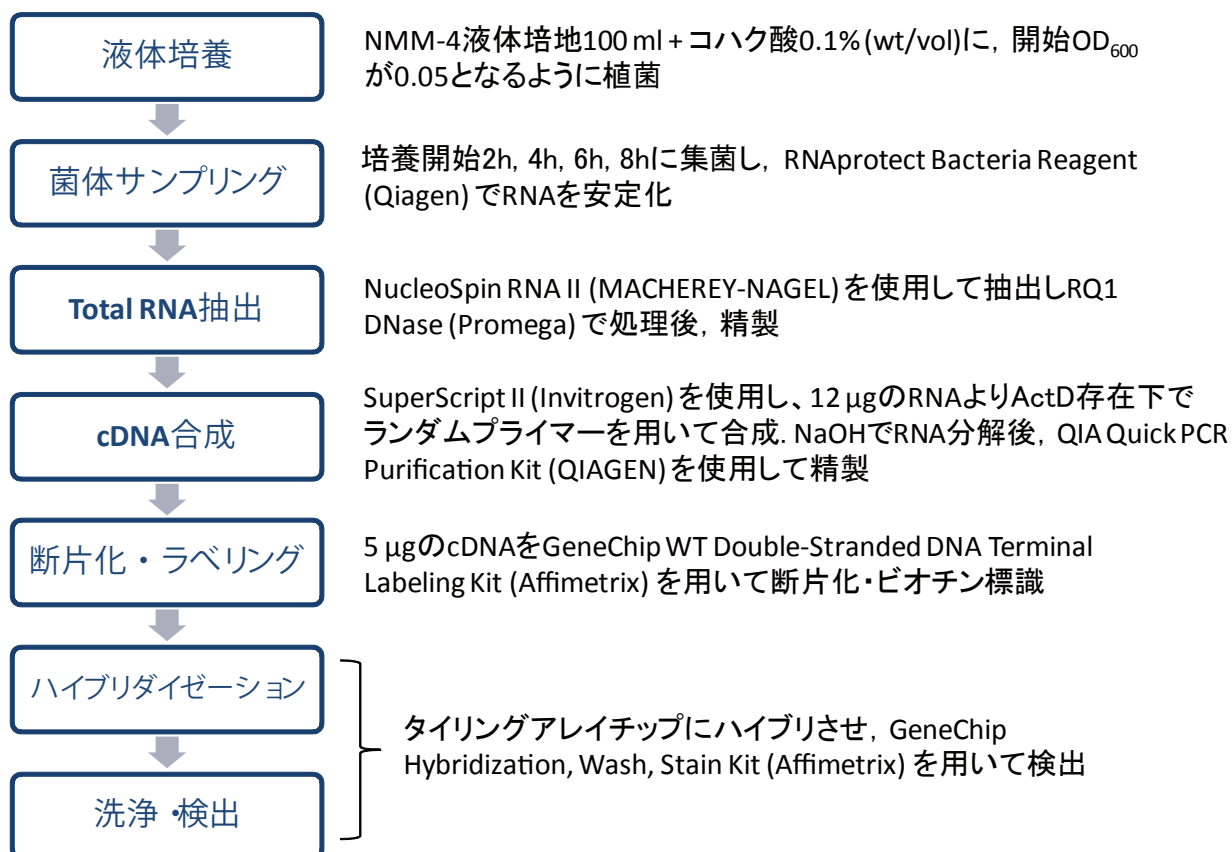


Fig. 3-1. 本研究で採用したアレイ解析の原理.

Total RNA より逆転写反応によって cDNA を合成する際, dNTP に加えて dUTP も少量添加しておく. すると, RNA 上で A (アデニン) であった位置の一部に U (ウラシル) が取り込まれる. この cDNA を UDG と APE1 で処理すると, U の位置で特異的に切断されて断片化される. この断片化 cDNA をビオチンでラベルし, アレイチップにハイブリ後, ストレプトアビジンとビオチン標識アビジン抗体で検出する.

(A)



(B)

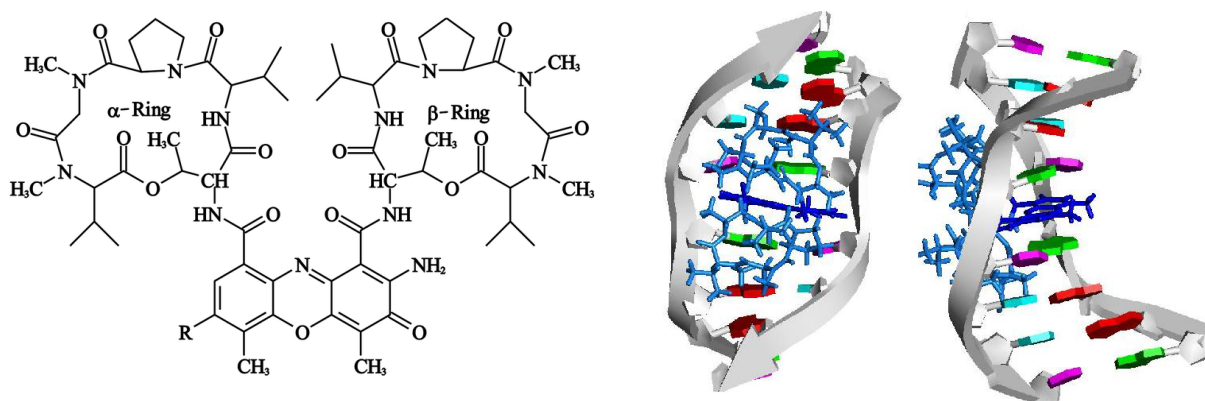


Fig. 3-2. サンプリング～データ取得までの手順の概要 (A) と actinomycin D (B).

(A) 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 (ActD) を添加することで二次的 cDNA の合成を抑えた。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。(B) ActD の構造式と NMR によって取得された DNA (5' -GAAGCTTC-3') との複合体構造を示す [Lian *et al.*, 1996 (PDB: 1DSC)]. ActD は DNA のデオキシグアノシンに結合して、DNA の複製や転写を阻害する。

