

# 博士論文（要約）

バイオフィルム中での環境細菌の振る舞いにおけるプラスミド機能の解明

李 昇昱

# バイオフィルム中での環境細菌の振る舞いにおけるプラスミド機能の解明

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 24 年度入学 李 昇昱

指導教員 野尻 秀昭

# 目次

## 目次

## 論文の内容の要旨

## 略語表

1

## 第1章 序論

- 1-1 バイオフィルムについて
    - 1-1-1 バイオフィルムとは
    - 1-1-2 バイオフィルムの形成機構
    - 1-1-3 バイオフィルム状態と浮遊状態の違い
  - 1-2 プラスミドについて
    - 1-2-1 カルバゾール分解プラスミド pCAR1
    - 1-2-2 プラスミドが機能する際の染色体との相互作用
    - 1-2-3 pCAR1上にコードされる核様体タンパク質
    - 1-2-4 プラスミドがバイオフィルム形成に与える影響
  - 1-3 本研究の背景と目的
- 第1章の図

## 第2章 pCAR1が宿主のバイオフィルム形成に与える影響の解析

- 2-1. 緒言
- 2-2. 材料と方法
  - 2-2-1 使用した菌株、プラスミド、培地
  - 2-2-2 試薬, 酵素, 基本的な実験操作
  - 2-2-3 PCR, 使用したプライマー
  - 2-2-4 過剰発現株の作製
  - 2-2-5 エレクトロポレーション法による形質転換
  - 2-2-6 バイオフィルムの形成試験
  - 2-2-7 共焦点レーザー顕微鏡によるバイオフィルムの観察及び画像獲得
  - 2-2-8 FM4-64染色
  - 2-2-9 pCAR1保持率測定試験

- 2-2-10 タイリングアレイによるトランスクリプトーム解析
- 2-3 結果
  - 2-3-1 pCAR1 保持が宿主のバイオフィーム形成に与える影響の観察
  - 2-3-2 NAPs の除去が宿主のバイオフィーム形成に与える影響
    - (1) 単独破壊株の観察
      - (1)-1 単独破壊株と野生株のpCAR1保持率比較
    - (2) 二重破壊株の観察
      - (2)-1 二重破壊株と野生株のpCAR1保持率比較
    - (3) 相補株の観察
      - (3)-1 相補株のpCAR1保持率測定
  - 2-3-3 pCAR1の保持, およびNAPs遺伝子の破壊によるKT2440株のトランスクリプトーム変化の解析
    - 2-3-3-1 浮遊状態とバイオフィームの状態の比較
    - 2-3-3-2 *pmr*と*pnd*, *pmr*と*phu*の2種の二重破壊株とKT2440(pCAR1)株の比較
    - 2-3-3-3 *pmr*と*pnd*, *pmr*と*phu*の2種の二重破壊株とKT2440株の比較
    - 2-3-3-4 pCAR1 特異的繊維状化の原因因子の探索と繊維状化メカニズムの解明
- 2-4 考察
  - 第2章の図

### 第3章 pCAR1 保持株・非保持株が共存した場合の挙動の解明

- 3-1 緒言
  - 3-2 材料と方法
    - 3-2-1 使用した菌株、プラスミド、培地
    - 3-2-2 試薬、酵素、基本的な実験操作
    - 3-2-3 GFP や mCherry を保持したプラスミドの作製とその宿主株の作製
    - 3-2-4 単独バイオフィームの形成試験
    - 3-2-5 共存バイオフィームの形成試験
    - 3-2-6 共焦点レーザー顕微鏡によるバイオフィームの観察及び画像獲得
    - 3-2-7 フローサイトメトリー (Flow cytometry)
    - 3-2-8 生育曲線の作製
    - 3-2-9 pCAR1 保持率測定試験
  - 3-3 結果と考察
    - 3-3-1 単独培養によるバイオフィーム形成
    - 3-3-2 混合培養によるバイオフィーム形成
    - 3-3-3 pCAR1 保持株や非保持株を混合した場合の挙動の解明
- 第3章の図

### 第4章 総括と展望



## 参考文献

## 補章

- ・ NAH7、RP4 のマップ、破壊株の作製方法
- ・ RNA マッピングデータ

## 謝辞

## 略語表

ActD	actinomycin D
Ap	ampicillin
CAR	carbazole
Cm	chloramphenicol
Da	dalton
DMSO	dimethyl sulfoxide
EPS	extracellular polysaccharides
Gm	gentamicin
H-NS	histone-like nucleoid structuring protein
HU	histone-like protein from <i>Escherichia coli</i> strain U93
Km	kanamycin
MGE	mobile genetic element
MvaT	transcriptional activator of the <i>mvaAB</i> operon
NAPs	nucleoid-associated proteins
OD	optical density
ORF	open reading frame
Phu	plasmid-encoded HU-like protein
Pmr	plasmid-encoded MvaT-like regulator
Pnd	plasmid-encoded NdpA-like protein
rpm	round per minute
SUC	succinate

## 論文の内容の要旨

応用生命工学専攻  
平成 24 年度博士課程進学  
氏 名 李 昇昱  
指導教員名 野尻 秀昭

### 論文題目

バイオフィーム中での環境細菌の振る舞いにおけるプラスミド機能の解明

### 第 1 章 序論

これまでプラスミドは宿主に抗生物質耐性能や難分解性物質分解能などの形質を単に付与するだけの因子であると考えられてきたが、実際には、宿主染色体の遺伝子発現様式を直接的・間接的に変化させることで宿主形質を本質的に変容させる因子であることが明らかになりつつある。あわせて、プラスミド上の遺伝子の一部も宿主ごとに発現様式が変化するため、プラスミド側から付与される機能も宿主ごとに変化する。すなわち接合伝達性プラスミドは宿主の生き残りや進化に従来の理解以上に複雑に関与することから、プラスミドが宿主に与える影響を詳細に理解することは、環境細菌におけるゲノム進化機構の解明に必須である。

バイオフィームは固体表面に接着した微生物が形成する高次構造体であり、人工環境、自然環境を問わず、固体表面と水が接するほぼ全ての場所に存在する。バイオフィームは、水質浄化への寄与など我々の生活に役立つ場合もあれば、金属腐食・食品汚染・医療器具汚損・齧歯などの厄介な問題の原因となる場合も多い。環境中のバイオフィームには多種多様な微生物が棲息し、相互作用して共同体を形成している。その結果、バイオフィーム中の微生物は、個々の微生物機能の単なる足し算を越えた新たな機能を獲得し、柔軟性に富んだ多細胞生物体ともみなせる特徴を有するようになる。

以上より、実環境中でのプラスミドと宿主の挙動を理解するためには、プラスミドがバイオフィーム中の宿主細菌の振る舞いに与える影響を理解することが重要であるが、過去の報告例は極めて限られていた。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 *Pseudomonas* 属の宿主細菌 3 種 (*P. putida* KT2440, *P. aeruginosa* PAO1, *P. fluorescens* Pf0-1)

を用いて、pCAR1の保持が宿主のバイオフィーム形成に与える影響を評価すると共に、pCAR1上にコードされる核様体タンパク質 (nucleoid-associated proteins; NAPs) がバイオフィーム形成に与える影響を調べた。さらに、pCAR1 保持株と非保持株を混合して培養することで、バイオフィーム内でのプラスミド保持株と非保持株の挙動を解析した。

## 第2章 pCAR1が宿主のバイオフィーム形成に与える影響の解析

上記3株について、pCAR1 保持株と非保持株が形成するバイオフィームを共焦点レーザー顕微鏡で観察した。PAO1 株と Pf0-1 株では顕著な変化は認められなかったが、KT2440 株ではマッシュルーム状の構造であったバイオフィームが pCAR1 の保持に伴いフラットな構造に変化した。合わせて、KT2440株ではpCAR1 保持に伴い個々の細胞が繊維状 (filamentous) に変化したものが多く認められた (図1)。このことは、pCAR1 保持に伴うバイオフィーム形成様式への影響が宿主ごとに異なることを示唆している。また、この現象は pCAR1 (IncP-7) 特異的で、異なる種類のプラスミド[NAH7 (IncP-1 群), RP4 (IncP-9 群)]では観察されなかった。pCAR1 上には宿主染色体の転写様式を変化させる因子として3種の NAPs (Pmr, Phu, Pnd) がコードされているため、各遺伝子の単独・二重破壊株が形成するバイオフィームも観察した。その結果、*pmr* と *pnd*, および *pmr* と *phu* の2組の二重破壊株で繊維状化の亢進が観察され (図1)、KT2440(pCAR1)株におけるバイオフィーム形態の変化に複数種の NAPs が複合的に関与している事が示された。

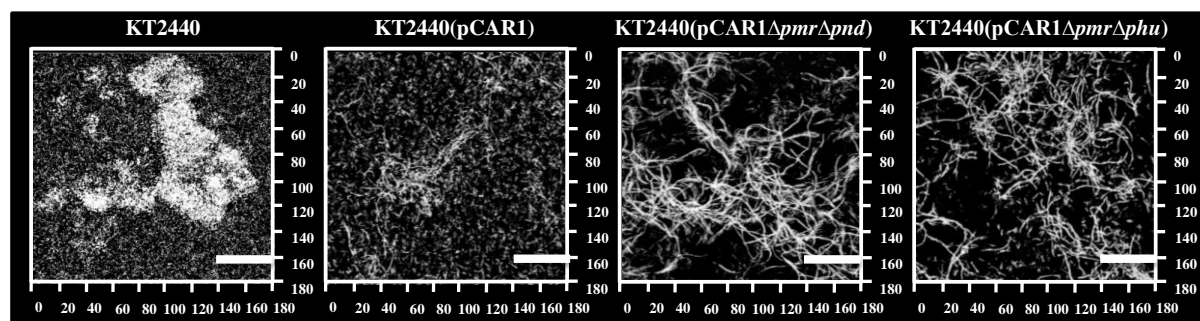


図1. *P. putida* KT2440, KT2440(pCAR1), KT2440(pCAR1 $\Delta$ *pmr* $\Delta$ *pnd*), KT2440(pCAR1 $\Delta$ *pmr* $\Delta$ *phu*)株のバイオフィームの観察像。各株をシャーレを上で静置培養、培養開始後12時間のバイオフィーム共焦点顕微鏡を用いて観察した。180 x 180  $\mu$ m (xy) の範囲を示す。図中のスケールバーは40  $\mu$ m を示す。

上記の pCAR1 を保持する KT2440 株がバイオフィーム形成時に繊維状化する原因を探るため、pCAR1 の保持や NAPs 遺伝子の破壊がバイオフィーム形成時のトランスクリプトームに及ぼす影響を、高密度タイリングアレイを用いて網羅的に調べた。まず、バイオフィーム状態と浮遊状態 (Shintani *et al.*, 2010) で pCAR1 を保持した際に転写変動した遺伝子を比較し、81 個 (誘導 52 個、抑制 29 個) のバイオフィーム状態で特異的に転写変動した遺伝子を選抜した (図2A)。*pmr* と *pnd*, *pmr* と *phu* の2組の二重破壊株と KT2440 株を比較し、*pmr* と *pnd*

株で 1,137 個 (誘導 1,115 個、抑制 22 個), *pmr* と *phu* 株で 1,454 個 (誘導 1,452 個、抑制 2 個)が選抜され, これらを図 2A で選抜された遺伝子と比較することにより繊維状化の原因になる, 32 個の共通に誘導される遺伝子を選抜した (図 2B, 共通に抑制された遺伝子は選抜されず). また, *pmr* と *pnd*, *pmr* と *phu* の 2 種の二重破壊株と KT2440(pCAR1)株を比較し, *pmr* と *pnd* 株で 380 個 (誘導 372 個、抑制 8 個), *pmr* と *phu* 株で 758 個 (誘導 1753 個、抑制 5 個)が選抜され, これらを図 2A で選抜された遺伝子と比較することにより繊維状化を亢進する可能性がある, 2 個の共通に誘導される遺伝子を選抜した (図 2C, 共通に抑制された遺伝子は選抜されず). これらの 2 個の遺伝子は図 2B で選抜された 32 個の遺伝子の中に含まれていた. そこで, 繊維状化の原因遺伝子, あるいは繊維状化を亢進する可能性がある 32 個の候補遺伝子について着目した.

選抜された 32 個の候補遺伝子を高発現させた際の KT2440 株及び KT2440(pCAR1)株のバイオフィルムを共焦点レーザー顕微鏡で観察した. その結果, KT2440 株を用いた過剰発現株では PP\_2193 (TonB-dependent siderophore receptor) を高発現させた株で菌体が伸びる現象が観察された (図 3). また, KT2440(pCAR1) 株を用いた過剰発現株では PP\_0308 (membrane dipeptidase) および PP\_0309 (hypothetical protein) を高発現させた株で繊維状化の亢進が観察された (図 3). PP\_2193 は細胞が鉄欠乏に陥った際に転写が誘導されると考えられる遺伝子であり, 菌体が繊維状化へと変化することに伴って細胞中の鉄

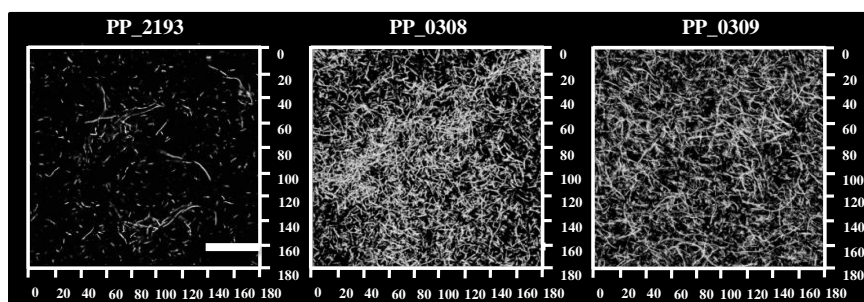


図 3. KT2440 株や KT2440(pCAR1)株のバイオフィルム形成に対する PP\_2193, PP\_0308, PP\_0309 の過剰発現の影響像. 各株をシャーレを上で静置培養, 培養開始後 12 時間のバイオフィルム共焦点顕微鏡を用いて観察した. 180 x 180  $\mu\text{m}$  (xy) の範囲を示す. 図中のスケールバーは 40  $\mu\text{m}$  を示す.

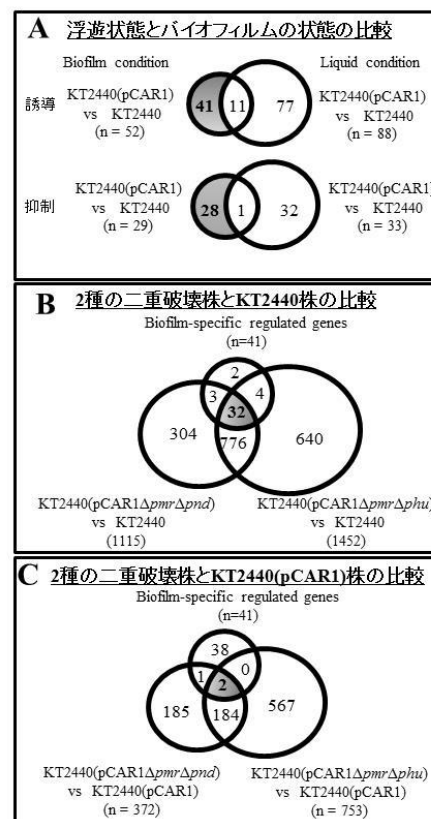


図 2. 繊維状化の原因遺伝子, あるいは繊維状化を亢進する可能性がある候補遺伝子の選抜.

欠乏が起きる可能性が示唆された. 一方, PP\_0308 や PP\_0309 については詳細な生理機能は不明である. 以上より, KT2440 株の pCAR1 保持に伴う繊維状化には, 複数の遺伝子が協調的に関与する可能性が示唆された.

