR, CbnR やナフタレン分解プラスミド NAH7 にコードされている NahR がこのファミリーに属する。当該ファミリーに属する転写因子は、4 量体を形成しプロモーター領域に結合し、エフェクターが作用することで DNA を湾曲させ転写を活性化するとされている (Ogawa *et al.*, 1999)。また、AraC/XylS ファミリーも分解酵素の転写制御を担う因子として、よく研究されている。約 250~300 アミノ酸から構成されることが多く、N 末端の保存性は低いものの、C 末端に含まれる 2 つの HTH motif がファミリー内で非常によく保存されているのが特徴である。その名前の通り、pWW0 にコードされる XylS や後述の pCAR1 にコードされる転写因子 AntR も AraC/XylS ファミリーに属している。-35 element 付近にタンデムに結合し、エフェクターの存在下で RNAP による転写開始を助けるとされている。

#### 1-4-4. 分解プラスミド研究における今後の課題

科学技術の発展は人類に恩恵をもたらしたが、それと同時に深刻な環境破壊をも招いており、解決すべき環境問題が山積している。環境汚染物質による土壌汚染や水質汚染はそういった問題の 1 つであり、生態系にできるだけ影響を与えないような方法で汚染物質除去が望まれている。汚染サイトの修復方法としては、物理的な除去以外の方法に、主に細菌を用いた生物学的手法である *bioremediation* が考えられる。

*Bioremediation* には、土着の分解菌の分解能をより活性化させる *biostimulation* と、分解能をもった菌を直接サイトに接種する *bioaugmentation* に区別することができる。*bioaugmentation* が成功する条件の 1 つとして、「接種した菌が汚染サイトに適応できること」が挙げられる。増殖力が相対的に弱い細菌であったり、汚染環境に適応できない菌であったりすると、当初望んだ効果を得られない可能性が高い。そういった問題を克服するために、*bioaugmentation* の一態様として *plasmid-mediated bioaugmentation* が試みられている。これは接合伝達性の分解プラスミドを使い、2 次的に強力な分解菌を得ることを目的とした方法である。実際に研究室レベルではすでにその有効性が確認されている (Bathe *et al.*, 2005)。今後、*plasmid-mediated bioaugmentation* の有効性が実環境中でも検討されることが期待されるが、その際に遺伝子汚染が起きない、あるいは最小限にとどめるために必要な知見を得ることが今後の分解プラスミドにおける応用的な研究の課題の

1つと言える。

また前述の通り、分解プラスミドについての研究は、分解経路から転写制御機構に至るまで網羅的な解析が進んでいるが、そのほとんどは宿主を1種に限定した中での研究であり、それが様々な分解プラスミドで個別に行われた解析結果が知見として集積している状況である。しかし、接合伝達性の分解プラスミドというものを考えた時に、それはある限られた状況(宿主)での機能を見ているに過ぎず、異なる宿主での機能を解析してはじめて接合伝達性の分解プラスミドの機能の全容に迫れると考えられる。宿主域の研究についても、技術の発展に伴いより正確に接合伝達体を検出できる方法などが *single-cell flow cytometry* を利用して確立されており(Sorensen *et al.*, 2003)、従来であれば検出できなかった正確な宿主域を決定することが可能となった。また、各種生物におけるゲノム情報が日々読まれており、プラスミドによってはその宿主のほとんどのゲノム情報が利用可能になりつつある。以上のことから、あるプラスミドについて宿主間での比較を行うことが現在可能となっており、本研究を含めた「横比較」による解析によってこれまでに分からなかった新たなプラスミドに関する知見が今後得られる可能性が高い。

## 1-5. カルバゾール分解プラスミド pCAR1 に関する研究

### 1-5-1. pCAR1 の発見と当研究室における解析の経緯

当研究室で研究対象にしているのは、IncP-7 群に属するカルバゾール分解プラスミド pCAR1 (Fig. 1-11) であり、2003年に全塩基配列が解読された(Maeda *et al.*, 2003)。カルバゾールは石油中などに含まれている含窒素複素環式芳香族化合物で、発がん性などが指摘される環境汚染物質である。pCAR1 はもともと下水処理場の活性汚泥中から単離されたカルバゾール分解菌 *Pseudomonas resinovorans* CA10 より発見された約 200 kb のプラスミドであり(Nojiri *et al.*, 2001)、接合伝達により少なくとも *Pseudomonas* 属や *Stenotrophomonas* 属を宿主域とすることが分かっている(Shintani *et al.*, 2005; Shintani *et al.*, 2008)。また、カルバゾール分解系遺伝子群の他に、3種類の核様体タンパク質 NAPs (Nucleoid Associated Proteins) をコードした遺伝子が pCAR1 上に存在する。NAPs は global regulator であり DNA に結合することでその周辺に存在する遺伝子の発現調節を行う。中でもプラスミド上にコードされている NAPs は、宿主染色体上の多くの遺伝子発現に影響を及ぼし、時にはステルス機能としての役割を果たすことが知られている(Doyle *et al.*, 2007)。そういった NAPs が複数種類コードされていることは、プラスミド-宿主の相互作用を解析する研究対象としても非常に有用であることから、pCAR1 については NAPs を軸としても解析が進んでいる(Suzuki *et al.*, 2011; Yun *et al.*, 2010)。

### 1-5-2. カルバゾール分解系遺伝子群の転写制御解析

pCAR1 上にはアクセサリージーンとしてカルバゾール分解系遺伝子群(*car/ant*)がコードされており、それら遺伝子群の発現によりカルバゾールが中間代謝産物であるアントラニ

ル酸を経由してカテコールへと代謝される。その後、カテコールは宿主がもつ  $\beta$ -ketoadipate pathway により、acetyl-CoA あるいは succinyl-CoA という形で TCA サイクルへと取りこまれることとなる(Nojiri *et al.*, 2002)。これらカルバゾール分解系遺伝子群の転写制御は、2 種類のプロモーター ( $P_{carAa}$ ,  $P_{ant}$ ) によって制御されている。 $P_{carAa}$  プロモーターは恒常的に発現しており、*car* 遺伝子群の転写を制御している(Miyakoshi *et al.*, 2006)。その一方で、 $P_{ant}$  プロモーターはアントラニル酸誘導性であり、*car* および *ant* 遺伝子群の転写を制御している。 $P_{ant}$  プロモーターの発現誘導には同じプラスミド上にコードされている AraC/XylS ファミリー転写因子 AntR が必要であり、中間代謝産物であるアントラニル酸がエフェクターとして作用することで転写が活性化される(Urata *et al.*, 2004)。実際にカルバゾール分解に寄与しているのは、 $P_{ant}$  プロモーター由来の分解酵素の発現であることを考えると分解系遺伝子群の発現において中心的な役割を果たす *antR* 自身の転写制御機構に興味もたれる。

*antR* はそのプロモーター配列から  $\sigma^{54}$  依存的な転写制御であり、 $\sigma^{54}$ -dependent activator が転写活性化に必要と予想されている(Miyakoshi *et al.*, 2007)。ただし、pCAR1 上には当該因子はコードされていないことから宿主染色体にコードされている因子が *antR* の転写活性化に寄与する可能性が高い (Fig. 1-12)。これは *antR* の発現が宿主依存的であり、各宿主のゲノム構成の違いによっては最終的に pCAR1 の分解能力に違いが出ることを示唆するものである。

### 1-5-3. 異なる宿主間における比較解析

当研究室では、現在までに pCAR1 が各宿主にどのような影響を与えるかについて複数のモデル宿主を対象として網羅的な解析が進んでいる。これまでに *P. putida* KT2440 と *P. resinovorans* CA10 をコハク酸培養あるいはカルバゾール培養を唯一の炭素源として培養し、その対数増殖期における pCAR1 の転写変動について比較解析が行われた結果、同じプラスミドでも宿主が異なれば一部の遺伝子の転写量に差が存在することが示された(Miyakoshi *et al.*, 2009)。また、5 種 6 株の宿主を対象としてコハク酸培養による pCAR1 上遺伝子の転写プロファイルの比較解析からは、*car* 遺伝子群の恒常的プロモーターである  $P_{carAa}$  について各宿主で転写量に差があることが分かっている(Shintani *et al.*, 2011b)。

一方で、pCAR1 の保持が宿主染色体上遺伝子の発現にどのような影響を与えるのかについても興味深い。実際に、pCAR1 保持により *P. putida* KT2440 の染色体上にコードされる *parI* 遺伝子の転写プロファイルが変化するが、それは pCAR1 上にコードされている *parA* による制御であることが分かっている(Miyakoshi *et al.*, 2007)。さらに 3 種のモデル宿主 (*P. putida* KT2440, *P. aeruginosa* PAO1, *P. fluorescens* Pf0-1) における pCAR1 保持の影響について、表現型マイクロアレイおよびタイリングアレイを用いた網羅的な比較解析が行われ、同じプラスミドが各宿主に与える影響について、表現型および遺伝子の転写変動の観点から、その詳細が明らかになりつつある (Takahashi, unpublished data)。

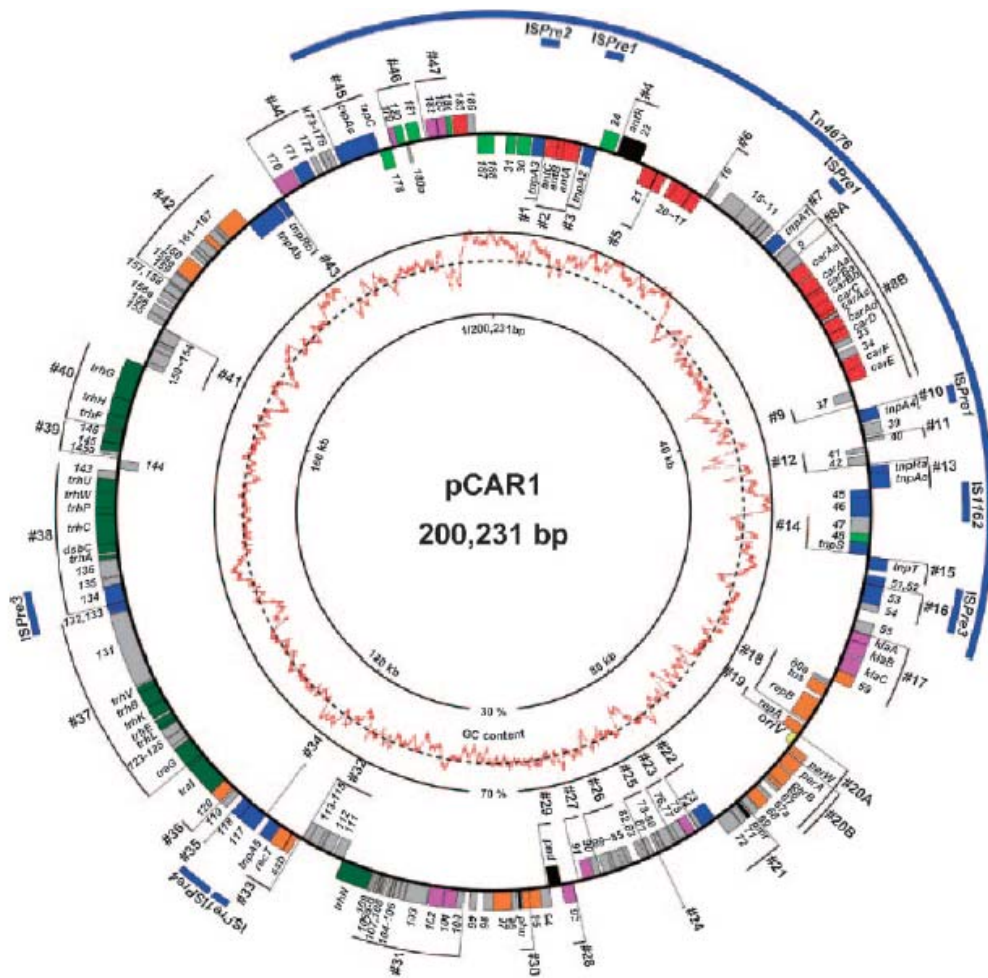


Fig. 1-11. カルバゾール分解プラスミド pCAR1 の遺伝子地図(Nojiri, 2012)

円の外側の ORF は時計回りに、内側の ORF は反時計回りに転写される。各 ORF は既知のタンパク質との相同性により推定される機能に従って色分けされている。橙色はプラスミドの複製・保持、緑色はプラスミドの接合伝達、青色は挿入因子、赤色は分解系遺伝子、黄緑色は輸送・膜タンパク質、黒色は転写制御因子、紫色はその他の機能、灰色は機能未知 ORF と相同性を示す ORF を表す。内側の円は G+C 含量を表し、破線は pCAR1 全体の平均 G+C 含量 56%を表す。

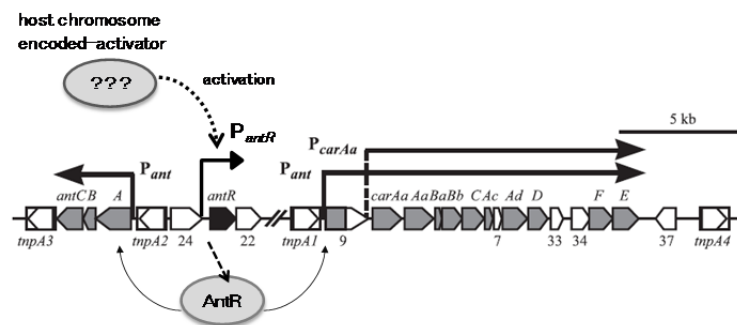


Fig. 1-12. pCAR1 上カルバゾール分解系遺伝子群の宿主依存的な予想転写制御モデル(Miyakoshi et al., 2007 より改変)

宿主因子によって  $P_{antR}$  プロモーターが活性化され、AntR が発現する。発現した AntR はアントラニル酸存在下で、 $P_{ant}$  プロモーターを活性化し、分解酵素遺伝子 *car/ant* が転写される。

#### 1-5-4. pCAR1 の宿主域に関する研究

pCAR1 は IncP-7 群に属するプラスミドであることから狭宿主域のプラスミドと考えられているが、その宿主域についてはまだ完全に解明されてはいない。既述の通り、pCAR1 の宿主域は現在までに *Pseudomonas* 属と *Stenotrophomonas* 属を対象とすることが明らかになっているが(Shintani *et al.*, 2008), さらに *Delftia* 属についても宿主である可能性が示されており(新谷, unpublished data), 各宿主において pCAR1 はどのような形質を付与しているのか、分解能力を発揮できるのかなど興味をもたれるところである。

#### 1-6. 本研究の目的

既述の背景をもとに、カルバズール分解プラスミド pCAR1 は既存の分解プラスミドと異なり、「宿主依存的」な発現制御というユニークな分解系遺伝子群をもつという点で研究対象として興味深く、新規な知見が得られると考えられ、その制御因子の発現機構を解明することを目指した。さらに、その宿主依存性に着目し、異なる宿主においてその機構がどのように変化するかということの評価することとした。それにより、典型的な転写制御機構の研究という路線を踏襲しつつも、そこから脱却し、これまでほとんど言及されてこなかった宿主間での分解系遺伝子の転写制御の姿を明らかにすることを目的としている。

そのためにもまず、pCAR1 のモデル宿主の 1 つである *P. aeruginosa* PAO1 の破壊株ライブラリーを用いて pCAR1 上 *antR* の発現制御に必要な宿主因子を決定することとした。その後、代表的なモデル宿主である *P. putida* KT2440 における解析を基本として *antR* の発現制御に必要なコンポーネントを決定し、発現制御モデルを構築した。次いで、異なる宿主 (*P. aeruginosa* PAO1) を用いることで、宿主依存的な発現制御ネットワークにどのような変化が生じるのかを解析した。さらに、pCAR1 の宿主・非宿主合わせた多様な細菌において *antR* の転写活性化ポテンシャルを解析することで、発現制御モデルの妥当性を評価した。以上の全ての結果を踏まえ、分解系プラスミドが宿主依存的な制御系をもつことで、既存の分解プラスミドと比較して宿主またはプラスミド自体にとって、どのような生物学的意義があるのかを言及することとした。

## 第2章

### 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

#### 2-1. 緒言

*antR* の転写制御に関与する宿主染色体上の  $\sigma^{54}$ -dependent activator を決定するため、ワシントン大学から頒布されている破壊株ライブラリー内より 22 種類の  $\sigma^{54}$ -dependent activator 破壊株を利用してレポーター解析によるスクリーニングを行うこととした。

そこで、本章ではまずスクリーニングを行うために必要なレポータープラスミドの構築から行うこととした。

#### 2-2. 方法

##### 2-2-1. 使用菌株, プラスミド, および培養条件

本章で使用した菌株及びプラスミドをそれぞれ, Table 2-1 および 2-2 に示す. *P. putida* KT2440 をはじめとして各株は特に表記のない限り, Luria-Bertani (LB) 培地(Sambrook & Russell, 2001), または終濃度 0.1% (w/v) のアントラニル酸ナトリウムまたはコハク酸アンモニウムを含む NMM4 培地(Shintani *et al.*, 2005)を用いて 30°Cにて培養した. 平板培地作製用に LB 培地には agar を 1.6 % (w/v)となるように加えた. NMM4 培地は, 2.2 g/l  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 0.8 g/l  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 3.0 g/l  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ , となるように調製し, 使用直前にミネラルおよび必要に応じた炭素源を Table 2-3 に示す濃度で添加した. 使用した抗生物質についても合わせて Table 2-3 に示した. ただし, レポーターアッセイにおける本培養時には, ルシフェラーゼ酵素の合成阻害が起きるのを避けるため, 抗生物質を添加しなかった.

##### 2-2-2. DNA の取り扱い

標準的な方法に従って *E. coli* の形質転換, プラスミドの調製, 制限酵素処理等の DNA 操作を行った(Sambrook & Russell, 2001).

##### 2-2-3. Polymerase chain reaction (PCR)

PCR は ExTaq(TaKaRa, Tokyo, Japan)あるいは KOD Plus Neo(Toyobo, Tokyo, Japan) を DNA polymerase として用い, 添付のプロトコルに従って行った. また, サーマルサイクラーには PCR Thermal Cycler Dice TP600 (TaKaRa)を使用した. 各実験で用いたプライマーについては, Table 2-4 に示した.



Table 2-1. 本研究で使用した菌株リスト (1/2)

Bacterial strain	Relevant characteristics	Source or reference
<b><i>Escherichia coli</i></b>		
DH5 $\alpha$	F <sup>-</sup> $\phi$ 80d <i>lacZ</i> $\Delta$ M15 <i>(lacZYA-argF)U169 endA1 recA1 hsdR17</i> (r <sub>K</sub> m <sub>K</sub> <sup>+</sup> ) <i>deoR thi-1 supE44</i> $\lambda$ <i>gyrA96 relA1</i>	Laboratory collection
S17-1 $\lambda$ <i>pir</i>	<i>recA thi pro hsdR</i> RP4-2 integrated into the chromosome ( <i>kan</i> ::Tn7 <i>ter</i> ::Mu) $\lambda$ <i>pir</i>	de Lorenzo <i>et al.</i> (1994)
BL21 (DE3)	F <sup>-</sup> <i>ompT hsdS<sub>B</sub></i> (r <sub>B</sub> m <sub>B</sub> ) <i>gal</i> $\lambda$ <i>cl 857 ind1 Sam7 nin5 lacUV5T7gene1 dcm</i> (DE3)	Novagen
<b><i>Pseudomonas putida</i></b>		
KT2440	naturally Ap <sup>r</sup> , naturally Cm <sup>r</sup> , naturally Rif <sup>r</sup> , naturally Sm <sup>r</sup>	Nelson <i>et al.</i> (2002)
KT2440 (pCAR1)	<i>P. putida</i> KT2440 harboring pCAR1	Miyakoshi <i>et al.</i> (2007)
KT2440 $\Delta$ <i>cbrB</i>	<i>cbrB</i> ::Gm <sup>r</sup> mutant of KT2440	This study
KT2440 $\Delta$ <i>cbrB</i> (pCAR1)	<i>cbrB</i> ::Gm <sup>r</sup> mutant of KT2440 (pCAR1)	This study
KT2440 $\Delta$ <i>ntrC</i>	<i>ntrC</i> ::Gm <sup>r</sup> mutant of KT2440	This study
<b><i>Pseudomonas aeruginosa</i></b>		
PAO1	naturally Ap <sup>r</sup> , naturally Cm <sup>r</sup> , naturally Km <sup>r</sup> , naturally Rif <sup>r</sup> , naturally Sm <sup>r</sup> , naturally Tc <sup>r</sup>	Stover <i>et al.</i> (2000)
PAO1(pCAR1)	<i>P. aeruginosa</i> PAO1 harboring pCAR1	Takahashi <i>et al.</i> (2009)
PAO1 $\Delta$ <i>PA0873</i>	<i>PA0873</i> ::Tet <sup>r</sup> mutant of PAO1	Jacobs <i>et al.</i> (2003)
PAO1 $\Delta$ <i>PA1097</i>	<i>PA1097</i> ::Tet <sup>r</sup> mutant of PAO1	Jacobs <i>et al.</i> (2003)
PAO1 $\Delta$ <i>PA1099</i>	<i>PA1099</i> ::Tet <sup>r</sup> mutant of PAO1	Jacobs <i>et al.</i> (2003)
PAO1 $\Delta$ <i>PA1196</i>	<i>PA1196</i> ::Tet <sup>r</sup> mutant of PAO1	Jacobs <i>et al.</i> (2003)
PAO1 $\Delta$ <i>PA1335</i>	<i>PA1335</i> ::Tet <sup>r</sup> mutant of PAO1	Jacobs <i>et al.</i> (2003)
PAO1 $\Delta$ <i>PA1663</i>	<i>PA1663</i> ::Tet <sup>r</sup> mutant of PAO1	Jacobs <i>et al.</i> (2003)
PAO1 $\Delta$ <i>PA1945</i>	<i>PA1945</i> ::Tet <sup>r</sup> mutant of PAO1	Jacobs <i>et al.</i> (2003)
PAO1 $\Delta$ <i>PA2005</i>	<i>PA2005</i> ::Tet <sup>r</sup> mutant of PAO1	Jacobs <i>et al.</i> (2003)
PAO1 $\Delta$ <i>PA2354</i>	<i>PA2354</i> ::Tet <sup>r</sup> mutant of PAO1	Jacobs <i>et al.</i> (2003)
PAO1 $\Delta$ <i>PA2359</i>	<i>PA2359</i> ::Tet <sup>r</sup> mutant of PAO1	Jacobs <i>et al.</i> (2003)
PAO1 $\Delta$ <i>PA2449</i>	<i>PA2449</i> ::Tet <sup>r</sup> mutant of PAO1	Jacobs <i>et al.</i> (2003)
PAO1 $\Delta$ <i>PA2665</i>	<i>PA2665</i> ::Tet <sup>r</sup> mutant of PAO1	Jacobs <i>et al.</i> (2003)
PAO1 $\Delta$ <i>PA3932</i>	<i>PA3932</i> ::Tet <sup>r</sup> mutant of PAO1	Jacobs <i>et al.</i> (2003)
PAO1 $\Delta$ <i>PA4021</i>	<i>PA4021</i> ::Tet <sup>r</sup> mutant of PAO1	Jacobs <i>et al.</i> (2003)
PAO1 $\Delta$ <i>PA4147</i>	<i>PA4147</i> ::Tet <sup>r</sup> mutant of PAO1	Jacobs <i>et al.</i> (2003)
PAO1 $\Delta$ <i>PA4547</i>	<i>PA4547</i> ::Tet <sup>r</sup> mutant of PAO1	Jacobs <i>et al.</i> (2003)
PAO1 $\Delta$ <i>PA4581</i>	<i>PA4581</i> ::Tet <sup>r</sup> mutant of PAO1	Jacobs <i>et al.</i> (2003)
PAO1 $\Delta$ <i>PA4726</i>	<i>PA4726</i> ::Tet <sup>r</sup> mutant of PAO1	Jacobs <i>et al.</i> (2003)
PAO1 $\Delta$ <i>PA5125</i>	<i>PA5125</i> ::Tet <sup>r</sup> mutant of PAO1	Jacobs <i>et al.</i> (2003)
PAO1 $\Delta$ <i>PA5166</i>	<i>PA5166</i> ::Tet <sup>r</sup> mutant of PAO1	Jacobs <i>et al.</i> (2003)
PAO1 $\Delta$ <i>PA5483</i>	<i>PA5483</i> ::Tet <sup>r</sup> mutant of PAO1	Jacobs <i>et al.</i> (2003)
PAO1 $\Delta$ <i>PA5511</i>	<i>PA5511</i> ::Tet <sup>r</sup> mutant of PAO1	Jacobs <i>et al.</i> (2003)

Table 2-1. 本研究で使用した菌株リスト (2/2)

Plasmid	Relevant characteristics	Source or reference
<b><i>Pseudomonas fluorescens</i></b>		
Pf0-1 Km	<i>P. fluorescens</i> Pf0-1 derivative with the introduced Km <sup>r</sup> gene into Pf101_0559, naturally Ap <sup>r</sup> , naturally Cm <sup>r</sup> , naturally Sm <sup>r</sup>	Takahashi <i>et al.</i> (2009)
Pf0-1Km (pCAR1)	<i>P. fluorescens</i> Pf0-1Km harboring pCAR1	Takahashi <i>et al.</i> (2009)
<b>Strains used for the check of <i>antR</i> activation potential</b>		
<i>Escherichia coli</i> K-12 W3110	type strain	NBRP
<i>P. protegens</i> Pf-5 NRRL B-23932	previously named <i>P. fluorescens</i> Pf-5	ARS culture collection
<i>P. resinovorans</i> CA10 dm4	pCAR1-free <i>P. resinovorans</i> CA10	Laboratory collection
<i>P. stutzeri</i> ATCC 17588	type strain	NBRC
<i>Azotobacter vinelandii</i> NBRC 102612	type strain	NBRC
<i>Burkholderia multivorans</i> ATCC 17616	type strain	Tohoku University
<i>Delftia tsuruhatensis</i> NBRC 16741	type strain	NBRC
<i>Halomonas elongata</i> NBRC 15536	type strain	NBRC
<i>Sphingobium japonicum</i> UT26S	HCH <sup>++</sup> Nal <sup>r</sup>	Tohoku University

NBRP : National BioResource Project

ARS: Agricultural Research Service

NBRC: Biological Resource Center, NITE

Table 2-2. 本研究で使用したプラスミドリスト (1/2)

Plasmid	Relevant characteristics	Source or reference
<b>Cloning vectors</b>		
pT7Blue T-vector	Ap <sup>r</sup> <i>lacZ</i> α T7 promoter f1 origin pUC/M13 priming sites	Novagen
pZErO-2	pMB1 <i>ori</i> Km <sup>r</sup>	Invitrogen
<b>Plasmids for <i>cbrB</i> disruptant construction</b>		
pPS856	Ap <sup>r</sup> , Gm <sup>r</sup> ; source of Gm <sup>r</sup> cassette	Hoang <i>et al.</i> (1998)
<b>Plasmids for standard curve in qRT-PCR</b>		
pTPf16S	pT7Blue with 0.1 kb PCR fragment containing the <i>P. fluorescens</i> Pf0-1 16S rRNA internal sequence	Takahashi <i>et al.</i> (2009)
pTuniv16S	pT7Blue with 0.1 kb PCR fragment containing the 16S rRNA internal sequence	Miyakoshi <i>et al.</i> (2007)
pTantA	pT7Blue with 0.1 kb PCR fragment containing the <i>antA</i> internal sequence	Miyakoshi <i>et al.</i> (2007)
pTantR	pT7Blue with 0.1 kb PCR fragment containing the <i>antR</i> internal sequence	This study
pTantR <sub>PA</sub>	pT7Blue with 0.1 kb PCR fragment containing the PAO1 chromosomal-encoded <i>antR</i> internal sequence	This study
pTcbrb	pT7Blue with 0.1 kb PCR fragment containing the <i>cbrB</i> internal sequence	This study
pTcbrbPA	pT7Blue with 0.1 kb PCR fragment containing the <i>cbrB</i> internal sequence	This study
pTcbrbPF	pT7Blue with 0.1 kb PCR fragment containing the <i>cbrB</i> internal sequence	This study
pTluc	pT7Blue with 0.1 kb PCR fragment containing the <i>luc</i> internal sequence	This study
pTercz	pT7Blue with 0.1 kb PCR fragment containing the <i>crcZ</i> internal sequence	This study
<b>Recombinant plasmids related to reporter assay</b>		
pBRK	<i>lacZ</i> α <i>mob</i> Km <sup>r</sup>	Kovach <i>et al.</i> (1995)
pMEGluc	promoterless <i>luc</i> + NF Gm <sup>r</sup>	Miyakoshi <i>et al.</i> (2006)
pBRCantA123	pBBR1MCS-5 containing the region -70 to +53 from <i>antA</i> start codon and <i>luc</i> + NF Gm <sup>r</sup>	Urata <i>et al.</i> (2004)
pMEGantR-orf0	<i>Bam</i> HI- <i>Hind</i> III fragment of pTantR-orf free in pMEGluc	This study
pMEGantR-orf250	<i>Bam</i> HI- <i>Hind</i> III fragment of pTantR-orf250 in pMEGluc	This study
pMEGantR-orf500	<i>Bam</i> HI- <i>Hind</i> III fragment of pTantR-orf500 in pMEGluc	This study
pMEGantR-orf750	<i>Bam</i> HI- <i>Hind</i> III fragment of pTantR-orf750 in pMEGluc	This study
pMEGantR-FL	<i>Bam</i> HI- <i>Hind</i> III fragment of pTantR-FL in pMEGluc	This study
pMEGantR-FL(opa)	<i>Bam</i> HI- <i>Hind</i> III fragment of pTantR-FL(opal) in pMEGluc	This study
pMEGantR-200	<i>Bam</i> HI- <i>Hind</i> III fragment of pTantR-200 in pMEGluc	This study
pMEGantR-280	<i>Bam</i> HI- <i>Hind</i> III fragment of pTantR-280 in pMEGluc	This study
pMEGantR-290	<i>Bam</i> HI- <i>Hind</i> III fragment of pTantR-290 in pMEGluc	This study
pMEGantR-300	<i>Bam</i> HI- <i>Hind</i> III fragment of pTantR-300 in pMEGluc	This study
pMEGantR-310	<i>Bam</i> HI- <i>Hind</i> III fragment of pTantR-310 in pMEGluc	This study
pMEGantR-320	<i>Bam</i> HI- <i>Hind</i> III fragment of pTantR-320 in pMEGluc	This study
pMEGantR-400	<i>Bam</i> HI- <i>Hind</i> III fragment of pTantR-400 in pMEGluc	This study
pMEGmut-1	Derivative of pMEGantR-FL with mutated putative <i>cbrB</i> binding site	This study
pMEGσ <sup>54</sup> mut	Derivative of pMEGantR-FL with mutated -24 box of the σ <sup>54</sup> promoter	This study
pMEGdeltaCA	Derivative of pMEGantR-FL with mutated CA motif	This study