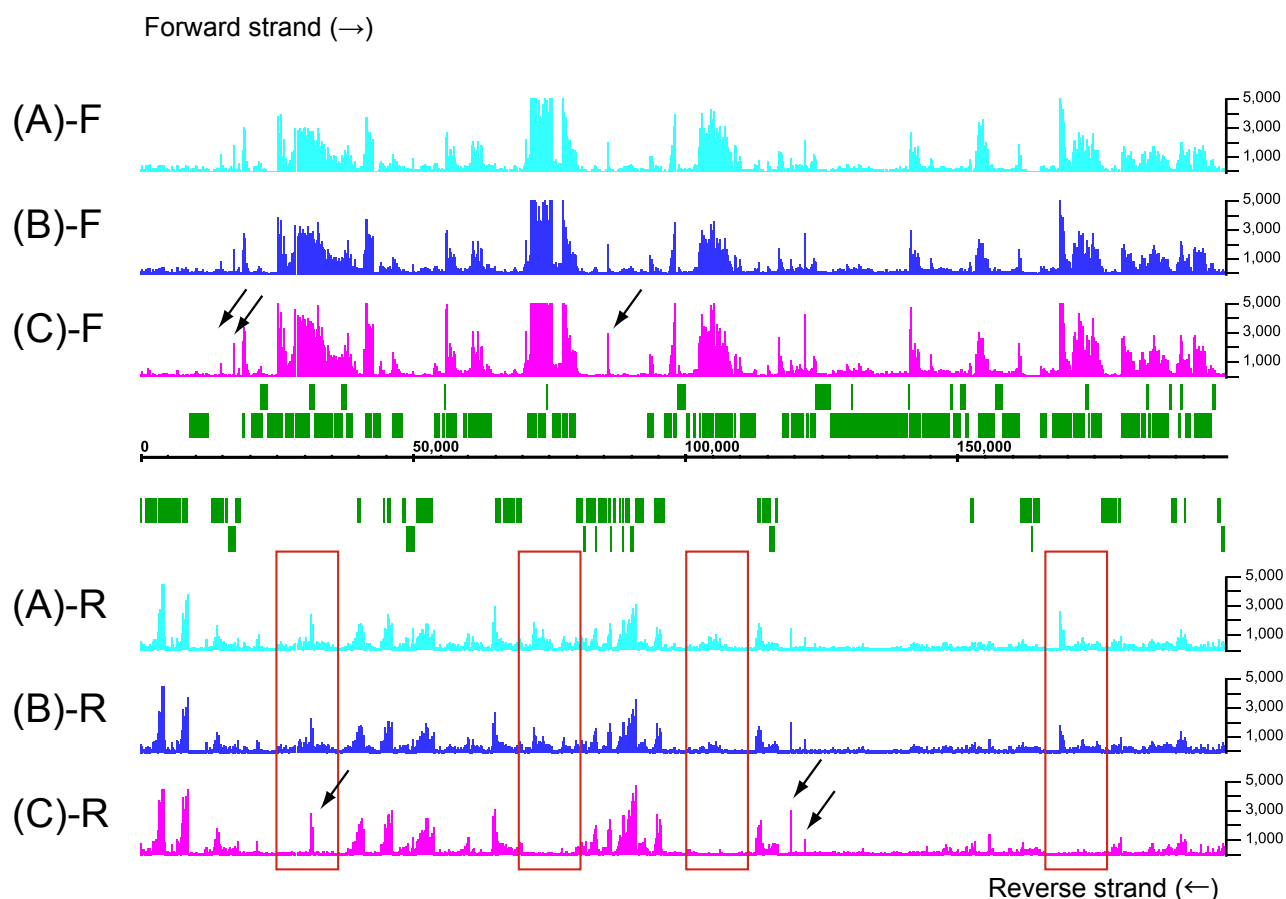


Fig. 3-3. 逆転写反応系への actinomycin D (ActD) 添加の効果 (高橋, 2009 年東京大学修士論文). *P. putida* KT2440(pCAR1) 株のコハク酸培養, 培養開始 4 時間後の total RNA を用意し, 同一の RNA サンプルから ActD 非添加 (B) / 添加 (C) で cDNA を合成し, それぞれを pCAR1 の全塩基配列が搭載されたカスタムタイリングアレイ (Affymetrix) にハイブリさせた. 結果の RNA マッピング図を, 以前の研究 (Shintani *et al.*, 2010) で ActD 非添加で取得されたデータ (A) とともに示す. 図中央の x 軸は pCAR1 の約 200 kb の塩基配列, y 軸は各プローブの示したシグナル値の大きさをそれぞれ表しており, 緑長方形はアノテーションされた ORF の大きさを表す (複数の ORF がつながって 1 つに見えるものもある). x 軸より上にあれば向かって左から右へ, 下にあれば向かって右から左へ転写される. ActD 添加によりアンチセンス側のシグナル値が顕著に減少した領域を赤枠で囲んで示す. ActD 非添加とほとんど変化が見られないシグナルを矢印で指し示す.

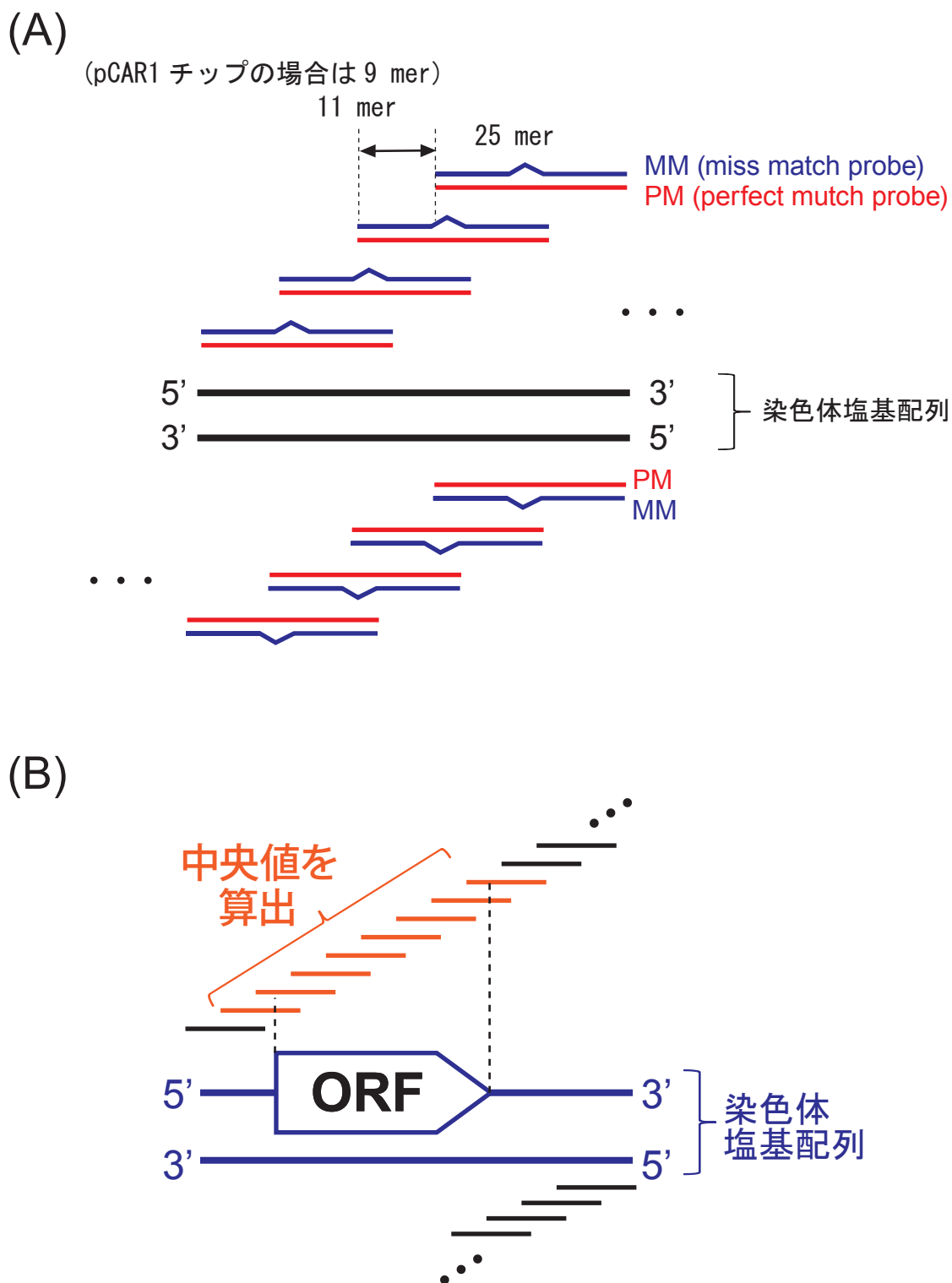


Fig. 3-4. カスタムタイリングアレイ上のプローブの並び方.

(A) 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. 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. (B) 各プローブのシグナル値を標準化した後, 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.

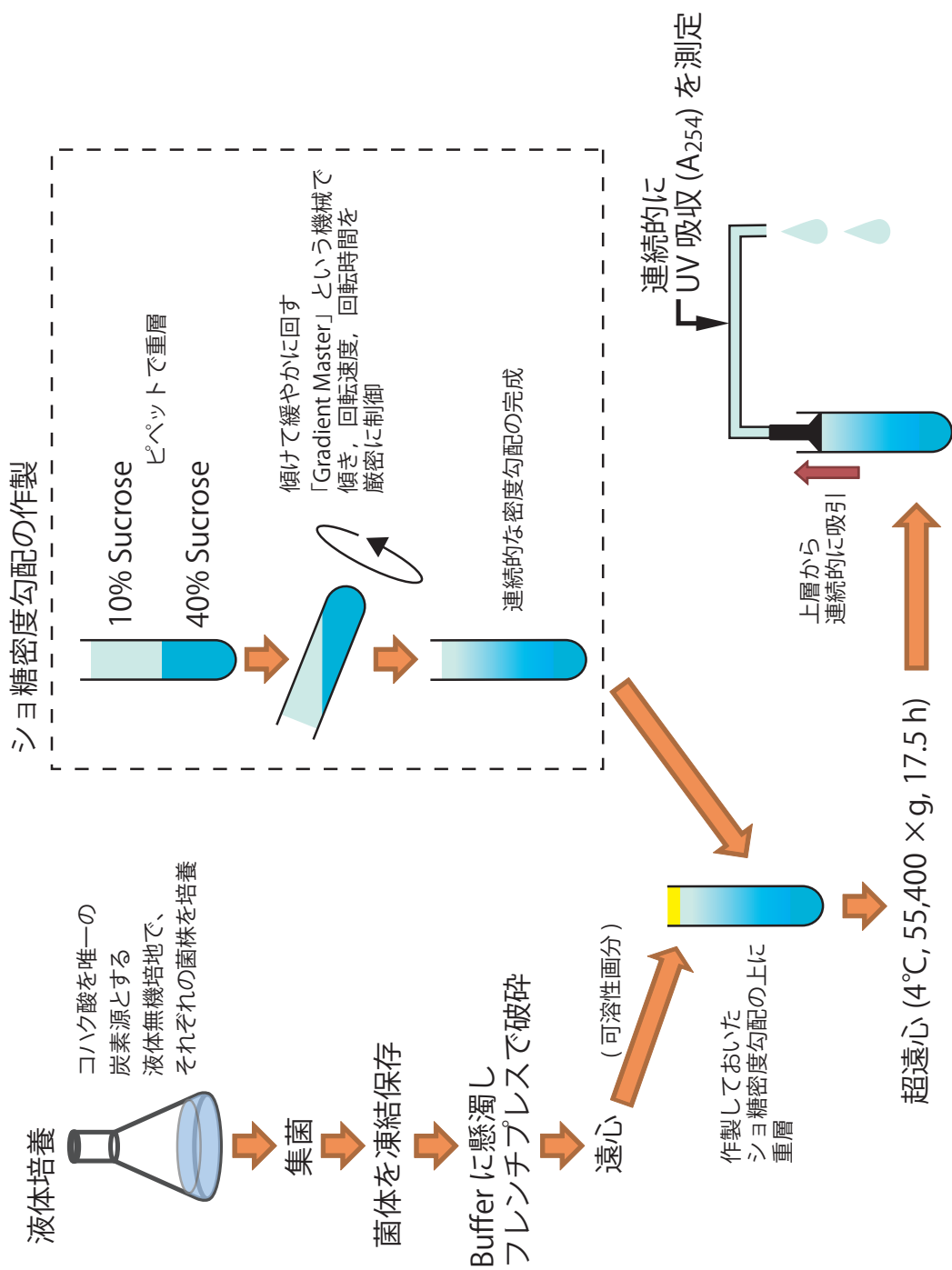


Fig. 3-5. シヨ糖密度勾配遠心によるリボソームのプロファイリングの概要.