### 第3章 pCAR1 保持株・非保持株が共存した際のバイオフィルムの解析

次に、3種の *Pseudomonas* 属細菌の pCAR1 保持株・非保持株を混合した際に形成されるバイオフィルムの観察を行った。各株にそれぞれ緑色蛍光タンパク質 (GFP) と赤色蛍光タンパク質 (mCherry) を挿入した株を作製し、15通りの組み合わせについて、蛍光タンパク質を入れ換えたものも含めて合計 30通りの組み合わせを観察した。その結果、PAO1株を他の株と混合培養すると pCAR1 保持・非保持に関わらずバイオフィルム中で PAO1株が優占化すること、同種間で pCAR1 保持・非保持株を混合培養すると一方の優占化は見られず、各株それぞれがバイオフィルムを形成し、混ざらない状態で棲み分けることが明らかとなった。過去の研究では、上記3株について浮遊状態で pCAR1 保持株と非保持株の競合培養を行った際に pCAR1 保持株の比率が減少することが明らかとなっている (Takahashi *et al.*, 2014)。そこで、フローサイトメトリーや共焦点レーザー顕微鏡を用いて、バイオフィルム状態と浮遊状態における上記3株の pCAR1 保持株・非保持株の割合を定量した。その結果、バイオフィルム状態では pCAR1 保持株と非保持株がほぼ同じ比率を示し、両菌株が生き残ってそれぞれ独立に存在しているのに対して、浮遊状態では pCAR1 保持株の比率が顕著に減少していくことが明らかになった。これらの傾向から、バイオフィルム状態では浮遊状態とは異なり、立体構造を持つため基質に対する濃度勾配が発生し、これらの影響でバイオフィルムの基部にあるプラスミド保持菌の活動が低いため、プラスミド保持株が淘汰されずそれぞれ独立に存在し生き残ると推測された。

### 第4章 総括と展望

本研究では宿主のモデルとして *P. putida* KT2440, *P. aeruginosa* PAO1, *P. fluorescens* Pf0-1株を、プラスミドのモデルとしてカルバゾール分解プラスミド pCAR1 を用い、pCAR1 保持株・非保持株を浮遊状態とは異なるバイオフィルムという集団中で単独及び混合培養することで pCAR1 保持株の挙動解析を行った。単独培養では、KT2440株特異的に pCAR1 保持株が形成するバイオフィルムはフラットになり、繊維状化した菌体が多く認められた。また、その原因となる3つの遺伝子 (PP\_0308, PP\_0309, PP\_2193) を高密度タイリングアレイ解析により取得することができた。さらに混合培養においては、浮遊状態よりバイオフィルム状態の方が、プラスミドが宿主に与える負荷が軽減されることが明らかになった。

プラスミドが接合伝達により様々な細菌間を移動することを考慮すれば、細胞同士が密接して存在するバイオフィルムは細菌間の遺伝子交換の場として捉えることができる。今後は混合培養時のバイオフィルム中におけるプラスミドの接合伝達現象などを解析することで、バイオフィルム内の細胞同士が密接した状態で、細菌ゲノムやプラスミドが進化を遂げる機構の全貌解明が期待される。

# 第1章

## 序論

### 1-1. バイオフィームについて

#### 1-1-1. バイオフィームとは

バイオフィームとは、一般的な定義においては物質表面に付着した微生物とそれらが生産する細胞外多糖 (EPS: Extracellular polymeric substances) で覆われた3次元構造体であり [Costerton *et al.*, 1999], 主に多糖類、核酸、及びタンパク質から構成される。

バイオフィームは、水圏をはじめ、土壤中、植物体、動物体、根圏など様々な自然環境 [Sawada *et al.*, 2004] や人工環境を問わず様々なところに存在することが知られている。それらは我々の生活とも深い関わりをもっている。身近な例として、歯垢、台所や排水溝のヌメリなどがあげられる。また、水道管、石油パイプラインなどの配管やカテーテルなどの医療器具内にも見られる。配管に形成されたバイオフィームは、流体の流れの妨害や金属腐食を誘発することにより、各設備の性能低下を引き起こす。また、医療器具内に形成されたバイオフィームは院内感染を引き起こす。さらに、日和見感染菌の中には、免疫力が低下した患者の体内でバイオフィームを形成し、感染症の慢性化を引き起こすものも存在する [Costerton *et al.*, 1995; Costerton *et al.*, 1999; Donlan and Costerton, 2002 2002]。バイオフィーム形態をとる微生物は、浮遊形態の微生物に比べ抗生物質に対する耐性が数百から数千倍に上るため、医療現場では特に問題になっている [Mah *et al.*, 2003; Drenkard, 2003]。また、微生物にとってもバイオフィームの形成は EPS で覆われた厚みのある高次構造体を形成するため、生育に不可欠な酸素や、栄養の勾配が生じやすいといった問題を引き起こす場合がある。

このように、バイオフィームは様々な問題を引き起こす一方で、我々の生活の中で有効に利用される場合もある。例えば、下水処理場で水質浄化に用いられる活性汚泥や発酵食品に利用される麹などである。微生物にとっても、バイオフィームの形成は外部ストレスに対する耐性を向上させるなど有利な面も持つ。

以上に述べたとおり、バイオフィームは生態系に広く存在しており、我々にとって様々な問題の原因となる場合も多いが、その有効利用に大きな可能性を秘めている。また、実環境中でのバイオフィームには多種多様な微生物が棲息しているが、それらは相互作用して共同体を形成している。その結果、バイオフィーム中の微生物は、個々の微生物機能の単なる足し算を越えた新たな機能を獲得し、柔軟性に富んだ多細胞生物体ともみなせる特徴を有するようになる。そのため、バイオフィーム形態をとる微生物の挙動を理解することは、環境中の微生物の生態を深く理解すると共に、幅広い分野で微生物を制御していく上で重要である。

### 1-1-2. バイオフィルムの形成機構

バイオフィルム形成過程にはいくつかの段階を踏むことが報告されている (Fig. 1-1). まず始めに (i) 浮遊状態の細胞が鞭毛や繊毛を用いた運動性により固体表面に付着 (attachment) し (ii) 物理化学的な力により可逆的に付着 (reversible attachment), その後, 鞭毛により強固に付着する (irreversible attachment). 次に, (iii) 付着した細菌の増殖及び繊毛や鞭毛を用いた運動性により, 立体的なマイクロコロニーを形成し [Klausen *et al.*, 2003; Caiazza *et al.*, 2007], さらに (iv) 微生物が分泌する, 多糖や細胞外 DNA など で構成される EPS よりマイクロコロニーが肥大化 [Henderson *et al.*, 1999], その後, (v) 成熟したマイクロコロニーからの細胞の脱離 (dispersal) する [Sauer *et al.*, 2002]. 脱離した浮遊菌は, 異なる部位でバイオフィルムを再形成し, 上記のプロセスが繰り返される.

### 1-1-3. バイオフィルム状態と浮遊状態の違い

これまでの研究から, バイオフィルム状態の微生物の挙動と液体培養された (浮遊状態の) 微生物の挙動に様々な差が存在することが明らかにされている. バイオフィルムが環境中の微生物にとって生き残りのためのシェルターの役割を果たしているという見解は, 広く受け入れられている. この例として, 浮遊状態の微生物よりもバイオフィルムの方が貧栄養環境下での生存能力に優れているという報告がある [Costerton *et al.*, 1999]. バイオフィルム中では, 細胞の抗生物質耐性が浮遊状態と比較して劇的に高まること示されているほか [Nickel *et al.*, 1985], バイオフィルムを形成した微生物が免疫系に対して高い耐性を示す事も知られている [Donlan and Costerton, 2002]. また, 様々な遺伝子の発現が浮遊状態とバイオフィルムではことなることが知られている [de Beer *et al.*, 1994; Prigent-Combaret *et al.*, 1999]. 例えば, *E. coli* の遺伝子発現プロファイル研究において, 実に, 発現している遺伝子の 38 % の遺伝子が浮遊状態とは異なる発現を示すという報告もある [Prigent-Combaret *et al.*, 1999]. このような生存性の変化をもたらす決定的な遺伝子制御系が存在するか否かについては未知な部分が多い. さらに, トルエン分解プラスミドを保持する *P. putida* KT2442 株で, 浮遊状態よりバイオフィルム状態でプラスミドの脱落頻度が多いことが明らかになっている [Ma *et al.*, 2013].

以上に述べたとおり, バイオフィルム状態に特異的に現れる性質を理解するにはバイオフィルムの生態を理解し, バイオフィルムの形成メカニズム解析する必要がある.

## 1-2. プラスミドについて

プラスミドは染色体とは独立に複製される細胞内 DNA であり, その一部は接合等によって細菌間を水平伝播する可動性遺伝因子 (mobile genetic element; MGE) である. 遺伝因子の水平伝播は細菌の進化の上で重要な役割を果たしていると考えられる. 例えば,



抗生物質耐性遺伝子をコードするプラスミドが細菌間で水平伝播することにより生じる薬剤耐性菌の蔓延 [Carattoli, 2003] や、病原性遺伝子を含む *pathogenicity island* が伝播することで生じる病原菌の蔓延 [Juhás *et al.*, 2009] などは典型的な例である。細菌の抗生物質耐性能や難分解性物質分解能に関する遺伝子など、一般的な条件下での生育には必須ではない因子はプラスミド上に存在することが多いことが知られている。

一般にプラスミドは、複製・保持機構の類似性によって分類される。類似した複製・保持機構を有する2種のプラスミドは同一の細胞内では共存できず、互いに排除しあう性質のことを不和合性 (*incompatibility*) と言い、このとき二つのプラスミドを同一の不和合性群 (*incompatibility group; Inc*) に属すると言う。複製・保持能や接合伝達能といった、プラスミドの基本性質を規定する遺伝子領域を、プラスミドの基本骨格 (*back bone*) と呼ぶが、二つのプラスミド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) の類似性が極めて高い場合が多い。なお、難分解性物質分解遺伝子、薬剤耐性遺伝子群といった“アクセサリ遺伝子”も有しており、これらの遺伝子により宿主は本来保持し得ない形質を獲得でき、結果特殊な環境下でも繁殖が可能となる。

こうした背景から、プラスミドが宿主に与える影響とその機構をより詳細に理解することは、環境細菌とゲノムの進化機構の解明に必須であると考えられる。

### 1-2-1. カルバゾール分解プラスミド pCAR1

当研究室では、原油中に含まれる含窒素芳香族化合物カルバゾール (Fig. 1-2) 分解遺伝子を有するプラスミド pCAR1 について研究を行ってきた。pCAR1 は 1993 年に東京都下水道処理場の活性汚泥より単離され、*Pseudomonas resinovorans* CA10 株 [Ouchiyama *et al.*, 1993] から見出されたプラスミドである [Nojiri *et al.*, 2001]。CA10 株と pCAR1 が有する、カルバゾール分解経路や分解酵素遺伝子群、分解酵素の構造等は、今までに詳細な解析が行われている [Nojiri, 2012]。pCAR1 上にはカルバゾール分解に関わる *car*, *ant* 遺伝子群の他に、プラスミドの接合伝達に関与する *tra*, *trh* 遺伝子群、プラスミドの複製に関与する *repA*, 細胞分裂の際にプラスミドの能動的な分配に関与する *par* 遺伝子群などが見出された [Maeda *et al.*, 2003]。CA10 株の単離後も、カルバゾール分解遺伝子群の多様性を解析するために多数のカルバゾール資化菌が単離された [Inoue *et al.*, 2004]。その解析過程で得られたカルバゾール資化菌 *P. putida* HS01 株は pCAR1 と類似の遺伝子構造をもつプラスミドを保持することが明らかになった [Shintani *et al.*, 2005a]。このプラスミドは pCAR2 と命名されたが、pCAR1 と同様に自己伝達能があり、CA10 株を供与菌とした pCAR1 の接合伝達受容菌域より HS01 株を供与菌とした pCAR2 のそれが広いことも明らかになっている [Shintani *et al.*, 2005b]。pCAR2 の全塩基配列が決定された結果 [Takahashi *et al.*, 2009b]、pCAR2 は 2003 年に決定した pCAR1 と比べて内部で ISPre1 が 1 コピー増えており (元々は 3 コピー存在)、かつ

transposase 遺伝子内部に 1 塩基の置換が発見されたが (コドンの 3 塩基目でアミノ酸残基は変化せず), その他は全く同一のプラスミドであった. なお, pCAR2 との比較の過程で, 現在研究室で日常的に用いている pCAR1 にも pCAR2 の場合と同一な 4 コピー目の ISPre1 の挿入が起きていることも明らかになった. これは, 研究室で代々実験用に使われている間に転移したものと考えられた. この程度の違いの場合, 同一の名前で呼称しても構わないという意見もあるが, 厳密に塩基配列に違いがあったため, 最近まで pCAR1 と呼んでいたプラスミドを pCAR1.1, pCAR2 を pCAR1.2 と改名し, DDBJ/EMBL/Genbank に配列情報が登録された. pCAR1.1 と pCAR1.2 は塩基配列レベルでは 1 塩基異なるプラスミドであるが, 上で述べたように機能的には全く同一と言ってよいプラスミドであり, 本論文では, pCAR1.1 と pCAR1.2 をあわせて pCAR1 と呼ぶことにする. これまでの研究で,  $\gamma$ -proteobacteria の *Pseudomonas* 属細菌から多くの分解プラスミドが見出されている. *Pseudomonas* 属由来のプラスミドは IncP-1~P-14 群に分類されるが, *Pseudomonas* 属由来の分解プラスミドのほとんどは IncP-1 群, IncP-2 群, IncP-7 群, IncP-9 群のいずれかに属している. pCAR1 は IncP-7 群に属することが実験的に証明されており [Shintani *et al.*, 2006], 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である [Maeda *et al.*, 2003; Takahashi *et al.*, 2009a] (Fig. 1-2). 現在までに全塩基配列が解読されている他の IncP-7 群プラスミドにはナフタレン分解プラスミド pND6-1 [Li *et al.*, 2004], トルエン分解プラスミド pWW53 [Yano *et al.*, 2007] 及び pDK1 [Yano *et al.*, 2010] の 3 つの報告があり, pCAR1 を含めた 4 者の基本骨格はよく保存されている事が明らかになっている [Yano *et al.*, 2010]. また, pCAR1 の宿主域としては, *Pseudomonas* 属細菌と *Stenotrophomonas* 属細菌, *Delftia* 属細菌に保持されることが現在までに確認されている [Shintani *et al.*, 2014].

### 1-2-2. プラスミドが機能する際の染色体との相互作用

プラスミドの振る舞いを規定する重要な因子の一つは, プラスミドと宿主染色体上の遺伝子発現様式である. 宿主がプラスミドを持つと, プラスミド上の遺伝子が染色体由来の因子の制御を受けるようになるが, それと同時に染色体上の遺伝子もプラスミド由来の因子の制御を受ける場合がある. すなわち, プラスミド上の遺伝子の発現には RNA ポリメラーゼや  $\sigma$  因子をはじめとする宿主染色体由来の因子が必須であるが, 染色体上の遺伝子発現に影響を与えうるような転写制御因子 (global regulator と呼ばれる DNA 結合性タンパク質も含めて) をコードする遺伝子がプラスミド上に存在する場合は, それらが染色体上の遺伝子群の発現に影響を与えることになる. こうして, 染色体とプラスミドの両方に由来する因子が協調的に機能することで, 細胞全体として「プラスミドを保持する」ということに起因する表現型が発現することになる. この制御機構を明らかにすることこそが, 多剤耐性菌の蔓延や分解菌による環境修復などを制御する技術の確立に欠かせない基礎情報となる.

当研究室では、プラスミド pCAR1 とその宿主である *Pseudomonas* 属細菌を用いて、プラスミドと宿主染色体上の遺伝子発現様式に着目して研究を進めてきた。これまでの研究から、pCAR1 を異なる宿主が保持した際、宿主によって遺伝子の転写状況や表現型が異なることが明らかとなっている [Shintani *et al.*, 2010]。例えば、ゲノム既知の *P. putida* KT2440 株、*P. aeruginosa* PAO1 株、*P. fluorescens* Pf0-1 株の 3 種の *Pseudomonas* 属細菌に pCAR1 を保持させ宿主のトランスクリプトーム比較を行ったところ、KT2440 株染色体では薬剤排出ポンプをコードする *mexEF-oprN* オペロンの転写が誘導され、実際に宿主の抗生物質耐性能が増強されたのに対し、他の 2 株ではこのような現象は見られなかった。また、pCAR1 上遺伝子のトランスクリプトーム解析については宿主のゲノムが解読されていない株も含めて 6 種の *Pseudomonas* 属細菌で行われており、カルバゾール分解や接合伝達に関する遺伝子の転写量が宿主によって異なっていることが明らかとなっている [Shintani *et al.*, 2011]。宿主によって異なる表現型の例としては、pCAR1 を保持した先の 3 株をカルバゾールを唯一の炭素源とする培地で生育させたところ、pCAR1 上のカルバゾール分解酵素は 3 株いずれでも誘導されるが、Pf0-1 株では宿主染色体にコードされるカテコール分解酵素（カテコールはカルバゾールの中間代謝物）の発現が誘導されないために宿主に毒性を示すカテコールが蓄積し、生育が著しく阻害された [Takahashi *et al.*, 2009b]。またこれら 3 宿主は pCAR1 保持に伴い、非保持株と比べて fitness や運動性、浸透圧ストレスに対する耐性が低下することも示されている [Takahashi *et al.*, 2014]。

以上の結果は、プラスミドはこれまで考えられてきたように宿主に付加的な形質を与えるだけの因子ではなく、宿主染色体の遺伝子発現様式を変化させることで宿主を本質的に変化させる因子であり、同時に、プラスミドの遺伝子発現様式も宿主によって変化することを示している。これらの現象は、プラスミド由来の因子と染色体由来の因子が両ゲノムの遺伝子発現様式を変化させた結果生じたものと考えられる。

### 1-2-3. pCAR1 上にコードされる核様体タンパク質

上記 1-2-2 で述べたように、プラスミド保持による様々な変化を生じさせる原因は何であろうか？一つの可能性として、近年、プラスミド-宿主染色体間の相互作用に重要な因子の候補として注目される核様体タンパク質 (nucleoid-associated proteins ; NAPs) が重要な役割を果たす可能性が示唆されている。NAPs は細菌の細胞内に多数存在し、DNA に結合し、DNA を曲げる・架橋する等、その構造を変化させることにより、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 and Dorman, 2010] (Fig. 1-3)。一般的な転写因子のように特定の標的遺伝子の転写を制御するものではないため、NAPs を介したプラスミド-宿主染色体間の相互作用を解明するためにはオーム解析が極めて重要となる。例えば、*Shigella flexneri* 2a strain 2457T 由来の自己伝達性 IncHI1 群メガプラスミド pSf-R27 は H-NS 様因子 Sfh をコードする遺伝子を