Table 2-2. 本研究で使用したプラスミドリスト(2/2)

Plasmid	Relevant characteristics	Source or reference
<b>Recombinant plasmids related to reporter assay</b>		
pMEGantR <sub>PA</sub> -100	<i>Bam</i> HI- <i>Hind</i> III fragment of pTantR <sub>PA</sub> -100 in pMEGluc	This study
pMEGantR <sub>PA</sub> -130	<i>Bam</i> HI- <i>Hind</i> III fragment of pTantR <sub>PA</sub> -130 in pMEGluc	This study
pMEGantR <sub>PA</sub> -150	<i>Bam</i> HI- <i>Hind</i> III fragment of pTantR <sub>PA</sub> -150 in pMEGluc	This study
pMEGantR <sub>PA</sub> -200	<i>Bam</i> HI- <i>Hind</i> III fragment of pTantR <sub>PA</sub> -200 in pMEGluc	This study
pMEGantR <sub>PA</sub> -300	<i>Bam</i> HI- <i>Hind</i> III fragment of pTantR <sub>PA</sub> -300 in pMEGluc	This study
pMEGPA $\sigma^{54}$ mut	Derivative of pMEGantR <sub>PA</sub> -300 with mutated -24 box of the putative $\sigma^{54}$ promoter	This study
<b>Recombinant plasmids related to CbrB expression</b>		
pET-26b(+)	T7 promoter <i>lacI</i> pBBR322 origin ; Km <sup>r</sup>	Novagen
pETnt13cbrbPA	<i>Nde</i> I- <i>Sac</i> I fragment of pZnt13cbrbPA ; Km <sup>r</sup>	This study
pETcbrb	<i>Nde</i> I- <i>Sac</i> I fragment of pZcbrb ; Km <sup>r</sup>	This study
pETnt13cbrb	<i>Nde</i> I- <i>Sac</i> I fragment of pZnt13cbrb ; Km <sup>r</sup>	This study
pETnt124cbrb	<i>Nde</i> I- <i>Sac</i> I fragment of pZnt124cbrb ; Km <sup>r</sup>	This study
pBRKcbrb	<i>Xba</i> I- <i>Sac</i> I fragment of pETcbrB in pBBR1-MCS2 ; Km <sup>r</sup>	This study

Table 2-3. 本研究で培地に加えた添加物

添加物	略称	終濃度	ストック濃度	溶媒
<b>炭素源・エネルギー源</b>				
Succinate	SUC	1 mg/ml	100 mg/ml	H <sub>2</sub> O
Anthranilate	AN	1 mg/ml	100 mg/ml	H <sub>2</sub> O
Carbazole	CAR	-	100 mg/ml	DMSO
<b>抗生物質</b>				
Ampicillin	Ap	100 µg/ml	100 mg/ml	H <sub>2</sub> O
Chloramphenicol	Cm	30 µg/ml	30 mg/ml	EtOH
Gentamicin	Gm	15 µg/ml	15 mg/ml	H <sub>2</sub> O
Kanamycin	Km	50 µg/ml	50 mg/ml	H <sub>2</sub> O
Tetracycline	Tc	62.5 µg/ml	62.5 mg/ml	50% EtOH
<b>ミネラル</b>				
FeCl <sub>3</sub> · 6 H <sub>2</sub> O	-	10 µg/ml	10 mg/ml	H <sub>2</sub> O
MgSO <sub>4</sub> · 7 H <sub>2</sub> O	-	200 µg/ml	200 mg/ml	H <sub>2</sub> O
CaCl <sub>2</sub> · 6 H <sub>2</sub> O	-	10 µg/ml	10 mg/ml	H <sub>2</sub> O
<b>その他</b>				
5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactoside	X-gal	20 µg/ml	20 mg/ml	DMF
Isopropyl β-D -1-thiogalactopyranoside	IPTG	-	0.1 M	H <sub>2</sub> O

Carbazole は LB 培地中では完全に溶けないため、正確な濃度を算出することは難しいが、不溶分も含めて 100 µg/ml となるように添加した。なお、カルバゾールの水溶解度は <0.1 g/100 ml である。

DMSO : dimethylsulfoxide, DMF : dimethylformamide

Table. 2-4. 本研究で使用したプライマーリスト (1/3)

Primer	Nucleotid sequence (5'→3')	Source or reference
<b>Plasmid construction for qRT-PCR standard curve</b>		
univ16S-F	ACACGGTCCAGACTCCTACG	Miyakoshi <i>et al.</i> (2007)
univ16S-R	TACTGCCCTTCCTCCCAACT	Miyakoshi <i>et al.</i> (2007)
Pf16S-F	GCATACGTCTACGGGAGAA	Takahashi <i>et al.</i> (2009)
Pf16S-R	CCTTGGTGAGCCATTACCTC	Takahashi <i>et al.</i> (2009)
anta-F	TGGAACAAGACCGAGATCAA	Miyakoshi <i>et al.</i> (2009)
anta-R	CGGAGACGTTGAAGAAGTCC	Miyakoshi <i>et al.</i> (2009)
antr-F2	TCAACAGCTACAGCCTCAGC	This study
antr-R2	GCCATTGATGGTCAGTTCCT	This study
cbrb-F2	GCTTCAGCATTGCCACTTTC	This study
cbrb-R2	CCCATTTTCATCGAGTCCAC	This study
crez-F	GAGGCGCAGCTAACTGATTC	This study
crez-R	TTGATCTGTGATCCAACCA	This study
PAcbrb-F	CTGATCGAATCCGAGCTGTT	This study
PAcbrb-R	GATCTCGCCTTCCTGCAATA	This study
PFcbrb-F	AGAAAGTCGATGTCCGGTTG	This study
PFcbrb-R	GATCACATGGAGGCGGTAGT	This study
luc-F	ACGATTTTGTGCCAGAGTCC	This study
luc-R	AGAATCTCACGCAGGCAGTT	This study
PAchrom-antr-F	GCTGATCAAGGGACTGATCC	This study
PAchrom-antr-R	GCCGGTAGTGCTTCAGGTAG	This study
<b>cbrB disruptant construction</b>		
cbrB-UpF	GTCGTGCGACTTCACCACCAAGGACCC	This study
cbrB-UpR-Gm	TCAGAGCGCTTTTGAAGCTAATTCGCTGACCTGGTACTGG	This study
cbrB-DnF-Gm	AGGAACCTCAAGATCCCAATTCGACCGAGACCGAACTGGC	This study
cbrB-DnR	GCAGCATGCCGTGCCAACTTTTC	This study
cbrB-check	GAAGAATTCTGATCAACCTGCTCTCC	This study
Gm-F	CGAATTAGCTTCAAAAGCGCTCTGA	This study
Gm-R	CGAATTGGGGATCTTGAAGTTCCT	This study
<b>reporter plasmid construction</b>		
ANTR-F-BamHI-280	GGATCCTCTGGGCAGGTAATACCCAA	This study
ANTR-F-BamHI-290	GGATCCCGCCGGCCGATCTGGGCAGG	This study
ANTR-F-BamHI-300	GGATCCGGGTAACACCCGCCGGCCGATCT	This study
ANTR-F-BamHI-310	GGATCCCGCCGGTGGGGTAACACC	This study
ANTR-F-BamHI-320	GGATCCACCGGTGCCGCCGGCCGGTG	This study
ANTR-F-BamHI-500	GGATCCACCGGTGCCGCCGGCCGGTG	2005年 甲斐修士論文
ANTR-R-HindIII	AAGCTTCCTTTAGGGGCACCCACGGCTGTTTG	2005年 甲斐修士論文
ANTR-R-HindIII-250	AAGCTTCCTTTAGGCTGTAGCTGTTGAGGTGT	This study

**Table 2-4. 本研究で使用したプライマーリスト (2/3)**

<b>Primer</b>	<b>Nucleotid sequence (5'→3')</b>	<b>Source or reference</b>
<b>reporter plasmid construction</b>		
ANTR-R-HindIII-500	AAGCTTCCTTTAGCAGACGCGCCGTTGACCGC	This study
ANTR-R-HindIII-750	AAGCTTCCTTTACGCCTCGATGTCCTCCAGGT	This study
ANTR-R-HindIII-Full	AAGCTTCCTTTATCAAAGCGACCGGTTGCGGC	This study
antR-Arg_11_Opal-F	GATGTGCATGTTTGAGACATTCGTA	This study
antR-Arg_11_Opal-R	TACGAATGTCTCAAACATGCACATC	This study
mut1-F	CCGCCGGCCGGTGG ATCGTAG CCCGCCGGCCGATC	This study
mut1-R	GATCGGCCGGCGGG CTACGAT CCACCGGCCGGCGG	This study
antRrpoNmut1-F	CGCGGCGCCCCACGCTTCATGAAGATTGCTGTTTGACC	This study
antRrpoNmut1-R	GGTCAAACAGCAATCTTCATGAAGCGTGGGGCGCCGCG	This study
deltaCA-F	TCAGAGCGCGTACAAAA TCAGTAGC ACAGCCGTGGGTGCCCCG	This study
deltaCA-R	CGGGGCACCCACGGCTGT GCTACTGA TTTTGTACGCGCTCTGA	This study
PA2511-F-BamHI-100	GGATCCTGCGGGGAGCCGGCCTTGCG	This study
PA2511-F-BamHI-130	GGATCCAGTCGGCGAACGCTATCCGGATAG	This study
PA2511-F-BamHI-150	GGATCCGGCGGACGCTTTGTCCGAAAG	This study
PA2511-F-BamHI-200	GGATCCCGGCCGGGGGCTCGCGGAGGGCTC	This study
PA2511-F-BamHI-300	GGATCC GCGTTGTGCTTATGGGTGACCCATTC	This study
PA2511-F-BamHI-400	GGATCC GAAGATGCCTTCCTCGGGACGGAAG	This study
PA2511-R-HindIII	AAGCTTCCTTTA GGTTCGGCACTCGACACGGCAAGG	This study
PAantRrpoNmut1-F	GGAGCCGGCCTTGCGCCTTCATATGCCTTGCAATTTGCG	This study
PAantRrpoNmut1-R	GCAAAATGCAAGGCATATGAAGGCGCAAGGCCGGCTCC	This study
<b>KT2440 CbrB expression</b>		
6xHis-PP4696-F(NdeI)	GAGATATACATATGCACCACCACCACCACATGCCGCACATTCTGATCGTGC	This study
13nt-cbrb-F	CATATG CACCACCACCACCACCAC TCGGCCCTGCGTCGCTGCTTGAGC	This study
124nt-cbrb-F	CATATG CACCACCACCACCACCAC CCAGCCGAGCCACGCGCCAGCAATG	This study
6xHis-PP4696-R(SacI)	GAGGAGCTCTTATTCGCTGGTAGCGTTGC	This study
ctPP4696-F(HindIII)	AAGCTT AAGGAGA TTGAATCAATGCCGCACATTCTGATCG	This study
ctPP4696-R(BamHI)	GGATCCTTA CAGGGCATTGTCGAGGATGTC	This study
<b>PAO1 CbrB expression</b>		
13nt-PA4726-F (NdeI)	CATATG CACCACCACCACCACCAC CGATCTGCATTGCGACGCTGCTGGAG	This study
PA4726-R(SacI)	GAGCTC TTACGAGTCGGCCGAGGCCCTGATTTAC	This study
<b>5' RACE primer</b>		
PA2511-5R-GSP	CTGCAACATCTCCTCCAGGACCTTGC	This study
PA2511-5R-nest	GTGGTGACATCGACTTCAGCACGTT	This study

**Table 2-4. 本研究で使用したプライマーリスト (3/3)**

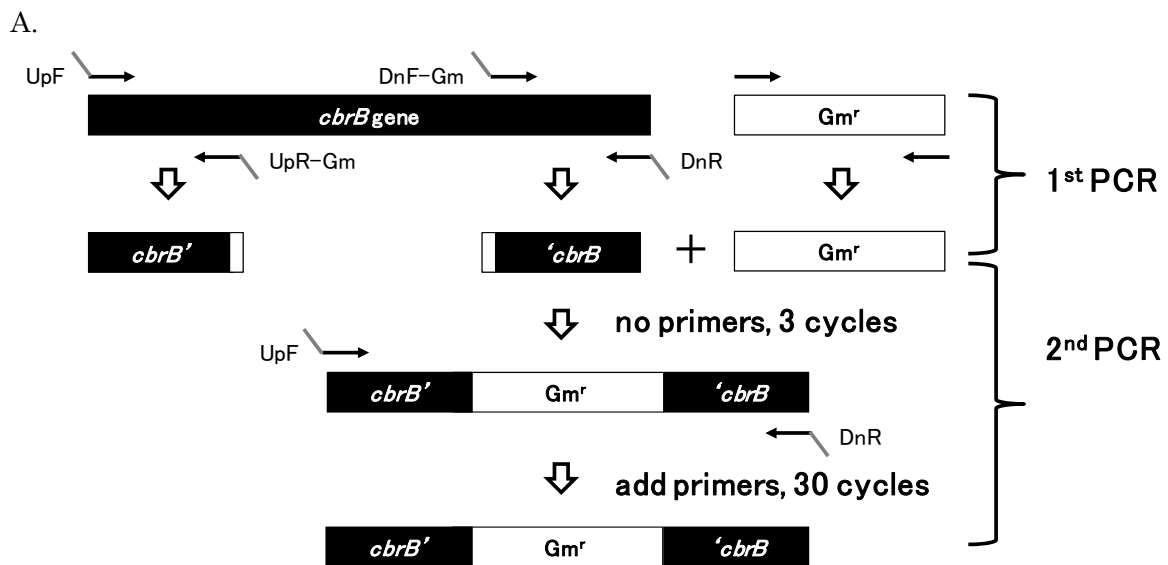
<b>Primer</b>	<b>Nucleotid sequence (5'→3')</b>	<b>Source or reference</b>
<b>gel shift assay probe</b>		
GS-P <sub>crez</sub> -F1	GTAACACCTCACCTCCCGTA	This study
GS-P <sub>crez</sub> -R1	AACTTTTCAAAACCCATTAA	This study
GS-P <sub>antR</sub> -F1	TTCTGGTAAACCGGTGCCGC	This study
GS-P <sub>antR</sub> -R1	ACAGTGGCGCTGCAAAAACGC	This study



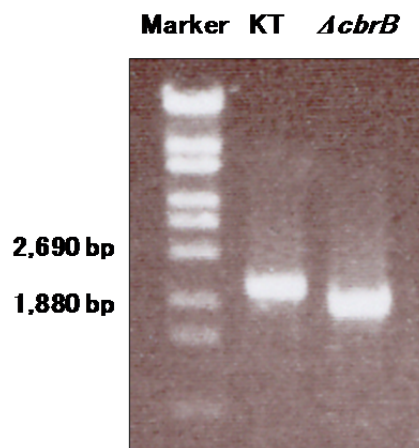
#### 2-2-4. *cbrB*の破壊

*cbrB* 遺伝子を相同性組換え (double crossover) により破壊するため、遺伝子破壊用プラスミド pK19*cbrB*::Gm を以下のように作製した。最初に Gm<sup>r</sup> cassette の両側に *cbrB* の 5'側及び 3'側の DNA 領域を持つ DNA 断片を 2段階の PCR により作製した (Fig. 2-1A)。1段階目の PCR において、部分的に Gm<sup>r</sup> cassette の配列を含む約 500 bp の *cbrB* の 5' - 及び 3'-領域を増幅した。この PCR では、テンプレートとして KT2440 株の total DNA、プライマーとして 5'-領域増幅用に *cbrB*-UpF 及び *cbrB*-UpR-Gm, 3'-領域増幅用に *cbrB*-DnF-Gm 及び *cbrB*-DnR を使用した。同時に Gm<sup>r</sup> cassette 増幅用のテンプレートとして pPS856(Hoang *et al.*, 1998), プライマーとして Gm-F 及び Gm-R (Table 2-4) を用いた PCR により Gm<sup>r</sup> cassette を増幅した。以上 3 個の PCR 産物を電気泳動し、ゲルから DNA 断片を抽出して精製した後、以下のように 2段階目の PCR を行うことで各 DNA 断片を結合した。最初に、50 µl 中に 50 ng の各 DNA 断片, 1.25 U の TaKaRa EX Taq, 1 × Ex Taq buffer, 0.25 mM dNTP を含む反応液を作製した。その後, 96°C, 2 min → (96°C, 30 s → 60°C, 30 s → 72°C, 2 min) × 3 サイクルの反応を行った。3 サイクル目終了後, 0.2 µM のプライマー-*cbrB*-UpF 及び *cbrB*-DnR を添加した。さらに (96°C, 30 s → 60°C, 30 s → 72°C, 2 min) × 25 サイクル → 72°C, 2 min の反応により PCR を完了した。その結果得られた目的の PCR 産物を電気泳動後、ゲルから抽出することで精製した。精製後の DNA 断片を suicide plasmid pK19mobsacB の *Sa*II - *Sph*I サイトにライゲーションした。

上記の方法で作製した pK19*cbrB*::Gm を保持する *E. coli* S17-1λpir の形質転換体を作製し、接合伝達により *P. putida* KT2440 に導入した。Gm 及び Cm を含む LB プレートで選択したコロニーの Km 感受性とスクロース耐性を調べた。該当するコロニーが得られなかったため、Gm を含む LB 液体培地にて 20 h 培養し、10%スクロース及び Gm を含む LB プレート上に塗布した。出現したコロニーから Km 感受性を示すものを選び、*cbrB*-UpF の上流に設計したプライマー-*cbrB*-check と *cbrB*-DnR を用いた PCR により *cbrB* の破壊を確認した (Fig. 2-1B)。得られた *cbrB*破壊株を Δ*cbrB*株と命名した。



B.



**Fig. 2-1. *P. putida* KT2440 における *cbrB* 遺伝子破壊株の作製**

(A) 2段階の PCR による遺伝子破壊用 DNA 断片の構築法の概念図

(B)  $Gm^r$  cassette 挿入による *cbrB* 遺伝子の破壊

*P. putida* KT2440 における、野生型株 (KT) 及び *cbrB* 破壊株 ( $\Delta cbrB$ ) の total DNA をもとに PCR を行い、 $\Delta cbrB$  において *cbrB* 遺伝子領域への  $Gm^r$  cassette の挿入を確認した。

### 2-2-5. RNA 抽出および定量 RT-PCR 解析

菌体からの全 RNA の調製は NucleoSpin®RNAII(Macherey-Nagel, Düren, Germany)を用いて行い, 操作は添付のプロトコルに従った. 抽出後の RNA サンプル中に含まれる DNA は RQ1 RNase-free DNase (Promega, Madison, WI)を用いて分解させた.

定量 RT-PCR は ABI PRISMTM 7700 Sequence Detection System (Applied Biosystems, Foster City, CA)を用いて行い, 反応試薬は QuantiTect SYBR Green RT-PCR kit (QIAGEN, Valencia, CA)を使用した. 操作は添付のプロトコルに従った. 解析対象の遺伝子については, 各 ORF 内で約 100 bp の DNA 断片が取得できるようにプライマーを設計した. それをもとに PCR で増幅した DNA 断片をクローニングベクター中に組み込むことで, 検量線を作成するためのベクターとし, 全 RNA 中における目的の遺伝子の RNA 量を測定する際に用いた.

### 2-2-6. エレクトロポレーション用のコンピテントセルの調製

*Pseudomonas* 属細菌および *Halomonas elongata* DSM2581, *Delftia tsuruhatensis* NBRC 16741 については, Itoh らの方法(Itoh *et al.*, 1994)をもとに, コンピテントセルを作製した. すなわち, 目的の菌株を 5 ml の LB 培地にて終夜培養した後, 回収前に氷上で 10 min 静置した. 2 ml の培養液から菌体を遠心 (12,000 rpm, 5 min, 4°C) により回収した. 0.5 ml のエレクトロポレーションバッファー (300 mM sucrose, 5 mM potassium dihydrogenphosphate) で 2 回洗浄した後, 0.5 ml の同バッファーに懸濁した. 作製したコンピテントセルは 100  $\mu$ l ずつ分注した後, 使用時まで -80°C で保存した.

*E. coli* K-12 株は 5 ml の LB 培地にて, OD 0.5 まで培養した後, 回収前に氷上で 10 min 静置した. 2 ml の培養液から菌体を遠心 (12,000 rpm, 5 min, 4°C) により回収した. 0.5 ml のエレクトロポレーションバッファー (10%グリセロール) で 2 回洗浄した後, 0.5 ml の同バッファーに懸濁した.

### 2-2-7. エレクトロポレーションによる形質転換

*Pseudomonas* 属細菌および *Halomonas elongata* DSM2581, *Delftia tsuruhatensis* NBRC 16741 については, 100  $\mu$ l の GENE PULSER II (Bio-Rad) および Gene Pulser Cuvette 0.1 cm (Bio-Rad) を用いてエレクトロポレーションを行った. 15 kV/cm, 25  $\mu$ F, 200  $\Omega$  の条件で形質転換を行った. *E. coli* K-12 は 25 kV/cm, 25  $\mu$ F, 200  $\Omega$  の条件で形質転換を行った.

### 2-2-8. レポータープラスミドの構築

プロモーターベクター pME4510 (Rist & Kertesz, 1998) の *Hind*III-*Sfi*I サイトに pSP-luc+NF (Promega) のルシフェラーゼ遺伝子 (*luc*) を含む *Hind*III-*Eco*RI 断片を挿入することにより pMEgluc を作製した. なお, *Eco*RI サイトは平滑末端処理を行った.

Table2-4 に示すプライマーセットと鋳型 *P. putida* (pCAR1) の total DNA を用いた PCR によって *antR* の ORF およびその上流域を増幅した。各 PCR 産物の塩基配列を確認した後、その領域を含む *Bam*HI-*Hind*III 断片を pMEG<sub>luc</sub> のクローニングサイトに挿入し、pMEG<sub>antR</sub> series のプラスミドを作製した。

#### 2-2-9. コハク酸あるいはアントラニル酸処理による誘導

PAO1 株もしくは KT2440 株の形質転換株を Luria 培地で一晩前培養した。CNF buffer (2.2 g/l Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.8 g/l KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) で洗浄した後、等量の CNF buffer に再懸濁した。その内 200 μl を終濃度 0.1% (w/v) のコハク酸アンモニウムを含む NMM4 培地 5 ml に植菌し、30°C で培養した。アントラニル酸誘導のためには、この培地にアントラニル酸ナトリウムを終濃度 0.1% (w/v) となるようにさらに添加した。

#### 2-2-10. レポーター解析

PAO1 もしくは KT2440 の形質転換株を各種条件で培養後、CNF buffer で 2 回洗浄した。菌体を sonication buffer [25 mM Tris-HCl (pH 8.0), 2 mM EDTA, 10% glycerol (v/v)] に懸濁し、Bioruptor (コスモバイオ, Tokyo, Japan) を用いて超音波破碎を行った。遠心 (15,000 rpm, 30 分, 4°C) により粗酵素抽出液を得た。タンパク質の定量は、プロテインアッセイキット (Bio-Rad) を用いて、bovine serum albumin (BSA) を標準タンパク質としたスタンダードアッセイ法により行った。粗酵素抽出液の濃度を 0.1 μg/μl となるように sonication buffer で希釈した後、10 μl を 96-wells microtiter plate に分注し、Centro LB960 (Berthold Technologies) を用いてタンパク質量 1 ng 当たりのルシフェラーゼ活性 relative light unit (RLU) を測定した。基質には Picagene LT7.5 (東洋インキ) を 10 μl 用いた。基質添加後の攪拌時間は 10 秒間、測定時間は攪拌終了後の 10 秒経過時とした。少なくとも 3 回測定した活性値の平均、標準偏差を算出した。

#### 2-2-11. CbrB の大量発現、精製

プラスミド pET<sub>cbrb</sub>, pET<sub>tnt13cbrb</sub>, pET<sub>tnt124cbrb</sub>, pET<sub>tnt13cbrbPA</sub> を保持する *E. coli* BL21(DE3) 株を 5 ml の LB 培地に植菌した。37°C で 3 時間培養した後、終濃度 0.2 μM の isopropyl-β-D-thiogalactoside (IPTG) を添加し更に 25°C で 15 時間培養した。集菌した菌体を sonication buffer に懸濁し、超音波破碎を行った。遠心 (15,000 rpm, 30 分, 4°C) により粗酵素抽出液を得た。得られた粗酵素抽出液から CbrB を MagneHis (Promega) によりビーズアフィニティー精製した。精製したタンパク質は SDS-PAGE により精製度を確認した。

#### 2-2-12. ゲルシフトアッセイ

ゲルシフトアッセイは DIG Gel Shift Kit 2<sup>nd</sup> generation (Roche Applied Science) を用いて、

付属の説明書に従って行った。CbrBの予想結合配列を含む *P<sub>creZ</sub>* プロモーターおよび *P<sub>antR</sub>* プロモーター領域のプローブは Table 2-4 に示したプライマーセットを用いた PCR により作製した DNA 断片を DIG-11-ddUTP により 3'末端ラベルすることにより作製した。0.04 ng/μl の DIG ラベルされたプローブ、1 μg/μl の poly-[d(I-C)], 0.1 μg/μl の poly-L-lysine, 及び各精製タンパク質を含む 20 μl の binding buffer (Roche Applied Science) 中で室温, 20 min 結合反応を行った。5 μl の loading buffer (kit 付属) を添加した後, 20 μl 分を 5% ポリアクリルアミドゲル及び TBE buffer (1 L あたり, 60.55 g Tris, 30 g Borate, 40 ml 0.5 M EDTA) を使用した電気泳動 (100 V, 45 min, 室温) に供した。泳動後ゲル中のプローブを Biotinylated DNA (Roche Applied System) に転写し, CSPD system (Roche Applied System) を用いて検出した。

### 2-2-13. RACE 解析

SMARTer RACE cDNA Amplification Kit (Clontech) のプロトコルに従って, キット付属のランダムプライマーを用いて 5' RACE cDNA を増幅した。なお, total RNA はアントラニル酸を添加 (0.1% w/v) した NMM-4 培地にて 1 時間培養した *P. aeruginosa* PAO1 より 2-2-4 の方法に基づき抽出した。5' RACE PCR は KOD Plus Neo polymerase を用いて 2-2-3 の方法に基づいて行うこととし, まずキット付属の UPM (10x Universal Primer A Mix) と PA2511-5R-GSP を用いて遺伝子断片を増幅した。そこで増幅した遺伝子断片をテンプレートとして, さらにキット付属の NUP (Nested Universal Primer) および PA2511-5R-nest を用いてシーケンス解析用の遺伝子断片を同様に KOD Plus Neo polymerase を用いて増幅した。PCR 条件は 98°C で 10 秒間, 65°C で 30 秒間, 68°C で 30 秒間のサイクルを適当なサイクル (35 サイクル) 行った。

### 2-2-14. ホモログ系統樹解析をはじめとする *in silico* 解析

系統樹解析には, MEGA5.1 (<http://www.megasoftware.net/>) を用いて解析を行った。解析に使用するホモログ候補は, Pseudomonas Genome Database (<http://www.pseudomonas.com/index.jsp>) あるいは NCBI BLAST サーチ (P BLAST) より取得し, 各因子に応じた query coverage 及び相同性の基準を満たすものを使用することとした。また, *P. resinovorans* CA10 のゲノムデータ (未公表) からも, ホモログ候補を取得し比較に用いた。

## 2-3. 結果と考察

### 2-3-1. モデル宿主 *Pseudomonas putida* KT2440 を中心とする解析

#### 2-3-1-1. スクリーニングに最適なレポータープラスミドの作製および検討

$\sigma^{54}$ -dependent activator は、一般に制御する転写単位の転写開始点上流 100 ~ 200 bp に結合し、転写を活性化する。そこで、*antR* のプロモーター領域（翻訳開始点から 500 bp 上流まで）と *luc* 遺伝子を結合させ、レポータープラスミドとして使う転写融合プラスミド pMEGantR-orf0 を作製した (Fig. 2-2A)。

作製したプラスミドの有効性を検証するため、*P. putida* KT2440 を用いて形質転換体を作製し、アントラニル酸処理によるルシフェラーゼの発現誘導を試みたが確認できなかった (Fig. 2-3A における一番上で示したバー)。これは当研究室で以前行われたアントラニル酸処理により *antR* の転写が誘導されるという結果 (Shintani *et al.*, 2011a) と一致しない。また、*P. aeruginosa* PAO1 染色体上にコードされている *antR* ホモログの転写制御については、正のオートレギュレーションが存在する可能性が報告されている (Kim *et al.*, 2012)。そこで *antR* の転写誘導には内部配列あるいはそこから発現する AntR タンパク質自身が必要と考え、*antR* のプロモーター領域に加えて ORF をそれぞれ 250 bp, 500 bp, 750 bp, 1017 bp (全長) 含むレポータープラスミドを作製し、同様にアントラニル酸処理を行いルシフェラーゼ活性の上昇について検討した。その結果、ORF 全長を含むレポータープラスミド pMEGantR-FL (Fig. 2-2B) において明瞭な発現誘導（コハク酸処理時と比較して約 3.3 倍）を観察することができた (Fig. 2-3A)。