菌体を破碎する際に用いた buffer とシヨ糖密度勾配の作製に用いた buffer は同じ組成で、20 mM Tris-HCl (pH 7.6), 15 mM (CH₃COO)₂Mg, 100 mM CH₃COONH₄, 0.1 mM dithiothreitol (DTT), 2 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF) である.

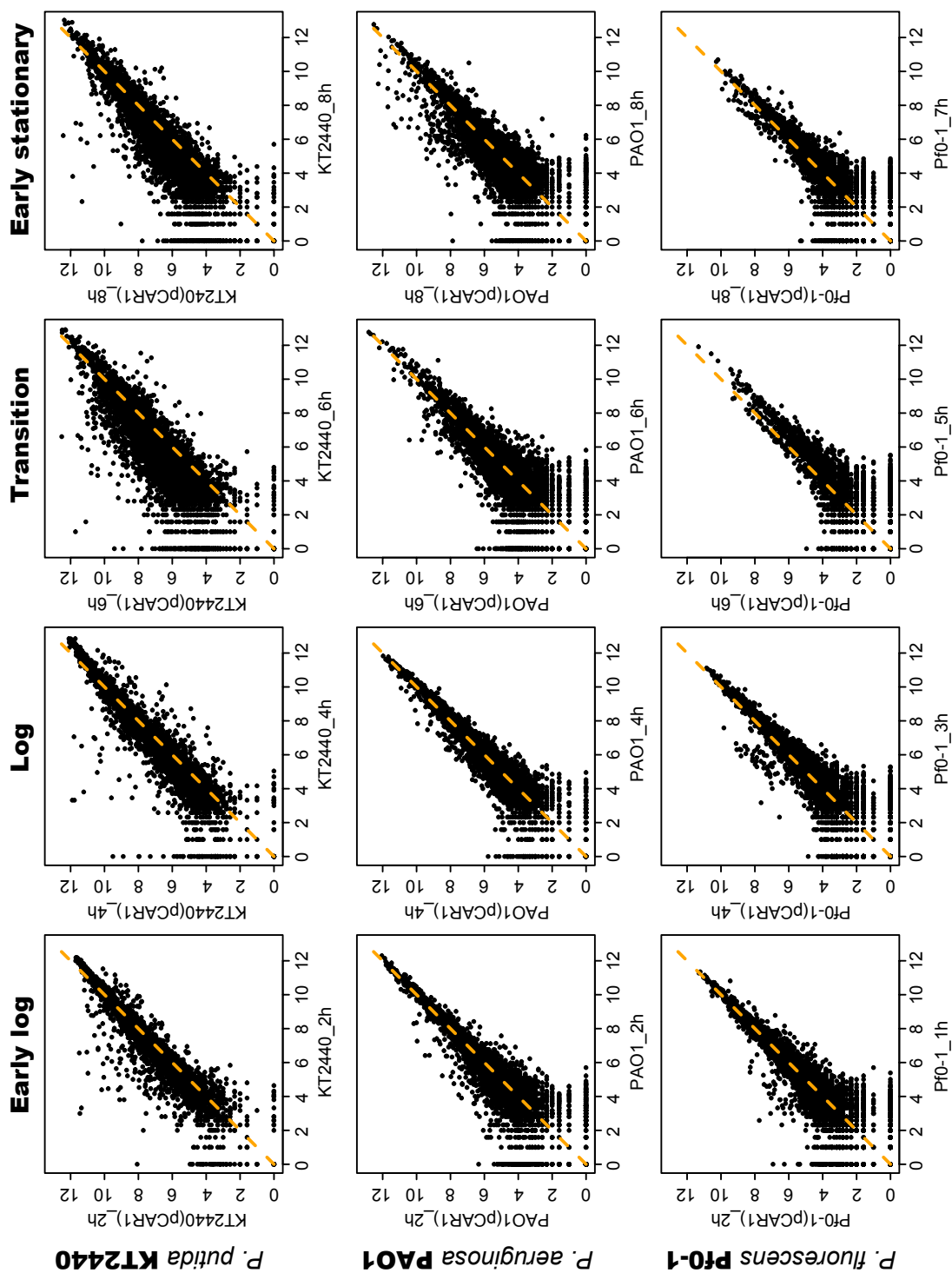


Fig. 3-6. pCAR1 を保持した際の 3 宿主の各経時点での転写変動.

pCAR1 あり (縦軸) となし (横軸) のそれぞれの条件で、各 ORF の代表値 (ORF 内に含まれるセンス側プロブの中央値) をプロットした散布図。軸は底を 2 とする対数目盛になっている。各軸に付したラベルは、例えば「KT2440_2h」ならば、KT2440 株の培養開始 2 時間後のデータであることを意味する。

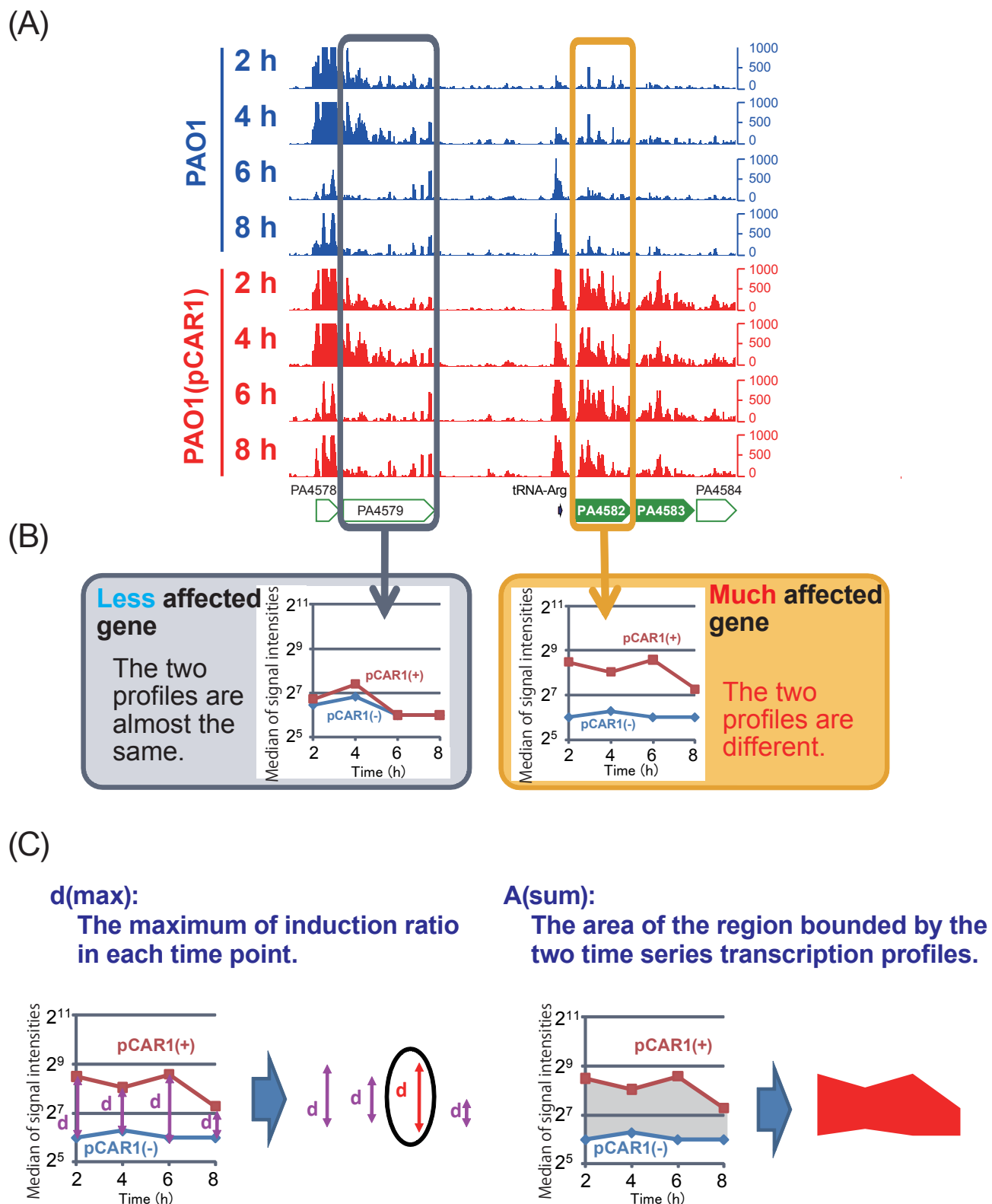


Fig. 3-7. pCAR1 を保持した際に転写プロファイルが変化した遺伝子の抽出基準.

Panel (A) shows an example of RNA map of much affected genes (PA4582-4583, green) and less affected genes (PA4579) by the carriage of pCAR1. The x-axis indicates the position of each chromosome, and the y-axis indicates the signal intensities of hybridization with single-stranded cDNA. Each bar denotes the signal intensity of each probe. Pentagons indicate the directions and locations of annotated genes. Panel (B) shows transcriptional profiles of much affected gene (PA4582) and less affected gene (PA4579). Panel (C) shows graphical explanation of A(sum) and d(max) values.

