

染色体機能調節因子としての プラスミドの機能の解明

東京大学大学院 農学生命科学研究科
応用生命工学専攻

平成 21 年度入学 高橋裕里香
指 導 教 官 山 根 久 和

総 目 次

図表の目次
論文の内容の要旨
略語表

第 1 章 序論

1-1. これまでのプラスミド研究の概観	1
1-2. プラスミドが宿主の生育に与える影響についてのこれまでの報告	2
1-2-1. 生育の評価	
1-2-2. 代謝物・細胞内成分の測定	
1-2-3. モデリング・シミュレーションによる解析	
1-2-4. 長期培養実験	
1-2-5. これまでの研究のまとめと問題点	
1-3. カルバゾール分解プラスミドpCAR1	6
1-3-1. カルバゾール分解経路の解析, pCAR1の発見	
1-3-2. プラスミドとしてのpCAR1の解析	
1-3-3. pCAR1を保持する異なる宿主の比較	
1-3-4. pCAR1上にコードされる核様体タンパク質	
1-4. プラスミド上にコードされるNAPsに関する研究	9
1-5. 本研究の目的	10
第1章の図表	12

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

2-1. 緒言	21
2-2. 材料と方法	21
2-3. 結果と考察	26
2-3-1. pCAR1コピー数の測定	26
2-3-2. Phenotype MicroArray解析	26
(1) C, N, P, S源のいずれかを変化させた場合	26
(I) 2連の一致度の評価と“2株間で差が見られた条件”の選抜方法の検討	
(II) pCAR1の保持またはNAPsの除去によって呼吸量に差が見られた条件の選抜	
(III) 活性が変化している代謝経路の考察	
(2) 浸透圧ストレス・pHストレスを与えた場合	34
(I) 2連の一致度の評価と“2株間で差が見られた条件”の選抜方法の検討	
(II) pCAR1の保持またはNAPsの除去によって呼吸量に差が見られた条件の選抜	
(III) 耐性が低下した理由の考察	
第2章の図表	39

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

3-1. 緒言	70
3-2. 材料と方法	70
3-3. 結果と考察	79
3-3-1. pCAR1を保持した際に転写変動する遺伝子の宿主間の比較	79
(1) pCAR1を保持した際に転写変動する遺伝子の選抜	
(2) pCAR1を保持した際に転写変動する遺伝子の分類	
(3) ある宿主固有の遺伝子に対するpCAR1の影響	
(4) 転写変動した遺伝子の内容はKT2440株とPAO1株の組み合わせで最も類似している	
(5) pCAR1を保持した際の転写変動は対数期よりも定常期で大きい	

(6)	pCAR1を保持したKT2440株とPAO1株では多くの遺伝子が定常期に入る際に抑制されない	
(7)	3宿主に保存されている遺伝子でもKT2440株のみで転写変動しているものが多い	
3-3-2.	pCAR1上にコードされたPmrの関与の検討	84
(1)	<i>pmr</i> の破壊によって転写変動した遺伝子の選抜と分類	
(2)	pCAR1の保持によって転写変動した遺伝子との重ね合わせ	
(3)	クラスターごとのPmrの関与の検討	
第3章の図表		89

第4章 宿主によって転写プロファイルの変化するpCAR1上の遺伝子の探索と解析

4-1.	緒言	137
4-2.	材料と方法	137
4-3.	結果と考察	138
4-3-1.	pCAR1上の転写ユニットの再検討	138
4-3-2.	ORFを含まない転写ユニットの解析	139
4-3-3.	宿主によって転写プロファイルの異なる転写ユニットの選抜と分類	140
(A)	PAO1株とPf0-1株では対数期特異的だがKT2440株では恒常的に転写されるグループ	
(B)	KT2440株とPAO1株では定常期に誘導されるがPf0-1株では誘導が見られないグループ	
(C)	KT2440株のみで転写が認められるグループ	
(D)	宿主ごとに転写が最大となる時期が異なるグループ	
4-3-4.	宿主によって異なる転写プロファイルを示した転写ユニット全体を見渡した考察	144
第4章の図表		147

第5章 プラスミド保持が引き起こす染色体遺伝子の転写変動の異種プラスミド間比較

5-1.	緒言	177
5-2.	材料と方法	177
5-3.	結果と考察	180
5-3-1.	RP4及びNAH7を保持するKT2440株の作製	180
5-3-2.	トランスクリプトーム解析	180
(1)	各プラスミドの保持に伴って転写変動した遺伝子の選抜	
(2)	転写変動した遺伝子の数はpCAR1よりRP4とNAH7のほうが多い	
(3)	pCAR1は転写誘導される遺伝子が多いのに対し、RP4とNAH7では抑制される遺伝子が多い	
(4)	RP4とNAH7の転写変動する遺伝子の内容はよく似ているが、pCAR1とは大きく異なる	
第5章の図表		186

第6章 総括と展望

第6章の図表	199
--------	-----

参考文献

補章1 実験操作の詳細な手順

補図・補表

謝辞

図表の目次

* を付したものは本文中に挿入されている

第1章 序論

- Fig. 1-1. 可動性遺伝因子による遺伝子の水平伝播 (Frost *et al.*, 2005, Fig. 1を引用)
Fig. 1-2. pCAR1 上にコードされたカルバゾール分解経路(A) とpCAR1 上の*car*・*ant* 遺伝子群の遺伝子構造(B)
Fig. 1-3. pCAR1の全塩基配列
Fig. 1-4. pCAR1 を保持した際に転写変動したORF とPmr を破壊した際に転写変動したORF の分類 (Yun and Suzuki *et al.*, 2010)
Fig. 1-5. KT2440 株染色体 (A) とpCAR1 (B) 上のPmr の結合サイトと*pmr* 遺伝子を破壊した際に転写変動したORF のマッピング (Yun and Suzuki *et al.*, 2010, Fig. 6)
Table 1-1. プラスミドが宿主の生育に与える影響についてのこれまでの報告
Table 1-2. 本研究で用いた*Pseudomonas* 属細菌3 種, 及び大腸菌の比較

第2章 pCAR1の保持に伴って変化する宿主の表現型の探索と宿主間での比較

- Fig. 2-1. Phenotype MicroArray (Biolog社)の概要
Fig. 2-2. Tetrazolium violetの構造式 (A) とtetrazolium環の開裂 (B)
Fig. 2-3. コハク酸培養における3種のpCAR1保持株 とpCAR1非保持株の生育曲線.
Fig. 2-4. Phenotype MicroArrayの結果の一例
Fig. 2-5. (A) KT2440株の2連の差と (B) KT2440(pCAR1)株の2連の差のヒストグラム
Fig. 2-6. 「KT2440株の2連の差」と「KT2440(pCAR1)株の2連の差」の散布図
Fig. 2-7. 2菌株間で選抜される条件の, 同じ菌株の2連のデータでの一致度の確認
Fig. 2-8. pCAR1の有無またはNAPsの除去によって呼吸量に変化が見られた条件 (C源)
Fig. 2-9. pCAR1の有無またはNAPsの除去によって呼吸量に変化が見られた条件 (N源)
Fig. 2-10. pCAR1の有無またはNAPsの除去によって呼吸量に変化が見られた条件 (P源)
Fig. 2-11. pCAR1の有無またはNAPsの除去によって呼吸量に変化が見られた条件 (S源)
Fig. 2-12. S源として選抜された化合物の構造式
Fig. 2-13. C源として与えた際にpCAR1 の有無によって呼吸量が低下した化合物の代謝経路へのマッピング
Fig. 2-14. アンモニアをN源として利用する際の推定代謝経路図.
Fig. 2-15. *Pseudomonas* 属細菌における2,3-butanediol, 3-hydroxy-2-butanone, 2,3-butanedioneの推定代謝経路
Fig. 2-16. 大腸菌で知られているpH耐性機構 (Krulwich *et al.*, 2011より引用)
* Table 2-1. 本章で使用した培地
* Table 2-2. 本章で培地に加えた添加物
* Table 2-3. 本章で使用した菌株とプラスミド
* Table 2-4. Phenotype MicroArrayの各wellの培地成分
Table 2-5. 3種の*Pseudomonas* 属細菌を宿主とした際のpCAR1コピー数
Table 2-6. 面積値の一例, 及び"2株の呼吸量に差のあった条件"の選抜例
Table 2-7. pCAR1の保持またはNAPsの除去によって呼吸量が変化する条件の数のまとめ
Table 2-8. C源として与えた場合にpCAR1の有無で宿主の呼吸量が変化した条件
Table 2-9. C源として与えた場合にKT2440(pCAR1)株とNAPs破壊株で呼吸量が変化した条件
Table 2-10. N源として与えた場合にpCAR1保持株と非保持株で呼吸量が変化した条件
Table 2-11. N源として与えた場合にKT2440(pCAR1)株とNAPs破壊株で呼吸量が変化した条件
Table 2-12. P源として与えた場合にpCAR1保持株と非保持株で呼吸量が変化した条件
Table 2-13. P源として与えた場合にKT2440(pCAR1)株とNAPs破壊株で呼吸量が変化した条件
Table 2-14. S源として与えた場合にpCAR1保持株と非保持株で呼吸量が変化した条件
Table 2-15. S源として与えた場合にKT2440(pCAR1)株とNAPs破壊株で呼吸量が変化した条件
Table 2-16. pCAR1の有無によって浸透圧ストレスが変化した条件 (PM9)
Table 2-17. NAPsの破壊によって浸透圧ストレスが変化した条件 (PM9)
Table 2-18. pCAR1の有無によってpHストレスが変化した条件 (PM10)
Table 2-19. NAPsの破壊によってpHストレスが変化した条件 (PM10)
<補図・補表として>
Fig. S2-1. Phenotype MicroArrayの各プレートの構成
Fig. S2-2. 生データ上での2 株間の比較

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

- Fig. 3-1. 本研究で採用したアレイ解析の原理
Fig. 3-2. サンプルング～データ取得までの手順の概要(A)とactinomycin D (B)
Fig. 3-3. 逆転写反応系へのactinomycin D (ActD) 添加の効果
Fig. 3-4. カスタムタイリングアレイ上のプローブの並び方
Fig. 3-5. ショ糖密度勾配遠心によるリボソームのプロファイリングの概要
Fig. 3-6. pCAR1を保持した際の3宿主の各経時点での転写変動
Fig. 3-7. pCAR1を保持した際に転写プロファイルが変化した遺伝子の抽出基準
Fig. 3-8. 3宿主におけるA(sum)とd(max)のプロット
Fig. 3-9. pCAR1保持株と非保持株のcompetition assay
Fig. 3-10. 各宿主でpCAR1を保持した際に転写プロファイルが変化した遺伝子のQTクラスタリング結果
Fig. 3-11. タイリングアレイ結果と定量RT-PCR結果の比較
Fig. 3-12. Pf0-1株における推定プロファージ領域の誘導
Fig. 3-13. 宿主固有の遺伝子が多く含まれるクラスター
Fig. 3-14. 転写変動したORFのうち3宿主に共通に保存されたものの包含関係
Fig. 3-15. 定常期に移行する際の100Sリボソームの形成(大腸菌)
Fig. 3-16. *Pseudomonas* 属細菌では100Sリボソームが形成されない
Fig. 3-17. 生育段階に伴うリボソームのプロファイルの変化の模式図
Fig. 3-18. 大腸菌W3110株と*Pseudomonas* 属細菌3種の*rmf*遺伝子周辺の遺伝子構造
Fig. 3-19. 大腸菌W3110株と*Pseudomonas* 属細菌3種の*hpf*遺伝子周辺の遺伝子構造
Fig. 3-20. *Pseudomonas* 属細菌3種の*rmf*遺伝子上流の配列
Fig. 3-21. *Pseudomonas* 属細菌3種の*hpf*遺伝子上流の配列
Fig. 3-22. 大腸菌W3110株と*Pseudomonas* 属細菌3種のRMFとHPFのアラインメント、およびHPFとYfiAの立体構造
Fig. 3-23. プロファイルの類似したKT2440株とPAO1株のクラスター
Fig. 3-24. 3宿主ともpCAR1を保持すると運動性が低下する
Fig. 3-25. 3宿主に保存されたRNAPとリボソームタンパク質の遺伝子を含む領域
Fig. 3-26. K1, K4クラスターに対するPmr除去の影響
Fig. 3-27. pCAR1上のPmrを除去しても運動性は変化しない
Fig. 3-28. NAPsによるNAPsの制御の例

* Table 3-1. 本章で培地に加えた添加物

* Table 3-2. 本章で使用したプライマー

* Table 3-3. 宿主のアノテーション情報

* Table 3-4. シグマ因子・転写制御因子の既知の結合サイト

Table 3-5. Numbers of conserved or host-specific ORFs in each host *Pseudomonas* strain

Table 3-6. Classification of differentially transcribed ORFs by carriage of pCAR1

Table 3-7. *In silico* analysis of flanking region around putative tsp of transcriptional units

Table 3-8. Commonly affected ORFs by carriage of pCAR1 in the three host strains

Table 3-9. Commonly affected ORFs in KT2440 and PAO1

Table 3-10. Commonly affected ORFs in PAO1 and Pf0-1

Table 3-11. Commonly affected ORFs in Pf0-1 and KT2440

Table 3-12. ORFs related to flagella affected by pCAR1 carriage in each host strain

Table 3-13. ORFs related to RNA degradation affected by pCAR1 carriage only in KT2440

Table 3-14. ORFs related to aminoacyl-tRNA biosynthesis affected by pCAR1 carriage only in KT2440

Table 3-15. ORFs related to DNA replication affected by pCAR1 carriage only in KT2440

Table 3-16. 各QTクラスターごとのPmrを除去した際の転写変動の仕方による分類

<補図・補表として>

Table S3-1. 各宿主でpCAR1を保持する際に転写変動するORFのシグナル値, クラスタリング解析結果

Table S3-2. pCAR1を保持する際に転写変動するORFの保存性, 上流配列の解析結果

第4章 宿主によって転写プロファイルの変化するpCAR1上の遺伝子の探索と解析

- Fig. 4-1. タイリングアレイデータより転写開始点を推定する模式図
Fig. 4-2. 3種の*Pseudomonas* 属細菌におけるpCAR1上の経時的RNAマップ
Fig. 4-3. 転写ユニット領域内部の最長ORF候補の決定例
Fig. 4-4. 転写ユニット#9.1内に見いだされた新ORFとλファージのリプレッサーの比較
Fig. 4-5. 宿主によって転写プロファイルの異なった転写単位のRNAマップ
Fig. 4-6. 宿主によって異なる転写プロファイルを示した転写単位のpCAR1上での位置
Fig. 4-7. ISPre1 とISPre2 のアラインメント

- Fig. 4-8. pCAR1上のトランスポゾン
 Fig. 4-9. KT2440株染色体上のTn4652とタイリングアレイデータ
 Fig. 4-10. KT2440株染色体上のTn4652とpCAR1上のTn4676の上流配列の比較
 Fig. 4-11. *pmr*, *pnd*, *phu*の転写プロファイル
 Fig. 4-12. 抽出された転写ユニットの転写開始点付近のGC含量の傾向
 Table 4-1. pCAR1上の全74個の転写単位のとめ
 Table 4-2. pCAR1上の74個の転写ユニットのうち、内部にORFを含まない10個の転写ユニット
 Table 4-3. ORFを含まない10個の転写ユニット内の最長ORF候補のBLASTP検索結果
 Table 4-4. 宿主によって転写プロファイルが変化した17個の転写ユニット
 Table 4-5. pCAR1上の全74個の転写単位の上流配列の*in silico*解析結果

第5章 プラスミド保持が引き起こす染色体遺伝子の転写変動の異種プラスミド間比較

- Fig. 5-1. RP4の環状遺伝子マップ
 Fig. 5-2. NAH7の環状遺伝子マップ
 Fig. 5-3. 3種のプラスミドをそれぞれ保持したKT2440株の各経時点での転写変動
 Fig. 5-4. プラスミドの保持により転写変動した遺伝子の3種のプラスミド間の包含関係
 Fig. 5-5. 3種のプラスミドをそれぞれ保持したKT2440株における対数期で誘導された遺伝子の内容
 Fig. 5-6. 3種のプラスミドをそれぞれ保持したKT2440株における対数期で誘導された遺伝子の内容
 Fig. 5-7. 3種のプラスミドをそれぞれ保持したKT2440株における対数期で抑制された遺伝子の内容
 Fig. 5-8. 3種のプラスミドをそれぞれ保持したKT2440株における定常期で抑制された遺伝子の内容
 Fig. 5-9. RNAP とリボソームタンパク質の遺伝子を含む領域のRNA マップ
 * Table 5-1. 本章で培地に加えた添加物
 * Table 5-2. 本章で使用了した菌株とプラスミド
 * Table 5-3. 本章で使用了したプライマー
 <補図・補表として>
 Table S5-1. pCAR1, RP4, NAH7の最低1種類のプラスミド保持株で転写変動するORF

第6章 総括と展望

- Fig. 6-1. pCAR1を保持した際のKT2440株の変化の概要.
 Fig. 6-2. プラスミドが宿主に与える影響の宿主間での比較とプラスミド間の比較.

論文の内容の要旨

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

論文題目 染色体機能調節因子としてのプラスミドの機能の解明

第1章 序論

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

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

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

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

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

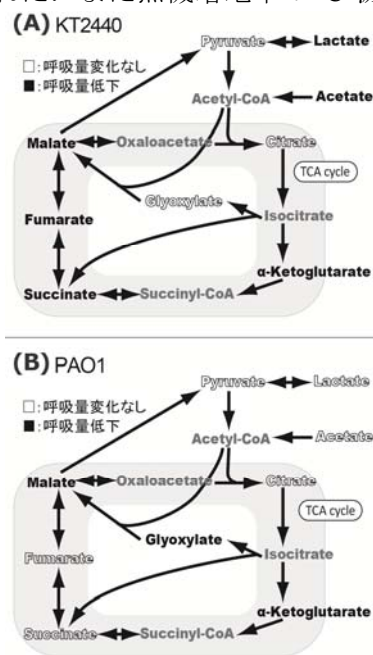


図1. pCAR1を保持した際に呼吸量が低下する基質（C源として）

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

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

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

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

第4章 宿主によって転写パターンの変化する pCAR1 上の遺伝子の探索と解析

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

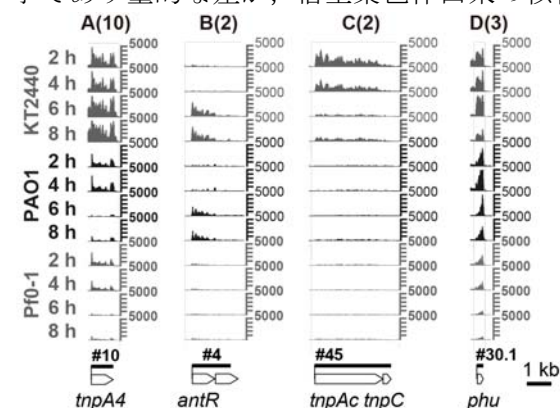


図2. 宿主によって転写プロファイルが変化した転写単位の例. 各グループの代表となる転写単位のRNAマップを1つずつ示し、カッコ内にそのグループに含まれる転写単位の数を表す。

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

第5章 プラスミドの保持により転写変動する染色体遺伝子のプラスミド間比較

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

された遺伝子が多いこと、また pCAR1 保持株で変動した遺伝子には機能既知なものが多く一方、RP4・NAH7 で変動した遺伝子は機能未知なものが多く pCAR1 で変動したものと共通性が少ないことも示された (図 3)。しかし、興味深い点として pyrroloquinoline quinone (PQQ) 合成遺伝子と PQQ 含有酵素遺伝子を含む 1 領域が 3 種のプラスミド保持株で共通して誘導されており (図 3A, ベン図の共通部分に相当)、全く種類の異なるプラスミドでも宿主に共通の反応を引き起こすことが示された。

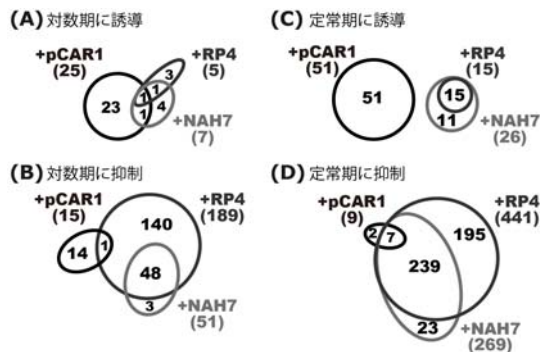


図3. 3種のプラスミドによってそれぞれ転写変動する遺伝子の包含関係

第 6 章 総括と展望

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

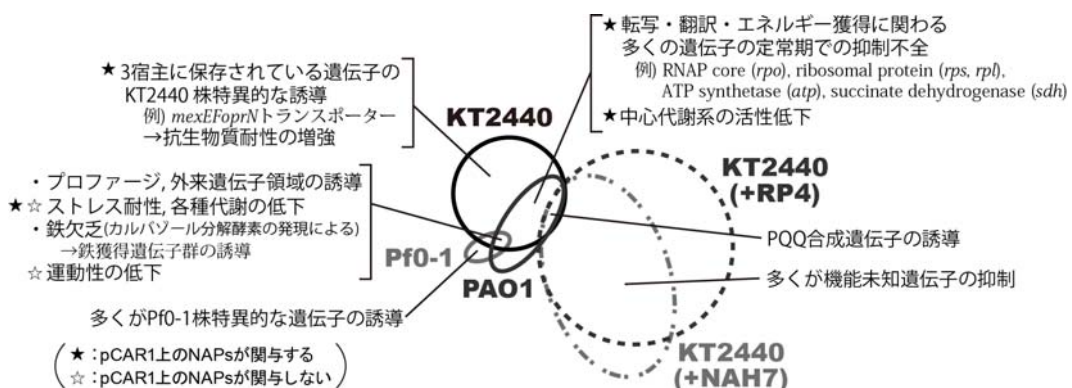


図4. プラスミドが宿主に与える影響の宿主間での比較とプラスミド間の比較

略語表

Ap	Ampicillin
bp	Base pares
CAR	Carbazole
CDS	Coding sequences
Cm	Chloramphenicol
COG	Clusters of Orthologous Groups of proteins
CTAB	Hexadecyltrimethyl ammonium bromide
DIG	Digoxigenen
DMF	Dimethyl formamide
DMSO	Dimethyl sulfoxide
DR	Direct repeat
EDTA	Ethylenediamine tetraacetic acid
Gm	Gentamicin
H-NS	Histone-like nucleoid-structuring protein
IR	Inverted repeat
IS	Insertion sequence
Km	Kanamycin
OD	Optical density
ORF	Open reading frame
PCR	Polymerase chain reaction
Phu	Plasmid-encoded HU-like protein
Pmr	Plasmid-encoded MvaT-like regulator
Pnd	Plasmid-encoded NdpA-like protein
qRT-PCR	quantitative Real Time PCR
QT	quality threshold
Rif	Rifampicin
RNAP	RNA polymerase
rpm	Round per minute
RT	Room temperature
SDS	Sodium dodecylsulfate
Sm	Streptomycin
SUC	Succinate
Tc	Tetracycline
Tris	Tris(hydoroxymethyl)aminomethane
X-gal	5-bromo-4-chroro-3-indril- β -D-galactoside

第1章 序論

1-1. これまでのプラスミド研究の概観

細菌は様々な環境に適応し、多くの生物が棲めない“極限環境”にも生育することができる。細菌がこのような高い適応能力を持つのは、世代時間が短いこと、単細胞生物であるために遺伝子の変異が表現型の変化に結びつきやすいことももちろん大きいですが、可動性遺伝因子 (mobile genetic elements; MGEs) を介して新規遺伝子を獲得することも大きく寄与している。細胞分裂時の (親から子への) 遺伝子の受け渡しを「垂直伝達」と呼ぶのに対し、こうした細胞間での遺伝子の移動を「遺伝子の水平伝播 (horizontal gene transfer; HGT)」と呼ぶ。

MGEs には、接合伝達性プラスミド、トランスポゾン、バクテリオファージ等が含まれる (Frost *et al.*, 2005)。この中で、プラスミドは、細菌の細胞内で染色体とは物理的に独立した単位として自律的に複製されるレプリコンである (松原, 1976; Thomas, 2000) という点で、染色体に挿入されて保持される他の MGEs と異なっている (Fig. 1-1)。

プラスミドの研究は、1946~47 年に Lederberg と Tatum が微生物にも無性生殖のみでなく有性生殖があることを発見し、続く数年の間にこの役割が F 因子によって担われることを明らかにしたことから始まった。F 因子は染色体とは独立に増殖し細胞間で伝達される DNA であり、宿主細胞表面には伝達のための性繊維 (sex pili) を形成させる。また、時に宿主染色体に組み込まれたり (integration), 染色体の一部を取り込んで他の細胞に移動させたりすること (mobilization) も明らかになり、微生物学者の興味を引いた。1954 年ごろになって、不思議なタンパク性抗菌物質として以前から研究されていたコリシンが、F 因子によく似た性質を持つ Col 因子に支配されて生産されることが明らかになり、他方で薬剤耐性を司る R 因子が発見された (1959~60 年)。

抗生物質耐性遺伝子やコリシン生産・耐性遺伝子といった“アクセサリ遺伝子”だけでなく、複製・分配・接合伝達といったプラスミドの基本性質を規定する遺伝子の解析も進んでくると、人為的に改変したプラスミドを遺伝子の運び屋 (ベクター) として利用できることが明らかになった。今日に至るまで様々なベクターが提案されており、遺伝学・生物工学の強力なツールとして盛んに利用されている。

プラスミドの複製・保持機構は多様であり、それをもとにした「不和合性群」による分類が一般的に行われている。類似した複製・保持機構を有する 2 種のプラスミドが同一の細胞に入ると、細胞分裂を繰り返すうちにほとんどが 1 種のみを保持する細胞の集団となる。この現象は 2 つのプラスミドが互いを排除し合うように見えることから、2 つのプラスミドが不和合性 (incompatibility) を示すと表現され、このとき 2 つのプラスミドを同一の不和合性群 (incompatibility group; Inc) に属するという。

“アクセサリ遺伝子 (領域)” に対して、プラスミドの基本性質を規定する領域を“基

本骨格”と呼ぶが、同一の不和合性群に属する場合、この基本骨格の構造（遺伝子の並び方やその塩基配列）の類似性が高い場合が多い。同一の不和合性群に属するプラスミドの配列を比較することで、その不和合性群の基本骨格の推定が行われているが、環境中から単離されるプラスミドは挿入・転移・欠失・逆位といった遺伝子の再構成が繰り返された結果、両者はモザイク状に分布している。また新たなプラスミドの単離により基本骨格の定義が変わることもある。

プラスミドが宿主細菌に与える形質としては、難分解性物質分解能、抗生物質や重金属・紫外線等への耐性能、病原性因子、など様々なものが報告されている (Frost *et al.*, 2005)。これらの形質は、医療、工業、農業、環境など様々な場面で、人間社会にとって禍いにもなれば利益にもなる。例えば、複数の抗生物質に耐性を示し院内感染の原因となる「多剤耐性菌」を出現させたりする一方で、組換え生物による有用物質生産に貢献したり、宿主にない物質代謝能を与えることで種々の難分解性環境汚染物質の分解菌を作り出し環境汚染サイトの浄化に貢献したりすることが挙げられる。

上記のように、プラスミド上にコードされた形質が環境中（多様な細菌を含む集団中）で顕在化するには、**(1)** プラスミドが安定に保持され、**(2)** 当該形質が宿主中で適切に発現するだけでなく、**(3)** プラスミドを保持した宿主が集団の中で優占することが重要になると考えられる。「プラスミド上にコードされた形質が宿主の生存に有利に働いて、プラスミドを保持する菌が生き残り、プラスミドを持たない菌は淘汰されてゆく」という状況は極めて単純でわかりやすい。しかし、分解菌を用いたバイオオーグメンテーションの失敗事例に枚挙にいとまがないことから推察すると、そのような理想的な環境条件はむしろ稀であると考えられる。プラスミド研究が始まってから現在までの約 60 年間に **(1)** と **(2)** については膨大な知見が蓄積してきたが、プラスミドの機能は様々な宿主内で同様であると盲目的に考え、宿主染色体の違いや周囲の環境によって変化する細胞内環境の違いを考慮しないことがほとんどであった。さらに、その細胞内環境もプラスミド自体の存在によってまた変化しうると予想される。プラスミドを保持することが“負荷”になる場合があることは古くから経験的に知られているが、プラスミドによって宿主細胞内に起こる変化の実体を把握することが**(3)**を理解する上で重要であると考えられる。

1-2. プラスミドが宿主の生育に与える影響についてのこれまでの報告

Table 1-1 にプラスミドが宿主の生育に与える影響に関するこれまでの報告をまとめた。用いた宿主細菌（大腸菌とそれ以外）で分けた上で、発表年の古いものから表記している。組換え大腸菌を用いた物質生産の効率を高めようという観点で行われた研究が大部分を占めるため、大腸菌での研究例を中心に解析手法ごとにこれまでの報告を紹介する。

1-2-1. 生育の評価

1-2-1 (A). 生育曲線 (growth curve), 生育速度 (growth rate)

生育を比較する方法として一番古典的なものは、生育曲線 (growth curve) の作成である。Rhee らは 3 種のベクターを同時に保持する大腸菌を用い、LB 培地ではプラスミド保持株の生育が遅れるが (最終到達 OD は同じ)、glucose を添加すると野生株と同等の生育速度を示し、最終到達 OD は野生株を上回ることから、glucose が存在するとプラスミドが宿主に与える負荷が軽減されるとしている (Rhee *et al.*, 1994)。

1-2-1 (B). Competition assay

生育を比べたい 2 株を混合して液体培地で培養し、経時的に 2 株の比を測定する。「2 株の生育の有利さが等しいならば 2 株を混ぜて培養してもその割合は一定に保たれるはずである」という考えに基づいた生育評価法で、逆の言い方をすれば「2 株の生育の有利さに違いがあるならば有利な方の株の割合が次第に増加する」ということになる。Dale & Smith は、接合伝達能を持たない多剤耐性プラスミドを保持する大腸菌を用いて、それぞれ単独で培養した生育曲線には差が見られないが、混合して培養するとプラスミド保持株の割合が次第に減少することを報告している (Dale & Smith, 1979)。

1-2-2. 代謝物・細胞内成分の測定

1990 年代に入ると、培養工学技術・分析技術の進歩に伴ってプラスミドが宿主に与える影響は具体的にどういったものなのかという観点から、代謝産物や細胞内成分の量の測定も始まった。以下、測定項目ごとに説明する。

1-2-2(A). 菌体量、培地成分の変化量

タンパク質や DNA をより多く生産するための研究という培養工学的な観点から、菌体収量 (biomass yeild), プラスミド収量 (plasmid yeild), グルコース消費量・取り込み速度 (glucose consumption), 酸素取り込み速度 (oxygen uptake rate), 二酸化炭素放出速度 (CO₂ secretion rate) などが測定されている。Rozkov らによって、カナマイシン耐性タンパク質を高発現するベクターを保持した大腸菌において acetate の生産量が増加し、培養中に培地の pH が低下している (Rozkov *et al.*, 2004) ことが示されてからは、acetate 生産量も多くの論文で測定されるようになった。Wang らはコピー数の異なる 2 種のベクターをそれぞれ保持した大腸菌を用いて、コピー数が多いほど生育速度が低下し、それに伴ってグルコース消費量、呼吸 (O₂ の取り込みと CO₂ の放出) 量、菌体収量、acetate 収量が増加したことを報告している (Wang *et al.*, 2006)。

1-2-2 (B). 代謝産物量 (metabolic flux)

与えた物質に由来する細胞内成分の種類と量を調べるため、¹³C でラベルした基質 (これまでに用いられているのは glucose のみ) で菌体を培養し、菌体抽出物中のラベルされた各代謝産物量を測定することも行われている。これまでに、ベクターを保持する大腸菌を用いた Wang らの報告 (Wang *et al.*, 2006) のみでしか実施されていないが、Wang らは各代謝

産物 (アミノ酸や dNTPs, NTPs) の量の変化は同条件で実施した酵素活性測定やトランスクリプトーム解析の結果と一致したと報告している。

1-2-2 (C). 酵素活性 (enzyme activity)

休止菌体反応または粗酵素抽出液を用いた反応によって、細胞内の特定の反応経路の活性を測定することも行われている (Buch *et al.*, 2010; Diaz-Ricci & Hernandez, 2000; Ow *et al.*, 2007). 前者によるグルコース取り込み実験において、2 種のベクターをそれぞれ保持する大腸菌においてグルコース取り込み量が増加することが示されている (Diaz-Ricci & Hernandez, 2000). Buch らは、pUCPM18 派生プラスミドと pBBR1MCS-2 を単独または複数保持する *Pseudomonas fluorescens* について、グルコースの取り込みから TCA 回路までの代謝系における主要な反応の活性を測定しており、生育速度の上昇が見られる株においてグルコン酸生成反応の活性が上昇していることを示した (Buch *et al.*, 2010).

1-2-2 (D). 細胞構成成分 (DNA, RNA, タンパク質など) の量

コピー数の異なる 2 種のベクターをそれぞれ保持した大腸菌を用いた Wang らの報告例 (Wang *et al.*, 2006) では、プラスミドを保持しても染色体 DNA, LPS (リポ多糖), ペプチドグリカン, グリコーゲンの量は変化しないが、タンパクと脂質の減少, RNA の増加が見られた。

また一例のみであるが、リボソームの定量を行っている報告もあり、RSF1050 またはその派生プラスミドを保持した *E. coli* HB101 株では、プラスミド非保持株に比べてリボソームが減少していたことが報告されている (Birnbaum & Bailey, 1991a).

1-2-2 (E). 全タンパク質の翻訳量・全遺伝子の転写量

宿主細胞内で発現量に変化しているタンパク質を探索するために、細胞の全タンパクの二次元電気泳動 (2D-PAGE) やトランスクリプトーム解析が行われている (Birnbaum & Bailey, 1991a; Ow *et al.*, 2006; Ow *et al.*, 2007; Rozkov *et al.*, 2004). Birnbaum & Bailey は RSF1050 またはその派生プラスミドを保持した *E. coli* HB101 株では、プラスミド非保持株に比べて TCA サイクルの酵素量が増加することを報告している (Birnbaum & Bailey, 1991a).

2000 年代後半から、マイクロアレイや qRT-PCR 解析によって、転写量が増加/減少している遺伝子の探索も行われている (Ow *et al.*, 2006; Ow *et al.*, 2007; Wang *et al.*, 2006). 2006 年の 2 つの論文は、いずれも大腸菌と ColE1 タイプのプラスミドを用いておりグルコースを唯一の炭素源とした培養条件で実施され、ほぼ同時に発表されている。両者の結果は一致しない部分もあるが、解糖系から TCA 回路までの中心代謝系に関わる多くの遺伝子の転写変動を検出している点は共通である。この結果を受け、中心代謝系のグローバルレギュレーターとして知られている FruR が関与しているのではないかと考えた Ow らが、*fruR* 破壊株の解析を行ったところ、*fruR* 破壊株では糖代謝系や転写・翻訳に関わる遺伝子の転写/翻訳量が増加した一方で、糖新生系や TCA 回路、ストレス応答に関わる遺伝子の転写/翻訳量が減少し、プラスミドを保持した際の生育速度の低下も改善した。

1-2-3. モデリング, シミュレーションによる解析

代謝ネットワークモデルをもとにして, 代謝に関わる各酵素の量と活性, 系に入る物質の量, 合成される物質の量, 消費されるエネルギー量などの各パラメーターを変化させて, 細胞内の代謝反応をシミュレーションすることができる. Chunningham らは, 各パラメーターをプラスミド生産量が最大になるように計算した結果, acetate の生成と恒常的な抗生物質耐性の発現はプラスミド生産を下げる原因となること, 及び PEP を pyruvate と ATP に変換する Pyr 活性が低いことと NADPH の生成はプラスミド生産量を高める鍵反応となることを示した (Cunningham *et al.*, 2009). また Ow らは, (a) 生育速度, (b) プラスミド生産量, (c) 細胞の維持に費やすエネルギー, をそれぞれ最大にするように各パラメーターを調整したところ, (c) が以前の報告 (Wang *et al.*, 2006) の実験データに最も一致したことを報告している (Ow *et al.*, 2009).

1-2-4. 長期培養実験

上で述べた研究と異なるアプローチとして, プラスミドによって適応度が下がった宿主を実験室で長期間培養することで, プラスミドと宿主が共進化し適応度が上がる現象を再現する実験も行われている (Bouma & Lenski, 1988; Dahlberg & Chao, 2003; Dionisio *et al.*, 2005; Heuer *et al.*, 2007a).

培養後の株 (宿主を b , プラスミドを p として b_1p_1 とする) が得られたら, もとのプラスミド非保持株 (b_0) 及び培養前のプラスミド保持株 (b_0p_0) と competition assay を行い, 適応度が上昇しているか確認する. 次にこの適応度の上昇が, プラスミド/宿主どちらの (または両方の) 変化によるものなのかを調べるため, 培養後の株からプラスミドを脱落させもとのプラスミドを接合し直した株 (b_1p_0), 培養後のプラスミドをもとの宿主に移した株 (b_0p_1) を作製し, competition assay を行うのが定石となっている. 変異がどちらに入ったかは報告によって異なっており, pACYCI84 (4 kb) を用いた Bouma&Lenski の実験では宿主染色体側 (Bouma & Lenski, 1988), 接合伝達性の多剤耐性プラスミドである R1 (約 100 kb) と RP4 (60 kb) を用いた Dahlberg & Chao の実験 (Dahlberg & Chao, 2003) では両方, R1 を用いた Dionisio らの実験 (Dionisio *et al.*, 2005) ではプラスミド上であった (宿主はいずれも大腸菌). また, 長期培養とは少し異なる実験であるが, 多剤耐性プラスミドである pB10 (65 kb, IncP-1 β) を用い, pB10 を安定に保持できない宿主である *Pseudomonas putida* H2 株に, 繰り返し接合伝達させることで, H2 株の生育に与える負荷が小さくなり安定性が改善するという報告もある (Heuer *et al.*, 2007b).

長期培養実験は, アイディアとしては古くから行われているが, 以前は全塩基配列決定が技術的に困難であったため, 生じた自然変異の位置を完全に特定した例はない. 変異が入った領域を探索した報告は現在のところ Dahlberg & Chao のもののみであり, 制限酵素処理したプラスミドの電気泳動パターンの比較によって, 抗生物質耐性遺伝子を含む領域の欠失や, 性繊毛 (pili) 生産に関わると予想される遺伝子や複製起点となる *oriV* 領域への IS

の挿入を検出するとともに、(原因遺伝子は特定されなかったが) プラスミド上の変異に起因する接合伝達頻度の低下も報告している (Dahlberg & Chao, 2003).

近年、次世代シーケンサーの普及によって全塩基配列決定が低コスト・短期間で行えるようになってきており、プラスミド・宿主染色体両方の変異を完全に解析した報告が待たれる。また、培養条件や宿主の違いによって適応度の上がり方 (変異の入り方) が変化するかという解析は、実環境中でのプラスミド-宿主の共進化を考察する上で不可欠な情報となると考えられる。

1-2-5. これまでの研究のまとめと問題点

大腸菌とベクターの系での解析では、解糖系やTCA回路などの中心代謝系の活性の低下、培地中の acetate 量の増加は異なるベクターを用いた複数の報告で共通に見られ、一般的な知見になりつつあるが、これらはタンパク質生産の効率を高めようという視点で行われているため、高コピーの小型プラスミドから1種類のタンパク質が高発現しているという非常に人工的な条件下での実験である。また、これらの報告のほとんどが対数増殖期の菌体を解析対象としている。実環境中では細菌が対数増殖を続けられる栄養条件は稀であり、ほとんどの細菌が周囲の環境変化に合わせて (多くの場合は緩慢な) 増殖と休止を繰り返している。さらに、対数期から定常期、または定常期から対数期へ切り替える際には細胞内の代謝状態が大規模に変化することが知られているが (Navarro Llorens *et al.*, 2010), この切り替えの際の宿主細胞にプラスミドが与える影響を調べた報告はこれまでにない。

大腸菌を用いた解析とは対照的に、大腸菌以外の菌を用いた研究では実環境中に近い条件でプラスミドの保持が宿主の生き残りに与える影響を評価したものが多い。しかし、宿主細胞の中で起こっている変化に踏み込んだ解析はほとんど行われていない。

また、大腸菌・それ以外の菌を用いた解析いずれも、同じ宿主に異なるプラスミドを保持させて比較した研究や、同時に複数のプラスミドを保持させた例はあるが、同じプラスミドを複数の宿主に入れプラスミドが宿主に与える影響を宿主間で比較した論文は当研究グループの論文 (Shintani *et al.*, 2010) を除いてこれまでにない。

1-3. カルバゾール分解プラスミド pCAR1

当研究室では、カルバゾール分解プラスミド pCAR1 の研究を通して、以前から宿主とプラスミドの相互作用に着目してきた。pCAR1 の基本的な性質の紹介も兼ねて、pCAR1 に関するこれまでの研究の経緯を述べる。

1-3-1. カルバゾール分解経路の解析, pCAR1 の発見

当研究室では、含窒素多環化合物カルバゾールを用い、土壌、活性汚泥、河川水などの環境中から複数のカルバゾール資化菌を単離し、それらを環境汚染物質分解菌のモデルとして解析してきた。その中の一つである *Pseudomonas resinovorans* CA10 株は 1993 年に都市

下水処理場の活性汚泥より単離され (Ouchiyaama *et al.*, 1993), 分解酵素遺伝子群や分解経路, 分解酵素の構造等の詳細な解析が進められてきた株である (Nojiri & Omori, 2007; Nojiri, 2012). 2001 年に分解遺伝子クラスター (*car* オペロンと *ant* オペロン) は CA10 株が保持するプラスミド (pCAR1) 上に存在すること, 及び両オペロンを含む約 40 kb の塩基配列が明らかにされた (Nojiri *et al.*, 2001).

pCAR1 にコードされたカルバゾール分解経路 (Fig. 1-2A) において, カルバゾールは上流経路によってアントラニル酸と 2-hydroxypenta-2,4-dienoate まで分解される (Ouchiyaama *et al.*, 1993). 2-Hydroxypenta-2,4-dienoate はメタ開裂経路によってピルビン酸とアセチル CoA まで分解されて TCA サイクルに入り (Nojiri *et al.*, 2001), もう一方のアントラニル酸はアントラニル酸二原子酸素添加酵素によって自発的脱炭酸・脱アミノを伴ってカテコールに変換される (Nojiri *et al.*, 2001). 上流経路とメタ開裂経路は *car* オペロンに, アントラニル酸二原子酸素添加酵素は *ant* オペロンにそれぞれコードされており (Fig. 1-2B) (Nojiri *et al.*, 2001), 2 つのオペロンはそれぞれの上流に存在する同一のアントラニル酸誘導性プロモーター P_{ant} から転写される. P_{ant} は AraC/XylS タイプアクチベーターAntR によって制御されており, AntR はアントラニル酸存在下で P_{ant} を活性化する. *car* オペロンの上流には弱い構成的プロモーター P_{carAa} も存在する. pCAR1 を保持する菌体がカルバゾールに遭遇すると, P_{carAa} によって常時わずかに発現している Car 酵素群の働きによってアントラニル酸が生じ, それを感知した AntR が P_{ant} を介して両オペロンを強力に転写誘導する, という効率の良い転写制御システムが獲得されている (Miyakoshi *et al.*, 2006; Urata *et al.*, 2004).