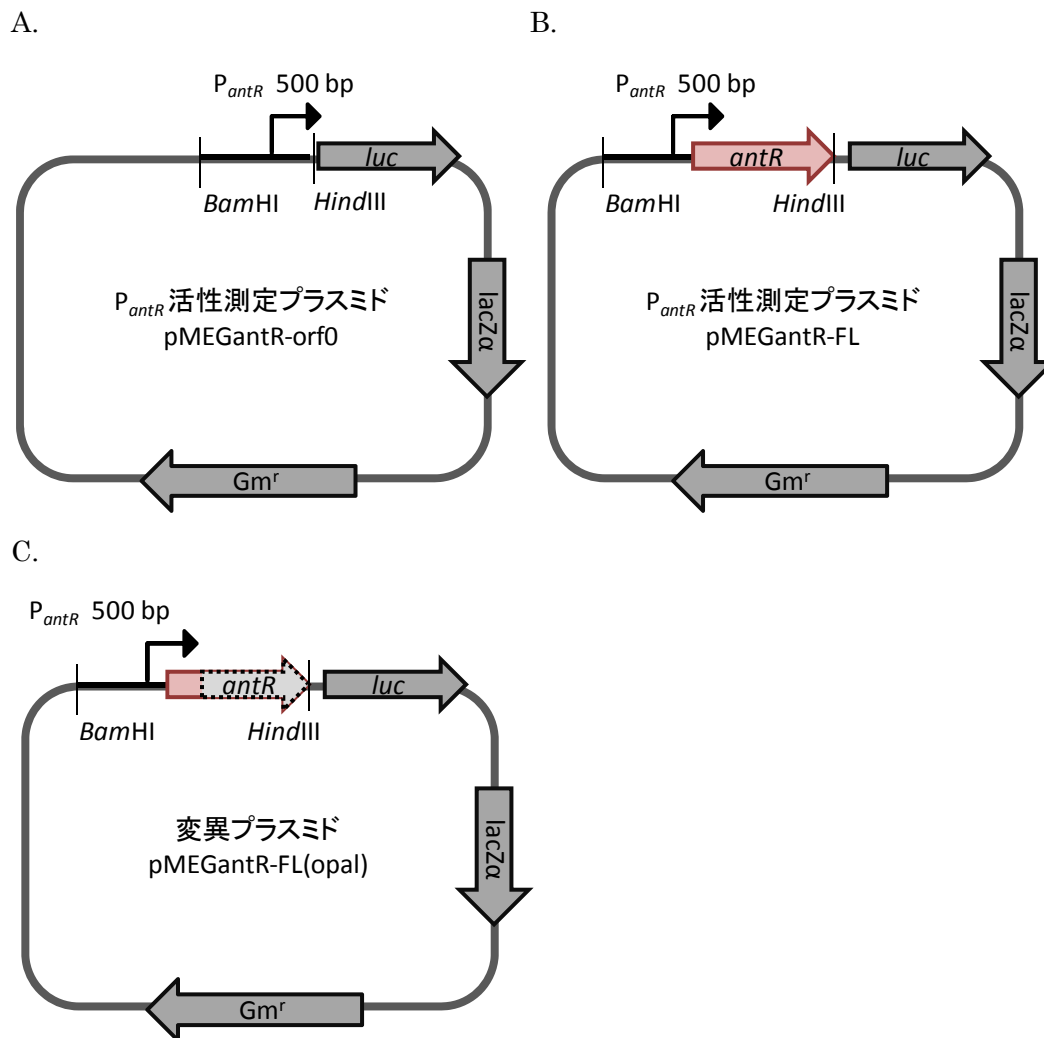
以上の結果から、pMEGantR-FL を導入した形質転換体は pCAR1 上 *antR* の転写状態を反映してレポーター遺伝子が発現していると考えられた。そのため、pMEGantR-FL を用いることで *antR* の転写誘導条件の解析やその転写制御を担う宿主染色体上因子のスクリーニング解析を効率的に行うことができると結論づけた。

また、その一方で、*P. putida* KT2440(pCAR1) を用いて各レポータープラスミドによる形質転換体を作製し、もう一つの誘導条件であるカルバゾール処理を行い、発現誘導を試みたところ、先ほどの結果と同様に ORF 全長を含むレポータープラスミドにて顕著な（コハク酸処理時と比較して 8.5 倍）発現が誘導され、pMEGantR-FL の有効性をさらに支持する結果を得ることができた (Fig. 2-3B)。

#### 2-3-1-2. オートレギュレーションによる転写活性化の検討

pCAR1 を保持しない KT2440 を用いた解析において *antR* の ORF 全長を含むプラスミドを用いることでルシフェラーゼの発現誘導が起きたことについて、ORF 内部の配列依存的な転写活性化によるものか、AntR タンパク質が翻訳されて機能した結果によるものかを確認することとした。そこで、*antR* の内部配列の一部に変異（終始コドン）を導入したレポータープラスミド pMEGantR-FL(opal) を作製し (Fig. 2-2C)、改めてルシフェラーゼ活

性を調べた。その結果、顕著に活性が低下したことから、配列依存的な活性化ではなく、発現した AntR によるオートレギュレーションの可能性が改めて示された。そのため、AntR を大量に発現するベクター pBRKantR (Miyakoshi *et al.*, 2007) を用いて、trans な発現系によりその機能について確認を行ったがルシフェラーゼ活性は上昇しなかった (Fig. 2-4)。しかし、pCAR1 を保持する *P. putida* KT2440 (KTPC) を用いて pCAR1 より AntR を供給することで、ルシフェラーゼの発現誘導を低活性ながら確認することができた (Fig. 2-5)。これは前述のレポータープラスミドの有効性を検討する際に、pCAR1 を保持する株において形質転換体を作製すると、pMEGantR-FL 以外のプラスミドをもつ形質転換体においてもカルバゾール依存的なルシフェラーゼの発現誘導を確認できており (Fig. 2-3B)、pCAR1 由来の AntR が作用することを裏付ける結果といえる。

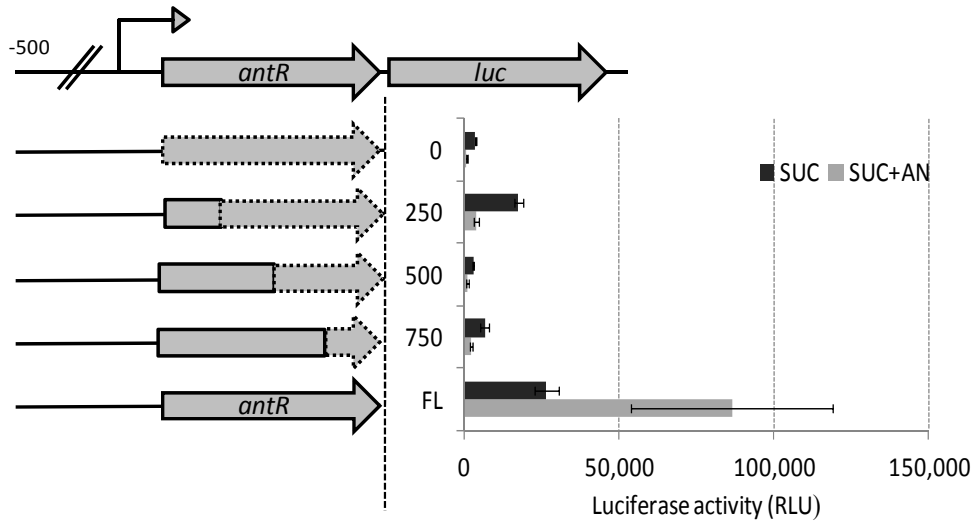


**Fig. 2-2. 作製したレポータープラスミドの構造**

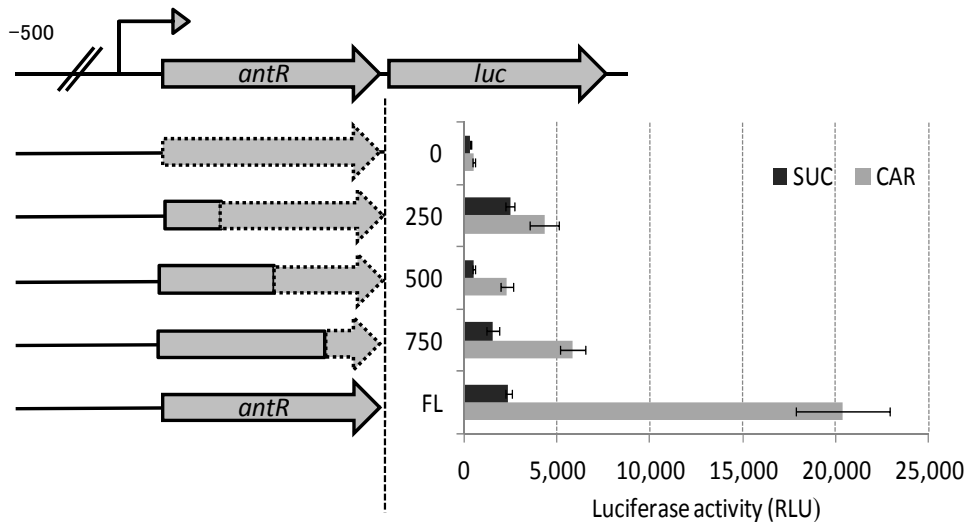
pMEG $luc$  を基本骨格とし,  $antR$  のプロモーター領域 500 bp あるいはそれにさらに ORF を含む DNA 断片を  $Bam$ HI –  $Hind$ III サイトを利用して挿入した. なお, ORF と  $luc$  遺伝子の間には人工的に ribosomal binding site を付加した. (A)  $antR$  の ORF を含まず, プロモーター領域 500 bp の下流にレポーター遺伝子をつないだレポータープラスミド, (B)  $antR$  の ORF を含み AntR が発現するレポータープラスミド, (C) ORF 内部に終始コドン (11 番目のアミノ酸を終始コドンに置換) が存在し, 翻訳が途中で止まるように設計した変異プラスミドをそれぞれ表す.



A.



B.



### Fig. 2-3. 発現解析用レポータープラスミドの検証

実線で示した *antR* の各 ORF 領域の下流に *luc* 遺伝子をつなげたレポータープラスミドをそれぞれ作製した. 図中の 0 と FL は *antR* の ORF 領域を全く含まないもの, 全長を含むものをそれぞれ表す. 250, 500, 750 は含まれている ORF 領域の ATG を基準とした塩基数を表す. エラーバーは 3 連の測定結果から算出した標準誤差を示す

- (A) *P. putida* KT2440 を用いて形質転換体を作製し, 非誘導条件としてコハク酸処理 (SUC) を, 誘導条件としてコハク酸に誘導物質であるアントラニル酸を培地に加え処理 (SUC+AN) を施した.
- (B) *P. putida* KT2440(pCAR1)を用いて, 誘導条件としてカルバゾール処理 (CAR) を行いルシフェラーゼの発現誘導を解析した.

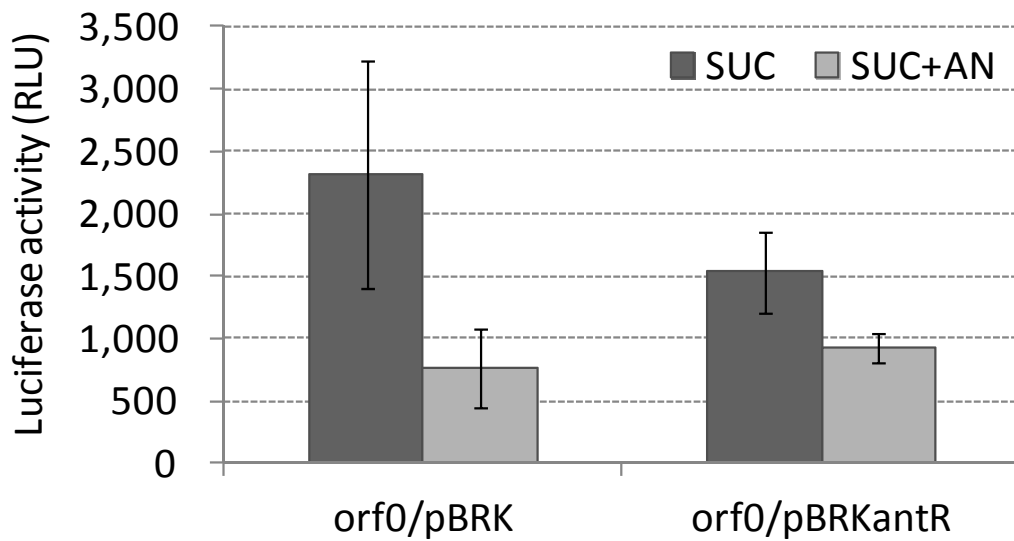


Fig. 2-4. trans な AntR の発現によるアントラニル酸誘導性獲得の検討

KT2440 に AntR を発現しないレポータープラスミド pMEGantR-orf0 を導入し、その後、ベクターコントロールとして pBRK あるいは AntR 発現プラスミド pBRKantR をさらに導入し、活性測定を行った。図中の orf0 は、pMEGantR-orf0 を保持することを表す。

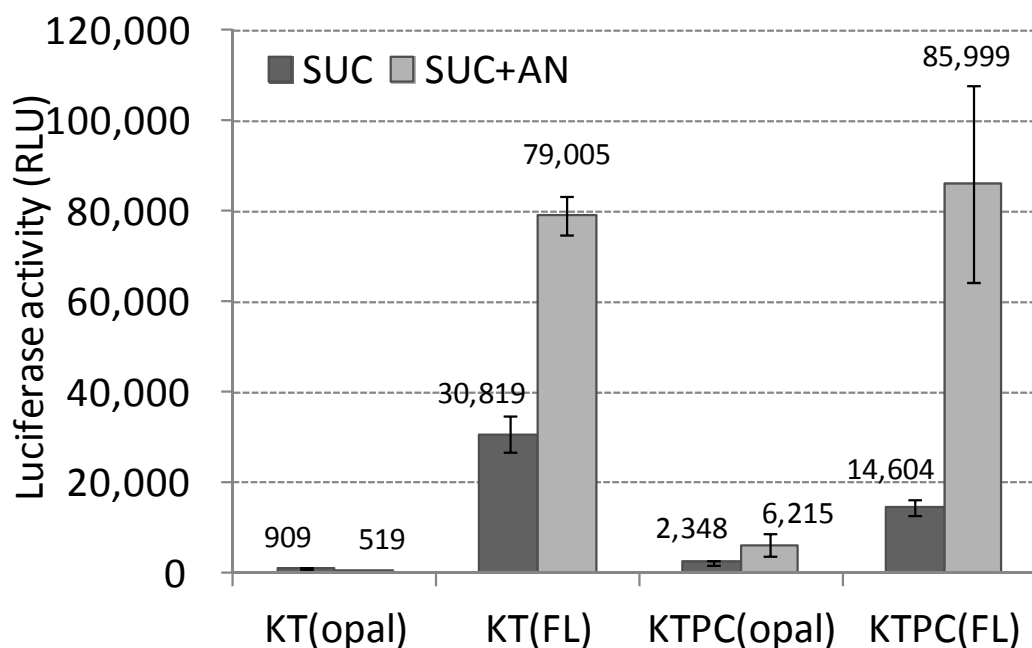


Fig. 2-5. 変異プラスミドを用いた場合のアントラニル酸誘導性の有無

*P. putida* KT2440 を KT と、pCAR1 の保持を PC と表記した。また、変異により AntR を発現しないレポータープラスミド pMEGantR-FL(opal) を opal とし、変異がなく AntR が発現する pMEGantR-FL を FL と表記した。エラーバーは少なくとも 3 連の測定結果から算出した標準誤差を示す。

### 2-3-1-3. PAO1 破壊株ライブラリーを用いた *antR* の転写活性化に必要な宿主因子の同定

これまで述べてきたように、pCAR1 上 *antR* の転写制御には宿主染色体因子が関与していると予想される。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  $\sigma^{54}$ -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 (Jacobs *et al.*, 2003)、本研究においてはまず *P. aeruginosa* PAO1 の 22 種類の  $\sigma^{54}$ -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。解析にあたっては前述のレポータープラスミド (Fig. 2-2B 参照) を用いて各種形質転換体を作製し、非誘導条件 (SUC) 及び誘導条件 (SUC + AN) における各株のルシフェラーゼ活性を比較検討した。非誘導条件は、優良な炭素源であるコハク酸による培養を行い、誘導条件はコハク酸に誘導物質であるアントラニル酸を加え培養をそれぞれ 3 h 行った。なお、誘導条件においてアントラニル酸は優良な炭素源ではないため、炭素飢餓状態になるのを防ぐべく、コハク酸も合わせて添加した。

その結果、誘導条件時における PA1663 破壊株、非誘導・誘導の両条件における *cbrB* (PA4726) 破壊株においてルシフェラーゼ活性が野生型株と比較して低下したことから (Fig. 2-6)、*antR* の転写を活性化する因子の候補として PA1663 と CbrB に着目した。そこで、再度実験を繰り返して 2 種類の破壊株の挙動を確かめたところ、PA1663 破壊株については誘導条件下でも野生型株と同程度のルシフェラーゼ活性を示したのに対して、*cbrB* 破壊株では両条件下で活性が再現性を伴って顕著に低下していた (Fig. 2-7)。

また、pCAR1 はこれまでに少なくとも 3 種の宿主 (*P. putida* KT2440, *P. aeruginosa* PAO1, *P. fluorescens* Pf0-1) にカルバゾール分解能を付与することから、各宿主染色体に存在する  $\sigma^{54}$ -dependent activator の中でも共通のホモログが存在するものが *antR* の制御に関与している可能性が高い。ここで上記の 3 宿主は全てゲノム情報が利用可能であることから、各株にコードされている  $\sigma^{54}$ -dependent activator のホモログについて *P. aeruginosa* PAO1 を基準に比較したところ、PAO1 がもつ 22 種類の内 16 種類が 3 宿主共通でホモログとして存在していた (Table 2-1)。その中で PA1663 は、KT2440 および Pf0-1 においてホモログが保存されていないこと及び再実験の結果と合わせて *antR* を転写活性化する因子ではないと結論づけた。その一方で、*cbrB* 遺伝子については当該 16 種の中に入っており、*antR* の転写に関与する因子として最も可能性の高い候補であると考えられた。

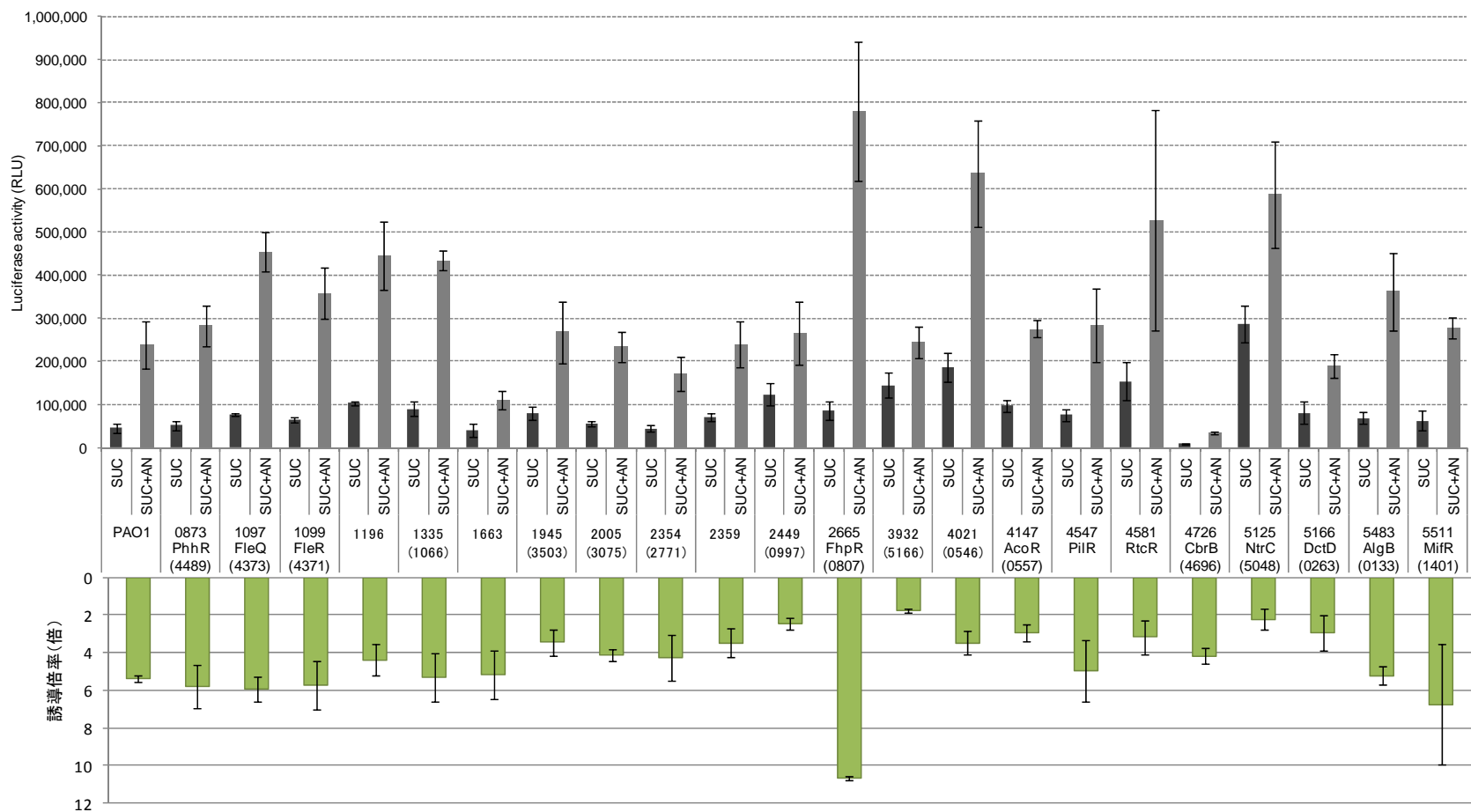
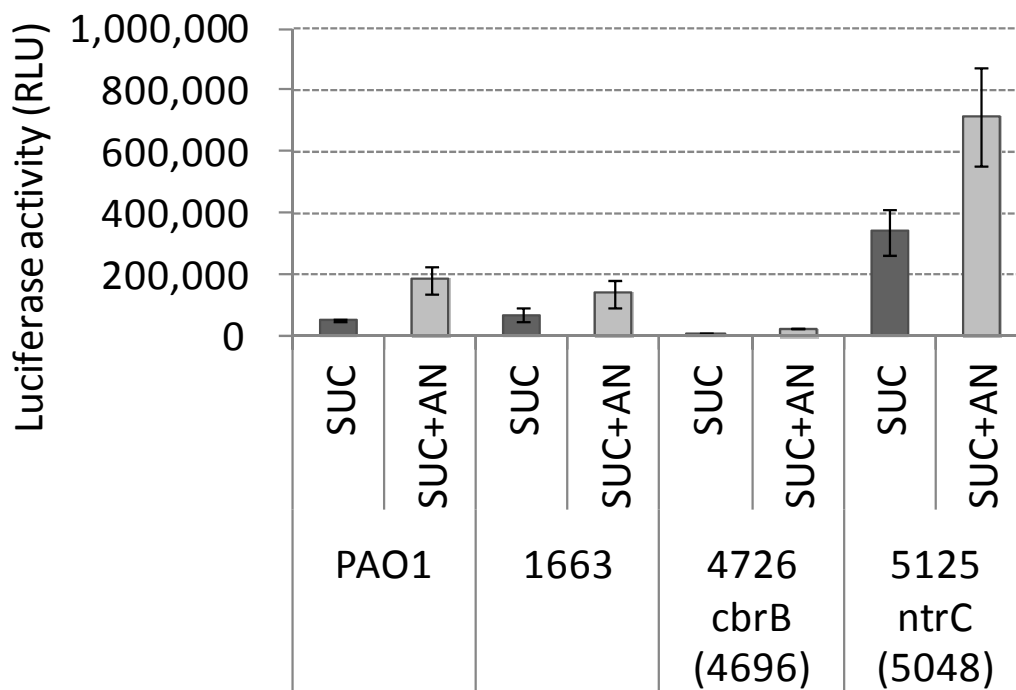


Fig. 2-6. PAO1における $\sigma^{54}$ -dependent activatorの破壊株22種類を用いたスクリーニング解析

野生型株の結果を一番左に示した。また、各破壊株は破壊された ORF の locus tag 番号で表記し、アノテーションされているものについては遺伝子名も併記した。カッコ内の数字は *P. putida* KT2440 におけるホモログの locus tag 番号を示す。グラフはコハク酸（黒色のバー）、コハク酸+アントラニル酸（灰色のバー）を炭素源として培養した各株のルシフェラーゼ活性を示した。エラーバーは3連の測定結果から算出した標準誤差を示す。



**Fig. 2-7.  $\sigma^{54}$ -dependent activator 破壊株を用いたスクリーニング結果の再現性確認**

野生型株の結果を一番左に示した。また、各破壊株は破壊された ORF の locus tag 番号で表記し、アノテーションされているものについては遺伝子名も併記した。カッコ内の数字は *P. putida* KT2440 におけるホモログの locus tag 番号を示す。グラフはコハク酸（黒色のバー）、コハク酸+アントラニル酸（灰色のバー）を炭素源として培養した各株のルシフェラーゼ活性を示した。エラーバーは3連の測定結果から算出した標準誤差を示す。

Table 2-1. pCAR1 のモデル宿主 3 種の染色体上に存在する  $\sigma^{54}$ -dependent activator のホモログ比較

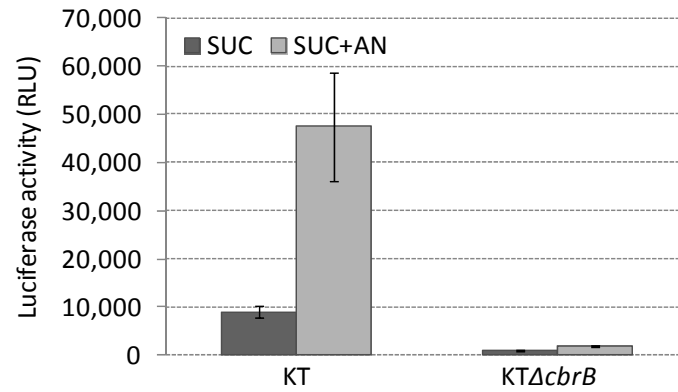
PAO1	KT2440	Pf0-1	Product Name	COG prediction
PA0873	PP_4489 (88%)	Pf01_1500 (90%)	PhhR	Transcriptional regulator of aromatic amino acids metabolism
PA1097	PP_4373 (84%)	Pf01_1532 (84%)	FleQ	Response regulator containing CheY-like receiver, AAA-type ATPase, and DNA-binding domains
PA1099	PP_4371 (75%)	Pf01_1534 (79%)	FleR	Response regulator containing CheY-like receiver, AAA-type ATPase, and DNA-binding domains
PA1196	- (-)	- (-)	probable transcriptional regulator	Transcriptional regulator containing PAS, AAA-type ATPase, and DNA-binding domains
PA1335	PP_1066 (82%)	Pf01_4540 (81%)	probable two-component response regulator	Response regulator containing CheY-like receiver, AAA-type ATPase, and DNA-binding domains
PA1663	- (-)	- (-)	probable transcriptional regulator	Transcriptional regulator containing GAF, AAA-type ATPase, and DNA binding domains
PA1945	PP_3503 (76%)	Pf01_012592 (79%)	probable transcriptional regulator	Response regulator containing CheY-like receiver, AAA-type ATPase, and DNA-binding domains
PA2005	PP_3075 (74%)	Pf01_3077 (72%)	probable transcriptional regulator	Transcriptional regulator containing PAS, AAA-type ATPase, and DNA-binding domains
PA2354	PP_2771 (79%)	Pf01_3918 (80%)	probable transcriptional regulator	Transcriptional regulator containing PAS, AAA-type ATPase, and DNA-binding domains
PA2359	- (-)	- (-)	probable transcriptional regulator	Transcriptional regulators containing an AAA-type ATPase domain and a DNA-binding domain
PA2449	PP_0997 (79%)	Pf01_4390 (83%)	probable transcriptional regulator	Transcriptional regulator of aromatic amino acids metabolism
PA2665	PP_0807 (73%)	Pf01_4653 (70%)	FhpR	Transcriptional regulator containing GAF, AAA-type ATPase, and DNA binding domains
PA3932	PP_5166 (69%)	Pf01_0222 (68%)	probable transcriptional regulator	Transcriptional regulators containing an AAA-type ATPase domain and a DNA-binding domain
PA4021	PP_0546 (65%)	Pf01_4988 (72%)	probable transcriptional regulator	Transcriptional activator of acetoin/glycerol metabolism
PA4147	PP_0557 (74%)	- (-)	AcoR	Transcriptional activator of acetoin/glycerol metabolism
PA4547	- (-)	Pf01_4840 (80%)	PilR	Response regulator containing CheY-like receiver, AAA-type ATPase, and DNA-binding domains
PA4581	- (-)	Pf01_1944 (82%)	RtcR	Sigma54-dependent transcription regulator containing an AAA-type ATPase domain and a DNA-binding domain
PA4726	PP_4696 (84%)	Pf01_4808 (84%)	CbrB	Response regulator containing CheY-like receiver, AAA-type ATPase, and DNA-binding domains
PA5125	PP_5048 (92%)	Pf01_0339 (93%)	NtrC	Response regulator containing CheY-like receiver, AAA-type ATPase, and DNA-binding domains
PA5166	PP_0263 (75%)	Pf01_0287 (76%)	DctD	Response regulator containing CheY-like receiver, AAA-type ATPase, and DNA-binding domains
PA5483	PP_0133 (83%)	Pf01_0046 (84%)	AlgB	Response regulator containing CheY-like receiver, AAA-type ATPase, and DNA-binding domains
PA5511	PP_1401 (75%)	Pf01_4458 (75%)	MifR	Response regulator containing CheY-like receiver, AAA-type ATPase, and DNA-binding domains

各遺伝子は locus tag 番号をもとに示した。3 種共通でホモログが存在するものを灰色の網かけで表す。また、各ホモログが存在するものには PAO1 との相同性をカッコ内に示した。

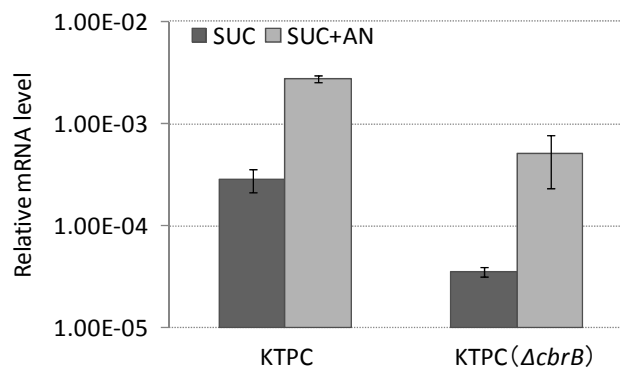
#### 2-3-1-4. KT2440 における *cbrB*破壊株を用いた *antR*の転写活性化能の検討

ここまで、PAO1 における *antR* の転写活性化には *cbrB* が関与する可能性が高いことが示された。そこで *P. putida* KT2440 の *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 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 (Fig. 2-8A)。また、pCAR1 を保持する KT2440 の *cbrB* 破壊株を用いて、pCAR1 上の *antR* 転写量について定量 RT-PCR を用いて測定したところ、野生型株と比較して *cbrB* 破壊株では *antR* の転写量が減少していた (Fig. 2-8B)。さらに、その破壊株に相補プラスミド pBRKcbrb を導入することにより CbrB を相補したところ、ルシフェラーゼ活性が回復するのを確認できた (Fig. 2-8C)。以上から、少なくとも PAO1 および KT2440 においては *cbrB* が共通で *antR* の転写活性化に関与する宿主因子であると判断した。さらに、解読されたゲノム情報から *Pseudomonas* 属においてゲノム既知の 10 種 34 株は全て *cbrB* 相同遺伝子を持っていることが分かった。そして、それらのアミノ酸配列は全てにおいて 80% 以上の identity を有しており、実際にその配列を 7 種の株で比較したところ、リンカー部分以外の重要なドメインが非常に高い保存性を示したことから (Fig. 2-9)、*Pseudomonas* 属共通で CbrB が *antR* の転写活性化に関与していると結論付けた。

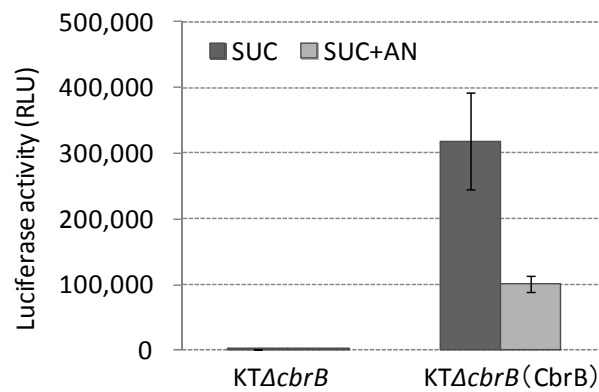
A.