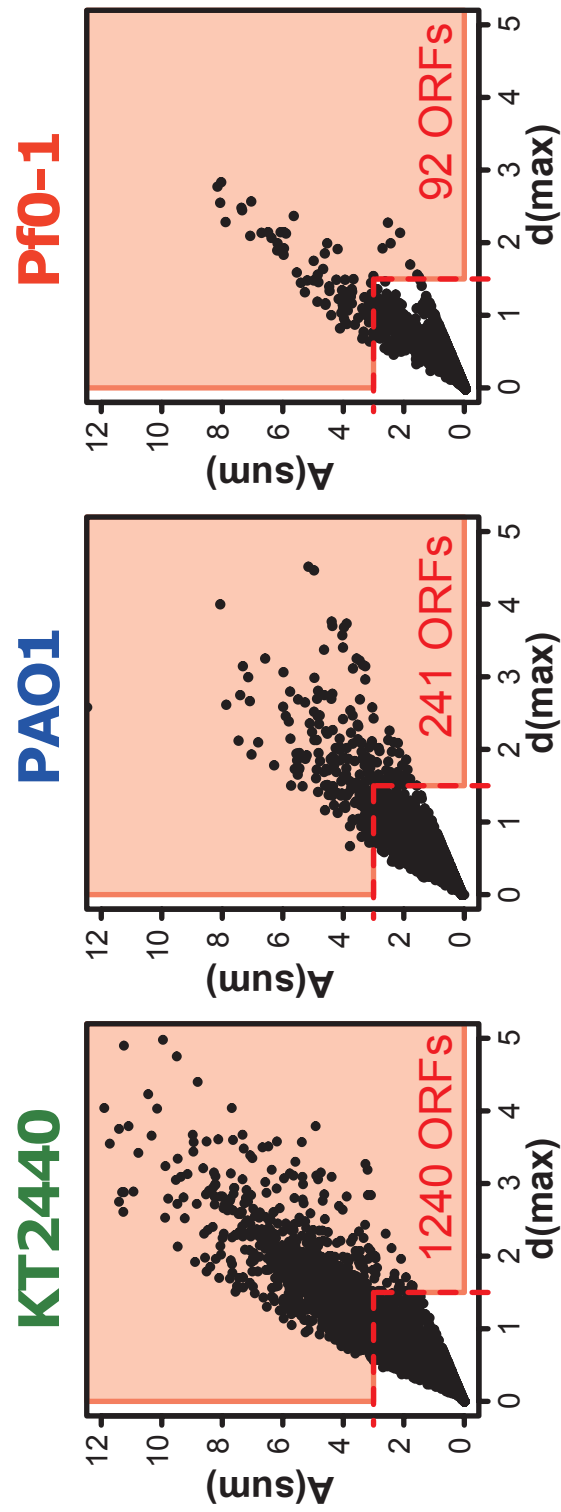
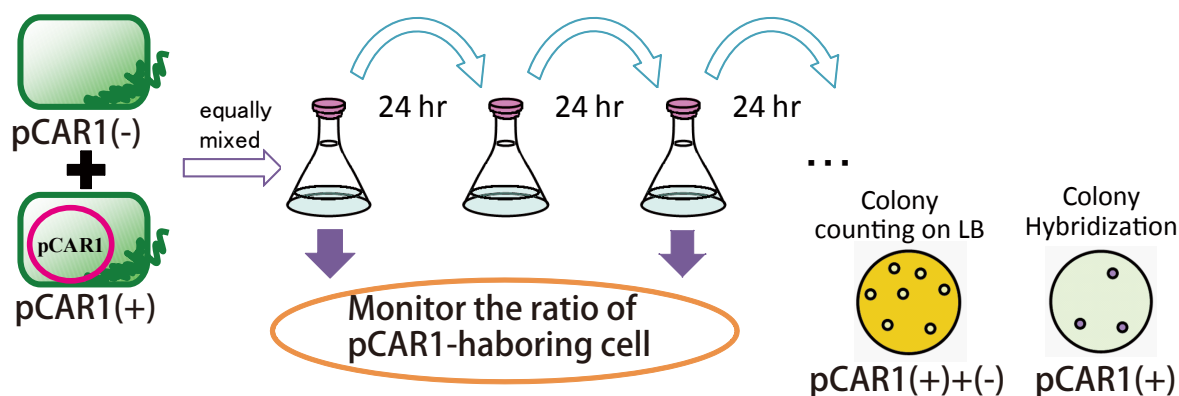


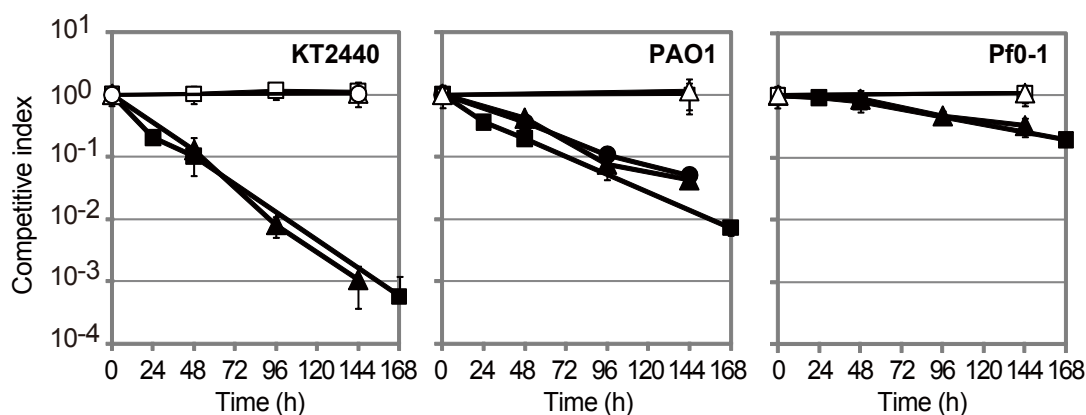
Fig. 3-8. 3 宿主における $A(\text{sum})$ と $d(\text{max})$ のプロット。

P. putida KT2440 株, *P. aeruginosa* PAO1 株, *P. fluorescens* Pf0-1Km 株それぞれについて, pCAR1 保持株・非保持株の各 4 経時点のアレイデータより, ①2 系列のグラフの囲む面積 $[A(\text{sum})]$ と ②各時点での誘導倍率のうち最大値 $[d(\text{max})]$ を算出し, 各 ORF ごとにプロットした散布図。

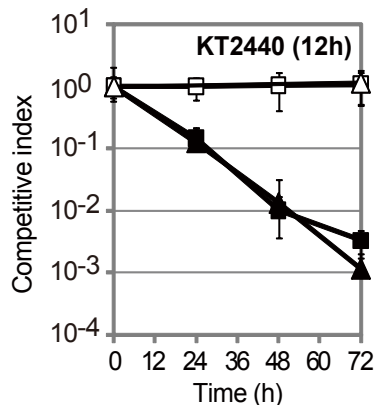
(A)



(B)



(C)



(D)

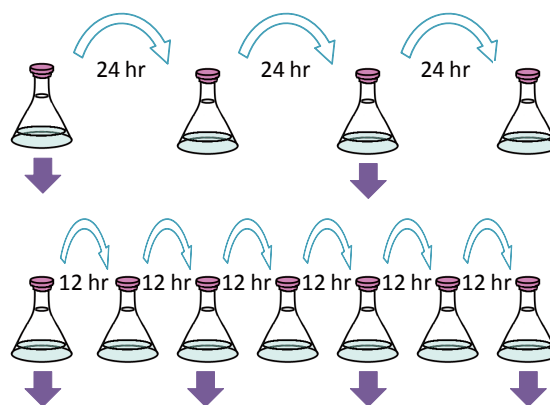


Fig. 3-9. pCAR1 保持株と非保持株の competition assay (高瀬, 2012 年東京大学修士論文).

(A) Competition assay の手順の概要. pCAR1 保持株と非保持株を OD でほぼ等量になるように混合し, コハク酸を唯一の炭素源とする液体無機培地で培養した. 24 時間ごとに同じ培地に 1/100 量植え継ぎを繰り返しながら, 合計 144~168 時間培養した. 植え継ぎの際培養液を適当に希釈して LB 寒天培地に塗布し, 出現したコロニー数より全菌体数を, *repA* 遺伝子をプローブとしたコロニーハイブリダイゼーションの結果より pCAR1 保持菌体数を測定した. (B) 3 宿主それぞれの competition assay の結果. 縦軸は, 各時点での pCAR1 保持菌株率を初期 pCAR1 保持菌株率で除した値 (competitive index) で表している. pCAR1 保持株が淘汰される速度は KT2440 株 > PAO1 株 > Pf0-1 株であった. (C) KT2440 株において, 植え継ぎ間隔を 12 時間に変更した際の結果. 植え継ぎの間隔と菌体比率測定の間隔の関係を (D) に示す. 植え継ぎ間隔を 1/2 にしても 1 回の植え継ぎごとの pCAR1 保持株の減少速度は変わらないことから, 淘汰は培養開始後 0 ~ 12 時間の間に起こることが示唆された.