持っている。H-NSは大腸菌においてDNA結合タンパク質として単離され、遺伝子のプロモーター領域(特にAT-richな領域)に結合することで多くの遺伝子の転写を抑制するglobal regulatorとして働くことが知られている[Fang and Rimsky, 2008]。SfhはH-NSの機能を相補できること、H-NSと同様に湾曲したAT-rich領域に結合することが示されていた[Beloin *et al.*, 2003; Deighan *et al.*, 2003]。H-NSがglobal regulatorとして働くことを考慮すると、pSf-R27を保持することで菌体内のH-NSホモログの数が増え、宿主の転写ネットワークに影響を与えることが予想された。そこで*Salmonella enterica* serovar Typhimurium SL1344(以下SL1344と表記)とSL1344(pSf-R27)およびSL1344(pSf-R27Δ*sfh*)のトランスクリプトーム比較が行われ、pSf-R27Δ*sfh*を保持する場合はpSf-R27を保持する場合よりも多くの遺伝子の転写変動がみられること、宿主細胞が*hns*破壊株に近いphenotypeを示すことが明らかとなった[Doyle *et al.*, 2007]。この現象はAT-richなpSf-R27およびpSf-R27Δ*sfh*を保持することで宿主染色体由来のH-NSの多くがプラスミドに結合して“奪われ”、染色体上に結合するH-NSの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推測された[Doyle *et al.*, 2007]。すなわち、SfhはH-NSと同様にAT-richな領域に結合することで染色体上に結合するH-NSの不足を補い、プラスミドを保持することにより宿主に生じる負荷を軽減する“stealth”機能を有することが提唱された[Doyle *et al.*, 2007; Dillon *et al.*, 2010]。

pCAR1上にもPmr(ORF70, plasmid-encoded MvaT-like regulator), NdpAホモログPnd(ORF93, plasmid-encoded NdpA-like protein), HUホモログPhu(ORF95a, plasmid-encoded HU-like protein)の3種類の核様体タンパク質がコードされている[Takeda *et al.*, 2011]。MvaTは、1998年に初めて、*P. mevalonii*においてメバロン酸代謝オペロン*mvaAB*の転写制御因子として単離されたが[Rosenthal and Rodwell, 1998]、その後*Pseudomonas*属細菌を中心にそのホモログが多数見つかり、[Diggle *et al.*, 2002; Tendeng *et al.*, 2003; Rescalli *et al.*, 2004]、大腸菌のH-NSに相当する(機能的に相同な)global regulatorであることが明らかとなった[Tendeng *et al.*, 2003]。MvaTホモログはN末端側に二量体化に関するcoiled-coilドメイン、C末端側にhelix-turn-helixというDNA結合ドメインを有する。また、H-NSと同様にホモオリゴマー・ヘテロオリゴマーを形成し、特にAT-richなDNA領域に結合することが示されている[Rosenthal and Rodwell, 1998; Vallet-Gely *et al.*, 2005; Castang *et al.*, 2008]。ndpAはグラム陰性細菌ゲノムに広く保存される遺伝子であるが、研究例はほとんど無く、コードされるタンパク質も機能が不明である。ただ、*P. fluorescens* SBW25株のNdpAと約30%の相同性を示す大腸菌のYejKは、細胞から分離された核様体中のタンパク質として精製された37 kDaのタンパク質であることから[Murphy *et al.*, 1999]、NdpAも核様体に存在すると予想される。HU(Histone-like Protein from *E. coli* strain U93)は1975年に*in vitro*でRNA polymeraseの転写活性を促進する因子として発見された[Rouviere-Yaniv and Gros, 1975]。HUは大腸菌では2つ、*P. putida*では3つのホモログが染色体上にコードされており、細菌の核様体の中で一番多く含まれる約

9 kDaのタンパク質である。これらはホモダイマー・ヘテロダイマーを形成し、その存在比率が生育段階ごとに変化すること [Claret and Rouvière -Yaniv, 1997], 4次構造ごとに機能が異なることが示されている。N末端側にタンパク質間相互作用ドメインを、C末端側にDNA結合ドメインを有し、ダイマー化することでDNA結合能を発揮する [Swinger *et al.*, 2003; Swinger and Rice, 2004; Luijsterburg *et al.*, 2006]。HUのglobalな転写制御メカニズムについては依然として不明な点が多いが、大腸菌におけるトランスクリプトーム解析によりSOS応答や酸化ストレス、浸透圧、嫌気代謝関連遺伝子の制御に関わることが明らかとなっている [Oberto *et al.*, 2009]。当研究の以前の研究で、*P. putida* KT2440(pCAR1)株とその*pmr*破壊株のトランスクリプトーム比較でから、pCAR1保持によ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、さらに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が明らかとなっている [Yun and Suzuki *et al.*, 2010]。また、*P. putida* KT2440株を宿主として、*pmr*, *pnd*, *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ものの、*pmr*を含む2つの二重破壊株 ( $\Delta pmr\Delta pnd$ と $\Delta pmr\Delta phu$ )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; 廣谷, 2014年東京大学修士論文], pCAR1の接合伝達頻度が低下する [松井, 2014年東京大学博士論文]という興味深い表現型が見られている。

このように、プラスミド上にコードされるNAPsの機能を理解することは、プラスミドの振る舞いや役割を理解する上でも、また細菌の進化を考える上でも、非常に重要である。

#### 1-1-4. プラスミドがバイオフィーム形成に与える影響

バイオフィーム中での遺伝子水平伝播の生態学的役割について研究が行われており、接合伝達マシーナリーがバイオフィーム形成を促進することが報告されている。例えば、IncP-9に属するトルエン分解プラスミドpWW0を保持する*P. putida* KT2440株が、非保持株よりバイオフィーム形成能が向上する [D'Alvise *et al.*, 2010], また大腸菌でプラスミドR1drd19保持する株がバイオフィーム形成能増加するなど [Yang *et al.*, 2008], プラスミド保持によるバイオフィーム形成量が変わる報告例が知られている。

バイオフィーム中での宿主細菌の振る舞いへのプラスミドの影響を理解することは、実環境中でのプラスミドと宿主の挙動を知る上で重要であるが、従来の研究では上記で述べたようにバイオフィーム量の変化とプラスミドの有無の関係などの解析がほとんどであり、生残性への影響などの知見はなく振る舞い全般についての情報は不十分な現状である。そこで、プラスミドを保持した宿主のバイオフィーム形成変化を総合的に捉える必要がある。

### 1-3. 本研究の背景と目的

当研究室グループの以前の研究で、3種の*Pseudomonas*属細菌 (*P. putida* KT2440株, *P. aeruginosa* PAO1株, *P. fluorescens* Pf0-1株) を用い、pCAR1保持株と非保持株を混合して継代培養すると、KT2440株>PAO1株>Pf0-1株の順にpCAR1保持株の割合が早く減少し、pCAR1の宿主への負荷が宿主ごとに異なることが明らかになっている [Takahashi *et al.*, 2014]. なお、この結果はタイリングアレイによって取得したpCAR1保持に伴い転写量に変動した宿主遺伝子の数 (KT2440 株で 1,240 個, PAO1 株で 241 個, Pf0-1 株で 92 個)及びPhenotype MicroArrayを用いた解析により呼吸量が低下した培養条件の数の大小と同様の傾向であった [Takahashi *et al.*, 2014]. このような、プラスミド保持に伴い様々な形質を示すようになった宿主が、実環境中でどのようにふるまうのかに興味を持たれたが、これまでのpCAR1を用いて行ってきた実験のほとんどが「コハク酸を唯一の炭素源とする液体培地での浸とう培養条件下」という極めて人工的な条件での実験であった。一方で、実環境中ではバイオフィルムを形成する菌が多にもかかわらず、それらの内でプラスミド保持菌の挙動に関する知見は不足している状況である。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、pCAR1の保持が宿主によるバイオフィルム形成に与える影響を共焦点レーザー顕微鏡を用いて観察し、その後、NAPsがバイオフィルム形成に与える影響も調べた。次に、pCAR1保持やNAPs破壊が宿主のバイオフィルムを形成する時に及ぼす影響を遺伝子の転写レベルで網羅的に調べた。更に、得られた候補遺伝子について、宿主のバイオフィルムを形成における影響について解析を行った (第2章)。第2章で得られる知見を基に、pCAR1保持株・非保持株を混合したバイオフィルムを形成させ、バイオフィルム内でのプラスミド保持株と非保持株の挙動について解析を行った (第3章)。

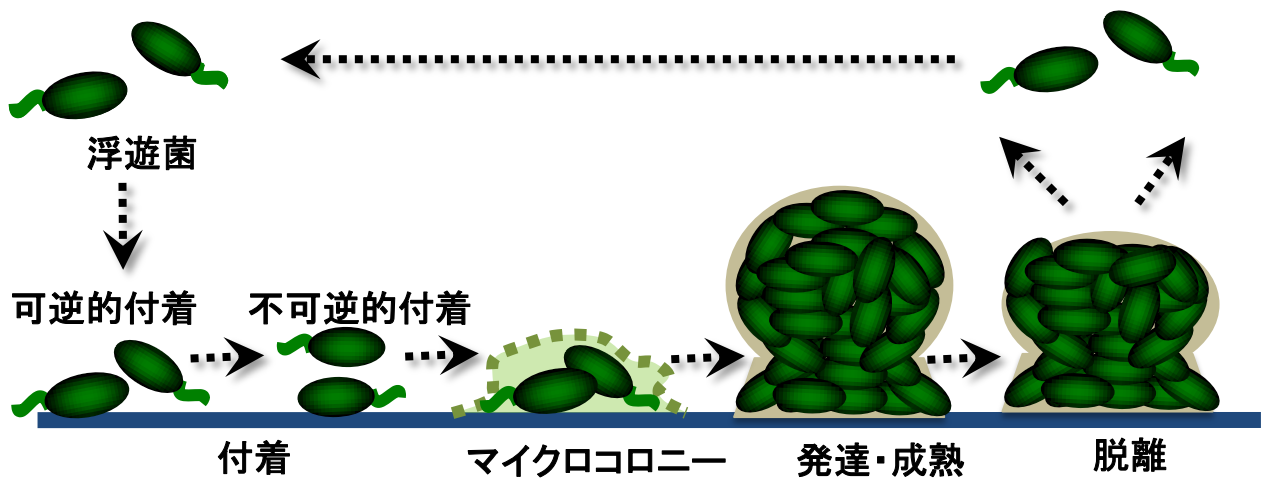
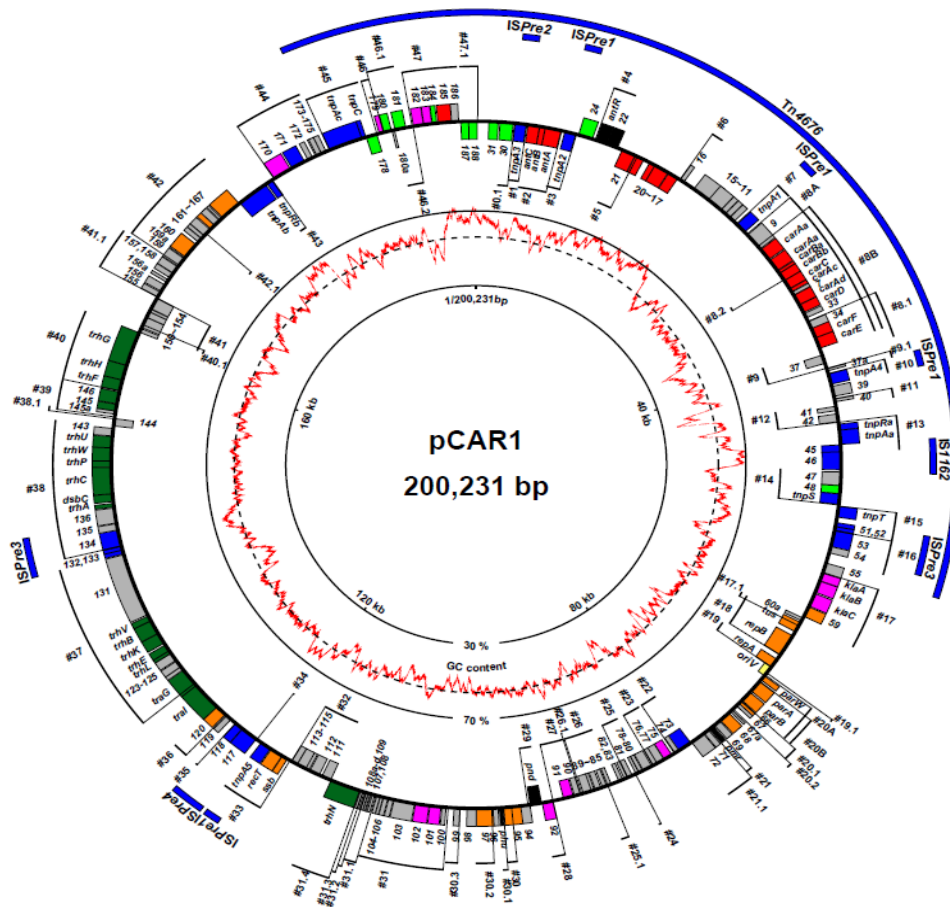


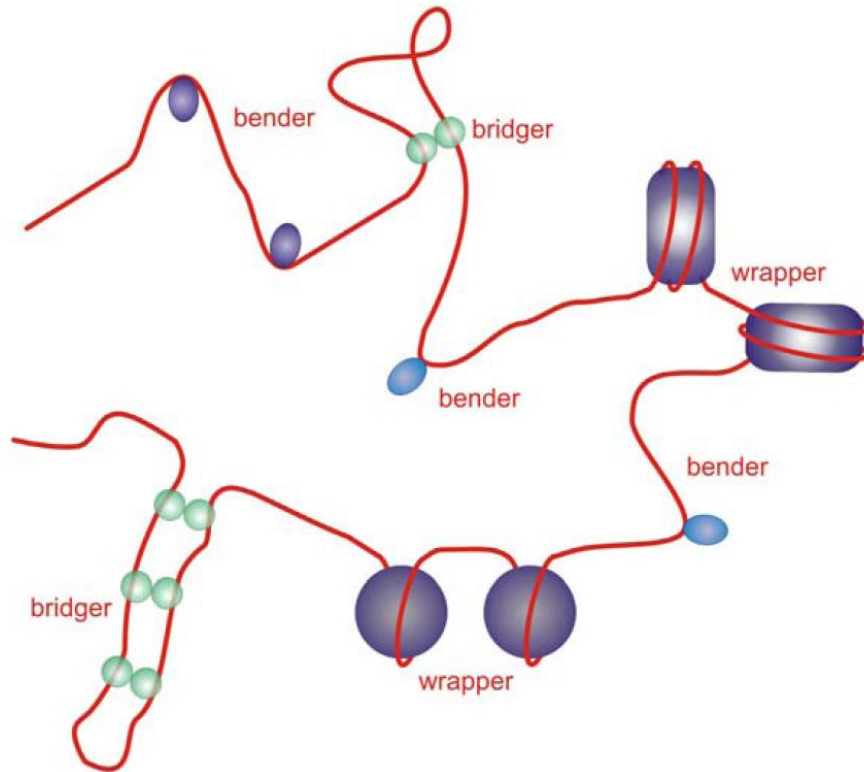
Fig. 1-1. バイオフィルム形成プロセス



**Fig. 1-2. カルバゾール分解プラスミドpCAR1の全遺伝子構造 [Maeda *et al.*, 2003; Takahashi *et al.*, 2009a]**

見いだされたORFを最も外側の円上にその転写方向に応じて示した(外側の扇形が時計回り, 内側の扇形が反時計回りに転写されるORF). 各ORFは相同性を示したタンパク質の機能の種類によって色分けした. (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, ピンク: その他の機能, 青色: 転移因子・挿入因子, 灰色: 既知の機能未知タンパク質と相同性を示すORF, 黄色: 既知の機能未知タンパク質と相同性を示さないORF). 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. 内側の赤線は各ORFのGC含量を示す. 破線がpCAR1全体の平均GC含量である56%を示す. またTn4676, ISPre1 - ISPre4位置を外側の青色の扇形で示した.





**Fig. 1-3. 核様体タンパク質とDNAの結合様式 [Luijsterburg et al., 2008]**  
 赤線はDNAを表す. 緑色の丸 (bridger) はbridgingによりDNAと結合する核様体タンパク質を, 青色の楕円 (bender) はbendingによりDNAと結合する核様体タンパク質を, 紫色の円および楕円 (wrapper) はwrappingによりDNAと結合する核様体タンパク質を表す.