1-3-2. プラスミドとしての pCAR1 の解析

2003 年には pCAR1 の全塩基配列が決定され, プラスミドの複製や伝達に関わる遺伝子や IS (insertion sequence) のアノテーションが行われた (Maeda *et al.*, 2003). 2006 年にはプラスミドとしての基本機能 (複製・分配・接合伝達等) について分子遺伝学的解析が行われ, pCAR1 の複製・分配に必要な遺伝子領域や pCAR1 が自己伝達能を有すること, IncP-7 群に属することが明らかになった (Shintani *et al.*, 2006). これにより, pCAR1 は IncP-7 群プラスミドとして初めて全塩基配列が決定されたプラスミドとなった. IncP-7 群の分解プラスミドでは, pCAR1 の後にナフタレン分解プラスミド pND6-1 (Li *et al.*, 2004) とトルエン分解プラスミド pWW53 (Yano *et al.*, 2007), トルエン分解プラスミド pDK1 (Yano *et al.*, 2010) の 3 つについて全塩基配列の報告があるが, pCAR1 を含めた 4 者の基本骨格はよく保存されている (Yano *et al.*, 2010). Fig. 1-3 に 2011 年 12 月現在での pCAR1 の全遺伝子構造を示す. pCAR1 の宿主域としては, 現在までに *Pseudomonas* 属細菌と *Stenotrophomonas* 属細菌に保持されることが確認されている (Shintani *et al.*, 2008).

1-3-3. pCAR1 を保持する異なる宿主の比較

pCAR1 の解析を進めるにあたり, 研究開始当初は CA10 株染色体の全塩基配列が未解明

であったことから、ゲノム既知の *Pseudomonas* 属細菌である *P. putida* KT2440 株 (Nelson *et al.*, 2002) と CA10 株の接合伝達によって KT2440(pCAR1)株を作製した (Miyakoshi *et al.*, 2007). マイクロアレイによる KT2440 株と KT2440(pCAR1)株のトランスクリプトーム比較によって、pCAR1 の保持に伴って 2 倍以上転写変動する宿主遺伝子として、11 個の ORF が見いだされた. この中で 40 倍という顕著な転写誘導を示した PP_3700 (*parI* と命名) について転写解析が行われ、*parI* の直上流に存在するプロモーターは *ParI* 自身及び pCAR1 上にコードされる *ParA* によって転写誘導されることが明らかになった (Miyakoshi *et al.*, 2007).

プラスミドの分配に関わる *ParA* が染色体上の遺伝子の転写を誘導するという結果は、プラスミドによって宿主染色体の機能が変わることを意味する. また、以前に得られていた pCAR1 の接合伝達可能な宿主域は用いる供与菌によって異なる (Shintani *et al.*, 2005b) という結果から、供与菌の染色体に由来する因子が pCAR1 の接合伝達機能を変化させることも示唆された. さらに他の研究グループからも、プラスミドにコードされた形質の発現に宿主のグローバルレギュレーターなどが関わること (Ramos *et al.*, 1997), 宿主によってプラスミドの性質 (安定性や接合伝達可能な宿主域) が変わること (De Gelder *et al.*, 2005; De Gelder *et al.*, 2007) が報告されていた. このようなプラスミドと宿主染色体間の相互作用を解析するためには、KT2440(pCAR1)株の他に染色体ゲノム既知の pCAR1 保持株を作製して、宿主によって変化するプラスミド機能・プラスミドによって変化する宿主機能を異なる宿主間で比較することがシンプルかつ効果的であると考えられた.

そこで、ゲノム既知の *P. aeruginosa* PAO1 株 (Stover *et al.*, 2000), *P. fluorescens* Pf0-1 株 (Silby *et al.*, 2009) と HS01 株 (Shintani *et al.*, 2005b; Takahashi *et al.*, 2009a) とをそれぞれ接合させ PAO1(pCAR1)株と Pf0-1Km(pCAR1)株を作製した (Takahashi *et al.*, 2009b). Km は接合伝達体の選抜のために Pf0-1 株染色体上にカナマイシン耐性遺伝子をミニトランスポゾンによって挿入したことを意味するが、本論文では以降 Pf0-1(pCAR1)株と表記することにする. 「Pf0-1 株と Pf0-1(pCAR1)株を比較」と表記していても、実際には Pf0-1Km 株と Pf0-1Km(pCAR1)株の比較を行っていることに注意されたい. Table 1-2 に KT2440 株, PAO1 株, Pf0-1 株のゲノムの基本的性質の比較を示す. GC 含量は KT2440 株と Pf0-1 株は 61%程度であるのに対し、PAO1 株は約 66%と高い. ゲノムサイズは KT2440 株が約 6.2 Mbp で一番小さく、PAO1 株が約 6.3 Mbp, Pf0-1 株が約 6.4 Mbp で一番大きい. Protein coding sequence (CDS) 数もゲノムサイズに比例しており、KT2440 株が約 5,400 個、PAO1 株が約 5,600 個、Pf0-1 株が約 5,700 個となっている. 対照として示した大腸菌 K-12 MG1655 株 (Blattner *et al.*, 1997) と比較すると、*Pseudomonas* 属細菌 3 株のゲノムは大腸菌のそれより 1.6-1.8 Mbp ほど大きく、protein coding sequence 数も 1,500 個ほど大きい.

これらの 3 種の pCAR1 保持株を用いて、pCAR1 が宿主に与える影響を宿主間で比較した解析としては、3 宿主の pCAR1 保持株と非保持株とをそれぞれコハク酸を唯一の炭素源とする培地で培養した際の対数増殖期におけるトランスクリプトーム比較が行われている (Shintani *et al.*, 2010). 3 株は、同培養条件 (非選択条件) で pCAR1 を非常に安定に保持する

ことが明らかになっている (Takahashi *et al.*, 2009b). pCAR1 を保持した際に 2 倍以上転写変動した遺伝子数は KT2440 株で 121 個 (誘導 88 個, 抑制 33 個), PAO1 株で 73 個 (誘導 55 個, 抑制 18 個), Pf0-1 株で 125 個 (誘導 118 個, 抑制 7 個)であり, 3 宿主いずれでも鉄欠乏に応答する複数の遺伝子の誘導が検出された. 鉄制限培地での生育試験によって, KT2440 株と PAO1 株では細胞内で実際に鉄が欠乏しており, その部分的な原因は pCAR1 上のカルバゾール分解酵素 (活性部位と電子伝達コンポーネントに鉄原子を含む) の発現であることが示された. 宿主固有に変動する遺伝子としては, KT2440 株で薬剤排出ポンプ (MexEFoprN) の転写が誘導され実際にクロラムフェニコール耐性が上昇していること, Pf0-1 株では推定プロファージ領域が誘導されていることを見出した.

宿主染色体の違いによるプラスミド機能の変化を解析したものとしては, CA10 株及び KT2440(pCAR1)株をコハク酸またはカルバゾールを唯一の炭素源として培養した際の対数増殖期の pCAR1 上 RNA マップの比較 (Miyakoshi *et al.*, 2009), コハク酸培養の対数増殖期 1 時点での 5 種 6 株の *Pseudomonas* 属細菌内での pCAR1 上 RNA マップの比較 (Shintani *et al.*, 2011) が報告されており, 宿主によってシグナルの強さに大きな差が見られる領域が複数見出されている.

1-1-4. pCAR1 上にコードされる核様体タンパク質

核様体タンパク質 (nucleoid-associated proteins; NAPs) は細菌の細胞内に多数存在し, DNA に結合してその構造を様々に変化させることで数百もの遺伝子の転写制御を行うことが知られている global regulator である (Dillon & Dorman, 2010). NAPs には DNA 結合ドメインとタンパク質間相互作用ドメインを持ち, 自身または他の NAPs と二量体 (場合によっては多量体) を形成して機能するものが多い (Dillon & Dorman, 2010). pCAR1 上には NAPs をコードする 3 つの遺伝子 (*pmr*, *pnd*, *phu*) が存在する (Takeda *et al.*, 2011)ことから, プラスミドによって染色体の機能の変化する原因としてこれら 3 つの NAPs の関与は容易に想像される. この中で, Pmr (plasmid-encoded MvaT-like regulator) は H-NS (histone-like nucleoid-structuring protein) 様因子であり, *pmr* を破壊した KT2440(pCAR1)株のトランスクリプトーム解析によって, (1) pCAR1 保持に伴って転写変動する遺伝子の中には Pmr を介して pCAR1 の影響を受けるものがあることと同時に, (2) Pmr が存在することで pCAR1 の保持に伴う転写変動を抑えられている遺伝子も存在すること [Pmr が stealth 機能 (1-4 で述べる) を持つこと] が示されている (Fig. 1-4) (Yun & Suzuki *et al.*, 2010). ChAP-chip (chromatin affinity purification coupled with high density tiling chip) 解析によって検出された Pmr 結合サイトはゲノム上の GC 含量が低い (AT-rich な) 領域に多く, さらに *pmr* を破壊した際に転写変動した ORF の位置とも相関が見られた (Fig. 1-4) (Yun & Suzuki *et al.*, 2010). さらにタンパク質としての解析により, 自身または KT2440 株染色体上の H-NS 様因子と相互作用して多量体化すること, DNA 結合能をもつことが示されている (Suzuki *et al.*, 2011).

Pnd (plasmid-encoded NdpA-like protein) と Phu (plasmid-encoded HU-like protein) について

は、転写・発現様式、破壊株の解析が行われており、*pnd* と *phu* をそれぞれ単独で破壊した場合には顕著な表現型の変化が見られないが、*pmr* と *pnd*、*pmr* と *phu* の二重破壊株では継代培養を経ることで *pCAR1* の構造変化および脱落が生じる頻度が高くなること (武田, 2011 年東京大学博士論文), バイオフィーム中で宿主菌体の繊維状化が促進されること (李, 2012 年東京大学修士論文), という興味深い表現型が見られている。

1-4. プラスミド上にコードされる NAPs に関する研究

pCAR1 以外にも NAPs をコードするプラスミドは数多く存在する。2010 年 4 月時点で塩基配列が解読されていた 2,260 個のプラスミドのうち、155 個 (7%) が既知の NAPs (Fis, H-NS, HU, IHF, Lrp のいずれか) と相同なタンパク質をコードする塩基配列を持つことが明らかとなっている (Takeda *et al.*, 2011)。また NAPs をコードするプラスミドのうちグラム陰性細菌由来の 136 個では、プラスミドのサイズが大きくなるほど NAPs をコードする割合が高くなることも明らかとなっている。しかし、これらの NAPs の機能解析はほとんど進んでおらず、宿主染色体にコードされる NAPs との機能の違いや、プラスミド上に NAPs がコードされる意義については不明点が多い。

機能解析が進んでいる例として、*Shigella flexneri* 2a strain 245T 由来のプラスミド *pSf-R27* にコードされる H-NS 様因子である *Sfh* に関する報告が挙げられる。Doyle らは *Salmonella entericaserovar* Typhimurium SL1344 に *pSf-R27* を保持させた株、*sfh* を破壊した *pSf-R27* 保持株、野生株の 3 株のトランスクリプトーム比較を行い、*Sfh* が存在しないとプラスミドを保持した際により多くの遺伝子が転写変動するようになることが、*sfh* を破壊すると宿主の fitness がより低下することの原因である (すなわち、*Sfh* はプラスミドが宿主に与える負荷を軽減する “stealth タンパク質” として機能している) と報告している (Doyle *et al.*, 2007)。この現象は AT-rich な *pSf-R27* 上に染色体由来の H-NS の多くが結合した結果、染色体上に結合する H-NS 量が減少したことで宿主の転写ネットワークが乱れた結果だと説明され、*Sfh* は染色体上の H-NS と同様に染色体上・プラスミド上の AT-rich な領域に結合することで染色体上に結合する H-NS の不足を補うことで、*pSf-R27* の保持に伴う宿主の転写ネットワークの乱れを抑えていると説明されている。

1-5. 本研究の目的

以上述べてきたように、プラスミドを保持した際に宿主に起こる変化の実体は未だ説明されていない部分が多く、これまで報告された解析は当研究室で行われたものも含めて不十分な点があった。組換え大腸菌を用いた物質生産効率の向上を意図した研究では、宿主細胞内で起こる変化を解析した報告が蓄積しつつあるものの、高コピーベクターから 1 種類のタンパク質を高発現させながら、一定速度で増殖し続ける菌体を対象とした極めて人工的な条件で解析されているという問題点があった。一方で実環境中でのプラスミド保持株の挙動の解明を志向した研究では、菌株の生残性を解析したものがほとんどで、細胞内

の変化には踏み込めていなかった。我々研究グループでも、プラスミド保持株の転写レベルと表現型レベルでの変化の解析を進め一定の成果を挙げてきたが、宿主細胞内の変化を網羅的に検出したとは言えない状況であった。具体的には、プラスミドを保持した際に変化する表現型の探索が不十分であったことと、転写レベルの解析では高密度タイリングアレイを用いて全転写産物を解析対象としていたものの対数期 1 時点での比較にとどまっていたこと、が挙げられる。また、プラスミド上にコードされる NAPs である Pmr や Sfh に関しては、プラスミドを保持した際の宿主の変化の大きさに重大な影響を及ぼす因子であることはこれまでの研究で十分に示されてきたが、宿主細胞に起こる様々な変化それぞれに対する関与の度合い (NAPs の関与が大きい／小さいものに分けられるのか？、分けられるとすれば機能や遺伝子の転写様式に共通性が見られるのか？) については、これまで整理・分類がなされてこなかった。

そこで本研究では、pCAR1 とゲノム既知の *Pseudomonas* 属宿主 3 種 (*P. putida* KT2440 株, *P. aeruginosa* PAO1 株, *P. fluorescens* Pf0-1 株) をモデルとして、まずプラスミドを保持した際に変化する宿主の表現型を探索し、継時的な転写変動を解析することで、プラスミドによって宿主細胞内に生じる変化を整理することを目的とした。その上で、それが異なる宿主・異なるプラスミドでどこまで共通なのか、またどこまでが NAPs の関与する変化なのか、を明らかにすることを目指した。

まず、pCAR1 を保持した際に変化する宿主細胞の性質や代謝活性を探索し (第 2 章)、次いで、対数期~定常期までの継時的なトランスクリプトーム解析によって pCAR1 の保持によって転写プロファイルが変化する遺伝子を選抜した (第 3 章)。この解析を 3 宿主で並行して行うことで、各宿主で検出した変化の宿主間での共通性を検討した。さらに、*pmr* を除去した KT2440(pCAR1) 株のトランスクリプトームを用いて、pCAR1 を保持した際の様々な転写変動を、Pmr が深く関与するものと比較的関与の度合いが低いものに分類した。また、各宿主内での pCAR1 上の遺伝子の転写プロファイルを比較することで、宿主によって pCAR1 の与える影響の大きさが異なる原因を探った (第 4 章)。さらに、他の不和合性群に属するプラスミドを保持する KT2440 株を用いて、pCAR1 を保持した際の宿主染色体の転写変動が他のプラスミドでも共通する現象なのか否かを評価した (第 5 章)。

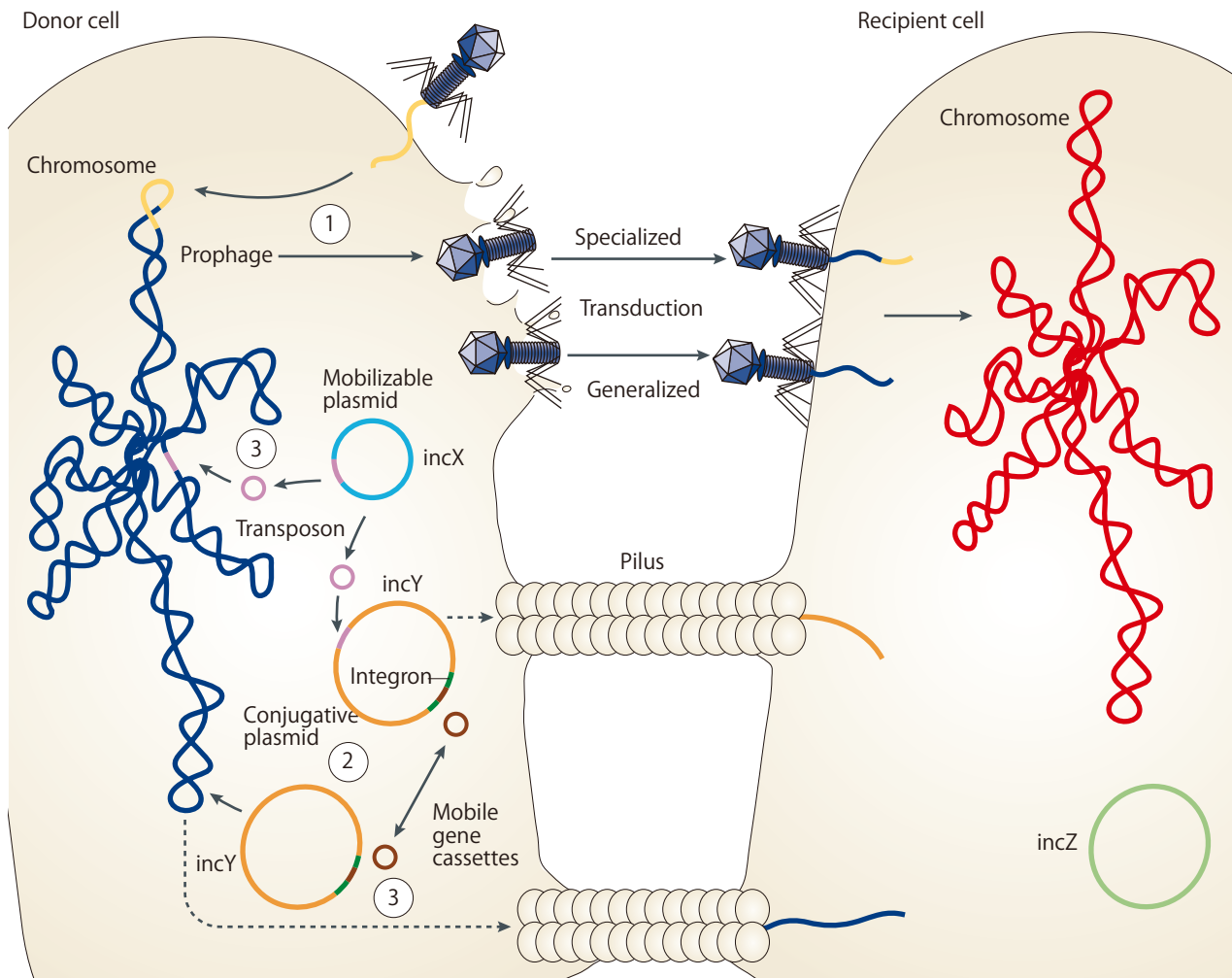


Fig. 1-1. 可動性遺伝因子による遺伝子の水平伝播 (Frost *et al.*, 2005, Fig. 1を引用).

Transfer of DNA between bacterial cells. Transduction (1). The DNA genome (yellow) of a temperate phage inserts into the chromosome (dark blue) as a prophage; it later replicates, occasionally packaging host DNA alone (generalized transduction) or with its own DNA (specialized transduction), lyses the cell, and infects a naive recipient cell in which the novel DNA recombines into the recipient host cell chromosome (red). Conjugation (2). Large, low copy number conjugative plasmids (orange) and integrated conjugative elements (ICEs; not shown) use a protein structure (known as a pilus) to establish a connection with the recipient cell and to transfer themselves to the recipient cell. Alternatively, a copy of a small, multicopy plasmid or defective genomic island or a copy of the entire bacterial chromosome can be transferred to a naive cell, in which these genetic elements either insert into the chromosome or replicate independently if compatible with the resident plasmids (light green). Conjugative transposons and plasmids of Gram-positive bacteria (not shown) do not use pili. Transposition (3). Transposons (pink) integrate into new sites on the chromosome or plasmids by non-homologous recombination. Integrons (dark green) use similar mechanisms to exchange single gene cassettes (brown).

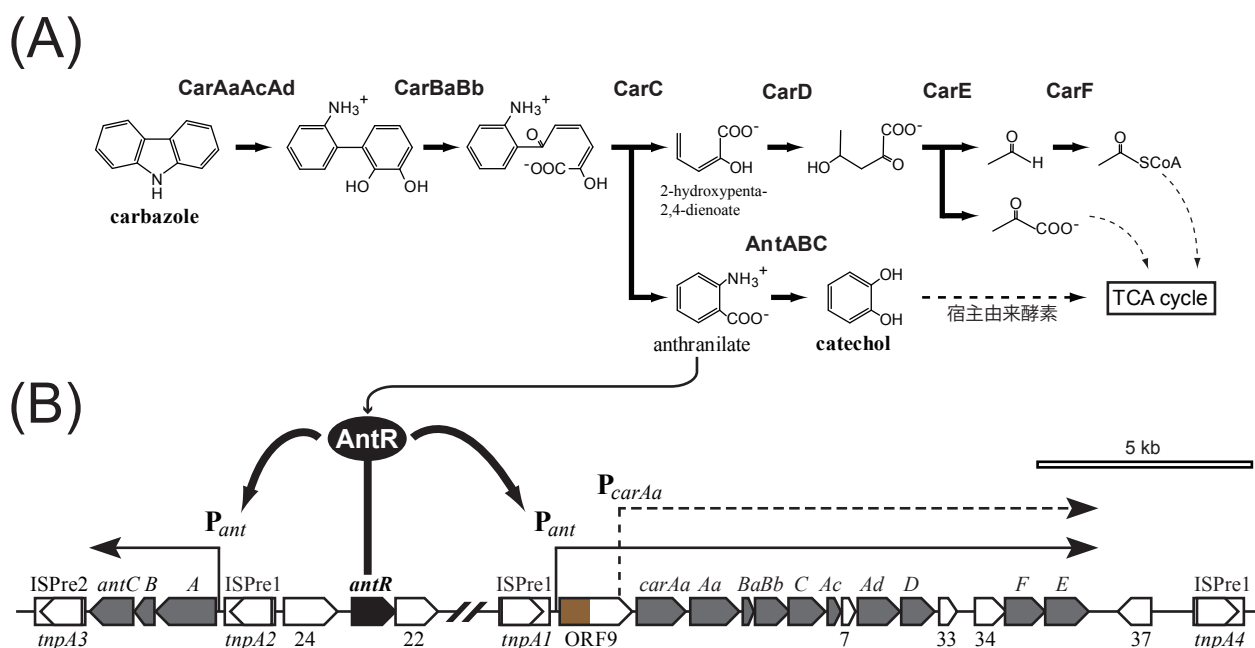


Fig. 1-2. pCAR1 上にコードされたカルバゾール分解経路 (A) と pCAR1 上の *car*・*ant* 遺伝子群の遺伝子構造 (B).

(A) pCAR1 上にコードされた酵素が触媒する各反応を実線矢印で表す。破線矢印は宿主染色体由来の酵素によって触媒される反応であることを示す。カルバゾールは、pCAR1 上にコードされた酵素によって TCA サイクル中間体とカテコールにまで分解される。酵素の名称は以下の通り：
CarAaAcAd, carbazole 1,9a-dioxygenase; *CarBaBb*, 2'-aminobiphenyl-2,3-diol 1,2-dioxygenase; *CarC*, 2-hydroxy-6-oxo-6-(2'-aminophenyl)-hexa-2,4-dienoate hydrolase; *CarD*, 2-hydroxypenta-2,4-dienoate hydratase; *CarE*, 4-hydroxy-2-oxovalerate aldolase; *CarF*, acetaldehyde dehydrogenase (acylating); *AntABC*, anthranilate 1,2-dioxygenase. (B) 黒五角形は転写制御遺伝子、灰色五角形は代謝遺伝子、白色五角形は関連のない遺伝子をそれぞれ表し、遺伝子名または ORF 番号をそれぞれの五角形の下に示す。白四角形は 4 コピーの相同な IS (3 コピーの *ISPre1* と 1 コピーの *ISPre2*) を表し、内部の転移酵素の名称を下に記す。*tnpA1* 遺伝子を含む *ISPre1* から ORF9 の 5' 側の領域 (図中茶色) は、*tnpA2* 遺伝子を含む *ISPre1* から *antA* の 5' 側の領域が転移したものである。実線矢印は P_{ant} 、破線矢印は P_{carAa} からの転写単位を表す。 P_{ant} はアントラニル酸存在下で、AraC/XylS タイプアクチベーター *AntR* によって誘導される。

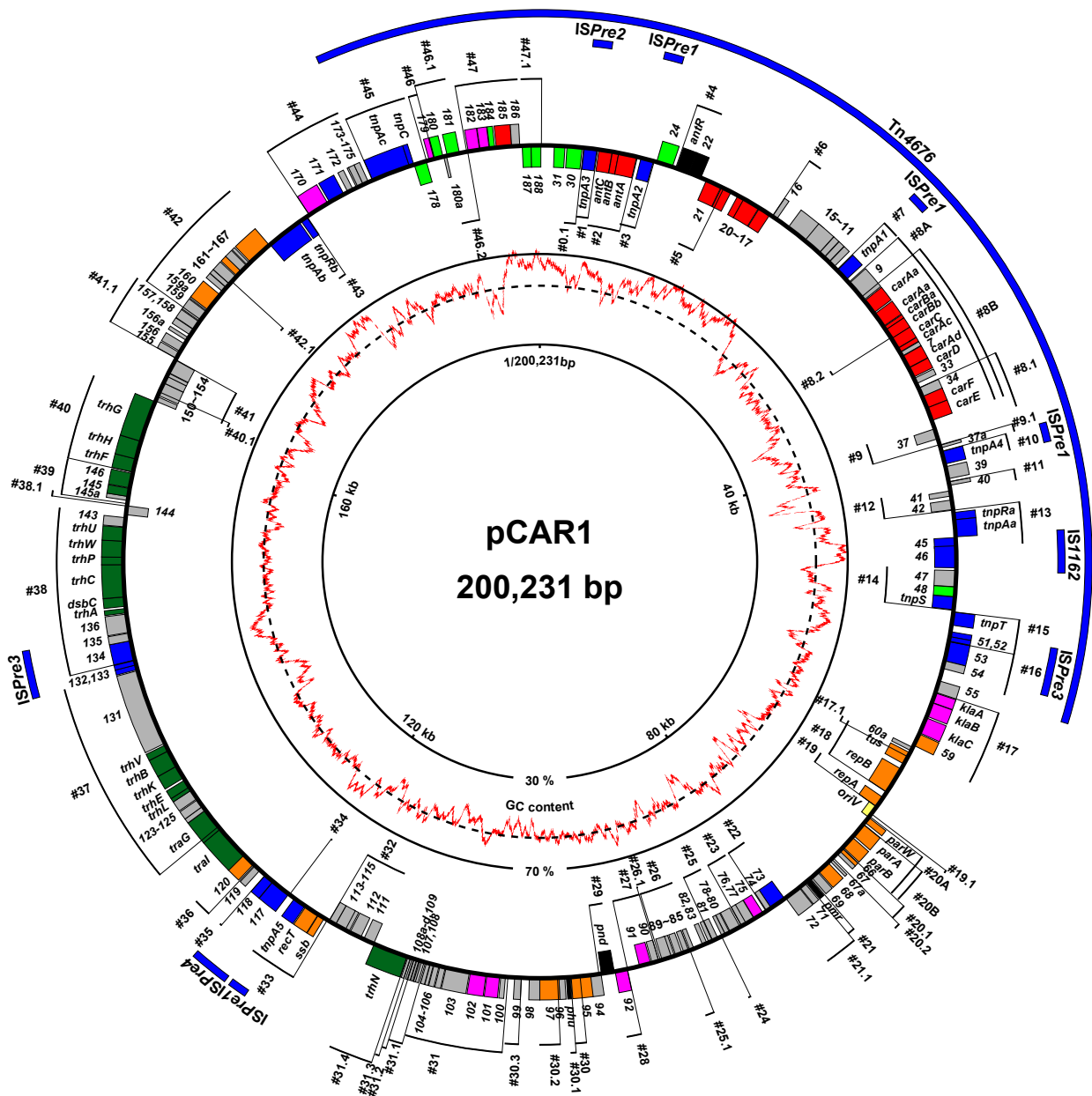


Fig. 1-3. pCAR1 の全塩基配列.

推定された ORF を最も外側の円上にその転写方向に応じて示した (外側の扇型が時計回り, 内側の扇形が反時計回りに転写される ORF). 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よって色分けされており, それぞれ, 赤色: 分解系遺伝子群, 橙色: プラスミドの複製・保持, 緑色: プラスミドの接合伝達, 黄緑色: 輸送タンパク・膜タンパク質, 黒色: 転写制御因子, 青色: 転移因子・挿入因子, 桃色: その他の機能, 灰色: 機能未知である. 過去の転写解析及びタイリングアレイデータより推定された転写単位 (#0.1 ~ #47.1, 全 74 個) をその向きとともに示す. 内側の赤線は GC 含量を示し, 破線が pCAR1 全体の平均 GC 含量である 56% を示す. また Tn4676, ISPre1 ~ ISPre4 の位置を外側の青色の扇型で示した.

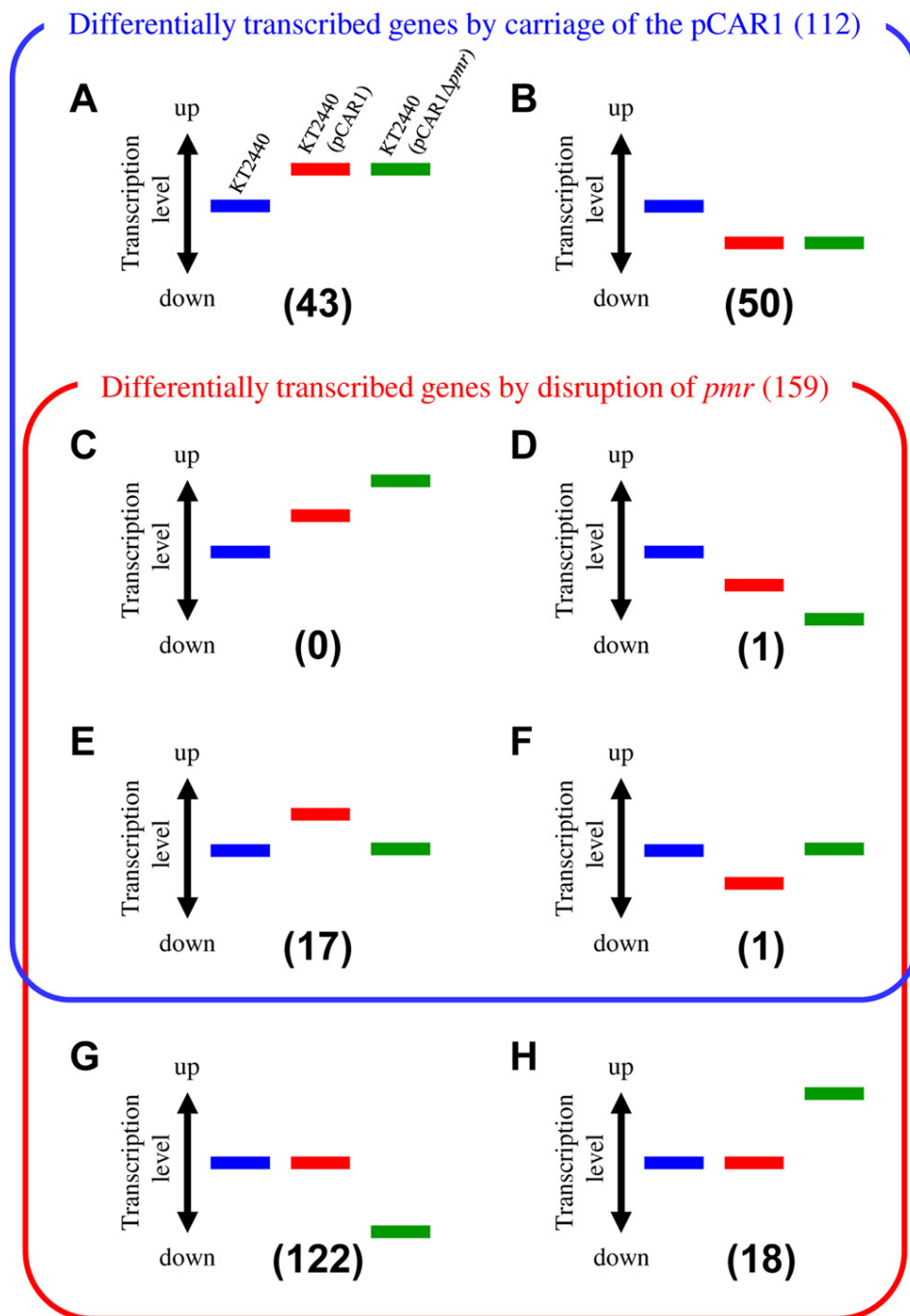


Fig. 1-4. pCAR1 を保持した際に転写変動した ORF と *pmr* を破壊した際に転写変動した ORF の分類 (Yun & Suzuki *et al.*, 2010, Fig. 3).

青, 赤, 緑はそれぞれ KT2440 株, KT2440(pCAR1) 株, *pmr* を破壊した KT2440(pCAR1) 株の, 相対的な転写量を表し, カッコ内にそれぞれのグループに分類された ORF の数を示す.

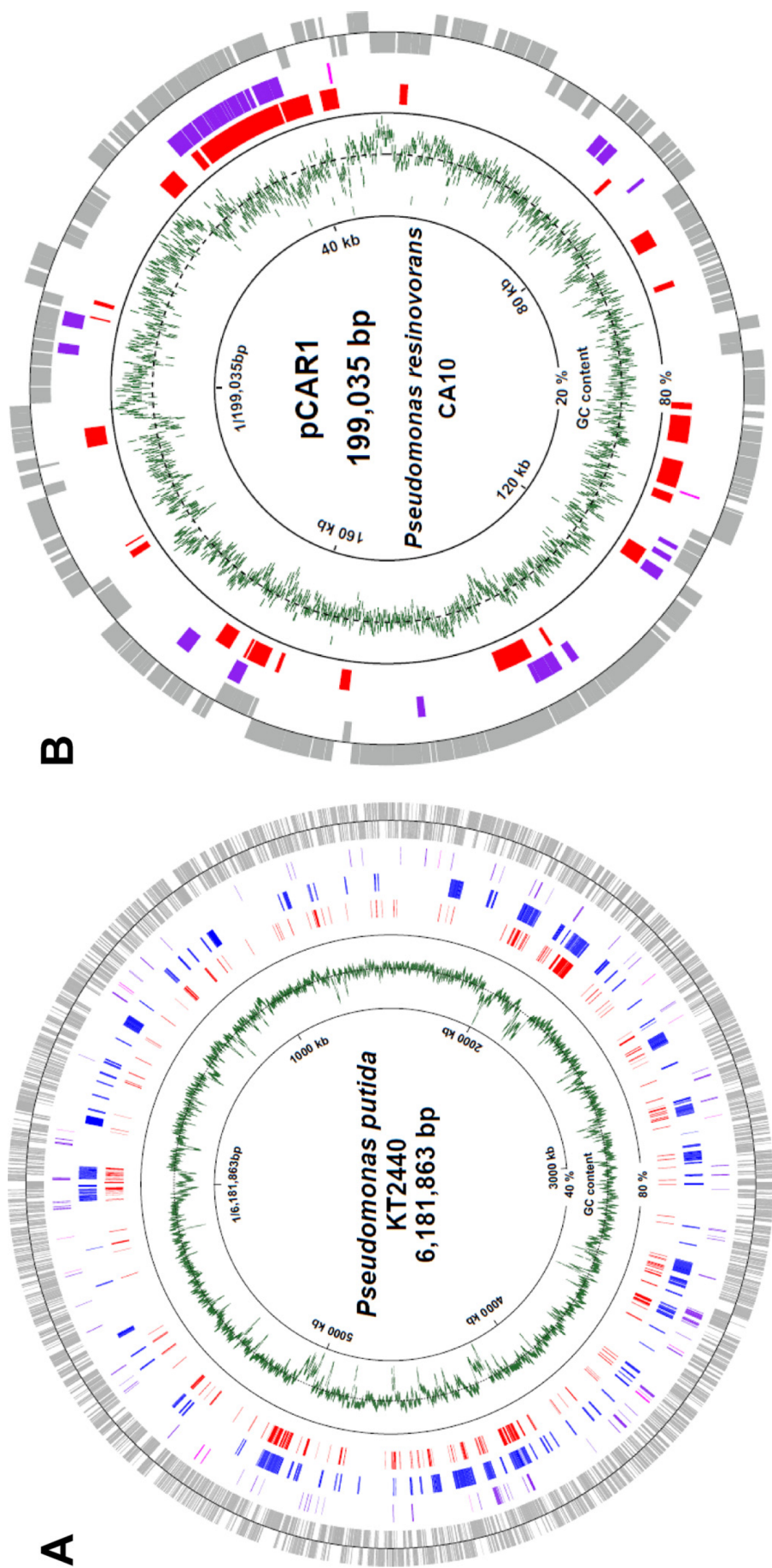


Fig. 1-5. KT2440 株染色体 (A) と pCAR1 (B) 上の Pmr の結合サイトと *pmr* 遺伝子を破壊した際に転写変動した ORF のマッピング (Yun and Suzuki *et al.*, 2010, Fig. 6).

Distribution of Pmr-binding sites on the *P. putida* KT2440 chromosome (A) or pCAR1 (B). Genes or ORFs (gray) outside the circle are coded clockwise, while those inside are coded counterclockwise. Genes upregulated or downregulated by *pmr* disruption are shown in purple and magenta, respectively. Putative horizontally acquired DNA regions in the KT2440 chromosome are shown in blue. The Pmr-binding regions detected in this study are shown in red. The green line indicates the average G+C content of genomic DNA (KT2440, 1,000-nt span; pCAR1, 100-nt span). The broken-line circle indicates the average G+C content of the entire KT2440 (61.6%) or pCAR1 (56.3%) genome.