(A) QT-clusters in KT2440

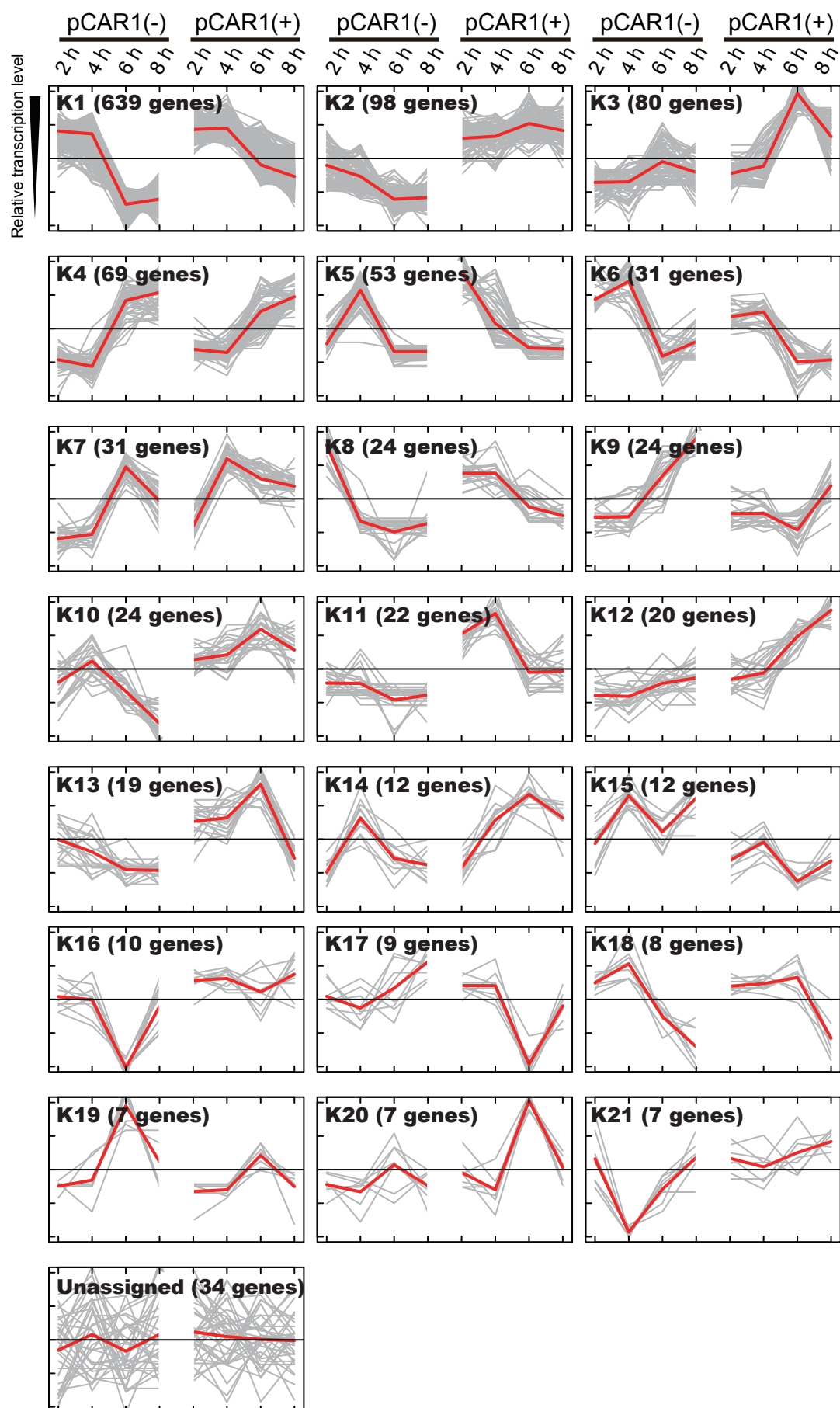
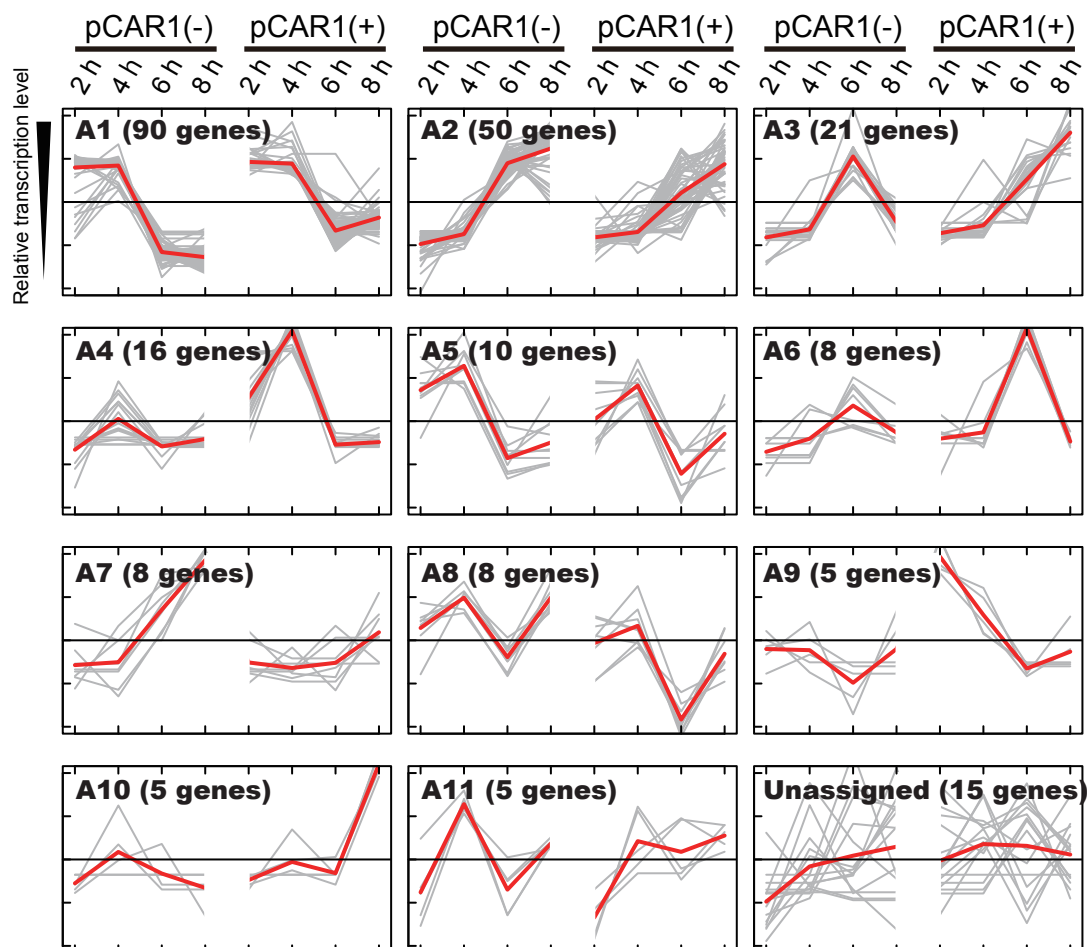


Fig. 3-10. 各宿主で pCAR1 を保持した際に転写プロファイルが変化した遺伝子の QT クラスタリング結果（全 2 ページ中 1 ページ目）.