## 第 2 章

### pCAR1 が宿主のバイオフィルム形成に与える影響の解析

#### 2-1. 緒言

本章では、カルバゾール分解プラスミド pCAR1 とその宿主として 3 種の *Pseudomonas* 属細菌 (*P. putida* KT2440 株, *P. aeruginosa* PAO1 株, *P. fluorescens* Pf0-1 株) を用いて、pCAR1 を保持することで宿主のバイオフィルム形成がどのような影響を受けるのかを、共焦点レーザー顕微鏡を用いて経時的に観察を行った。

また、プラスミド pCAR1 上にコードされている 3 種類の NAPs がバイオフィルム形成に与える影響を明らかにするため、各 NAPs をコードする遺伝子 (*pmr*, *phu*, *pnd*) の単独破壊株、二重破壊株および相補株を用いて、バイオフィルムの様々な表現型を比較することで各 NAPs の除去が宿主のバイオフィルム形成に与える影響を調べた。

その結果、KT2440 株特異的に保持株が形成するバイオフィルムはフラットになり、繊維状化した菌体が多く認められた。また、 $\Delta pmr/\Delta phu$  と  $\Delta pmr/\Delta pnd$  の 2 組の二重破壊株で繊維状化の亢進が見られ、その原因を探るため、pCAR1 保持や NAPs 遺伝子の破壊がバイオフィルム形成時のトランスクリプトームに及ぼす影響を高密度タイリングアレイで解析を行った。その結果、繊維状化の原因遺伝子、あるいは繊維状化を亢進する遺伝子と考えられる 32 個の候補遺伝子の取得ができた。そこで、選抜された遺伝子について高発現株を作製し、これらがバイオフィルム形成に及ぼす影響を解析した。

## 2-2. 材料と方法

### 2-2-1. 使用した菌株, プラスミド, 培地

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. 以降, 特に濃度を明記しない場合は Table 2-2 の終濃度に従って添加したものとする. *Pseudomonas* 属細菌は LB 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. 平板培地には細菌培地用寒天粉末 (Wako Pure Chemical Industries, Ltd) また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. 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 (以下 CAR プレートと表記).

Table 2-1. 本章で用いた培地

LB medium		NMM-4 medium	
Bacto tryptone	10 g	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	2.2 g
Yeast extract	5 g	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.8 g
NaCl	10 g	NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	3.0 g
pH 7.0		FeCl <sub>3</sub> ·6H <sub>2</sub> O*	0.01 g
	per liter	MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O*	0.2 g
		CaCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O*	0.01 g
		pH7.0	
			per liter

\*オートクレーブ後に, 別に調製しておいたストックとして加えた (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*
Carbazole (liquid culture)	CAR	1 mg/ml	100 mg/ml	DMSO*
Succinate	SUC	1 mg/ml	100 mg/ml	H <sub>2</sub> O
抗生物質				
Gentamycin	Gm	30 µg/ml	30 mg/ml	H <sub>2</sub> O
ミネラル				
FeCl <sub>3</sub> ·6H <sub>2</sub> O	-	10 µg/ml	10 mg/ml	H <sub>2</sub> O
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	-	200 µg/ml	200 mg/ml	H <sub>2</sub> O
CaCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	-	10 µg/ml	10 mg/ml	H <sub>2</sub> O

\*dimethylsulfoxide

Table 2-3. 本章で用いた菌株とプラスミド(4 ページ中1 ページ目).

Strain or plasmid	Relevant characteristics	Source or reference
Bacterial strains		
<i>P. putida</i> KT2440	naturally Ap <sup>r</sup> , naturally Cm <sup>r</sup> , naturally Gm <sup>r</sup> , naturally Km <sup>r</sup> , naturally Rif <sup>r</sup> , naturally Sm <sup>r</sup> , naturally Tc <sup>r</sup>	Nelson <i>et al.</i> , 2002
<i>P. putida</i> KT2440(pBBad18K::0308)	<i>p. putida</i> KT2440 carrying pBBad18K::0308	This study
<i>P. putida</i> KT2440(pBBad18K::0309)	<i>p. putida</i> KT2440 carrying pBBad18K::0309	This study
<i>P. putida</i> KT2440(pBBad18K::0310)	<i>p. putida</i> KT2440 carrying pBBad18K::0310	This study
<i>P. putida</i> KT2440(pBBad18K::0311)	<i>p. putida</i> KT2440 carrying pBBad18K::0311	This study
<i>P. putida</i> KT2440(pBBad18K::0315)	<i>p. putida</i> KT2440 carrying pBBad18K::0315	This study
<i>P. putida</i> KT2440(pBBad18K::0316)	<i>p. putida</i> KT2440 carrying pBBad18K::0316	This study
<i>P. putida</i> KT2440(pBBad18K::0322)	<i>p. putida</i> KT2440 carrying pBBad18K::0322	This study
<i>P. putida</i> KT2440(pBBad18K::0323)	<i>p. putida</i> KT2440 carrying pBBad18K::0323	This study
<i>P. putida</i> KT2440(pBBad18K::0324)	<i>p. putida</i> KT2440 carrying pBBad18K::0324	This study
<i>P. putida</i> KT2440(pBBad18K::0325)	<i>p. putida</i> KT2440 carrying pBBad18K::0325	This study
<del><i>P. putida</i> KT2440(pBBad18K::0327)</del>	<del><i>p. putida</i> KT2440 carrying pBBad18K::0327</del>	<del>This study</del>
<i>P. putida</i> KT2440(pBBad18K::0328)	<i>p. putida</i> KT2440 carrying pBBad18K::0328	This study
<i>P. putida</i> KT2440(pBBad18K::0704)	<i>p. putida</i> KT2440 carrying pBBad18K::0704	This study
<i>P. putida</i> KT2440(pBBad18K::0894)	<i>p. putida</i> KT2440 carrying pBBad18K::0894	This study
<i>P. putida</i> KT2440(pBBad18K::0895)	<i>p. putida</i> KT2440 carrying pBBad18K::0895	This study
<i>P. putida</i> KT2440(pBBad18K::0913)	<i>p. putida</i> KT2440 carrying pBBad18K::0913	This study
<i>P. putida</i> KT2440(pBBad18K::1616)	<i>p. putida</i> KT2440 carrying pBBad18K::1616	This study
<i>P. putida</i> KT2440(pBBad18K::1617)	<i>p. putida</i> KT2440 carrying pBBad18K::1617	This study
<i>P. putida</i> KT2440(pBBad18K::1741)	<i>p. putida</i> KT2440 carrying pBBad18K::1741	This study
<i>P. putida</i> KT2440(pBBad18K::2183)	<i>p. putida</i> KT2440 carrying pBBad18K::2183	This study
<i>P. putida</i> KT2440(pBBad18K::2184)	<i>p. putida</i> KT2440 carrying pBBad18K::2184	This study
<i>P. putida</i> KT2440(pBBad18K::2185)	<i>p. putida</i> KT2440 carrying pBBad18K::2185	This study
<i>P. putida</i> KT2440(pBBad18K::2193)	<i>p. putida</i> KT2440 carrying pBBad18K::2193	This study
<i>P. putida</i> KT2440(pBBad18K::2791)	<i>p. putida</i> KT2440 carrying pBBad18K::2791	This study
<i>P. putida</i> KT2440(pBBad18K::3190)	<i>p. putida</i> KT2440 carrying pBBad18K::3190	This study
<i>P. putida</i> KT2440(pBBad18K::3191)	<i>p. putida</i> KT2440 carrying pBBad18K::3191	This study
<i>P. putida</i> KT2440(pBBad18K::4389)	<i>p. putida</i> KT2440 carrying pBBad18K::4389	This study
<i>P. putida</i> KT2440(pBBad18K::4665)	<i>p. putida</i> KT2440 carrying pBBad18K::4665	This study

**Table 2-3. 本章で用いた菌株とプラスミド (4ページ中2 ページ目).**

Strain or plasmid	Relevant characteristics	Source or reference
Bacterial strains		
<i>P. putida</i> KT2440(pBBad18K::4858)	<i>p. putida</i> KT2440 carrying pBBad18K::4858	This study
<i>P. putida</i> KT2440(pBBad18K::4859)	<i>p. putida</i> KT2440 carrying pBBad18K::4859	This study
<i>P. putida</i> KT2440(pBBad18K::5033)	<i>p. putida</i> KT2440 carrying pBBad18K::5033	This study
<i>P. putida</i> KT2440(pBBad18K::5306)	<i>p. putida</i> KT2440 carrying pBBad18K::5306	This study
<i>P. putida</i> KT2440(pCAR1)	<i>P. putida</i> KT2440 harboring pCAR1, naturally Tc <sup>r</sup> , naturally Cm <sup>r</sup>	Miyakoshi <i>et al.</i> , 2007
KT2440(pCAR1 $\Delta$ <i>pmr</i> )	KT2440(pCAR1) single-deletion mutant lacking <i>pmr</i>	This study
KT2440(pCAR1 $\Delta$ <i>pnd</i> )	KT2440(pCAR1) single-deletion mutant lacking <i>pnd</i>	This study
KT2440(pCAR1 $\Delta$ <i>phu</i> )	KT2440(pCAR1) single-deletion mutant lacking <i>phu</i>	This study
KT2440(pCAR1 $\Delta$ <i>pmr</i> $\Delta$ <i>pnd</i> )	KT2440(pCAR1) double-deletion mutant lacking <i>pmr</i> and <i>pnd</i>	This study
KT2440(pCAR1 $\Delta$ <i>pmr</i> $\Delta$ <i>phu</i> )	KT2440(pCAR1) double-deletion mutant lacking <i>pmr</i> and <i>phu</i>	This study
KT2440(pCAR1 $\Delta$ <i>pnd</i> $\Delta$ <i>phu</i> )	KT2440(pCAR1) double-deletion mutant lacking <i>pnd</i> and <i>phu</i>	This study
KT2440(pCAR1[ $\Delta$ <i>pmr</i> $\Delta$ <i>phu</i> ]: <i>pmr</i> )	KT2440(pCAR1 $\Delta$ <i>pmr</i> $\Delta$ <i>phu</i> ) containing 0.57-kb <i>pmr</i> cassette inserted into 101,000-101,001 region of pCAR1	This study
KT2440(pCAR1[ $\Delta$ <i>pmr</i> $\Delta$ <i>pnd</i> ]: <i>pmr</i> )	KT2440(pCAR1 $\Delta$ <i>pmr</i> $\Delta$ <i>pnd</i> ) containing 0.57-kb <i>pmr</i> cassette inserted into 101,000-101,001 region of pCAR1	This study
<i>P. putida</i> KT2440(pCAR1) (pBBad18K::0308)	<i>p. putida</i> KT2440(pCAR1) carrying pBBad18K::0308	This study
<i>P. putida</i> KT2440(pCAR1) (pBBad18K::0309)	<i>p. putida</i> KT2440(pCAR1) carrying pBBad18K::0309	This study
<i>P. putida</i> KT2440(pCAR1) (pBBad18K::0310)	<i>p. putida</i> KT2440(pCAR1) carrying pBBad18K::0310	This study
<i>P. putida</i> KT2440(pCAR1) (pBBad18K::0311)	<i>p. putida</i> KT2440(pCAR1) carrying pBBad18K::0311	This study
<i>P. putida</i> KT2440(pCAR1) (pBBad18K::0315)	<i>p. putida</i> KT2440(pCAR1) carrying pBBad18K::0315	This study
<i>P. putida</i> KT2440(pCAR1) (pBBad18K::0316)	<i>p. putida</i> KT2440(pCAR1) carrying pBBad18K::0316	This study
<i>P. putida</i> KT2440(pCAR1) (pBBad18K::0322)	<i>p. putida</i> KT2440(pCAR1) carrying pBBad18K::0322	This study
<i>P. putida</i> KT2440(pCAR1) (pBBad18K::0323)	<i>p. putida</i> KT2440(pCAR1) carrying pBBad18K::0323	This study
<i>P. putida</i> KT2440(pCAR1) (pBBad18K::0324)	<i>p. putida</i> KT2440(pCAR1) carrying pBBad18K::0324	This study
<i>P. putida</i> KT2440(pCAR1) (pBBad18K::0325)	<i>p. putida</i> KT2440(pCAR1) carrying pBBad18K::0325	This study
<i>P. putida</i> KT2440(pCAR1) (pBBad18K::0327)	<i>p. putida</i> KT2440(pCAR1) carrying pBBad18K::0327	This study
<i>P. putida</i> KT2440(pCAR1) (pBBad18K::0328)	<i>p. putida</i> KT2440(pCAR1) carrying pBBad18K::0328	This study
<i>P. putida</i> KT2440(pCAR1) (pBBad18K::0704)	<i>p. putida</i> KT2440(pCAR1) carrying pBBad18K::0704	This study
<i>P. putida</i> KT2440(pCAR1) (pBBad18K::0894)	<i>p. putida</i> KT2440(pCAR1) carrying pBBad18K::0894	This study

**Table 2-3. 本章で用いた菌株とプラスミド (4ページ中3ページ目).**

Strain or plasmid	Relevant characteristics	Source or reference
Bacterial strains		
<i>P. putida</i> KT2440(pCAR1) (pBBad18K::0894)	<i>p. putida</i> KT2440(pCAR1) carrying pBBad18K::0894	This study
<i>P. putida</i> KT2440(pCAR1) (pBBad18K::0895)	<i>p. putida</i> KT2440(pCAR1) carrying pBBad18K::0895	This study
<i>P. putida</i> KT2440(pCAR1) (pBBad18K::0913)	<i>p. putida</i> KT2440(pCAR1) carrying pBBad18K::0913	This study
<i>P. putida</i> KT2440(pCAR1) (pBBad18K::1616)	<i>p. putida</i> KT2440(pCAR1) carrying pBBad18K::1616	This study
<i>P. putida</i> KT2440(pCAR1) (pBBad18K::1617)	<i>p. putida</i> KT2440(pCAR1) carrying pBBad18K::1617	This study
<i>P. putida</i> KT2440(pCAR1) (pBBad18K::1741)	<i>p. putida</i> KT2440(pCAR1) carrying pBBad18K::1741	This study
<i>P. putida</i> KT2440(pCAR1) (pBBad18K::2183)	<i>p. putida</i> KT2440(pCAR1) carrying pBBad18K::2183	This study
<i>P. putida</i> KT2440(pCAR1) (pBBad18K::2184)	<i>p. putida</i> KT2440(pCAR1) carrying pBBad18K::2184	This study
<i>P. putida</i> KT2440(pCAR1) (pBBad18K::2185)	<i>p. putida</i> KT2440(pCAR1) carrying pBBad18K::2185	This study
<i>P. putida</i> KT2440(pCAR1) (pBBad18K::2193)	<i>p. putida</i> KT2440(pCAR1) carrying pBBad18K::2193	This study
<i>P. putida</i> KT2440(pCAR1) (pBBad18K::2791)	<i>p. putida</i> KT2440(pCAR1) carrying pBBad18K::2791	This study
<i>P. putida</i> KT2440(pCAR1) (pBBad18K::3190)	<i>p. putida</i> KT2440(pCAR1) carrying pBBad18K::3190	This study
<del><i>P. putida</i> KT2440(pCAR1) (pBBad18K::3191)</del>	<del><i>p. putida</i> KT2440(pCAR1) carrying pBBad18K::3191</del>	<del>This study</del>
<i>P. putida</i> KT2440(pCAR1) (pBBad18K::4389)	<i>p. putida</i> KT2440(pCAR1) carrying pBBad18K::4389	This study
<i>P. putida</i> KT2440(pCAR1) (pBBad18K::4665)	<i>p. putida</i> KT2440(pCAR1) carrying pBBad18K::4665	This study
<i>P. putida</i> KT2440(pCAR1) (pBBad18K::4858)	<i>p. putida</i> KT2440(pCAR1) carrying pBBad18K::4858	This study
<i>P. putida</i> KT2440(pCAR1) (pBBad18K::4859)	<i>p. putida</i> KT2440(pCAR1) carrying pBBad18K::4859	This study
<i>P. putida</i> KT2440(pCAR1) (pBBad18K::5033)	<i>p. putida</i> KT2440(pCAR1) carrying pBBad18K::5033	This study
<i>P. putida</i> KT2440(pCAR1) (pBBad18K::5306)	<i>p. putida</i> KT2440(pCAR1) carrying pBBad18K::5306	This study
<i>P. putida</i> KT2440R(RP4)	KT2440Rif harboring RP4	This study
<i>P. putida</i> KT2440R(NAH7K2)	KT2440Rif harboring NAH7K2	This study
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO1	naturally Km <sup>r</sup>	Stover <i>et al.</i> , 2000
<i>P. aeruginosa</i> PAO1(pCAR1)	<i>P. aeruginosa</i> PAO1 harboring pCAR1, naturally Km <sup>r</sup>	Takahashi <i>et al.</i> , 2009
<i>P. fluorescens</i> Pf0-1	naturally Tc <sup>r</sup>	Deflaun <i>et al.</i> , 1990
<i>P. fluorescens</i> Pf0-1Km	<i>P. fluorescens</i> Pf0-1-derivative strain with the introduced Km <sup>r</sup> 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>E. coli</i> DH5 $\alpha$	F, $\phi$ 80d <i>lacZ</i> $\Delta$ M15, $\Delta$ ( <i>lacZYA-argF</i> )U169, <i>endA1</i> , <i>recA1</i> , <i>hsdR17</i> (tr <sub>K</sub> m <sub>K</sub> <sup>+</sup> ), <i>deoR</i> , <i>thi-1</i> , <i>supE44</i> , <i>gyrA96</i> , <i>relA1</i> , $\lambda$ , <i>phoA</i>	Toyobo

**Table 2-3. 本章で用いた菌株とプラスミド(4 ページ中4 ページ目).**

Strain or plasmid	Relevant characteristics	Source or reference
Bacterial strains		
pBBad18K	Broad host range vector, ParaBAD promoter, Km <sup>r</sup>	Sukchawalit <i>et al.</i> , 1999
pZErO-2	Cloning vector, MCS in <i>lacZ'</i> , <i>neo</i> , Km <sup>r</sup>	Invitrogen
RP4	IncP-1 group, self-transmissible, 60,099-bp, carries Km <sup>r</sup> , Tc <sup>r</sup> , Ap <sup>r</sup> genes	Pansegrau <i>et al.</i> , 1994
NAH7	IncP-9 group, self-transmissible, 82,232-bp, carries naphthalene-degradative genes	Sota <i>et al.</i> , 2006
NAH7K2	NAH7 derivative with kanamycin-resistant gene inserted into <i>nahAc</i> gene	Ono <i>et al.</i> , 2007
pCAR1	Isolated from <i>Pseudomonas resinovorans</i> CA10, carrying the <i>car</i> and <i>ant</i> operons, IncP-7group, self-transmissible	Maeda <i>et al.</i> , 2003; Shintani <i>et al.</i> , 2006; Takahashi <i>et al.</i> 2009

### 2-2-2. 試薬, 酵素, 基本的な実験操作

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) のものを添付のプロトコール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) を添付のプロトコールに従って用い, 反応液を直接大腸菌の形質転換に使用した. 「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. PCR, 使用したプライマー

PCRはKOD-Plus (Toyobo) をDNA polymeraseとして用い, 添付のプロトコールに従って行った. サーマルサイクラーにはPCR Thermal Cycler Standard (Takara Bio, Shiga, Japan) を用い, 以下のプログラムで行った. 本章で使用したプライマー (シグマアルドリッチジャパン及びライフテクノロジーズジャパンに合成を依頼した) はTable 2-4に示した.