B.



C.



**Fig. 2-8. *P. putida* KT2440 における *cbrB* 破壊株のレポーター解析**

グラフはコハク酸（黒色のバー）、コハク酸+アントラニル酸（灰色のバー）を炭素源として培養した KT2440 のルシフェラーゼ活性を示した。エラーバーは3連の測定結果から算出した標準誤差を示す。(A) KT2440 の野生型株 (KT) および改めて作製した *cbrB* 破壊株(KTΔ*cbrB*)における各ルシフェラーゼ活性を示した。(B) pCAR1 を保持する KT2440(KTPC)あるいはその *cbrB*破壊株(KTPC)を用いた定量 RT-PCR による pCAR1 上 *antR*遺伝子の転写量の解析結果。(C) *cbrB*破壊株に対して相補プラスミド pBRKcbrb を導入し、CbrB の大量発現の影響を解析した結果。



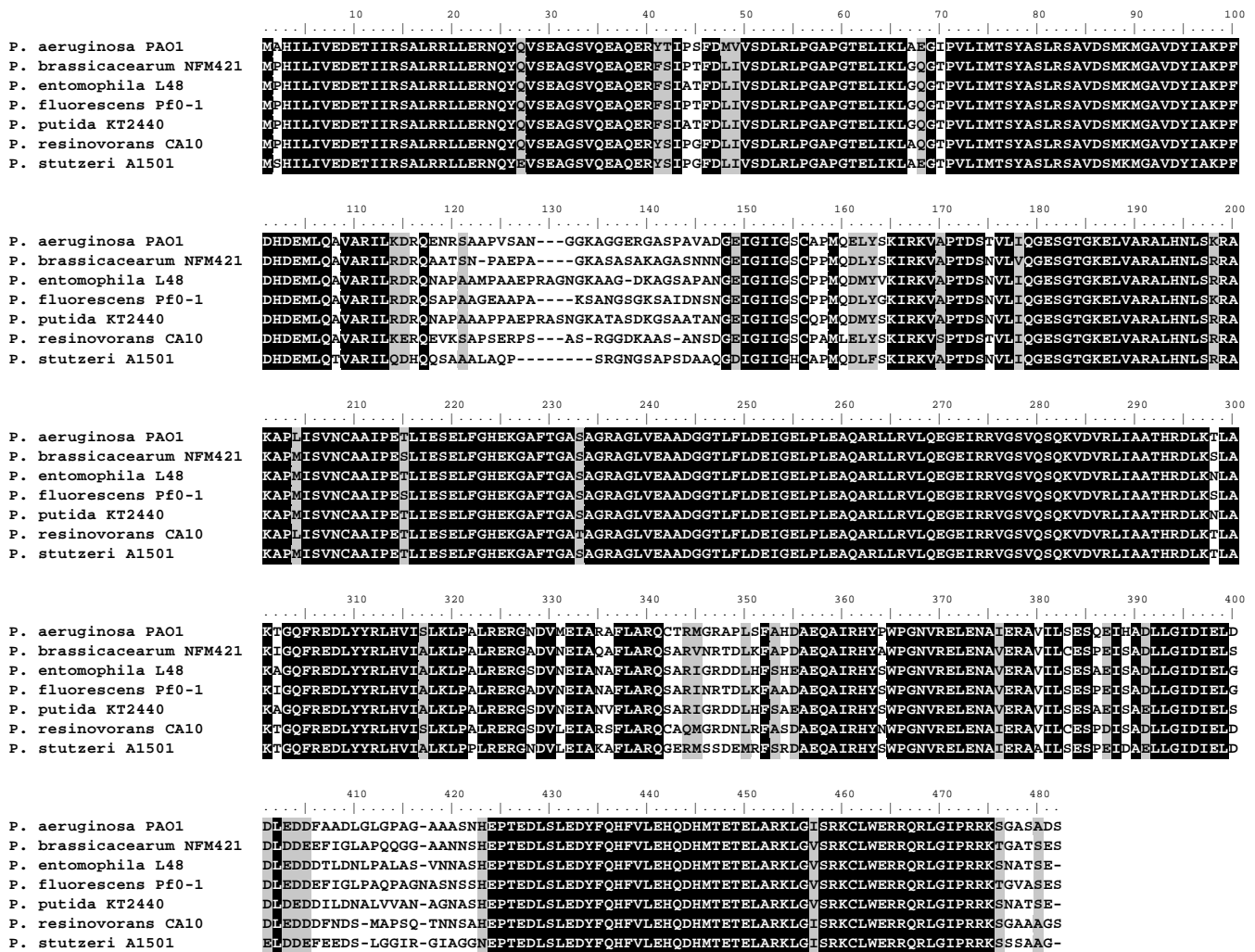


Fig. 2-9. *Pseudomonas* 属 7 種がもつ CbrB ホモログのアミノ酸配列の同源性比較

ClustalW を用いて、CbrB ホモログのアミノ酸配列の同源性について比較した。7 種全てで保存されたアミノ酸残基は黒色の網かけにした。また、類似した性質のアミノ酸で保存されている場合は灰色の網かけとした。

### 2-3-1-5. $P_{antR}$ プロモーターの炭素飢餓条件および窒素飢餓条件による誘導の検討

CbrB は CbrA-CbrB 二成分制御系の response regulator を構成する因子であり、2001 年に *P. aeruginosa* PAO1 において発見され、細胞内の炭素源と窒素源のバランス (C : N ratio) をモニターするシグナル伝達系であると予想されている (Nishijyo *et al.*, 2001). そこで、本研究では *P. putida* KT2440 を用いて炭素源と窒素源のどちらか一方を加えない無機液体培地と、両方を共に加えない培地にて 1 h 培養した場合に、これまで同様にレポーター解析によりルシフェラーゼ活性が変化するかを検証した。その結果、培地に炭素源が存在しない場合においてルシフェラーゼ活性が上昇した (Fig. 2-10A)。また、*cbrB* 破壊株においてアントラニル酸による誘導は PAO1 と同様に起きるが、炭素飢餓による応答が起きなくなることが明らかになった (Fig. 2-10B)。さらに、アントラニル酸による発現誘導と異なり、炭素飢餓状態における誘導性については培養時間の経過とともにコハク酸処理と比較して顕著な差がなくなる傾向にあり、誘導処理後 5 時間の時点においてはほぼ同等の活性となることから (Fig. 2-10C)、その誘導性は一過的なものであると考えている。

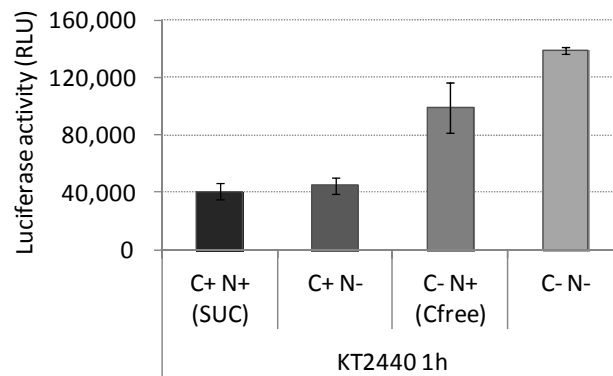
以上の結果から、アントラニル酸の存在以外に炭素飢餓条件によっても *antR* の転写が活性化されることが示された。特に、炭素飢餓は CbrA-CbrB 二成分制御系を介して一過的に *antR* の転写を活性化することが示唆された。

### 2-3-1-6. *antR* の転写活性化に必要なシス配列の同定

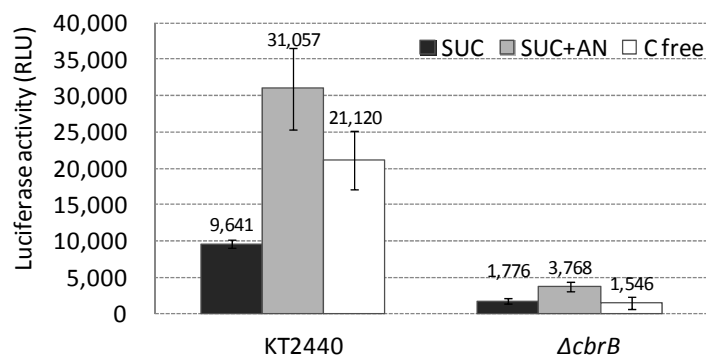
$\sigma^{54}$ -dependent activator は多くの場合、転写開始点上流に存在するエンハンサー結合領域に結合することが知られている。そこで、CbrB の  $P_{antR}$  プロモーターにおける結合領域を同定するためにレポーター解析を行った。解析にあたっては、*antR* 転写開始点の上流 445 bp を含む pMEGantR-FL を基準として、5'領域をさらに短く削った DNA 断片を用いてレポーター解析を行った。その結果、*antR* 転写開始点の上流 255 bp、245 bp の DNA 断片ではアントラニル酸添加・非添加に関わらず構成的なルシフェラーゼの発現が検出されたが、235 bp の断片においては顕著に発現量が減少した (Fig. 2-11A)。

転写開始に必要と予想された領域周辺には、CbrB の結合コンセンサス配列と一部一致する配列が存在し (Fig. 2-11B)、 $\sigma^{54}$  結合配列が変異するとルシフェラーゼ活性が低下することも観察された (Fig. 2-11A における一番下のバー)。以上の結果から、当該領域に CbrB が結合することが予想された。

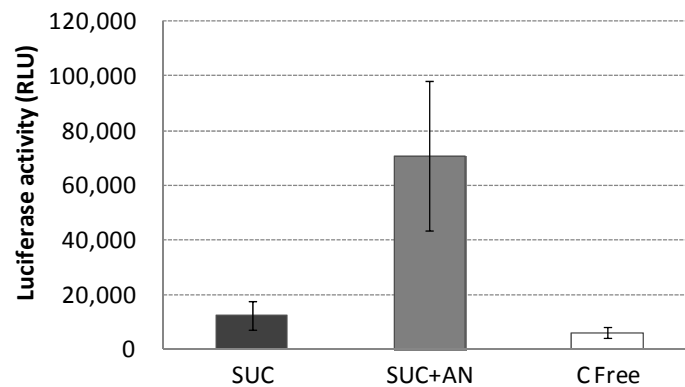
A.



B.



C.



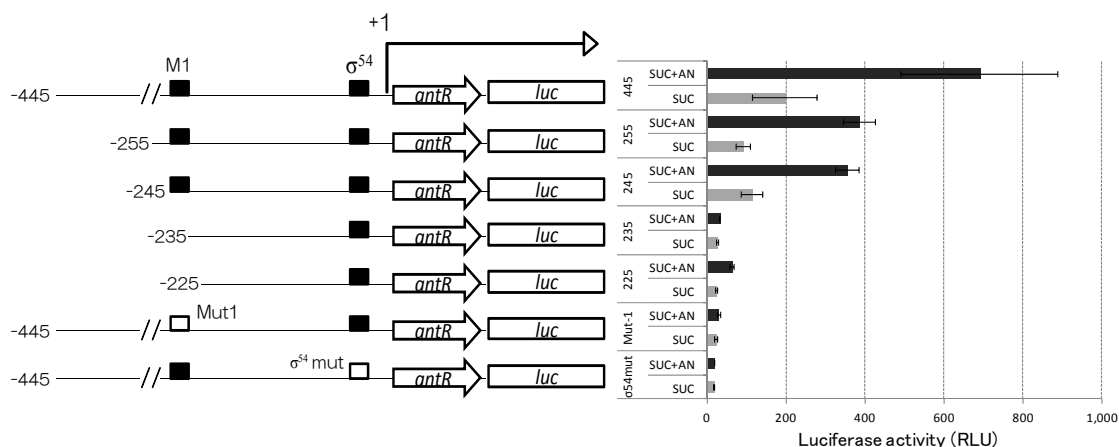
**Fig. 2-10. *P<sub>antR</sub>* プロモーターの活性化条件の検討**

(A) 炭素源はコハク酸，窒素源は硝酸アンモニウムを用いて，炭素源の有無（C±）及び窒素源の有無（N±）の各条件についてのルシフェラーゼ活性を調べた結果を表す．炭素源と窒素源を含む培地はこれまで用いてきた SUC 処理に相当する．

(B) グラフはコハク酸（黒色のバー），コハク酸+アントラニル酸（灰色のバー），炭素源無し（白色のバー）処理を行い 1 h 培養した KT2440 形質転換体のルシフェラーゼ活性を表す．エラーバーは 3 連の測定結果から算出した標準誤差を示す．

(C) KT2440 の形質転換体を各誘導条件下において 5 h 培養した時のルシフェラーゼ活性を示す．

A.



B.

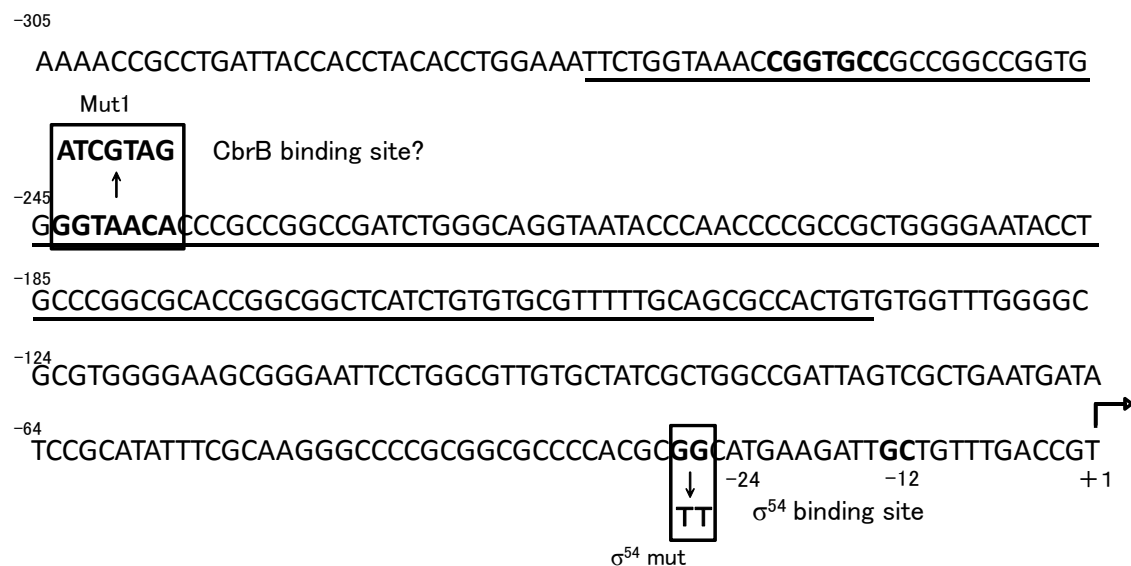


Fig. 2-11. *antR* 転写開始点上流域の 5'-deletion 解析.

(A) グラフはコハク酸+アントラニル酸 (黒色のバー) またはコハク酸 (灰色のバー) を炭素源として培養した KT2440 のルシフェラーゼ活性を示した. *antR* 転写開始点の位置をグラフの上側に示した. *luc* の上流に結合させた DNA 領域をグラフの左側に示した. また, 転写開始に重要な  $\sigma^{54}$  結合サイトおよび CbrB 予想結合サイトを黒い四角 (図中の  $\sigma^{54}$  あるいは M1) で示し, 変異を導入した場合は白い四角 (同  $\sigma^{54}$  mut あるいは Mut1) で示した. エラーバーは 3 連の測定結果から算出した標準誤差を示す.

(B) *antR* 転写開始点の上流配列. 転写開始点を +1 とし, 上流約 300 bp までを図示した. -240 bp から -260 bp 上流付近に存在する CbrB の予想結合サイトおよび既に明らかになっている  $\sigma^{54}$  結合サイトを太字で示した. 変異を導入した塩基を枠で囲み, 置換後の塩基とともに示した. さらに, 後述のゲルシフトアッセイに用いるプローブがカバーする領域には下線をつけて表した.

### 2-3-1-7. CbrB の発現精製系構築とゲルシフトアッセイによる解析

CbrB はそのアミノ酸配列から NtrC ファミリーに属する response regulator であり, PAO1 において small RNA *crcZ* のプロモーター領域に結合し, 転写を正に制御する (Sonnleitner *et al.*, 2009) (Fig. 2-12). 本研究では KT2440 由来の CbrB を用いて  $P_{antR}$  プロモーターへの結合を確認するゲルシフトアッセイを行うため, その発現精製系を構築することとした. そこで, KT2440 由来の His タグ融合 CbrB 発現プラスミドを作製するため, pET-26b(+) をベースとしたプラスミド pETcbrb を構築した (Fig. 2-13A), それを用いて大腸菌の形質転換体を IPTG 濃度 0.2 mM, 培養温度 25°C, 培養時間 12 h で発現させ (以後, 各 CbrB の発現条件はこの条件を適用した), ビーズ精製キット MagneHis (Promega) によりゲルシフトアッセイに供するために必要な量の目的タンパク質を得た (Fig. 2-14A). そして, 精製タンパク質を *crcZ* あるいは *antR* のプロモーター領域でかつ CbrB の予想結合サイトを含む領域をカバーするプローブと反応させゲルシフトアッセイを行ったが, バンドのシフトは観察されなかった (Fig. 2-14B 左, C). ただし Abdou らの研究から, PAO1 由来の精製 CbrB を用いたゲルシフトアッセイにおいても  $P_{crcZ}$  プロモーターへの DNA 結合能を確認できないことが言及されており (Abdou *et al.*, 2011), 今回の結果はそのことと一致している. その一方で, PAO1 由来の CbrB において N 末端の一部 (13 アミノ酸) を欠失させると DNA 結合能が上昇し, ゲルシフトアッセイにより  $P_{crcZ}$  プロモーターへ結合することが同じく示されている (Abdou *et al.*, 2011). 詳細なメカニズムは不明なままであるが, これは N 末端にある regulatory domain が C 末端の DNA binding domain の制御に関与するからではないかと予想されている.

そこで *Pseudomonas* 属細菌における各 CbrB 間のアミノ酸保存性の高さから, KT2440 の CbrB においても N 末端の一部のアミノ酸を欠失することで DNA への結合能が増すと考え, N 末端の 13 アミノ酸あるいは 124 アミノ酸を欠失した His タグ融合 CbrB (nt13CbrB 及び nt124CbrB) の発現系を構築することとした (Fig. 2-13B).

nt13CbrB については PAO1 と同等の truncated CbrB を作製することで DNA 結合能の上昇を見込んで作製した. ところで, トルエン分解遺伝子の転写活性化を担う XylR をはじめとして, regulatory domain がエフェクター非存在下では隣接するドメインの活性中心を覆い隠すことで機能を阻害する機構がこれまでに報告されている (Gu *et al.*, 1994; Perez-Martin & De Lorenzo, 1995) (Fig. 2-15A). これをもとに CbrB における regulatory domain の機能を推察すると, XylR と同様に非活性化状態では DNA binding domain の特に HTH motif 部分を覆い隠すことで自身の DNA 結合能を阻害しているのではないかと考えられた. PAO1 における CbrB において 13 アミノ酸欠失すると DNA 結合能が上昇する仮説の 1 つとして, DNA binding domain を阻害するために重要な残基が N 末端に最も近い領域に存在しており, それが欠失することで阻害が起きなくなることが予想される. また, その仮説が正しいとすれば, regulatory domain 全体を欠失させたとしても nt13CbrB と同じように DNA 結合能が上昇するのではないかと考え, regulatory domain に相当する

124 アミノ酸を欠失させた nt124CbrB についても発現系を構築することとした。

nt13CbrB については目的のタンパク質が不溶性画分に移行してしまいが (Fig. 2-14A 右), nt124CbrB は可溶性タンパク質として発現させることに成功し (Fig. 2-14A 左)、目的の精製タンパク質を得ることができた。得られた精製タンパク質を用いて再度ゲルシフトアッセイを試みたが、バンドのシフトは見られなかった (Fig. 2-14B)。

そこで現在は、DNA 結合能の上昇がすでにゲルシフトアッセイで証明されている PAO1 における 13 アミノ酸欠失した CbrB (nt13CbrB<sub>PA</sub>) の発現精製系を構築し、目的タンパク質を得ようと試みているところである。それにより、P<sub>antR</sub> プロモーターへ CbrB が結合する可能性についてより詳細に検討できると考えている。

### 2-3-1-8. CbrB の活性制御機構についての考察

本研究においては、regulatory domain を欠失させた CbrB において結合能の上昇を確認しようと試みたが、native form と同じく顕著な上昇能は認められなかった。これは一様に regulatory domain の有無が DNA binding domain を単純に阻害するのではなく、response regulator であるが故にリン酸化に伴うコンフォメーションの変化が DNA 結合能の上昇に寄与していることが仮説として考えられる (Fig. 2-15B)。つまり、regulatory domain 内のリン酸化シグナルを受容する 52 番目のアスパラギン酸残基の存在が重要であり、それを欠失させたことで、本研究においては目的とする結果が得られなくなったのではないかと考えている。今後、アスパラギン酸のリン酸化による影響についてはアミノ酸置換体を用いることなどで詳細が明らかになると期待される。その一方で、52 番目のアスパラギン酸を失わないように N 末端のアミノ酸を欠失させることが、結合能が上昇した truncated CbrB 作製に必要ではないかと推測される。

### 2-3-1-9. small RNA CrcZ による antR の翻訳制御の検討

*P. aeruginosa* PAO1 における解析から、global regulator である small RNA *crcZ* が CbrB によって制御されることは既述の通りである (Sonnleitner *et al.*, 2009)。CrcZ は Crc による翻訳阻害を解除して、結果的に下流の遺伝子の翻訳を正に制御している (Fig. 2-12 参照)。Crc は RNA 結合タンパク質であり、CA motif と呼ばれる配列をもつ mRNA に選択的に結合し翻訳を阻害する。ここで、*antR* の開始コドン近傍にも予想 CA motif が存在していることから (Fig. 2-16A)、CbrB は既述の直接的な転写活性化以外に、*crcZ* を介して翻訳制御という形で間接的に AntR タンパク質の発現量を制御している可能性が考えられた。そこで、*antR* がもつ予想 CA motif の機能を調べるために、motif を構成している各塩基を置換し、pCAR1 を保持する *P. putida* KT2440 を用いてレポーター解析によりその影響を検討した。予想 CA motif に変異が入ったレポータープラスミド pMEGdeltaCA を用いて作製した形質転換体では、ルシフェラーゼ活性の上昇がみられた (Fig. 2-16B)。このことから、*antR* のプロモーター領域において変異を導入した領域が CA motif としての機能をもつ可

能性が示された。また、Crc を大量発現させるとルシフェラーゼの活性が相対的に低下すること (Fig. 2-16C) は、*antR* のプロモーター活性が Crc の影響を受ける可能性を示すものであり、CbrB-CrcZ-Crc の一連のシグナル伝達機構によって *antR* の翻訳段階が制御されていることを示唆するものである。

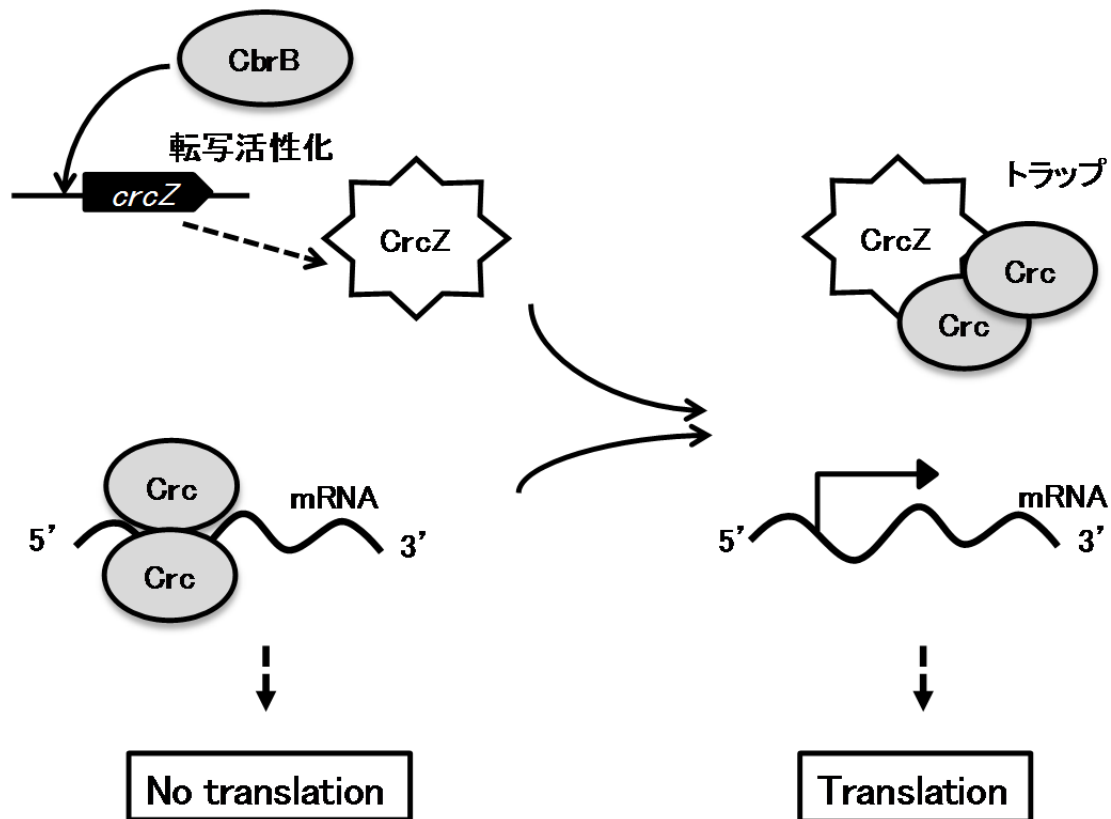
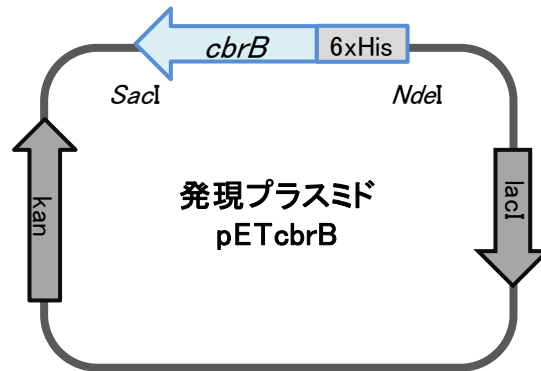


Fig. 2-12 . CbrB-CrcZ-Crc システムによる翻訳阻害の解除機構

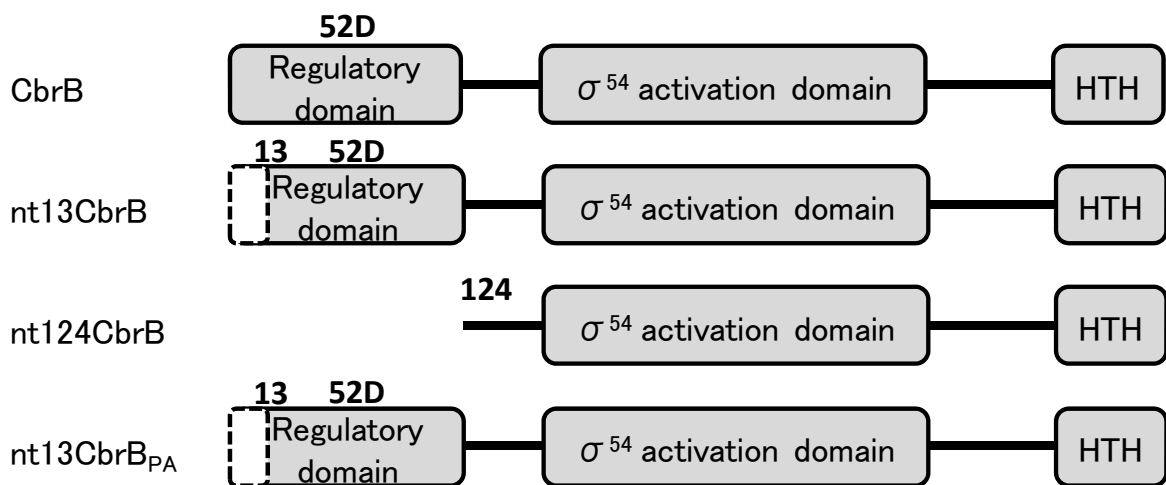
CbrB は small RNA *crcZ* のプロモーター領域に結合し、転写活性化を行う。転写された CrcZ は CA motif を介して Crc をトラップすることができる。Crc は RNA 結合タンパク質であり、目的遺伝子 mRNA における翻訳開始点付近の CA motif に結合する。small RNA CrcZ により Crc がトラップされることで、目的遺伝子の翻訳阻害が解除される。そのため、CbrB は結果として間接的に特定の遺伝子の発現を正に制御する。



A.



B.



**Fig. 2-13 . KT2440 あるいは PAO1 由来の CbrB の発現系構築**

(A) pET26b-(+)を用いた CbrB 発現プラスミドのコンストラクト. 各 CbrB の N 末端には, 精製を行うためにそれぞれ His タグを付加した. また, *NdeI*-*SacI* サイトを用いて pET26b-(+) へ目的のインサートを組み込んだ.

(B) CbrB 全長のアミノ酸配列における各 domain を模式的に表したもの. 構築した各発現プラスミドから発現する目的のタンパク質に含まれる領域をそれぞれ示した. 52D は response regulator のリン酸化に重要と考えられる. 52 番目のアスパラギン酸の位置を表す. また, 図中に表記した各タンパク質の詳細は以下の通りである.