Table 1-1. プラスミドが宿主の生育に与える影響についてのこれまでの報告

宿主		プラスミド		行われた解析		結果		参考文献	
<i>E. coli</i>									
<i>E. coli</i> K-12		R1 dtd19 and its copy number mutant		Growth rate [Cell length] [SEM (隔壁形成の観察)]		プラスミドを保持すると、様々な培地での生育速度が小さくなり、コピー数が増加した変異プラスミドではさらに生育が遅くなった。プラスミド保持株の集団中では、一部の細胞が隔壁形成不全によって伸長することで、平均細胞サイズが大きくなった。細胞サイズの増加とプラスミドコピー数には相関が見られた。		Engberg <i>et al.</i> , 1975	
<i>E. coli</i> 114		pH 121/PB165 (non-conjugative, Sm ^r , Su ^r)		Growth curve Competition assay		それぞれ単独で培養した生育曲線には差が見られないが、混合して培養するとプラスミド保持株の割合が次第に減少する。		Dale & Smith, 1979	
<i>E. coli</i> K12 921		医療現場より単離された薬剤耐性プラスミド101種類		Growth rate		宿主の生育の遅れる程度と、そのプラスミドが属する不和合性群、及びコードする抗生物質耐性の種類とは相関がない。プラスミドのサイズとも明確な相関はない。		Zund & Lebek, 1980	
<i>E. coli</i> RH202 and its derivatives		RSF2124 and its derivatives		Competition assay		[Adams <i>et al.</i> , 1979]の結果を受けて]colisinを生産しないRSF2124派生プラスミドでは、プラスミド保持株は淘汰されかけけるが、染色体上に変異が入った株が出現しその割合が再び増加する。プラスミドの脱落も見られた。		Helling <i>et al.</i> , 1981	
<i>E. coli</i> RR1		the derivatives of pBR322		Competition assay		テトラサイクリン耐性遺伝子の発現のみが宿主のfitnessを低下させる要因であることを示した。		Lee & Edlin, 1985	
<i>E. coli</i> B		pACYC184 (4 kb, Cm ^r , Tc ^r)		Competition assay Long-term culturing		約500世代の培養後に、染色体上の変異によってfitnessが向上した。		Bouma & Lenski, 1988	
<i>E. coli</i> HB101		RSF1050 and its derivatives (7.6-7.8 kb, copy number is 37, 56, 240, respectively)		Growth rate Total protein/定量 Total RNA 定量 Ribosome/定量 2D-PAGE		プラスミド保持株において、コピー数37では野生株との差は見られなかったが、コピー数56, 240ではgrowth rateの低下、リボソームの減少、TCAサイクルの酵素量の増加が見られた。		Birnbaum & Bailey, 1991	
<i>E. coli</i> JM109		pBR322 (ColE1-derived) pEcoR4 (ColE1-derived) pMTC48 (ColE1-derived) pRK248 (RK2-derived)		Growth curve		野生株はglucoseを唯一の炭素源とするM9最少培地ではほとんど増殖が見られないが、プラスミドを保持すると生育できるようになった。LB培地ではプラスミド保持株の生育が遅れる(最終到達ODは同じ)が、glucoseを添加すると野生株と同等の生育速度を示し、最終到達ODは野生株を上回った。		Rhee <i>et al.</i> , 1994	
<i>E. coli</i> RB791		A derivative of pRIT28 into which a gene encoding protein ZZ		Growth rate CFU Glucose consumption Protein production		野生株、プラスミド保持株 (IPTG誘導なし)、プラスミド保持株 (IPTG誘導あり) を比較したところ、IPTG非存在下ではプラスミドの有無によって growth rate や glucose consumption に差は見られなかった。		Andersson <i>et al.</i> , 1996	
<i>E. coli</i> HB101		pUC19 pRK248		Growth curve Resting cell reaction		休止菌体反応によるグルコース取り込み量が増加した。		Diaz-Ricci & Hernandez, 2000	
<i>E. coli</i> K12		R1 (~100 kb, IncFII) RP4 (60 kb, IncP-1)		Competition assay Long-term culturing		1100世代の培養後、プラスミド・染色体両方に fitness cost を抑える変異が入った。プラスミド上の変異としては、抗生物質耐性遺伝子を含む領域の欠失や、性纖毛 (pili) 合成に関わると思われる遺伝子や複製起点となる <i>oriV</i> 領域への IS の挿入が検出されるところともに、(原因遺伝子は特定されなかったものの) プラスミド上の変異に由来する接合伝達能の低下も見られた。		Dahlberg & Chao, 2003	

Table 1-1. プラスミドが宿主の生育に与える影響についてのこれまでの報告 (続き)

<i>E. coli</i> DH1	pGSK001 (2.6 kb, pUC9-base) and its derivatives (5.9 kb) containing the therapeutic sequence (a hepatitis B antigen under the control of a CMV promoter)	Growth rate Biomass yield Acetate yield Oxygen uptake Modeling 2D-PAGE	プラスミド保持株ではgrowth rateとbiomassが減少し、acetate生産量と酸素取り込み量が増加した。Modelingによって、これらの変化の原因はプラスミド上にコードされたカナマイシン耐性タンパクの高発現(細胞の全タンパクの18%)によって、ATPの必要量が増加したためであると推定された。	Rozkov <i>et al.</i> , 2004
<i>E. coli</i> K12 MG1655	R1 (~100 kb, IncFII)	Competition assay Long-term culturing	420世代の培養後、5ロット中2ロットでプラスミド上の変異(実体は不明)に由来する宿主のfitnessの向上(非保持株も上回る)が見られた。最もfitnessの向上が見られたR1プラスミドを <i>Salmonella enterica</i> serovar typhimuriumに保持させたところ、同様にfitnessの向上が見られた。	Dionisio <i>et al.</i> , 2005
<i>E. coli</i> 345-2RifC	<ul style="list-style-type: none"> • R46 [• K42R RpsL substitution] [• TnI, Tn7] 	Competition assay (buch) Long-term culturing Survival (in pig)	ストレプトマイシン耐性を付与する因子として、(i) R46プラスミドの保持、(ii) リボソームタンパク質の遺伝子の変異、及び(iii) トランスポゾン (TnI, Tn7) の挿入、がそれぞれ宿主のfitnessに影響を及ぼすか調べたところ、R26保持株では液体培養中でのfitnessの低下、ブタ消化管内での生存性の低下が見られた。ストレプトマイシン非存在下で200世代培養した後では、液体培地中でのfitnessは回復しなかったものの、ブタ消化管内では野生株よりも高い生存率を示した。	Enne <i>et al.</i> , 2005
<i>E. coli</i> BL21(DE3)	<ul style="list-style-type: none"> • pOri1 (2.8 kb, 50 copies) • pOri2 (4.6 kb, 400 copies) (ColE1-derived, the difference is the number of ori)	Growth rate Glucose consumption Biomass yield Acetate yield Oxygen uptake Enzyme activities Metabolic flux Microarray	両プラスミドを保持した際に、growth rateが低下し、glucose取り込み量・biomass・acetate生産量・酸素取り込み量が増加した。Microarrayによるトランスクリプトーム解析の結果、解糖系やTCA回路の遺伝子は転写誘導されていた一方で、グリオキシル酸経路や糖新生系の遺伝子の転写は抑制されていた。この結果は、酵素活性及び代謝産物量の測定結果とも一致した。	Wang <i>et al.</i> , 2006
<i>E. coli</i> DH5a	NS3 (7.3 kb, pUC ori-derived)	Growth rate Biomass yield Glucose consumption Acetate production Microarray (mid log) 2D-PAGE (mid log)	ペントースリン酸経路の酵素の遺伝子の転写には大きな変化が見られなかったが、解糖系では複数の遺伝子が減少していた。他方、TCA回路では複数の遺伝子の転写が増加していた。2D-PAGEによって、転写量の変化とタンパク量の変化はほぼ相関していることが示された。	Ow <i>et al.</i> , 2006
<i>E. coli</i> DH5a	NS3 (7.3 kb, pUC ori-derived)	Growth rate Glucose consumption Acetate production qRT-PCR 2D-PAGE	中心代謝系のglobal regulatorとして知られているFruRの遺伝子破壊株では、プラスミドを保持した際の生育速度の低下が改善し、プラスミド収量も増加した。fruR破壊株では糖代謝系や転写・翻訳に関わる遺伝子の転写/翻訳量が増加し、糖新生系やTCA回路、ストレス応答に関わる遺伝子の転写/翻訳量が減少していた。	Ow <i>et al.</i> , 2007
-	-	<i>in silico</i> simulation	各パラメーターを、プラスミド生産量が最大になるようにsimulateした結果、acetateの生成と恒常的な抗生物質耐性の発現はプラスミド生産を下げる原因となること、PEPをpyruvateとATPに変換するPyr活性が低いこととNADPHの生成はプラスミド生産量を高める鍵反応となることを示した。	Cunningham <i>et al.</i> , 2009

Table 1-1. プラスミドが宿主の生育に与える影響についてのこれまでの報告 (続き)

-	-	<i>in silico</i> simulation	(a) growth rate, (b) plasmid production, (c) maintenance energy expenditure をそれぞれ最大にするように各コンポーネント量を調整したところ、(c) が (Wang <i>et al.</i> , 2006) の実験データに最も一致した。	Ow <i>et al.</i> , 2009
<i>E. coli</i> K12-derived strain XK1502	R1 (~100 kb, IncFII) and its derivative	Competition assay <i>in silico</i> simulation	R1 プラスミド上にコードされた、自身の接合伝達を抑制する 'fertility inhibition' (fin) システムはプラスミドが宿主に与える負荷を軽減することを示した。	Haft <i>et al.</i> , 2009
<i>E. coli</i> 以外				
<i>Pseudomonas fluorescens</i> SBW25	pQBR103 (425 kb)	Survival (on plant) Competition (on plant)	テンサイ植物体上での菌数の変化を、(i) プラスミド保持株/非保持株それぞれ単独の場合、(ii) 混合接種した場合で、継続的にモニタリングした。(i)・(ii) 両方の場合で、テンサイ接種直後はプラスミド保持株が減少したが、植物体の成長に伴って非保持株と同数まで回復した。	Lilley & Bailey, 1997
<i>Pseudomonas chlororaphis</i> SPR044	pJP4 (80-kb, IncP-1β)	Survival (on plant root)	野生株の他にSPR244株 (GacS deficient), SPR344株 (phenazine-1-carboxamide overproducer), 及びSPR644株 (phenazine-1-carboxamide deficient) を用いてシロイヌナズナ根圏での生存における、プラスミド保持の影響を調べた。	Schmidt-Eisenlohr & Baron, 2003
<i>Salmonella Typhimurium</i>	pSf-R27 (IncHI, no antibiotic resistance), with or without a functioning <i>sfh</i> gene	Microarray Competition assay Virulence Motility	プラスミド上にコードされたSfh (H-NSホモログ) が存在しないとプラスミドを保持した際により多くの遺伝子が転写変動するようになり、宿主のfitnessが低下した。pSf-R27Δ <i>sfh</i> 保持株では運動性の低下、UV耐性の上昇、マクロファージ存在下での生存率の上昇という、染色体の <i>hms</i> 破壊株と同様の表現型が観察された。	Doyle <i>et al.</i> , 2007
<i>Pseudomonas fluorescens</i> SBW25	pQBR103 (425 kb)	Raman spectroscopy	pQBRプラスミドを保持すると、細胞のRamanスペクトルが大きく変化した。その原因となる化合物としては、adenine, guanine, cytosine, uracil等のヌクレオチドが多く推定された。	Ude <i>et al.</i> , 2007
<i>Pseudomonas fluorescens</i> 13525	pUCPM18 derivatives (7-8 kb, 14-16 copies) pBBR1MCS-2 (5 kb, 30 copies)	Growth rate Glucose consumption Biomass yield Organic acid yields Enzyme activities	pUCPM18派生プラスミドを保持した際には、解糖系及びグルコン酸生成経路の活性が上昇しgrowth rateが増加した。2種のpUCPM18派生プラスミド (差異はinsertの抗生物質耐性遺伝子のみ) を同時に保持した際に、その効果はさらに増強された。pBBR1MCS-2を単独で保持した場合は大きな影響は見られなかったが、pUCPM18派生プラスミドと同時に保持した場合は、pUCPM18派生プラスミドの影響を抑える効果が見られた。	Buch <i>et al.</i> , 2010
<i>Enterobacter asburiae</i> PSI3 (gluconic acid producing, phosphate-solubilizing strain)	pBluescript/ SK (ColE1ori, 500-700copies) pBR322 (ColE1ori, 15-20copies) pGM160 (ColE1ori, 7.8 kb, Gm ^r) pACYC184 (p15Aori, 4.2 kb, 10-12 copies) pTOL <i>gfp</i> mut3b (~117 kbp, <i>gfp</i> under <i>lac</i> promoter, single copy)	Growth rate Glucose consumption Biomass yields Gluconic acid yield Phosphate released	サイズ、コピー数が異なる5種類のプラスミドをそれぞれ保持させたところ、1種類 (pACYC184) を除いた4種類では、リン制限下において生育速度、glucose消費速度、菌体収量、gluconic acid生産量、可溶化させたリン量が低下した。pACYC184は培養中に菌体から急速に脱落していた。	Sharma <i>et al.</i> , 2011

Table 1-2. 本研究で用いた *Pseudomonas* 属細菌 3 種, 及び大腸菌の比較

	<i>P. putida</i> KT2440	<i>P. aeruginosa</i> PAO1	<i>P. fluorescens</i> Pf0-1	<i>E. coli</i> K-12 MG1655
単離源	大阪の田畑	嚢胞線維症患者の肺	米国農場の土壌	ヒトの糞便
Genome 配列の報告論文	Nelson <i>et al.</i> , 2002	Stover <i>et al.</i> , 2000	Silby <i>et al.</i> , 2009	Blattner <i>et al.</i> , 1997
Genome size	6,181,863 bp	6,264,404 bp	6,438,405 bp	4,639,675 bp
GC 含量	61%	67%	61%	50%
GenBank Accession No.	AE015451	AE004091.2	CP000094.2	U00096.2
最新のリリース	2010.03.05	2010.09.28	2011.03.11	2010.10.25
No. of CDS	5350	5572	5722	4145
Coding density	86%	89%	89%	85%
No. of rRNA genes (cluster)	22 (7 clusters)	13 (4 clusters + 4.5S)	19 (6 clusters)	22 (7 clusters)
No. of tRNA	74	63	73	89
その他備考	トルエン分解プラスミド pWW0 の保持株 (mt-2 株) として単離された。KT2440 株からは pWW0 が脱落している。	日和見感染菌である緑膿菌のモデル菌株。 <i>Pseudomonas</i> 属細菌として初めて全塩基配列が決定された。	土壌より単離した <i>P. fluorescens</i> の中で土壌への吸着力が強い株として選抜された。	ファージと F プラスミドを脱落させた以外はほとんど遺伝子操作が加えられていない K-12 派生株。

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

2-1. 緒言

本章では、各宿主における pCAR1 コピー数を測定するとともに、Phenotype MicroArray (Biolog 社) を用いて、pCAR1 を保持した際の宿主の呼吸量 (細胞内の還元力) が変化する培地条件を探索することで、宿主細胞内の様々な代謝反応の中で、どのような反応が pCAR1 を保持した際に影響を受けるのか絞り込みを行った。

2-2. 材料と方法

2-2-1. 使用した菌株、プラスミド、培地、及び培養条件

本章で使用した培地を Table 2-1 に、培地にストックとして添加した試薬とその終濃度を Table 2-2 に、使用した菌株およびプラスミドを Table 2-3 にそれぞれ示す。 *Pseudomonas* 属細菌はいずれも LB 培地、R2A 培地、またはカルバゾールを添加した NMM-4 培地 (carbon-free nitrogen plus mineral medium 4) において 30°C で培養し、大腸菌は LB 培地で 37°C で培養した。平板培地には微生物培養用精製寒天末 (Nakarai Tesque, Inc., Kyoto, Japan) を培地に対して 1.6 % (wt/vol) となるように加えた。R2A 平板培地は、すべての成分及び寒天 [1.5 % (wt/vol)] があらかじめ混合された市販品 (Difco R2A Agar, Becton Dickinson, Code 218263) を用いて作製した。カルバゾールを添加した NMM-4 培地で平板培地を作製する際には、カルバゾールを含まない層の上にカルバゾールを懸濁した層を薄く重ねることでクリアゾーン形成を短時間で観察できるようにした (カルバゾール重層プレート、作製法は補章を参照)。

Table 2-1. 本章で用いた培地

LB medium		R2A medium		NMM-4 medium	
Bacto tryptone	10 g	Yeast extract	0.5 g	Na ₂ HPO ₄	2.2 g
Yeast extract	5 g	Proteose Peptone No.3	0.5 g	KH ₂ PO ₄	0.8 g
NaCl	10 g	Casamino acids	0.5 g	NH ₄ NO ₃	3.0 g
pH 7.0		Dextrose	0.5 g	FeCl ₃ ·6H ₂ O*	0.01 g
per liter		Soluble Starch	0.5 g	MgSO ₄ ·7H ₂ O*	0.2 g
		Sodium pyruvate	0.3 g	CaCl ₂ ·6H ₂ O*	0.01 g
		Dipotassium phosphate	0.3 g	pH7.0	
		Magnesium sulfate	0.05 g	per liter	
		per liter			

*オートクレーブ後にフィルター滅菌済みのストックを添加 (Table 2-2 を参照)

Table 2-2.本章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
炭素源・エネルギー源 Carbazole (plate culture)	CAR	1 mg/ml	40 mg/ml	DMSO ^a
ミネラル				
FeCl ₃ ·6H ₂ O	-	10 µg/ml	10 mg/ml	10 mM HCl ^b
MgSO ₄ ·7H ₂ O	-	200 µg/ml	200 mg/ml	H ₂ O ^c
CaCl ₂ ·2H ₂ O	-	10 µg/ml	10 mg/ml	H ₂ O ^c
その他				
5-Bromo-4-chloro-3-indryl-β-D-galactoside	X-gal	20 µg/ml	20 mg/ml	DMF ^d

^adimethylsulfoxide, ^bHPLC グレードの 1N HCl を MilliQ 水で希釈して使用, ^cMilliQ 水を使用,

^ddimethylformamide

2-2-2. 試薬, 酵素, 基本的な実験操作

試薬の調製法は新細胞工学実験プロトコル(東京大学医科学研究所制癌研究部編, 第1版, 1993), およびクローニングとシークエンス(杉浦昌弘編, 1989)に従った. 本研究で使用した制限酵素およびその他の酵素類は, タカラバイオ株式会社(Takara Bio), 東洋紡績株式会社(Toyobo), ニッポンジーン (Nippon Gene), ロシュ・ダイグノスティックス社(Roche Diagnostics) のいずれのものかを購入し, 説明書の指示に従って用いた. ベクターと DNA 断片の連結は Ligation High (Toyobo)または Ligation High ver.2 (Toyobo) を添付のプロトコルに従って用い, 反応液を直接大腸菌の形質転換に使用した. 「*Pseudomonas* 属細菌からの total DNA の抽出」, 「Polymerase chain reaction(PCR)」, 「アガロースゲル電気泳動とゲルからの DNA の回収」, 「コンピテントセルの作製」, 「大腸菌の形質転換」, 「大腸菌からのプラスミドの抽出」, については, 補章1に詳細な手順を記した.

2-2-3. 生育曲線の作製

補章1に手順の詳細を記し, ここでは概要のみ記述する. 用いる菌株のシングルコロニーを 5 ml の LB 液体培地に植菌し, 30°C, 300 strokes/min で 14~14.5 h 前培養した. 集菌・洗菌後, 終濃度 0.1% (wt/vol) のコハク酸を含む 100 ml の NMM-4 液体培地に, 開始 OD₆₀₀ が 0.05 となるように植菌し, 30°C, 120 rpm で培養しながら, OD₆₀₀ または CFU/ml を測定した. 前培養液から抽出した total DNA をテンプレートとして pCAR1 上の複数の領域を PCR で増幅することで, 用いた菌株内の pCAR1 に欠失がないことを確認した.

2-2-4. pCAR1 コピー数の測定

KT2440(pCAR1)株, PAO1(pCAR1)株, Pf0-1(pCAR1)株のそれぞれの total DNA に宿主染色体上・pCAR1 上のそれぞれの領域がどれだけ含まれているかを定量 PCR によって定量した. total DNA は, コハク酸培養中 (「2-2-3. 生育曲線の作製」を参照) に培養開始 4 h, 8 h, 24 h でそれぞれサンプリングした 20 ml 分の培養液より抽出した. 定量 PCR で増幅した領域は, 宿主染色体上は ATP 合成酵素の遺伝子である *atpI* 遺伝子 (locus_tag 番号はそれぞれ

PP_5420, PA5561, Pfl01_5737) 内部のそれぞれ 146 bp, 148 bp, 110 bp の領域で, pCAR1 上は *repA* 遺伝子の内部の 116 bp の領域である. total DNA は 10 ng/μl に希釈して用い, 検量線作製にはそれぞれのプライマーセットの増幅する領域を 1 つの pT7Blue T-vector (Novagen) にクローニングしたプラスミドを 100 pM~10 fM に 1/10 ずつ段階希釈したものを用いた.

プラスミドの作製法の詳細は以下の通り. 各 pCAR1 保持株の total DNA と各宿主の *atpI* 遺伝子を増幅するプライマーセット, DNA ポリメラーゼに Ex Taq (Takara Bio, Shiga, Japan) を用いて PCR を行い, アガロースゲル電気泳動によって精製した産物を pT7Blue T-vector (Novagen) に TA クローニングしシーケンスを確認した. 得たプラスミドをマルチクローニングサイト内の *AccI* と *XbaI* サイトで切断し, CIAP で脱リン酸処理をした. pTori008 (Shintani *et al.*, 2006a) を同じ制限酵素 (*AccI* と *XbaI*) で処理して得た, *repA* 遺伝子を含む 1254 bp の配列 (pCAR1 の塩基番号で 68931-70181) とそれぞれライゲーションし, 目的のプラスミドを得た.

2-2-5. Phenotype MicroArray (Biolog 社) による解析

Phenotype MicroArray (Biolog 社) を用いて, pCAR1 保持株と非保持株の様々な培養条件における呼吸量を測定し, 比較した. Phenotype MicroArray は, 1well ごとに異なる化合物が入った 96 穴プレートであり, 各 well に等量の菌懸濁液を分注することで 1 well ごとに異なる培地が完成する仕組みとなっている (Fig. 2-1). 菌懸濁液には tetrazolium violet という色素が添加されており, 菌株が呼吸して NADH が生成すると色素が還元されて紫色を呈する. Tetrazolium violet は Fig. 2-2 に示すように, 4 つの窒素原子と 1 つの炭素原子から構成される tetrazolium 環に 2 つのフェニル基と 1 つのナフチル基が結合した構造をしており, 還元されると中央の五員環が開裂し, 紫色を呈する. 専用の培養装置を用いてプレートを静置培養すると, 装置内の CCD カメラが 15 分に 1 回自動的に画像を取得し, 各 well の発色した色素量をモニタリングすることができる.

Biolog 社では細菌用に PM1~20 の 20 種類の 96 穴プレートを販売しているが, 本研究では PM1 (C 源), PM2A (C 源), PM3B (N 源), PM4A (P または S 源), PM9 (浸透圧耐性), PM10 (pH 耐性) の 6 種類を選んで, 各株のデータを 2 連で取得した.

具体的な植菌の方法は補章 1 に記すが, 基本的には, 前培養を R2A 寒天培地で行った点以外は Biolog 社のプロトコル (PM Procedures for *E. coli* and other GN Bacteria, 16-Jan-06) に従って行った. 大まかには, カルバゾール重層プレート上でのクリアゾーン形成によってカルバゾール分解能を確認したシングルコロニーを R2A 寒天培地で一晚培養後, 一定の濁度となるように Biolog 社が提供する培地 (IF-0 または IF-10) に懸濁して, PM パネルに 1 well あたり 100 μl 分注するという操作である. 培地成分及び PM1~4 の各 well の化合物の正確な濃度は企業秘密だが, おおよそ Table 2-4 に示す組成であるとされている. 菌体数は,

所定の濁度となるように調製した菌懸濁液を段階希釈して LB プレートに塗布し、得られたコロニーを計数することで見積もった。各 well に入った化合物をプレートの配置どおりに並べた図を Supplemental Fig. S2-1 に示す。

Table 2-4. Phenotype MicroArray の各 well の培地成分 (Biolog 社の公表範囲)

PM1~2 (C 源)		PM3~4 (N, P, S 源)	
C 源(各 well)	5~50 mM	Sodium succinate	20 mM
NaCl*	100 mM	Ferric citrate	2 μM
Triethanolamine HCl	30 mM	各 well の化合物	2~20 mM (N 源)
(pH7.1)*			
NH ₄ Cl*	5 mM		1 mM range (P 源)
NaH ₂ PO ₄ *	2 mM		100 μM range (S 源)
Na ₂ SO ₄ *	0.25 mM	PM1-2 の培地で*のついたものから	
MgCl ₂ *	0.05 mM	N, P, S いずれかの成分を抜いたもの	
KCl*	0.05 mM		
Ferric chloride*	1 mM		
Tetrazolium violet	0.01%	Tetrazolium violet	0.01%
菌体	85%T ^a	菌体	85%T ^a
	(≒ 10 ⁸ CFU/ml)		(≒ 10 ⁸ CFU/ml)
PM9~10 (浸透圧耐性・pH 耐性)			
各 well の化合物	(濃度は公表)		
1/5 LB			
Tetrazolium violet	0.01%		
菌体	85%T ^a の 200 倍希釈		
	(≒ 10 ⁵ -10 ⁶ CFU/ml)		

^a%T は % of Transmittance の略であり、ブランクが 100%としたときの光の透過率 (濁度) を示す。

データの数値化・可視化には「PM Data Analysis Suite (Biolog, version 1.20.02)」を用いた。このソフトは「Data File Converter」「File Management/ Kinetic Plot Version」「Parametric Version」の 3 つから構成されており、詳細な使い方は補章 1 に記す。

数値化したデータの取り扱いには Excel 2007 または Excel 2010 (Microsoft 社) を用い、散布図及びヒストグラムの作成にはフリー統計解析ソフト「R」を用いた。「R」は ver. 2.12.2 (64 bit) の日本語化パッチ済みのものを筑波大学の CRAN (<http://cran.md.tsukuba.ac.jp/bin/windows/base/rpatched.html>) よりダウンロードして用いた。

Table 2-3.本章で用いた菌株とプラスミド

菌株とプラスミド	関連する性質 ^a	入手先または参考文献
Bacterial strains		
<i>Escherichia coli</i> DH5α	F ⁻ λ, φ80d, <i>lacZΔM15</i> , Δ (<i>lacZYA-argF</i>), <i>U169</i> , <i>endA1</i> , <i>recA1</i> , <i>hsdR17</i> (<i>r_K⁻</i> , <i>m_K⁺</i>), <i>deoR</i> , <i>thi-1</i> , <i>supE44</i> , <i>gyrA96</i> , <i>relA1</i>	Toyobo
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO1	naturally Ap ^r , naturally Cm ^r , naturally Km ^r , naturally Rif ^r , naturally Sm ^r , naturally Tc ^r	(Stover <i>et al.</i> , 2000)
<i>P. aeruginosa</i> PAO1(pCAR1)	<i>P. aeruginosa</i> PAO1 harboring pCAR1	(Takahashi <i>et al.</i> , 2009)
<i>P. fluorescens</i> Pf0-1	naturally Ap ^r , naturally Cm ^r , naturally Sm ^r	(Deflaun <i>et al.</i> , 1990)
<i>P. fluorescens</i> Pf0-1Km	<i>P. fluorescens</i> Pf0-1-derivative strain with the introduced Km ^r gene into Pf01_0559	(Takahashi <i>et al.</i> , 2009)
<i>P. fluorescens</i> Pf0-1Km(pCAR1)	<i>P. fluorescens</i> Pf0-1Km harboring pCAR1	(Takahashi <i>et al.</i> , 2009)
<i>P. putida</i> KT2440	naturally Ap ^r , naturally Cm ^r , naturally Gm ^r , naturally Km ^r , naturally Rif ^r , naturally Sm ^r , naturally Tc ^r	(Nelson <i>et al.</i> , 2002)
<i>P. putida</i> KT2440(pCAR1)	<i>P. putida</i> KT2440 harboring pCAR1, naturally Tc ^r , naturally Cm ^r	(Miyakoshi <i>et al.</i> , 2007)
Plasmids		
pCAR1	Isolated from <i>Pseudomonas resinovorans</i> CA10, carrying the <i>car</i> and <i>ant</i> operons, IncP-7 group, self-transmissible	(Maeda <i>et al.</i> , 2003; Shintani <i>et al.</i> , 2006b; Takahashi <i>et al.</i>)
pT7Blue T-vector	Ap ^r , <i>lacZ</i>	Novagen

^aAp^r, Cm^r, Gm^r, Km^r, Rif^r, Sm^r and Tc^r はそれぞれ ampicillin (100 µg/ml), chloramphenicol (30 µg/ml), gentamicin (30 µg/ml), kanamycin (50 µg/ml), rifampicin (25µg/ml), streptomycin (450µg/ml) 及び tetracycline (12.5µg/ml)への耐性を示す。

2-3. 結果と考察

2-3-1. pCAR1 コピー数の測定

宿主によって pCAR1 を保持することの影響の大きさに違いが見られた場合、各宿主でのコピー数が異なる可能性が考えられるため、まずコピー数の測定を行うことにした。各宿主の total DNA 中に含まれている染色体上の *atpI* 遺伝子・pCAR1 上の *repA* 遺伝子を定量 PCR によってそれぞれ定量し、その比 *repA/atpI* を pCAR1 コピー数とした。染色体側の測定対象領域として *atpI* 遺伝子を選んだ理由は、3 株共通に染色体の複製開始点付近に位置し、ATP 合成酵素をコードする必須遺伝子であるため欠失の心配がないと考えられたからである。一方、pCAR1 上の *repA* 遺伝子も pCAR1 の複製に必須であることが実験的に示されており、*oriV* 近傍に位置している遺伝子である。

コハク酸を唯一の炭素源として培養し（生育曲線は Fig. 2-3 参照）、培養開始 4 h, 8 h, 24 h のコピー数を測定したところ（Table 2-5）、対数期（4 h）のコピー数は 3 宿主でほぼ同じ（1～2）で、KT2440 株と PAO1 株では定常期（8 h）にわずかに増加（2～3）していた。一方 Pf0-1 株では生育段階によらず 1～2 でほぼ一定であった。以前の研究で、LB 培地で一晚培養した Pf0-1(pCAR1)株の派生株の全塩基配列が次世代シーケンサーを用いて決定されたことがあったが（Shintani *et al.*, 2011）、その際の染色体と pCAR1 のリード深度の比と、今回の測定値は一致していた。以上、3 宿主のコピー数に大きな違いは認められないと結論づけた。

2-3-2. Phenotype MicroArray 解析

pCAR1 を保持した際の宿主の表現型の変化を網羅的に検出するため、Phenotype MicroArray (Biolog 社) を用いて様々な培養条件での菌体の呼吸量を経時的にモニタリングした。3 宿主の pCAR1 保持株と非保持株を比較することで、各宿主での pCAR1 を保持した際の変化を検出し、その変化が宿主間で共通なのか、それともある宿主特異的なものなのかを検討した。また、KT2440(pCAR1)株の pCAR1 上の NAPs 破壊株のデータ（武田, 2011 年東京大学博士論文）も一緒に考察することで、KT2440 株において観察された pCAR1 の影響が NAPs を介するものなのかどうか検討した。

本項ではまず、(1) C, N, P, S 源のいずれかを変化させた条件（PM1~4）の結果を用いて pCAR1 を保持した際に変化している代謝経路を考察し、(2) 次に浸透圧ストレスや pH ストレスを与えた条件（PM9~10）の結果を用いてストレス応答機構への pCAR1 保持の影響を考察する。

(1). C, N, P, S 源のいずれかを変化させた場合

(1)_(I). 2 連の一致度の評価と“2 株間で差の見られた条件”の選抜方法の検討

Phenotype MicroArray の生データの一例を Fig. 2-4 に示す。1 つ 1 つのマスマスクが、横軸に培養時間（本実験では 48h）、縦軸に tetrazolium violet の発色量（≡菌株の呼吸量）をとったプロットとなっており、15 分に 1 回の自動測定を 48 時間行った結果を示している。感覚的に

は、左列の2株の結果を重ね合わせた図において、緑や赤の部分が多いwellが、選抜すべき“2株間で差が見られた条件”である。プロットを一つ一つ目視によって比較して差が見られた条件を選抜するとデータの客観性・定量性が損なわれると考えたため、以下に示すようなプロットの形状を代表する数値を菌株間で比較することで“2株間で差が見られた条件”を選抜することにした。Biolog システムに添付のソフトウェアではプロットの代表値として、Height (プロットの高さの平均), Area (プロットに囲まれた面積), Inflection (最大値に達するまでの時間), Lag (増加し始めるまでの時間), Slope (傾き)等、様々なパラメーターを計算することができるが、Biolog 社はこの中で Height と Area が一番ブレの少ない値であるとして推奨している。*P. aeruginosa* PAO1 株の Phenotype MicroArray 結果を報告している論文 (Gaillard *et al.*, 2008) で Area が用いられていることから、本研究でも Area を用いることにした。例として、Fig. 2-4 で生データを示したプレートについて Area 値を計算した結果を Table 2-6 に示す。

①同菌株の2連の一致度の評価

2つの菌株の呼吸量に“差がある”とする基準を決めるため、同菌株の2連のデータがどのくらいばらついているのかを評価した。例として、KT2440(pCAR1)株と KT2440 株の PM1~4 のデータ (96×4=384 条件) のデータを用いて検討した例を示す。まず、それぞれの菌株で2連のデータの差をとってヒストグラムを描き (Fig. 2-5), pCAR1 の有無に関わらず分布の中心はほぼ0であり、形状にも大きな差は認められないことを確認した。次に、「それぞれの菌株での2連の差」どうしの相関を散布図に表したところ (Fig. 2-6), 全体の約90%の条件は2連のブレが呼吸量7000未満におさまっていた [7000以上になる条件の数は KT2440(pCAR1)株で27条件(7%), KT2440株で39条件(10%)]. ここから、差が7000以上であった場合に、呼吸量に差が見られるとしてよいと決定した。同様の分布の検討を、KT2440株, PAO1株, Pf0-1株のpCAR1保持株/非保持株について行い、さらにプレートごと、C源, N源, P源, S源ごとでも分布の検討を行った結果、宿主の違い、プレートの違い、C源, N源, P源, S源の違いによって分布に大きな違いが見られないことから、抽出基準は宿主・プレートの種類に関わらず共通でよいと判断した。

②“2株間で差が見られた条件”の選抜方法の検討

比較する2株の2連どうしの組み合わせ (計4通り) で呼吸量の差を計算し、2通り以上の組み合わせで差が7000以上であった場合に、その条件を“2株の呼吸量に差が見られた条件”とすることにした。Table 2-6 に一例を示すが、右から2~5列目が、KT2440(pCAR1)株の呼吸量から KT2440株の呼吸量を差し引く計算を、1連ごとに4通りの組み合わせで行った結果である。7000以上または-7000以下の値を黄色で塗って示しており、同じ行に黄色く塗られた値が2個以上並んだ場合にその行 (条件) を選抜している。ただし、黄色く塗られた値の中で正負が逆転した場合 (well_F07 の Propionic acid の行参照) は、選抜しないこ

とした。さきほどの KT2440(pCAR1)株と KT2440 株の PM1~4 のデータ (96×4=384 条件) のデータにおける、「それぞれの菌株での 2 連の差」 どのの相関を表した散布図に、この方法で選抜される条件を重ね合わせてみると (Fig. 2-7), 2 通りの組み合わせで選抜されたものは片方の菌株で 2 連のブレが大きいものも認められるが、3 通り・4 通りの組み合わせで選抜されたものは、各菌株での 2 連のブレは 7000 以下であるものがほとんどである (すなわち、同じ菌株の 2 連のデータでもブレやすい条件ばかりを選抜しているわけではない) ことが確かめられた。さらに、選抜された条件の中からより確からしいものを選ぶために、何通りの組み合わせで抽出されたかによってその条件の“確からしさの重みづけ”を行うこととした。以降、4 通りの組み合わせで差が 7000 以上であったことを P4, 3 通りの組み合わせで差が 7000 以上であったことを P3, 2 通りの組み合わせで差が 7000 以上であったことを P2 と呼ぶことにする (Table 2-6 の一番右の列に例を示す)。

(1)_(II). pCAR1 の保持または NAPs の破壊によって呼吸量に差が見られた条件の選抜

<PM1~4 全体として>

PM1~4 の 4 枚の 96 穴プレートで、C 源 (190 種)、N 源 (95 種)、P 源 (59 種)、S 源 (35 種) を変えた際の呼吸量を評価できる。pCAR1 保持株と非保持株で差が見られた培養条件の数を Table 2-3 に示す。3 宿主を比較すると、KT2440 株が 66 条件と一番多く、PAO1 株が 39 条件、Pf0-1 株が 31 条件で一番少なかった。また、pCAR1 を保持した際に呼吸量が増加した条件より減少した条件のほうが圧倒的に多く、その数は KT2440 株で 66 条件中 56 条件、PAO1 株で 39 条件中 35 条件、Pf0-1 株で 31 条件中 28 条件であった。KT2440(pCAR1)株の各 NAPs 破壊株と KT2440(pCAR1)株の比較においては、 Δpmr 株で 22 条件、 Δpnd 株で 22 条件、 Δphu 株で 15 条件、 $\Delta pmr\Delta pnd$ 株で 15 条件、 $\Delta pmr\Delta phu$ 株で 15 条件が選抜された。

<C 源 (PM1-2)>

まず pCAR1 保持株と非保持株の比較においては、190 条件の中で、KT2440 株で 22 条件、PAO1 株で 25 条件、Pf0-1 株で 17 条件において、pCAR1 保持株と非保持株で差が見られた (Table 2-8, Fig. 2-8A)。このうち、KT2440 株の 2 条件 (formic acid, D-fructose) と Pf0-1 株の 1 条件 (D-arabitol) は pCAR1 を保持すると呼吸量が増加するタイプの変化であったが、それ以外はすべて pCAR1 を保持すると呼吸量が低下するタイプの変化であった。基質の種類としては全 46 種類であった。複数の菌株で選抜され、選抜された際の確からしさも高い L-malic acid, L-leucine, D,L-malic acid, α -keto-glutaric acid, L-isoleucine, 2,3-butanediol に着目して、代謝経路上の類縁の化合物も見えていくと、①TCA 回路とその周辺の化合物 (α -keto-glutaric acid, D,L-malic acid, L-malic acid, succinic acid, fumaric acid, acetic acid, L-lactic acid, propionic acid), ②分岐鎖アミノ酸 (L-leucine, L-Isoleucine), ③ブタン骨格を持つ化合物 (2,3-butanediol, 2,3-butanone, 3-hydroxy-2-butanone) が顕著な傾向であった。①TCA 回路とその周辺の有機酸の多くは KT2440 株と PAO1 株で選抜されているのに対し、③ブタン骨格を持つ化合物は

PAO1 株と Pf0-1 株で選抜されており, ②分岐鎖アミノ酸は PAO1 株で一番顕著だが, KT2440 株と Pf0-1 株でも選抜されている, という宿主間の違いが見られた.

KT2440(pCAR1)株の各 NAPs 破壊株と KT2440(pCAR1)株の比較においては, 最低 1 株の NAPs 破壊株において抽出された基質は 34 条件であった(Table 2-9, Fig. 2-8B). これら 34 条件のうち KT2440 株と KT2440(pCAR1)株の比較において抽出された 22 条件と重複するものは 13 条件で, これらの中には, 上述した①TCA 回路とその周辺経路の有機酸が多く含まれた (Fig. 2-6B). これらの有機酸を C 源としたときには pCAR1 を保持すると呼吸量が低下し, pCAR1 上の NAPs を破壊すると呼吸量が増加するという挙動を示すことが読み取れる. ②分岐鎖アミノ酸と③ブタン骨格を持つ化合物に関しては, もともと KT2440 株と KT2440(pCAR1)株の比較においても L-leucine (P2) が抽出されているのみであったが, NAPs を破壊してもこれらの化合物を C 源とした際の呼吸量に変化は見られなかった. NAPs を介さない経路で pCAR1 を保持した影響が現れる C 源と考えられる 9 条件については, KT2440 株と KT2440(pCAR1)株の比較において P2 で選抜されたものがほとんどで, かつ pCAR1 を保持した際に呼吸量が増加する方向に変化するものが 3 条件, 減少する方向に変化するものが 6 条件と混ざっており, 化合物間にも構造上の類似性や代謝経路上で近いなどの共通点が見られないという傾向があった. NAPs を破壊して初めて呼吸量に影響が出る 12 条件についても, 各 NAPs 破壊株での P 値が 2 であり, 同じ株の 2 連間のデータのばらつきが大きいものが多い. 以上より, KT2440 株と KT2440(pCAR1)株の比較, また KT2440(pCAR1)株とその NAPs 破壊株の比較で抽出された化合物の中で, 上述した TCA 回路とその周辺の代謝経路の有機酸が, 構造上の類似性や代謝経路上で近いなどの共通点が見られること, いくつかについては PAO1 株と PAO1(pCAR1)株の比較においても抽出されていること, から一番着目すべき化合物群であると結論付けた.

<N 源 (PM3)>

95 条件の基質の中で, KT2440 株で 18 条件, PAO1 株で 6 条件, Pf0-1 株で 5 条件の基質において pCAR1 保持株と非保持株で差が見られた (Table 2-10, Fig. 2-9A). このうち, KT2440 株の 1 条件 (N-acetyl-D,L-glutamic acid), PAO1 株の 1 条件 (ammonia) 以外は pCAR1 を保持すると呼吸量が低下するタイプの変化であった. 基質の種類としては全 26 種類であった. 各株の P4, P3 に着目すると, 2 株以上で P3 以上の確からしきで選抜された基質がないことから, C 源や P 源 (後述) に比べると, N 源として与えた際に pCAR1 を保持株で呼吸量の変化が見られる基質には宿主間の共通性は乏しいと言える.

KT2440(pCAR1)株の各 NAPs 破壊株と KT2440(pCAR1)株の比較においては, 6 条件が選抜された (Table 2-11, Fig. 2-9B). これら 6 条件の基質は P 値がいずれも 2 で確からしさが低く, また KT2440 株と KT2440(pCAR1)株の比較において P4 で抽出された 3 条件の基質 (β -phenylethylamine, α -amino-N-valeric acid, Gly-Met) と P3 で抽出された 4 条件の基質 (D-valine, L-pyroglutamic acid, putrescine, inosine) では, いずれも NAPs を破壊しても

KT2440(pCAR1)株と呼吸量に差が出なかったことから、pCAR1 を保持した際の呼吸量の変化の中で主なものはNAPs を介さない経路で pCAR1 の影響を受けていることがわかる。

<P 源 (PM4 の一部)>

59 基質の中で、KT2440 株で 22 条件、PAO1 株で 8 条件、Pf0-1 株で 8 条件において pCAR1 保持株と非保持株で差が見られた (Table 2-12, Fig. 2-10A)。基質の種類としては全部で 27 条件であり、株間で共通して抽出された基質が多いが、同じ菌株の 2 連のデータのブレが大きいものも多いため、最低 1 株で P4 であった基質を議論する。まず、一番目を引く基質としては D-glucose-6-phosphate であろう。KT2440 株と Pf0-1 株で P4 であり、PAO1 株では P2 であるものの生データを参照すると PAO1(pCAR1)株の 2 連の呼吸量はいずれも PAO1 株の 2 連の呼吸量を下回っており、pCAR1 を保持した際に 3 株で共通に呼吸量が低下する培養条件である。D-glucose-6-phosphate 以外のリン酸化糖 (Table 2-12 において紫字で示した) においても、KT2440 株ではそれらの多くで pCAR1 の保持に伴う呼吸量の低下が見られる。PAO1 株と Pf0-1 株でも一部の基質では呼吸量の低下が見られるが、呼吸量の低下が見られる基質の種類は KT2440 株ほど多くない。リン酸化糖の他には、ヌクレオチドが目立つ。ヌクレオチドにおいても、KT2440 株で多くの条件において pCAR1 を保持した際に呼吸量の低下が観察されている。

KT2440(pCAR1)株の各 NAPs 破壊株と KT2440(pCAR1)株の比較においては、13 条件が抽出された (Table 2-13, Fig. 2-10B)。この 13 条件と KT2440 株と KT2440(pCAR1)株の比較で抽出された 22 条件で重複するものは 9 条件であった。リン酸化糖を P 源とする条件は KT2440(pCAR1)株と KT2440 株の比較で抽出された 3 種類全てが NAPs を破壊した際に抽出されている一方で、ヌクレオチドを P 源とする条件は guanosine-5'-monophosphate 以外は抽出されておらず P 値も低いことから、リン酸化糖の代謝は NAPs を介した pCAR1 の影響を受けているのに対してヌクレオチド代謝に見られる pCAR1 の影響には NAPs の関与は少ないと考えられる。KT2440 株と KT2440(pCAR1)株の比較では抽出されなかったが、KT2440(pCAR1)株とその NAPs 破壊株の比較において初めて抽出された 4 条件のうち、2-deoxy-D-glucose 6-phosphate, D-mannose-1-phosphate, D-mannose-6-phosphate の 3 種はリン酸化糖である。KT2440 株及び KT2440(pCAR1)株での 2 連のばらつきが大きく、pCAR1 を保持しても呼吸量に変化が見られないかどうかは断言できないが、D-glucose-1-phosphate, D-glucose-6-phosphate, D-glucosamine-6-phosphate の 3 種のリン酸化糖とは、pCAR1 を保持した影響及び NAPs を破壊した影響の出方が異なる可能性があり興味深い。

<S 源 (PM4 の一部)>

35 条件の中で、KT2440 株で 4 条件、Pf0-1 株で 1 条件が選抜され、PAO1 株では抽出された基質はなかった (Table 2-14, Fig. 2-11A)。Pf0-1 株で選抜された D,L-ethionine は KT2440 株でも抽出されており、抽出された基質としては 4 種類である。これらの構造式において

硫黄の位置を見ると (Fig. 2-12), cysteamine は-SH 基, thiourea は=S 基, ethionine は-S-結合, glutathione は-S-S-結合と共通性に乏しい.