<反応サイクル>

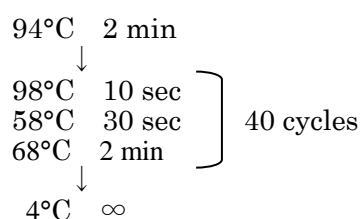


Table 2-4. 本章で使用したプライマー

Primer	Sequence (5' → 3')	Reference
<i>For sequencing of PCR-fragment cloned into pZErO-2-vector</i>		
PP_0322-F	<u>GAATTCAAGGAGAATACACAATGTTTCAGCAAGC</u>	This study
PP_0322-R	<u>CTGCAGTCAGCGGTAGACAGGGAAAT</u>	This study
PP_0324-F	<u>GAATTCAAGGAGACACCGTCATGTTGCATATTT</u>	This study
PP_0324-R	<u>CTGCAGTCATACTTTTTCCCCTTGGC</u>	This study
PP_0328-F	<u>GAATTCAAGGAGATAAGAGCATGTCTGGCAATC</u>	This study
PP_0328-R	<u>CTGCAGTTACGCCGCACCCCACATTT</u>	This study
PP_0704-F	<u>GAATTCAAGGAGACTCTACGATGCAGATCAACG</u>	This study
PP_0704-R	<u>CTGCAGTCAGGCATCGGCATAGCGCA</u>	This study
PP_0894-F	<u>GAATTCAAGGAGAATGTTCCATGACCGCAACCG</u>	This study



---

PP_0894-R	<u>CTGCAGTCAGGCAACCTGCTCCACCC</u>	This study
PP_1616-F	<u>GAATTCAAGGAGAGACCTTTGATGATCAAGT</u>	This study
PP_1616-R	<u>CTGCAGTCAGAAGTGGATCACGCTAC</u>	This study
PP_1617-F	<u>GAATTCAAGGAGAGTCTGTCATGAGCCTGGATA</u>	This study
PP_1617-R	<u>CTGCAGTTAAACCCGCCCCAGTGCCA</u>	This study
PP_1741-F	<u>GAATTCAAGGAGAGGATGCTTTGATGGCAACTT</u>	This study
PP_1741-R	<u>CTGCAGTTACTTGCCAGTCCACTCCT</u>	This study
PP_2183-F	<u>GAATTCAAGGAGACCGCTGTATGCCTGATGAAT</u>	This study
PP_2183-R	<u>CTGCAGTCAGCATGCTGAGTCCTCCC</u>	This study
PP_4665-F	<u>GAATTCAAGGAGATTGTGCCATGTCCGATTTC</u>	This study
PP_4665-R	<u>CTGCAGTCAGGCGAAGACGAAATACT</u>	This study
PP_4858-F	<u>GAATTCAAGGAGACGAAATCATGAAACGCCATC</u>	This study
PP_4858-R	<u>CTGCAGTCAGCTCACACGGCTGAGTT</u>	This study
PP_5306-F	<u>GAATTCAAGGAGAGGCCAGCATGACACGTACTC</u>	This study
PP_5306-R	<u>CTGCAGTTACCCACTTTCACCATGT</u>	This study
PP_0308-F	<u>TCTAGAAAGGAGACAGCCTGATGAGCCCAGCCG</u>	This study
PP_0308-R	<u>AAGCTTTTACTCGCCCCAGACATCCT</u>	This study
PP_0309-F	<u>TCTAGAAAGGAGAAGTTTCCATGGCCAAAATCG</u>	This study
PP_0309-R	<u>AAGCTTTTACAACGGCTTTGTAACGA</u>	This study
PP_0310-F	<u>TCTAGAAAGGAGATAGCGTCATGGCATTCTGAAG</u>	This study
PP_0310-R	<u>AAGCTTTCAGAAGTCCTTGACACAGGC</u>	This study
PP_0315-F	<u>TCTAGAAAGGAGAATACACGATGGACGTCACCG</u>	This study
PP_0315-R	<u>AAGCTTCTACTGCGCCTGCACTTCTT</u>	This study
PP_0316-F	<u>TCTAGAAAGGAGAGCTGGAGATGAACATGTCCG</u>	This study
PP_0316-R	<u>AAGCTTTCAGTAATCGATCCGCACAT</u>	This study
PP_0327-F	<u>TCTAGAAAGGAGACAAGAACATGAGTCGGGCAC</u>	This study
PP_0327-R	<u>AAGCTTTTACAGAACGACAGTCCGGT</u>	This study
PP_0895-F	<u>TCTAGAAAGGAGAGCCAAACATGGAAATACGCC</u>	This study
PP_0895-R	<u>AAGCTTTCATACCGGCAGTGCCTTGA</u>	This study
PP_2791-F	<u>TCTAGAAAGGAGACTGACTTTTGAAGAGTTGGC</u>	This study
PP_2791-R	<u>AAGCTTTCATGGCGCTTCGGCTCCGG</u>	This study
PP_4859-F	<u>TCTAGAAAGGAGACCGCATCATGCTGCCGCGCG</u>	This study
PP_4859-R	<u>AAGCTTTCAGTAGCCTGGGTTGCCGA</u>	This study
PP_5033-F	<u>TCTAGAAAGGAGACTTTCCCGTGACCGACAACA</u>	This study
PP_5033-R	<u>AAGCTTTCAGCCGGTGATCATCGGCA</u>	This study
PP_0311-F	<u>GAATTCAAGGAGAGCCTCCCATGTTGAACACCC</u>	This study

---

PP_0311-R	<u>TCTAGATCAGTGCACCTCCGCAGGTT</u>	This study
PP_0323-F	<u>GAATTCAAGGAGAACACACCATGCAACGTTACT</u>	This study
PP_0323-R	<u>TCTAGATTAGTGGGCGACGGCGGCGG</u>	This study
PP_0325-F	<u>GAATTCAAGGAGAAAAAAGTATGAGCCAGACCT</u>	This study
PP_0325-R	<u>TCTAGATTAGACGTTCTGCCGCTCAC</u>	This study
PP_2184-F	<u>GAATTCAAGGAGATCAACGGTTGCCGGGAGGAC</u>	This study
PP_2184-R	<u>TCTAGATCACTGTGCGGCCTCCGTGG</u>	This study
PP_2185-F	<u>GAATTCAAGGAGACCGCACAGTGATCAATTTCT</u>	This study
PP_2185-R	<u>TCTAGATCATCGGCGAACCTCGGCTT</u>	This study
PP_3191-F	<u>GAATTCAAGGAGACACGCTCTTGCTGTTTGTGG</u>	This study
PP_3191-R	<u>TCTAGATCATTGAACGGCCTCGAGGA</u>	This study
PP_4389-F	<u>GAATTCAAGGAGAAGCCGACATGACCACCACCA</u>	This study
PP_4389-R	<u>TCTAGACTAGATGCCGATGCTTTGGA</u>	This study
PP_3190-F	<u>GAATTCAAGGAGACCGTTCAATGAGGGTCTTCA</u>	This study
PP_3190-R	<u>TCTAGATCAGGTGCACAGGGCGGCCA</u>	This study
PP_0913-F	<u>TCTAGAAAGGAGAACCAATAATGATTCGAATGC</u>	This study
PP_0913-R	<u>GGTACCTCAGAACTCGTGATCCGCAG</u>	This study
PP_2193-F	<u>GAATTCAAGGAGATTACGACTTGTCAGGAAGCT</u>	This study
PP_2193-R	<u>AAGCTTTCAGTAAGCCATGCTCCAGC</u>	This study

Underlined nucleotides represent artificial restriction sites.

#### 2-2-4. 過剰発現株の作製

32 個の候補遺伝子について、Table 2-4 に示す制限酵素サイトを付加したプライマーセットと鋳型 *P. putida* KT2440 の total DNA を用いた PCR によって目的の各断を増幅した。各 PCR 産物の塩基配列を確認した後、その領域を含む *EcoRI-PstI*, *EcoRI-BamHI*, *EcoRI-XbaI*, *EcoRI-SphI*, or *XbaI-HindIII* 断片を pZerO<sup>TM</sup>-2 ベクター (Invitrogen, Carlsbad, CA) のクローニングサイトに挿入した。過剰発現をするプラスミドとしてアラビノース誘導性の pBBad18K [Sukchawalit *et al.*, 1999] を用いた。マルチクローニングサイト内に同様の制限酵素処理した pBBad18K にライゲーションすることで挿入した。作製したプラスミドをそれぞれエレクトロポレーションによる法によって導入した。各遺伝子の発現は終濃度 0.02 mM のアラビノースの添加により誘導した。エレクトロポレーション用の *P. putida* KT2440 株や *P. putida* KT2440(pCAR1) 株のコンピテントセルの調製については、補章 1 に詳細な手順を記した。

#### 2-2-5. エレクトロポレーション法による形質転換

*P. putida* KT2440 株及び *P. putida* KT2440 (pCAR1) 株に対して、作製したプラスミドをそれぞれ 100  $\mu$ l のコンピテントセルに 2  $\mu$ l ずつ入れ GENE PULSER II (Bio-Rad) 及び Gene Pulser Cuvette 0.1 cm (Bio-Rad) を用いてエレクトロポレーションを行った。15 kV/cm, 25  $\mu$ F, 200  $\Omega$  の条件で形質転換を行った。

#### 2-2-6. バイオフィルムの形成試験

##### ・静置培養系

各宿主の pCAR1 保持株・非保持株の、グリセロールストックを白金耳で LB 寒天培地にストリークし、30°C で培養した (24 時間以内)。出現したシングルコロニーを滅菌つまようじを用いて、LB 寒天培地と CAR プレートに 10 個程度パッチし、30°C で培養した (24 時間以内)。まず、pCAR1 保持株は CAR プレート上で CAR 資化能を有することを確認し、pCAR1 非保持株は CAR 資化能を持たないことを確認した。分解能を持つ菌体が CAR プレート上で生育すると CAR を資化し、コロニー周辺にクリアゾーンと呼ばれる透明な部位を形成する。そのため、CAR 分解能を有する pCAR1 保持株を検出することができる。次に、それぞれの LB 寒天培地上のコロニーを白金耳で 5 ml の LB 液体培地に植菌し、30°C, 300 rpm で 14-15 時間培養した (前培養)。得られた培養液を 35 mm の底がガラスになっているシャーレ (IWAKI, Tokyo, Japan) に OD<sub>600</sub> が 0.01 となるように植菌し、それを 60° 程度傾けた状態で、30°C で静置培養した。適当な時間で培養をやめ、2-2-7 に示す方法で共焦点レーザー顕微鏡によるバイオフィルムの観察を行った。実験の概略を Fig. 2-1 示す。

##### ・連続培養系

バイオフィルムの連続培養には、フローリアクター法を用いた [Palmer, 1999]。LB 液体培地で 30°C, 300 rpm で 14-15 時間振とう培養して前培養液を得た。これを、10 倍希釈した LB 培地 (1/10LB) で OD<sub>600</sub> が 0.01 になるように希釈した。次に、300  $\mu$ l の細胞懸濁液を三方活栓によりフローセル (流路サイズ 1 x 4 x 40 mm, H x W x L) (Stovall Life Science, Greensboro, NC, USA) の下流から注入した。この状態で、室温にて 1 時間静置することで微生物に付着を促した。最後に、0.2 ml/min の速度で 1/10LB 培地の連続供給を開始し、30°C で 24 時間培養を行った。顕微鏡観察は、2-2-7 に示す方法で共焦点レーザー顕微鏡による培養開始後 24 時間のバイオフィルムの観察を行った。本システムの各部位の各称と役割について、Fig. 2-2 に示す。

#### 2-2-7. 共焦点レーザー顕微鏡によるバイオフィルムの観察及び画像獲得

共焦点顕微鏡画像の取得には、40 倍 Plan-Apochromat 対物レンズ (開口数 1.4) を装備した Carl Zeiss LSM710 共焦点レーザー顕微鏡 (Carl Zeiss, Jena, Germany) を用いた。デ

ータ取得・観察は筑波大学院生命環境科の野村暢彦教授の研究室から機器を借りて行った。バイオフィルムの可視化には COCRM (Continuous Optimizing Confocal Reflection Microscopy) 法 [Yawata *et al.*, 2008] を用いた。本手法は、バイオフィルムの三次元構造を非破壊、非染色で可視化することが可能となり、つまりバイオフィルムを生きた状態で観察や解析などができる手法である。共焦点反射顕微鏡法においてはバイオフィルムをピーク波長 514 nm のヘリウムネオンレンズで照明し、反射光を 505-530 nm バンドパスフィルターを通して検出した。獲得した画像からバイオフィルムのバイオマスや厚さを定量するため、COMSTAT [Heydorn *et al.*, 2000] というソフトウェアを使って解析を行った。

#### 2-2-8. FM4-64 染色

FM4-64 染色液 (Invitrogen) による染色は、上記 2-2-6 (静置培養系) において記した方法で、底ガラスシャーレを用いて 30°C で静置培養したものを染色して観察に供した。具体的には、適当な時間の培養後にシャーレの培養液を捨て、終濃度 0.2  $\mu$ M の FM4-64 染色液を 1 ml 加えて室温で約 20 分間静置培養した。最後に、2-2-7 に示す方法で共焦点レーザー顕微鏡による 6 時間目と 12 時間目に観察を行った。

#### 2-2-9. pCAR1 保持率測定試験

KT2440(pCAR1)株、単独破壊株、二重破壊株および相補株が、バイオフィルム状態と浮遊状態での培養時にそれぞれ pCAR1 を安定に保持できるのかを調べた。実験の詳細な手順と概略を Fig. 2-3 と補章 1 に記した。

#### 2-2-10. タイリングアレイによるトランスクリプトーム解析

<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、*P. putida* KT2440 株の染色体 DNA 配列と pCAR1 の DNA 配列を基に同社の Custom Express Array Program によってそれぞれ設計したものを用いた。染色体のタイリングアレイについては、染色体 DNA の両鎖について 25 mer の DNA プローブが 1,110,578 本、11 塩基密度で敷き詰められている (Fig. 2-4A)。pCAR1 のタイリングアレイについては、pCAR1 の DNA の両鎖について 25 mer の DNA プローブが 43,750 本、9 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。

<サンプルの調製>

各株を Fig. 2-1 に示す方法で 5 ml の LB 液体培地で 30°C, 14 h, 300 rpm で振とう培養

した後、1 ml の LB 培地を含むシャーレに初期 OD<sub>600</sub> が 0.01 となるように植菌し、30°C で静置培養した。OD<sub>600</sub> が 0.35 から 0.4 の間の増殖期に達した時点、すなわちバイオフィームが最も形成された時点でシャーレに付着してある菌体よりサンプルを調製した。各サンプルとも独立した 2 つのフラスコで培養した 2 連のサンプルを用意した。cDNA 合成・ラベリング・断片化およびハイブリダイゼーション・検出は Affymetrix 社の推奨条件に準じて行った。なお、cDNA 合成の際には、DNA の複製や転写を阻害する抗生物質 actinomycin D (以下 ActD) を逆転写反応液に加えることでアンチセンス側の非特異的なシグナルを抑制することができるという知見 [Perocchi *et al.*, 2007] に基づき、逆転写反応液に終濃度 6 µg/ml の ActD を添加して逆転写反応を行った。また、RNA マッピングの詳細な手順は補章 1 に示す。