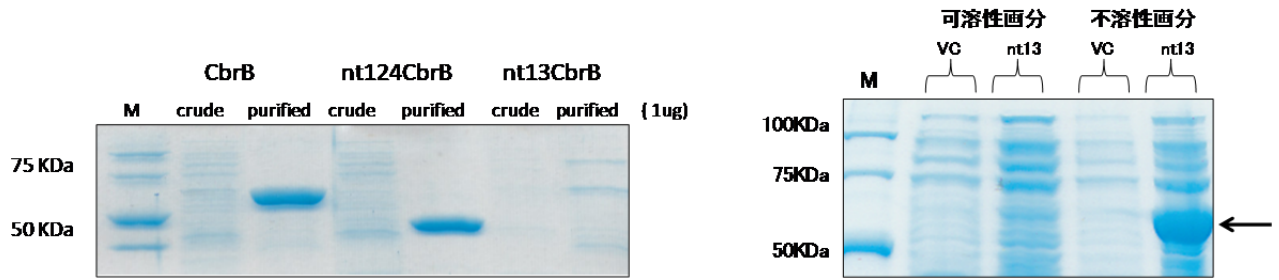
CbrB : *P. putida* KT2440 由来の native form CbrB,

nt13CbrB : N 末端 13 アミノ酸を欠失した *P. putida* KT2440 由来の CbrB,

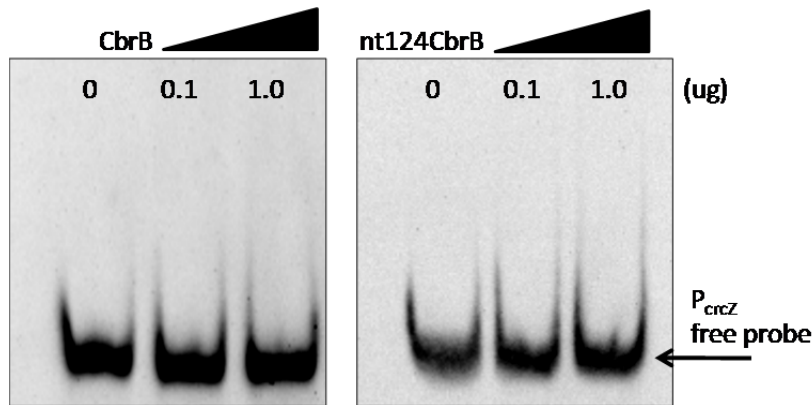
nt124CbrB : N 末端 13 アミノ酸を欠失した *P. putida* KT2440 由来の CbrB,

nt13CbrB<sub>PA</sub> : N 末端 13 アミノ酸を欠失した *P. aeruginosa* PAO1 由来の CbrB, をそれぞれ表す.

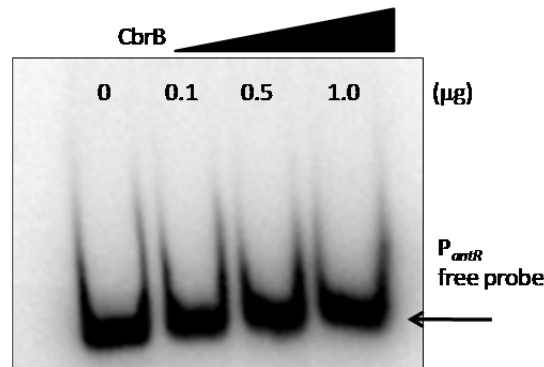
A.



B.



C.

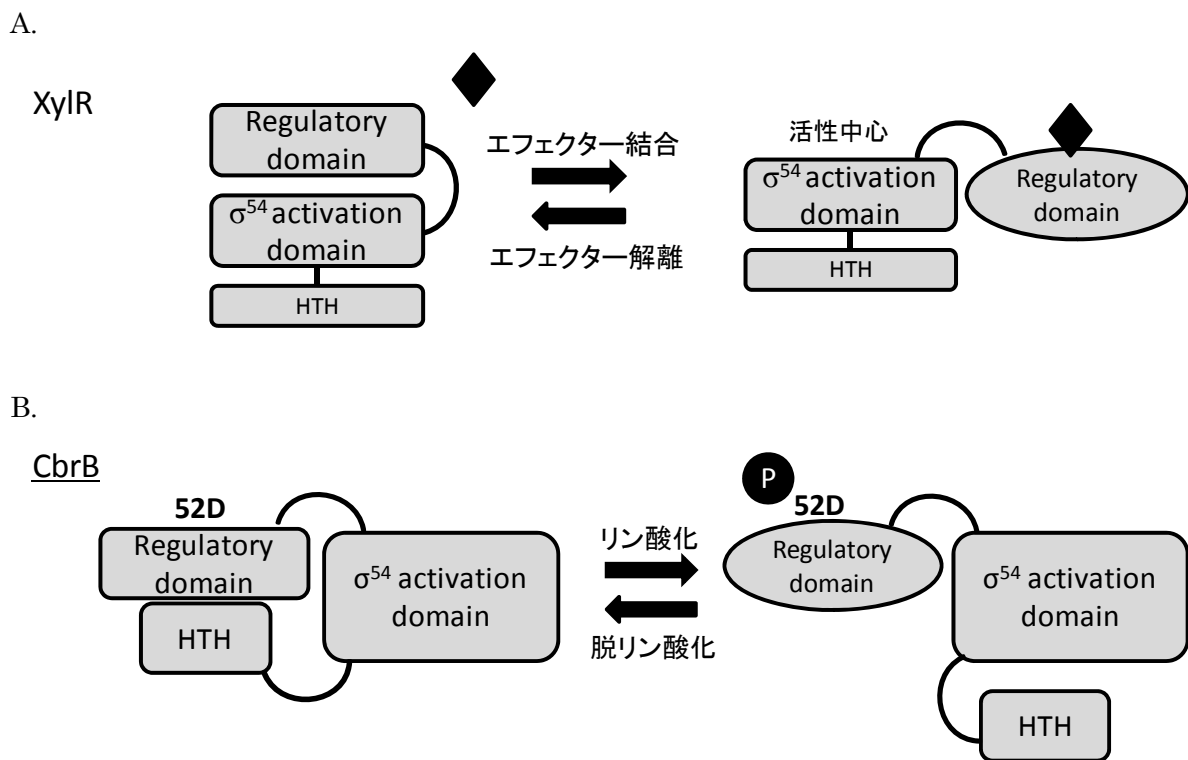


**Fig. 2-14 . KT2440 由来の CbrB を用いたゲルシフトアッセイ結果**

(A) SDS-PAGE を用いた CbrB の発現精製結果. (左図) 各 CbrB を大腸菌にて発現させ, その粗酵素抽出液および精製タンパク質を SDS-PAGE に供した. (右図) nt13CbrB の不溶性画分への発現の確認. VC はベクターコントロールとして, pET26b-(+)を用いた形質転換体由来のサンプルを表す. nt13 は pETnt13cbrB を含む形質転換体由来のサンプルを表す.

(B) His タグ融合 CbrB あるいは nt124CbrB を用いた  $P_{crcZ}$  プローブへの結合の検証

(C) His タグ融合 CbrB を用いた  $P_{antR}$  プローブへの結合の検証



**Fig. 2-15 . XylR および CbrB における regulatory domain による自己の機能阻害モデル**

(A) XylR はトルエンなどのエフェクター非存在下では, regulatory domain が  $\sigma^{54}$  activation domain の活性中心を覆い隠すように隣接することで自己の機能を阻害していると考えられている(Perez-Martin & De Lorenzo, 1995).

(B) CbrB の regulatory domain の機能についてはまだ解明されていないが, N 末端の一部が DNA binding domain に隣接することでその機能を阻害するのかもしれない. 二成分制御系の response regulator であることを考慮すると, リン酸化状態になることでも truncated CbrB と同様に DNA 結合能が上昇する可能性がある.

A.

```

amiE TTTTTTCGTCGCCGAAAAAATAACAACAAGAGGTGATATCCATGCGTCACGGCGATATTTT
zwf TCACTCAATATTTGGTTGGTAACAACAATGCGCTGATGTCCGCGTTCTGCCCTGCACGTT
edd ACCGATGATTATGTTGTAAAAACAACAATTGATAGTCTGTAGGAGAATCTGCCATGCACC
glk CTGGCGCGGGGCATTGCGGTTCAACGACGATGAATAACGACAACAAGAGAAGCGCCGGC
xyfS CTTGGTCCCGCGCGGCATACAACAACGATAGCAGCCTGAGTGTCTGCCCATGAATG
benR GGTAGGGCGCGGGCGACCAGAACAATAACGATACCGAGTGCCTTGCCTATGAAAAGCCGC

antR GTGCCGTGAGAGCGCGTACAAAAAACAGCAAACAGCCGTGGGTGGCCCCGTGATGAGT

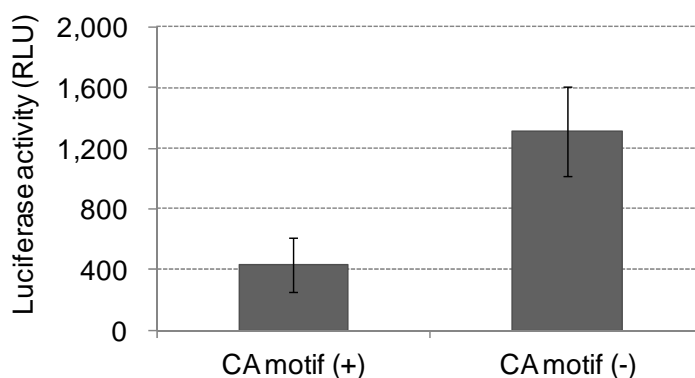
```

AACAGCAAACAGCCGTGGGTGGCCCCGTGATGAGT  
 ↓  
 TCAGTAGC

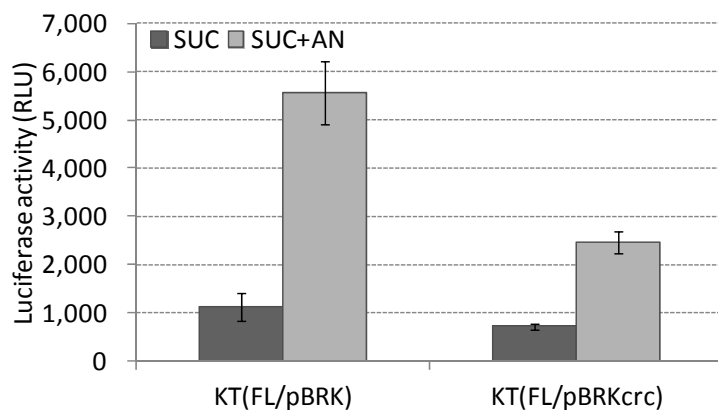
CA motif ?

ΔCA motif

B.



C.



**Fig. 2-16 . P<sub>antR</sub>プロモーターにおける CrcZ および Crc の影響解析**

(A) pCAR1 上 P<sub>antR</sub> プロモーターの翻訳開始点に存在する予想 CA motif の配列を黒四角内に示した. CrcZ 制御下にあることがすでに報告されている遺伝子のプロモーター配列についても併記した (Sonnleitner *et al.*, 2009 より改変).

(B) CA motif に変異を導入したレポータープラスミドを作製し, その機能解析を行った. native な配列を CA motif(+ )とし, 変異を導入したものを CA motif(- )とした.

(C) Crc 大量発現プラスミドを用いたレポーター解析. FL は AntR を発現するレポータープラスミド pMEGantR-FL を表す. また pBRK はベクターコントロールを, pBRKcrc は Crc を大量発現するプラスミドを表す.

### 2-3-1-10. *antR*の予想発現制御モデルの構築

ここまで pCAR1 上 *antR* の転写制御機構について解析し, *Pseudomonas* 属の宿主共通で *cbrB* 遺伝子が *antR* の転写を担う重要な因子であることを示した.

CbrB は CbrA-CbrB 二成分制御系の response regulator を構成する因子であり, 主に *P. aeruginosa* PAO1 および *P. fluorescens* SBW25 の解析結果から, 細胞内の炭素源と窒素源のバランスを感知するための因子であることがこれまでに報告されている(Nishijyo *et al.*, 2001; Zhang & Rainey, 2007). また CbrB は small RNA *crcZ* を介して, 炭素源代謝に関与する多くの遺伝子の制御を担っていることから global response regulator と位置づけられている(Sonnleitner *et al.*, 2009). *CrcZ* を介した制御については, プロモーター領域に CA motif が存在することが条件となる.

本研究においては, *antR* のプロモーター領域に CbrB 結合コンセンサス配列(Abdou *et al.*, 2011)に類似する転写活性化に重要な配列が見出されたことから, 直接 CbrB による転写活性化を受けていることが示唆された. CbrB は native form であると結合能が弱くゲルシフトアッセイに不相当である可能性が高いが, 結合能の上昇する truncated form を用いることで目的の領域への結合を早急に確認し, その直接的な制御についての決定的な証拠を得たいと考えている. また, その一方で *antR* の翻訳開始点付近に CA motif として機能する配列も存在する可能性が示され, *CrcZ* によって post-transcriptional な制御を受けることが分かった. このことから CbrB は転写段階だけでなく *antR* の翻訳段階においても *CrcZ* を介して正に制御している可能性が明らかになった. 遺伝子発現制御の過程において転写および翻訳段階で制御をすることで, より厳密な発現量の制御が可能になり, より的確に炭素源の変化などの環境変化に応答できることが予想される.

さらに, *antR* の転写はアントラニル酸の他に炭素飢餓によって誘導されることが新たに判明した. アントラニル酸は AntR に対してエフェクターとして働き, オートレギュレーション機能を介して自身の転写量を増やしていると考えられる. その一方で炭素飢餓は CbrA-CbrB を介して *antR* の転写活性化につながっていると考えている.

以上のことから, *Pseudomonas* 属における pCAR1 の各宿主における *antR* の基本的な発現制御モデルを構築した (Fig. 2-17). 上流のシグナルからのおよその流れは以下のようになっていると推察される.

1. 炭素源のバランス変化などを CbrA が感知する.
2. CbrA が自己リン酸化を起こし, 続いて CbrB をリン酸化する.
3. リン酸化 CbrB が *antR* の転写活性化を直接制御するとともに, small RNA *CrcZ* を介して翻訳制御にも正の因子として関与する.
4. AntR が発現し, アントラニル酸誘導性の  $P_{ant}$  プロモーターを活性化する.
5. その際に, AntR は自身の  $P_{antR}$  プロモーターも活性化する可能性がある.



### 2-3-1-11. CbrB および AntR による $P_{antR}$ プロモーター活性化機構の推察

これまでの結果から、 $P_{antR}$  プロモーターの活性化には CbrB と AntR の両方が必要であると考えられる。特に CbrB は破壊株を用いたレポーター解析において著しくレポーター遺伝子の活性が落ちることから、ベースとなる転写量を決定する重要な因子である。その一方で、AntR 自身についてもアントラニル酸存在下で転写を効率的に誘導するのに重要な役割を果たしていることが分かった。その両者が  $P_{antR}$  プロモーター上でどのように機能しているのかはより詳細な解析が必要である。特に CbrB 及び AntR はともに DNA に結合するタンパク質であることを考えると、 $P_{antR}$  プロモーターに結合する可能性が高く、ゲルシフトアッセイを中心とした解析が今後の課題であるが、本研究における結果に基づいた考察を以下行うことで、 $P_{antR}$  プロモーター活性化の予想される作用機序について言及する。

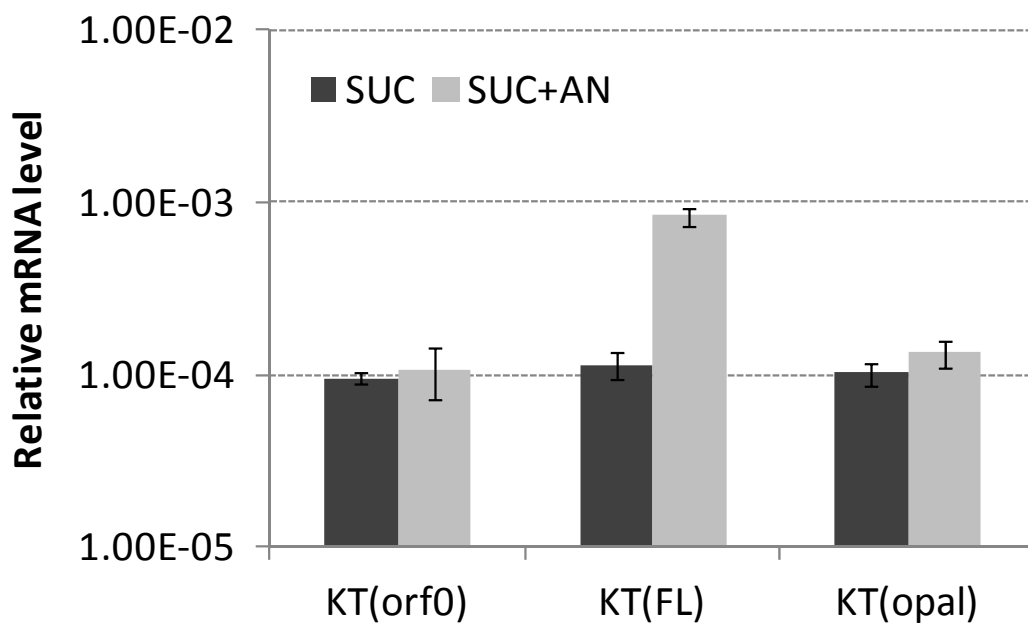
まず、CbrB については DNA への直接的な結合を今後示す必要があるものの、5' deletion assay の結果をもとに考えると CbrB は  $P_{antR}$  プロモーター上に存在する予想結合配列に結合する可能性が高い。ただし、CbrB と機能的・構造的に最も類似しているとされる NtrC において、DNA への結合を介さない転写活性化機構が存在することが近年に示唆されており (Porrua *et al.*, 2009)、CbrB における同様の機構については検証する余地がある。また、PAO1 におけるヒスチジン代謝に関与する *hutU* 遺伝子のプロモーター領域には NtrC と CbrB が重複した領域に結合するとされており (Itoh *et al.*, 2004)、炭素源と窒素源の両方になりうる物質をそれぞれが制御する可能性が指摘されている。ただし、*antR* の転写制御においてはプロモーター内に NtrC の結合コンセンサス配列が特に見出せないことから、NtrC が競合的に結合する可能性は低いとみている。その一方で、本研究におけるスクリーニング解析の過程において、*ntrC* をコードする PA5125 破壊株では野生型株と比較して非誘導状態におけるルシフェラーゼ活性が 7 倍近く上昇していることは興味深い現象といえる (Fig. 2-7)。これは CbrB が炭素源と窒素源のバランス (C:N ratio) をモニターしていることを支持する結果であり、窒素同化に関与する多くの遺伝子を制御している NtrC の破壊に伴い、細胞内の C:N ratio が野生型と比較してバランスが変化した結果によるものだと考えられる。

一方で、AntR によるオートレギュレーションについてもアントラニル酸存在下での  $P_{antR}$  プロモーターへの結合が原因とみている。特に、アミノ酸レベルで相同性 59% をもつ *P. aeruginosa* PAO1 がもつ AntR ホモログ (後述の AntR<sub>PA</sub>) はアントラニル酸存在下で自身のプロモーター領域に結合し、転写を活性化する可能性が示されていることから (Kim *et al.*, 2012)、pCAR1 上 *antR* についても同様の機構が存在すると考えるのが妥当である。AntR は AraC/XylS family に属する転写因子であることから、基本的には XylS と同様に標的である  $P_{ant}$  プロモーターの -35 element 付近に結合すると考えられる。そして RNAP をリクルートし、aromatic inducer と呼ばれるエフェクター存在下で open complex の形成を助けることが予想される (Tropel & van der Meer, 2004)。レポーター遺伝子の転写量を定量 RT-PCR で測定してみると、AntR が発現することで実際に転写量が増えることから

(Fig.2-18), AntR の発現は転写量に直接作用するものであるといえる。本研究における  $P_{antR}$  プロモーターにおいても上述の通りに AntR が機能すると一見考えられるが,  $\sigma^{54}$  依存的事であることを考慮に入れると同じ機構は成立しない可能性が高い。AntR の結合領域特定を含め, 転写が活性化されるメカニズムの解析については今後の課題といえる。また, trans な AntR の発現によるアントラニル酸誘導性の獲得については, 高コピーかつ恒常的なプロモーターによる大量発現プラスミドを用いたレポーター解析ではその誘導性を確認できなかった (Fig. 2-4) 一方で, 低コピーの pCAR1 を用いた場合には誘導性を確認できたことから, その発現量が重要な要因の 1 つであることが示唆された (Fig. 2-5)。

以上, CbrB と AntR の機能的およびプロモーター上での位置的な関係について総合的に考察すると, AntR は転写開始点と CbrB が結合するであろう領域の中間となる周辺に結合し, 協調的に転写を活性化するのではないかと推測している。特に,  $\sigma^{54}$  依存的な転写制御機構においては IHF が DNA bending 機能を発揮することで  $\sigma^{54}$ -dependent activator を RNAP 付近にリクルートする例が多数知られているが,  $P_{antR}$  プロモーターにおいては IHF の結合コンセンサス配列見出すことができないため, 代わりとなる因子が要求される可能性がある。そのため, IHF の代わりとして AntR が結合することで, CbrB が RNAP 付近に存在しやすいように DNA が bending されるのではないかと考えている (Fig. 2-19)。





**Fig. 2-18. 定量 RT-PCR によるルシフェラーゼ遺伝子の定量**

炭素源としてコハク酸 (SUC), あるいはコハク酸に加えて誘導物質であるアントラニル酸 (SUC+AN) を含む無機液体培地で KT2440 の各形質転換体を 3 h 培養し, AntR 発現によるルシフェラーゼ遺伝子の転写量への影響を解析した. AntR を発現しないレポータープラスミド pMEGantR-orf0 を orf0 と表記し, AntR を発現するレポータープラスミド pMEGantR-FL を FL と表記した. さらに, 変異により AntR を発現しないレポータープラスミド pMEGantR-FL(opal) を opal とした. 遺伝子の転写量は同様に測定した 16S rRNA 遺伝子の転写量を用いて標準化して示している.

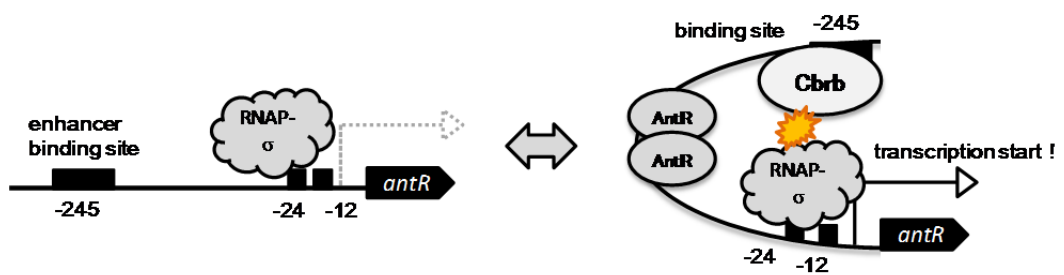


Fig. 2-19. CbrB 及び AntR の協調的作用による pCAR1 上 *antR* の転写開始モデル

### 2-3-2. 異なる宿主における発現制御ネットワーク変化の解析

pCAR1 における *antR* の発現制御機構は宿主依存的である。*antR* の発現に関与する因子は宿主共通で CbrB であることが示されたが、宿主が変化することで各宿主固有の因子が CbrB 以外に関与することも考えられる。また、CbrB 自体についてもその発現量や質が変化することで、各宿主のカルバゾール分解系遺伝子群の制御様式が変化する可能性も考えられる。このような宿主依存性に着目し、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変化するかということに興味を持たれた。そこで、*P. putida* KT2440 以外の異なる宿主にも着目し、*antR* の発現制御機構の機能変化について検証すると共に、宿主間での分解力の比較について分解系遺伝子群の転写量を測定することで比較解析した。

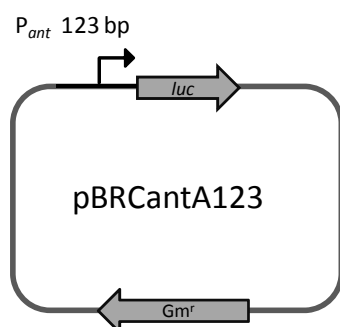
#### 2-3-2-1. *P. aeruginosa* PAO1 における pCAR1 上 *antR* の転写制御

これまでに、*P. resinovorans* CA10 におけるレポーター解析において、AntR を発現しないレポータープラスミドにも関わらず、アントラニル酸に対する誘導性が確認されている（浦田，2004 修士論文）。これは今回の *P. putida* の結果（Fig. 2-3）と一見矛盾する。しかし、AntR のホモログが CA10 染色体上に存在しており、それが pCAR1 の AntR と同等の機能を果たすのではないかと考えられた。また、このことは AntR ホモログが各宿主における分解力を決定する宿主固有のファクターとなりうることを示唆している。

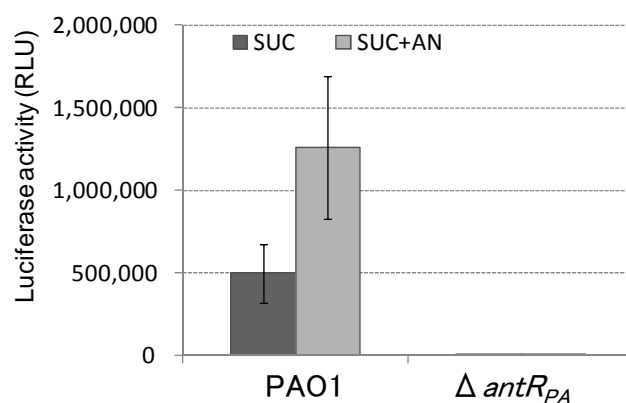
その一方で、ゲノム配列が既知でかつ当研究室にて pCAR1 の宿主としてよく解析されている PAO1 においても CA10 と同様に染色体上にアミノ酸レベルで相同性 59% の AntR ホモログ PA2511（以後、AntR<sub>PA</sub>）が存在している。そこで、本研究では KT2440 以外の宿主として PAO1 に着目し、その染色体にコードされている *antR* ホモログ（以後、*antR*<sub>PA</sub>）が pCAR1 上の分解系遺伝子群の発現制御に与える影響をレポーター解析により検証した。

まず、P<sub>ant</sub> プロモーターの活性化能についてレポータープラスミド pBRCantA123 を用いて PAO1 の野生型株と *antR*<sub>PA</sub> 破壊株におけるルシフェラーゼ活性の比較を行った。pBRCantA123 は AntR 存在下であれば、pCAR1 上 *ant* operon の転写活性化に十分な P<sub>ant</sub> プロモーター領域を含む pBBR1-MCS5(Kovach *et al.*, 1995)を基本骨格とするレポータープラスミドである（Fig. 2-20A）。その結果、PAO1 においてアントラニル酸による発現誘導を確認するとともに、*antR*<sub>PA</sub> 破壊株においてはその活性が顕著に低下した（Fig. 2-20B）。このことから、AntR<sub>PA</sub> が P<sub>ant</sub> プロモーターを AntR の代わりに活性化できることが明らかとなった。また、AntR を発現しないレポータープラスミド pMEGantR-orf0（Fig. 2-2A 参照）を用いて、同様に P<sub>ant</sub> プロモーターの活性を比較すると、PAO1 においてのみアントラニル酸誘導性を確認することができた（Fig. 2-20C）。以上の結果から、宿主を PAO1 とした場合、AntR<sub>PA</sub> が P<sub>ant</sub> および P<sub>antR</sub> プロモーターに作用し、カルバゾール分解に関与する遺伝子の発現ネットワークを変化させることが示唆された。

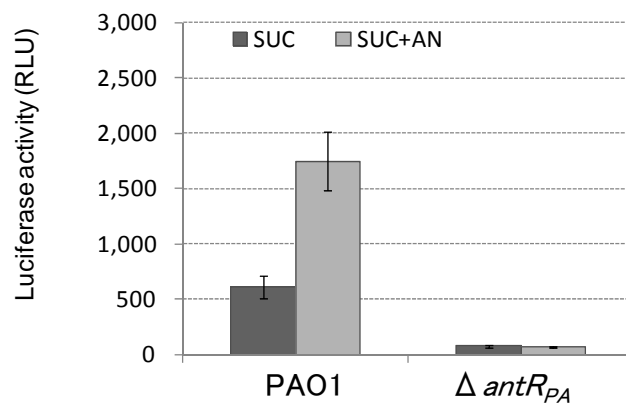
A.



B.



C.