KT2440(pCAR1)株と NAPs 破壊株の比較においても抽出された基質はなかった (Table 2-15, Fig. 2-11B) ことから, S 源としたときの呼吸量の低下は KT2440 株特異的なものが多く, それらは pCAR1 上の NAPs が関与しない pCAR1 を保持することによる影響と考えられる.

(1)_(III). 活性が変化している代謝経路の考察

pCAR1 保持株と非保持株との比較, 及び KT2440(pCAR1)株とその pCAR1 上の NAPs 破壊株との比較において顕著な傾向が見られた基質が利用される際の代謝経路を考えることで, pCAR1 を保持した際に影響を受けている代謝反応 (関わる酵素・遺伝子) の考察を試みた.

考察にあたってはまず, 各基質がそのままの形で細胞内に入るのか, それとも何らかの変換反応の後に取り込まれるのかを調べた. 既知のトランスポーターのデータベース [Transporter Classification Database (TCDB); <http://www.tcdb.org/>], *in silico* 解析によってトランスポーターと推定された遺伝子のリスト (TransporterDB; <http://www.membranetransport.org/>), 及び ortholog 検索 (Sequence Similarity DataBase; <http://www.genome.jp/kegg/ssdb/>) を用いて, 本研究に用いた *Pseudomonas* 属細菌 3 株それぞれに, 各基質を輸送するトランスポーターが保存されているかどうか調べた. その結果をふまえて, 化合物群ごとに考察していく.

(i). C 源として与えた場合の TCA 回路とその周辺の有機酸

TCA 回路とその周辺の有機酸 (α -ketoglutarate, succinate, fumarate, malate, acetate, lactate) についてはこれらを細胞内に運搬する transporter が本研究に用いた *Pseudomonas* 属細菌 3 種すべてに保存されており, 機能解析されている大腸菌のトランスポーターと相同性も高いことから, 実際に機能している可能性が高いと推測された. TCA 回路とその周辺の代謝マップに, Phenotype MicroArray 解析で呼吸量に差が見られた化合物を宿主ごとにプロットした図を Fig. 2-13 に示す. Pf0-1 株では図中の化合物を与えた条件では pCAR1 の有無による呼吸量の変化は見られなかった一方で, KT2440 株と PAO1 株ではいくつかの化合物を与えた条件で宿主の呼吸量の低下が見られた (Fig. 2-13). 代謝マップ上で, 呼吸量の低下が見られる化合物と見られない化合物が近接していることから, pCAR1 の有無によって呼吸量に差が出る原因はその化合物の代謝反応の活性が変化しているためだと考えられる. 例えば, KT2440 株と PAO1 株両方で呼吸量の低下が見られる malate からは, Mdh または Mqo によって oxaloacetate に変換される経路と, MaeA によって pyruvate に変換される経路が存在するが, これらはいずれも細胞内還元力となる NADH や還元型キノンを生成する反応である. したがって, これらの反応活性が 2 宿主の pCAR1 保持株で低下している可能性が高いと考えられる. Malate が生成する反応としては, FumC によって fumarate に水が付加される反応と, GlcB によって glyoxylate と acetyl-CoA より生成する反応があるが, PAO1 株では

glyoxylate を与えた際に呼吸量の低下が見られる一方で、KT2440 株では fumarate を与えた際に呼吸量の低下が見られるという差異がある。FumC による反応も GlcB による反応いずれも還元力を生成しない反応だが、上述した malate から還元力を生み出す 3 反応いずれかの活性が低下しているとすると、KT2440 株では FumC の変換速度が malate の消費速度よりも速く malate の変換反応が律速になるために、malate でなく fumarate を与えた場合にも呼吸量の低下が見られると考えられる。glyoxylate を与えた場合に呼吸量の変化が見られないのは、GlcB による反応が malate の消費速度より遅くかつ pCAR1 の有無で活性が変化しないためだと考えられる。一方、PAO1 株では KT2440 株と逆で、GlcB による反応が速く、FumC による反応が遅いため、glyoxylate を与えた場合には呼吸量が低下するが、fumarate を与えた場合には呼吸量の低下が見られないと考えられる。このように考えると、KT2440 株と PAO1 株で pCAR1 を保持した際に活性が低下していると考えられる反応は Fig. 2-13 に示したようになる。今後は、粗酵素抽出液または休止菌体反応を用いて各基質の変換活性を測定することで、本当にそれぞれの反応活性が低下しているのかを確認し、その酵素をコードする遺伝子の転写・翻訳の制御機構に pCAR1 を保持することがどのように影響していくのかを調べる必要があるとなってくるであろう。

(ii). P 源として与えた場合のリン酸化糖

リン酸化糖については、そのままの形で細胞内に取り込むトランスポーターは保存されておらず、ペリプラスムの phosphatase によってリン酸基が切断された後にそれぞれの糖 transporter 及び無機リン酸 transporter によって別々に細胞内に取り込まれている可能性が高いと推測された。もし無機リン酸の取込み以降が影響を受けているとすると無機リン酸イオンを直接与えた条件 (PM04A, well_A02) でも pCAR1 保持株と非保持株で差が見られるはずであるが実際には差がないこと、及び C 源の succinate (20 mM) に比べて P 源の量は少ない (1 mM range) ためリン酸基が外れた糖が C 源として影響することは無視できると考えられることから、pCAR1 を保持することで活性が変化している代謝ステップは periplasm の phosphatase である可能性が高いと考えられる。

(iii). P 源として与えた場合のヌクレオチド

ヌクレオチドについては、大腸菌のヌクレオチドトランスポーターである NapG のオルソログが存在することが示唆されたが、大腸菌 NapG との相同性は低く、同様の機能を持つかどうかは不明であった。従って、ヌクレオチドはそのまま細胞内に取り込まれている可能性と、periplasm で脱リン酸された後に、nucleo base transporter 及び無機リン酸 transporter によって別々に細胞内に取り込まれている可能性の 2 通りが考えられた。

periplasm で脱リン酸化されている場合、(II) 項と同様の議論によって pCAR1 を保持することで活性が変化している代謝ステップは periplasm に局在する phosphorylase である可能性が高いと考えられる。しかし、KT2440(pCAR1)株と各 NAPs 破壊株の比較において、リン酸化糖の代謝は NAPs を介した pCAR1 の影響を受けているのに対してヌクレオチド代謝に見られる pCAR1 の影響には NAPs の関与は少ないという違いが見られていることから、リン

酸化糖とヌクレオシドは異なる phosphorylase によって加リン酸分解されていると考えられる。

そのまま取り込まれている場合を考えると、細胞内に入ったヌクレオチドはまず nucleoside phosphorylases によって nucleobase とリボース-1-リン酸に分解され、リボース-1-リン酸はペントースリン酸経路に入り (Tozzi, 2006, FEMS.J), 核酸合成に利用されるか、D-グリセルアルデヒド 3-リン酸まで変換されて解糖系に入り、ピルビン酸まで変換される間にリン酸基は ATP の一部となる。解糖系の 3-ホスホグリセリン酸 (PM4_B6), 2-ホスホグリセリン酸 (PM4_B7), ホスホエノールピルビン酸 (PM4_C1) を与えた際には呼吸量に変化が見られないことから、pCAR1 を保持した際に宿主の呼吸量が低下する原因としては、細胞内への輸送量が低下している可能性、またはペントースリン酸経路の活性が低下している可能性が考えられる。

(iv) N 源として与えたアンモニア

アンモニアを N 源とした条件で、PAO1 株特異的に pCAR1 保持株の方が非保持株より呼吸量が増加した。PM1-4 の中で pCAR1 を保持した際に顕著な呼吸量の増加が見られる唯一の条件であることから着目した。アンモニアは高い膜透過性があることから、トランスポーターなしで細胞内に入ると考え、アンモニアを反応物とする代謝反応に注目した (Fig. 2-7)。図中に PAO1 株において pCAR1 呼吸量に差が見られなかった基質 (nitrite, nitrate, L-glutamine, L-glutamate, urea) を一緒にプロットすると、グルタミン酸のアミノ基となって各種アミノ酸になる経路 (アミノ基転移) は活性が変化していないと考えられた。他にアンモニアを反応物とする反応としては、炭酸と反応してカルバモイルリン酸になって尿素サイクルに入る経路、または deamido-NAD 及び ATP と反応して NAD を生成する反応があり、これらのいずれかまたは両方が pCAR1 を保持した際に活性が上昇するのではないかと考えられる。

(v) C 源として与えた際のブタン骨格を持つ化合物

ブタン骨格を持つ化合物 (2,3-butanediol, 2,3-butanone, 3-hydroxy-2-butanone) はプラスミドの有無に関わらず呼吸量の増加が少ない基質であるが、PAO1 株では P4 で抽出され、P2 であるが Pf0-1 株でも抽出されたことから着目した。3 基質のうち、2,3-butanediol は脱水素されて 3-hydroxy-2-butanone (acetoin) になり、acetoin は acetoin cleaving system (AcoABC) によって acetaldehyde と acetyl-CoA に開裂し、両者は最終的に TCA サイクルに入る (Fig. 2-15)。2,3-butanone (diacetyl) については、酵母においては (R,R)-2,3-butanediol dehydrogenase が diacetyl reductase 活性も持つ酵素が知られているが、*Pseudomonas* 属細菌には保存されていないため、diacetyl の代謝経路は不明である。2,3-butanediol dehydrogenase をコードする *adh* 遺伝子と *acoABC* 遺伝子は、*P. putida* pPG2 株においてオペロンとなっていることが示され、各々がコードする酵素の機能解析が行われている (Huang *et al.*, 1994)。本研究で用いた 3 種の *Pseudomonas* 属細菌のうち KT2440 株と PAO1 株については、*acoABCadh* 遺伝子群が保存されている (locus tag 番号はそれぞれ PP_0555-0552, PA4150-4153) が、Pf0-1 株には保存さ

れていない. acetaldehyde が acetyl-CoA に変換される経路には, (i) いったん酸化されて酢酸となってから ATP を消費して acetyl-CoA を生じる経路と, (ii) acetaldehyde dehydrogenase によって脱水素と CoA の付加が行われる経路が存在する. (ii) の acetaldehyde dehydrogenase をコードする遺伝子は大腸菌には *mhpF* と *adhE* の 2 つが存在するが, 本研究で用いた *Pseudomonas* 属細菌にはいずれも保存されていない. 以上の状況を考えると, PAO1 株において, 代謝途中でいずれも acetaldehyde が生じると予想される近縁の化合物で共通に呼吸量の低下が見られた原因を考察すると, Adh, AcoABC, または acetaldehyde dehydrogenase の活性が低下, または量が減少しているために NADH 生成量が落ちているのではないかと考えられる.

(2). 浸透圧ストレス・pH ストレスを与えた場合

(2)_(i). 2 連間の一致度の評価と“2 株間で差の見られた条件”の選抜基準の検討.

PM9-10 は栄養培地 (おおよそ 1/5LB 培地, Table M2-4 参照) 中に各 well の化合物が添加されることで浸透圧ストレス (PM9) や pH ストレス (PM10) に対する耐性を評価するプレートとなっている. PM1-4 と同様に分布の検討をしたところ (データ示さず), データのばらつきは PM1-4 と同様であり, 呼吸量が 7000 以上変化した培養条件を抽出するのが妥当と判断した. PM9-10 には 1 種類の物質の濃度が段階的に変化する well が存在する (Supplemental Fig. S2-1) ため, 呼吸量が 7000 以上変化しても濃度依存的に変化していない well は除外した. また, 呼吸量に変化した培養条件の数は化合物の種類で数えることとした (同じ化合物で濃度が異なる well が複数抽出されても, 1 種類と数える).

(2)_(ii). pCAR1 の保持または NAPs の破壊によって呼吸量に差が見られた条件の選抜

<PM9-10 全体として>

まず, pCAR1 の有無によって差が見られた well ではすべて pCAR1 保持株のほうが非保持株よりも呼吸量の増加するタイミングが遅い, または最終到達値が小さいことから, pCAR1 を保持すると耐性が低下する傾向にあることが読み取れる (Supplemental Fig. S2-2). また, NAPs を破壊して呼吸量に変化した条件のほとんどが KT2440 株と KT2440(pCAR1) 株の比較において変化していた条件と重なっており, pCAR1 を保持しただけでは変化が見られないが NAPs を破壊して初めて変化した条件はほとんどなかった.

<浸透圧ストレス耐性について (PM9)>

pCAR1 を保持した際の変化としては, KT2440 株で NaCl, KCl, NaSO₄, HCOONa, NaNO₂ の 5 種類, PAO1 株で Urea の 1 種類, Pf0-1 株で NaNO₂ の 1 種類の物質に対して, 濃度依存的な耐性の低下が見られた (Table 2-16, Supplemental Fig. S2-2). なお, KT2440 株では ethylene glycol, PAO1 株では sodium phosphate や sodium nitrate など 2 種類以上の濃度で呼吸量の

差が 7000 以上であったが、これらは濃度依存的でなく、2 連間でのデータのブレが大きいために抽出されている可能性が高いことから除外した。

KT2440(pCAR1)株の各 NAPs 破壊株と KT2440(pCAR1)株の比較においては (Table 2-17), まず単独破壊株では, Δphu 株においては変化の見られた条件はなく, Δpmr 株で 1 種類 (sodium lactate), Δpnd 株で 2 種類 (sodium lactate, sodium nitrate) に対する耐性が低下したのみであった。二重破壊株では, $\Delta pmr\Delta pnd$ 株で 1 種類 (KCl) で耐性が低下し, $\Delta pmr\Delta phu$ 株では, KCl, Na_2SO_4 , HCOONa の 3 種類で耐性が回復した一方で, sodium lactate では耐性が低下した。

以上の結果を化合物ごとに, 呼吸量の変化を (7000 未満のものも含めて) 詳細に見てみると, 大きく 3 つのグループに分けられる。

(A) Urea

PAO1 株のみで pCAR1 を保持した際に耐性の低下が見られており, KT2440 株と Pf0-1 株では見られない PAO1 株特異的な変化である。

(B) NaCl, KCl, Na_2SO_4 , HCOONa , NaNO_2

NaCl, KCl, Na_2SO_4 , HCOONa については, KT2440 株特異的な変化であり, NAPs を単独破壊した際には変化が見られないが, pmr と pnd を二重破壊すると耐性の低下が見られ, pmr と phu を二重破壊すると若干の耐性の回復が見られる。

NaNO_2 については, KT2440 株・KT2440(pCAR1)株・及びその NAPs 破壊株では上記グループと同様の変化の傾向だが, Pf0-1 株でも耐性の低下が見られている点が異なる。

(C) Sodium lactate

pCAR1 を保持した際には 3 宿主いずれも変化が見られないが, KT2440 株において pmr または pnd を破壊すると耐性が低下する。二重破壊株では, pmr と pnd を破壊すると KT2440(pCAR1)株と同程度まで耐性が回復するが, pmr と phu を破壊するとそれぞれの単独破壊より耐性が低下する。

<pH ストレス耐性について (PM10)>

PM10 プレートでは最上段 (A 段) の 12 well で生育できる pH の範囲を調べる他, B~G 段でたいていの細菌にとって生育できない pH である pH=4.5 と 9.5 での pH 調節能力を評価している (Supplemental Fig. S2-1)。pH を調節するためにアミノ酸等を脱炭酸または脱アミノすることが知られていることから, それぞれの well の化合物を基質とする decarboxylase と deaminase の活性を評価していることになる。本研究の結果を参照すると (Table 2-18, Fig. S2-2), KT2440 株では pH10 (A12) から pH5 (A4) まで呼吸量の増加が認められており, pCAR1 を保持すると高 pH 側での耐性に若干の低下が見られた。PAO1 株と Pf0-1 株では pH10 (A12) から pH4.5 (A3) まで生育が認められており, pCAR1 を保持した際の変化は PAO1 株では認められず, Pf0-1 株では (呼吸量の差は 7000 未満であるが) 低 pH 側での耐性に若干の低下が見られた。

pH=4.5 (B~D 段) では、もともとこの pH に耐性のない KT2440 株では多くの条件で呼吸量の増加が認められないが、5 条件 (L-Norvaline, α - amino-N-butyric acid, β -hydroxy glutamate, γ -hydroxy glutamic acid, 5-hydroxy-L-lysine) で培養後半に呼吸量の増加が認められ (Fig. S2-2), それぞれの基質を脱アミノすることで pH を調節していると考えられる. これらの 2 条件では pCAR1 を保持した際に呼吸量の低下が見られ, これらの基質の脱アミノ活性が低下していると考えられる. もともとこの pH に耐性を示す PAO1 株では多くの条件で呼吸量の増加が認められるが, pCAR1 を保持した際に呼吸量の低下が見られたのは 3 条件 (hydroxy-L-proline, D,L-diamino-pimelic acid, trimethylamine-N-oxide, urea) であり, この中で P4 であったのは D,L-diamino-pimelic acid と urea の 2 条件であった. Pf0-1 株も, もともとこの pH に耐性を示し多くの条件で呼吸量の増加が見られるが, pCAR1 を保持した際に呼吸量の低下が見られたのは PAO1 株より多い 19 条件 (Table 2-18) であり, この中で P4 であったのは 2 条件 (L-asparagine, urea) であった.

pH=9.5 (E~G 段) では, 3 宿主ともにもともとこの pH に耐性があるため, 多くの条件で呼吸量の増加が認められる. KT2440 株では, 30 条件 (Table 2-18) で耐性の低下が見られた一方で, PAO1 株では 2 条件 (L-tryptophan, L-norvaline), Pf0-1 株では 5 条件 (glycine, L-isoleucine, L-phenylalanine, agmatine, cadaverine) のみで耐性の低下が見られた.

KT2440(pCAR1)株とその pCAR1 上の NAPs 破壊株の比較では, まず生育できる pH の範囲 (A 段) では $\Delta pmr\Delta phu$ 株で pH5.5 での呼吸量が低下しているのみであり, pH4.5 (B~D 段) では抽出された条件はなかった (Table 2-19). pH9.5 (E~G 段) では単独破壊株・二重破壊株のいずれかで呼吸量に変化したのは 5 条件 (L-asparagine, L-lysine, L-ornithine, phenylethylamine, tyramine) であるが, いずれも P2 である. phenylethylamine, tyramine については複数の破壊株で共通に抽出されているものの, もともと KT2440(pCAR1)株での 2 連の数値が大きくブレているために抽出されているだけという危険性がある. 以上を考慮すると, KT2440 株における pH 耐性の低下には pCAR1 上の NAPs の関与はほとんどないと考えられる.

(2)_(iii). 耐性が低下した理由の考察.

高浸透圧ストレスに対して bacteria は, trimethylammonium compounds (betain 等), アミノ酸, 糖, heterosides などの化合物 (compatible solutes) を細胞外から取り込む, または細胞内で合成することで細胞内浸透圧を高め細胞の恒常性を維持することが知られている (Krämer, 2010). これらの応答は, 数秒~数分という短時間で起こるタンパク質の活性レベルの調節と, 数分~数時間という比較的長いスパンで起こる遺伝子の転写レベルの調節の, 両方のレベルで起こる. 浸透圧の上昇を感知するシステムとしては (1) KdpD/KdpE (細菌一般に保存されている), (2) EnvZ/OmpR (大腸菌由来), (3) MtrA/MtrB (*Corynebacterium glutamicum* 由来) の 3 つのシステムが詳細に研究されており, *Pseudomonas* 属細菌には, (1) KdpD/KdpE と (2) EnvZ/OmpR のシステムが保存されている (KEGG より, データ示さず). (1) KdpD/KdpE

は membrane-bound histidine kinase である KdpD と cytoplasm に存在する soluble response regulator である KdpE によって構成される二成分制御系であり K^+ 欠乏または塩ストレスに応答して K^+ の取り込み機構をコードする *kdpFABCDE* オペロンを正に制御するが、KdpD が受容するシグナルの実体については明らかになっていない。(2) EnvZ/OmpR についても細胞外の浸透圧依存的に外膜 porin タンパク質をコードする *ompC* と *ompF* の転写を制御することが知られているが、EnvZ が受容するシグナルの実体は明らかになっていない。EnvZ の periplasm 側の親水性ドメインを truncate してもセンサーとしても機能を失わないことから、シグナルを受容するのは、周囲の脂質二重膜を介してか、cytoplasm 側のドメインを介してではないかと考えられている。以上のように、浸透圧ストレスを感知する機構が明らかになっていないため、今回 pCAR1 の有無または NAPs の破壊によって宿主の呼吸量が低下した条件において、その影響を受けている実体 (ある遺伝子の転写なのか、それともタンパク量、あるいはタンパクの活性なのか) は不明である。しかし、今回調べた浸透圧ストレス条件の中で、ある化合物に対しては呼吸量の変化が見られた一方で別の化合物に対しては変化が見られなかったことから、化合物によって浸透圧を感知するセンサーが異なる可能性、または浸透圧ストレスに応答する遺伝子が化合物によって異なる可能性、遺伝子の転写誘導の度合いが化合物によって異なる可能性が考えられる。

pH 耐性については、細菌は大きく分けて二つの方法で細胞内の pH 恒常性を保っていることが知られている (Krulwich *et al.*, 2011) (Fig. 2-16)。一つ目は H^+ の輸送量の調節であり、大腸菌の場合、酸性条件下で呼吸鎖の ATP synthetase の発現量を増やして細胞外への H^+ 輸送量を増加させる。アルカリ条件では、 Na^+ 等の cation を細胞外に放出し代わりに H^+ を細胞内に取り込む cation-proton antiporter が pH 調節に中心的な役割を果たす。大腸菌では、non-proton-pumping cytochrome *bd* を増加させ、呼吸鎖による H^+ の汲み出しを最小限にすることで、cytoplasm の H^+ 量が失われるのを防ぐとともに、 F_1F_0 -ATP synthetase の発現量を増加させることで細胞内への H^+ 取り込みを促進することも知られている。二つ目は、 H^+ を消費または生成する代謝反応の調節であり、酸性条件では hydrogenase や amino acid decarboxylase の活性を高めることで細胞内 H^+ の消費を促進する。大腸菌においては、glutamate または arginine の decarboxylase の反応活性が上昇することが知られており、同時に活性化する glutamate/GABA antiporter によってこの反応が平衡に達するのが防がれている。逆にアルカリ条件では、amino acid deaminases や有機酸を生成する反応 (例えば tryptophan deaminase, TnaA) の活性を高めることが知られている。

PM10 の結果を参照すると、KT2440 株では pCAR1 を保持した際に酸性条件とアルカリ条件両方で耐性の低下が見られたことから、上記の pH 調節機構が pCAR1 の影響を受けていることがわかる。さらに、酸性条件・アルカリ条件のいずれでも、アミノ酸等の基質を添加した条件で耐性の低下が見られたことから、二つ目の H^+ を消費または生成する代謝反応の調節する機構が低下していることが示され、すなわち、これらの基質の decarboxylase (酸性条件) または deaminase (アルカリ条件) の活性が低下している、または細胞内量が減少し

ている可能性, またはこれらの基質を輸送する transporter の活性が低下している, または発現量が減少している可能性が考えられる. PAO1 株と Pf0-1 株では耐性の低下が見られた条件が少なく, それらの多くは KT2440 株と共通していないことから, KT2440 株で観察された pH 耐性の低下のメカニズムは KT2440 株特異的であり, NAPs 破壊株では KT2440(pCAR1) 株とほとんど変化していないことから, pCAR1 によって pH 耐性が低下するのは NAPs に依存しない経路によるものと考えられる.

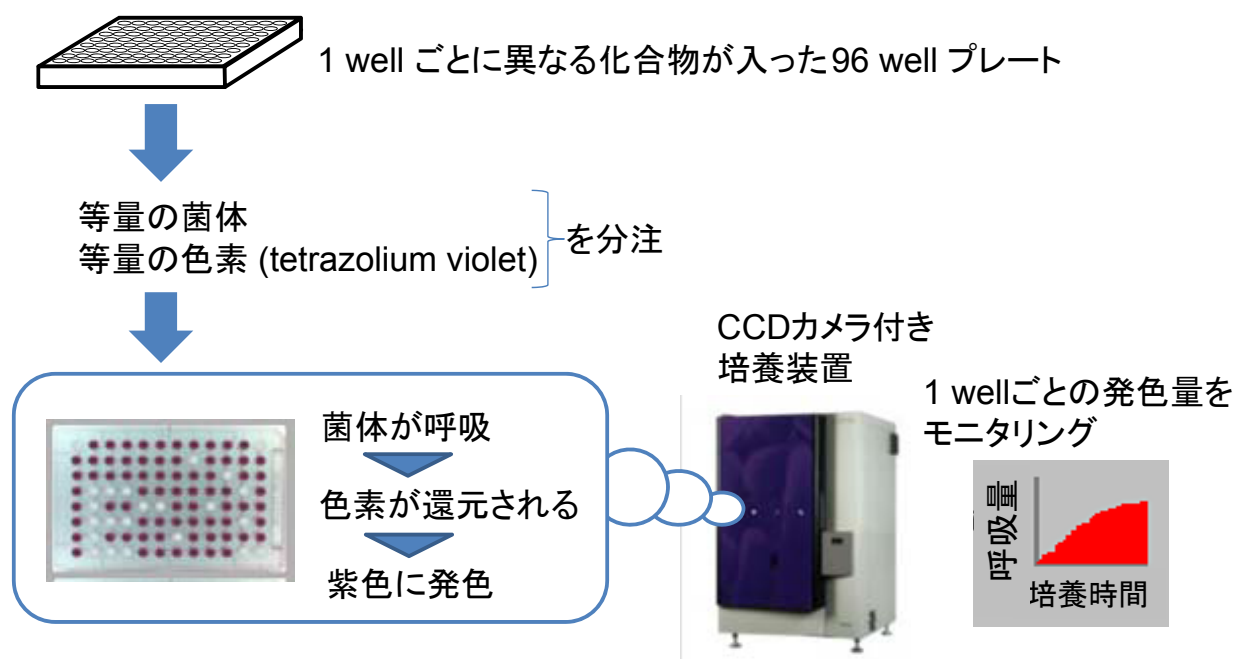


Fig. 2-1. Phenotype MicroArray (Biolog 社) の概要.

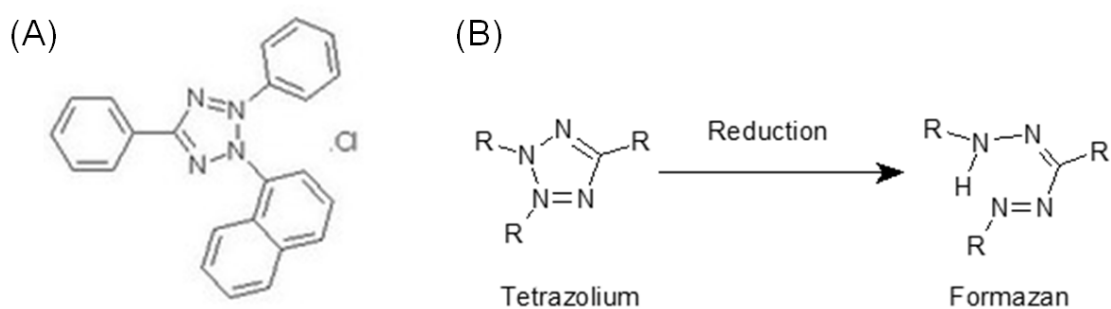


Fig. 2-2. Tetrazolium violet の構造式 (A) と tetrazolium 環の開裂 (B).

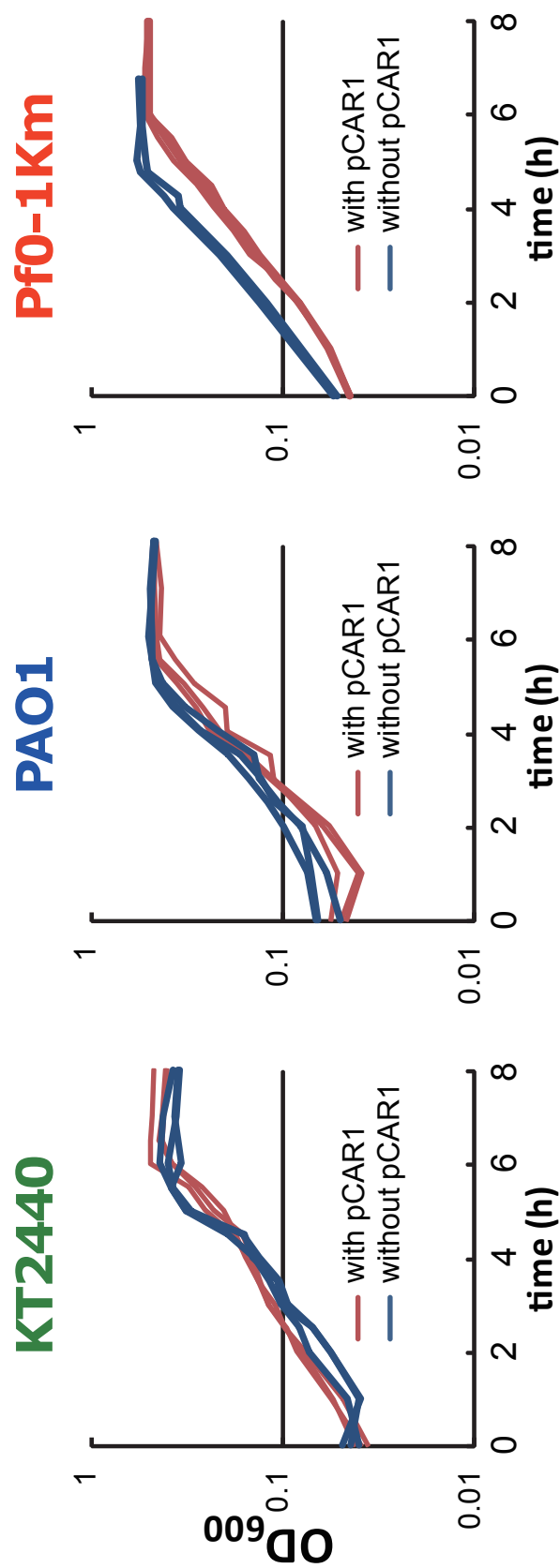
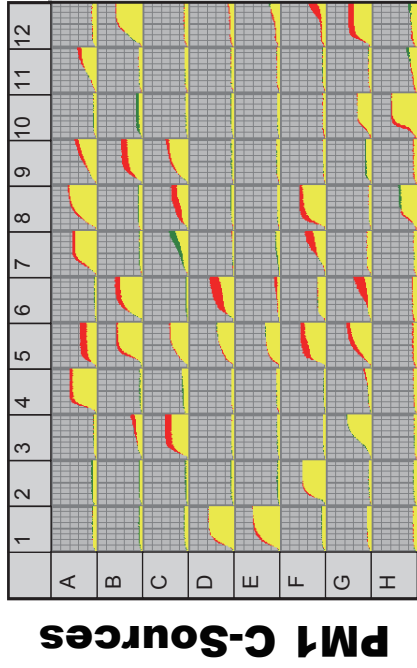
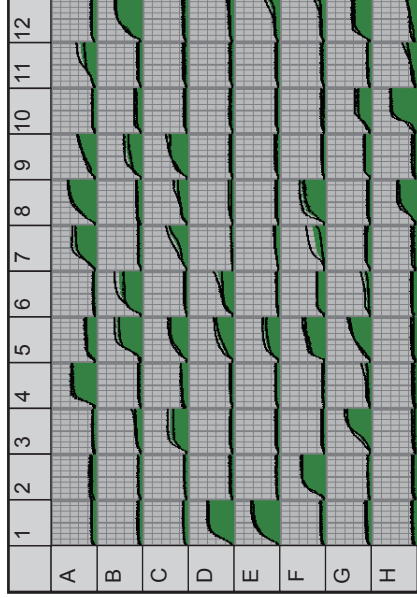


Fig. 2-3. コハク酸培養における3種のpCAR1保持株(赤)とpCAR1非保持株(青)の生育曲線. (Shintani *et al.*, 2010)
P. putida KT2440 株, *P. aeruginosa* PAO1 株, *P. fluorescens* Pf0-1Km 株のpCAR1 保持株・非保持株を, それぞれコハク酸 [0.1% (wt/vol)] を唯一の炭素源とする液体無機培地 (NMM-4) で培養し, OD₆₀₀ を経時的に測定した。1本の線は1回の実験の測定値を表し, 1つの株につき, 独立した3回の実験を行った (Pf0-1Km 株のみ2回)。

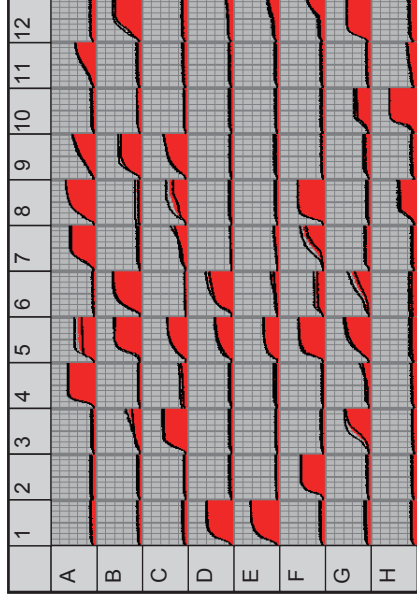
KT2440(pCAR1) vs KT2440



KT2440(pCAR1)



KT2440



PM2 C-Sources

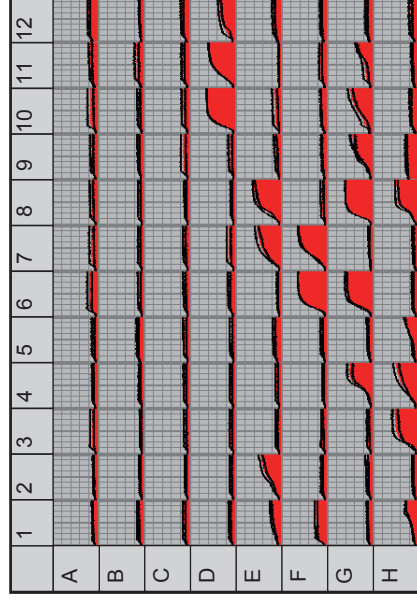
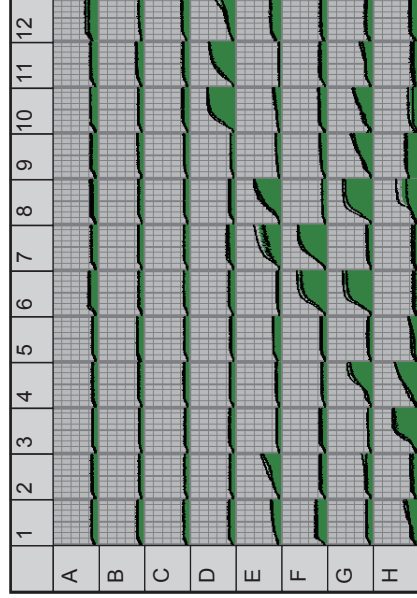
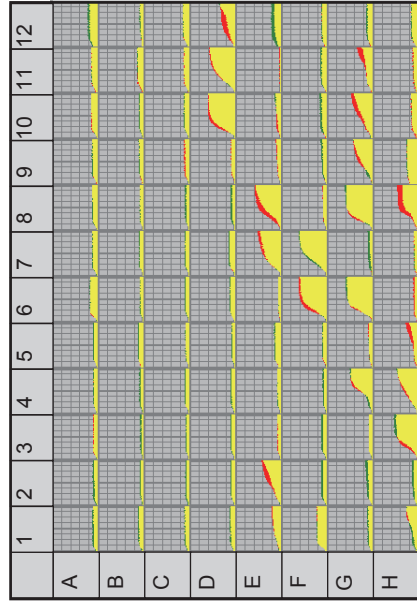
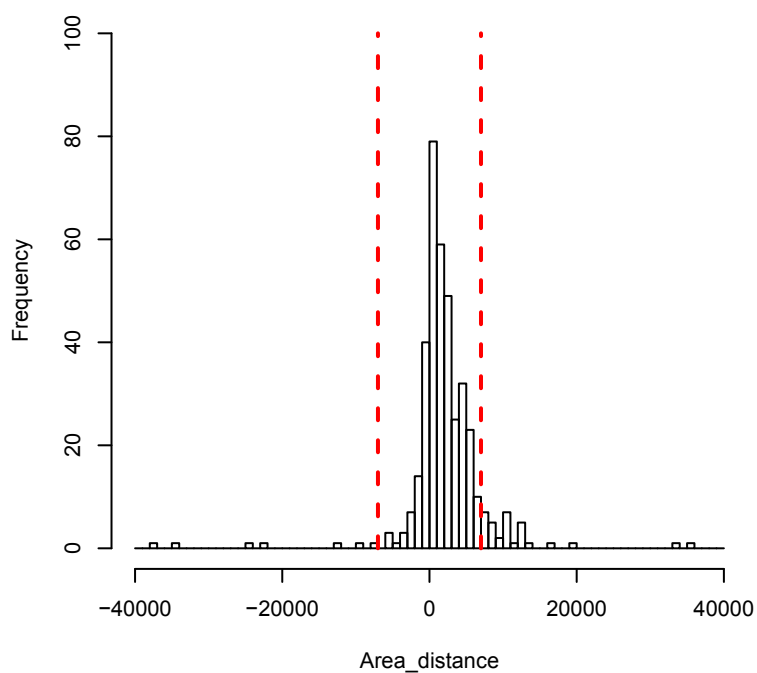


Fig. 2-4. Phenotype MicroArray の結果の一例.

P. putida KT2440 株と KT2440(pCAR1) 株の PM1-2 の結果. 1 つ 1 つの well の結果を各プレートに並べてあり, 各マス目の横軸が培養時間 (0-48 h), 縦軸が発色した tetrazolium violet 量 (菌株の呼吸量) を表す. pCAR1 保持株 (緑, 中央列) と非保持株 (赤, 右列) のそれぞれの結果では, 2 連の結果をそれぞれ黒線で表し, その平均を塗りつぶして示してある. 左列では, pCAR1 保持株の 2 連の平均 (緑) と非保持株の 2 連の平均 (赤) の重ね合わせを示しており, 重なり合った部分を黄色で示す. 左列において, 緑や赤の部分が多い well が, “pCAR1 を保持すると菌株の呼吸量に差が見られた条件” である.

(A)

PM1 ~ 4



(B)

PM1 ~ 4

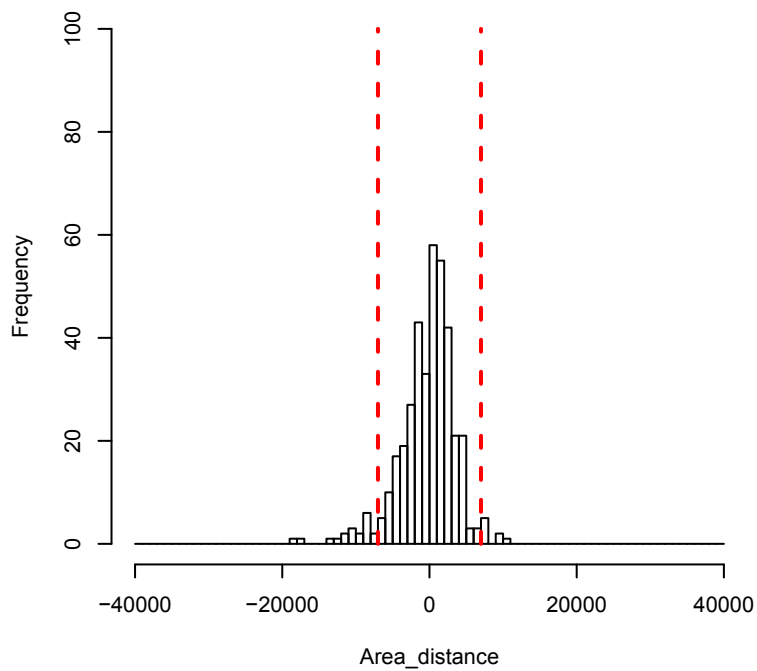


Fig. 2-5. (A) KT2440株の2連の差と (B) KT2440(pCAR1)株の2連の差のヒストグラム.
呼吸量の差が7000と-7000の位置に赤線を引いて示す.

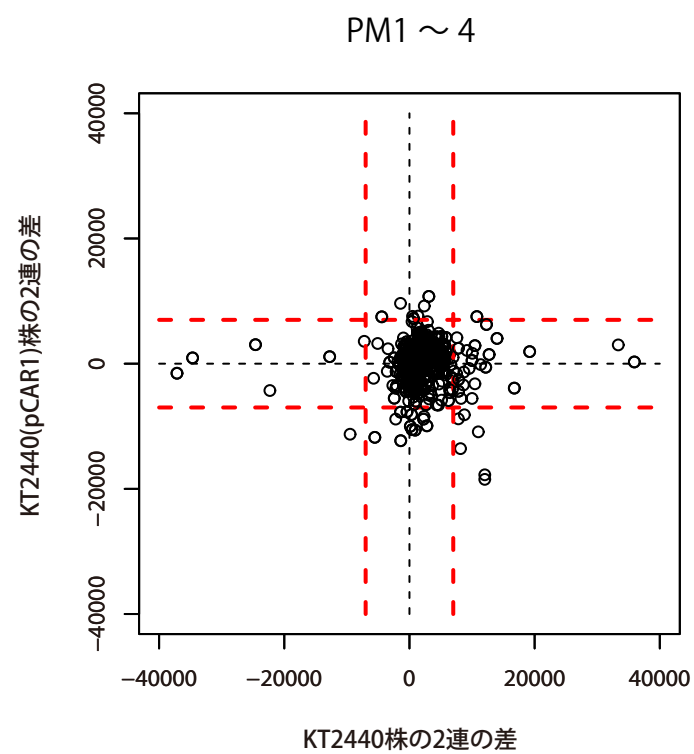


Fig. 2-6. 「KT2440株の2連の差と」「KT2440(pCAR1)株の2連の差」の散布図.
呼吸量の差が7000と-7000の位置に赤線を引いて示す.