#### <検出後のデータ処理>

Affymetrix 社の Tiling Analysis Software Ver1.1.02 を用いて行い、1 連分のデータは前後 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 Bandwidth = 30 とした)。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した。また、データベースに登録されている最新のアノテーション情報を用い、各 ORF 内領域に敷き詰められているセンス側プローブのシグナル値の中央値を計算し、その ORF の転写量の代表値とした。

#### <オペロンの中央値の抽出>

フリー統計解析ソフト「R」を用いて、当研究室の宮腰らによって定義された pCAR1 上のオペロン [Miyakoshi *et al.*, 2009] に基づいて、各オペロン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平均値を計算し、そのオペロンの代表値とした (Fig. 2-4B)。「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。

#### <2 倍以上転写変動した遺伝子の抽出>

2 株間で 2 倍以上転写変動した遺伝子を抽出する方法を以下に示す。株 A (2 連のサンプルをそれぞれ A1, A2 とする) と株 B (2 連のサンプルをそれぞれ B1, B2 とする) で比較を行う際には、まず A1 と B1 のデータセットに対して KT2440 株染色体上 5,398 個の ORF の転写量について fold change の値を算出する。求めた 5,398 個の fold change の値でヒストグラムを描き、ヒストグラムのピークを fold change の“基準値”とする。基準値よりも 2 倍以上高い fold change を示したものを“転写量が増加した”遺伝子、2 分の 1 以下の fold change を示したものを“転写量が減少した”遺伝子とする。これを 4

組のデータセット全てで行い，全ての組み合わせで転写量が増加した遺伝子，および転写量が減少した遺伝子を転写変動した遺伝子として抽出した．pCAR1 上の 192 個の ORF に対しても同様の抽出を行った．なお，シグナル値が 64 未満のものは 2 連間の再現性が低かったため“転写されていない”とみなした．

<解析に用いたアノテーション情報>

アノテーション情報を *Pseudomonas Genome Database* の Web サイト (<http://www.pseudomonas.com/>) により CSV 形式でダウンロードして使用した．宿主の ORF 数 (rRNA, tRNA, small RNA を除いたもの) を示す (Table 2-5)．

**Table 2-5. 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

## 2-3. 結果

### 2-3-1. pCAR1 保持が宿主のバイオフィーム形成に与える影響の観察

(Lee *et al.*, 2014, *Environmental Microbiology report* 及び修士論文より改変・引用)

3種の *Pseudomonas* 属細菌の pCAR1 保持株・非保持株を、各々 Fig. 2-1 に示す方法で LB 培地を用いて静置培養した。2-2-7 に示す方法で、共焦点レーザー顕微鏡により気液界面付近に形成されるバイオフィームの形成様式を、3時間ごとに観察した。

まず、*P. putida* KT2440 株を経時的に観察したところ、pCAR1 保持株・非保持株とも培養後 3 時間目にバイオフィームが形成され、18 時間目にはがれていくことが観察された (Fig. 2-5)。形状を詳細に比較するためバイオフィーム形成開始 12 時間目の画像を拡大したところ、pCAR1 保持の KT2440(pCAR1) 株は厚さ 16 $\mu$ m 程度で繊維状 (filamentous) のフラット状のバイオフィームを、pCAR1 非保持の KT2440 株は厚さ 55  $\mu$ m マッシュルーム状のバイオフィームになる現象が観察された (Fig. 2-6)。次に、*P. aeruginosa* PAO1 株や *P. fluorescens* Pf0-1 株が pCAR1 保持・非保持で形成するバイオフィームの形状を観察したところ、両株も 3 時間目にバイオフィームが形成され、18 時間目にはがれていくことが観察されたが (Fig. 2-7, Fig. 2-8)、バイオフィームの形状に pCAR1 の保持は影響せず (Fig. 2-9)、さらに *P. putida* KT2440 株の場合よりバイオフィーム形成量が低い傾向が認められた。このような状況から、Fig. 2-6 に示した pCAR1 保持に伴うバイオフィームの繊維状化・フラット化という影響は *P. putida* に特異的である可能性が示唆された。

次に、培養方法の変化によるバイオフィーム形成様式を評価した。まず、フローセル (flowcell) を用いた連続観察系で KT2440 株のバイオフィーム形成の過程をリアルタイム非破壊で観察した結果、pCAR1 保持の KT2440(pCAR1) 株は繊維状のバイオフィームを、pCAR1 非保持の KT2440 株はマッシュルーム状のバイオフィームになり、静置培養系と同じように繊維状になる様子が観察された (Fig. 2-10)。また、振とう培養系で KT2440 株のバイオフィーム形成の過程を FM4-64 染色や共焦点レーザー顕微鏡による観察したところ、pCAR1 保持・非保持いずれの場合も繊維化は起こらないことが観察された (Fig. 2-11)。以上の結果を受けて、本研究では pCAR1 を保持した際に菌体が繊維状になる形質に注目し、KT2440 株だけを用いて以降の解析を行うことにした。

まず、バイオフィーム内の細胞形態がプラスミドの保持により変化する現象が他のプラスミドでも起こるのかについて調べた。pCAR1 と異なる Inc グループに属するナフトレン分解プラスミド NAH7 (IncP-1, 80kb) と薬剤耐性プラスミド RP4 (IncP-9, 60kb) 保持する KT2440 株を用いて、上で行ったのと同様な静置培養系での観察を行った。NAH7 と RP4 は高橋が作製した株を使用した [高橋, 2012 年東京大学博士論文]。なお RP4 と NAH7 の環状遺伝子マップを補章 Fig. 1, Fig. 2 にそれぞれ示す。その結果、KT2440(NAH7) 株と KT2440(RP4) 株のいずれの場合も時間経過と共にバイオフィームが

形成されて、はがれていくことが観察されたが (データ示さず), pCAR1 の場合に観察されたような繊維状化は起こらないことが観察された (Fig. 2-12). また, KT2440(pCAR1)株よりバイオフィーム形成量が少ない傾向が見られた.

次に, KT2440 株が pCAR1 保持により細胞が長く伸びている表現型は, 細胞分裂が滞って一細胞が伸びている, あるいは分裂は進行するが分裂後の細胞が分離してない2つの可能性が考えられる. これを確認するため, KT2440 株と KT2440(pCAR1)株をそれぞれ 2-2-6 に示す方法にて LB 液体培地で静置培養し, 培養開始後 6, 12 時間目に 2-2-8 に示す方法で染色して共焦点顕微鏡を用いて観察を行った. その結果, KT2440 株では 6, 12 時間で一つの細胞が繋がっていることは見えたが, 細胞が長く伸びている様子は観察できなかった (Fig. 2-13A). 一方, KT2440(pCAR1)株の場合, 一つの細胞が繋がっている様子や, 一細胞が長く伸びている様子の両方が観察できた (Fig. 2-13B). さらに, pCAR1 保持細胞は細胞の長軸の平均サイズが 5  $\mu\text{m}$  であったのに対し, 非保持細胞では平均 2  $\mu\text{m}$  と, pCAR1 保持細胞の方が細胞が伸長していることが明らかになった (Fig. 2-13).

### 2-3-2. NAPs の除去が宿主のバイオフィーム形成に与える影響

(Lee et al., 2014, *Environmental Microbiology Report* 及び修士論文より改変・引用)

pCAR1 上にコードされた3種の NAPs (Pmr, Phu, Pnd) が, 上記の pCAR1 を保持した際の繊維状化に関与するか否かを明らかにするため, *pmr*, *pnd*, *phu* をそれぞれ除去した単独破壊株・2つずつ除去した二重破壊株の観察を行った. 単独破壊株と二重破壊株は武田らが作製した株を使用し, 作製方法について概略図を補章 Fig. 3 に示す [武田, 2011 年東京大学博士論文].

#### (1) 単独破壊株の観察

単独破壊株 [(KT2440(pCAR1 $\Delta$ *pmr*), KT2440(pCAR1 $\Delta$ *pnd*), KT2440(pCAR1 $\Delta$ *phu*)] を Fig. 2-1 に示す方法で各々 LB 液体培地で静置培養し, 2-2-7 に示す方法で共焦点レーザー顕微鏡により気液界面付近に形成されるバイオフィームの形成様式を 3 時間ごとに観察した. いずれの株も 3 時間目にバイオフィームが形成され, 18 時間目にはがれていくことが観察され (Fig. 2-14), 野生型株である KT2440(pCAR1)株と比べて同程度に繊維状になり差が見られなかった (Fig. 2-15A).

#### (1)-1 単独破壊株と野生株の pCAR1 保持率比較

本研究開始以前に, *pmr* 破壊株が作製されており, その解析から *pmr* を破壊することにより pCAR1 上にコードされるプラスミドの分配に関する *parA*, *parB* の転写量が減少することが明らかになっていた [Yun and Suzuki et al., 2010]. このことから, 武田らは pCAR1 が不安定化している可能性を考え, 以前の研究とは異なる方法 (以前は *pmr* 破



壊に利用した Gm cassette 除去していないもの、今回は完全に除去したもの) により 3 種の *pmr*, *pnd*, *phu* の破壊株を作製し、各株および KT2440(pCAR1)株をコハク酸を唯一炭素源とする液体培地で継代培養し pCAR1 の保持率を比較したが、野生株と同様に pCAR1 を安定に保持することが明らかになっていた [武田, 2011 年東京大学博士論文; 廣谷, 2014 年東京大学修士論文]. 同様の懸念から、バイオフィーム形成するに伴って pCAR1 が脱落していく可能性を検討するためにバイオフィーム状態, 浮遊状態両方で pCAR1 安定性実験を行った.

まず, Fig. 2-1 に示した方法で静置培養し, 2-2-9 や Fig. 2-3 に示した方法に従って CAR 資化能を有する株の割合を測定した. バイオフィームを形成し始める 3 時間目と, はがれていく 18 時間目の各株, 各状態でそれぞれ 100 コロニーずつ CAR プレートにパッチして培養することでクリアゾーンの有無により CAR 資化能の保持率を測定した. バイオフィーム状態および浮遊状態で 2 連の実験を行った結果, KT2440(pCAR1)株および 3 株の単独破壊株でいずれも 99% 以上の CAR 資化能を安定に保持し, 保持率に差は認められなかった (Fig. 2-16, Fig. 2-17).

## (2) 二重破壊株の観察

NAPs は他の NAPs と協調的に作用しあいながら遺伝子の転写制御を行うことが知られているため [Dillon and Dorman, 2010], pCAR1 上にコードされる 3 種の NAPs も互いに協調的に作用する可能性が考えられた. そこで各 NAPs 遺伝子を 2 つずつ除去した二重破壊株 KT2440(pCAR1 $\Delta$ *pmr* $\Delta$ *pnd*)株, KT2440(pCAR1 $\Delta$ *pmr* $\Delta$ *phu*)株, および KT2440(pCAR1 $\Delta$ *pnd* $\Delta$ *phu*)株を用いて, LB 液体培地で静置培養し, 共焦点レーザー顕微鏡によりバイオフィームの形成様式を 3 時間ごとに観察することで表現型に差が生じるかどうかを調べた. その結果, KT2440(pCAR1 $\Delta$ *pnd* $\Delta$ *phu*)株では 3 時間目にバイオフィームが形成され, 18 時間目にはがれていくことが観察されたが (Fig. 2-18C), KT2440(pCAR1)株と比べて同程度に繊維状化しており, 形状に差は見られなかった (Fig. 2-15B). 一方, KT2440(pCAR1 $\Delta$ *pmr* $\Delta$ *pnd*)株及び KT2440(pCAR1 $\Delta$ *pmr* $\Delta$ *phu*)株では時間とともにバイオフィームが形成され, はがれていくことが観察され (Fig. 2-18A, B), KT2440(pCAR1)株より菌体が繊維状化しやすいことが観察された (Fig. 2-15B). また, フローセルを用いた連続観察系でバイオフィーム形成様式の観察を行ったところ, 静置培養系同じく KT2440(pCAR1)株より菌体が繊維状化しやすい様子が観察された (Fig. 2-19).

### (2)-1 二重破壊株と野生株の pCAR1 保持率比較

以前の武田の実験では, 3 種の *pmr*, *pnd*, *phu* 遺伝子のうち 2 つずつ除去した二重破壊株と野生株である KT2440(pCAR1)株をコハク酸を唯一炭素源とする液体培養で継代

培養し pCAR1 の保持率を比較していた。その結果から、KT2440(pCAR1 $\Delta$ pmr $\Delta$ pnd)株及び KT2440(pCAR1 $\Delta$ pmr $\Delta$ phu)株において、継代 1 回目では pCAR1 をかろうじて安定に保持していたが、継代 5 回目では pCAR1 の脱落頻度が増加することが明らかになっていった[2011 年東京大学博士論文; 廣谷, 2014 年東京大学修士論文] この結果から、本研究において行ったような二重破壊株を用いたバイオフィーム形成実験においても pCAR1 が不安定化している可能性を考え、バイオフィーム状態、浮遊状態の双方の状態の細胞中での pCAR1 の安定性を評価した。

二重破壊株および KT2440(pCAR1)株を Fig. 2-1 に示した方法で静置培養し、2-2-9 や Fig. 2-3 に示した方法に従って CAR 資化能を有する株の割合を測定した。バイオフィームが形成し始める 3 時間目とはがれていく 18 時間目の各株、各状態をそれぞれ 100 コロニーずつ CAR プレートにパッチすることで CAR 資化能の保持率を測定した。バイオフィーム状態および浮遊状態で 2 連の実験を行った結果、KT2440(pCAR1)株および 3 株の二重破壊株でいずれも 97 % 以上の CAR 資化能を安定に保持し、保持率に差は認められなかった (Fig. 2-20, Fig. 2-21)。

### (3) 相補株の観察

二重破壊株の結果から、pCAR1 を保持する KT2440 株では $\Delta$ pmr $\Delta$ pnd、あるいは $\Delta$ pmr $\Delta$ phu の 2 種の二重破壊によって“KT2440(pCAR1)株よりバイオフィームの繊維状化が激しくなる”という表現型を示すことが明らかとなったが、この表現型が“NAPs 遺伝子を破壊したことに起因する”ことを示すためには相補実験を行う必要がある。そこで、各二重破壊株に NAPs をコードする遺伝子を相補し、上記表現型が観察されなくなるかどうかを調べることにした。なお、各 NAPs 遺伝子の単独破壊株では繊維状化の亢進は見られないことから、ここでの相補株は KT2440(pCAR1 $\Delta$ pmr $\Delta$ pnd)株と KT2440(pCAR1 $\Delta$ pmr $\Delta$ phu)株に対し pmr 遺伝子をプロモーターごと相補したものを用いることにした。この相補株は以前当研究室の武田によって作成されていたもので [武田, 2011 年東京大学博士論文], 上流及び下流の ORF までの距離が長く、高密度タイリングアレイを用いた RNA マッピング解析により mRNA が転写されていないことが明らかとなった pCAR1 上の ORF98-99 遺伝子間領域に、pmr とそのプロモーター領域を導入することで、他の遺伝子の転写を阻害することなく pmr を intact に近い状態で発現・相補するものである。

相補株 KT2440(pCAR1[ $\Delta$ pmr $\Delta$ phu>::pmr)および KT2440(pCAR1[ $\Delta$ pmr $\Delta$ pnd>::pmr)を 2-2-2 に示した方法で静置培養し、共焦点レーザー顕微鏡によるバイオフィームの観察を行った結果、他の場合と同様に培養後 3 時間目にバイオフィームが形成され、18 時間目にはがれていくことが観察された(データ示さず)。いずれの相補株も単独破壊株と同様の表現型に回復したことから、二重破壊株の表現型が pCAR1 上の 3 つの核様体タンパク質遺伝子のうち pmr を含む 2 つの除去により発現したことが裏付けられた (Fig.

2-22).