**Fig. 2-20. PAO1 における  $P_{ant}$  および  $P_{antR}$  プロモーター活性化能の検討**

(A)  $P_{ant}$  プロモーターの活性を測定するためのレポータープラスミド。転写活性化に十分な *ant* 遺伝子上流 123 bp がルシフェラーゼ遺伝子に結合している。レポーター解析により、 $P_{ant}$  プロモーター活性化能 (B) あるいは  $P_{antR}$  プロモーター活性化能 (C) について野生型株 (PAO1) あるいは *antR<sub>PA</sub>* 破壊株 ( $\Delta antR_{PA}$ ) を用いて比較検討した。グラフはコハク酸 (黒色のバー), コハク酸+アントラニル酸 (灰色のバー) を炭素源として培養した各株のルシフェラーゼ活性を示す。エラーバーは 3 連の測定結果から算出した標準誤差を示す。

### 2-3-2-2. RACE 解析による *antR<sub>PA</sub>* の転写開始点の決定

前述の PAO1 を用いたレポーター解析の結果から、*antR<sub>PA</sub>* の転写制御機構に興味もたれた。そこで、*antR<sub>PA</sub>* の転写様式を pCAR1 上 *antR* と比較するため、RACE 法による転写開始点の決定を行った。*antR<sub>PA</sub>* の内部に相補的な遺伝子特異的プライマーを用いて転写産物由来の遺伝子断片を増幅し、その配列を解析したところ、*antR<sub>PA</sub>* の翻訳開始点上流 50 bp までの断片を多数のクローンで確認することができた。そして、その上流にはプロモーターと考えられる -35 および -10 element に相当する配列 5'-CCTTGCG-N<sub>17</sub>-TTTTGCT-3' が見出された (Fig. 2-21A)。その塩基配列や転写開始点との位置関係から  $\sigma^{70}$  依存性プロモーターであると考えられた。さらに、これまでに当研究室で解析されているタイリングアレイの結果 (Fig. 2-21B) も、当該位置周辺から転写が始まることを示しており、RACE 解析の結果を裏付けるものである。

なお、RACE 解析においては翻訳開始点上流 92 bp までの遺伝子断片の増幅も確認できしており、翻訳開始点上流 50 bp 以外にさらに上流に別の転写開始点が存在する可能性が考えられた。ただし、翻訳開始点上流 92 bp を転写開始点とした場合、-35 および -10 配列は見出すことはできなかった。さらに、RNA マッピングのデータからはシグナル値は非常に低い (上述の転写開始点からのシグナルと比較すると 1 割程度) が開始コドン上流 200 bp 付近からも転写が起きていることが検出されており (Fig. 2-21C)、その転写産物が一部分解されたものが解析結果に反映したものと考えている。

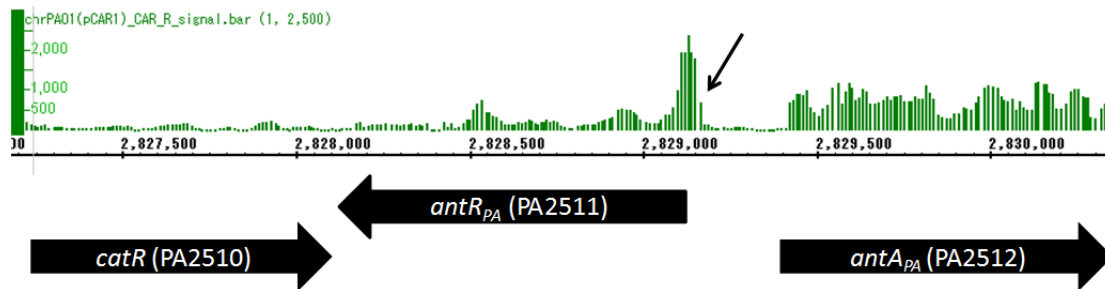
### 2-3-2-3. P<sub>*antR<sub>PA</sub>*</sub> プロモーターの 5' deletion 解析および mutation 解析

P<sub>*antR<sub>PA</sub>*</sub> プロモーター配列をみると、当該転写開始点の近くに  $\sigma^{54}$  の結合コンセンサス配列に類似した配列が存在し (Fig. 2-21A)、 $\sigma^{54}$  依存的な転写制御も考えられた。そこでその推定結合配列の一部に変異を導入し *antR<sub>PA</sub>* の転写活性化能に変化がみられるか否かをレポーター解析で確認した。その際、転写活性化に必要な領域を合わせて特定するため、5' deletion assay も合わせて行った。その結果、 $\sigma^{54}$  結合コンセンサス配列に変異が導入されてもルシフェラーゼ活性に変化はなかった (Fig. 2-22A)。また、転写開始点の上流 100 bp の DNA 断片ではルシフェラーゼの発現が顕著に確認できたが、80 bp の断片においてはルシフェラーゼの発現量が減少したことから、転写活性化には少なくとも転写開始点上流 100 bp が必要であることが明らかになった (Fig. 2-22A)。この領域には最近報告された PAO1 染色体上の *antR* 遺伝子 (本論文における *antR<sub>PA</sub>*) の転写制御機構の解析結果 (Kim *et al.*, 2012) を合わせて考えると、AntR<sub>PA</sub> が結合し転写が活性化されると考えられる。また PAO1 における *cbrB* 破壊株を用いてルシフェラーゼ活性を測定したが、野生型株と比較して変化は見られなかった (Fig. 2-22B)。以上より、*antR<sub>PA</sub>* の転写は  $\sigma^{54}$  と CbrB に依存せず、 $\sigma^{70}$  依存的な転写制御機構であることが明らかとなった。このことから、PAO1 における pCAR1 上の分解酵素遺伝子の発現は  $\sigma^{70}$  及び  $\sigma^{54}$  の両方に制御される転写因子 (*antR<sub>PA</sub>* 及び *antR*) の制御下にあり、他の株と異なる分解力を持つことが示唆された。

A.



B.



C.

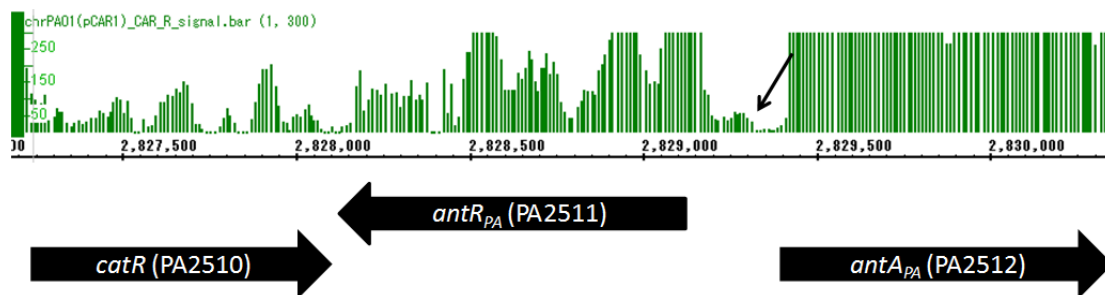


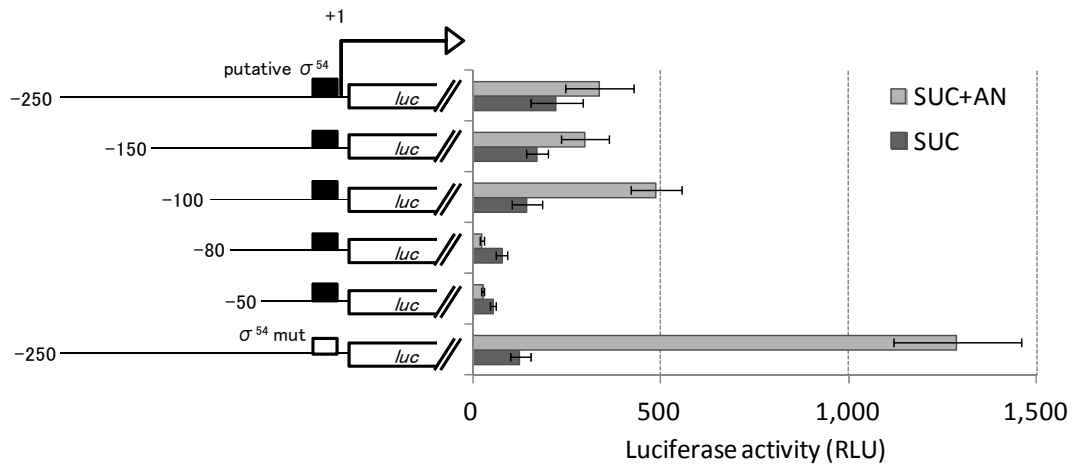
Fig. 2-21. *antR<sub>PA</sub>* の転写開始点の決定

(A) 翻訳開始点上流の *antR<sub>PA</sub>* のプロモーター配列を示す。赤字で示した A が今回明らかになった転写開始点であり、転写開始点の+1 を基準として各位置を数字で表した。また、予想された  $\sigma^{54}$  結合配列をオレンジ色で示し、変異解析において導入する変異を併記した。さらに、-35, -10 element, AntR binding site (本研究結果で転写活性化に必要と判断された領域) を下線および太字で示した。

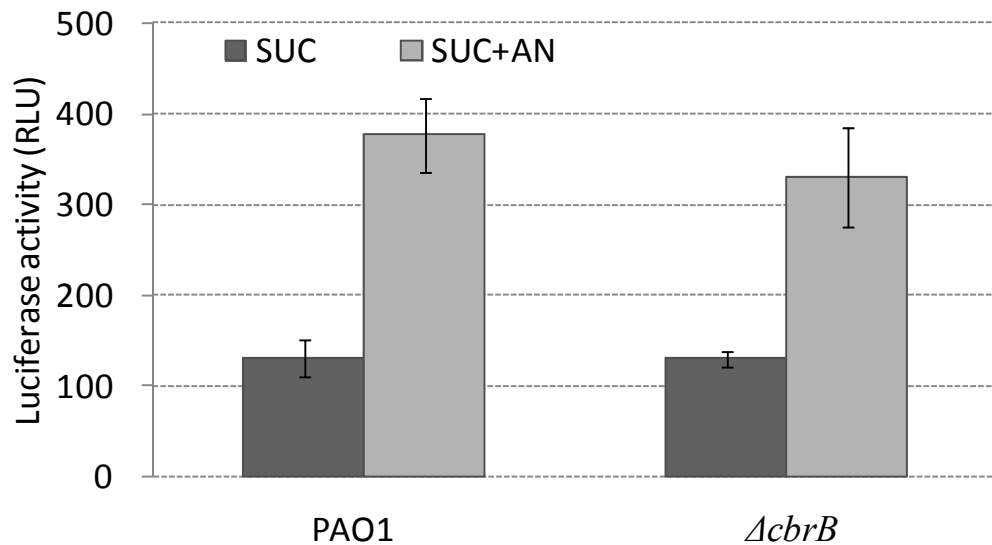
(B) RNA マッピングによる *antR<sub>PA</sub>* の転写解析 (新谷, unpublished data)。カルバゾールを炭素源とする無機液体培地で対数増殖期まで培養した PAO1(pCAR1) からサンプルを調製した。x 軸は PAO1 染色体上の領域を、y 軸は各プローブの示したシグナル値の大きさを表す。さらに、*antR<sub>PA</sub>* 周辺に存在するカテコール代謝を制御する転写因子 *catR* 及びアントラニル酸分解酵素 *antA* についても、そのコードされている向きとともに併せて示した。また、*antR<sub>PA</sub>* の推定転写開始点と思われる領域 (開始コドンから約 40 bp 上流) を矢印で示した。

(C) (B) と同じ領域について y 軸における最大値を 2,500 から 300 にすることで、より小さいシグナルを拡大して表した結果を示す。矢印は *antR<sub>PA</sub>* の推定転写開始点 ((B) とは別の転写開始点) と思われる領域 (開始コドンから約 190 bp 上流) を示した。

A.



B.



**Fig. 2-22. *antRPA* の転写制御機構の解析**

(A) *antRPA* 転写開始点上流域の 5' -deletion 解析及び mutation 解析. グラフはコハク酸+アントラニル酸 (灰色のバー) またはコハク酸 (黒色のバー) を炭素源として培養した KT2440 のルシフェラーゼ活性を示した. *antRPA* 転写開始点の位置をグラフの上側に示した. *luc* の上流に結合させた DNA 領域をグラフの左側に示した. また, 転写開始に重要と予想される  $\sigma^{54}$  結合サイトを黒い四角で示し, 変異が入っている場合は白い四角で示した. エラーバーは 3 連の測定結果から算出した標準誤差を示す.

(B) 野生型株 (PAO1) あるいは *cbrB* 破壊株 ( $\Delta cbrB$ ) における  $P_{antRPA}$  プロモーター活性化能を検討した. グラフはコハク酸 (黒色のバー), コハク酸+アントラニル酸 (灰色のバー) を炭素源として培養した各株のルシフェラーゼ活性を示す. エラーバーは 3 連の測定結果から算出した標準誤差を示す.

#### 2-3-2-4. *antR* および *antR<sub>PA</sub>* のアントラニル酸に対する転写誘導プロファイル比較

モデル宿主 KT2440 と比較すると、PAO1 を宿主とする場合は *antR<sub>PA</sub>* が染色体上に存在することで、細胞内に存在するレギュレーター量が相対的に多くなることや、その発現条件によっては最終的に分解酵素の発現量が変化することが予想される。実際に pCAR1 を保持する PAO1 がカルバゾールを炭素源として分解・利用する場合、中間代謝産物としてアントラニル酸が生成されることで *antR* と *antR<sub>PA</sub>* の発現がともに誘導されることから、それぞれが分解系遺伝子群の働きにどのように寄与しうるかに興味を持たれた。

そこで、まず *antR* と *antR<sub>PA</sub>* のアントラニル酸に対する転写誘導プロファイルについて定量 RT-PCR を用いて比較した。pCAR1 を保持する PAO1 をコハク酸およびアントラニル酸を含んだ無機液体培地で処理し、経時的 (15, 30, 45, 60, 120 min の 5 点) にサンプリングを行った。その結果、*antR* および *antR<sub>PA</sub>* ともにアントラニル酸処理によって転写が誘導され、かつその経時的プロファイルに違いが見られた。特に *antR* はアントラニル酸処理後 15 min には転写量がほぼピーク (誘導前と比較して 100 倍) に到達したのに対して、*antR<sub>PA</sub>* は処理後 60 min に転写量がピーク (同 10 倍) に到達することが分かった (Fig. 2-23)。これは、両者の転写制御機構がそれぞれ異なる  $\sigma$  因子の制御下にあることが原因の一つと考えられる。また、このことから pCAR1 上 *antR* は相対的により迅速かつ急激な転写制御が行われていることが示唆された。

#### 2-3-2-5. 異なる宿主を用いた分解関連遺伝子の転写誘導プロファイル比較

*antR<sub>PA</sub>* のような宿主特異的な因子の存在は、同じプラスミドでも宿主によって特定の遺伝子の発現制御が変化し、分解力も変動しうることを示唆する。そのために、次に異なる宿主間における分解に関与する遺伝子の転写誘導プロファイルに興味をもたれた。

そこで、当研究室で pCAR1 の宿主として長らく使用してきた 3 種の宿主 (*P. putida* KT2440, *P. aeruginosa* PAO1, *P. fluorescens* Pf0-1) をアントラニル酸で処理し、誘導状態における関連遺伝子の転写プロファイルを定量 RT-PCR を用いて比較した。Pf0-1 は KT2440 と同様に相対性の高い *antR* 遺伝子が染色体上に存在しない。その一方で、PAO1 においては *AntR<sub>PA</sub>* の発現の影響から他の宿主と異なるプロファイルを示す可能性が考えられた。

その結果、pCAR1 上 *antR* については各宿主ともに処理開始後に同様の発現誘導が起きることが明らかになった (Fig. 2-24A)。また、分解酵素遺伝子の一つである *antA* の転写量については、KT2440 及び Pf0-1 と比較すると PAO1 においては転写の誘導が比較的緩やかに起こる傾向が見られた (Fig. 2-24B)。

PAO1 における誘導プロファイルが他の 2 株と違う理由については、*AntR<sub>PA</sub>* の存在もその一因ではないかと考えられ、例えば pCAR1 由来の *AntR* が染色体上に存在する *antR<sub>PA</sub>* プロモーター上にトラップされることで、プラスミド上の分解酵素遺伝子のプロモーターを活性化させる *AntR* が相対的に少なくなる可能性がある。*AntR<sub>PA</sub>* の寄与については、そ



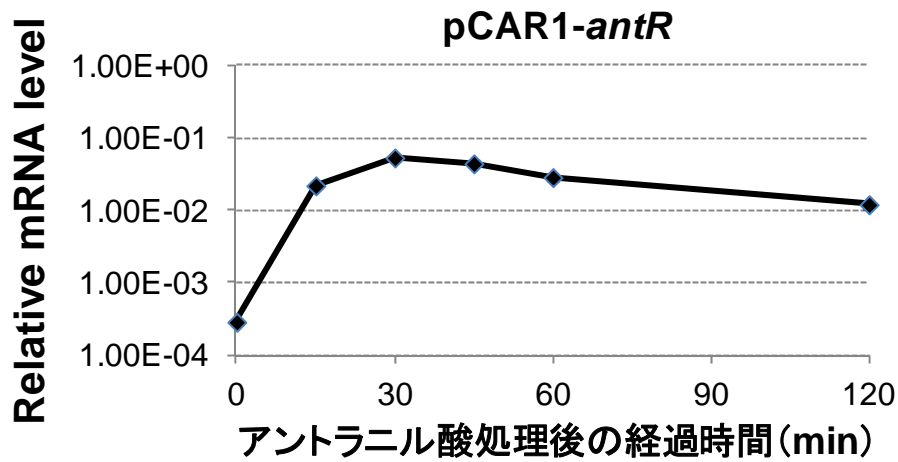
の実態についてより正確に把握するためにも今後、*antR<sub>PA</sub>* 破壊株における pCAR1 上の分解系遺伝子群の転写プロファイルを比較対象に加えた解析が必須であると考えている。それに加えて AntR<sub>PA</sub> のタンパク質としての安定性やプロモーター領域へのアフィニティについて、pCAR1 由来の AntR と比較してどのように違うのかを総合的に検討することで、AntR<sub>PA</sub> の影響の実態を把握につなぐとみている。さらに、*antR<sub>PA</sub>* の転写を誘導する条件が詳細に明らかになることで、分解酵素遺伝子群の発現に明確に差がでる条件についても見出せると考えている。なお、レギュレーターである AntR が十分に発現し、それに連動して下流の遺伝子が転写されることを考えると *antR* と *antA* の転写量がピークに到達する時間に差があるのは合理的である。

#### 2-3-2-6. アントラニル酸による *cbrB* の転写誘導あるいはリン酸化への影響の検討

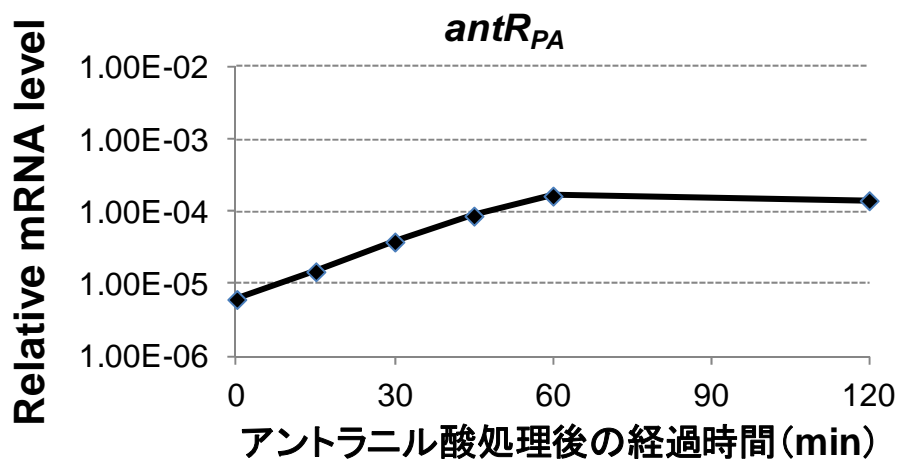
*antR* を制御する *cbrB* 遺伝子の転写についてもアントラニル酸による影響を調べたところ、分解系遺伝子群と違い各宿主においてアントラニル酸依存的に対数的な転写量の増加は見られなかった (Fig. 2-25)。これはアントラニル酸が *cbrB* の転写を誘導するものではなく、主に AntR へエフェクターとして作用することで一連の遺伝子の転写が誘導されていることを裏付けるものである。

一方、アントラニル酸への暴露は細胞内のアントラニル酸濃度の上昇をもたらし、結果として細胞内の炭素源バランスが変化して CbrB がリン酸化されている可能性も考えられた。リン酸化 CbrB の存在量が相対的に多くなると仮定すると、レギュロン<sup>1</sup>の 1 つである small RNA *crcZ* の転写量が上がると予想される。そこで、KT2440 を対象として、CbrB の制御下にある small RNA *crcZ* の転写量について測定した。しかし、*cbrB* の場合と同様に転写量の経時的な変化はほとんど観察されなかった (Fig. 2-26)。このことから、CbrB のリン酸化状態についてもアントラニル酸で変化する可能性は低いとみている。

A.

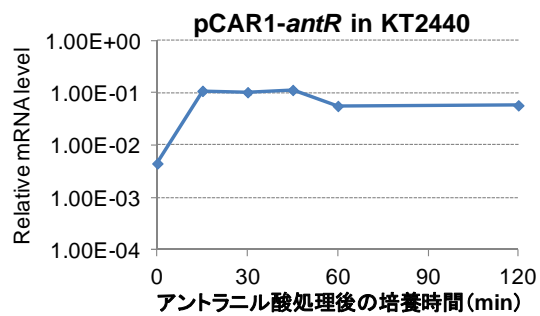


B.

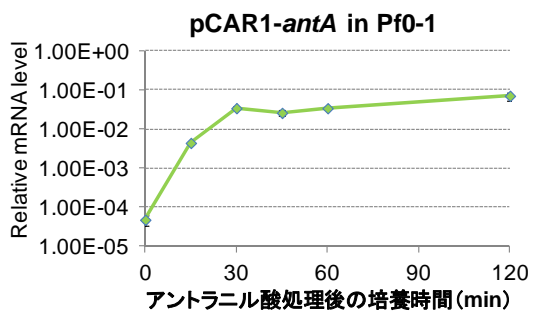
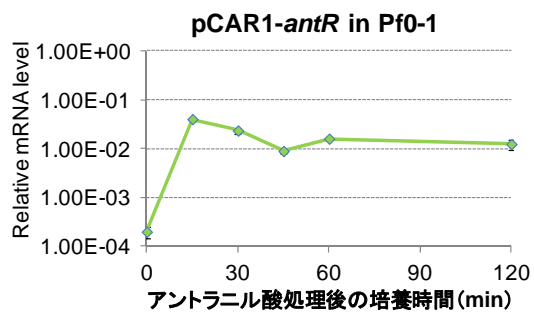
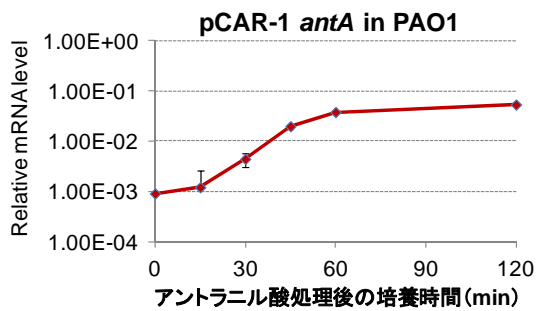
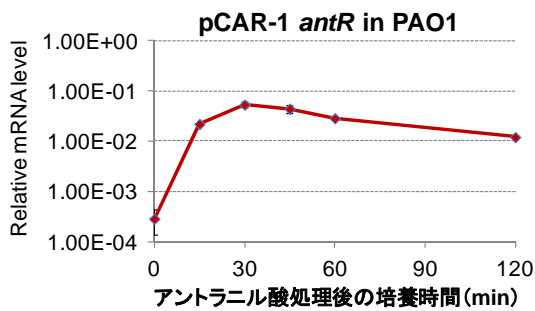
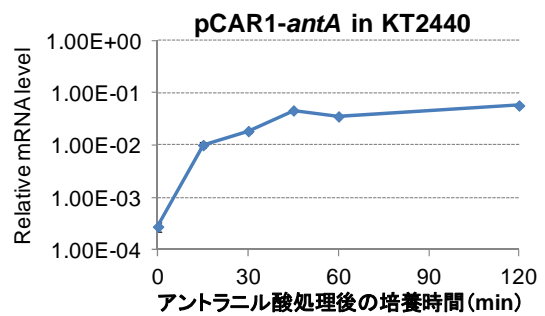


**Fig. 2-23. PAO1 を宿主とした場合の *antR* および *antR<sub>PA</sub>* の転写誘導プロファイル**  
PAO1(pCAR1)をコハク酸及びアトラニル酸を含む無機液体培地で培養し、誘導物質であるアトラニル酸による転写量への影響を経時的に解析した。グラフは *antR* (A) および *antR<sub>PA</sub>* (B) の経時的転写プロファイルをそれぞれ表し、各株における遺伝子の転写量は同様に測定した 16S rRNA 遺伝子の転写量を用いて標準化して示した。エラーバーは3連の測定結果から算出した標準誤差を示す。

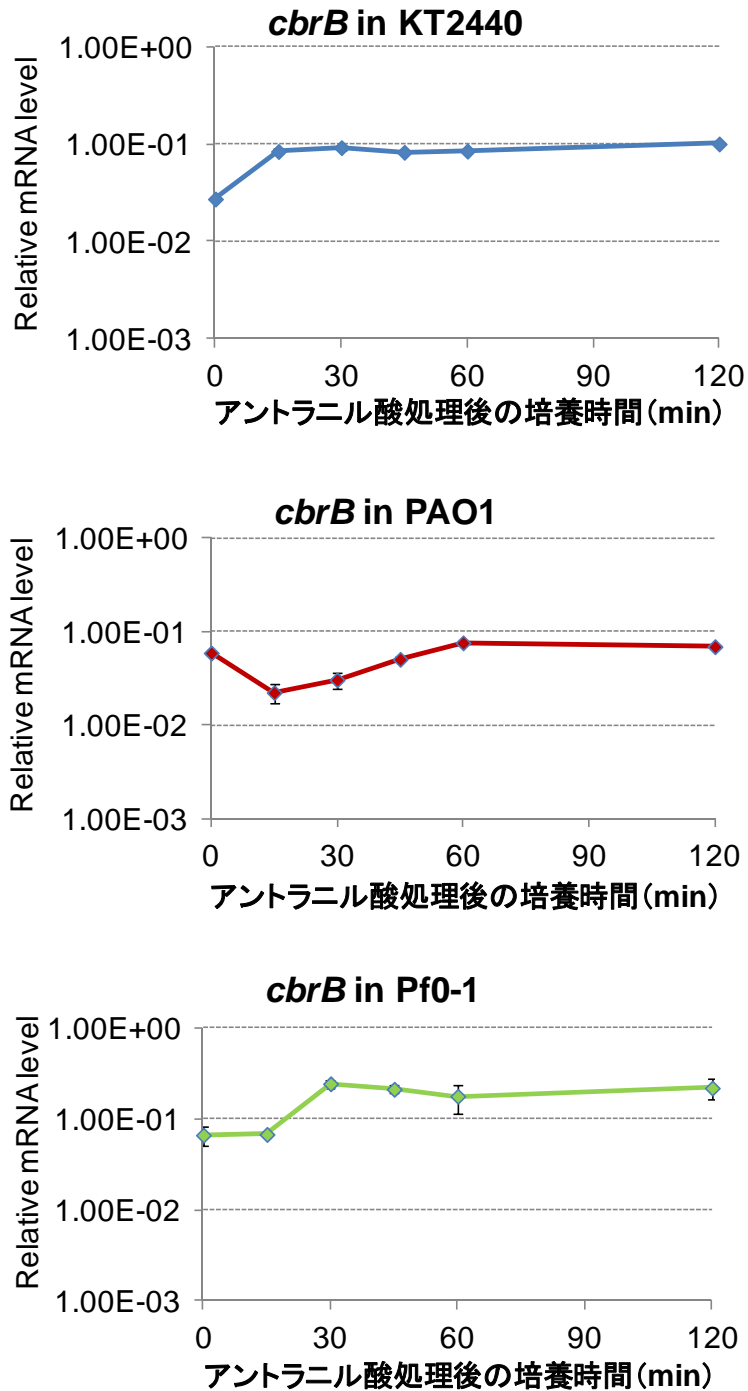
A.



B.

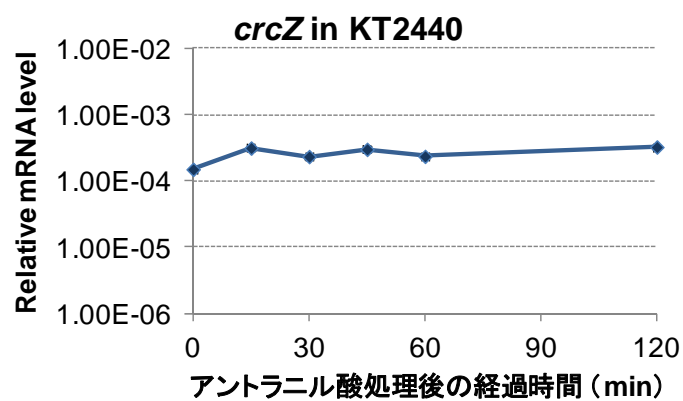


**Fig. 2-24.** 3 宿主における pCAR1 上 *antR* 遺伝子および *antA* 遺伝子の転写プロファイル  
 KT2440(pCAR1) (上段), PAO1(pCAR1) (中段), Pf0-1(pCAR1) (下段), をコハク酸及び  
 アントラニル酸を含む無機液体培地で培養し, 誘導物質であるアントラニル酸処理による  
 pCAR1 上 *antR* 遺伝子 (A) および *antA* 遺伝子 (B) の経時的転写プロファイル. 各  
 株における遺伝子の転写量は同様に測定した 16S rRNA 遺伝子の転写量を用いて標準化し  
 て示した. エラーバーは 3 連の測定結果から算出した標準誤差を示す.



**Fig. 2-25. 3 宿主における *cbrB* 遺伝子の転写プロファイル**

KT2440(pCAR1) (上段), PAO1(pCAR1) (中段), Pf0-1(pCAR1) (下段), をコハク酸及びアントラニル酸で培養した際の *cbrB* 遺伝子の経時的転写プロファイル. 各株における遺伝子の転写量は同様に測定した 16S rRNA 遺伝子の転写量を用いて標準化して示した. エラーバーは 3 連の測定結果から算出した標準誤差を示す.



**Fig. 2-26. KT2440(pCAR1)における *crcZ* の転写プロファイル**

KT2440(pCAR1)をコハク酸及びアントラニル酸で培養した際の small RNA *crcZ* の経時的転写プロファイル. 各株における遺伝子の転写量は同様に測定した 16S rRNA 遺伝子の転写量を用いて標準化して示した. エラーバーは 3 連の測定結果から算出した標準誤差を示す.