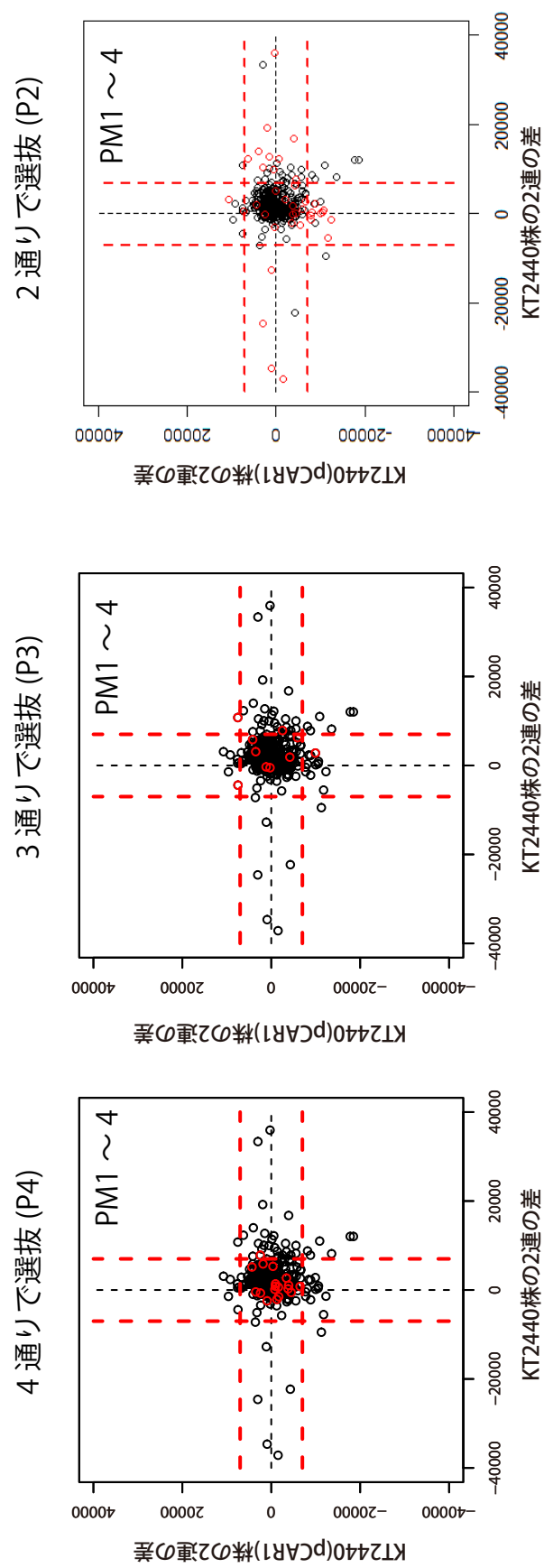


Fig. 2-7. 2菌株間で選抜される条件の, 同じ菌株の2連のデータでの一致度の確認.

「KT2440株の2連の差」と「KT2440株の2連の差」の散布図上に, 「KT2440株とKT2440(pCAR1)株の1連ずつの4通りの組み合わせのうち最低2通りで呼吸量が7000以上変化した条件」のみを赤丸で重ねた. 何通りの組み合わせで呼吸量が7000以上変化したかで3枚の散布図に分けた. 呼吸量の差が7000と-7000の位置に赤線を引いて示す.

C-sources (190 compounds)

(A)

pCAR1を保持した際に

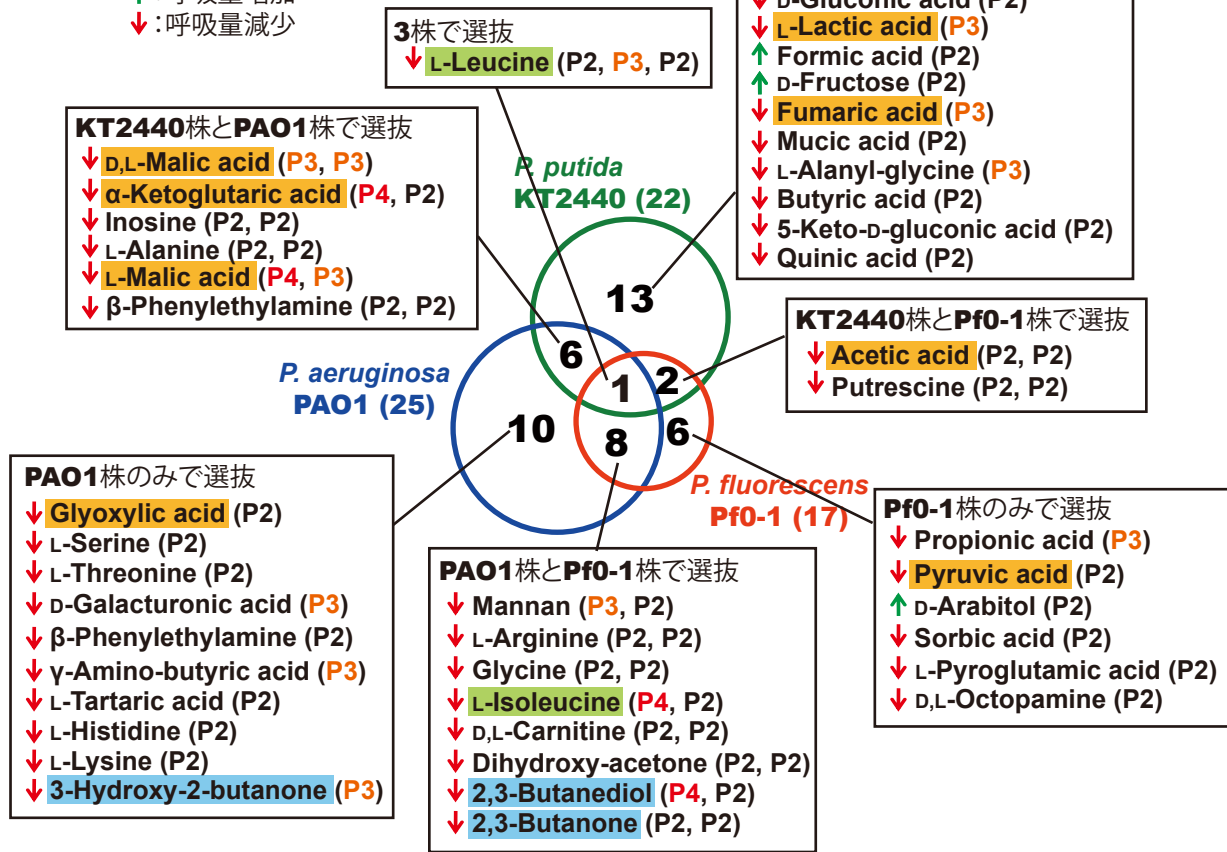
↑:呼吸量増加

↓:呼吸量減少

■: TCA回路とその周辺

■: ブタン骨格を持つ

■: 分岐鎖アミノ酸



(B)

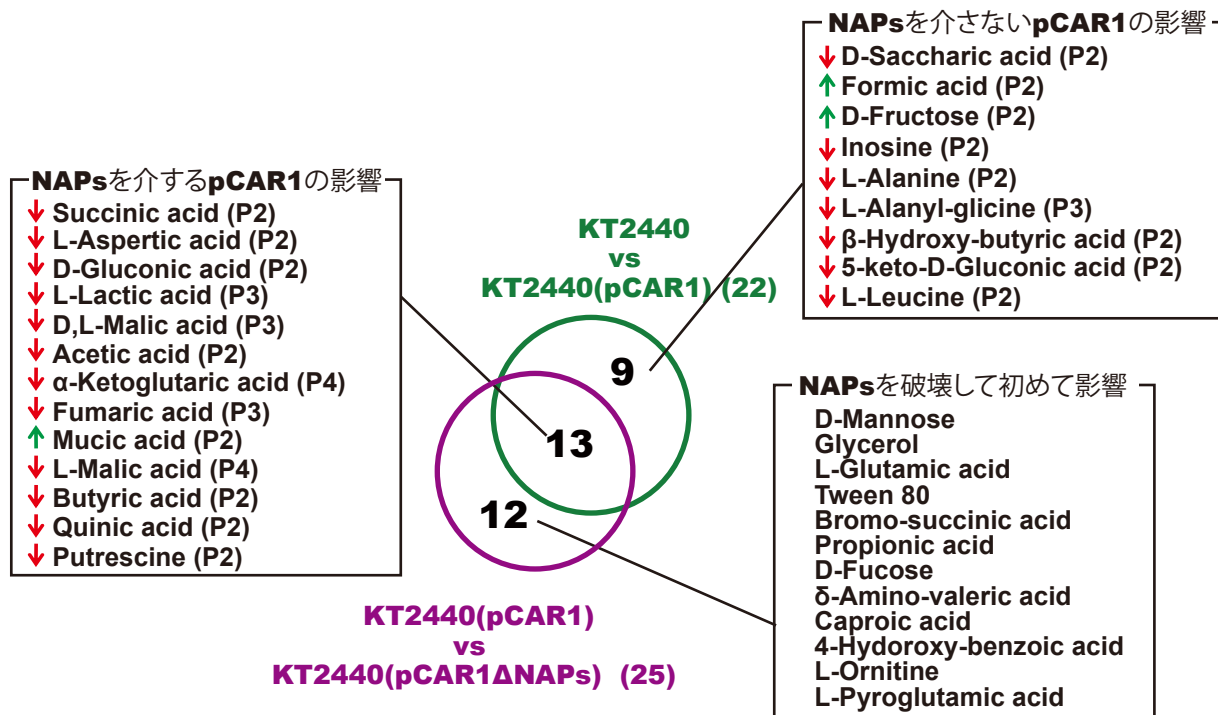
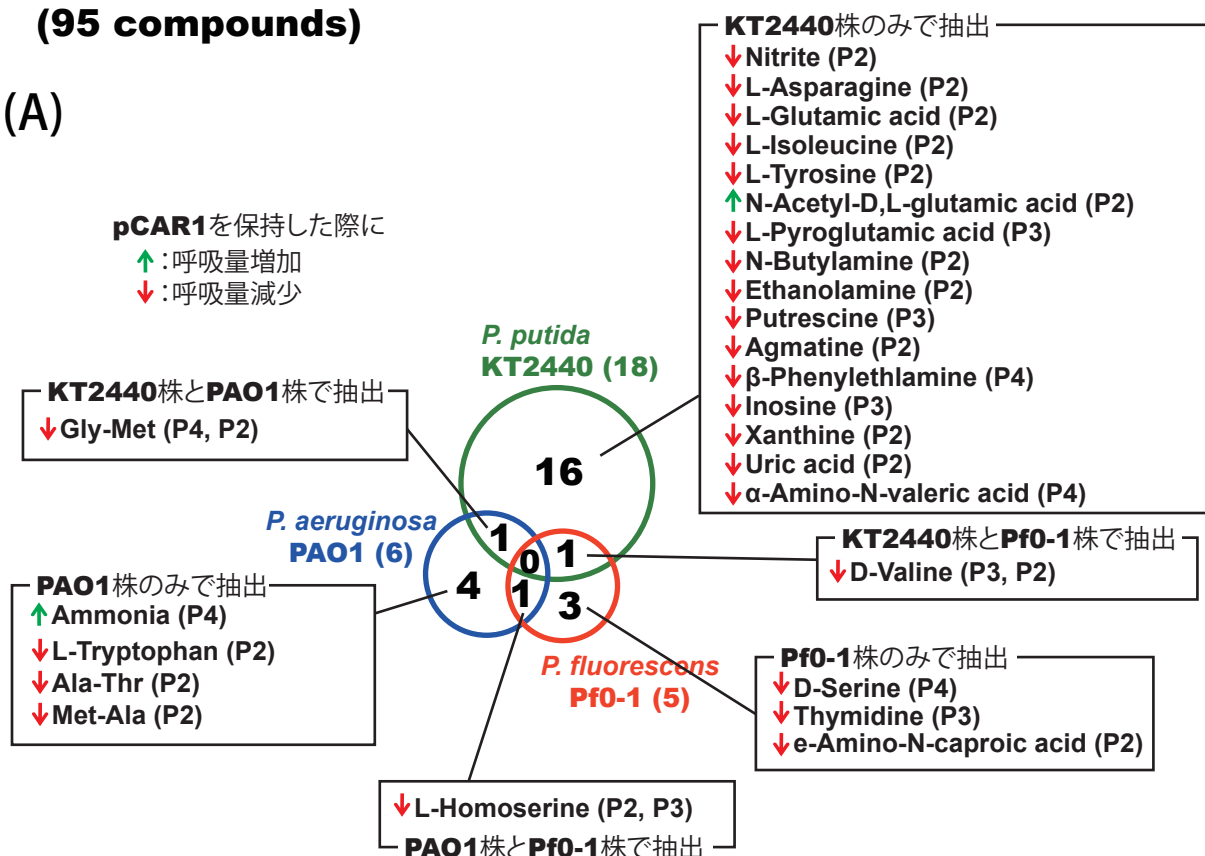


Fig. 2-8. pCAR1 の有無または NAPs の除去によって呼吸量に変化が見られた条件 (C 源)

(A) KT2440 株, PAO1 株, Pf0-1 株それぞれで, pCAR1 保持株と非保持株を比較して選抜された条件の包含関係をベン図に示す. 化合物名は Biolog 社の表記に従う. 化合物名の横の矢印は, ↑:pCAR1 を保持すると呼吸量が増加したこと, ↓:pCAR1 を保持すると呼吸量が減少したこと, を示す. (B) KT2440(pCAR1) 株において NAPs を破壊した際に選抜されるものと pCAR1 を保持した際に選抜されたものの包含関係を示す. 化合物の横の矢印の意味は上段と同じで, KT2440 株が pCAR1 を保持した際の呼吸量の変化を表している.

N-sources (95 compounds)

(A)



(B)

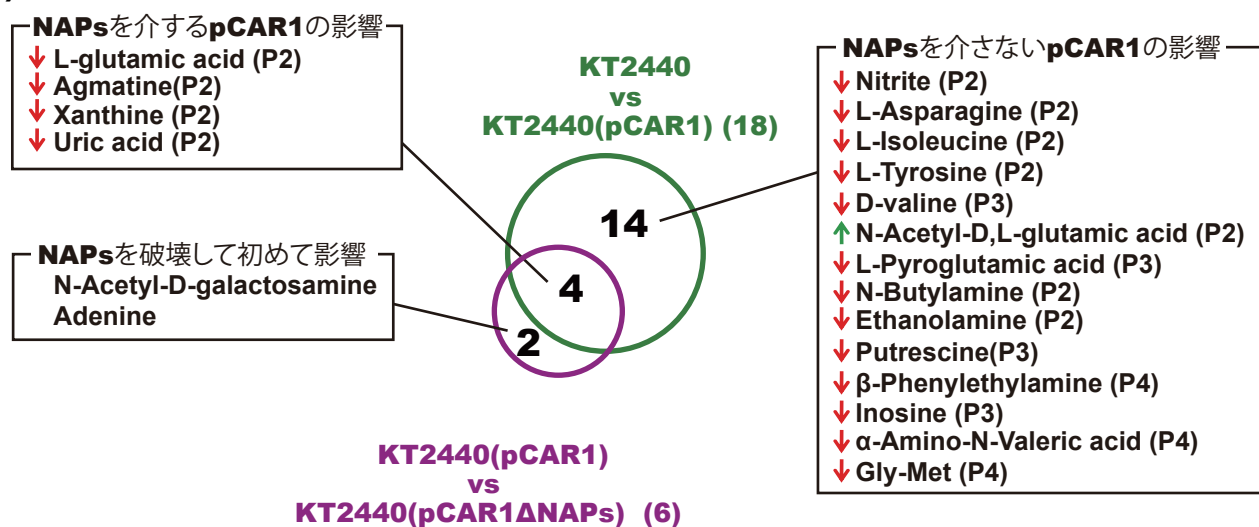


Fig. 2-9. pCAR1 の有無または NAPs の除去によって呼吸量に変化が見られた条件 (N 源)
(A) KT2440 株, PAO1 株, Pf0-1 株それぞれで, pCAR1 保持株と非保持株を比較して選抜された条件の包含関係をベン図に示す. 化合物名は Biolog 社の表記に従う. 化合物名の横の矢印は, ↑:pCAR1 を保持すると呼吸量が増加したこと, ↓:pCAR1 を保持すると呼吸量が減少したこと, を示す. (B) KT2440(pCAR1) 株において NAPs を破壊した際に選抜されるものと pCAR1 を保持した際に選抜されたものの包含関係を示す. 化合物の横の矢印の意味は上段と同じで, KT2440 株が pCAR1 を保持した際の呼吸量の変化を表している.

P-sources (59 compounds)

(A) pCAR1を保持した際に

↑:呼吸量増加
↓:呼吸量減少

■:リン酸化糖
■:ヌクレオチド

KT2440株のみで選抜

↓ Adenosine-2'-monophosphate (P3)
↓ Guanosine-2'-monophosphate (P4)
↓ Guanosine-3'-monophosphate (P4)
↓ Guanosine-5'-monophosphate (P4)
↓ Cytidine-2'-monophosphate (P4)
↓ Cytidine-3'-monophosphate (P4)
↓ Cytidine-5'-monophosphate (P4)
↓ Thymidine-5'-monophosphate (P4)

↓ D-Glucosamine-6-phosphate (P4)
↓ D-Glucose-1-phosphate (P4)
↑ Phospho-glycolic acid (P3)
↑ O-Phospho-L-serine (P2)
↑ O-Phospho-D-serine (P2)
↓ Cysteamine-S-phosphate (P2)
↓ Thiophosphate (P2)

3株共通に選抜

↓ D-Glucose-6-phosphate (P4, P2, P4)
↓ Uridine-2'-monophosphate (P2, P2, P2)
• Phosphocreatine (P2, P2, P2)

PAO1株のみで選抜

↑ Adenosine-5'-monophosphate (P2)
↓ 2-Deoxy-D-glucose-6-phosphate (P2)
↓ D-Mannose-1-phosphate (P4)
↓ D-Mannose-6-phosphate (P2)

P. aeruginosa
PAO1 (8)

P. putida
KT2440 (22)

KT2440株とPf0-1株で選抜

• Uridine-3'-monophosphate (P2, P2)
• Tripolyphosphate (P4, P2)
• O-Phospho-L-tyrosine (P4, P2)
↓ Uridine-5'-monophosphate (P2, P2)

15

0

3

4

1

0

P. fluorescens
Pf0-1 (8)

• Phospho acetic acid (P2, P2)

PAO1株とPf0-1株で選抜

(B)

NAPsを介さないpCAR1の影響

↓ Adenosine-2'-monophosphate (P3)
↓ Guanosine-2'-monophosphate (P4)
↓ Guanosine-3'-monophosphate (P4)
↓ Cytidine-2'-monophosphate (P4)
↓ Cytidine-3'-monophosphate (P4)
↓ Cytidine-5'-monophosphate (P2)
↓ Thymidine-5'-monophosphate (P4)

↓ O-Phospho-L-tyrosine (P4)
↑ O-Phospho-L-serine (P2)
↓ Cysteamine-S-phosphate (P2)
↓ Thiophosphate (P2)
↓ Uridine-3'-monophosphate (P2)
↓ Uridine-5'-monophosphate (P2)

NAPsを介するpCAR1の影響

↓ D-Glucose-6-phosphate (P4)
↓ D-Glucose-1-phosphate (P4)
↓ D-Glucosamine-6-phosphate (P4)
↓ Guanosine-5'-monophosphate (P4)
↑ O-Phospho-D-serine (P2)
↑ Tripolyphosphate (P4)
↑ Phosphocreatine (P2)
↑ Phospho-glycolic acid (P3)
↓ Uridine-2'-monophosphate (P2)

KT2440(pCAR1)

vs

KT2440(pCAR1ΔNAPs) (13)

KT2440
vs
KT2440(pCAR1) (22)

NAPsを破壊して初めて影響

Adenosine-3'-monophosphate
D-Mannose-1-phosphate
D-Mannose-6-phosphate
2-Deoxy-D-glucose 6-phosphate

13

9

4

Fig. 2-10. pCAR1の有無またはNAPsの除去によって呼吸量に変化が見られた条件(P源)

(A) KT2440株, PAO1株, Pf0-1株それぞれで, pCAR1保持株と非保持株を比較して選抜された条件の包含関係をベン図に示す. 化合物名はBiolog社の表記に従う. 化合物名の横の矢印は, ↑:pCAR1を保持すると呼吸量が増加したこと, ↓:pCAR1を保持すると呼吸量が減少したこと, を示す. (B) KT2440(pCAR1)株においてNAPsを破壊した際に選抜されるものとpCAR1を保持した際に選抜されたものの包含関係を示す. 化合物の横の矢印の意味は上段と同じで, KT2440株がpCAR1を保持した際の呼吸量の変化を表している.

S-sources (35 compounds)

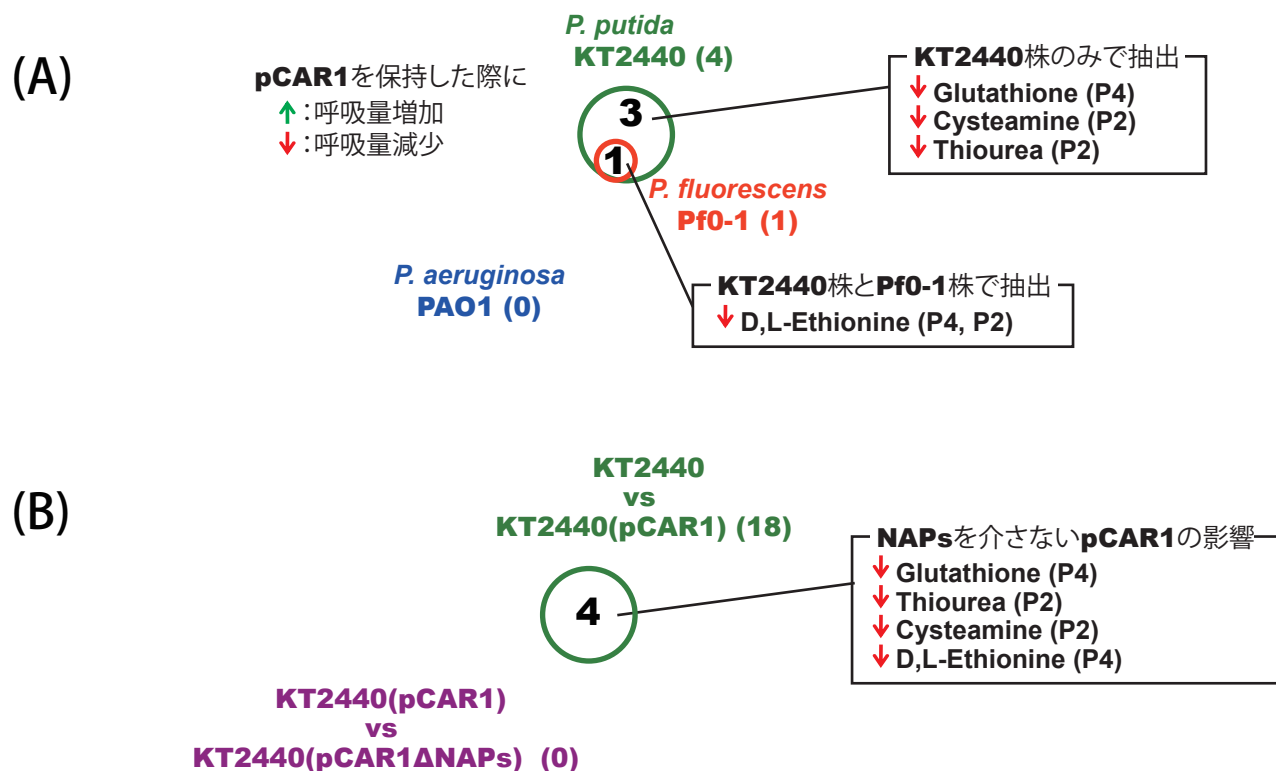


Fig. 2-11. pCAR1の有無またはNAPsの除去によって呼吸量に変化が見られた条件(S源)
 (A) KT2440株, PAO1株, Pf0-1株それぞれで, pCAR1保持株と非保持株を比較して選抜された条件の包含関係をベン図に示す. 化合物名はBiolog社の表記に従う. 化合物名の横の矢印は, ↑:pCAR1を保持すると呼吸量が増加したこと, ↓:pCAR1を保持すると呼吸量が減少したこと, を示す. (B) KT2440(pCAR1)株においてNAPsを破壊した際に選抜されるものとpCAR1を保持した際に選抜されたものの包含関係を示す. 化合物の横の矢印の意味は上段と同じで, KT2440株がpCAR1を保持した際の呼吸量の変化を表している.

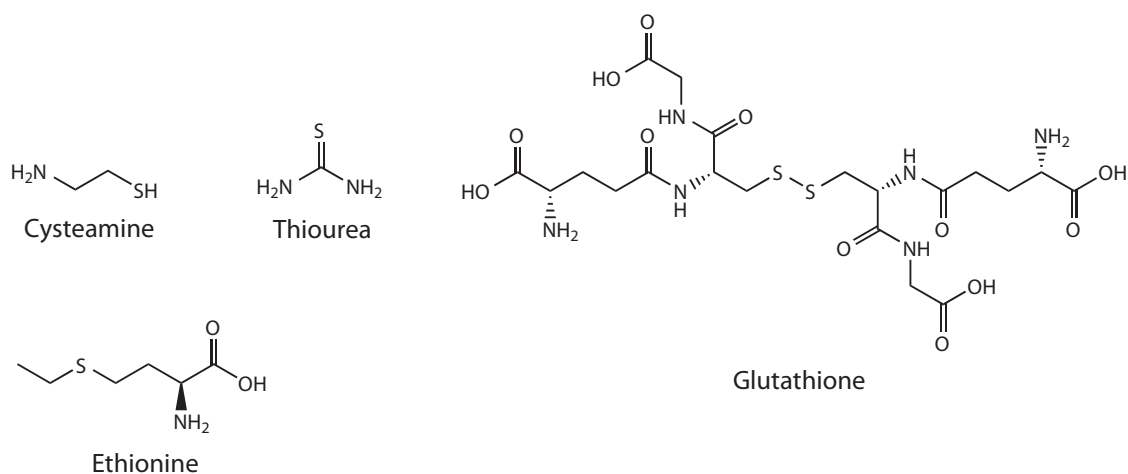
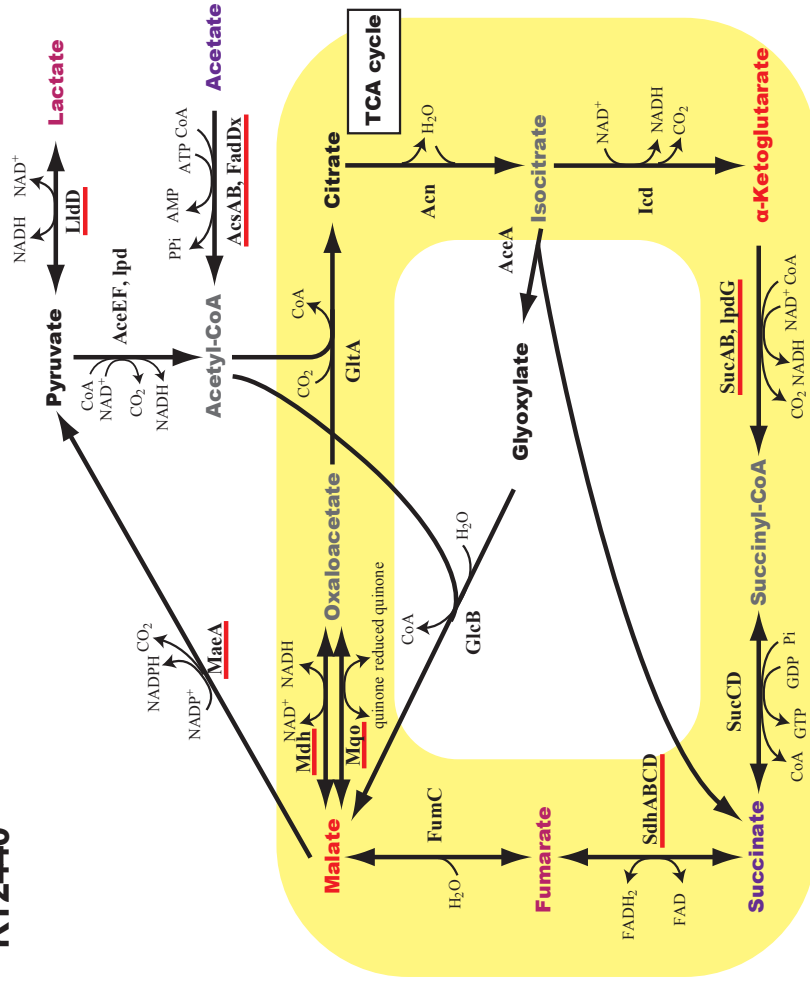


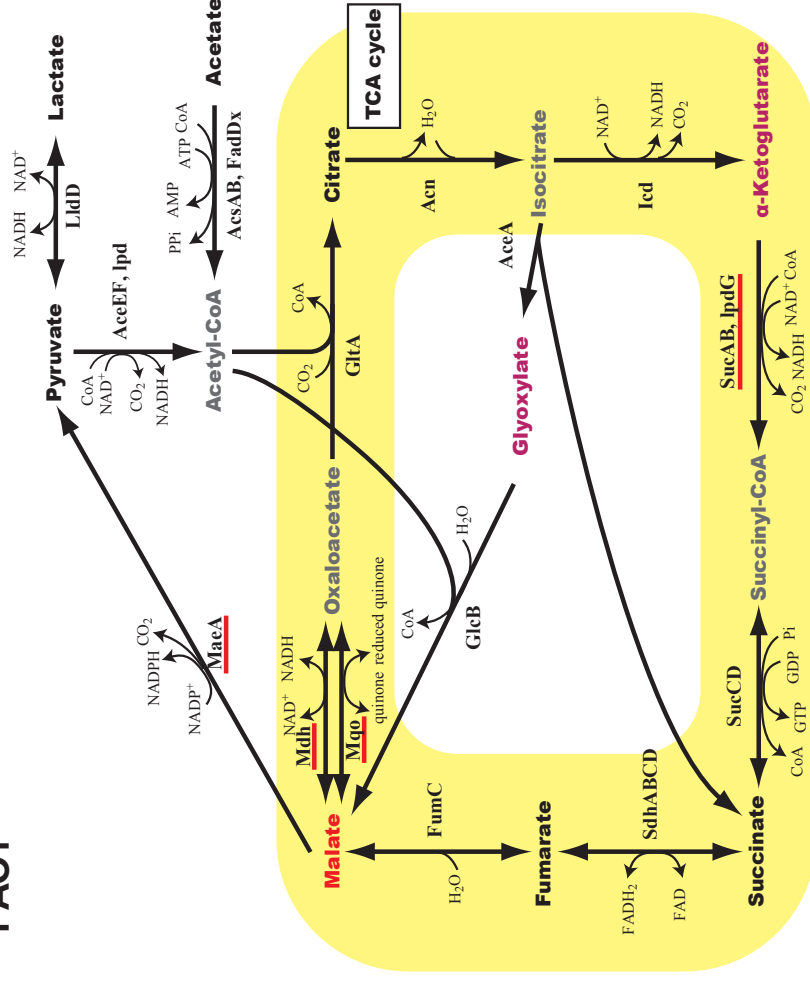
Fig. 2-12. S源として選抜された化合物の構造式.

KT2440株, PAO1株, Pf0-1株のpCAR1保持株と非保持株の比較において抽出された化合物と, KT2440(pCAR1)株の各NAPs破壊株とKT2440(pCAR1)株の比較において抽出された化合物の構造式を示す.

KT2440



PAO1



< 凡例 >

■ Phenotype MicroArray に搭載されていない

■ Phenotype MicroArray に搭載されているが呼吸量に変化なし

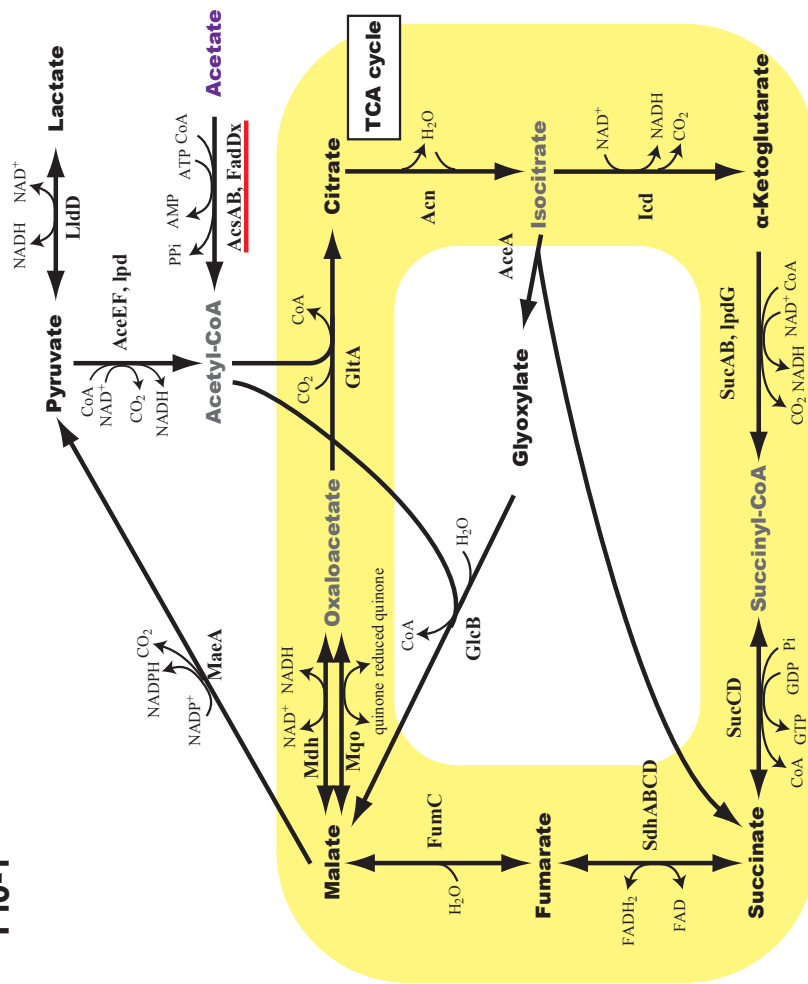
■ 4通りの組み合わせで7000以上減少(P4)

■ 3通りの組み合わせで7000以上減少(P3)

■ 2通りの組み合わせで7000以上減少(P2)

Fig. 2-13. C源として与えた際に pCAR1 の有無によって呼吸量が低下した化合物の代謝経路へのマッピング (2 ページ中 1 ページ目)
P. putida KT2440 株と *P. aeruginosa* PAO1 株で pCAR1 を保持した際に呼吸量が低下した化合物に凡例に従って色をつけた． pCAR1 を保持した際に活性が低下していると考えられる反応を触媒する酵素名に赤線を付して示す．

Pf0-1



< 凡例 >

■ Phenotype MicroArray に搭載されていない

■ Phenotype MicroArray に搭載されているが呼吸量に変化なし

- 4通りの組み合わせで7000以上減少 (P4)
- 3通りの組み合わせで7000以上減少 (P3)
- 2通りの組み合わせで7000以上減少 (P2)

Fig. 2-13. C 源として与えた際に pCAR1 の有無によって呼吸量が低下した化合物の代謝経路へのマッピング (2 ページ中 2 ページ目)
P. putida KT2440 株と *P. aeruginosa* PAO1 株で pCAR1 を保持した際に呼吸量が低下した化合物に凡例に従って色をつけた. pCAR1 を保持した際に活性が低下していると考えられる反応を触媒する酵素名に赤線を付して示す.

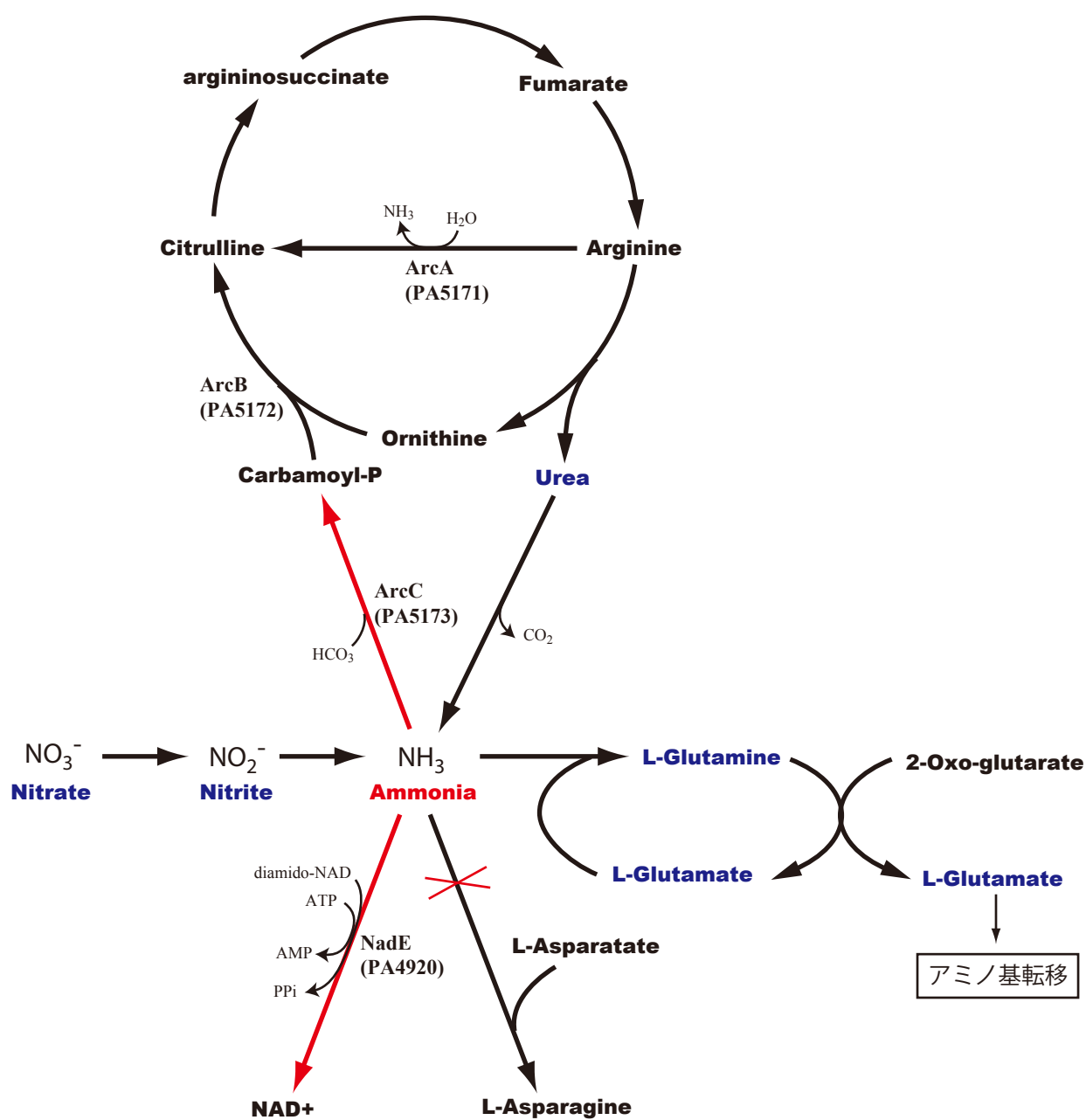


Fig. 2-14. アンモニアを N 源として利用する際の推定代謝経路図 .

P. aeruginosa PAO1 株で pCAR1 を保持した際に呼吸量が増加したアンモニアに関わる代謝反応をまとめた. アスパラギン酸と反応してアスパラギンを生成する反応は一部の細菌で知られているが *Pseudomonas* 属細菌では保存されていない経路である. Phenotype MicroArray に搭載されているが PAO1 株において呼吸量の変化が見られなかった化合物を青字で示す. PAO1 株で pCAR1 を保持した際に活性が低下していると考えられる反応を赤線で示す.