### (3)-1 相補株の pCAR1 保持率測定

相補株 KT2440(pCAR1[ $\Delta pmr\Delta phu$ ]::pmr)および KT2440(pCAR1[ $\Delta pmr\Delta pnd$ ]::pmr)株を静置培養し、バイオフィーム状態、浮遊状態でそれぞれ CAR 資化能を有する株の割合を測定した。バイオフィームが形成し始める3時間目とはがれていく18時間目の各株、各状態をそれぞれ100コロニーずつ CAR プレートにパッチすることで CAR 資化能の保持率を測定した。バイオフィーム状態および浮遊状態で2連の実験を行った結果、バイオフィーム状態では98%以上、浮遊状態では100%の保持率を示し、CAR 資化能を安定に保持することを認めた (Fig. 2-23, Fig. 2-24)。

### 2-3-3. pCAR1 の保持, および NAPs 遺伝子の破壊による KT2440 株のトランスクリプトーム変化の解析 (Lee et al., 2014, *Environmental Microbiology Report* 及び修士論文より改変・引用)

2-3-1 や 2-3-2 での結果から、*P. putida* KT2440 株が pCAR1 を保持した際に菌体が繊維状になり、また2つの二重破壊株 [KT2440(pCAR1 $\Delta pmr\Delta pnd$ ), KT2440(pCAR1 $\Delta pmr\Delta phu$ )] で繊維状化が亢進することが明らかになった。

そこで、その原因を探するため、*P. putida* KT2440 株の pCAR1 保持・非保持株及び *pmr* と *pnd*, *pmr* と *phu* の2つの遺伝子の二重破壊株を Fig. 2-1 に示した方法で LB 培地で静置培養し、バイオフィームが最も良く成長した12時間に集菌した菌体より抽出した RNA から cDNA を合成してタイリングアレイ解析に供し、pCAR1 保持や NAPs 遺伝子の破壊による各遺伝子の転写変動の様子を網羅的に調べた。

まず、同じ株の2連のサンプルの一致度を調べた。1連ずつのデータから、各 ORF の中央値を算出して散布図を描いたところ、いずれも相関係数 0.93 以上の高い相関を示した (Fig. 2-25A)。2連でともに中央値 64 以上の ORF のみでは相関係数は 0.98 以上になった。一方、中央値が 64 未満の ORF については相関が悪くなり、いずれかのロットで中央値が 1 になるものが多数存在した、各プローブのシグナル値の最低値は 1 であり、これはそのプローブに cDNA のハイブリが認められないことを示す。そこで2連分のデータより算出した各 ORF の中央値についても、シグナル値が 64 未満の ORF は“転写されていない ORF” とみなすことにした。

シグナル値 64 以上のデータについて有意な発現があったと判断することにし、2連のデータから各プローブのシグナル値、さらには各遺伝子 (ORF) の発現量を表す代表値 (配列内部に配置されたプローブのシグナルの中央値) を算出し、これを以降の解析に用いた。

### 2-3-3-1. 浮遊状態とバイオフィルムの状態の比較

トランスクリプトームを比較した株の組み合わせを Table 2-6 に示す。

**Table 2-6.** トランスクリプトーム比較を行った株の組み合わせと評価する転写変動

Test sample	Reference sample	評価する転写変動
バイオフィルム状態	浮遊状態	バイオフィルム状態で特異的に生じる変動

まず、バイオフィルム状態で KT2440(pCAR1)株と KT2440 株のトランスクリプトームを比較した結果、染色体上で全 5,386 遺伝子のうち 52 遺伝子の転写量が増加し、29 遺伝子の転写量が減少した (Fig. 2-25B)。その多くは転写量が増加していたことから、pCAR1 保持は主に転写抑制因子として機能することが示唆された。

バイオフィルム状態では pCAR1 を保持することで菌体が繊維状になったが (Fig. 2-6)、浮遊状態では pCAR1 を保持しても菌体が繊維状にならないことから (Fig. 2-11)、バイオフィルム状態と浮遊状態のトランスクリプトーム比較をすることで、バイオフィルム状態で特異的に転写変動する遺伝子の選抜を行った。以前の研究において、コハク酸を唯一の炭素源とする液体培養で KT2440(pCAR1)株と KT2440 株のトランスクリプトーム比較が行われており、その結果 121 個 (転写量増加 88 個, 転写量減少 33 個) の遺伝子が選抜されている [Shintani *et al.*, 2010]。そこでまず、コハク酸を唯一の炭素源とする液体培養で 12 時間培養し KT2440 株と KT2440(pCAR1)株を観察したところ菌体が繊維状にならないことを確認した (データ示さず)。従って、以前の研究 (浮遊状態) と今回行った結果 (バイオフィルム状態) を比較したところ、染色体上では両条件共通に転写変動した遺伝子が 12 個 (増加 11 個, 減少 1 個) 選抜された一方、pCAR1 上では転写変動した遺伝子が選抜されなかった。染色体上の遺伝子のうち、両条件で共通して変動した遺伝子の中には、プラスミドの分配に関わる *parI* (PP\_3700) や薬剤排出ポンプをコードする *mexEF-oprN* (PP\_3425-PP\_3427) などが含まれていたが、このように共通して転写変動した遺伝子は繊維状化に関与する可能性が低いと考えられたため除外した。その結果、52 個の増加した遺伝子から 41 個、29 個の減少した遺伝子から 28 個の遺伝子がバイオフィルム状態で特異的で転写変動し (Fig. 2-26)、これらが繊維状化の原因遺伝子を含む可能性が高いと考えられた。バイオフィルム状態で特異的に転写変動した遺伝子の中では酸化還元関連遺伝子 (PP\_0308-0310 など) や鉄関連遺伝子 (PP\_2193, PP\_5306 など)、またはトランスポーター関連遺伝子 (PP\_1726, PP\_2656 - 2659, PP\_5326 - 5329 など) などが含まれていた。

### 2-3-3-2. *pmr* と *pnd*, *pmr* と *phu* の 2 種の二重破壊株と KT2440(pCAR1)株の比較

まず, *pmr* と *pnd*, および *pmr* と *phu* を除去した 2 種の二重破壊株と KT2440(pCAR1) 株のトランスクリプトーム比較を行うことで, 繊維状化を亢進する可能性が高い遺伝子を網羅的に選抜する. トランスクリプトームを比較した株の組み合わせを Table. 2-7 に示す.

**Table. 2-7. トランスクリプトーム比較を行った株の組み合わせと評価する転写変動**

Test sample	Reference sample	評価する転写変動
①KT2440(pCAR1Δ <i>pmr</i> Δ <i>pnd</i> )	KT2440(pCAR1)	<i>pmr</i> と <i>pnd</i> の破壊により生じる変動
②KT2440(pCAR1Δ <i>pmr</i> Δ <i>phu</i> )	KT2440(pCAR1)	<i>pmr</i> と <i>phu</i> の破壊により生じる変動

KT2440(pCAR1Δ*pmr*Δ*pnd*)株と KT2440(pCAR1)株のトランスクリプトームを比較した結果, 染色体上で全 5,398 遺伝子のうち 372 個の遺伝子の転写量が増加し, 8 個の遺伝子の転写量が減少した (Fig. 2-25B). pCAR1 上では全 200 遺伝子のうち転写量が増加した遺伝子はなく, 転写量が減少した遺伝子も除去した *pmr*, *pnd* ただ 2 つのみであった (データ示さず). 次に, KT2440(pCAR1Δ*pmr*Δ*phu*)株と KT2440(pCAR1)株のトランスクリプトームを比較した結果, 染色体上で全 5,398 遺伝子のうち 753 個の遺伝子の転写量が増加し (Fig. 2-25B), 5 個の遺伝子の転写量が減少した. pCAR1 上では全 200 遺伝子のうち転写量が増加した遺伝子はなく, 転写量が減少した遺伝子も除去した *pmr*, *phu* ただ 2 つのみであった (データ示さず). NAPs 間の相互作用の有無を考察するため, 遺伝子の重複を調べたところ, 186 個の遺伝子が共通して増加し, 共通に減少する遺伝子は検出されなかった (Fig. 2-27).

上で述べた 2 つの二重破壊株で共通して転写変動した遺伝子 (増加 186 個, 減少 0 個) や 2-3-3-1 の解析においてバイオフィーム状態で特異的に転写した遺伝子 (増加 41 個, 減少 28 個) で共通に増加した遺伝子の比較を行い, 繊維状化を亢進する原因遺伝子を絞り込んだ. その結果, 2 個の遺伝子が共通で転写が増加し, 共通に減少した遺伝子は選抜されなかった (Fig. 2-28). 共通して変動した遺伝子の中には ECF  $\sigma$  因子をコードすると考えられる PP\_0704 と TonB 依存型シデロフォア受容体をコードすると考えられる PP\_2193 が見出された. ECF  $\sigma$  は  $\sigma^{70}$  family に属するものであり, 細胞外の環境シグナルに応答する [Missiakas and Raina, 1998]. これまでに, さまざまな生体の機能を調節することがわかっており, 特に興味深いことに鉄取り込みに関与する ECF 因子の存在も明らかになっている [Leoni *et al.*, 2000]. そのため, PP\_0704 が PP\_2193 の転写制御に関与している可能性も考えられ, これら 2 遺伝子が選抜されたことは興味深い.

### 2-3-3-3. *pmr* と *pnd*, *pmr* と *phu* の 2 種の二重破壊株と KT2440 株の比較

次に, *pmr* と *pnd*, および *pmr* と *phu* を除去した 2 種の二重破壊株と KT2440 株のト

ランスクリプトーム比較を行うことで、繊維状化の原因になる可能性が高い遺伝子を網羅的に選抜した。トランスクリプトームを比較した株の組み合わせを Table. 2-8 に示す。

**Table. 2-8.** トランスクリプトーム比較を行った株の組み合わせと評価する転写変動

Test sample	Reference sample	評価する転写変動
①KT2440(pCAR1Δ <i>pmr</i> Δ <i>pnd</i> )	KT2440	<i>pmr</i> と <i>pnd</i> の破壊により生じる変動
②KT2440(pCAR1Δ <i>pmr</i> Δ <i>phu</i> )	KT2440	<i>pmr</i> と <i>phu</i> の破壊により生じる変動

KT2440(pCAR1Δ*pmr*Δ*pnd*)株と KT2440 株のバイオフィルム形成状態でのトランスクリプトームを比較した結果、染色体上の全 5,398 遺伝子のうち 1,115 個の遺伝子の転写量が増加し、22 個の遺伝子の転写量が減少した (Fig. 2-25B)。次に、KT2440(pCAR1Δ*pmr*Δ*phu*)株と KT2440 株のバイオフィルム形成状態でのトランスクリプトームを比較した結果、染色体上では全 5,398 遺伝子のうち 1,452 個の遺伝子の転写量が増加し、2 個の遺伝子の転写量が減少した (Fig. 2-25B)。NAPs 間の相互作用の有無を考察するため、遺伝子の重複を調べたところ、808 個の遺伝子が共通して増加し、共通に減少する遺伝子は検出されなかった (Fig. 2-29)。

上の解析で共通して選抜された遺伝子 (808 個, 減少 0 個) と **2-3-3-1** においてバイオフィルム状態で特異的に転写変動 (増加 41 個, 減少 28 個) した遺伝子との比較によって、共通に変動した遺伝子を選抜した。これらの遺伝子は繊維状化の原因遺伝子である可能性が高いと考えられる。その結果、32 個の遺伝子が共通に増加したが、共通に減少した遺伝子は抽出されなかった (Table. 2-9, Fig. 2-30)。共通して増加した遺伝子の中には、**2-3-3-2** で選抜された PP\_0704 と PP\_2193 が含まれていた。そこで、選抜された 32 個の遺伝子は繊維状化の原因遺伝子、あるいは繊維状化を亢進する遺伝子である可能性が高いため、選抜された候補遺伝子について高発現株を作製し、これらがバイオフィルム形成に及ぼす影響について解析を行った。

#### **2-3-3-4. pCAR1 特異的繊維状化の原因因子の探索と繊維状化メカニズムの解明**

まず、繊維状化しない宿主である KT2440 株と繊維状化する KT2440(pCAR1) 株細胞内で、それぞれ選抜された 32 個の候補遺伝子をアラビノース添加により挿入遺伝子が高発現する pBBad18K ベクターから高発現させ、各 32 過剰発現体において導入遺伝子の発現がバイオフィルムへ形成に及ぼす影響を共焦点レーザー顕微鏡を用いて評価した。詳細は以下の通り。

##### **・KT2440 株を用いた過剰発現株 - 繊維状化する遺伝子を探索**

まず、pBBad18KベクターがKT2440株に生育負荷を与えないか確認した。補章1 に示

**Table 2-9. 繊維状化の原因遺伝子, あるいは繊維状化を亢進する可能性が高い32個の候補遺伝子**

Locus	Gene	KT2440	$\Delta pmr\Delta pnd / \Delta pmr\Delta phu / \Delta pmr\Delta pnd / \Delta pmr\Delta phu$	KT2440	KT2440	KT2440	Description
Tag	Name	KT2440	KT2440	KT2440	KT2440	KT2440	
PP_0308		11.0	8.0	4.9			membrane dipeptidase
PP_0309		8.0	4.5	3.0			hypothetical protein
PP_0310		13.7	8.1	4.9			oxidoreductase, FMN-binding
PP_0311		8.8	4.4	3.1			iron-sulfur cluster-binding protein
PP_0315		9.4	6.0	3.7			Rieske (2Fe-2S) domain protein
PP_0316		5.1	3.5	3.3			oxidoreductase FAD-binding domain protein
PP_0322	<i>glyA-I</i>	8.8	6.1	3.1			serine hydroxymethyltransferase
PP_0323	<i>soxB</i>	8.5	6.5	3.7			sarcosine oxidase, beta subunit family
PP_0324	<i>soxD</i>	11.2	8.2	5.3			sarcosine oxidase, delta subunit family
PP_0325	<i>soxA</i>	7.9	6.2	4.1			sarcosine oxidase, alpha subunit family
PP_0327	<i>purU-I</i>	4.1	3.4	4.0			formyltetrahydrofolate deformylase
PP_0328	<i>filhA</i>	10.0	6.3	4.3			formaldehyde dehydrogenase, glutathione-independent
PP_0704		2.1	6.9	5.0	2.8	2.0	ECF subfamily RNA polymerase sigma factor
PP_0894		2.0	4.1	3.3			hypothetical protein
PP_0895		2.8	3.2	2.8			hypothetical protein
PP_0913		2.6	6.3	6.3			hypothetical protein
PP_1616		6.8	6.7	5.8			D-isomer specific 2-hydroxyacid dehydrogenase family protein
PP_1617		4.3	4.2	3.3			S-formylglutathione hydrolase
PP_1741		3.7	3.2	4.9			substrate-binding region of ABC-type glycine betaine transport system
PP_2183		5.0	4.4	3.3			formate dehydrogenase subunit gamma
PP_2184		4.5	3.6	2.9			NADH dehydrogenase (quinone)
PP_2185		5.8	4.0	4.1			formate dehydrogenase, alpha subunit
PP_2193		2.1	6.8	12.1	2.8	5.0	TonB-dependent siderophore receptor
PP_2791		2.1	3.5	2.5			aminoglycoside phosphotransferase
PP_3190		3.3	5.8	4.2			ornithine cyclodeaminase
PP_3191		3.7	7.6	6.1			hypothetical protein
PP_4389	<i>flgD</i>	2.1	3.3	4.5			flagellar basal body rod modification protein
PP_4665		15.6	14.4	2.8			hypothetical protein
PP_4858		64.1	72.6	74.1			hypothetical protein
PP_4859		2.4	5.2	6.2			TetR family transcriptional regulator
PP_5033	<i>hutU</i>	3.6	8.6	2.2			urocanate hydratase
PP_5306	<i>exbB</i>	2.4	6.6	5.0			ferric siderophore transport system protein ExbB

した方法でLB培地や0.02 % (w/v)のアラビノースを添加したLB培地で培養し、3時間ごとに24時間まで生育曲線の作成を行った。その結果、KT2440株とpBBad18Kを保持するKT2440(pBBad18K)株の生育はほぼ同じで (Fig. 2-31A), このベクターが入ることによって生育への影響は無いことを確認した。次に、Fig. 2-1に示す方法で12時間までバイオフィルムを形成させ、共焦点レーザー顕微鏡による画像を獲得し、表現型への影響を観察したところ、pBBad18K保持株・非保持株ともマッシュルーム状のバイオフィルムになり差が見られなかった (Fig. 2-32A)。また、画像を解析ソフトウェアであるCOMSTATを用いてバイオフィルム量を定量した結果、KT2440株は  $3.15 \pm 0.67 \mu\text{m}^3/\mu\text{m}^2$  でKT2440 (pBBad18K) 株では  $3.33 \pm 0.77 \mu\text{m}^3/\mu\text{m}^2$  のほぼ同じ数値を示し (Table 2-10), このベクターが入ることによってバイオフィルム量にも影響がないことが確認された。以上の結果を受けて、pBBad18Kを用いて各候補遺伝子がバイオフィルムへ及ぼす影響を解析することにした。

2-2-4に示した方法で32個の過剰発現株を作製し、各々Fig. 2-1に示す方法でLB培地を用いて静置培養し、2-2-7に示す方法で、共焦点レーザー顕微鏡により気液界面付近に形成されるバイオフィルムの形状を、培養6時間と12時間で観察を行った。その結果、ほとんどの株では6時間、12時間と共にKT2440株と同様にマッシュルーム状のバイオフィルムになり、バイオフィルムの形状に差が見られなかった (Fig. 2-33)。一方で、PP\_2193 (TonB-dependent siderophore receptor) を高発現させた株では菌体が伸びる現象が観察された (Fig. 2-34)。

#### ・KT2440(pCAR1)株を用いた過剰発現株 - 繊維状化を亢進する遺伝子を探索

KT2440(pCAR1)株でもまず pBBad18K ベクターが KT2440 株に挿入による生育負荷に影響があるかどうかを確認した。その結果、KT2440(pCAR1)株や pBBad18K を保持するKT2440(pCAR1) (pBBad18K)株の生育はほぼ同じで(Fig. 2-31B), このベクターが入ることによって生育への影響は無いことが確認された。また、共焦点レーザー顕微鏡による獲得した画像の解析から、表現型 (Fig. 2-32B) やバイオフィルム量 [KT2440(pCAR1) :  $0.73 \pm 0.49 \mu\text{m}^3/\mu\text{m}^2$ , KT2440(pCAR1)(pBBad18k) :  $0.84 \pm 0.37 \mu\text{m}^3/\mu\text{m}^2$  ほぼ同じ数値を示す] (Table 2-11) についても、このベクターが入ることによってバにも影響がないことが明らかになった。以上の結果を受けて、pBBad18k を用いて各候補遺伝子がバイオフィルムへ及ぼす影響を解析することにした。

その結果、ほとんどの株では6時間、12時間と共にKT2440(pCAR1)株と同様にフラットになり、繊維状化した菌体が観察され、差が見られなかったが (Fig. 2-35), PP\_0308 (membrane dipeptidase) や PP\_0309 (hypothetical protein) を高発現させた株で繊維状化の亢進が観察された (Fig. 2-36)。タイリングアレイを用いたRNA マッピングによる転写プロファイリングデータから、PP\_0308 から PP\_0310 までの遺伝子がオペロンを構成することが確認された (Fig. 2-37)。しかし、これらのオペロンの機能についてはまだ知



Table 2-10. COMSTATを用いたバイオフィルム量の定量.