(B) QT-clusters in PAO1



(C) QT-clusters in Pf0-1

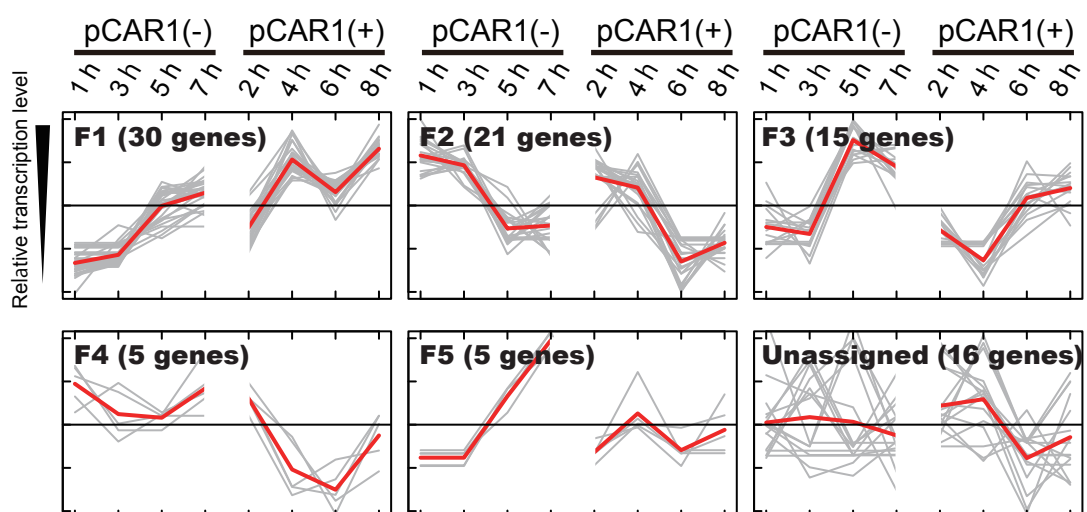


Fig. 3-10. 各宿主で pCAR1 を保持した際に転写プロファイルが変化した遺伝子の QT クラスターリング結果 (全 2 ページ中 2 ページ目)。

Cluster K1

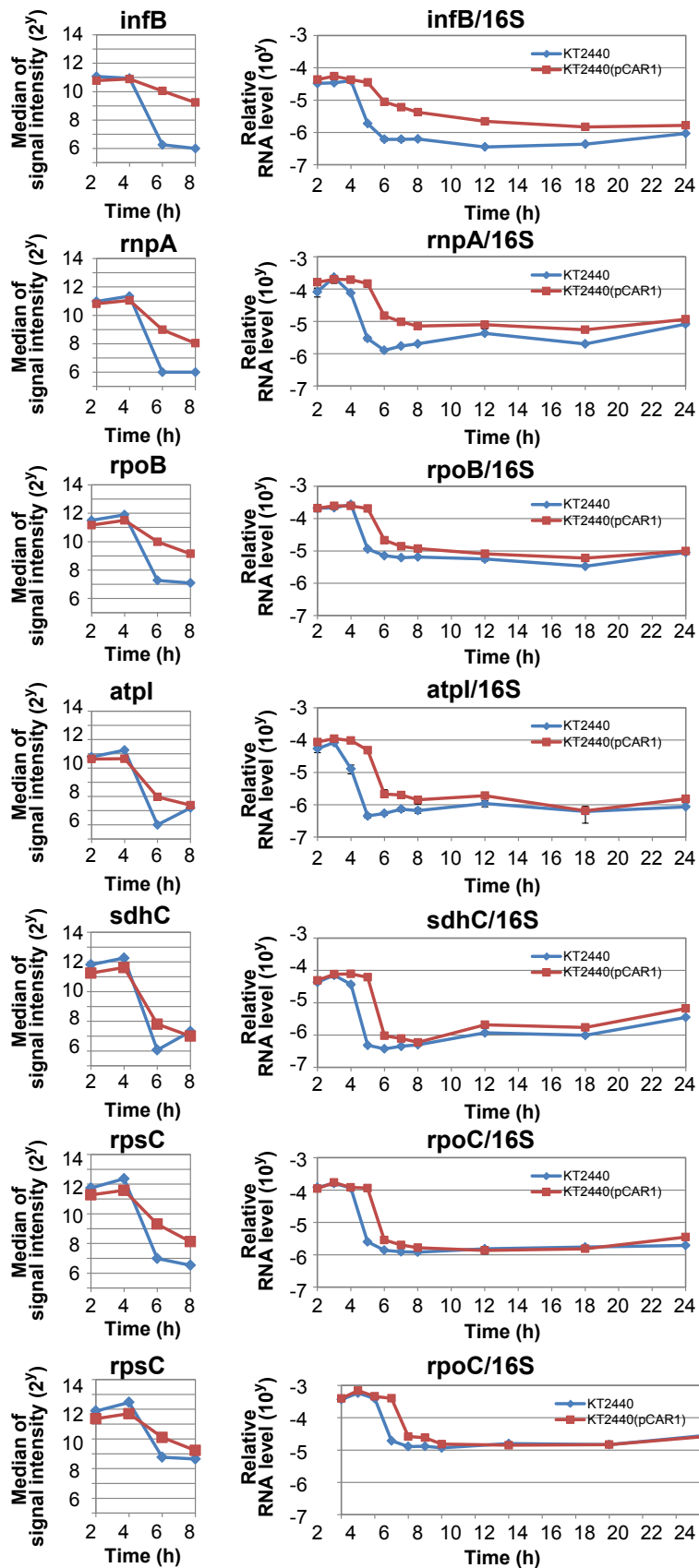
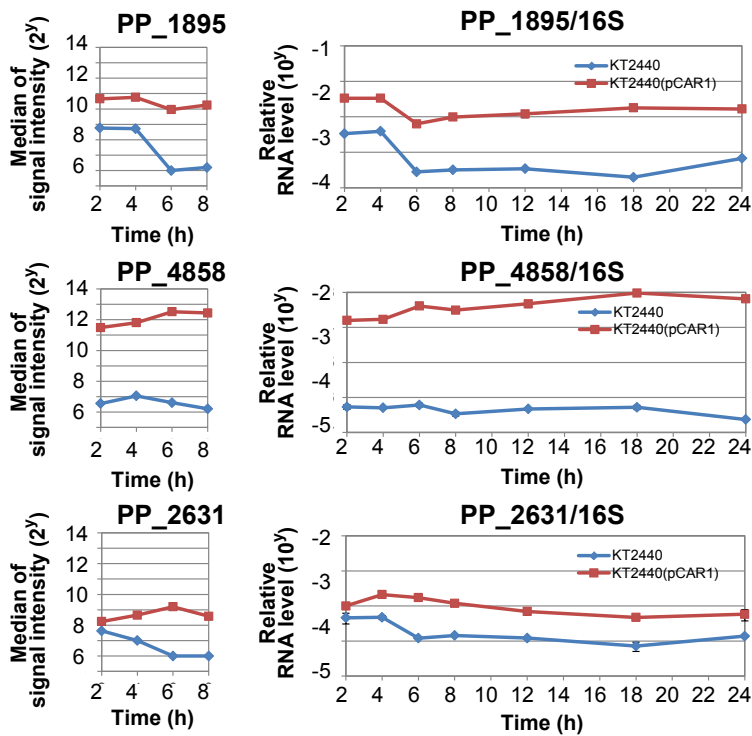


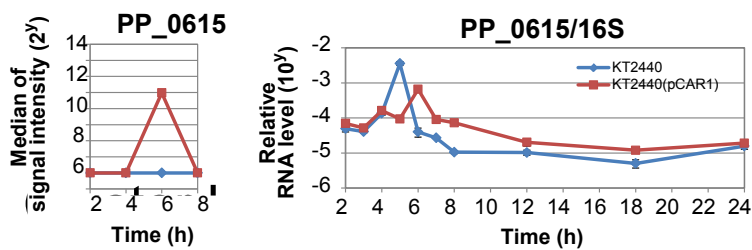
Fig. 3-11 タイリングアレイ結果と定量 RT-PCR 結果の比較。(全7ページ中1ページ目)

定量 RT-PCR はタイリングアレイ解析と独立のロットで培養した菌体を用いた。コハク酸を唯一の炭素源とする液体無機培地で培養し、継時的にサンプリングした菌体より RNA を抽出した。精製後の RNA よりランダムプライマーを用いて合成した cDNA 中の各遺伝子由来の配列と 16S rRNA 由来の配列を qPCR でそれぞれ定量した。

Cluster K2



Cluster K3



Cluster K12

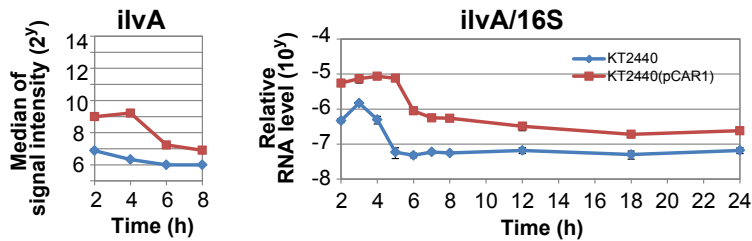


Fig. 3-11 タイリングアレイ結果と定量 RT-PCR 結果の比較. (全 7 ページ中 2 ページ目)

その他

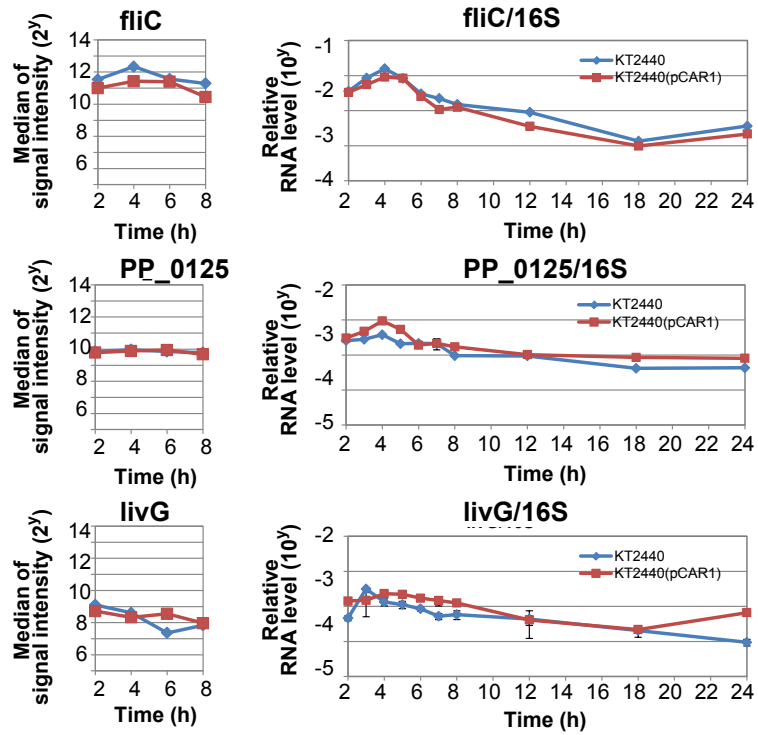


Fig. 3-11 タイリングアレイ結果と定量 RT-PCR 結果の比較. (全 7 ページ中 3 ページ目)