### 2-3-2-7. モデル宿主 3 種における分解力の違いについての総合的な考察

各宿主が pCAR1 を保持した際に、同等の分解力を発揮できるのかは非常に興味深い。当研究室では以前から、pCAR1 を対象として各宿主で pCAR1 上の遺伝子発現がどのように変動するのか網羅的な研究が行われてきている。そこで、その結果を踏まえつつ、前述の定量 RT-PCR の結果と合わせて pCAR1 を保持する各宿主がそれぞれどのような分解能力をもつのか考察する。その際に、アントラニル酸の有無を条件として、非誘導状態あるいは誘導状態における関連遺伝子の挙動をもとにそれぞれ議論することが重要であると考えた。そして、分解力については関与する遺伝子の転写量やそのプロモーター活性に着目し、その指標とした。

#### (1) コハク酸処理による非誘導状態における分解力の考察

これまで、*car* 遺伝子群の恒常的な転写活性化を担っている  $P_{carAa}$  プロモーターについては、コハク酸培養時の対数増殖期における RNA マッピングの結果から KT2440 と比較して PAO1 や Pf0-1 においてその転写量が多いことが指摘されている (Shintani *et al.*, 2011b)。また各宿主が定常期に入る約 8 時間目までの *antR* の経時的転写プロファイルを定量 RT-PCR で比較すると、各宿主共通で定常期の初期段階において転写が誘導されるが、KT2440 のみその誘導が維持され続けることが示されている (高橋, unpublished data)。定常期初期という一時的な誘導がかかる原因は今のところ不明であるが、*cbrB* の転写量が培養段階に関わらずほとんど一定であること (高橋, 2012 博士論文) および  $\sigma^{54}$  の発現量もほとんど変化しない (Jurado *et al.*, 2003) ことを考えると、そのリン酸化ステータスが変わ化すると考えられる。また、KT2440 は 3 種の宿主の中でも pCAR1 保持による染色体上遺伝子の転写変動が最も多く、「プラスミドの負荷」が大きいことから (高橋, 2012 博士論文)、それに伴う 2 次的な影響が定常期の持続的な *antR* の転写誘導につながっている可能性がある。

以上のことから、カルバゾールの取り込み能力が仮に宿主間で等しいとするならば、*car* 遺伝子群の転写量の違いから PAO1 や Pf0-1 は KT2440 と比較してカルバゾールをアントラニル酸にする初速度が異なる (速い) 可能性がある。またそれに伴うアントラニル酸産生による分解系遺伝子群の転写誘導がより早いタイミングで起こるかもしれない。また KT2440 は定常期に到達して以降、AntR を継続的に発現していることで、他の宿主と比較した時に分解酵素遺伝子の発現を迅速に行える可能性がある。

#### (2) アントラニル酸処理による誘導状態における分解力の考察

誘導性プロモーターである  $P_{ant}$  から転写が誘導されることで発現する分解酵素の量は、その宿主がもつ分解力の実質の上限を決める重要な要因の 1 つとなる。そのことから、アントラニル酸による誘導処理を施して  $P_{ant}$  プロモーター由来の経時的な転写産物の量を宿主間で比較解析することで、分解力の代替指標にできると考えた。前述の定量 RT-PCR の

結果からは, KT2440 及び Pf0-1 と比較して PAO1 における *antA* 遺伝子の転写誘導プロファイルが異なり, 宿主間における分解酵素遺伝子の発現に差が出る可能性が見出された. 特に, PAO1 の *antR<sub>PA</sub>* のようにその宿主固有の因子が存在する場合は発現制御ネットワークが変化することが考えられ (Fig. 2-27), その転写活性化条件や転写量をよく見極めることで, そういった因子の分解力発現への寄与を明確にすることができると考えられる. *antR<sub>PA</sub>* と *antR* の分解力への寄与をより詳細に検討するためには, 前述の通りそれぞれを破壊した株における分解系遺伝子群の転写量を比較解析することが今後の課題として挙げられる. また, 低濃度のアントラニル酸や炭素飢餓条件などに対する誘導性を含めて多面的な見地から議論することで, 各宿主における分解力の違いが見えてくる可能性がある.

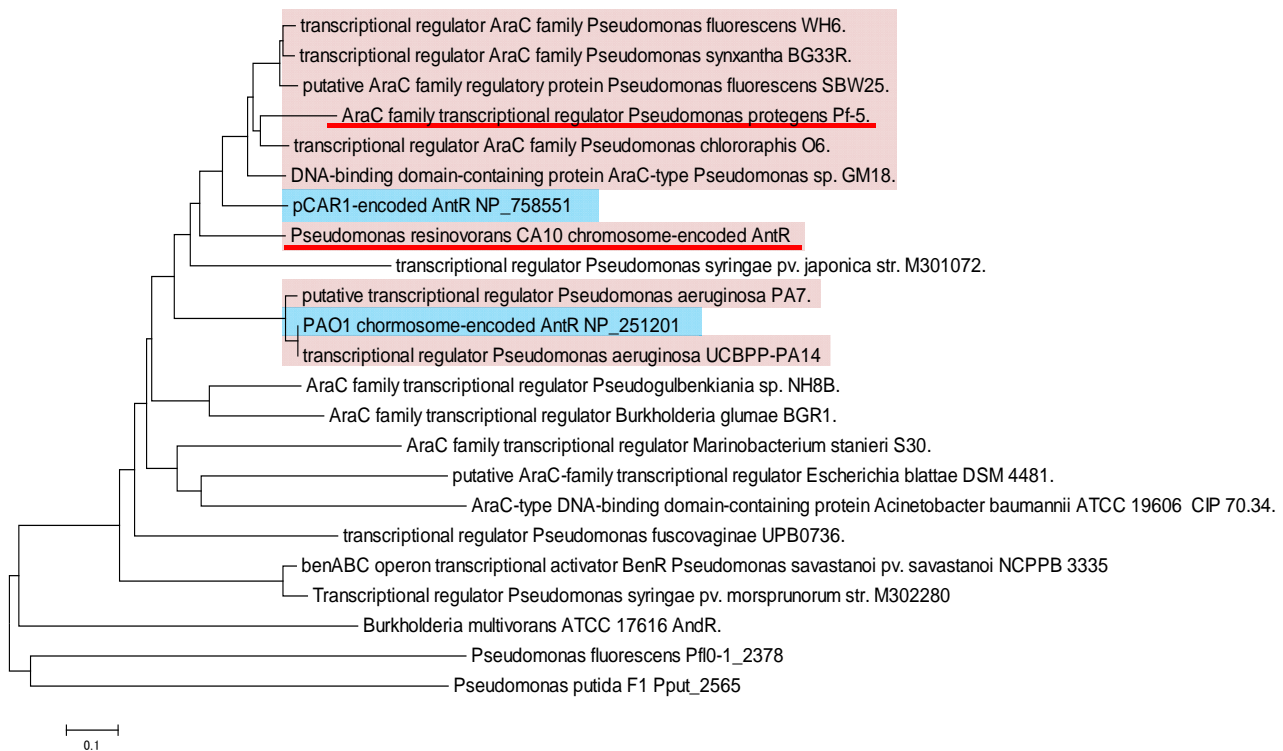
### 2-3-2-8. pCAR1 の分解系遺伝子群の発現に機能する AntR ホモログの考察

ここまで PAO1 における *antR<sub>PA</sub>* を通して, 宿主が異なることで pCAR1 上 *antR* の発現制御ネットワークが変化する可能性が示された. ここで, AntR のホモログとして機能するものが AntR<sub>PA</sub> 以外にどの程度存在するかを検証するために, AntR を query として protein blast search を行い, 抽出したホモログをもとに系統樹を作製した. その結果, *P. aeruginosa* や *P. fluorescens* に属する複数の株においては identity 60% 以上のホモログが存在した一方で, 本研究において使用した *P. putida* においては相同性の高いものを見出すことができなかった (Fig. 2-28). また, *P. fluorescens* であっても, Pf0-1 からは基準を満たすホモログが抽出されなかった. このことから, 例外はあるものの *Pseudomonas* 属においては *P. aeruginosa* や *P. fluorescens* など特定の種において, よく保存されていると考えられる. また, 海洋細菌である *Marinobacterium stanieri* やイネ病原菌である *Burkholderia glumae* などにおいてもホモログが存在していた. この内, *antR<sub>PA</sub>* と同程度あるいはそれ以上の identity をもつものは pCAR1 に影響を与える可能性が特に高いとみている.

以上のことから, 宿主が異なることで発現制御ネットワークが変化する現象は PAO1 特異的なことではなく, 他の多くの株を宿主とした時にも起こることが予想された. 実際に, 60% 程度の identity を有するホモログをもつ株 (*P. resinovorans* CA10 や *P. protegens* Pf-5) においてはアントラニル酸処理により P<sub>*antR*</sub> プロモーターの発現誘導が起きることがレポーター解析によって示され (Fig. 2-29), その予想が正しいことが裏付けられている.



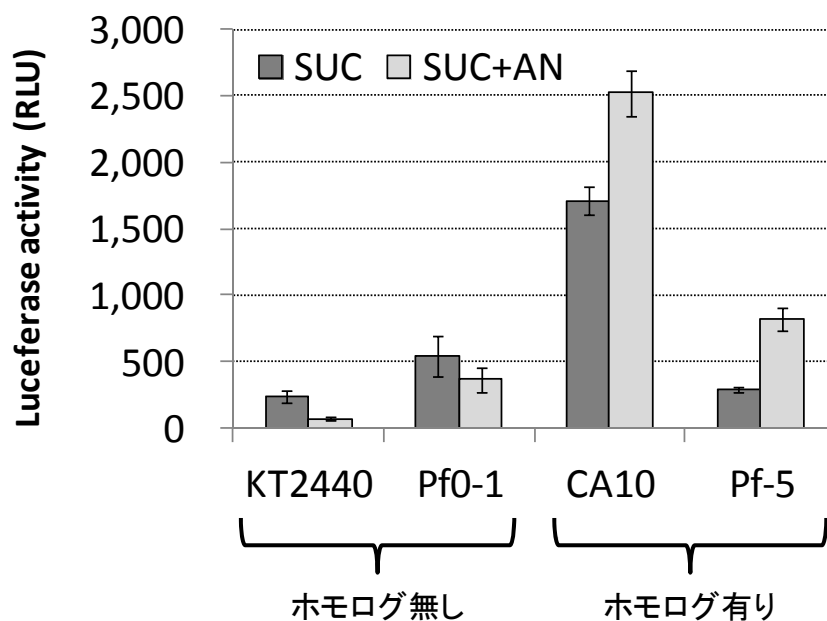




**Fig. 2-28. AntR ホモログの系統樹解析結果**

pCAR1 にコードされた AntR を query として、protein blast search を行った。抽出されたデータを同様に query coverage 90%以上、相同性 40%以上を満たすホモログを選抜し、MEGA5.1 を用いて系統樹を作製した。また、*P. resinovorans* CA10 染色体上にコードされているホモログも加えた。また、基準を満たさないが KT2440 または Pf0-1 において AntR と最も identity のある候補及びこれまでに良く似た機能をもつことが報告されている *Burkholderia multivorans* における AndR を候補に加え、系統樹に加えた。

AntR (pCAR1-encoded AntR) 及び AntR<sub>PA</sub> (PAO1 chromosome-encoded AntR) を青い網かけで示し、AntR<sub>PA</sub> と同様に 60%程度の identity を持つものを赤い網かけで示した。また、PAO1 以外にホモログの機能を確認するために使用した株については下線を引いた。



**Fig. 2-29. *antR* ホモログをもつ株におけるレポーター解析**

グラフはコハク酸（黒色のバー）、コハク酸+アントラニル酸（灰色のバー）を炭素源として培養した各株のルシフェラーゼ活性を示す。エラーバーは3連の測定結果から算出した標準誤差を示す。AntR ホモログをもたない株として、*P. putida* KT2440 及び *P. fluorescens* Pf0-1 を用いた。また、ホモログをもつ株として、*P. resinovorans* CA10 及び *P. protegens* Pf-5 を用いた。図中においては、それぞれ株の名称で表記した。また、CA10 については pCAR1 をもたないもの (CA10 dm4) を使用している。

### 2-3-3. *Pseudomonas* 属以外における *antR* の転写活性化ポテンシャルの検証

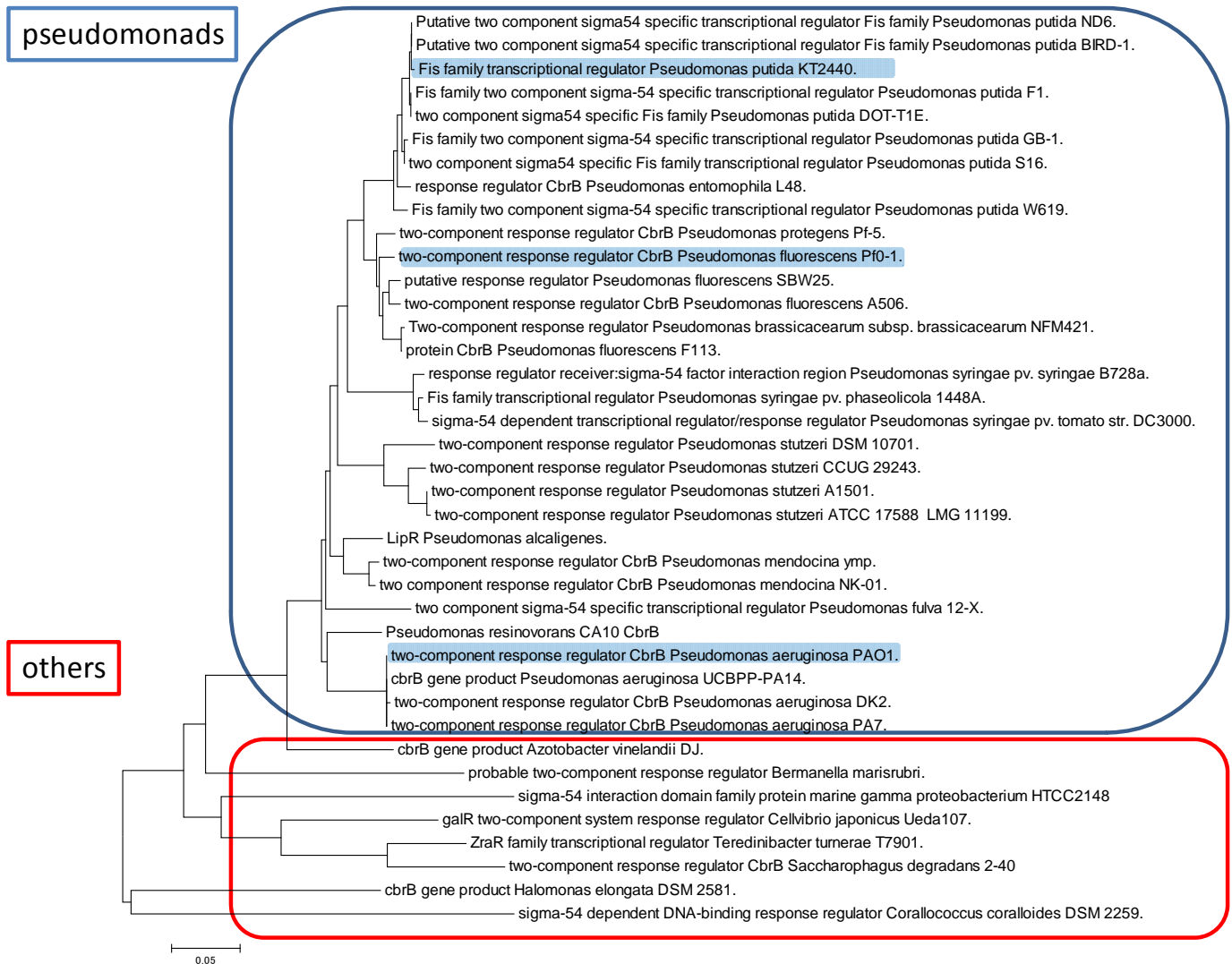
*antR* の発現制御は宿主依存的であり、特に CbrB が転写活性化に必要となる。このことから、必然的に分解能を獲得できる宿主が限定されることになる。そこで、*antR* の転写活性化ポテンシャルをもつ可能性がある細菌を同定するため、これまでに解読されたゲノム情報をもとに網羅的に解析することとした。

#### 2-3-3-1. *antR* の転写活性化に重要な各コンポーネントの保存性

*antR* の発現制御モデル (Fig. 2-27) から、その発現に最も重要な因子の 1 つは CbrB であり、その存在により pCAR1 の宿主となる菌が分解能力を獲得できるようになる。そこで、KT2440 由来 CbrB のアミノ酸配列をもとに protein blast search による CbrB のホモログ分布を調べ、系統樹を作製した。その結果、既述の通りゲノム既知の *Pseudomonas* 属細菌全てにおいて同源性 80% 以上のホモログが見出された。それに加えて、窒素固定細菌 *Azotobacter vinelandii* DJ や好塩細菌 *Halomonas elongata* DSM2581 等においても identity がそれぞれ 78%, 61% のホモログが存在していた (Fig. 2-30)。一方で、pCAR1 の宿主候補として見出されている *Stenotrophomonas* 属 (Shintani *et al.*, 2008) や *Delftia* 属 (新谷, unpublished data) におけるホモログは見出されなかった。このことは、これらの細菌において CbrB に代わる因子が存在しなければ、pCAR1 の宿主でありながら *Pseudomonas* 属と異なりカルバゾール分解能を獲得できないことを示唆している。

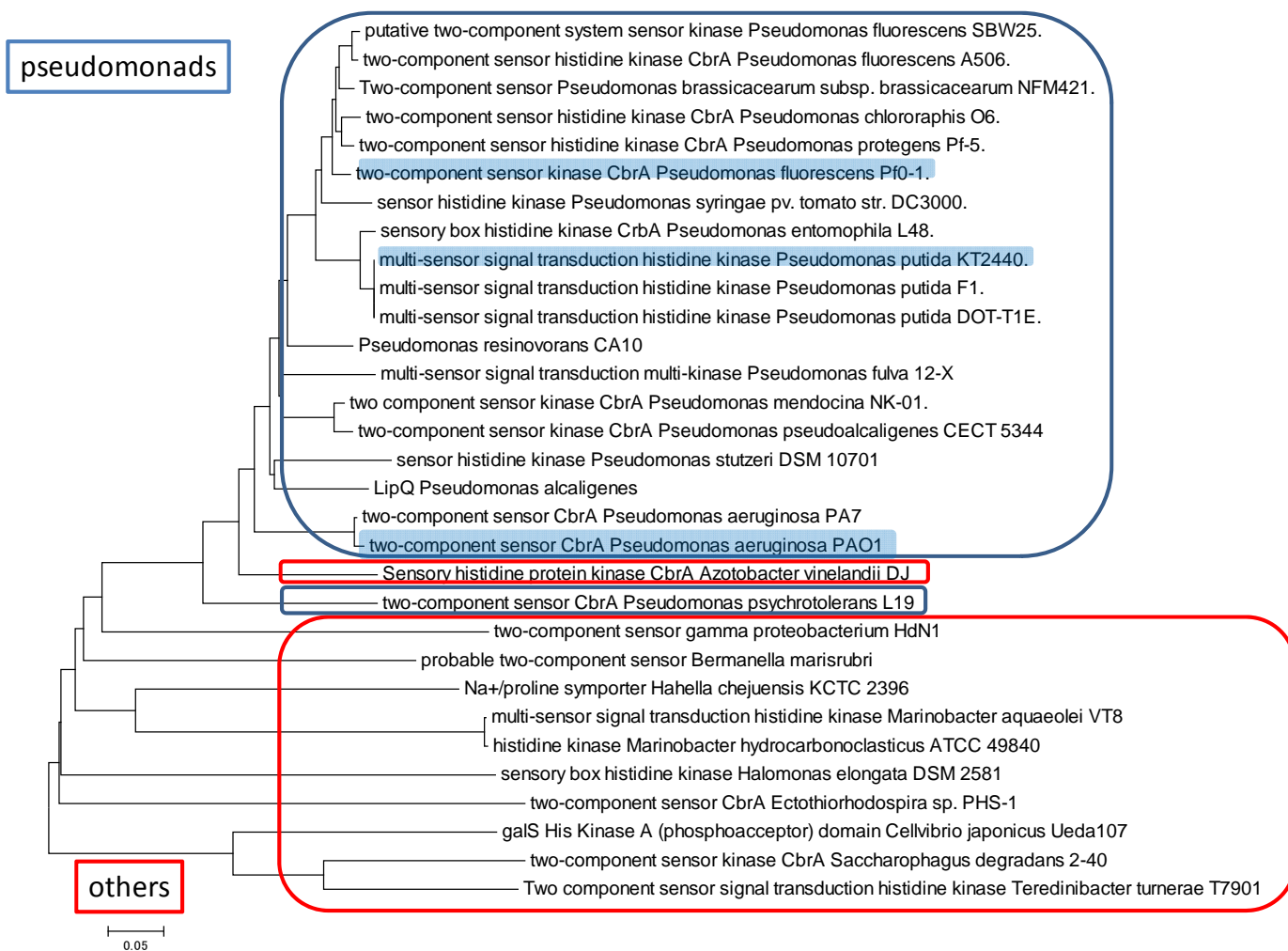
また sensor kinase CbrA のホモログについても、CbrB 同様に *Pseudomonas* 属間では 80% 以上の高い保存性が維持されていた。このことは、ほぼ全ての *Pseudomonas* 属が pCAR1 を保持することでカルバゾール分解能力を獲得できることを改めて支持するものである。また、CbrB を持っていた *Azotobacter* や *Halomonas* 属細菌においても CbrA ホモログが存在しており、CbrA は CbrB と共に 1 つの二成分制御系として一定の細菌に保存されていることが分かった (Fig. 2-31)。

一方で、CbrB のレギュロンである small RNA CrcZ についてのホモログの分布を見てみると、*Pseudomonas* 属においては一様にホモログを見出すことができたものの、それ以外では *Azotobacter vinelandii* DJ を除いて保存性の高いホモログは見出すことができなかった (Fig. 2-32)。また、*P. aeruginosa* 間ではそれぞれ 100% 近い保存性があるのに対し、*P. aeruginosa* と他種 (例えば、*P. putida* や *P. fluorescens*) では 75% 程度の保存性にとどまった。さらに系統樹を作製する際には利用しなかったが、同じ *Pseudomonas* の中でも *P. putida* や *P. fluorescens* 染色体上には、CrcZ ホモログが複数種類コードされており、種に応じて進化していると考えられた。特に、*P. putida* においては CrcZ のホモログ CrcY として研究が進められている (Fonseca *et al.*, 2012; Moreno *et al.*, 2012)。



**Fig. 2-30. CbrB ホモログの系統樹解析結果**

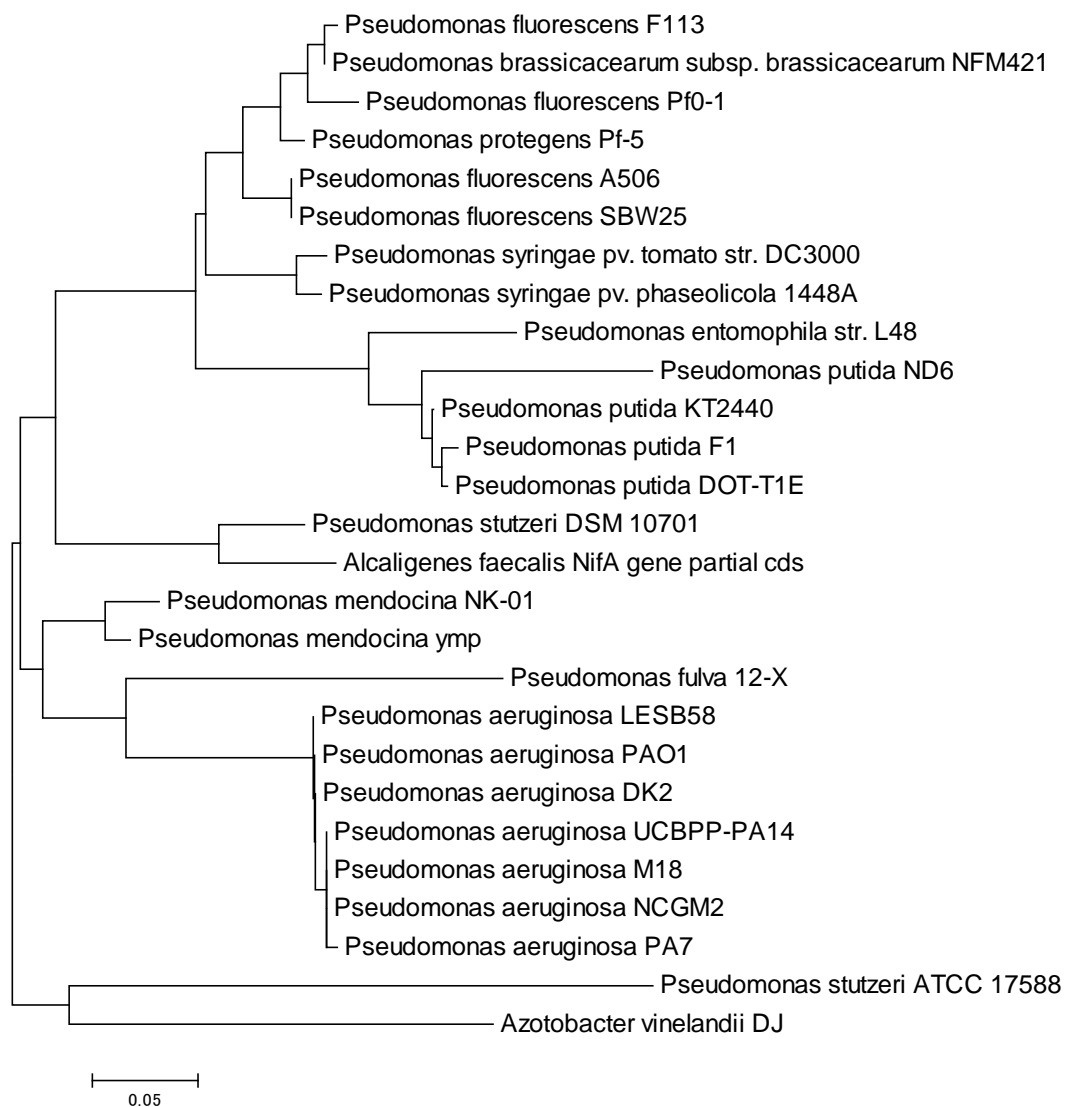
*P. putida* KT2440 由来 CbrB のアミノ酸配列を query とし protein blast search を行った。抽出されたホモログ候補の内、query coverage 95%以上、identity 60%以上を満たすものを選抜した。系統樹作製は MEGA5.1 により行った。青枠内のホモログは *Pseudomonas* 属由来を、赤枠内のホモログは他属種由来を示す。また、pCAR1 の宿主として代表的なものを網かけで示した。



**Fig. 2-31. CbrA ホモログの系統樹解析結果**

*P. putida* KT2440 由来 CbrA のアミノ酸配列を query とし protein blast search を行った。

抽出されたホモログ候補の内、query coverage 95%以上、identity 40%以上を満たすものを選抜した。青枠内のホモログは *Pseudomonas* 属由来を、赤枠内のホモログは他属種由来を示す。pCAR1 の宿主として代表的なものを網かけで示した。



**Fig. 2-32. CrcZ** ホモログの系統樹解析結果

*P. aeruginosa* PAO1におけるCrcZをqueryとして、nucleotide blast searchを行った。抽出されたデータをquery coverage 75%以上、相同性70%以上を満たすホモログを選抜し、系統樹を作製した。なおqueryに用いた配列はPseudomonas Genome Databaseに公表されているものを参照した。

### 2-3-3-2. pCAR1 の宿主およびその候補における *antR* の転写制御について

系統樹解析の結果より, *Azotobacter* や *Halomonas* 属細菌の一部においても CbrB ホモログの存在を理由に *antR* の転写活性化が起きる可能性が示された. その一方で, pCAR1 の宿主候補でありながら, *Delftia* や *Stenotrophomonas* 属細菌においてはホモログが存在せず, 分解能を獲得できないことが予想された.

そこで pCAR1 の宿主・非宿主を問わずに多様な細菌における *antR* の転写制御の可能性をレポーター解析で検証し, 各種細菌を通して発現制御モデルの妥当性および宿主依存性について検討することとした. 解析に供した菌は Table 2-1 で示した 7 種類である. その内の 4 種についてはエレクトロポレーションによる形質転換が可能なことから, レポータープラスミドによる転写活性化ポテンシャルの解析を行った. その結果, 相同性の高いホモログが存在する *P. stutzeri* においてはルシフェラーゼの発現を確認できた一方で, 重要な因子のホモログを持ち合わせない *Delftia tsuruhatensis* や *E. coli* K-12 においては活性を確認することができなかった (Fig. 2-33). また, CbrA-CbrB のホモログを持つ *Halomonas elongata* についても顕著な活性を確認することができなかった.

### 2-3-3-3. *antR* の転写活性化ポテンシャル測定結果からの考察

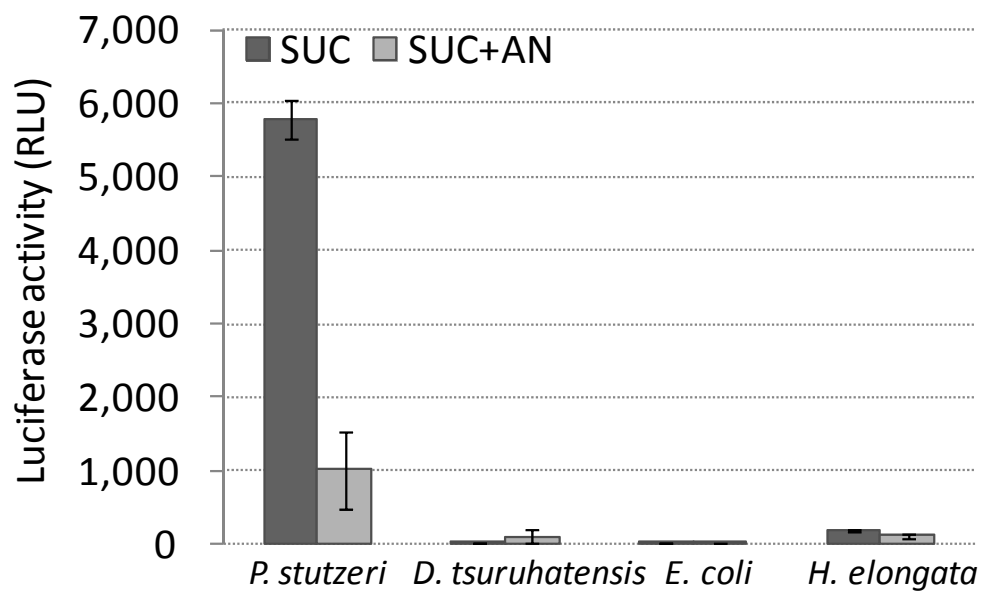
これまで KT2440 や PAO1 を始めとして, アントラニル酸による発現誘導を確認することができたが, *P. stutzeri* においてはアントラニル酸により発現が低下した. その原因は不明であるが, 同じ *Pseudomonas* 属細菌であることから, CbrA-CbrB 二成分制御系は高度に保存されており, basal な発現については KT2440 や PAO1 と比較して変わらない結果だと考えられる. また, レポータープラスミドから供給される AntR も他の株の時と同様に機能することを考えると, 基本的な発現制御系に大きな変化が生じる可能性は低い. そこで, 宿主固有の因子がアントラニル酸依存的に発現を阻害するのではないかと推測している. 候補となる因子を予測するのは難しいが, 例えば安息香酸などの分解を担う BenR など AntR と同様にエフェクター存在下で DNA に結合するタンパク質が AntR の結合サイトに競合的に結合することレポーター遺伝子の発現が阻害されるのかもしれない. また当研究室においてこれまでに単離された *P. stutzeri* OM1 は pCAR1 上の *car* 遺伝子群を持つ株であり (Shintani *et al.*, 2003), その制御に関連する因子による影響も他の *Pseudomonas* と違う挙動を示す原因の 1 つではないかと考えられる.