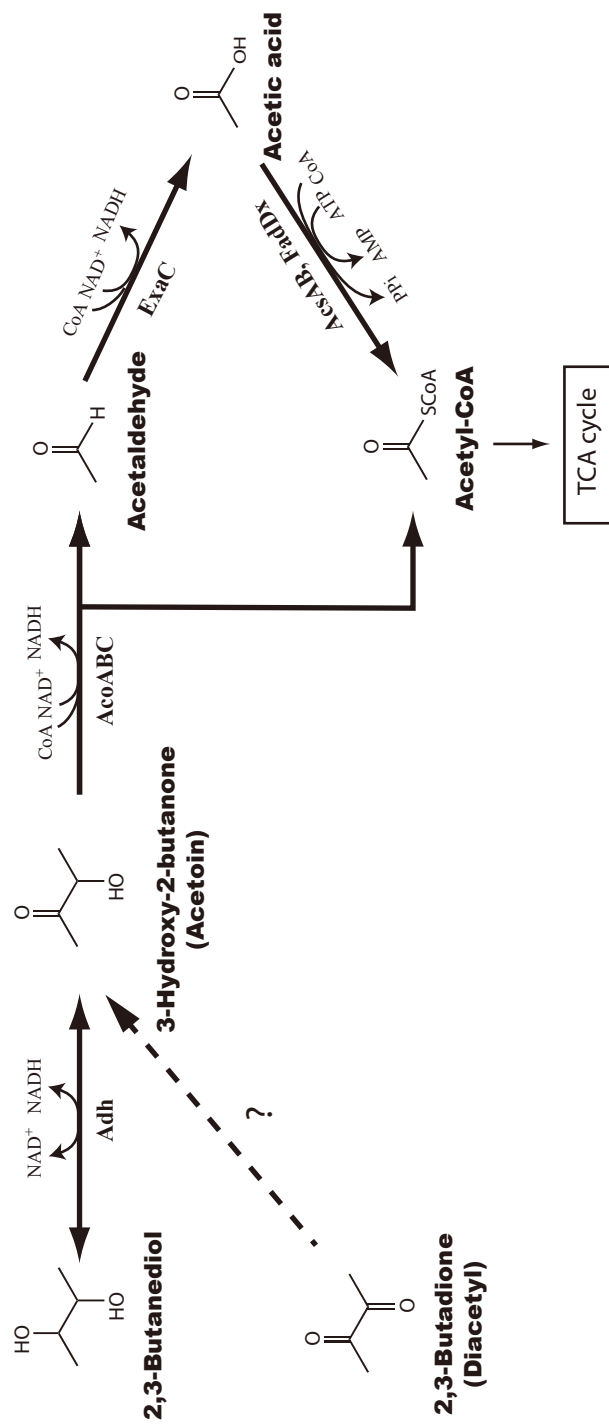
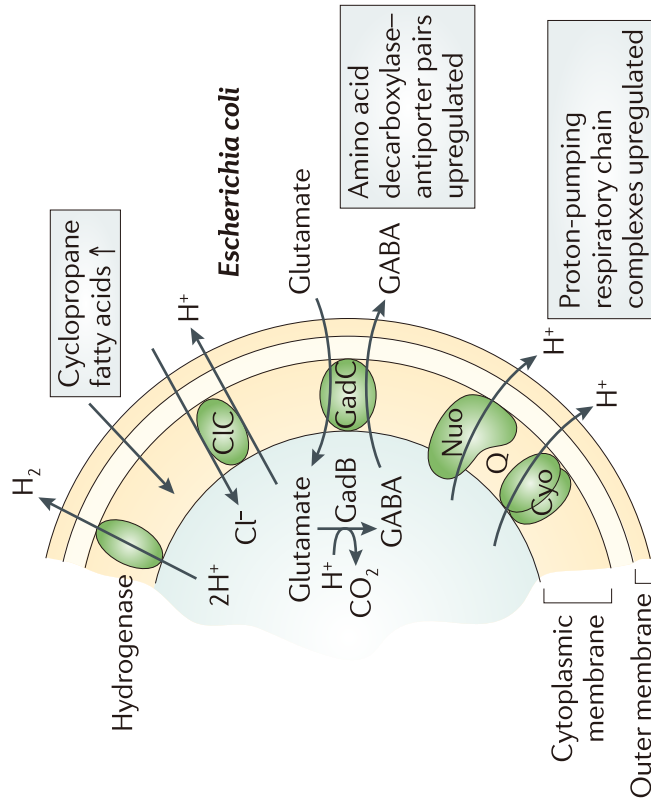


Fig. 2-15. *Pseudomonas* 属細菌における 2,3-butanediol, 3-hydroxy-2-butanone, 2,3-butanone の推定代謝経路

CarF は pCAR1 上にコードされた acetaldehyde dehydrogenase である。その他は KT2440 株または PAOI 株の染色体上にコードされている酵素。

a Acid challenge



b Alkali challenge

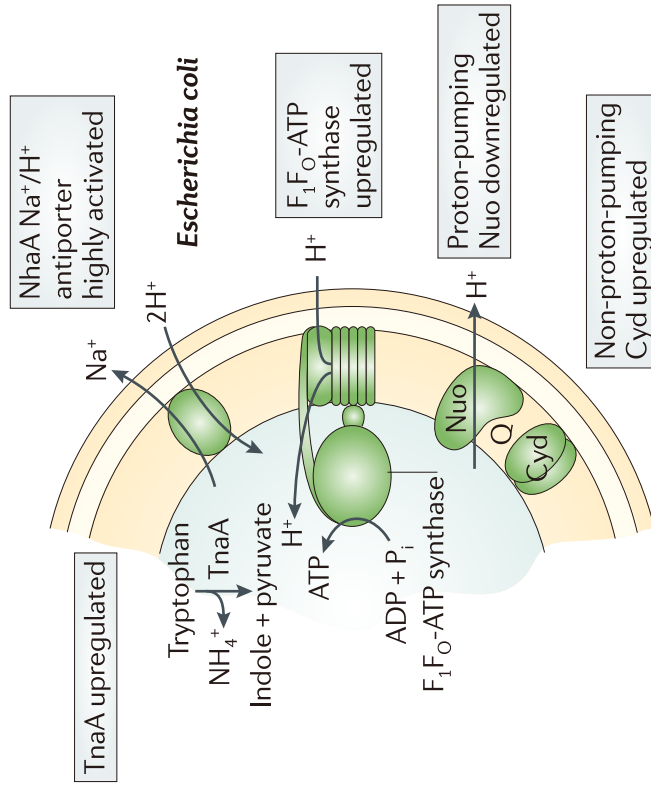


Fig. 2-16. 大腸菌で知られている pH 耐性機構 (Krulwich *et al.*, 2011, Fig.1 より 一部を引用)

酵素や化合物の名称は以下の通り。Cyd, cytochrome bo; Cyo, cytochrome bd; GadB, γ -aminobutyric acid; GadC, glutamate / γ -aminobutyrate antiporter; NhaA, Na^+/H^+ antiporter; Nuo, NADH-ubiquinone oxidoreductase; TnaA, tryptophan deaminase (also known as tryptophanase)

Table 2-3. 本章で用いた菌株とプラスミド

菌株とプラスミド	関連する性質 ^a	入手先または参考文献
Bacterial strains		
<i>Escherichia coli</i> DH5α	F ⁻ , λ, φ80d, <i>lacZΔM15</i> , Δ (<i>lacZYA-argF</i>), <i>U169</i> , <i>endA1</i> , <i>recA1</i> , <i>hsdR17</i> (r _K ⁻ , m _K ⁺), <i>deoR</i> , <i>thi-1</i> , <i>supE44</i> , <i>gyrA96</i> , <i>relA1</i>	Toyobo
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO1	naturally Ap ^r , naturally Cm ^r , naturally Km ^r , naturally Rif ^r , naturally Sm ^r , naturally Tc ^r	Stover <i>et al.</i> , 2000
<i>P. aeruginosa</i> PAO1(pCAR1)	<i>P. aeruginosa</i> PAO1 harboring pCAR1	Takahashi <i>et al.</i> , 2009
<i>P. fluorescens</i> Pf0-1	naturally Ap ^r , naturally Cm ^r , naturally Sm ^r	Deflaun <i>et al.</i> , 1990
<i>P. fluorescens</i> Pf0-1Km	<i>P. fluorescens</i> Pf0-1-derivative strain with the introduced Km ^r gene into Pf01_0559	Takahashi <i>et al.</i> , 2009
<i>P. fluorescens</i> Pf0-1Km(pCAR1)	<i>P. fluorescens</i> Pf0-1Km harboring pCAR1	Takahashi <i>et al.</i> , 2009
<i>P. putida</i> KT2440	naturally Ap ^r , naturally Cm ^r , naturally Gm ^r , naturally Km ^r , naturally Rif ^r , naturally Sm ^r , naturally Tc ^r	Nelson <i>et al.</i> , 2002
<i>P. putida</i> KT2440(pCAR1)	<i>P. putida</i> KT2440 harboring pCAR1, naturally Tc ^r , naturally Cm ^r	Miyakoshi <i>et al.</i> , 2007
Plasmids		
pCAR1	Isolated from <i>Pseudomonas resinovorans</i> CA10, carrying the <i>car</i> and <i>ant</i> operons, IncP-7 group, self-transmissible	Maeda <i>et al.</i> , 2003; Shintani <i>et al.</i> , 2006b; Takahashi <i>et al.</i>
pT7Blue T-vector	Ap ^r , <i>lacZ</i>	Novagen

^aAp^r, Cm^r, Gm^r, Km^r, Rif^r, Sm^r and Tc^r はそれぞれ ampicillin (100 µg/ml), chloramphenicol (30 µg/ml), gentamicin (30 µg/ml), kanamycin (50 µg/ml), rifampicin (25 µg/ml), streptomycin (450 µg/ml) 及び tetracycline (12.5 µg/ml) への耐性を表す。

Table2-5.3 種の *Pseudomonas* 属細菌を宿主とした際の pCAR1 コピー数

hosts	SUC_4h	SUC_8h	SUC_24h
KT2440	1.63 (± 0.14)	2.70 (± 0.34)	2.44 (± 0.35)
PAO1	0.84 (± 0.14)	1.34 (± 0.10)	1.85 (± 0.19)
Pf0-1	1.60 (± 0.13)	1.56 (± 0.13)	1.68 (± 0.13)

Plasmid copy number indicates the ratio of *repA* to *atpI* in total DNA. Mean and standard deviation from three independent determinations are shown.

Table 2-6. 面積値の一例, 及び"2株の呼吸量に差のあった条件"の選抜例^a

PM	Well	Compound ^c	Source	KEGG ID	KT2440(pCARI)		KT2440		KTPC1	KTPC1	KTPC2	KTPC2	P(K) ^b
					KTPC1	KTPC2	KT1	KT2	-KT1	-KT2	-KT1	-KT2	
PM01	A01	Negative Control	C-source	-	8696	8908	9183	7548	-487	1148	-275	1360	
PM01	A02	L-Arabinose	C-source	C00259	8267	12917	9747	6391	-1480	1876	3170	6526	
PM01	A03	N-Acetyl-D-Glucosamine	C-source	C03000	5713	7047	7211	5073	-1498	640	-164	1974	
PM01	A04	D-Saccharic Acid	C-source	C00818	40981	44818	49949	48130	-8968	-7149	-5131	-3312	2 ↓
PM01	A05	Succinic Acid	C-source	C00042	18826	17692	23858	36590	-5032	-17764	-6166	-18898	2 ↓
PM01	A06	D-Galactose	C-source	C00124	4030	5931	4856	3848	-826	182	1075	2083	
PM01	A07	L-Aspartic Acid	C-source	C00049	32350	38912	42263	39613	-9913	-7263	-3351	-701	2 ↓
PM01	A08	L-Proline	C-source	C00148	40773	43756	45563	45371	-4790	-4598	-1807	-1615	
PM01	A09	D-Alanine	C-source	C00133	24216	23151	27475	28891	-3259	-4675	-4324	-5740	
PM01	A10	D-Trehalose	C-source	C01083	6313	7416	7363	5417	-1050	896	53	1999	
PM01	A11	D-Mannose	C-source	C00159	25363	17780	25233	23875	130	1488	-7453	-6095	
PM01	A12	Dulcitol	C-source	C01697	9616	8425	9435	9677	181	-61	-1010	-1252	
PM01	B01	D-Serine	C-source	C00740	6589	8304	6569	5429	20	1160	1735	2875	
PM01	B02	D-Sorbitol	C-source	C00794	6886	7170	7092	4734	-206	2152	78	2436	
PM01	B03	Glycerol	C-source	C00116	12790	10399	12953	16370	-163	-3580	-2554	-5971	
PM01	B04	L-Fucose	C-source	C01019	6669	5345	5553	4090	1116	2579	-208	1255	
PM01	B05	D-Glucuronic Acid	C-source	C00191	41536	35836	43736	42503	-2200	-967	-7900	-6667	
PM01	B06	D-Gluconic Acid	C-source	C00257	42630	31893	46447	43352	-3817	-722	-14554	-11459	2 ↓
PM01	B07	D,L-α-Glycerol- Phosphate	C-source	C00093	7531	5633	7436	4600	95	2931	-1803	1033	
PM01	B08	D-Xylose	C-source	C00181	8489	10899	11868	4929	-3379	3560	-969	5970	
PM01	B09	L-Lactic Acid	C-source	C01432	29459	21962	34177	38583	-4718	-9124	-12215	-16621	3 ↓
PM01	B10	Formic Acid	C-source	C00058	9899	14311	7072	6914	2827	2985	7239	7397	2 ↑
PM01	B11	D-Mannitol	C-source	C00392	8750	5975	8169	6220	581	2530	-2194	-245	
PM01	B12	L-Glutamic Acid	C-source	C00025	44010	41598	46689	40803	-2679	3207	-5091	795	
PM01	C01	D-Glucose-6-Phosphate	C-source	C00092	8084	8245	8486	6086	-402	1998	-241	2159	
PM01	C02	D-Galactonic Acid-γ-Lactone	C-source	C03383	6630	5794	5440	3953	1190	2677	354	1841	
PM01	C03	D,L-Malic Acid	C-source	C00497	25497	35413	43013	40232	-17516	-14735	-7600	-4819	3 ↓
PM01	C04	D-Ribose	C-source	C00121	11426	13224	13973	8197	-2547	3229	-749	5027	
PM01	C05	Tween 20	C-source	C11624	30652	26533	29478	30430	1174	222	-2945	-3897	
PM01	C06	L-Rhamnose	C-source	C00507	6884	4047	3916	3396	2968	3488	131	651	
PM01	C07	D-Fructose	C-source	C00095	25709	18481	14985	14352	10724	11357	3496	4129	2 ↓
PM01	C08	Acetic Acid	C-source	C00033	18532	14495	33539	19540	-15007	-1008	-19044	-5045	2 ↓
PM01	C09	α-D-Glucose	C-source	C00031	30644	29571	34566	32756	-3922	-2112	-4995	-3185	
PM01	C10	Maltose	C-source	C00208	7484	4500	5632	4749	1852	2735	-1132	-249	
PM01	C11	D-Melibiose	C-source	C05402	9180	5349	7947	6234	1233	2946	-2598	-885	
PM01	C12	Thymidine	C-source	C00214	9740	7044	9176	8513	564	1227	-2132	-1469	
PM01	D01	L-Asparagine	C-source	C00152	43101	45631	46486	44808	-3385	-1707	-855	823	
PM01	D02	D-Aspartic Acid	C-source	C00402	7780	5389	6547	3796	1233	3984	-1158	1593	
PM01	D03	D-Glucosaminic Acid	C-source	C03752	6590	4630	6540	4058	50	2532	-1910	572	
PM01	D04	1,2-Propanediol	C-source	C00583	6409	4709	6760	4280	-351	2129	-2051	429	
PM01	D05	Tween 40	C-source	-	30014	23284	28699	25823	1315	4191	-5415	-2539	
PM01	D06	α-Keto-Glutaric Acid	C-source	C00026	24092	19772	39704	34517	-15612	-10425	-19932	-14745	4 ↓
PM01	D07	α-Keto-Butyric Acid	C-source	C00109	4133	3213	3822	3427	311	706	-609	-214	
PM01	D08	α-Methyl-D-Galactoside	C-source	C03619	8418	4275	6649	4191	1769	4227	-2374	84	
PM01	D09	α-D-Lactose	C-source	C00243	7762	4431	5733	4149	2029	3613	-1302	282	
PM01	D10	Lactulose	C-source	C07064	7698	5070	6670	4631	1028	3067	-1600	439	
PM01	D11	Sucrose	C-source	C00089	7667	5032	7165	5254	502	2413	-2133	-222	
PM01	D12	Uridine	C-source	C00299	9930	6937	10362	9518	-432	412	-3425	-2581	
PM01	E01	L-Glutamine	C-source	C00064	42675	46042	47893	46870	-5218	-4195	-1851	-828	
PM01	E02	meso-Tartaric Acid	C-source	C00552	6124	5055	4830	4175	1294	1949	225	880	
PM01	E03	D-Glucose-1-Phosphate	C-source	C00103	7358	4262	5745	4132	1613	3226	-1483	130	
PM01	E04	D-Fructose-6-Phosphate	C-source	C00085	7822	5977	8923	4740	-1101	3082	-2946	1237	
PM01	E05	Tween 80	C-source	C11625	27866	21149	25521	25121	2345	2745	-4372	-3972	
PM01	E06	α-Hydroxy Glutaric Acid-γ-Lactone	C-source	-	5752	3752	9475	5471	-3723	281	-5723	-1719	
PM01	E07	α-Hydroxy-Butyric Acid	C-source	C05984	7943	6671	6246	5182	1697	2761	425	1489	
PM01	E08	β-Methyl-D-Glucoside	C-source	-	7501	3951	6671	4006	830	3495	-2720	-55	
PM01	E09	Adonitol	C-source	C00474	8284	4941	8064	4716	220	3568	-3123	225	
PM01	E10	Maltotriose	C-source	C01835	7337	4385	6177	4330	1160	3007	-1792	55	
PM01	E11	2'-Deoxy-Adenosine	C-source	C00559	7100	4739	7208	5117	-108	1983	-2469	-378	
PM01	E12	Adenosine	C-source	C00212	15368	10018	15334	12331	34	3037	-5316	-2313	
PM01	F01	Glycyl-L-Aspartic Acid	C-source	C02871	9182	7371	8801	6666	381	2516	-1430	705	
PM01	F02	Citric Acid	C-source	C00158	39496	40466	41621	39821	-2125	-325	-1155	645	
PM01	F03	meso-Inositol	C-source	C00137	6949	3949	6306	3995	643	2954	-2357	-46	
PM01	F04	D-Threonine	C-source	C00820	5259	3578	4532	2910	727	2349	-954	668	
PM01	F05	Fumaric Acid	C-source	C00122	32420	36578	45352	43491	-12932	-11071	-8774	-6913	3 ↓
PM01	F06	Bromo-Succinic Acid	C-source	-	15636	14631	18844	11884	-3208	3752	-4213	2747	
PM01	F07	Propionic Acid	C-source	C00163	6787	25290	29612	17561	-22825	-10774	-4322	7729	
PM01	F08	Mucic Acid	C-source	C01807	33207	43809	47664	46762	-14457	-13555	-3855	-2953	2 ↑
PM01	F09	Glycolic Acid	C-source	C00160	6610	4377	5519	5142	1091	1468	-1142	-765	
PM01	F10	Glyoxylic Acid	C-source	C00048	7759	3060	6568	5241	1191	2518	-3508	-2181	
PM01	F11	D-Cellobiose	C-source	C00185	8017	5086	6992	5342	1025	2675	-1906	-256	
PM01	F12	Inosine	C-source	C00294	12304	7902	18612	16568	-6308	-4264	-10710	-8666	2 ↓
PM01	G01	Glycyl-L-Glutamic Acid	C-source	-	10634	7374	10581	7738	53	2896	-3207	-364	
PM01	G02	Tricarballic Acid	C-source	-	5891	5541	6137	4644	-246	1247	-596	897	
PM01	G03	L-Serine	C-source	C00065	33530	31402	36175	26960	-2645	6570	-4773	4442	
PM01	G04	L-Threonine	C-source	C00188	10742	5821	9761	8474	981	2268	-3940	-2653	
PM01	G05	L-Alanine	C-source	C00041	29942	29706	35495	38653	-5553	-8711	-5789	-8947	2 ↓
PM01	G06	L-Alanyl-Glycine	C-source	-	12769	5226	24503	13739	-11734	-970	-19277	-8513	3 ↓
PM01	G07	Acetoacetic Acid	C-source	C00164	10328	7243	10318	8557	10	1771	-3075	-1314	
PM01	G08	N-Acetyl-β-D-Mannosamine	C-source	C00645	7312	4030	7172	4304	140	3008	-3142	-274	
PM01	G09	Mono Methyl Succinate	C-source	-	13243	11418	12267	8639	976	4604	-849	2779	
PM01	G10	Methyl Pyruvate	C-source	-	25918	21052	26872	22221	-954	3697	-5820	-1169	
PM01	G11	D-Malic Acid	C-source	C00497	7468	5417	6927	5855	541	1613	-1510	-438	
PM01	G12	L-Malic Acid	C-source	C00149	30186	34657	42841	43390	-12655	-13204	-8184	-8733	4 ↓
PM01	H01	Glycyl-L-Proline	C-source	-	9851	7912	9939	8505	-88	1346	-2027	-593	
PM01	H02	p-Hydroxy-Phenylacetic Acid	C-source	C00642	9477	6757	8292	6904	1185	2573	-1535	-147	
PM01	H03	m-Hydroxy-Phenylacetic Acid	C-source	C05593	8836	4513	7291	5872	1545	2964	-2778	-1359	
PM01	H04	Tyramine	C-source	C00483	9033	5470	8698	7193	335	1840	-3228	-1723	
PM01	H05	D- Psicose	C-source	C06468	10497	6139	12397	8173	-1900	2324	-6258	-2034	
PM01	H06	L-Lyxose	C-source	C01508	11156	8304	13627	8389	-2471	2767	-5323	-85	
PM01	H07	Glucuronamide	C-source	-	10112	5008	8437	6539	1675	3573	-3429	-1531	
PM01	H08	Pyruvic Acid	C-source	C00022	27563	31055	30513	26814	-2950	749	542	4241	
PM01	H09	L-Galactonic Acid-γ-Lactone	C-source	C01115	9421	4573	9216	7831	205	1590	-4643	-3258	
PM01	H10	D-Galacturonic Acid	C-source	C00333	43201	39082	46451	44940	-3250	-1739	-7369	-5858	
PM01	H11	β-Phenylethylamine	C-source	C05332	12741	13528	12926	12595	-185	146	602	933	
PM01	H12	Ethanolamine	C-source	C00189	15135	12196	12562	13064	2573	2071	-366	-868	

^apCARI保持株の呼吸量から非保持株の呼吸量を差し引いた値を、各株の1連目2連目ごとに4通り計算し、2通り以上の組み合わせで7000以上の差があったものを抽出している。7000以上の差の間で正負が逆転したものは除外してある(例、F07のpropionic acid)。^bP(K)は何通りの組み合わせで7000以上の差があったかを表しており、その右の↑は“pCARIの保持によって呼吸量が増加したこと”を示し、↓は“pCARIの保持によって呼吸量が減少したこと”を示す。^c抽出される基質名を太

Table 2-7. pCAR1の保持またはNAPsの除去によって呼吸量が増加する条件の数のまとめ

Table 2-7(A). 3宿主それぞれでpCAR1を保持した際に呼吸量が増加する条件の数

		C源 (190条件)	N源 (95条件)	P源 (59条件)	S源 (35条件)	計
KT2440	計	22	18	22	4	66
	P4	2	3	11	2	18
	P3	4	4	2	0	10
	P2	16	11	9	2	38
PAO1	計	25	6	8	0	39
	P4	3	1	1	0	5
	P3	6	0	0	0	6
	P2	16	5	7	0	28
Pf0-1	計	17	5	8	1	31
	P4	0	1	1	0	2
	P3	1	2	0	0	3
	P2	16	2	7	1	26

Table 2-7(B). KT2440株においてpCAR1上の各NAPsを除去した際に呼吸量が増加する条件の数

		C源 (190条件)	N源 (95条件)	P源 (59条件)	S源 (35条件)	計
<i>Δpmr</i>	計	13	4	5	1	22
	P4	2	0	0	0	2
	P3	2	0	0	0	2
	P2	9	4	5	1	18
<i>Δpnd</i>	計	10	4	8	0	22
	P4	0	0	1	0	1
	P3	0	0	0	0	0
	P2	10	4	7	0	21
<i>Δphu</i>	計	10	1	4	0	15
	P4	1	0	2	0	3
	P3	3	0	0	0	3
	P2	6	1	2	0	9
<i>ΔpmrΔpnd</i>	計	8	1	6	0	15
	P4	1	0	0	0	1
	P3	1	0	1	0	2
	P2	6	1	5	0	12
<i>ΔpmrΔphu</i>	計	6	2	7	1	15
	P4	0	0	4	0	4
	P3	1	0	1	0	2
	P2	5	2	2	1	9

Table 2-8. C源として与えた場合にpCAR1保持株と非保持株で呼吸量に差が見られた基質^a (PM1~2)

PM	Well	Compound ^c	Source	KEGG ID	KT2440(pCARI)				KT2440				PAO1(pCARI)				PAO1				P(A) ^b				P(F) ^b				
					KTPC1	KTPC2	KT1	KT2	P(K) ^b	PAPC1	PAPC2	PAI	PA2	PM1	PFPC1	PFPC2	PFI	PF2	P(F) ^b										
PM1	A04	D-Saccharic Acid	C-source	C00818	40981	44818	49949	48130	2 ↑	8770	11262	8131	PM1	46402	41614	44906	41635												
PM1	A05	Succinic Acid	C-source	C00042	18826	17692	23858	36590	2 ↓	25676	35222	27816	37785	38643	29851	36031	36238												
PM1	A07	L-Aspartic Acid	C-source	C00049	32350	38912	42263	39613	2 ↓	30599	32043	34355	34089	40598	36095	40770	38439												
PM1	B06	D-Gluconic Acid	C-source	C00257	42630	31893	46447	43352	2 ↓	31050	32913	36047	33208	41096	35817	38560	33865												
PM1	B09	L-Lactic Acid	C-source	C01432	29459	21962	34177	38583	3 ↑	26492	28844	28941	29890	40747	40171	44020	40968												
PM1	B10	Formic Acid	C-source	C00058	9899	14311	7072	6914	2 ↑	10114	16292	11373	16417	20575	14259	18405	19253												
PM1	C03	D,L-Malic Acid	C-source	C00497	25497	35413	43013	40232	3 ↓	28193	30174	40371	37158	43226	40120	41888	39921												
PM1	C07	D-Fructose	C-source	C00095	25709	18481	14985	14352	2 ↑	16697	18447	21177	23290	23665	18551	24780	20008												
PM1	C08	Acetic Acid	C-source	C00033	18532	14495	35339	19540	2 ↑	17903	16308	17920	23019	33267	21376	32515	29953	2 ↑											
PM1	D06	α-Keto-Glutaric Acid	C-source	C00026	24092	19772	39704	34517	4 ↓	25972	30203	38276	31995	43042	43142	45470	41495												
PM1	F05	Fumaric Acid	C-source	C00122	32420	36578	45352	43491	3 ↓	35260	30686	36244	40061	45341	41782	44243	43233												
PM1	F07	Propionic Acid	C-source	C00163	6787	25290	29612	17561		19200	15644	21121	15529	20798	14948	30541	25741	3 ↑											
PM1	F08	Mucic Acid	C-source	C01807	33207	43809	47664	46762	2 ↓	5194	10509	7416	13350	44616	43867	44204	45485												
PM1	F10	Glyoxylic Acid	C-source	C00048	7759	3060	6568	5241		3415	7399	6689	18439	3415	4199	2848	8553	6197											
PM1	F12	Inosine	C-source	C00294	12304	7902	18612	16568	2 ↓	10685	14167	16105	24349	27988	25348	32124	31249												
PM1	G03	L-Serine	C-source	C00065	33530	31402	36175	26960		11713	7637	17166	14910	11713	36537	30456	33115	28375											
PM1	G04	L-Threonine	C-source	C00188	10742	5821	9761	8474		8325	10680	15252	22949	8325	14077	9296	13057	9848											
PM1	G05	L-Alanine	C-source	C00041	29942	29706	35495	38653	2 ↓	14880	19597	19233	28033	14880	33877	25101	32343	28027											
PM1	G06	L-Alanyl-Glycine	C-source	-	12769	5226	24503	13739	3 ↓	6093	13339	10744	18946	6093	33404	22680	34469	24807											
PM1	G12	L-Malic Acid	C-source	C00149	30186	34657	42841	43390	4 ↓	35481	28411	44032	39876	35481	38600	43706	41370	2 ↑											
PM1	H08	Pyruvic Acid	C-source	C00022	27563	31055	30513	26814		14681	23574	19010	24548	14681	30211	19415	31395	28351	2 ↑										
PM1	H10	D-Galacturonic Acid	C-source	C00333	43201	39082	46451	44940		5216	8251	12590	16289	5216	5697	4034	12351	10523											
PM1	H11	β-Phenylethylamine	C-source	C05332	12741	13528	12926	12595		5747	8373	10549	16087	5747	3926	3622	7467	9057											
PM2A	A11	Mannan	C-source	C00464	11785	13191	15206	9540		12735	14257	20384	22196	12735	13913	10326	22288	10236	2 ↑										
PM2A	B06	D-Arabitol	C-source	C01904	6934	8376	8979	3776		12268	13316	15581	16501	12268	29723	21844	25530	14687	2 ↑										
PM2A	D10	γ-Amino-Butyric Acid	C-source	C00334	41338	45121	47525	46235		29687	31341	39515	36731	29687	40836	28935	41578	32275											
PM2A	D12	Butyric Acid	C-source	C00246	16048	20470	28225	20393	2 ↓	12034	10310	13421	13753	12034	23165	13819	26964	19875											
PM2A	E08	β-Hydroxy-Butyric Acid	C-source	C01089	30176	34331	42437	36014	2 ↓	23305	31087	34836	33184	23305	32247	28769	37933	35246											
PM2A	E12	5-Keto-D-Gluconic Acid	C-source	C01062	19209	19206	15444	10220	2 ↓	18361	20178	20667	24838	18361	21781	20270	29959	14271											
PM2A	F06	Quinic Acid	C-source	C00296	37634	45331	45850	46244	2 ↓	36447	37379	38479	35297	36447	42622	28132	36761	32582											
PM2A	F09	Sorbic Acid	C-source	-	10784	9541	8898	6793		10579	16899	12646	19184	10579	17137	14241	28874	14030	2 ↑										
PM2A	F12	L-Tartaric Acid	C-source	C00898	11335	9459	11474	8131		11518	12212	22517	18131	11518	15989	10187	19659	13128											
PM2A	G04	L-Arginine	C-source	C00062	26034	28358	24061	29801		20980	19134	27223	26619	20980	30445	18094	30310	27295	2 ↑										
PM2A	G05	Glycine	C-source	C00037	8568	6080	9081	6233		13049	20569	25552	20624	13049	9714	7516	18094	12797	2 ↑										
PM2A	G06	L-Histidine	C-source	C00135	39706	46336	44825	40190		36440	26867	37542	35080	36440	29403	22808	30977	24215	2 ↑										
PM2A	G09	L-Isoleucine	C-source	C00407	23749	24354	26309	24180		12962	13364	23418	22017	12962	24943	17646	30383	24732	2 ↑										
PM2A	G10	L-Leucine	C-source	C00123	23633	23116	33637	23635	2 ↓	12637	14696	20828	22680	12637	18570	17450	28518	23212	2 ↑										
PM2A	G11	L-Lysine	C-source	C00047	12971	15122	21253	14558		14890	12289	23064	16925	14890	22157	7527	19191	11537	2 ↑										
PM2A	H03	L-Pyrogutamic Acid	C-source	C02238	34207	37430	41458	30992		39164	35105	41772	37848	39164	30620	23235	36396	31004	2 ↑										
PM2A	H05	D,L-Carnitine	C-source	C00487	13708	9159	15941	14213		18878	16174	26473	20692	18878	25659	20251	32004	28331	2 ↑										
PM2A	H07	D,L-Octopamine	C-source	C04227	10968	6355	10034	7244		25853	24521	29571	28148	25853	8202	4213	15246	8302	2 ↑										
PM2A	H08	Putrescine	C-source	C00134	18020	29783	29548	35090	2 ↓	17953	18521	17715	19432	17953	27276	14233	34894	20983	2 ↑										
PM2A	H09	Dihydroxy-Acetone	C-source	C00184	25767	22992	25489	22019		20183	21482	28666	26348	20183	19274	16054	30895	22954	2 ↑										
PM2A	H10	2,3-Butanediol	C-source	C03044	18073	8875	15223	12874		12551	11303	25259	21926	12551	12069	8076	18633	16701	2 ↑										
PM2A	H11	2,3-Butanone	C-source	C00741	12576	7949	11815	9807		10179	10465	18573	16702	10179	13364	8743	20035	16173	2 ↑										
PM2A	H12	3-Hydroxy-2-Butanone	C-source	C00466	16331	13251	16802	11210		9976	10337	17478	18225	9976	13369	9365	18727	14413	2 ↑										

^apCAR1保持株の呼吸量を差し引いた値を、各株の1連目2連目ごとに4通計算し、2連目以上の組み合わせで7000以上の差があったものを掲載している。7000以上の差の間で正負が逆転したものは除外してある。^bp(K), P(A), P(F)はそれぞれKT2440株, PAO1株, P(F)1株において何通りの組み合わせで7000以上の差があったかを表している。その右の↑は“pCAR1の保持によって呼吸量が増加したことを示し、↓は“pCAR1の保持によって呼吸量が減少したことを示す。本文中で取り上げる基質名を太字で示す。

Table 2-10. N源として与えた場合にpCAR1保持株と非保持株で差が見られた基質 (PM3)

PM	Well	Compound ^c	Source	KEGG ID	KT2440(pCAR1)				KT2440				PAOI(pCAR1)				P(A) ^b				P(F) ^b			
					KTPC1	KTPC2	KT1	KT2	P(K) ^b	PAPC1	PAPC2	PAI	PA2	P(A) ^b	PFPC1	PFPC2	PF1	PF2	P(F) ^b					
PM3B	A02	Ammonia	N-source	C00014	39250	45087	46129	41000		44489	43231	8447	19389		48088	46697	47315	48232						
PM3B	A03	Nitrite	N-source	C00088	33569	31163	38489	38575	2 ↓	22195	24541	28329	28620	4 ↑	41583	39414	43229	41919						
PM3B	A09	L-Asparagine	N-source	C00152	39357	48199	51838	49597	2 ↓	46949	46065	49523	47199		49393	52348	49689	52239						
PM3B	A12	L-Glutamic Acid	N-source	C00025	35049	45591	48385	47984	2 ↓	46542	46638	47921	48254		50059	52042	50298	52151						
PM3B	B04	L-Isoleucine	N-source	C00407	36457	39973	44833	46867	2 ↓	32305	30993	31752	33264		38600	40294	37827	40328						
PM3B	B12	L-Tryptophan	N-source	C00078	12389	12364	10233	9891		16269	15010	22159	22735	2 ↓	21316	20268	25781	24180						
PM3B	C01	L-Tyrosine	N-source	C00082	36409	40060	44955	45119	2 ↓	34130	36602	34340	35765		44344	45910	44966	45086						
PM3B	C08	D-Serine	N-source	C00740	33191	31629	37103	34165		15489	15863	16485	19964		11786	11888	20302	21293						
PM3B	C09	D-Valine	N-source	C06417	34189	33924	41020	41542	3 ↓	12988	13116	16009	15895		14719	14716	19880	21764						
PM3B	C11	L-Homoserine	N-source	C00263	35403	32473	33602	33449	2 ↑	20342	19275	27998	23652	2 ↓	12861	8714	19236	19901	3 ↓					
PM3B	D01	N-Acetyl-D,L-Glutamic Acid	N-source	C00624	9947	15950	8789	7756	2 ↑	23141	24523	22493	28007		11801	11211	17770	12626						
PM3B	D03	L-Pyrogutamic Acid	N-source	C02238	29869	28712	36562	36878	3 ↓	41266	39687	36030	40657		41248	41753	39950	41722						
PM3B	D07	N-Butylamine	N-source	-	6557	8586	16126	12841	2 ↓	4130	4253	4579	4776		7359	6588	10660	10706						
PM3B	D09	Ethanolamine	N-source	C00189	29994	39992	40825	40701	2 ↓	42406	41246	41550	42212		39790	38712	40358	40211						
PM3B	D11	Putrescine	N-source	C00134	37140	32940	47840	42012	3 ↓	43917	44341	49031	47454		48886	45349	48779	44756						
PM3B	D12	Agmatine	N-source	C00179	37292	42827	44666	47112	2 ↓	43546	43212	46710	49047		41715	50093	45666	44883						
PM3B	E02	β-Phenylethylamine	N-source	C05332	19201	19984	30119	29976	4 ↓	14774	15226	16045	18191		15506	12774	16574	14580						
PM3B	F09	Thymidine	N-source	C00214	6942	5882	5797	5656		4080	4594	5624	6176		12036	8520	17978	19519	3 ↓					
PM3B	F12	Inosine	N-source	C00294	17732	23642	35478	29240	3 ↓	40967	41771	43030	43337		42874	44429	42870	43557						
PM3B	G01	Xanthine	N-source	C00385	32204	44514	41396	42803	2 ↓	44973	45819	42455	44266		50294	47697	46425	46880						
PM3B	G03	Uric Acid	N-source	C00366	34648	33194	44800	32088	2 ↓	46084	44109	45730	43419		51384	47443	47377	45230						
PM3B	G09	e-Amino-N-Caproic Acid	N-source	C02378	13229	18783	20901	10882		4709	4955	6344	6493		26986	22170	29701	30501	2 ↓					
PM3B	G12	α-Amino-N-Valeric Acid	N-source	C01826	17988	18361	33036	27729	4 ↓	19421	20805	22187	24607		21585	22124	23964	26452						
PM3B	H07	Ala-Thr	N-source	-	46548	46592	47067	47890		21422	23330	29355	29395	2 ↓	49584	49624	48080	48069						
PM3B	H11	Gly-Met	N-source	-	34880	33959	43712	46129	4 ↓	8188	12498	15697	18652	2 ↓	38244	37113	41449	42585						
PM3B	H12	Met-Ala	N-source	-	39859	43667	45462	46261	2 ↓	13532	17013	20666	22431	2 ↓	46473	46551	45933	47374						

^apCAR1保持株の呼吸量から非保持株の呼吸量を差し引いた値を、各株の1連目2連目ごとに4通り計算し、2通り以上の組み合わせで7000以上の差があったものを掲載している。7000以上の差の間で正負が逆転したものは除外してある。^bp(K), P(A), P(F)はそれぞれKT2440株, PAOI株, P(F)1株において何通りの組み合わせで7000以上の差があったかを表している。その右の↑は“pCAR1の保持によって呼吸量が増加したことを示し、↓は“pCAR1の保持によって呼吸量が減少したことを示す。本文中で取り上げる基質名を太字で示す。

Table 2-12. P源として与えた場合にpCAR1保持株と非保持株で差が見られた基質 (PM4の一部)

PM	Well	Compound ^c	Source	KEGG ID	KT2440(pCAR1)				KT2440				PAO1(pCAR1)				P(A) ^b				P(F) ^b			
					KTTPC1	KTTPC2	KT1	KT2					PAPC1	PAPC2	PAPC2	PAI	PA2							
PM04A	A05	Triphosphosphate	P-source	C02466	14630	18542	6339	5264					13977	9348		9558	19343							
PM04A	A08	Adenosine- 2'-Monophosphate	P-source	C00946	5780	8290	20696	12829					45375	45918		47365	47489							
PM04A	A10	Adenosine- 5'-Monophosphate	P-source	C00020	4429	9577	8328	4764					47931	48113		13240	43526							
PM04A	B01	Thiophosphate	P-source	-	27537	35646	37554	37219					37721	37683		41003	39751							
PM04A	B08	Guanosine-2'-Monophosphate	P-source	-	14183	15451	32723	34837					44007	44608		44971	45061							
PM04A	B09	Guanosine-3'-Monophosphate	P-source	C06193	13471	16880	38087	35414					43977	44162		44906	45273							
PM04A	B10	Guanosine-5'-Monophosphate	P-source	C00144	22225	19812	38777	39460					43008	43875		43339	44446							
PM04A	C02	Phospho-Glycolic Acid	P-source	C00988	32695	29216	25141	22027					32846	31882		30666	25761							
PM04A	C03	D-Glucose-1-Phosphate	P-source	C00103	22234	20381	40199	34353					42534	43845		45762	40688							
PM04A	C04	D-Glucose-6-Phosphate	P-source	C00092	15040	21511	33095	32311					23924	37098		42165	43031							
PM04A	C05	2-Deoxy-D-Glucose 6-Phosphate	P-source	C06369	20291	24595	16528	38814					44523	28620		47255	43765							
PM04A	C06	D-Glucosamine-6-Phosphate	P-source	C00352	19820	20783	40566	39721					44312	43961		47089	44890							
PM04A	C08	Cytidine- 2'-Monophosphate	P-source	C03104	12107	13693	39611	38958					42052	42699		44111	44260							
PM04A	C09	Cytidine- 3'-Monophosphate	P-source	C05822	10095	13875	38976	38740					42957	42568		44939	44474							
PM04A	C10	Cytidine- 5'-Monophosphate	P-source	C00055	8268	6346	24519	5316					41946	40856		43436	44681							
PM04A	D01	D-Mannose-1-Phosphate	P-source	C00636	6762	18048	7008	16506					11610	10296		46902	42641							
PM04A	D02	D-Mannose-6-Phosphate	P-source	C00275	20081	17075	40004	6626					34532	36569		44056	40525							
PM04A	D03	Cysteamine-S-Phosphate	P-source		26848	20590	37879	25573					40365	40058		42680	40016							
PM04A	D05	O-Phospho-D-Serine	P-source		43360	44903	6233	43372					45148	44267		47171	45346							
PM04A	D06	O-Phospho-L-Serine	P-source		41636	41361	44072	8124					46284	45588		48071	47773							
PM04A	D08	Uridine- 2'-Monophosphate	P-source	C03031	7177	4309	15546	5078					39649	25815		45324	43381							
PM04A	D09	Uridine- 3'-Monophosphate	P-source	C01368	5579	6129	24564	12362					40960	42888		45807	44962							
PM04A	D10	Uridine- 5'-Monophosphate	P-source	C00105	7509	11405	21868	5115					40144	38973		40410	44945							
PM04A	E02	O-Phospho-L-Tyrosine	P-source	C06501	18925	20616	37549	39069					45118	44290		44311	42441							
PM04A	E03	Phosphocreatine	P-source	C02305	38815	37876	6921	41555					41710	42893		10692	41374							
PM04A	E06	Phosphono Acetic Acid	P-source	C05682	6800	5144	5114	4213					37778	38695		40740	25067							
PM04A	E10	Thymidine- 5'-Monophosphate	P-source	C00364	8038	8997	18086	16702					44494	43652		45125	43753							

^apCAR1保持株の呼吸量を差し引いた値を、各株の1連目2連目ごとに4通り計算し、2通り以上の組み合わせで7000以上の差があったものを掲載している。7000以上の差の間で正負が逆転したものは除外してある。^bp(K), P(A), P(F)はそれぞれKT2440株, PAO1株, P(F)はそれぞれ何通りの組み合わせで7000以上の差があったかを表している。その右の↑は“pCAR1の保持によって呼吸量が増加したことを示し、↓は“pCAR1の保持によって呼吸量が減少したことを示す。本文中で取り上げる基質名を太字で示す。

Table 2-14. S源として与えた場合にpCAR1保持株と非保持株で差が見られた基質 (PM4の一部)