Cluster A1

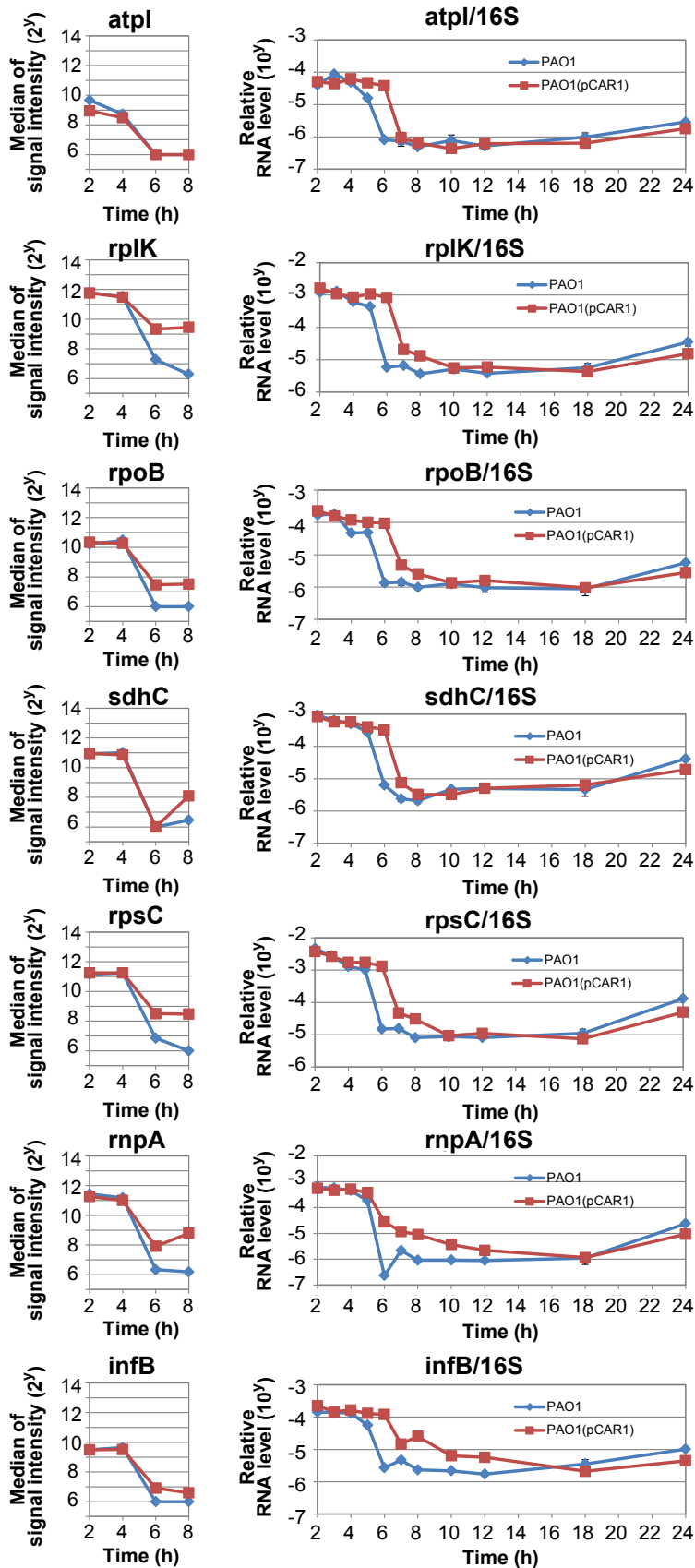
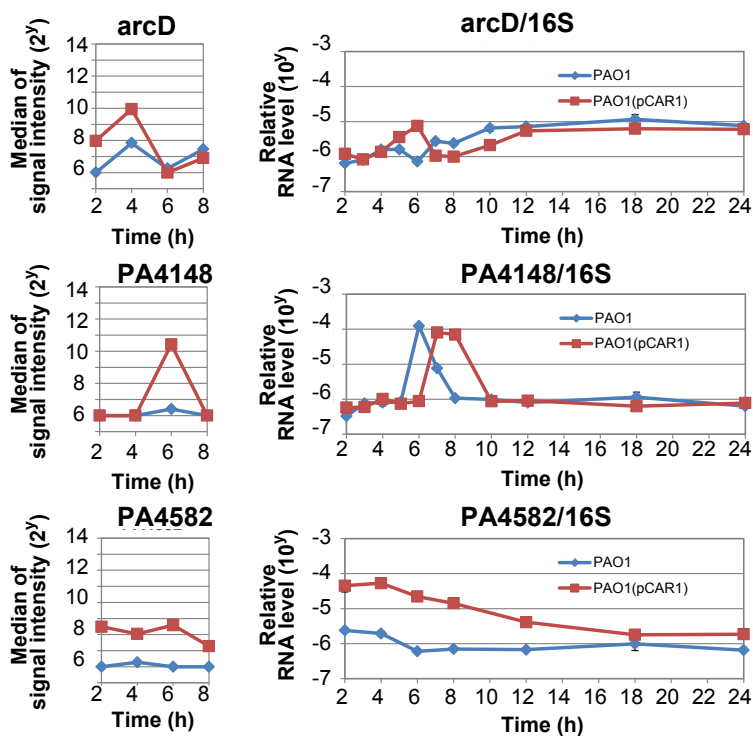


Fig. 3-11 タイリングアレイ結果と定量 RT-PCR 結果の比較. (全 7 ページ中 4 ページ目)

その他 PAO1 株で選抜されたもの



PAO1 株で選抜されなかったもの

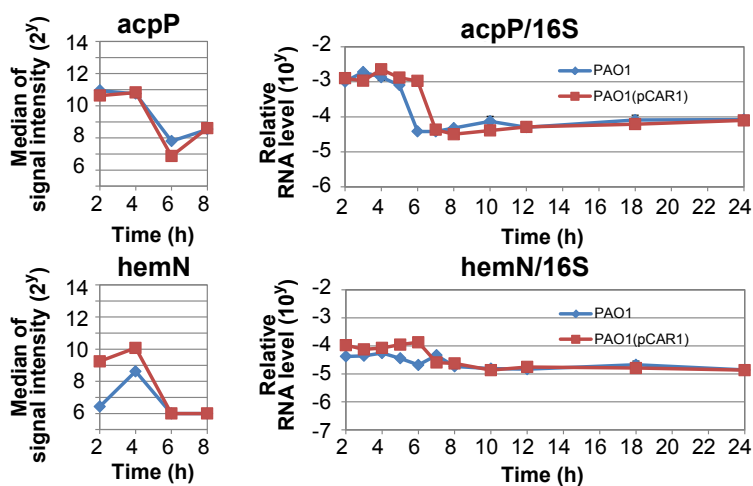


Fig. 3-11 タイリングアレイ結果と定量 RT-PCR 結果の比較。(全 7 ページ中 5 ページ目)

K1 と A1 に含まれるが Pf0-1 株では選抜されていないもの

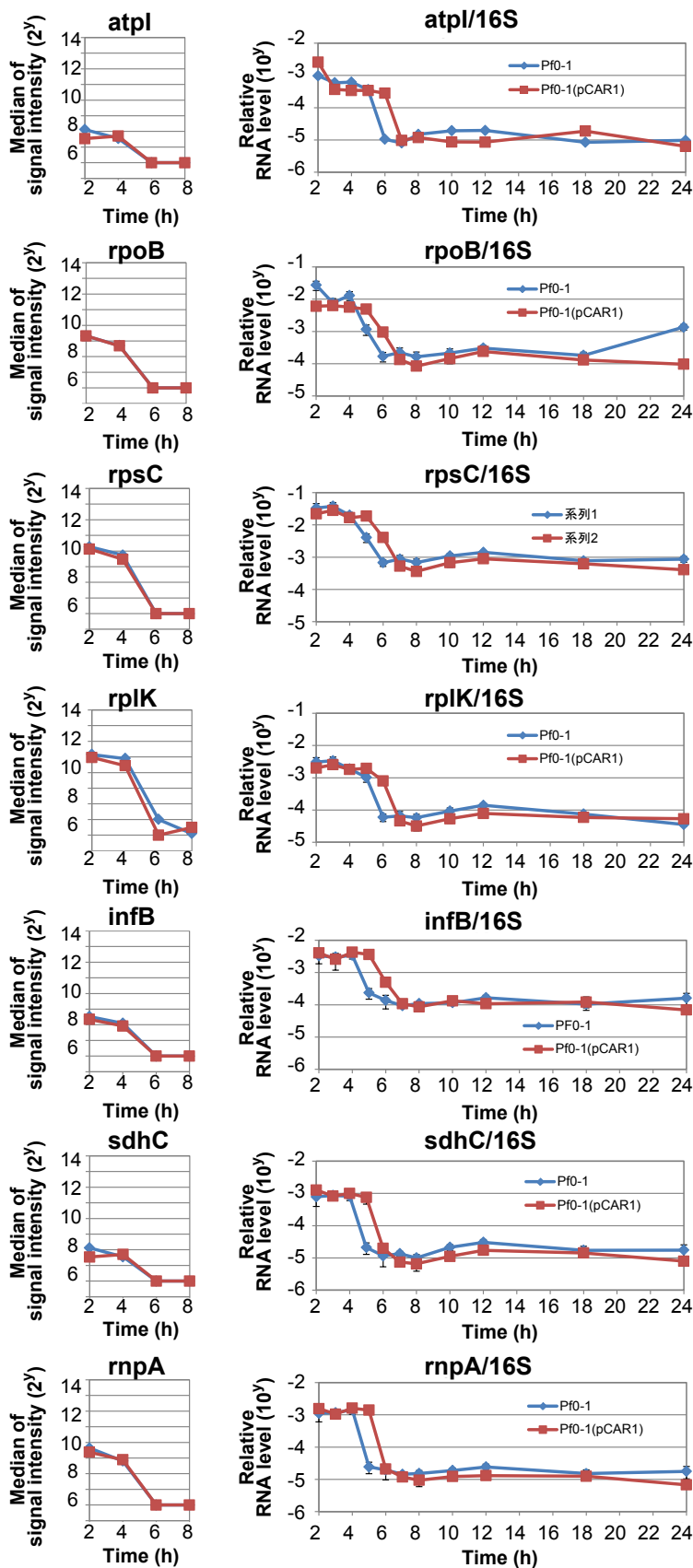
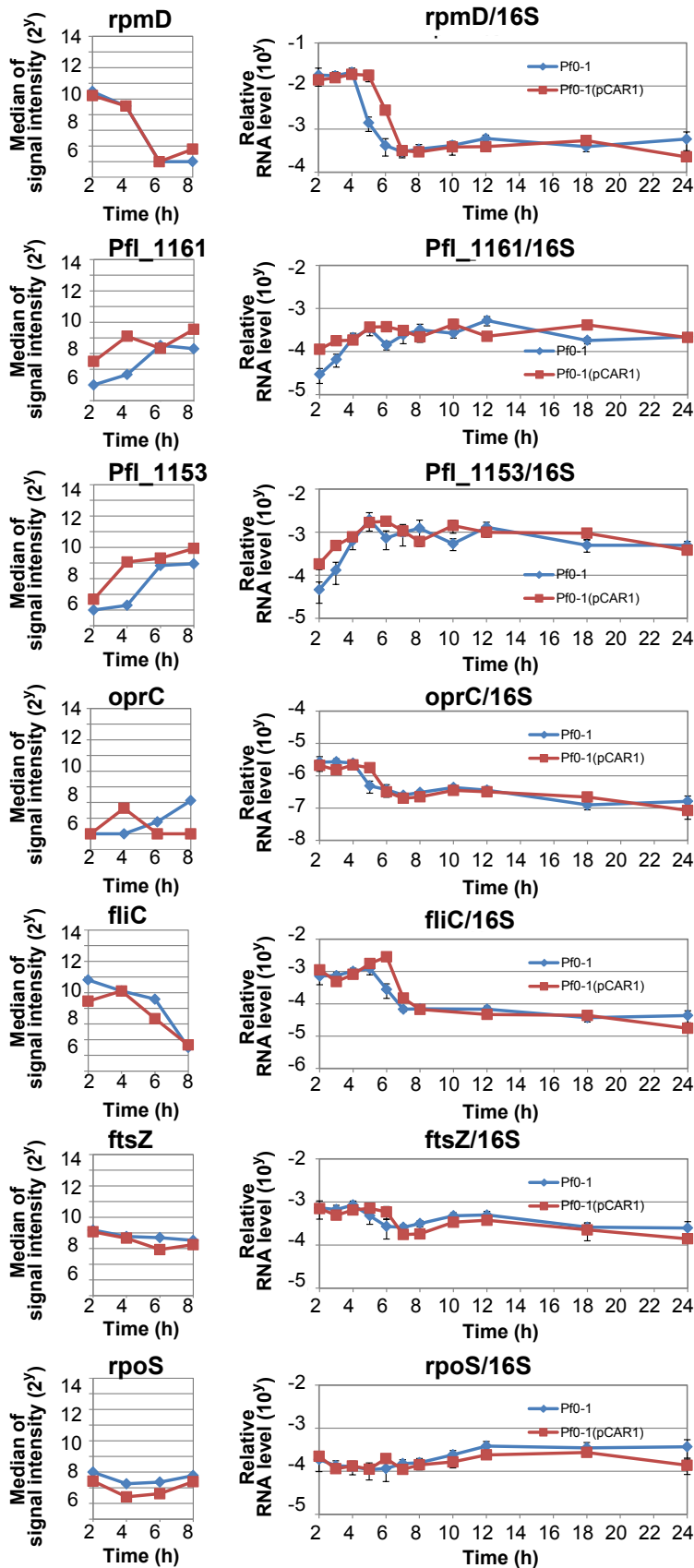