また, *Delftia tsuruhatensis* や *E. coli* において発現が見られないのは CbrB ホモログが存在せず, かつ代替的な因子が存在しないことを示唆しており, 制御モデルが妥当であることを裏付けるものである. このことから, *Delftia* は pCAR1 の宿主の 1 つでありながら, カルバゾール分解菌ではない可能性が示された. つまり, pCAR1 にとって *Delftia* は分解菌として最適な宿主ではないといえるが, *Delftia* を介した接合伝達は *Pseudomonas* を宿主とした時には移動困難であった細菌に移動できる機会を得られる可能性もある. 分解プラスミドの宿主域を決定するのは分解系遺伝子群ではないため, 今後 pCAR1 のように宿主

依存的な発現制御系をもつプラスミドの場合に、分解能力を獲得できない宿主にはどのような役割があるのか非常に興味をもたれるところである。

ところで、残りの3種類 (*Azotobacter*, *Burkholderia*, *Sphingomonas*) の細菌については染色体組み込み型レポーターを用いた解析を行う予定であり、現在目的の断片を組み込んだ株を取得中である。今後、その結果と合わせて総合的な議論をしたいと考えている。特に今回ホモログを持っているにも関わらず活性の出なかった *Halomonas* 属細菌については、その保存性が相対的に低いことでシグナル伝達を効率的に行うために重要な残基が保存されていないことが原因ではないかと考えられるが、*Pseudomonas* 属と同程度に保存された **CbrB** をもつ *Azotobacter* における転写活性化の解析結果と合わせて議論することで、**CbrB** のアミノ酸残基の置換がどの程度許容されるのか等、より詳細な考察ができると考えられる。





**Fig. 2-33. 他属種の細菌における *antR* 転写活性化ポテンシャルの検討**

グラフはコハク酸（黒色のバー）、コハク酸+アントラニル酸（灰色のバー）を炭素源として培養した各株のルシフェラーゼ活性を示した。エラーバーは最低3連の測定結果から算出した標準誤差を示す。

### 第3章 総括と展望

本研究では、カルバゾール分解プラスミド pCAR1 上にコードされた分解系制御遺伝子 *antR* の宿主依存的な発現制御機構を解明するため、主に *P. putida* KT2440 を宿主として種々の解析を行った。

前章における前半部分においては、宿主染色体由来の global response regulator CbrB が *antR* の転写活性化に中心的な役割を果たし、特に basal な発現量に寄与することを明らかにした。また、CbrB は *antR* の発現制御においてその転写段階だけでなく、small RNA CrcZ を介して翻訳段階においても機能する可能性があることを示した。一方で、スクリーニング時に必要なレポータープラスミドの作製を通して、AntR が正のオートレギュレーション機能をもつことが分かった。また AntR はアントラニル酸存在下において、特に誘導的な発現に中心的に寄与する可能性が高いことが示された。さらに、アントラニル酸以外に炭素飢餓条件によっても *antR* の転写が誘導されることが確認された。共に DNA 結合タンパク質である CbrB 及び AntR が、それぞれ  $P_{antR}$  プロモーター活性化にどのように機能するのかについての詳細な解析が今後の課題である。本研究における種々のレポーター解析の結果からは、2種類のタンパク質が存在して初めて顕著なレポーター活性を得られることから、CbrB 及び AntR は  $P_{antR}$  プロモーターの活性化に協調的に作用していると考えている (Fig. 2-16)。CbrB については、N 末端アミノ酸の一部を欠失することで DNA 結合能が上昇する理由について依然として不明であり、response regulator としてリン酸化されると同様の現象が起きるのか興味を持たれるところである。また、CbrB にシグナルを伝達するとされる CbrA は Na<sup>+</sup>ポンプとしての機能がアミノ酸配列の一部から予想され、実際に感知しているシグナルの正体についての詳細な知見が得られることで、*antR* の発現制御系の全体像がより一層明らかになると期待される。

上述の結果及び *Pseudomonas* 属における CbrB のアミノ酸レベルでの保存性の高さから、*Pseudomonas* 属の宿主共通で CbrB が *antR* の転写制御に関与することを結論づけることができた。そして、CbrA-CbrB 二成分制御系は炭素源の変化 (炭素飢餓条件) に応じて *antR* の転写を活性化し、それに伴って分解系遺伝子群の発現誘導が起きるという一連の基本的な発現制御モデル (Fig. 2-14) を構築するに至った。

前章の後半部分においては、異なる宿主である *P. aeruginosa* PAO1 にまず着目した。そして、その染色体上に存在する *antR* ホモログ (*antR<sub>PA</sub>*) が pCAR1 上の分解系遺伝子群のプロモーターを活性化させること及びその転写制御が pCAR1-*antR* と異なる  $\sigma^{70}$  依存的なものであることを突き止めた。その結果から、宿主が変わることで CbrB 以外の宿主固有の因子によっても発現制御モデルのネットワークが変化しうることを見出した。それにより、各宿主で獲得する分解能力が違うのではないかという仮説を考えるに至った。その仮説を検証するため、pCAR1 の代表的な 3 宿主 (*P. putida* KT2440, *P. aeruginosa* PAO1, *P.*

*fluorescens* Pf0-1) を用いて、アントラニル酸処理による分解系遺伝子群の転写プロファイル測定したところ、少なくとも *antR<sub>PA</sub>* と *pCAR1-antR* で転写プロファイルに違いがあり、条件によっては宿主ごとに分解力が異なることが示唆された。さらに、*pCAR1* の宿主候補である *Delftia* 属細菌をはじめとして、*CbrB* ホモログを持たない多くの細菌においては分解系遺伝子群が機能するネットワークを持ちうるのかを調べたところ、少なくとも本研究において解析した種類の菌においては、代替的なネットワークは存在せず、発現制御モデルの保存性が重要であることが分かった。

以上、複数のモデル宿主を用いた解析を通して、宿主依存的というユニークな形質をもつプラスミド上の *antR* の発現制御モデルについて構築し、その機能変化について言及することができた (Fig. 2-27)。その一方で、*CbrB* ホモログをはじめとして、*AntR* の発現に関与する因子を持つ菌が *Pseudomonas* 属細菌を超えて一部の細菌において保存されていることから、そういった細菌においては宿主域を超えて発現系が機能する可能性が示唆された。

結果的にではあるが、分解系遺伝子群の発現が炭素源をモニターする因子の下流にあることは非常に合理的である。優良な炭素源に恵まれた環境下においては、それらを最大限に有効活用することが望まれるが、実環境中において常に優良な炭素源に恵まれることは難しく、各細菌は炭素飢餓に近い環境で利用しにくい炭素源を使った生育が求められる場合もある。そのような状況下、通常は他の細菌が炭素源として利用不可能なカルバゾールについて資化できるシステムを持ち合わせることは、環境に適応できる可能性が上がると考えられる。また一方で、他の細菌が支配的な環境においても、その細菌が使えない炭素源を *pCAR1* の宿主となることで利用可能になれば、一見生存に不利な環境においてもしたたかに生き残ることができると予想される。

現在までに知る限り、*pCAR1* 以外に宿主依存的な発現制御機構を備えもつ分解プラスミドは見つかっておらず、同じ分解プラスミドであってもトルエン分解プラスミド *pWW0* やナフタレン分解プラスミド *NAH-7* などは分解系遺伝子群とそのレギュレーターを同じプラスミド上に持っている。中でも *pWW0* は *pCAR1* と同様に  $\sigma^{54}$  依存的な *P<sub>u</sub>* プロモーターを持っているものの、同じプラスミド上にそれに対応する  $\sigma^{54}$ -dependent activator である *XylR* が存在するため (Ramos *et al.*, 1997)、*pCAR1* のように宿主依存的とはいえない。そのため、本研究対象の *antR* の宿主依存的な発現系は非常にユニークなシステムであると言える。そこで、プラスミド上の発現系を宿主に委ねることによってどのような意義があるかについて以下考察した。

*antR* の発現制御系は基本的には宿主因子 *CbrB* に依存するものであるが、なぜ同じ *pCAR1* 上にコードされていないかという疑問がまず持たれる。宿主の特定の因子に依存する発現制御系をもつことは、分解能を獲得できる宿主を限定することに他ならないと考えられる。しかし、系統樹解析の結果から *pCAR1* の主な宿主域である *Pseudomonas* 属は全て *cbrB* 遺伝子を備えており、*pCAR1* が *Pseudomonas* 属を宿主とする限り、*antR* の発現

制御が行われなくなることはない。このことから pCAR1 は *cbrB* 遺伝子をあえて持たないことで、特に機能的な不利を伴わずにゲノムサイズ（プラスミドサイズ）を縮小させることができると考えられ、その結果としてより安定的に宿主内で存在できるのではないかと考えられる。

また、宿主においてもカルバゾール分解系の発現は宿主自身がコントロールすることでより生存に有利になると考えられる。仮に宿主に非依存的にカルバゾール分解系遺伝子群の発現がなされるとすると、優良な炭素源が他に存在する場合においてそれは宿主にとって「コスト」でしかない。しかし、例えば炭素飢餓時などに宿主依存的に利用できる炭素源を増やすことができるとすれば、生存競争において非常に有利になると考えられる。

もちろん、上述したように宿主を限定してしまうという不利な点は存在するが、中心的な位置を占める宿主域での宿主との共存を考えるならば、宿主とプラスミドの両方にとって宿主依存的であることが、都合が良いように思える。特に狭宿主域のプラスミドについては、その不利な点をほとんど考慮しなくて良い可能性もある。今後、宿主依存的な制御を受けるプラスミド上の遺伝子が見つかりと予想されるが、それらについての解析が行われることで上述の仮説の妥当性が明らかになるとみている。

今後はそのような宿主依存的な発現制御機構の生物学的役割が詳細に解明されることを期待したい。特に、宿主あるいはプラスミドの相互の進化にとってどのような影響を及ぼすのか、他のプラスミドと比較しながら解析することで宿主-プラスミド間の相互作用と合わせて新たな一面が見えてくると考えている。また、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。

- Abdou, L., Chou, H. T., Haas, D. & Lu, C. D. (2011). Promoter Recognition and Activation by the Global Response Regulator CbrB in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* **193**, 2784-2792.
- Abril, M. A., Buck, M. & Ramos, J. L. (1991). Activation of the *Pseudomonas* TOL plasmid upper pathway operon. Identification of binding sites for the positive regulator XylR and for integration host factor protein. *J Biol Chem* **266**, 15832-15838.
- Barrios, H., Valderrama, B. & Morett, E. (1999). Compilation and analysis of sigma(54)-dependent promoter sequences. *Nucleic Acids Res* **27**, 4305-4313.
- Bathe, S., Schwarzenbeck, N. & Hausner, M. (2005). Plasmid-mediated bioaugmentation of activated sludge bacteria in a sequencing batch moving bed reactor using pNB2. *Lett Appl Microbiol* **41**, 242-247.
- Beck, L. L., Smith, T. G. & Hoover, T. R. (2007). Look, no hands! Unconventional transcriptional activators in bacteria. *Trends Microbiol* **15**, 530-537.
- Bertoni, G., Fujita, N., Ishihama, A. & de Lorenzo, V. (1998). Active recruitment of sigma54-RNA polymerase to the Pu promoter of *Pseudomonas putida*: role of IHF and alphaCTD. *EMBO J* **17**, 5120-5128.
- Borukhov, S. & Severinov, K. (2002). Role of the RNA polymerase sigma subunit in transcription initiation. *Res Microbiol* **153**, 557-562.
- Browne, P., Barret, M., O'Gara, F. & Morrissey, J. P. (2010). Computational prediction of the Crc regulon identifies genus-wide and species-specific targets of catabolite repression control in *Pseudomonas* bacteria. *BMC Microbiol* **10**, 300.
- Cannon, W. V., Chaney, M. K., Wang, X. & Buck, M. (1997). Two domains within sigmaN (sigma54) cooperate for DNA binding. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 5006-5011.
- Cases, I., Ussery, D. W. & de Lorenzo, V. (2003). The sigma54 regulon (sigmulon) of *Pseudomonas putida*. *Environ Microbiol* **5**, 1281-1293.
- de Lorenzo, V., Herrero, M., Metzke, M. & Timmis, K. N. (1991). An upstream XylR- and

IHF-induced nucleoprotein complex regulates the sigma 54-dependent Pu promoter of TOL plasmid. *EMBO J* **10**, 1159-1167.

**Doucleff, M., Pelton, J. G., Lee, P. S., Nixon, B. T. & Wemmer, D. E. (2007).** Structural Basis of DNA Recognition by the Alternative Sigma-Factor,  $\sigma^{54}$ . *J Mol Biol* **369**, 1070-1078.

**Doyle, M., Fookes, M., Ivens, A., Mangan, M. W., Wain, J. & Dorman, C. J. (2007).** An H-NS-like stealth protein aids horizontal DNA transmission in bacteria. *Science* **315**, 251-252.

**Feklistov, A. & Darst, S. A. (2011).** Structural basis for promoter-10 element recognition by the bacterial RNA polymerase sigma subunit. *Cell* **147**, 1257-1269.

**Fonseca, P., Moreno, R. & Rojo, F. (2012).** Pseudomonas putida growing at low temperature shows increased levels of CrcZ and CrcY sRNAs, leading to reduced Crc-dependent catabolite repression. *Environ Microbiol*.

**Gao, R., Mack, T. R. & Stock, A. M. (2007).** Bacterial response regulators: versatile regulatory strategies from common domains. *Trends Biochem Sci* **32**, 225-234.

**Ghosh, T., Bose, D. & Zhang, X. (2010).** Mechanisms for activating bacterial RNA polymerase. *FEMS Microbiol Rev* **34**, 611-627.

**Gu, B., Lee, J. H., Hoover, T. R., Scholl, D. & Nixon, B. T. (1994).** Rhizobium meliloti DctD, a sigma 54-dependent transcriptional activator, may be negatively controlled by a subdomain in the C-terminal end of its two-component receiver module. *Mol Microbiol* **13**, 51-66.

**Hawley, D. K. & McClure, W. R. (1983).** Compilation and analysis of Escherichia coli promoter DNA sequences. *Nucleic Acids Res* **11**, 2237-2255.

**Helmann, J. D. & Chamberlin, M. J. (1988).** Structure and function of bacterial sigma factors. *Annu Rev Biochem* **57**, 839-872.

**Hervas, A. B., Canosa, I. & Santero, E. (2008).** Transcriptome analysis of Pseudomonas putida in response to nitrogen availability. *J Bacteriol* **190**, 416-420.

- Hoang, T. T., Karkhoff-Schweizer, R. R., Kutchma, A. J. & Schweizer, H. P. (1998).** A broad-host-range Flp-FRT recombination system for site-specific excision of chromosomally-located DNA sequences: application for isolation of unmarked *Pseudomonas aeruginosa* mutants. *Gene* **212**, 77-86.
- Hong, E., Doucleff, M. & Wemmer, D. E. (2009).** Structure of the RNA polymerase core-binding domain of sigma(54) reveals a likely conformational fracture point. *J Mol Biol* **390**, 70-82.
- Itoh, N., Kouzai, T. & Koide, Y. (1994).** Efficient transformation of pseudomonas strains with pNI vectors by electroporation. *Biosci Biotechnol Biochem* **58**, 1306-1308.
- Itoh, Y., Nishijyo, T. & Nakada, Y. (2004).** Histidine Catabolism and Catabolite Regulation. In *Pseudomonas*, pp. 371-395. Edited by J.-L. Ramos. New York: Kluwer Academic / Plenum Publishers.
- Jacobs, M. A., Alwood, A., Thaipisuttikul, I. & other authors (2003).** Comprehensive transposon mutant library of *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 14339-14344.
- Jurado, P., Fernandez, L. A. & de Lorenzo, V. (2003).** Sigma 54 levels and physiological control of the *Pseudomonas putida* Pu promoter. *J Bacteriol* **185**, 3379-3383.
- Kim, S. K., Im, S. J., Yeom, D. H. & Lee, J. H. (2012).** AntR-mediated bidirectional activation of antA and antR, anthranilate degradative genes in *Pseudomonas aeruginosa*. *Gene* **505**, 146-152.
- Kovach, M. E., Elzer, P. H., Hill, D. S., Robertson, G. T., Farris, M. A., Roop, R. M., 2nd & Peterson, K. M. (1995).** Four new derivatives of the broad-host-range cloning vector pBBR1MCS, carrying different antibiotic-resistance cassettes. *Gene* **166**, 175-176.
- Krell, T., Lacal, J., Busch, A., Silva-Jimenez, H., Guazzaroni, M. E. & Ramos, J. L. (2010).** Bacterial sensor kinases: diversity in the recognition of environmental signals. *Annu Rev Microbiol* **64**, 539-559.
- Liu, M. Y., Gui, G., Wei, B., Preston, J. F., 3rd, Oakford, L., Yuksel, U., Giedroc, D. P. &**

- Romeo, T. (1997).** The RNA molecule CsrB binds to the global regulatory protein CsrA and antagonizes its activity in *Escherichia coli*. *J Biol Chem* **272**, 17502-17510.
- Livny, J. & Waldor, M. K. (2007).** Identification of small RNAs in diverse bacterial species. *Curr Opin Microbiol* **10**, 96-101.
- Maeda, K., Nojiri, H., Shintani, M., Yoshida, T., Habe, H. & Omori, T. (2003).** Complete nucleotide sequence of carbazole/dioxin-degrading plasmid pCAR1 in *Pseudomonas resinovorans* strain CA10 indicates its mosaicity and the presence of large catabolic transposon Tn4676. In *J Mol Biol*, pp. 21-33.
- Marques, P. D.-C. a. S. (2004).** Compiling  $\sigma^{70}$ -Dependent Promoter. In *Pseudomonas*, pp. 319-343. Edited by J.-L. Ramos. New York: Kluwer Academic / Plenum Publishers.
- Merrick, M. J. (1983).** Nitrogen control of the nif regulon in *Klebsiella pneumoniae*: involvement of the ntrA gene and analogies between ntrC and nifA. *EMBO J* **2**, 39-44.
- Merrick, M. J. (1993).** In a class of its own--the RNA polymerase sigma factor sigma 54 (sigma N). *Mol Microbiol* **10**, 903-909.
- Miyakoshi, M., Urata, M., Habe, H., Omori, T., Yamane, H. & Nojiri, H. (2006).** Differentiation of carbazole catabolic operons by replacement of the regulated promoter via transposition of an insertion sequence. *J Biol Chem* **281**, 8450-8457.
- Miyakoshi, M., Shintani, M., Terabayashi, T., Kai, S., Yamane, H. & Nojiri, H. (2007).** Transcriptome analysis of *Pseudomonas putida* KT2440 harboring the completely sequenced IncP-7 plasmid pCAR1. *J Bacteriol* **189**, 6849-6860.
- Miyakoshi, M., Nishida, H., Shintani, M., Yamane, H. & Nojiri, H. (2009).** High-resolution mapping of plasmid transcriptomes in different host bacteria. *BMC Genomics* **10**, 12.
- Mondragon, V., Franco, B., Jonas, K., Suzuki, K., Romeo, T., Melefors, O. & Georgellis, D. (2006).** pH-dependent activation of the BarA-UvrY two-component system in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **188**, 8303-8306.
- Moreno, R. & Rojo, F. (2008).** The target for the *Pseudomonas putida* Crc global regulator in



the benzoate degradation pathway is the BenR transcriptional regulator. *J Bacteriol* **190**, 1539-1545.

**Moreno, R., Fonseca, P. & Rojo, F. (2010).** The Crc global regulator inhibits the *Pseudomonas putida* pWW0 toluene/xylene assimilation pathway by repressing the translation of regulatory and structural genes. *J Biol Chem* **285**, 24412-24419.

**Moreno, R., Fonseca, P. & Rojo, F. (2012).** Two small RNAs, CrcY and CrcZ, act in concert to sequester the Crc global regulator in *Pseudomonas putida*, modulating catabolite repression. *Mol Microbiol* **83**, 24-40.

**Murakami, K. S. & Darst, S. A. (2003).** Bacterial RNA polymerases: the whole story. *Curr Opin Struct Biol* **13**, 31-39.

**Nishijyo, T., Haas, D. & Itoh, Y. (2001).** The CbrA-CbrB two-component regulatory system controls the utilization of multiple carbon and nitrogen sources in *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol Microbiol* **40**, 917-931.

**Nojiri, H., Sekiguchi, H., Maeda, K., Urata, M., Nakai, S., Yoshida, T., Habe, H. & Omori, T. (2001).** Genetic characterization and evolutionary implications of a car gene cluster in the carbazole degrader *Pseudomonas sp.* strain CA10. *J Bacteriol* **183**, 3663-3679.

**Nojiri, H., Maeda, K., Sekiguchi, H., Urata, M., Shintani, M., Yoshida, T., Habe, H. & Omori, T. (2002).** Organization and transcriptional characterization of catechol degradation genes involved in carbazole degradation by *Pseudomonas resinovorans* strain CA10. *Biosci Biotechnol Biochem* **66**, 897-901.

**Nojiri, H. (2012).** Structural and molecular genetic analyses of the bacterial carbazole degradation system. *Biosci Biotechnol Biochem* **76**, 1-18.

**Ogawa, N., McFall, S. M., Klem, T. J., Miyashita, K. & Chakrabarty, A. M. (1999).** Transcriptional activation of the chlorocatechol degradative genes of *Ralstonia eutropha* NH9. *J Bacteriol* **181**, 6697-6705.

**Oglesby, A. G., Farrow, J. M., Lee, J.-H., Tomaras, A. P., Greenberg, E. P., Pesci, E. C. & Vasil, M. L. (2008).** The influence of iron on *Pseudomonas aeruginosa* physiology. *THE JOURNAL*

*OF BIOLOGICAL CHEMISTRY* **283**, 15558-15567.

**Perez-Martin, J. & De Lorenzo, V. (1995).** The amino-terminal domain of the prokaryotic enhancer-binding protein XylR is a specific intramolecular repressor. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**, 9392-9396.

**Porrua, O., Garcia-Gonzalez, V., Santero, E., Shingler, V. & Govantes, F. (2009).** Activation and repression of a sigmaN-dependent promoter naturally lacking upstream activation sequences. *Mol Microbiol* **73**, 419-433.

**Ramos, J. L., Marques, S. & Timmis, K. N. (1997).** Transcriptional control of the Pseudomonas TOL plasmid catabolic operons is achieved through an interplay of host factors and plasmid-encoded regulators. *Annu Rev Microbiol* **51**, 341-373.

**Rappas, M., Bose, D. & Zhang, X. (2007).** Bacterial enhancer-binding proteins: unlocking sigma54-dependent gene transcription. *Curr Opin Struct Biol* **17**, 110-116.

**Rist, M. & Kertesz, M. A. (1998).** Construction of improved plasmid vectors for promoter characterization in Pseudomonas aeruginosa and other gram-negative bacteria. *FEMS Microbiol Lett* **169**, 179-183.

**Ronson, C. W., Astwood, P. M., Nixon, B. T. & Ausubel, F. M. (1987).** Deduced products of C4-dicarboxylate transport regulatory genes of Rhizobium leguminosarum are homologous to nitrogen regulatory gene products. *Nucleic Acids Res* **15**, 7921-7934.

**Sambrook, J. & Russell, D. W. (2001).** *Molecular Cloning*, third edition edn: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

**Shingler, V. (2011).** Signal sensory systems that impact sigma(5)(4) -dependent transcription. *FEMS Microbiol Rev* **35**, 425-440.

**Shintani, M., Nojiri, H., Yoshida, T., Habe, H. & Omori, T. (2003).** Carbazole/dioxin-degrading car gene cluster is located on the chromosome of Pseudomonas stutzeri strain OM1 in a form different from the simple transposition of Tn4676. *Biotechnol Lett* **25**, 1255-1261.

- Shintani, M., Habe, H., Tsuda, M., Omori, T., Yamane, H. & Nojiri, H. (2005).** Recipient range of IncP-7 conjugative plasmid pCAR2 from *Pseudomonas putida* HS01 is broader than from other *Pseudomonas* strains. *Biotechnol Lett* **27**, 1847-1853.
- Shintani, M., Fukushima, N., Tezuka, M., Yamane, H. & Nojiri, H. (2008).** Conjugative transfer of the IncP-7 carbazole degradative plasmid, pCAR1, in river water samples. *Biotechnol Lett* **30**, 117-122.
- Shintani, M., Takahashi, Y., Yamane, H. & Nojiri, H. (2010).** The behavior and significance of degradative plasmids belonging to Inc groups in *Pseudomonas* within natural environments and microcosms. *Microbes Environ* **25**, 253-265.
- Shintani, M., Horisaki, T., Yamane, H., Ohkuma, M. & Nojiri, H. (2011a).** Evolution of the IncP-7 carbazole-degradative plasmid pCAR1 improves survival of its host *Pseudomonas fluorescens* Pf0-1 in artificial water microcosms. *Microbiology* **157**, 2276-2286.
- Shintani, M., Tokumaru, H., Takahashi, Y., Miyakoshi, M., Yamane, H., Nishida, H. & Nojiri, H. (2011b).** Alterations of RNA maps of IncP-7 plasmid pCAR1 in various *Pseudomonas* bacteria. *Plasmid* **66**, 85-92.
- Sonnleitner, E., Abdou, L. & Haas, D. (2009).** Small RNA as global regulator of carbon catabolite repression in *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc Natl Acad Sci U S A*.
- Sorek, R., Kunin, V. & Hugenholtz, P. (2008).** CRISPR--a widespread system that provides acquired resistance against phages in bacteria and archaea. *Nat Rev Microbiol* **6**, 181-186.
- Sorensen, S. J., Sorensen, A. H., Hansen, L. H., Oregaard, G. & Veal, D. (2003).** Direct detection and quantification of horizontal gene transfer by using flow cytometry and *gfp* as a reporter gene. *Curr Microbiol* **47**, 129-133.
- Spohn, G. & Scarlato, V. (1999).** Motility of *Helicobacter pylori* is coordinately regulated by the transcriptional activator FlgR, an NtrC homolog. *J Bacteriol* **181**, 593-599.
- Studholme, D. J. & Dixon, R. (2003).** Domain architectures of sigma54-dependent transcriptional activators. *J Bacteriol* **185**, 1757-1767.

**Suzuki, C., Yun, C. S., Umeda, T., Terabayashi, T., Watanabe, K., Yamane, H. & Nojiri, H. (2011).** Oligomerization and DNA-binding capacity of Pmr, a histone-like protein H1 (H-NS) family protein encoded on IncP-7 carbazole-degradative plasmid pCAR1. *Biosci Biotechnol Biochem* **75**, 711-717.

**Suzuki, K., Wang, X., Weilbacher, T., Pernestig, A. K., Melefors, O., Georgellis, D., Babitzke, P. & Romeo, T. (2002).** Regulatory circuitry of the CsrA/CsrB and BarA/UvrY systems of *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **184**, 5130-5140.

**Tropel, D. & van der Meer, J. R. (2004).** Bacterial transcriptional regulators for degradation pathways of aromatic compounds. *Microbiol Mol Biol Rev* **68**, 474-500, table of contents.

**Urata, M., Miyakoshi, M., Kai, S., Maeda, K., Habe, H., Omori, T., Yamane, H. & Nojiri, H. (2004).** Transcriptional regulation of the ant operon, encoding two-component anthranilate 1,2-dioxygenase, on the carbazole-degradative plasmid pCAR1 of *Pseudomonas resinovorans* strain CA10. *J Bacteriol* **186**, 6815-6823.

**Utsumi, R. & Igarashi, M. (2012).** [Two-component signal transduction as attractive drug targets in pathogenic bacterial]. *Yakugaku Zasshi* **132**, 51-58.

**Vitale, E., Milani, A., Renzi, F., Galli, E., Rescalli, E., de Lorenzo, V. & Bertoni, G. (2008).** Transcriptional wiring of the TOL plasmid regulatory network to its host involves the submission of the sigma54-promoter Pu to the response regulator PprA. *Mol Microbiol* **69**, 698-713.

**Wilderman, P. J., Sowa, N. A., FitzGerald, D. J., FitzGerald, P. C., Gottesman, S., Ochsner, U. A. & Vasil, M. L. (2004).** Identification of tandem duplicate regulatory small RNAs in *Pseudomonas aeruginosa* involved in iron homeostasis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 9792-9797.

**Yun, C. S., Suzuki, C., Naito, K. & other authors (2010).** Pmr, a histone-like protein H1 (H-NS) family protein encoded by the IncP-7 plasmid pCAR1, is a key global regulator that alters host function. *J Bacteriol* **192**, 4720-4731.

**Zhang, X. X. & Rainey, P. B. (2007).** Genetic analysis of the histidine utilization (hut) genes in *Pseudomonas fluorescens* SBW25. *Genetics* **176**, 2165-2176.



## 謝辞

本博士論文研究を行うにあたり、素晴らしい研究環境と温かいご指導を頂きました東京大学生物生産工学研究センター環境保全工学研究室准教授、野尻秀昭先生に深く感謝申し上げます。また、同様に日頃よりご指導を頂きました同研究室助教の岡田憲典先生及び元同研究室の教授、現在は帝京大学理工学部バイオサイエンス学科にいらっしゃいます山根久和先生に深く感謝申し上げます。

本研究の結果の一部については、現東京農業大学生物資源ゲノム解析センター、松本貴嗣博士と共有するものであり、貴重な結果を惜しげもなく本博士論文研究のために供与して頂きました。また、本研究の解析全般的にわたるご協力を賜りました。この場を借りて厚く御礼を申し上げます。

研究者としての在り方や研究の方向性についてのご助言をはじめ、技術的な面まで親身に見て頂いた、現静岡大学工学部准教授、新谷政己先生に深く感謝申し上げます。

本研究にて使用した一部の菌株を供与して頂いた、東北大学大学院生命科学研究科教授、津田雅孝先生をはじめ、国立遺伝学研究所およびNITE（独立行政法人 製品評価技術基盤機構）の方に深く感謝申し上げます。

二成分制御系の **response regulator** 研究について技術的な面でご助言頂いた、長岡技術科学大学大学院工学研究科生物統合工学専攻、下平潤博士に深く感謝申し上げます。

RNA マッピングの解析をはじめ、本研究結果の考察をする上で示唆に富んだご助言を頂いた高橋裕里香博士に深く感謝申し上げます。

また、同期の梅田隆志博士、宮本皓司博士をはじめとする研究室の多くの方々から貴重なアドバイスを頂き、大変感謝しております。

最後に常に温かく見守り、経済面、精神面の支えとなってくれた家族・友人に感謝し、この論文を捧げます。

2013年3月