PM	Well	Compound ^c	Source	KEGG ID	KT2440				PAO1(pCAR1)				P(A) ^b				P(F) ^b			
					KT2440	KT1	KT2	P(K) ^b	PAPC1	PAPC2	PAI	PA2	P(A) ^b	PF0-1	PF1	PF2	P(F) ^b			
PM4A	F11	Cysteamine	S-source	C01678	19144	16121	13555	38145	2	↓	23766	22990	23547	21888	27601	26491	27050	26740		
PM4A	G05	Glutathione	S-source	C00051	31321	27828	40140	40582	4	↓	39903	41064	43816	41211	47510	47834	45784	45242		
PM4A	G06	D,L-Ethionine	S-source	C11227	14019	11542	30872	23074	4	↓	29264	28961	30376	30812	9281	8246	17314	12896	2	↓
PM4A	H02	Thiourea	S-source	-	23666	31427	35027	36446	2	↓	33116	33311	34838	34595	32797	34081	35764	35487		

^apCAR1保持株の呼吸量の呼吸量を差し引いた値を、各株の1連目ごとに4通り計算し、2通り以上の組み合わせで7000以上の差があったものを掲載している。7000以上の差の間で正負が逆転したものは除外してある。^bp(K), P(A), P(F)はそれぞれKT2440株, PAO1株, PF0-1株において何通りの組み合わせで7000以上の差があったかを表している。その右の↑は“pCAR1の保持によって呼吸量が増加したことを示し、↓は“pCAR1の保持によって呼吸量が減少したことを示す。本文中で取り上げる基質名を太字で示す。

Table 2-16. pCAR1の有無によって浸透圧ストレス耐性が変化した条件^a (PM9)

PM	Well	Compound	KT2440(pCAR1)		KT2440		P(K) ^b	PAO1(pCAR1)		PAO1		P(A) ^b	Pf0-1(pCAR1)		Pf0-1		P(F) ^b
			KTPC1	KTPC2	KT1	KT2		PAPC1	PAPC2	PA1	PA2		PFPC1	PFPC2	PF1	PF2	
PM09	A01	1% NaCl	37981	38673	43806	41483		41393	43733	45790	39877		44987	43767	41831	46398	
PM09	A02	2% NaCl	32023	32692	40804	43088	4 ↓	37667	40764	41796	33750		39822	42443	38930	43713	
PM09	A03	3% NaCl	13317	16129	35327	36327	4 ↓	33526	36153	38751	29342		29199	32053	30084	33566	
PM09	A04	4% NaCl	4347	6713	21274	25109	4 ↓	27644	32718	32570	26553		12516	17058	19231	14665	
PM09	A05	5% NaCl	2397	3583	6512	8510		21422	25361	24609	25175		3866	4809	3604	3534	
PM09	A06	5.5% NaCl	2103	2946	2797	4320		15652	18386	19803	19919		4228	3663	2279	2129	
PM09	A07	6% NaCl	3449	3121	4761	6386		12409	12460	14400	13814		6114	7841	7866	5597	
PM09	A08	6.5% NaCl	2103	2844	2426	6103		7851	10137	15319	12159		8490	4607	5206	2375	
PM09	A09	7% NaCl	4167	4151	3492	3471		7321	7729	9140	5810		5808	4409	2725	3904	
PM09	A10	8% NaCl	5389	7229	3856	7215		7185	12521	5664	6093		12136	10932	3757	6071	2
PM09	A11	9% NaCl	4021	7458	9443	5923		11307	10446	5820	9052		7574	8827	7585	10160	
PM09	A12	10% NaCl	6781	6819	11032	9950		11591	14828	9578	8547		20798	14948	30541	25741	
PM09	D01	3% Potassium Chloride	28225	26864	40038	38287	4 ↓	38889	37766	34843	37942		41956	41343	38934	40330	
PM09	D02	4% Potassium Chloride	16445	16558	32772	32508	4 ↓	34592	34283	31936	36682		30647	32549	30568	31938	
PM09	D03	5% Potassium Chloride	6604	6149	24376	24124	4 ↓	29231	31132	29951	32473		19556	18059	18788	20500	
PM09	D04	6% Potassium Chloride	3489	4103	11642	16334	4 ↓	29346	28474	28747	30414		7560	7377	15550	8863	2
PM09	D05	2% Sodium Sulfate	32953	34770	38600	31726		41160	39166	43037	39734		31923	35438	41590	39273	2
PM09	D06	3% Sodium Sulfate	31447	32328	38882	41848	3 ↓	40214	39252	41563	36742		43854	43505	42134	44587	
PM09	D07	4% Sodium Sulfate	25621	24813	37603	37616	4 ↓	38371	40154	38454	39360		42890	35390	41183	40049	
PM09	D08	5% Sodium Sulfate	15462	15137	31624	36035	4 ↓	38468	38586	34049	38715		41533	38831	39125	40916	
PM09	E01	1% Sodium Formate	36905	35523	43296	40857		39074	42865	40402	42657		48833	48673	41702	48258	
PM09	E02	2% Sodium Formate	27683	29460	38927	39832	4 ↓	33817	36298	30403	34999		38886	42257	38040	41475	
PM09	E03	3% Sodium Formate	22083	22505	35606	33359	4 ↓	28078	28973	28107	30640		39039	38416	35317	38353	
PM09	E04	4% Sodium Formate	12396	12718	30735	31212	4 ↓	18854	18610	23069	23113		35178	34713	34699	36563	
PM09	E05	5% Sodium Formate	3014	2807	23600	25356	4 ↓	4047	4892	10834	10250		26846	27217	27419	28202	
PM09	E06	6% Sodium Formate	2763	2208	4272	5459		4898	2322	2838	5291		5920	7741	12739	10888	
PM09	E07	2% Urea	36788	37048	33795	39696		41029	41512	41622	34419		45616	44607	44548	43053	
PM09	E08	3% Urea	6701	4849	6099	5527		28809	33186	39095	36869	2 ↓	27794	26070	28827	27695	
PM09	E09	4% Urea	2329	2140	2979	2419		20558	21969	33721	30382	4 ↓	2230	2372	2535	3247	
PM09	E10	5% Urea	2262	2148	2435	2483		9011	12438	26718	22638	4 ↓	2268	2506	2513	2713	
PM09	E11	6% Urea	2403	2219	2876	2708		3430	3945	12288	9579	2 ↓	2398	2496	2735	3443	
PM09	E12	7% Urea	4582	3186	6183	5392		3918	3645	6485	6419		3484	3942	5342	6801	
PM09	H07	10mM Sodium Nitrite	41601	42554	43108	44735		44604	44915	44601	43845		40856	49985	48793	47530	
PM09	H08	20mM Sodium Nitrite	35835	35399	42450	39445		39326	40139	38864	42223		39768	48359	46008	47074	
PM09	H09	40mM Sodium Nitrite	13708	14640	32587	31844	4 ↓	25959	31179	35214	34310	2	32234	38665	39723	43086	2 ↓
PM09	H10	60mM Sodium Nitrite	5616	2128	16274	15162	4 ↓	17356	18011	23085	22381		15011	23181	30930	33115	4 ↓
PM09	H11	80mM Sodium Nitrite	5270	2430	8521	6842		14701	13295	19561	19205		5360	15810	21853	27682	3 ↓
PM09	H12	100mM Sodium Nitrite	7053	3107	8428	7810		5703	5407	12957	10570	2	3777	3975	8110	9753	

^apCAR1保持株の呼吸量から非保持株の呼吸量を差し引いた値を、各株の1連目2連目ごとに4通り計算し、2通り以上の組み合わせで7000以上の差があったものを掲載している。同じ化合物の濃度が段階的に変化しているwellは抽出されなかったwellも含めて示している。7000以上の差の間で正負が逆転したものは除外してある。^bP(K), P(A), P(F)はそれぞれKT2440株、PAO1株、Pf0-1株において何通りの組み合わせで7000以上の差があったかを表している。2通り以上の組み合わせで7000以上変化していても濃度依存的に変化していないwellは除外しており、濃度依存的だと判断した条件のみに、その右に矢印を付した。↑は“pCAR1の保持によって呼吸量が増加したこと”を示し、↓は“pCAR1の保持によって呼吸量が減少したこと”を示す。

Table 2-17. NAPsの破壊によって浸透圧ストレス耐性が変化した条件^a (PM9)

PM Well Compound ^c			KT2440		KT2440(pCARI)		KT2440(pCARIΔpmr)		KT2440(pCARIΔpnd)		KT2440(pCARIΔphu)		KT2440(pCARIΔpmr Δpnd 1)		KT2440(pCARIΔpmr Δphu 1)		P(mh) _b				
PM	Well	Compound ^c	KT1	KT2	KTPC1	KTPC2	P(K) ^b	Δpmr 1	Δpmr 2	P(m) ^b	Δpnd 1	Δpnd 2	P(n) ^b	Δphu 1	Δphu 2	P(h) ^b	Δpmr Δpnd 1	Δpmr Δpnd 2	P(mn) _b	Δpmr Δphu 1	Δpmr Δphu 2
PM09	A01	1% NaCl	43806	41483	37981	38673		39822	38817	39000	38679			37305	37721	37973	37671			37826	36606
PM09	A02	2% NaCl	40804	43088	32023	32692	4 ↓	31082	33192	31589	32379			32806	31133	26052	27309			35840	34636
PM09	A03	3% NaCl	35327	36327	13317	16129	4 ↓	10038	13574	12771	10085			13958	12923	7977	9553			20806	17126
PM09	A04	4% NaCl	21274	25109	4347	6713	4 ↓	3001	8337	8432	3130			7282	4555	4638	6076			8646	5366
PM09	A05	5% NaCl	6512	8510	2397	3583	4 ↓	4500	3590	3242	2121			3477	2305	3705	6772			5726	2566
PM09	A06	5.5% NaCl	2797	4320	2103	2946		2101	3547	5039	4692			2836	2101	2101	2838			4336	2411
PM09	A07	6% NaCl	4761	6386	3449	3121		3383	8360	2954	2248			4132	5364	2228	4091			7265	5050
PM09	A08	6.5% NaCl	2426	6103	2103	2844		2699	2938	3624	2269			2942	2118	2107	5274			4136	4974
PM09	A09	7% NaCl	3492	3471	4167	4151		2104	4210	9997	2152			6411	2481	2102	4309			5214	4216
PM09	A10	8% NaCl	3856	7215	5389	7229		4989	4503	3514	5961			4382	2115	2107	4228			3563	6398
PM09	A11	9% NaCl	9443	5923	4021	7458		10608	5348	5536	7576			6778	9273	8320	4448			6334	6375
PM09	A12	10% NaCl	11032	9950	6781	6819		7716	4859	5536	7483			7840	7356	9888	8970			5575	10964
PM09	D01	3% Potassium Chloride	40038	38287	28225	26864	4 ↓	26077	27430	28037	27127			27119	26129	19707	21220	3 ↓	3 ↓	33067	32856
PM09	D02	4% Potassium Chloride	32772	32508	16445	16558	4 ↓	15029	14824	16077	14239			16122	16005	8344	10372	2 ↓	2 ↓	23945	22247
PM09	D03	5% Potassium Chloride	24376	24124	6604	6149	4 ↓	4709	5778	4926	5360			6717	6044	3636	3752			11202	9993
PM09	D04	6% Potassium Chloride	11642	16334	3489	4103	4 ↓	3808	3683	4636	3037			3617	3732	3882	2969			5797	6452
PM09	D05	2% Sodium Sulfate	38600	31726	32953	34770		32728	30716	29272	33443			33792	33646	32929	30915			35168	32785
PM09	D06	3% Sodium Sulfate	38882	41848	31447	33238	3 ↓	26580	29000	29122	29978			29933	29471	30933	25809			35945	32694
PM09	D07	4% Sodium Sulfate	37603	37616	25621	24813	4 ↓	21422	24477	24472	24370			25090	25374	20958	18183			31720	32946
PM09	D08	5% Sodium Sulfate	31624	36035	15462	15137	4 ↓	13124	11779	14724	14031			14650	15343	10628	9950			23162	23447
PM09	D09	5% Ethylene Glycol	46652	38853	41002	41559		37125	36108	42032	37405			41901	40092	40486	40224			39221	33555
PM09	D10	10% Ethylene Glycol	39494	45419	36803	36489		36244	38150	40380	35763			38538	38183	36748	39363			39272	33581
PM09	D11	15% Ethylene Glycol	43400	45774	31843	38654		38322	33176	40280	41299	2 ↑		38024	36401	33382	38030			32224	29783
PM09	D12	20% Ethylene Glycol	48559	41804	38284	42198		36519	40669	43727	35959			42144	42196	35623	40541			40121	39759
PM09	E01	1% Sodium Formate	43296	40857	36905	35523		36839	37626	38979	37204			37163	34889	34637	35768			38503	38030
PM09	E02	2% Sodium Formate	38927	39832	27683	29460	4 ↓	28736	30054	30316	28950			30737	29216	26132	27813			35398	31015
PM09	E03	3% Sodium Formate	35606	33359	22083	22505	4 ↓	21068	22480	24754	22306			21169	23299	19692	20417			26638	26151
PM09	E04	4% Sodium Formate	30735	31212	12396	12718	4 ↓	9495	11543	11038	11849			10355	13672	7611	7049			21761	22936
PM09	E05	5% Sodium Formate	23600	25356	3014	2807	4 ↓	3377	2503	2382	2544			2487	2882	2797	2332			8311	7790
PM09	E06	6% Sodium Formate	4272	5459	2763	2208		2267	2141	2130	7263			2348	2950	2366	2226			2358	2350
PM09	F01	1% Sodium Lactate	45699	44630	42357	44553		42112	44489	44579	42427			44403	42324	40749	42890			44015	41684
PM09	F02	2% Sodium Lactate	26829	27115	21267	23976		11661	13760	20732	12639	2 ↓		22834	21714	20257	22217			7422	5319
PM09	F03	3% Sodium Lactate	2585	2634	2539	2153		5128	2359	2259	2439			2208	2466	2513	2253			2418	2484
PM09	F04	4% Sodium Lactate	2492	2441	2220	2237		2169	2684	2332	2177			2440	2307	2231	2468			2478	2251
PM09	F05	5% Sodium Lactate	2885	2749	2442	2101		2272	2101	2102	2303			2101	2453	2340	2101			2102	2429
PM09	F06	6% Sodium Lactate	2736	2728	2421	2101		2287	2106	2102	2307			2101	2539	2429	2109			2104	2439
PM09	F07	7% Sodium Lactate	2484	2378	2210	2101		2143	2101	2102	2113			2101	2329	2146	2101			2101	2187
PM09	F08	8% Sodium Lactate	2278	2199	2129	2101		2116	2102	2101	2102			2101	2160	2113	2101			2101	2146
PM09	F09	9% Sodium Lactate	2997	2827	2484	2101		2315	2101	2102	2239			2101	2661	2415	2101			2101	2457
PM09	F10	10% Sodium Lactate	4229	3653	3045	2106		3225	2103	2115	2878			2206	3432	3264	2107			2111	3122
PM09	F11	11% Sodium Lactate	2946	2894	2627	2151		2696	2105	2171	2418			2112	2837	2422	2303			2120	2588
PM09	F12	12% Sodium Lactate	5281	4870	4557	2562		4348	2738	2568	4411			2573	4843	4198	2565			2504	4451
PM09	H07	10mM Sodium Nitrite	43108	44735	41601	42554		39940	42204	40135	39433			42617	41168	39736	40009			43007	41364
PM09	H08	20mM Sodium Nitrite	42450	39445	35835	35399		32553	33202	31112	33248			32710	33249	31853	29777			38228	39037
PM09	H09	40mM Sodium Nitrite	32587	31844	13708	14640	4 ↓	10296	8435	5685	11949	2 ↓		12895	15711	7162	8308			14472	22243
PM09	H10	60mM Sodium Nitrite	16274	15162	5616	2128	4 ↓	5669	2134	2106	5224			2101	6746	5325	2105			2105	5808
PM09	H11	80mM Sodium Nitrite	8521	6842	5270	2430		5154	2285	2392	4972			2277	6106	5014	2277			2364	5413
PM09	H12	100mM Sodium Nitrite	8428	7810	7053	3107		7106	3585	3314	6548			3228	7992	6788	3251			3361	7258

^a各NAPs破壊株の呼吸量を差し引いた値を、各株の1連目2連目ごとに4通り計算し、2通り以上の組み合わせで7000以上の差があったものを掲載している。7000以上の差の間で正負が逆転したものは除外してある。参考として、KT2440(pCARI)株の呼吸量からKT2440株の呼吸量を差し引いて選ばれた基質も掲載してある。^bP(K), P(m), P(n), P(h), P(mm), P(mh)はそれぞれKT2440(pCARI)株とKT2440株, KT2440(pCARIΔpmr)株とKT2440(pCARI)株, KT2440(pCARIΔpnd)株とKT2440(pCARI)株, KT2440(pCARIΔphu)株とKT2440(pCARI)株, KT2440(pCARIΔpmr Δpnd)株とKT2440(pCARI)株, KT2440(pCARI Δpmr Δpnd)株とKT2440(pCARI Δpmr Δphu)株とKT2440(pCARI Δpmr Δphu)株の呼吸量の差を表している。その右の↑は“pCARI1の保持によって呼吸量が増加したことを”を示し、↓は“pCARI1の保持によって呼吸量が減少したことを”を示す。本文中で取り上げる基質名を太字で示す。

Table 2-18. pCAR1の有無によってpHストレス耐性が変化した条件^a (PM10)

PM	Well	Compound	KT2440(pCAR1)		KT2440		PAO1(pCAR1)		PAO1		Pf0-1(pCAR1)		Pf0-1		P(F) ^b		
			KTPC1	KTPC2	KT1	KT2	P(K) ^b	PAPC1	PAPC2	PA1	PA2	P(A) ^b	PFPC1	PFPC2	PF1	PF2	
PM10	A01	pH 3.5	4526	6971	5185	5560		8235	8678	4808	5835		7201	7900	4948	5354	
PM10	A02	pH 4	2922	6574	3854	4215		7936	8362	3585	4271		6770	7629	3277	3770	
PM10	A03	pH 4.5	2792	5088	3679	3817		19742	18338	17647	18756		5319	5812	8858	7216	
PM10	A04	pH 5	2547	5615	5479	4172		46836	46036	44004	43899		45285	46639	46557	42585	
PM10	A05	pH 5.5	37721	40708	39159	29847		47690	47385	46551	46813		50023	49168	46256	47889	
PM10	A06	pH 6	43017	45418	44815	32781		47359	46657	46731	45580		50700	49992	47861	47229	
PM10	A07	pH 7	43012	45661	44291	33235		46685	46419	40307	40434		50042	50701	47334	49303	
PM10	A08	pH 8	44510	46846	48215	47420		43102	43545	38181	41446		50981	49312	51225	52592	
PM10	A09	pH 8.5	39417	42441	36948	42063		41209	42339	37507	44371		48983	49522	51707	51074	
PM10	A10	pH 9	35523	39599	43030	45408	2 ↓	42346	41599	42129	39844		49311	48506	48776	47648	
PM10	A11	pH 9.5	32504	33986	40816	40405	2 ↓	44178	39777	38286	40132		48368	48155	49948	48356	
PM10	A12	pH 10	26960	27114	43409	44889	4 ↓	36097	38708	39078	33721		49031	47704	50143	48923	
PM10	B02	pH 4.5 + L-Alanine	2450	5255	2980	3153		25177	28742	31843	26818		7991	15971	18036	21668	2 ↓
PM10	B03	pH 4.5 + L-Arginine	2129	2714	2283	2134		19319	20661	24503	23453		3293	7340	4632	14898	2 ↓
PM10	B04	pH 4.5 + L-Asparagine	2130	3040	2297	2272		28004	27328	29844	29590		11639	8512	19617	26528	4 ↓
PM10	B05	pH 4.5 + L-Aspartic Acid	2119	3023	2275	2128		16399	19390	19187	17449		3798	5620	3102	18713	2 ↓
PM10	B07	pH 4.5 + L-Glutamine	2862	3289	3555	3219		22732	23440	27573	24379		14842	9745	13311	22414	2 ↓
PM10	B08	pH 4.5 + Glycine	2138	2267	2315	2444		22461	22812	26702	23802		3173	14407	7813	28329	2 ↓
PM10	B12	pH 4.5 + L-Lysine	4798	4193	5644	5807		8327	9571	15587	9308		5014	5368	9580	19431	2 ↓
PM10	C01	pH 4.5 + L-Methionine	5323	6905	5234	5417		17826	19603	22520	24046		6932	8141	10951	15820	2 ↓
PM10	C02	pH 4.5 + L-Phenylalanine	3082	5138	3430	3804		24455	25327	27946	25577		5854	9013	19994	13229	3 ↓
PM10	C04	pH 4.5 + L-Serine	2240	2364	2699	2510		26469	26605	29092	29590		19684	11817	19866	20880	2 ↓
PM10	C07	pH 4.5 + L-Tyrosine	2697	2545	3088	3226		22426	24395	26383	24803		15514	15193	18444	23790	2 ↓
PM10	C08	pH 4.5 + L-Valine	2713	2689	3111	3187		26466	27913	30283	29985		12302	19718	22229	20048	2 ↓
PM10	C09	pH 4.5 + Hydroxy-L-Proline	3988	3404	4447	4386		28414	27137	30007	26362		12725	13622	14894	21251	2 ↓
PM10	C11	pH 4.5 + L-Homoarginine	4877	3177	5449	5145		15160	13273	24846	17055	2 ↓	3789	3181	5023	4829	
PM10	D03	pH 4.5 + L-Norvaline	2962	2673	14713	3158	2 ↓	29500	30427	33948	32054		24791	24534	28546	28088	
PM10	D04	pH 4.5 + α-Amino-N-Butyric Acid	2985	3111	15093	3202	2 ↓	27518	29459	32601	33907		24442	21122	28486	28404	2 ↓
PM10	D06	pH 4.5 + β-Hydroxy Glutamate	2843	2303	20187	14410	4 ↓	31664	33725	37046	36422		28593	21689	33121	30607	2 ↓
PM10	D07	pH 4.5 + γ-Hydroxy Glutamic Acid	2380	2101	15887	7126	2 ↓	26081	28265	33755	32834		27414	23880	26081	31090	
PM10	D08	pH 4.5 + 5-Hydroxy-L-Lysine	2234	2132	13199	2441	2 ↓	26606	26376	31129	32926		13282	16458	20385	24080	3 ↓
PM10	D10	pH 4.5 + D,L Diamino-Pimelic Acid	2434	2365	3348	2956		17628	16521	25937	27834	4 ↓	6641	2703	16400	11453	3 ↓
PM10	D11	pH 4.5 + Trimethylamine-N-Oxide	5488	3655	6095	5755		14137	12733	20554	22285	3 ↓	4733	3689	7759	13642	2 ↓
PM10	D12	pH 4.5 + Urea	5805	3238	6598	6374		23329	22445	30596	33070	4 ↓	21859	24454	32401	32112	4 ↓
PM10	E01	pH 9.5	33925	33309	43561	33976	2 ↓	41246	43375	41913	45798		48443	45693	46271	47298	
PM10	E02	pH 9.5 + L-Alanine	29481	31354	41049	40354	4 ↓	42596	43401	43690	40828		46769	44994	43049	43521	
PM10	E03	pH 9.5 + L-Arginine	7016	13096	38009	36954	4 ↓	38728	39753	41058	39671		38502	34497	36212	36815	
PM10	E04	pH 9.5 + L-Asparagine	13271	10524	39809	34837	4 ↓	39853	40910	41902	41089		41643	40434	41159	41466	
PM10	E05	pH 9.5 + L-Aspartic Acid	26604	27287	40282	37620	4 ↓	39400	41098	33923	39884		43362	44667	45615	44509	
PM10	E06	pH 9.5 + L-Glutamic Acid	18635	18640	41063	39981	4 ↓	42087	42406	46492	45645		44509	40402	46812	45462	
PM10	E07	pH 9.5 + L-Glutamine	32965	34201	43098	40176	3 ↓	41435	42613	46726	45416		46939	46330	47559	46928	
PM10	E08	pH 9.5 + Glycine	12046	7250	38458	33233	4 ↓	40748	38159	38969	39320		35854	25674	36815	33795	2 ↓
PM10	E10	pH 9.5 + L-Isoleucine	2950	2363	30093	29842	4 ↓	35982	36406	39223	38469		8373	8376	15850	15052	2 ↓
PM10	E11	pH 9.5 + L-Leucine	4198	2524	24054	21114	4 ↓	34404	34271	38443	36761		5438	5959	12640	9873	
PM10	E12	pH 9.5 + L-Lysine	20443	14900	40332	37047	4 ↓	38161	39128	40631	39722		40857	39008	46032	41417	
PM10	F01	pH 9.5 + L-Methionine	5114	5226	31697	25754	4 ↓	34093	37374	37171	37644		30679	34125	34033	34799	
PM10	F02	pH 9.5 + L-Phenylalanine	3729	4042	18351	7436	2 ↓	35606	35308	36225	33127		5665	5972	17103	8078	2 ↓
PM10	F03	pH 9.5 + L-Proline	38750	42403	46939	46992	2 ↓	47665	49440	48509	45701		51453	52176	47189	50373	
PM10	F04	pH 9.5 + L-Serine	18256	21905	41078	39772	4 ↓	41070	41208	45153	41626		43775	45119	42679	44413	
PM10	F05	pH 9.5 + L-Threonine	6569	7883	35011	36788	4 ↓	38634	39578	41228	41354		32561	37598	39655	38632	
PM10	F06	pH 9.5 + L-Tryptophan	4586	2593	5002	4909		23918	21623	32118	30383	3 ↓	4868	3422	5712	5347	
PM10	F08	pH 9.5 + L-Valine	5057	10142	37588	36635	4 ↓	37728	38915	40219	39493		38272	39444	41253	40635	
PM10	F09	pH 9.5 + Hydroxy-L-Proline	28419	27271	38745	40435	4 ↓	42239	42010	40312	41715		45381	44519	46178	44433	
PM10	F10	pH 9.5 + L-Ornithine	12545	12682	38163	34598	4 ↓	39274	39465	44411	39261		42110	38594	41036	39257	
PM10	F11	pH 9.5 + L-Homoarginine	6668	4090	36491	32601	4 ↓	37881	37761	33948	36366		30240	26613	33071	28374	
PM10	F12	pH 9.5 + L-Homoserine	18652	14828	39530	37924	4 ↓	31302	31327	34267	33950		36942	36864	41638	38812	
PM10	G01	pH 9.5 + Anthranilic Acid	7834	7690	29479	27343	4 ↓	39585	38294	41603	36531		29999	34297	40507	36088	
PM10	G02	pH 9.5 + L-Norleucine	4147	3628	14581	9035	2 ↓	34251	35207	34877	29148		4200	5403	5863	4886	
PM10	G03	pH 9.5 + L-Norvaline	8060	4771	33873	35532	4 ↓	38254	38660	37625	28588	2 ↓	38738	40249	38157	40627	
PM10	G04	pH 9.5 + Agmatine	12502	7598	38021	39817	4 ↓	44256	43637	39739	42065		24567	33875	35355	35297	2 ↓
PM10	G05	pH 9.5 + Cadaverine	11645	10036	11929	12349		41037	40179	40403	39855		7180	14880	32222	12865	2 ↓
PM10	G06	pH 9.5 + Putrescine	20401	19817	39233	38664	4 ↓	40457	39167	41900	41981		40030	40209	42006	41333	
PM10	G08	pH 9.5 + Phenylethylamine	25356	12935	33763	36420	4 ↓	35912	36031	32213	32473		44625	27452	38753	26594	
PM10	G09	pH 9.5 + Tyramine	10825	3906	14547	19585	3 ↓	17805	16794	10274	12512		13312	13714	15643	9156	
PM10	G10	pH 9.5 + Tryptamine	29262	29214	33958	39629	2 ↓	40103	40568	38385	36979		45073	45134	44372	44703	
PM10	G12	pH 9.5 + Urea	28634	24023	39976	37805	4 ↓	38337	37799	34170	30343	2 ↓	45633	45398	46807	45223	
PM10	H01	X-Caprylate	42878	46105	43832	46266		40640	47109	41175	31749	2 ↓	47001	49967	47667	44578	
PM10	H02	X-α-D-Glucoside	43542	46333	45739	44724		48060	48024	43901	33371	2 ↓	48511	51281	42834	45881	
PM10	H03	X-β-D-Glucoside	43585	45322	43964	44820		47298	47830	40799	30059	3 ↓	46754	48932	46389	48565	
PM10	H04	X-α-D-Galactoside	43737	45264	44836	44996		48498	48390	40875	35797	4 ↓	50575	52237	46372	44994	
PM10	H05	X-β-D-Galactoside	42578	44481	43147	43526		46507	47890	41153	37408	2 ↓	46154	52360	48428	46880	
PM10	H06	X-α-D-Glucuronide	41571	44522	445												

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

3-1. 緒言

第2章では pCAR1 を保持した際の宿主の表現型の変化の検出を行った。以前の研究で、3 宿主染色体それぞれのカスタムタイリングアレイ (Affymetrix 社) を用いて pCAR1 の保持によるトランスクリプトームの変動の解析が行われているが (Shintani *et al.*, 2010), その結果からはこれらの表現型の変化した原因は特定できなかった。その原因として、以前の解析では対数期 1 時点での誘導倍率を用いて pCAR1 を保持した際に転写変動する遺伝子を選抜しているために、異なる生育段階での転写変動を検出できていない可能性が考えられた。そこで本章では、対数期~定常期までの 4 経時点で 3 宿主の pCAR1 保持株・非保持株のトランスクリプトームデータをそれぞれ取得し、pCAR1 プラスミドを保持した際に転写プロファイルが変化する宿主染色体上の遺伝子を探索することで、表現型の変化した原因を探るとともに、表現型レベルでは検出できない宿主細胞の変化を網羅的に検出し、機能や宿主間の共通性に基づいて分類した。

3-2. 材料と方法

3-2-1. 使用した菌株、プラスミド、培地、及び培養条件

本章で使用した菌株およびプラスミドはすべて第2章で既出である (Table 2-3 参照)。使用した培地は、LB 及び NMM-4 であり、組成は Table 2-1 に示した。培地にストックとして添加した試薬とその終濃度を Table 3-1 に示す。菌株の取り扱いには基本的に第2章と同様であり、*Pseudomonas* 属細菌については本章で行った解析すべてでコハク酸 [0.1% (wt/vol)] を添加した 100 ml の NMM-4 培地において培養した菌体を用いている。NMM-4 培地、及びストックは MilliQ 水を用いて作製した。

Table 3-1. 本章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
炭素源・エネルギー源				
Carbazole (plate culture)	CAR	1 mg/ml	40 mg/ml	DMSO ^a
Succinate	SUC	1 mg/ml	100 mg/ml	H ₂ O
ミネラル				
FeCl ₃ ·6H ₂ O	-	10 µg/ml	10 mg/ml	10 mM HCl ^b
MgSO ₄ ·7H ₂ O	-	200 µg/ml	200 mg/ml	H ₂ O
CaCl ₂ ·2H ₂ O	-	10 µg/ml	10 mg/ml	H ₂ O
その他				
5-Bromo-4-chloro-3-indrilyl-β-D-galactoside	X-gal	20 µg/ml	20 mg/ml	DMF ^c

^adimethylsulfoxide, ^bHPLC グレードの 1N HCl を MilliQ 水で希釈, ^cdimethylformamide.

3-2-2. 試薬, 酵素, 基本的な実験操作

2 章に示した.

3-2-3. 使用したプライマー

本章で使用したプライマーをTable 3-2に示す. 本研究で新たに設計したものについてはPrimer3 ver 0.4.0 (http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi) を用いて設計し, Sigma genosise社に委託して合成したものを用了.

Table 3-2. 本章で使用したプライマー

名称	塩基配列 (5' to 3')	参考文献
pCAR1 上に欠失がないかの確認用		
antR-F	CTCAAGACCCAGTACCCCAACCGC	Takahashi <i>et al.</i> , 2009b
antR-R	CGGATCAGGTAGTGC GGCAGCTTC	Takahashi <i>et al.</i> , 2009b
carF-F	GCAAAGGTAGCAATTATCGGGTCG	Takahashi <i>et al.</i> , 2009b
carF-R	CGCCTTTCCTTTTCGATGCTCCGCC	Takahashi <i>et al.</i> , 2009b
TnpRa-F	TATTTTTTGACACCTGCGTGC	Takahashi <i>et al.</i> , 2009b
TnpRa-R	GGTTTCCCGACTTATACCGAA	Takahashi <i>et al.</i> , 2009b
trhN-F	TGAGAACGTGACGAAAAACG	Shintani <i>et al.</i> , 2005b
trhN-R	AGGTGCGAGTTTTGAACGTA	Shintani <i>et al.</i> , 2005b
trhA-F	AAGCAACCCTCCAAACGAT	Shintani <i>et al.</i> , 2005b
trhA-R	TACAGGCAGGGCTTGGAGA	Shintani <i>et al.</i> , 2005b
recT-F*	CAATTGTTGGGAACCTGCTT	Takahashi <i>et al.</i> , 2009b
ORF117-R*	CAGCCATCTGATTGGTTCCT	Takahashi <i>et al.</i> , 2009b
ORF146-F	ATGTCCAAAGACTCAGAAGGCAA	Takahashi <i>et al.</i> , 2009b
ORF146-R	CGGGTGAAAGCGAACGTAGCGGC	Takahashi <i>et al.</i> , 2009b
KT2440 株染色体上の遺伝子の qRT-PCR 用		
univ16S-F	ACACGGTCCAGACTCCTACG	Miyakoshi <i>et al.</i> , 2007
univ16S-R	TACTGCCCTTCCTCCCAACT	Miyakoshi <i>et al.</i> , 2007
univ_rpsC-F	ATCGTCAAGGAGCACACCTC	This study
univ_rpsC-R	CTTACGGACGCGCTTTTTCAG	This study
PP_0005(trmE)-F	CGTTGATTGCCTTGCGTATT	This study
PP_0005(trmE)-R	CGTCGATGTGGATATGTTTCG	This study
PP_0008(rnpA)-F	TTTCAAAGCGGTCTTCGACT	This study
PP_0008(rnpA)-R	CTTCTTGCCGATTACCAAGC	This study
PP_0125-F	CAGGATCCCGAGGTGTTGTA	This study
PP_0125-R	CCAGTACATCCATGCCTTGC	This study

PP_0447(rpoB)-F	CCGAGATGACTACCGAGCTG	This study
PP_0447(rpoB)-R	AGTTGGTTGCTGGTGGTGTGTC	This study
PP_0480(rplQ)-F	CTCACCGCAAGGCTATGTTC	This study
PP_0480(rplQ)-R	CGGTTAGCAACGCTGTCTTC	This study
PP_0615-F	GCTGATCGCCACTATGTGCT	This study
PP_0615-R	TAAGGGCCAGGTAACGGTTC	This study
PP_1138(livG)-F	CGAAGGAAACCGAAGACCTC	This study
PP_1138(livG)-R	CCACGATATGGTCGGAAATG	This study
PP_1895-F	GACCCTGGTGAACAAGACCA	This study
PP_1895-R	GTCACGACGATGTCGAAGGT	This study
PP_2631-F	TGAACTTCGTGCAACTGCTG	This study
PP_2631-R	CGCAACACGCCACGTAAT	This study
PP_3446(ilvA-1)-F	TACGACCTGGCCATTGAAAC	This study
PP_3446(ilvA-1)-R	CCCGGATCTTGAACGAAAAC	This study
Pf+PP_sdhC-F	GTGAAAAGCCAACGACCTGT	This study
PP_4193(sdhC)-R	TTGCCCAGTGCATAAAGCAT	This study
PP_4378(fliC)-F	ACTTTCGGTGGCCGTAATCT	This study
PP_4378(fliC)-R	GCTGGCTTCGTTGTAGTTGC	This study
PP_4712(infB)-F	GATACCGCCCTGGAAGACTC	This study
PP_4712(infB)-R	CTTGGCACGACGGATGTAGT	This study
PP_4858-F	CTGCTGACCCTGACCCTGT	This study
PP_4858-R	GCCTTCAGCTACGGTGTTCA	This study
PP_5040(fbp)-F	TTCCGAAGAAATGGACAACG	This study
PP_5040(fbp)-R	GAAGATGGTACCGACCGACA	This study
PP_5420(atpI)-F	TGTGTATTTTCGCTGGAAGG	This study
PP_5420(atpI)-R	AGTGGCTTCACTCCTGCAA	This study
PAO1 株染色体上の遺伝子の qRT-PCR 用		
univ16S-F	ACACGGTCCAGACTCCTACG	Miyakoshi <i>et al.</i> , 2007
univ16S-R	TACTGCCCTTCCTCCCAACT	Miyakoshi <i>et al.</i> , 2007
univ_rpsC-F	ATCGTCAAGGAGCACACCTC	This study
univ_rpsC-R	CTTACGGACGCGCTTTT TAG	This study
PA1092(fliC)-F	CCGTATCTCCGATACCACCA	This study
PA1092(fliC)-R	TCTGCAGGCTGATGTCAATG	This study
PA1546_hemN-F	AACCTGCTGGACGACGATT	This study
PA1546_hemN-R	ACCTCCATGTCTGAAGTCCTG	This study
PA1581(sdhC)-F	CGTCATCCTGTTTCCTCGGTA	This study

PA1581(sdhC)-R	GTACAGCAGCGCAGACAGC	This study
PA1777(oprF)-F	CTACGAAACCGGCAACAAGA	This study
PA1777(oprF)-R	CGCTGTTGATGTTGGTGATG	This study
PA2966(acpP)-F	ATGAGCACCATCGAAGAACG	This study
PA2966(acpP)-R	TTCTCTTCCAGAGCCATCA	This study
PA4148-F	GACCGGGTGATGAACGTC	This study
PA4148-R	GATCGATGACAGGTTGACGA	This study
PA4245(rpmD)-F	TGGCAACTGTCAAAGTCACTC	This study
PA4245(rpmD)-R	TGTCCTGAACTTCGACGGTA	This study
PA4252(rplX)-F	TGAAGGTTCTCGCTGACGAC	This study
PA4252(rplX)-R	GCCTCCTTCTCGACGATACC	This study
PA4268(rpsL)-F	CTGCGTAAGGTATGCCGTGT	This study
PA4268(rpsL)-R	ACGGATCAGCACTACGCTGT	This study
PA4270(rpoB)-F	GTACCGAGCGTGTCATCGTC	This study
Pf+PA_rpoB-R	GAACCGCGGTAAGGAATGAT	This study
PA4274(rplK)-F	AGCTTCACCTTCGAAACCAA	This study
PA4274(rplK)-R	GTCTTGGCGATCTCTTCCAG	This study
PA4582-F	CAACTGGTGAGCGCTACTT	This study
PA4582-R	GGTCTGGCCTTTCCAGTACA	This study
PA4744(infB)-F	ACCTCGCTGCTCGACTACAT	This study
PA4744(infB)-R	GGTATCCAGGAAGGTCACCA	This study
PA5170_arcD-F	GCTGTTTCCTGTTTCATCCTGA	This study
PA5170_arcD-R	ATGAACACCCAGACGGTGAC	This study
PA5561(atpI)-F	GCTGCTCGTCCAACCTGGTAG	This study
PA5561(atpI)-R	TGAAACGGAACGCCTTGTAG	This study
PA5569(rnpA)-F	AATTCAGCGCAGTCTTCGAC	This study
PA5569(rnpA)-R	GCGAGCTTGACGTTCTTCTT	This study
Pf0-1 株染色体上の遺伝子 qRT-PCR 用		
Pfl16S-F	GCATACGTCCTACGGGAGAA	Takahashi <i>et al.</i> , 2009b
Pfl16S-R	CCTTGGTGAGCCATTACCTC	Takahashi <i>et al.</i> , 2009b
univ_rpsC-F	ATCGTCAAGGAGCACACCTC	This study
univ_rpsC-R	CTTACGGACGCGCTTTTTAG	This study
univ_oprC-F	GCCTGAACATCCTCACCAAC	This study
Pfl_0596(oprC)-R	TGATCACGGTGAGTTTGTCTG	This study
Pfl_0779(infB)-F	AAGAAAGCCCTGACCGGTAT	This study
Pfl_0779(infB)-R	CGGTGAACAGTACCCTCGAT	This study

Pfl_1132(rpoS)-F	TCCAAACACTCCGCTTCACT	This study
Pfl_1132(rpoS)-R	CGCGCAAAATGAACTTCTTC	This study
Pfl_1143-F	TGGCATCAAGGATTCGTACA	This study
Pfl_1143-R	GTTGTCCAGCTCCAGAAAGC	This study
Pfl_1153-F	ACTGGAAGGCCGTGAAGTG	This study
Pfl_1153-R	ATTTGGCTCCCTTTTGTGTTG	This study
Pfl_1161-F	CATCGACATCATCAGCGAAC	This study
Pfl_1161-R	TCACCTGCCAACTGTTATCG	This study
Pfl_1527(fliC)-F	AACGCTGAATTCGCTCAGAT	This study
Pfl_1527(fliC)-R	CGCCAACCTGCGAGATTACA	This study
Pfl_1610(sdhC)-F2	ACCATCAAACCTCCCATCAC	This study
Pfl_1610(sdhC)-R2	CATGCCTTCACCTCGACATA	This study
Pfl_4668(ftsZ)-F	TACCGTTATCGATCCGGACA	This study
Pfl_4668(ftsZ)-R	CGGTGTTGTGCGATGACCTTT	This study
Pfl_5054(rplQ)-F	CTCTGGCCAAGACAGACAGC	This study
Pfl_5054(rplQ)-R	ACCCTCACGGGTAGCGTAAC	This study
Pfl_5061(rpmD)-F	ACTGTGCGTTAAGGGTCTGG	This study
Pfl_5061(rpmD)-R	CGACACGCAGCATGTAGTAAG	This study
Pfl_5086(rpoB)-F	GGTACCGAGCGTGTTATCGT	This study
Pf+PA_rpoB-R	GAACCGCGGTAAGGAATGAT	This study
Pfl_5090(rplK)-F	CGACCGTAGCTTCACTTTTCG	This study
Pfl_5090(rplK)-R	TGCCAACCTTAACGGTGTTTC	This study
Pfl_5737(atpI)-F	CTGATTTTGACGGCAGTGCT	This study
Pfl_5737(atpI)-R	GAACCAGCTGACCGACTGAG	This study
Pfl_5745(rnpA)-F	CAGGACTTCAGTCGGGAAAA	This study
Pfl_5745(rnpA)-R	GGGTGATCGAGATCGTTGTT	This study

*recT-F と ORF117-R の組み合わせで、*mpA5* 遺伝子を含んだ *ISPre1* が増幅される。上流・下流にアニールするプライマーセットであるため、他の *ISPre1* は増幅されない。