Fig. 3-11 タイリングアレイ結果と定量 RT-PCR 結果の比較。(全 7 ページ中 6 ページ目)



K1 と A1 に含まれるが
Pf0-1 株では選抜されていないもの

F1(推定プロファージ領域)

F1(推定プロファージ領域)

Fig. 3-11 タイリングアレイ結果と定量 RT-PCR 結果の比較。(全 7 ページ中 7 ページ目)

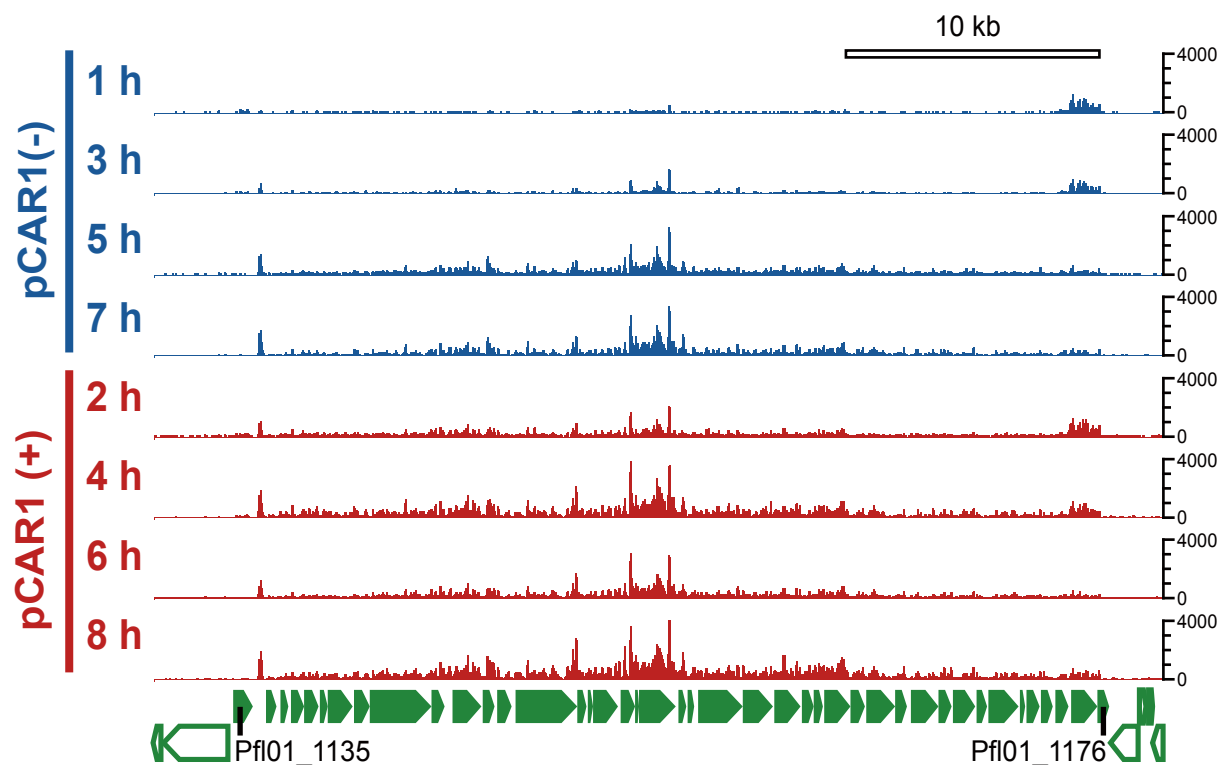


Fig. 3-12. Pf0-1 株における推定プロファージ領域の誘導

x 軸は染色体塩基配列, y 軸は各プローブの示したシグナル値の大きさをそれぞれ表しており, 緑五角形はアノテーションされた ORF の大きさと向きを表す.

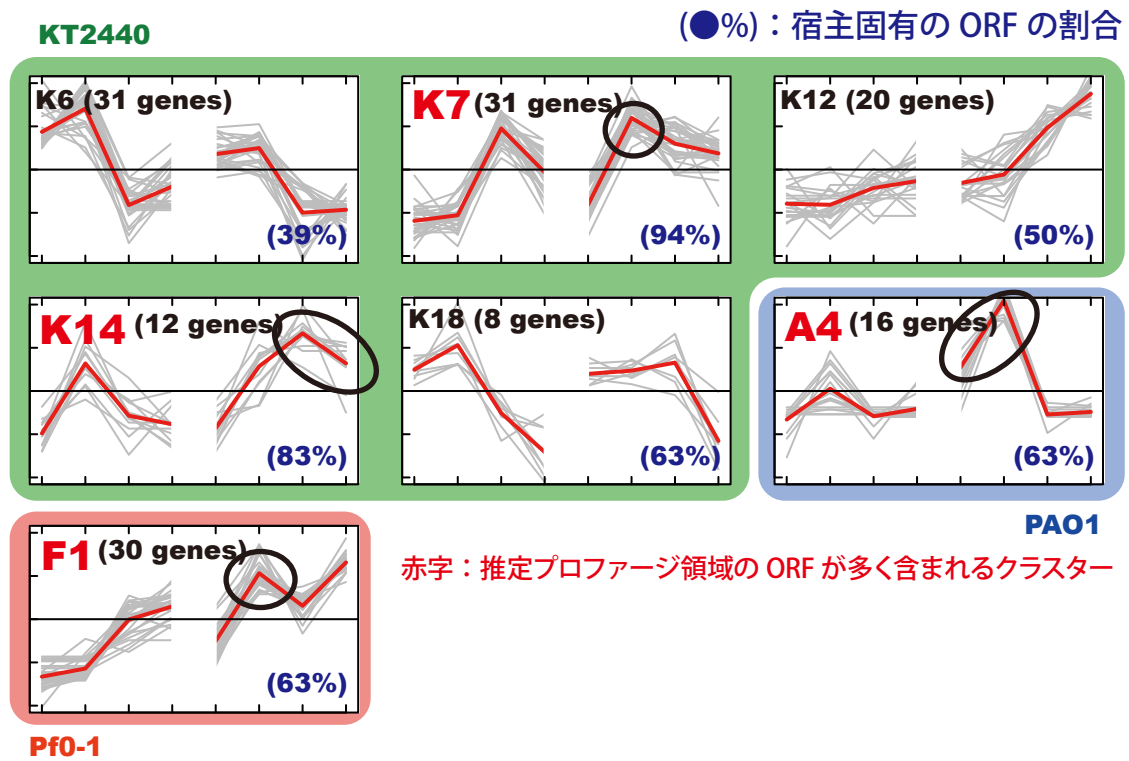


Fig. 3-13. 宿主固有の遺伝子が多く含まれるクラスター