3-2-4. タイリングアレイ (Affymetrix 社) によるトランスクリプトーム解析

本研究で行った Affymetrix 社のタイリングアレイ解析の原理を Fig. 3-1 に示す。

＜ハイブリカクテル調製＞

作業の概要を Fig. 3-2A に示す。詳細な手順は補章 1 に記し、ここでは概要を述べる。3 株の pCAR1 保持株、非保持株をそれぞれ 0.1% (wt/vol) のコハク酸を含む 100 ml の NMM-4 液体培地に初期 OD₆₀₀ が 0.05 となるように植菌して 30°C、120 rpm で培養し、OD₆₀₀ を測定しながら、培養開始 2, 4, 6, 8 時間後に集菌した菌体より total RNA を抽出し、cDNA を合成

した。この際、actinomycin D を添加することで二次的 cDNA の合成を抑えた (Fig. 3-3)。この cDNA を断片化後、ビオチンラベルしてハイブリカクテルを調製した。

<用いた DNA チップ>

Affymetrix 社 (Santa Clara, CA) のカスタムタイリングアレイを、それぞれ 3 株の染色体塩基配列をもとに同社の Custom Express Array Program によって設計したものをを用いた。染色体 DNA の両鎖について 25 mer の DNA プローブが、KT2440 株で 1,110,578 本、PAO1 株で 1,141,680 本、Pf0-1 株で 1,175,336 本、11 塩基密度で敷き詰められている (Fig. 3-4A)。各プローブは perfect match (PM) と miss match (MM) で 1 組となっており、PM と MM のシグナルに有意に差が認められるとき“cDNA がハイブリしている”として検出する。

<検出後のデータ処理>

Affymetrix 社の Tiling Analysis Software ver.1.1.02 を用いて行い、前後 2 本のプローブと合わせた 3 本のプローブの中央値を、そのプローブのシグナル値とした (ソフトウェアの設定では Bandwidth=30)。シグナル値が 1 のプローブ (1 はシグナル値の最小値でハイブリが認められないことを示す) を除いた全プローブの中央値が 100 となるように標準化されている。

<各 ORF の代表値の算出>

フリー統計解析ソフト「R」を用いて、各株のアノテーション情報 (下の3-2-5参照) をもとに、各ORF内に入るセンス側プローブを抽出しそれらのシグナル値の中央値を計算し、そのORFの代表値とした (Fig. 3-4B)。「R」はver. 2.1.0またはver. 2.7.0を、筑波大学のCRAN (<http://cran.md.tsukuba.ac.jp/bin/windows/base/rpatched.html>) より日本語化パッチ済みのものをダウンロードして用いた。

3-2-5. 解析に用いたアノテーション情報

3宿主それぞれのアノテーション情報をPseudomonas Genome Database のWebサイト (<http://www.pseudomonas.com/>) よりCSV形式でダウンロードして使用した。3宿主のORF数 (rRNA, tRNA, small RNAを除いたもの) を示す。

Table 3-3. 3 宿主のアノテーション情報

菌株名	Ref Seq番号	リリース日	ORF数
<i>Pseudomonas putida</i> KT2440	NC_002947	2010 年 7 月 22 日	5350
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO1	NC_002516	2010 年 8 月 26 日	5571
<i>Pseudomonas fluorescens</i> Pf0-1	NC_007492	2010 年 7 月 22 日	5722

3-2-6. 3 宿主での保存性による ORF の分類

理化学研究所の新谷政己博士との共同研究によって行った。ある宿主の1個のORFのアミノ酸配列をクエリーとして、他の1宿主の全ORFのアミノ酸配列をデータベースとした

BLASTP検索を行ってE value $<10^{-20}$ のものがヒットした場合、データベースとした宿主にそのORFが“保存されている”とした。これを3宿主すべてのORFについて、すべての宿主の組み合わせについて行って、“3宿主に保存されたORF”“2宿主に保存されたORF”“その宿主固有のORF”に分類した。その結果はTable 3-5 に示す。例えば、KT2440株では3,538個のORFには他の2株にもE value $<10^{-20}$ でヒットするORFが存在することを意味する。

3-2-7. 転写パターンによる ORF の分類

岡山理科大学の原啓文講師との共同研究によって行った。TIGR MultiExperiment Viewer software (Saeed *et al.*, 2003) (TM4; <http://www.jcvi.org/cms/research/software/>より無償でダウンロードできる) を用いたquality threshold (QT) クラスタリングを行った。具体的には、まず pCAR1非保持株の4経時点と保持株の4経時点をつなげて8点のデータとし、64以下の値に関してはすべて64に変換した [64以下の値は64未満のシグナル値に関しては2連で行った場合の再現性が低いことがこれまでの実験で明らかになっている (Miyakoshi *et al.*, 2009; Shintani *et al.*, 2010; Shintani *et al.*, 2011) ため、64未満の値の変動が選抜に影響しないように]。このシグナル値を2を底とする対数変換し、pCAR1の保持により転写変動したもののみのシグナル値をTM4にインプットし、最大値が2、最小値が-2となるように標準化した。このデータを用いて、距離 (パターンの類似度の計算方法) に Euclidean distanceを用いたQT clusteringを行った。各ORFがどのクラスターに分類されたかは、Supplemental Table S3-1に示した。

3-2-8. 推定される機能による ORF の分類

各ORFの機能の推定には、Clusters of orthologous groups (COG) による分類を用いた。COGは全ゲノム解読済みの生物種のタンパク質 (ORFの翻訳アミノ酸配列) を同じ祖先タンパク質に由来すると考えられるものどうしをまとめ、それらのグループを機能別に分類したものである (Tatusov *et al.*, 1997)。具体的には、各株のアノテーション情報をもとにそれぞれのORFのCOG番号 (COG####という4桁の番号) をCOG (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/COG/>) のFTPサイトの全COG番号のリスト (<ftp://ftp.ncbi.nih.gov/pub/COG/COG/whog,03/05/2003>版) を用いてCOG code (アルファベット1文字) に変換した。各ORFのCOG codeはSupplemental Table S3-1に示した。Microsoft Excel 2007またはExcel 2010のピボットテーブル機能を用いて、各COG codeに割り当てられたORFの数を集計した。

3-2-9. 転写ユニットと転写開始点の推定

理化学研究所の新谷政己博士との共同研究によって行った。各宿主の転写ユニットをthe database of prokaryotic operons (DOOR; <http://csbl1.bmb.uga.edu/OperonDB/DOOR.php>) に基づいて決定した。推定転写開始点 [transcriptional start points (tsp)] の決定は、フリー統計解析

ソフトR (R Development Core Team, 2008) 上で自作プログラム (dynamic programming algorithm that for each chromosome strand separately, minimizes the cost function) (Shintani *et al.*, 2010) を用いて行った. 決定した転写開始点はIGB package (Affymetrix) を用いて可視化した RNAマップと比較して, 目視による確認・修正を行った. 決定した各ORFの転写開始点は Table S3-2に示した.

3-2-10. 転写開始点近傍の配列の *in silico* 解析

理化学研究所の新谷政己博士との共同研究によって行った. 転写開始点を+1として上流 200 bp〜下流50 bpの配列を抽出し, シグマ因子や既知の転写因子の結合サイトをEMBOSS (The European Molecular Biology Open Software Suite) (Rice *et al.*, 2000) を使用して検索した. 検索に用いた結合サイトをTable M3-5に示す. 各ORFについての結果はTable S3-2に示す.

Table 3-4. シグマ因子・転写制御因子の既知の結合サイト

名称	結合配列 (5' to 3')	許容するミスマッチ数
シグマ因子		
RpoD	TTGACCN _{16~18} TATAAT	3
RpoS	CTATACT	1
RpoN	[C/T]TGGCACGNNNNTTGC[A/T]	2
転写因子		
PvdS	TAAATN ₁₆ CGT	1
Fur	GATAATGATNATCATTATC	0
IHF	[A/T]ATCA[A/G]N _{4~6} TT[A/G]	0

N は ATGC いずれか 1 文字を表し, [C/T]は C か T かのいずれか 1 文字を表す. N_{16~18} は 16~18 文字の N を表す.

3-2-11. 定量 RT-PCR (qRT-PCR)

<サンプリング>

コハク酸を終濃度 0.1% (wt/vol) で含む 100 ml の NMM-4 液体培地に, 菌株を初期 OD₆₀₀ が 0.05 となるように植菌した. 30°C, 120 rpm で培養し, 適当な時間に培養液をサンプリングした. サンプリングした培養液は, RNA を安定化するため速やかに等量の RNAprotect Bacteria Reagent (QIAGEN) と混合した. その後の操作は添付のプロトコルに従い菌体を集菌し, RNA の抽出時まで-80°C で保存した.

(以降の詳細な手順は補章 1 に示す)

<total RNA の調製>

菌体からの RNA の抽出には, NucleoSpin^(R) RNA II キット (MACHEREY-NAGEL) を使用し, 添付のプロトコルを一部改変して行った. RQ1 DNase (Promega) を用いて DNA を分解

した後、NucleoSpin^(R) RNA Clean-up キット (MACHEREY-NAGEL) を用いて、RNA を精製した。

<cDNA 合成>

逆転写酵素には SuperScriptTM II (Invitrogen) を、プライマーには Random primer (Invitrogen) を、RNase 阻害剤として RNaseOUT (Invitrogen) を用い、サーマルサイクラーに PCR Thermal Cycler Dice Standard (Takara Bio, Shiga, Japan) を用いた。Total RNA 1 µg と Random primer 250 ng を計 11 µl となるように混合し、70°C で 10 分間変性させた後、25 °C で 10 分間静置した。SuperScriptTM II を終濃度 10 U/µl, RNaseOUT を終濃度 2 U/µl, ジチオスレイトールを終濃度 10 mM, dNTP を終濃度各 0.5 mM となるように追加し、添付の推奨バッファー濃度、合計 20 µl となるようにした。25°C で 10 分静置後、25°C で 60 分間、さらに 37°C で 60 分間静置して逆転写反応を行い、その後 70°C で 10 分間加熱することで酵素を失活させた。反応液に 1N NaOH を 6.67 µl 加えて 65 °C で 30 分間加熱し RNA を加水分解した後、1N HCl を 6.67 µl 加えて中和し、使用時まで -20 °C で保存した。

<定量 PCR (qPCR)>

用いた装置、反応系、反応サイクルは第 2 章に記述した方法と同じである。検量線の作成には、用いるプライマーの PCR 産物を pT7Blue T-vector (Novagen) にクローニングしたプラスミドを 100 pM~100 aM に 10 倍ずつ段階希釈して用いた。cDNA 溶液は 3~30 µg/µl に調製したものを 2 µl 用いた。16S rRNA の定量時には cDNA 溶液をさらに 100 倍希釈したものを 2 µl 用いた。

3-2-13. リボソームのプロファイリング

立教大学の河村富士夫教授との共同研究によってショ糖密度勾配遠心によるリボソームの分画及び定量を行った。手順の概要を Fig. 3-5 に示す。

- (1) コハク酸を唯一の炭素源とする培地で菌体を培養し、OD₆₀₀×培養液量 (ml)=100 となる培養液量を経時的に集菌 (4°C, 8000×g, 5 min) し、液体窒素で急速凍結させた後に -80°C で保存した。
- (2) 菌体を 3.5 ml の Buffer I [20 mM Tris-HCl (pH 7.6), 15 mM (CH₃COO)₂Mg, 100 mM CH₃COONH₄, 0.1 mM dithiothreitol (DTT), 2 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF)] に懸濁し、フレンチプレス (Aminco, 500 psi で 3 回) で破碎した。
- (3) 遠心分離 (4°C, 12000 rpm, 30 min) し、上清 (可溶性画分) を回収した。
- (4) 可溶性画分の吸光度を測定し、A₂₆₀=10 となる量をあらかじめ作製しておいたショ糖密度勾配 (10-40%) の上に重層し、超遠心 (4°C, 55,400 ×g, 17.5 hour) した。
- (5) Piston Gradient Fractionator (Bio Comp Instruments Inc., New Brunswick, Canada) と Bio-mini UV Monitor (ATTO Co., Tokyo, Japan) を用いて、ショ糖密度勾配の上層から下層を連続的に吸引し、連続的に 254 nm の UV 吸収を測定した。

3-3. 結果と考察

pCAR1 を保持すると宿主染色体トランスクリプトームにどのような変化が生じるのかを精査するため、コハク酸を唯一の炭素源とする液体無機培地で 3 種の pCAR1 保持株・非保持株をそれぞれ培養し、対数期～定常期まで経時的に高密度タイリングアレイを用いてトランスクリプトームデータを取得した。3 宿主の pCAR1 保持株と非保持株を比較することで、各宿主での pCAR1 を保持した際の変化を検出し、その変化が宿主間で共通なのか、それともある宿主特異的なものなのかを検討した。また、KT2440(pCAR1)株の pCAR1 上の NAPs 破壊株のデータ (Yun *et al.*, unpublished) も一緒に考察することで、KT2440 株において観察された pCAR1 の影響のうち NAPs を介するもの／介さないものを整理し考察を加えた。

3-3-1. pCAR1 を保持した際に転写変動する遺伝子の宿主間の比較

(1) pCAR1 を保持した際に転写変動する遺伝子の選抜

各菌株ゲノムのアノテーションに基づき、ORF 内のセンス側プローブの中央値をその ORF のシグナル値とした (Fig. M3-4B)。ORF のシグナル値を pCAR1 あり (縦軸) となし (横軸) のそれぞれの条件で、各遺伝子内部のプローブのシグナル値より計算した中央値をプロットした (Fig. 3-6)。トランスクリプトーム全体の傾向として、KT2440 株と PAO1 株では pCAR1 の保持によって転写変動する遺伝子の数は対数増殖期よりも定常期のほうが多くなる傾向が見られた。

3 株の経時的なデータから pCAR1 の保持によって変動している遺伝子 (転写時期が変わる、転写量が変わるなど何パターンか考えられる) を選抜する際の基準として、Camillo らの論文 (Camillo *et al.*, 2007) を参考に、①「pCAR1 あり」と「pCAR1 なし」の 2 系列のグラフの囲む面積 [以降 A(sum)と呼ぶ] (もし 2 系列がほとんど同じ形なら囲まれる面積は小さくなり、逆に 2 系列の形に違いがあればその間の面積は大きくなる) と②各時点での誘導倍率の最大値 [以降 d(max)と呼ぶ]、の 2 つを基準にした (Fig. 3-7)。まず、シグナル値をすべて底を 2 とする対数に変換した。この際、64 未満のシグナル値に関しては 2 連で行った場合の再現性が低いことがこれまでの実験で明らかになっている (Miyakoshi *et al.*, 2009; Shintani *et al.*, 2010; Shintani *et al.*, 2011) ため、64 未満の値の変動が選抜に影響しないように、すべて 64 (対数変換後は 6) にした。この変換後の値を用いて各 ORF の A(sum)と d(max)を算出した。3 株それぞれで、各 ORF の A(sum)と d(max)をプロットしてみると (Fig. 3-8)、両者に相関が見られた。

$A(\text{sum}) \geq 3$ または $d(\text{max}) \geq 1.5$ の ORF を“pCAR1 を保持した際に転写変動する遺伝子”と定義すると、KT2440 株で 1,240 個、PAO1 株で 241 個、Pf0-1 株で 92 個の ORF が抽出された (Supplemental Table S3-1)。抽出された ORF を、DOOR (Database of prOkaryotic OpeRons) (Dam *et al.*, 2007) に公開されている推定転写ユニットに重ね合わせたところ、pCAR1 を保持した際に転写変動した転写ユニットの数は、KT2440 株で 615 個、PAO1 株で 148 個、Pf0-1

株で49個となった。この数の大小関係は、pCAR1を保持した際の負荷がPf0-1株よりKT2440株で大きいことを示しており、pCAR1非保持株と混合培養した際にそれぞれの菌株が淘汰される速度がKT2440株>PAO1株>Pf0-1株であること (Fig. 3-9)(高瀬, 2012年東京大学修士論文) と一致している。

(2) pCAR1 を保持した際に転写変動する遺伝子の分類

各宿主でpCAR1を保持した際に転写変動した遺伝子の内容を比較するにあたり、抽出されたORFをいくつかの観点で分類した。

まず、宿主ごとに転写変動したORF (転写ユニット) の数が異なるのは、(i) ある宿主固有の遺伝子が転写変動しているためなのか、(ii) 3宿主に保存された遺伝子が宿主ごとに異なる変動をしているためなのかを調べるため、転写変動したORFを、BLASTP検索結果に基づいた保存性によって、3宿主に保存されたものとある宿主のみに存在するものに分類した (Table 3-5)。

次に、各ORFが転写プロファイルをどのように変化させたのかを知るため、QTクラスタリングを用いて、転写プロファイルの形による分類を行った。その結果、KT2440株で21個、PAO1株で11個、Pf0-1株で5個のクラスターに分類された (Fig. 3-10)。以降、各株のクラスターを、含まれるORFの数が多いものから順に、K1, K2, ..., A1, A2, ..., F1, F2, ... と呼ぶ。代表的なクラスターについて、タイリングアレイ解析とは独立のロットでより細かい経時点 (1時間おき) で用意したcDNAを用いて定量RT-PCRを行い、プロファイルの確認を行った (Fig. 3-11)。K3クラスターのように、タイリングアレイデータからは“本来ほとんど転写されていなかった遺伝子がpCAR1を保持すると一過的に発現するようになった”プロファイルに見えていたものが、細かく経時点を取った定量RT-PCRでは一過的な転写プロファイルがずれていたことが明らかになったものもあったが、おおむね各クラスターの転写プロファイルと一致した結果が得られた。

さらに、抽出されたORFにはどのような機能を持つものが多いのかを調べるため、各ORFをCOGで推定される機能ごとに23のグループに分類した。

以上、3つの観点で分類した結果をTable 3-6に示す。

また、同じクラスターに分類されたORFは共通の転写制御を受けている可能性があると考え、各ORFの推定転写開始点から、転写開始点の上流200 bp及び下流50 bpの合計250 bpの配列を用いて、シグマ因子や転写因子の既知の結合配列が存在するかどうかを調べた。その結果をTable 3-7にまとめる。以降の項で、上記分類に基づいて解析した結果を、順番に述べる。

(3) ある宿主固有の遺伝子に対するpCAR1の影響

pCAR1を保持した際に転写変動したORFの中で宿主固有のものの割合を計算してみると、Pf0-1株では35% (32/92 ORF) と全ゲノム中の宿主固有のORFの割合 (22%, 1279/5722)

よりも高い値を示した一方で、KT2440 株 [19% (241/1240), 23% (1216/5350)] と PAO1 株 [(24% (57/241), 26%(1462/5571))] では大きな差は認められなかった (Table 3-6). この理由は、以前の対数期 1 時点でのトランスクリプトーム比較 (Shintani *et al.*, 2010) でも検出されたように、Pf0-1 株では 1 箇所の推定プロファージ領域上の 30 個の ORF が pCAR1 を保持した際に転写誘導されているためで (Fig. 3-12), それらの ORF (Pfl01_1138-1140, Pfl01_1142-1164, Pfl01_1167, Pfl01_1169-1170, Pfl01_1172) は F1 クラスターに分類されている (Supplemental Table S3-1). クラスターごとに見てみると、宿主固有の ORF が多く含まれるのは、F1 (63%) の他に、KT2440 株の K6 (39%), K7 (94%), K12 (50%), K14 (83%), K18 (63%), 及び PAO1 株の A4 (63%) であった (Fig. 3-13). K12 と K18 に含まれる ORF には hypothetical protein をコードするものが多かった一方で、K7, K14, A4 及び F1 は推定プロファージ領域 (dos Santos *et al.*, 2004; Fouts, 2006; Kulasekara & Lory, 2004) 上に位置する ORF が、K6 は外来遺伝子領域上 (dos Santos *et al.*, 2004) に位置する ORF が多かった. pCAR1 もまた宿主細胞にとって外来 DNA であることを考えると、これらの外来 DNA に由来する領域は新たな外来 DNA の存在を感知して異なる宿主で似た挙動をしているのかもしれない.

(4) 転写変動した遺伝子の内容は KT2440 株と PAO1 株の組み合わせで最も類似している

pCAR1 によって転写変動した ORF の中で 3 宿主に保存されたものの数は、KT2440 株で 879 個、PAO1 株で 161 個、Pf0-1 株で 42 個であった (Table 3-6). これらの包含関係をベン図に示す (Fig. 3-14). これらの中で 3 宿主に共通で抽出されたものは 4 個であった (Table 3-8). そのうち 2 個は 30S リボソームタンパク質の遺伝子を含む同一の転写ユニットに属しており、残りの 2 個は酢酸代謝に関わる遺伝子であった.

それぞれの菌株で固有に転写変動していたものの割合は、KT2440 株で 88% (775/879 ORF), Pf0-1 株で 74% (31/42 ORF) であったのに対し、PAO1 株では 37% (60/161 ORF) しかなかった. これは、PAO1 株の 161 個の中で 95 個は、相当する KT2440 株のオルソログが共通に転写変動しているためである (Table 3-9). 他の宿主の組み合わせでは、KT2440 株の 8 個と Pf0-1 株の 6 個が共通に転写変動するオルソログであり (Table 3-10), PAO1 株と Pf0-1 株の組み合わせでは PAO1 株の 2 個と Pf0-1 株の 1 個が共通に転写変動する組み合わせであった (Table 3-11). このことから、pCAR1 に対する転写変動の内容は KT2440 株と PAO1 株で最も似ていることが読み取れる. 3 株共通、または KT2440 株と PAO1 株で共通に転写変動した遺伝子の内容を見てみると (Table 3-8, Table 3-9), TCA サイクル及びその近傍の代謝経路の遺伝子が多い. これは、pCAR1 を保持した際に一次代謝系が転写レベルで影響を受けていることを意味し、Phenotype MicroArray 解析 (第 2 章) において TCA サイクルとその周辺の代謝経路の化合物を C 源として与えた際に pCAR1 保持株/非保持株間で代謝機能が変化していたことと一致している. 一方で、KT2440 株と Pf0-1 株で多くの保存された ORF が宿主特異的に転写変動していたことから、この 2 株間の違いは (i) 宿主固有の ORF が転写変動するためだけでなく、(ii) 3 宿主に保存された ORF が宿主固有に転写変動されるため

でもあることが分かる。

(5) pCAR1 を保持した際の転写変動は対数期よりも定常期で大きい。

QT クラスタリング解析の各クラスターの転写プロファイルを検討すると、対数期から定常期への移行期 (transition) に転写変動しているものが多い (Fig. 3-10)。例えば、KT2440 株のクラスターについて 6 h で誘導または抑制されたかどうかだけに着目して見てみると、K1 は誘導、K2 も誘導、K3 も誘導、K4 は抑制、とこの 4 つのクラスターはすべて移行期で転写変動したものとと言える。K5 や K6 のように 6 h での転写が変化していないものももちろん存在するが、このように 3 株のクラスターを俯瞰すると、多くのクラスターが移行期で転写変動したクラスターと言える。このことは、定常期への移行に絡んだイベントが pCAR1 を持つことによって影響を受けたことを想起させた。そこで、まず第一に、大腸菌と枯草菌において定常期に入る際に形成されることが知られている二量体化したリボソーム (100S リボソーム, Fig. 3-15) の検出・定量を試みた。しかし、予想に反して本研究に用いた *Pseudomonas* 細菌 3 株ではいずれも 100S リボソームの形成が検出できなかった (Fig. 3-16)。大腸菌で 100S リボソーム形成に関わるタンパク質は RMF, HPF, YfiA の 3 つが知られている (Fig. 3-17)。RMF と HPF はそれぞれ 100S リボソーム形成に必須であるが、YfiA は HPF のパラログでありながら 100S リボソーム形成を阻害する (Fig. 3-17)。YfiA はリボソームを 70S リボソームのままで定常期の菌体内で保存する働きをしていると考えられている (Fig. 3-17)。本研究で用いた *Pseudomonas* 属細菌 3 株にはいずれも RMF と HPF は保存されている (Fig. 3-18, Fig. 3-19) が、YfiA は保存されていない。タイリングアレイデータから、3 株の RMF ホモログと HPF ホモログはそれぞれ大腸菌の RMF, HPF と同様に対数期後半から定常期初期にかけて強く誘導され、推定転写開始点付近に SD 配列と相同性の高い配列が存在する (Fig. 3-20, Fig. 3-21) ことから翻訳されている可能性も高い。RMF ホモログと大腸菌の RMF とのアミノ酸配列の同一性はそれぞれ 49% (KT2440), 51% (PAO1), 49% (Pf0-1) であり、HPF ホモログと大腸菌の HPF とはそれぞれ 53% (KT2440), 53% (PAO1), 51% (Pf0-1) で、アラインメントをとってみても保存性が高いと言える (Fig. 3-22)。以上の状況をふまえると *Pseudomonas* 属細菌で 100S リボソームが観察されない原因としては、(1) RMF ホモログが (大腸菌 RMF との高い相同性にも関わらず) 機能を失っている可能性、(2) HPF ホモログが (HPF オルソログであるにも関わらず) YfiA 様の機能を獲得し 100S リボソーム形成を阻害している可能性が考えられる。しかし、本研究とは目的を異にする解析となるため、この仮説の検証は行わないことにした。

次に、定常期に入る際に転写誘導されるシグマ因子である RpoS (Yuste *et al.*, 2006) に着目した。*P. aeruginosa* において *rpoS* を破壊すると、炭素飢餓や浸透圧ストレスへの感受性が高まることも示されている (Jørgensen *et al.*, 1999; Suh *et al.*, 1999)。*rpoS* 遺伝子が pCAR1 によって転写変動した ORF として抽出されたのは Pf0-1 株のみであったが、生データを参照すると KT2440 株と PAO1 株でも定常期に転写が抑制されていた (Supplemental Table S3-1)。

転写開始点付近の配列の *in silico* 解析結果を参照すると、K4, K8, K9, A2, A7, F2 及び F3 に推定 RpoS 結合サイト (5'-CTATACT-3') が多く見いだされた (Table 3-7). これらのクラスターの転写プロファイルと比較してみると、K4 と A2, K9 と A7 は類似したパターンを示しており (Fig. 3-23), これらのクラスターに含まれる ORF の転写調節機構も類似している可能性が示唆された. Pf0-1 株では他の 2 株に比べて多くの RpoS 結合サイトが見いだされたことは、Pf0-1 株の RpoS レギュロンが pCAR1 の存在によって転写変動されたことを意味するかもしれない.

以上の結果を考慮すると、pCAR1 を保持すると対数期から定常期への移行に影響が出て、宿主細胞の生理学的性質や代謝状態が変化するのではないかという仮説を立てた.

実際、運動性に関わる遺伝子 (COG code N) は特定のクラスターに集中してはいないものの、3 宿主それぞれで抽出されており、転写プロファイルは移行期で転写変動している (Table 3-8). KT2440 株では、モーターと分泌装置をコードすると推定される ORF が pCAR1 を保持した際に転写誘導されていた一方で、hook や filament をコードすると推定される ORF は移行期に転写抑制されていた (Table 3-12). PAO1 株と Pf0-1 株でも、抽出された ORF の数は KT2440 株と比べてかなり少ないものの同様の傾向が見られた. pCAR1 を保持した際に 3 宿主共通に運動性が低下することは以前に示されており (Fig. 3-24)(高橋, 2009 年東京大学修士論文), この一連の転写変動がその原因の一つとなっているかもしれない.

(6) pCAR1 を保持した KT2440 株と PAO1 株では多くの遺伝子が定常期に入る際に抑制されない.

A1 クラスターに分類された 90 個の ORF のうち、84 個は 3 宿主に保存された ORF であり、そのうち 64 個の KT2440 株でのオルソログは K1 クラスターに分類されていた. K1 と A1 の転写プロファイルは似ている (Fig. 3-23) ことから、これらは pCAR1 を保持した際に共通の反応を示していると推測された. これらのクラスターに含まれる ORF は、本来対数期に盛んに転写され定常期に入ると完全に抑制されるが、pCAR1 を保持した際には定常期に入っても完全には抑制されず、若干転写が「続く」というプロファイルを示した. 機能に着目すると、これらの 64 個の ORF のうち 42 個は COG で J (translation, ribosomal structure and biogenesis) に分類されており、11 個は C (energy production and conversion) に分類されている. 各 ORF がコードするタンパク質としては、ribosomal proteins (*rps*, *rpl*), F-type ATPase (*atp*), RNAP core (*rpo*), succinate dehydrogenase (*sdh*) 等の生命活動の維持に不可欠なものが多く含まれており、これらの ORF が定常期に入っても転写され続けているということからも、pCAR1 を保持することで対数期から定常期に入る際の転写の切り替えが鈍くなっているのではないかという先ほどの仮説が裏付けられる. 一例として、3 株共通に保存された RNAP core とリボソームタンパク質の遺伝子が集まった領域の生データを示す (Fig. 3-25). pCAR1 を保持しない株では培養開始 6 h・8 h (移行期～定常期) でほとんど転写が認められないが、pCAR1 を保持した KT2440 株と PAO1 株では 8 h でも完全には転写が抑制されてい

ないことがわかる。この傾向は、より経時点を細かくとり、8 h以降~24 hまでを対象とした定量 RT-PCR 解析においても確認された (Fig. 3-11, K1 及び A1 参照)。

(7) 3 宿主に保存されている遺伝子でも KT2440 株のみで転写変動しているものが多くある。

K1 クラスターに含まれる 639 個の ORF のうち、539 個は 3 宿主で保存された ORF であったが、そのうち 463 個は KT2440 株のみで抽出されていた。その内容としては、RNA 分解(*rne*, *pnp*), aminoacyl-tRNA の合成 (*glyS*, *ileS* 等), DNA 複製 (*dna*, *pol*, *lig*) に関わる ORF が含まれており (Table 3-13, Table 3-14, Table 3-15), pCAR1 を保持しない株に比べて KT2440 株では転写・翻訳・DNA 複製等が活性化していることがあらためて示唆された。

K2 クラスターには pCAR1 を保持すると生育段階に関わらず 4 経時点すべてで転写誘導される遺伝子が分類された。PAO1 株と Pf0-1 株では K2 と同じ転写プロファイルを持つクラスターは認められなかったことから、KT2440 特異的な転写変動の一つである。実際、K2 クラスターの 98 個の ORF の中で 60 個は 3 宿主で保存された ORF であるが、そのうち 58 個は KT2440 のみで転写変動していた。また、d (max) と A(sum) の値が大きい遺伝子が並んでいることも K2 クラスターの特徴である。上流配列の解析からはこれらの ORF に共通した特徴は見いだせなかったが、これらの ORF が恒常的に転写されていることが pCAR1 を保持した KT2440 株が他の pCAR1 保持株より大きな負荷を受ける原因の一つとなっている可能性がある。

3-3-2. pCAR1 上にコードされた Pmr の関与の検討

pCAR1 上には Pmr, Pnd, Phu の 3 種の NAPs がコードされているが、中でも Pmr に関しては当研究室において遺伝子レベル・タンパク質レベル両方で詳細な機能解析が行われてきた (Suzuki *et al.*, 2011; Yun *et al.*, 2010)。pmr を完全に除去した KT2440(pCAR1)株を、本研究と同じ培養条件で実施した対数期 (4 h) と定常期 (8 h) のタイリングアレイデータが既に取得されている (Yun *et al.*, unpublished data)。そこで、このデータを用いて 3-3-1 で検出した KT2440 株が pCAR1 を保持した際の様々な転写変動を、Pmr が深く関与するものと、関与の程度が低いものに分類することにした。

(1) pmr の破壊によって転写変動した遺伝子の選抜と分類。

まず KT2440(pCAR1)株と pmr 破壊株の比較を行って、Pmr を除去した際に転写変動する遺伝子を選抜することにした。pmr を破壊した KT2440(pCAR1)株のデータは 2 時点であり 3-3-1 のような転写プロファイルの類似度による選抜が行えないため、各時点で KT2440(pCAR1)株と比べて誘導倍率が 2 倍以上変化した ORF を、“Pmr の除去によって転写変動した遺伝子”とみなすことにした。2 経時点のデータから転写変動のプロファイルを把握するため、各時点での転写変動が (ア) 誘導 (pmr 破壊株/野生株=d とおくと、 $d \geq 2$)、(イ)

抑制 ($d \leq 2$), (ウ) 変動しなかった ($0.5 < d < 2$), のいずれであるかで分類し, 2つの経時点で $3 \times 3 = 9$ 通りに分類した. その結果を Table 3-16 の一番下の行に示した. 2 経時点とも Pmr の除去による変動が見られなかった遺伝子は 3,435 個であるから, 対数期または定常期の最低片方で転写変動した遺伝子は 1,951 個 ($=5,386 - 3,435$) で, これは全 ORF の 32% にのぼる. 各時点ごとに見ると, 対数期で誘導されたものが 362 個 ($=186 + 126 + 50$), 対数期で抑制されたものが 294 個 ($=39 + 175 + 80$), 定常期で誘導されたものが 1,202 個 ($=80 + 1,072 + 50$), 定常期で抑制されたものが 448 個 ($=39 + 223 + 186$) であり, 対数期よりも定常期のほうが Pmr を除去した影響が現れることが読み取れる. この傾向は, ウェスタンブロットによる Pmr の発現プロファイル解析 (Yun *et al.*, 2010) において, 対数期にも発現が認められるが定常期にさらに発現量が増加することと一致する. 以前に, 本研究と同じ培養条件の対数期 1 時点で KT2440 株と, KT2440(pCAR1) 株, 及び *pmr* 破壊株 (カナマイシン耐性遺伝子を挿入することで破壊したもので今回用いた遺伝子全長を完全に除去したものとは異なる) のトランスクリプトーム比較が行われているが (Yun *et al.*, 2010), 今回のデータ解析では定常期のデータも用いて Pmr の除去によって転写変動した遺伝子を選抜・分類することで, 以前は検出されなかった変動を検出することができたと言える.

(2) pCAR1 の保持によって転写変動した遺伝子との重ね合わせ.

前項において Pmr の除去に伴ってどのように転写変動したかで分類した ORF を, pCAR1 を保持した際に転写変動したかどうか [3-3-1 の KT2440 株と KT2440(pCAR1) 株の比較において選抜された 1,240 個の ORF に含まれるかどうか] でさらに分類した (Table 3-16, I, II 行). まず, pCAR1 を保持した際に転写変動した 1,240 個の ORF から見ると, Pmr を除去した際に転写変動が見られなかったものは 578 個であり, 約半数 (47%) は Pmr を介さずに pCAR1 を保持した影響を受けたといえることができる. また, Pmr を除去した際に転写変動した 1,951 個の ORF から見ると, pCAR1 の保持によっても転写変動したものは 662 個であり, 約 3 分の 2 にあたる 1,289 個 ($=1,951 - 662$) に pCAR1 を保持した際には転写変動が見られなかったことは, 以前の対数期での比較 (Yun *et al.*, 2010) において Pmr の破壊にともなって転写変動した 159 個の ORF のうち, 140 個 (Fig. 1-4, G+H のグループの合計) は pCAR1 を保持した際には転写変動しなかったことと同様の傾向であると言える.

また, 全 ORF に占める pCAR1 を保持した際に変動した ORF の割合 (1,240/5,386, 23%) に比べて, 対数期で抑制され定常期で抑制・または変動しなかったグループ (Table 3-16, i, ii 列) と, 対数期には誘導・または変動なしで定常期に誘導されるグループ (Table 3-16, vi, ix 列) は高い割合を示しており, Pmr を除去すると対数期に抑制されるもの (対数期に Pmr が誘導しているもの) と定常期に誘導されるもの (定常期で Pmr が抑制している) は pCAR1 を保持した際にも転写変動したものが多くことが読み取れる.

(3) クラスターごとの Pmr の関与の検討

pCAR1 を保持した際に転写変動した ORF 1,240 個 (Table 3-16, I 行) を、3-3-1 で行った KT2440 株と KT2440(pCAR1)株での転写プロファイルによる QT クラスタリングの結果 (Fig. 3-10) で分類し、その上で Pmr を除去した際の転写変動の仕方 (9 通り) で分類した (Table 3-16). この結果を用いて、各クラスターが示す pCAR1 を保持した際の転写変動について、その変動が Pmr を介したもののなのか、Pmr の関与の度合いを検討した。

まず、各クラスターに属する遺伝子の数に対して Pmr を除去した影響が見られない遺伝子の数の割合が多いクラスターは、pCAR1 を保持した影響を受ける際に Pmr が関与しない遺伝子が多く集まったグループであると考えられる。具体的には、pCAR1 によって転写変動した遺伝子全体での割合 (578/1,240, 47%) よりもかなり高い割合を示す K2 (80/98, 82%), K5 (39/53, 74%), K7 (28/30, 90%), K10 (22/24, 90%), K15 (11/12, 92%) が挙げられる。逆に、割合の低い K1 (227/639, 36%), K4 (4/69, 6%), K6 (12/31, 39%), K8 (8/24, 33%), K9 (6/24, 25%), K12(6/20, 30%) などは転写変動に Pmr が関与する遺伝子が集まっていると考えられる。以下、機能ごとに関連するクラスターをまとめて議論する。

・対数期から定常期への移行が不完全になる傾向は Pmr を除去するとより亢進される

pCAR1 を保持した際にも Pmr を除去した際にも転写変動した 662 個の ORF のうち、391 個 (59%) は定常期に Pmr によって抑制されている。391 個のうち、356 個 (91%) が K1 クラスターに分類されている。K1 クラスターは 3 宿主の中で KT2440 株と PAO1 株に見られた、“本来定常期に転写が抑制される遺伝子が pCAR1 を保持すると定常期に入っても転写が完全に抑制されないようになる”という転写プロファイルを示すクラスターであり (Fig. 3-23), pCAR1 を保持する KT2440 株において Pmr はこの抑制を促す (pCAR1 による転写変動を抑える) 方向に機能しているが、pCAR1 を持たない時と比べると完全には抑制しきれていないことが読み取れる (Fig. 3-26)。

一方で、定常期の主要なシグマ因子である RpoS の推定結合サイトが多く検出された K4, K8 クラスターについても Pmr の関与が大きいと推定されている。K4 は“本来定常期に誘導される遺伝子が pCAR1 を保持すると完全に誘導がされなくなる”という転写プロファイルを示すクラスターであるが (Fig. 3-23), K4 に含まれる全 69 個の ORF のうち、55 個 (=2+20+33) が Pmr によって定常期に誘導されていることから、Pmr はこれらの誘導を促す方向に機能しているが、やはり完全には誘導しきれていないことが読み取れる (Fig. 3-26)。K8 は“本来は対数期初期 (2 h) をピークとして以降はほとんど転写が見られない遺伝子が pCAR1 を保持すると対数期中期 (4 h) まで転写が続くという”という転写プロファイルを示すクラスターであるが、K8 に含まれる全 24 個のうち 13 個 (=7+8) は Pmr によって定常期に抑制されていることから、やはり“Pmr が pCAR1 を保持する前の転写プロファイルに戻そうとする方向に働いているが完全には戻しきれていない”ことが読み取れる。

以上の傾向から、“Pmr は pCAR1 を保持した際に生育段階に応じた転写の切り替えが不

完全になる変化を抑える働きをしているが、完全には抑えきれていない”とまとめることができる。

・外来遺伝子領域・プロファージ領域の転写誘導への Pmr の関与

Pmr の染色体上のホモログである MvaT および大腸菌での機能的ホモログである H-NS は比較的 G+C 含量の低い外来遺伝子領域に結合して転写を抑制することが報告されている。外来遺伝子領域上 (dos Santos *et al.*, 2004) に位置する ORF を多く含む K6 に着目すると、約 60% の ORF が Pmr の除去によって転写変動している。しかし、各 ORF のシグナル値を参照すると、外来遺伝子領域 (PP_3776~PP_3788) は対数期 (4h) をピークとして定常期には抑制されるプロファイルを持つが、Pmr を除去すると対数期でのシグナル値が低下することから Pmr によって対数期に誘導されている。このことは Pmr が、外来遺伝子領域を抑制する染色体上の MvaT とは異なる機能を持つ可能性を示唆する。推定プロファージ領域 (dos Santos *et al.*, 2004) 上に位置する ORF を多く含む K7, K14 に着目すると、K7 は Pmr を除去しても転写変動しない ORF の割合が非常に多く、K14 もクラスター全体としては半数は Pmr の関与が認められるものの、ファージ由来 ORF (PP_3873, PP_3876, PP_3878, PP_3882, PP_3883) 自体には Pmr を除去した影響はほとんど見られなかった。

・Flagella 関連遺伝子の転写変動には Pmr の関与は小さい

Flagella 形成に関わる遺伝子はいくつかのクラスターに分散しているが (Table 3-8), K10 と K15 には比較的多くの遺伝子が集中している。この 2 つのクラスターの転写変動に Pmr を除去した影響が少ないことから、pCAR1 を保持した際の flagella 形成に関わる遺伝子群の転写変動には Pmr の関与は少ないと考えられる。これは、*pmr* を破壊した KT2440(pCAR1) 株の運動性は KT2440(pCAR1) 株と比較して差が見られないこと (Fig. 3-27) (武田, 2011 年博士論文) と一致する。

以上述べたように、転写変動に Pmr が関与する遺伝子の転写パターンは定常期に抑制されるものだけではなく、定常期に誘導されるもの、対数期に誘導されるものなど様々であったが、これは、Pmr が他の NAPs と協調的・競合的に遺伝子の転写制御に関わるからであると解釈できる。例えば、大腸菌において定常期に誘導される NAPs である Dps の遺伝子の転写は、対数期特異的な NAPs である Fis、定常期特異的な NAPs である IHF、恒常的な H-NS、の 3 つの NAPs によって制御されている (Fig. 3-28)。対数期には RpoD と Fis の複合体によって RpoS がプロモーターに接近できないが、細胞内 Fis 量が減少すると RpoD との複合体が形成されず、RpoS はプロモーターに結合できるようになる。この例では、RpoD と RpoS の転写プロファイル及び細胞内量が変化しなくても、NAPs の量や転写プロファイルの変化によって RpoS レギュロンの転写が変化する。3-3-1 項の考察では定常期の主要なシグマ因子である RpoS レギュロンの誘導が遅れていることに着目したが、KT2440 株と

PAO1 株で *rpoS* 自体は転写変動した遺伝子として選抜されなかったのは、このような理由かもしれない。