	<b>Biomass (<math>\mu\text{m}^3/\mu\text{m}^2</math>)</b>	<b>Average thickness (<math>\mu\text{m}</math>)</b>
<b>KT2440</b>	3.15 $\pm$ 0.67	13.24 $\pm$ 3.76
<b>KT2440(pBBad18K)<sup>a</sup></b>	3.33 $\pm$ 0.77	13.11 $\pm$ 6.03
<b>KT2440(pCAR1)</b>	0.73 $\pm$ 0.49	3.42 $\pm$ 1.72
<b>KT2440(pCAR1)(pBBad18K)<sup>a</sup></b>	0.84 $\pm$ 0.37	4.44 $\pm$ 0.26

The values are the means of data from at least 3 image stacks. (Standard deviations is included as  $\pm$ )  
<sup>a</sup> Cultures were grown in the presence of 0.02% arabinose.

られていない。

#### 2-4. 考察

まず, KT2440 株では pCAR1 を保持することでバイオフィーム中で菌体が繊維状になったが, PAO1 株や Pf0-1 株では pCAR1 保持により差が見られなかった。このことは, pCAR1 保持に伴う宿主へのバイオフィーム形成様式は宿主によって異なることを示している。プラスミドを保持した際の宿主のバイオフィーム形成様式の変化を pCAR1 保持株と比較するにあたり, pCAR1 とは異なる Inc グループに属し, 全塩基配列決定済みで, KT2440 株内で安定に保持されるプラスミドとして NAH7 (IncP-1 群, 80 kb), RP4 (IncP-9 群, 60 kb) の 2 つについてバイオフィーム形成様式の変化を観察したが, 差は見られなかった。このことからプラスミド保持によってバイオフィームの形成様式が変わるという現象は pCAR1 (IncP-7 群, 200 kb) 又は IncP-7 群特異的に起こることが予想された。また, プラスミド保持によるバイオフィーム形成様式が“繊維状化する”とかいうケースは報告されてないが一方, プラスミド保持によるバイオフィーム形成量が上がる報告例が知られているので [Yang *et al.*, 2008; D'Alvise *et al.*, 2010], KT2440 株が pCAR1 保持によって繊維状の細胞形態に変化する現象は非常に興味深いと思われる。

次に, pCAR1 保持により菌体が繊維状化する様子を FM4-64 染色を用いて観察したところ, KT2440(pCAR1)株では細胞同士が繋がっている様子及び一細胞が長く伸びている様子の両方が観察されたが, 野生株である KT2440 株ではほとんど細胞が伸びていないことが観察された。KT2440(pCAR1)株が繊維状のバイオフィームになる現象は, 最初, 細胞が長く伸びた細胞が繊維状なバイオフィームを形成すると考えられる。

上記現象の原因としては, pCAR1 上にコードされている NAPs が考えられた。E. coli K-12 株において, global regulator である H-NS と, H-NS とアミノ酸レベル 58% の identity を示す StpA [Sonden and Uhlin, 1996; Zhang *et al.*, 1996] を 1 つずつ除去した単独破壊株ではバイオフィーム形成量が野生株より各々 2.5 倍, 2 倍, 減少し, 2 つ除去した二重破壊株ではほとんどバイオフィームを形成しないことが報告されている [Belik *et al.*, 2008]。本研究でも pCAR1 上にコードされている 3 つの NAPs 遺伝子の単独破壊株, 二重破壊株用いてバイオフィーム形成に与える影響を調べた結果, 単独破壊株では KT2440(pCAR1)株との差は見られなかったが, *pmr*, *phu* と *pmr*, *pnd* の 2 つの二重破壊株ではバイオフィームの繊維状化が激しくなる様子が観察された。また, 単独破壊株と二重破壊株及び野生株のそれぞれについてバイオフィーム状態や浮遊状態の両方で pCAR1 保持率測定を行ったところ, いずれの株も pCAR1 を安定に保持していることが明らかとなった。以上の解析により, NAPs 遺伝子がバイオフィーム形成様式に与える影響は, 1 つ破壊したことよりも, *pmr* を含む 2 つの NAPs 遺伝子を破壊したときに大きくなることが示された。

上記の *P. putida* KT2440 株が pCAR1 を保持した際に菌体が繊維状になる原因を探る

ため、pCAR1 保持や NAPs 遺伝子の破壊がバイオフィーム形成時のトランスクリプトームに及ぼす影響を高密度タイリングアレイで解析を行った。その結果、繊維状化の原因遺伝子、あるいは繊維状化を亢進する遺伝子と考えられる 32 個の候補遺伝子の選抜ができた。そこで、選抜された遺伝子について高発現株を作製し、これらがバイオフィーム形成に及ぼす影響を解析した。まず、KT2440 株を用いた過剰発現株では、ほとんどの株ではバイオフィームの形状に差が見られなかったが、PP\_2193(TonB-dependent siderophore receptor) を高発現させた株で菌体が伸びる現象が観察された。PP\_2193 は TonB 依存型シデロフォア受容体をコードすると考えられる遺伝子である。*Pseudomonas* 属細菌は難溶性の 3 価の鉄を獲得するため様々な siderophore と呼ばれる低分子生物を細胞外に放出して、そのキレート作用によって鉄と錯体を形成させ、特異的な受容体及び運搬システムによって細胞内に取り込む。最もよく知られている siderophore は pyoverdine (PVD) と呼ばれており、特に PAO1 株については詳細に解析が進められてきた [Visca *et al.*, 2007]。PVD は複数の *pvd* 遺伝子産物によって生合成され、Fur (ferric uptake regulatory protein) と PvdS という 2 つの因子によって *pvd* 遺伝子群の転写が制御されている。以前の当研究室での研究において、3 宿主の pCAR1 保持株と非保持株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トランスクリプトーム比較を行なった結果、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 [高橋, 2012 年東京大学博士論文]。pCAR1 を保持することで宿主細胞は実際に鉄欠乏状態に陥り、それが原因となって PVD 生合成・取り込みや PvdS に関与する遺伝子が 2 倍以上転写量が増加することが明らかになっている [Shintani *et al.*, 2010]。また、これらの遺伝子が誘導される部分的な原因は pCAR1 上のカルバゾール分解酵素の発現であることが示されている [Shintani *et al.*, 2010]。今回は、以前の研究とは違って PVD ではなく、他の siderophore の取り込みに関連する PP\_2193 (TonB-dependent siderophore receptor)が見出された。PP\_2193 は鉄欠乏の時に転写されると考える遺伝子であり、菌体の繊維状化への変化することによる細胞中の鉄欠乏が起きる可能性が示唆されている。これらの結果は、バイオフィーム状態でも pCAR1 を保持することで鉄獲得の必要性が高まっている可能性を想起させる。以前の研究とは、培地や培養条件が異なるため同列に議論することはできないが、鉄欠乏応答遺伝子が同様に選抜されたことは興味深い。

また以前の研究で、Phenotype Microarray (Biolog 社) を用いた解析によって、pCAR1 を保持した際に非保持株と比べて浸透圧や pH を変化させ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、特定のストレスへの耐性が低下することが明らかになっている [Takahashi *et al.*, 2014]。KT2440 株の繊維状化した状態は繊維状化しない状態より様々な環境ストレスに対し、高い耐性を持っていることから、菌体の繊維状化は様々な環境に適応し、有利な特性を付与することが示唆されている [Crabbé *et al.*, 2012]。すなわち、pCAR1 保持によって宿主細胞に鉄の必要性が高まり、PP\_2193 の高発現は結果

的に KT2440 株にストレス状態を促進し、ストレス条件に対する応答として、バイオフィルムが繊維状化する可能性が考えられる。

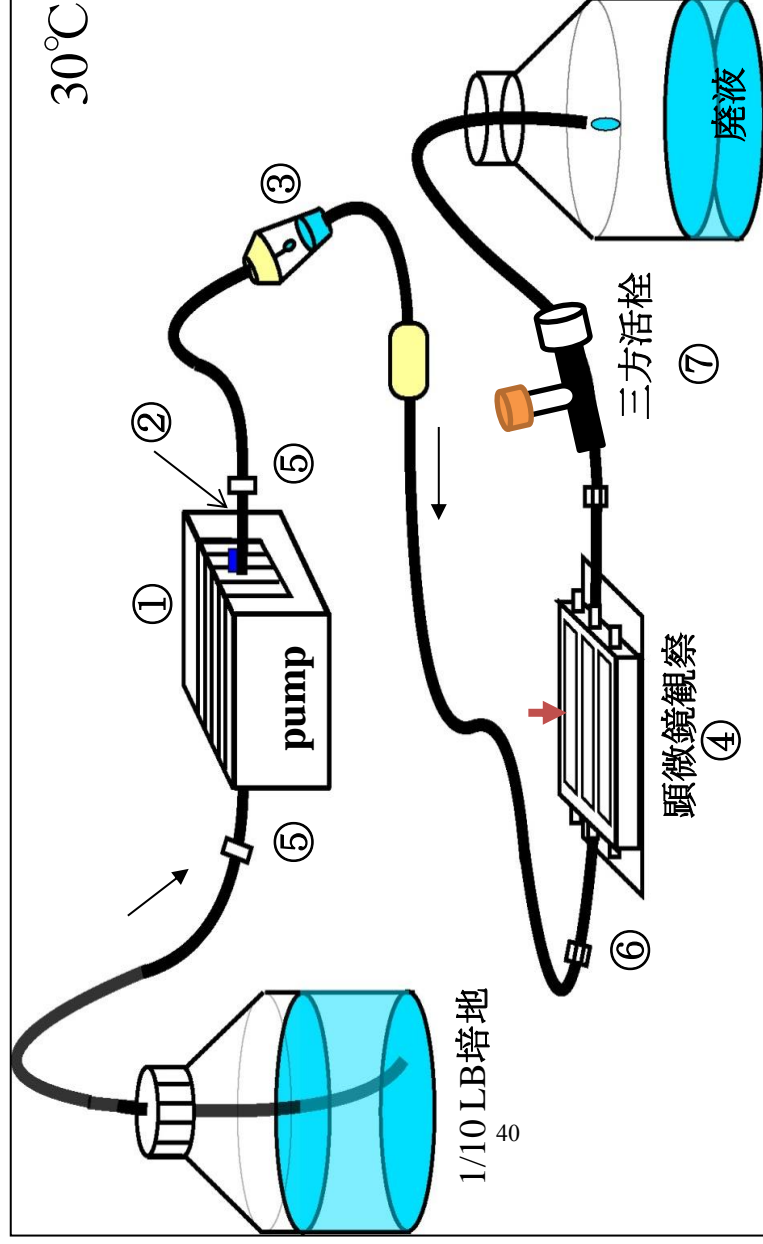
また、KT2440(pCAR1) 株を用いた過剰発現株では、32 株中、PP\_0308(membrane dipeptidase) や PP\_0309(hypothetical protein) を高発現させた株で繊維状化の亢進が観察された。PP\_0309 は機能未知で、PP\_0308 はアミノ酸にジペプチドを加水分解する膜ジペプチダーゼをコードすると考えられる。PP\_0308 は、浮遊状態で KT2440 株の繊維状化を誘導する条件と非誘導する条件下でのプロテオーム解析から、転写抑制されていることが報告されている [Crabbé *et al.*, 2012]。本研究では、以前の研究とは違って当該遺伝子は転写誘導されたが、これは以前の研究は浮遊状態でプラスミド非保持での解析結果などの実験条件での違いのため同列に議論することはできないが同様の遺伝子が選抜されたことは興味深い。なお PP\_0309 や PP\_0308 遺伝子の詳細な生理機能は不明である。

KT2440 株を用いた過剰発現株では PP\_2193 を高発現させた株のみで菌体が伸びる現象が観察され、KT2440(pCAR1)株を用いた過剰発現株では、PP\_0308, PP\_0309 の 2 つの繊維状化を亢進する遺伝子が見つかった。このような結果から、繊維状化そのものに関与する遺伝子は繊維状化の亢進には関与しない、さらに繊維状化を亢進する遺伝子は繊維状化そのものには関与しないと考えられ、バイオフィルムの繊維状化そのものと繊維状化の亢進ではメカニズムが違う可能性が示唆された。このことから、KT2440 株が pCAR1 を保持することで繊維状化する原因は、少なくとも三つの遺伝子、PP\_0308, PP\_0309, および PP\_2193 を含む複数の遺伝子が転写誘導されることによる協調的影響であることが示唆された。

なお、本章の内容については以下の原著論文で発表した。

**Lee SU, Takahashi Y, Oura H, Okada K, Yamane H, Nomura N, Nojiri H.** 2014. Effects of carbazole-degradative plasmid pCAR1 on biofilm morphology in three *Pseudomonas* strains. *Environmental Microbiology Report*

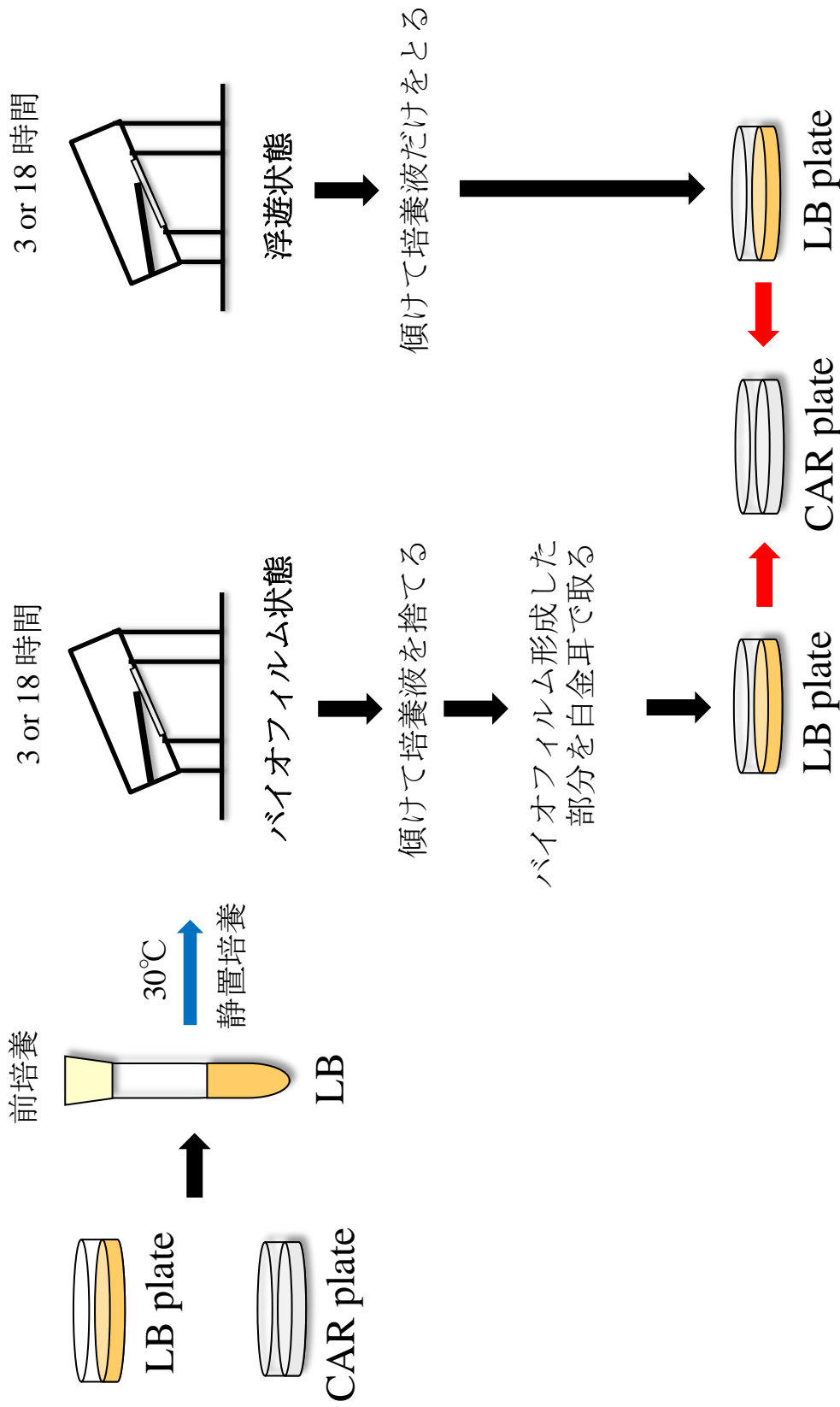




- ①Peristaltic pump (ISMATEC社製)：培地を一定の流速で送ることが出来る。
- ②Color-coded-2-stop tube (ISMATEC社製)：Peristaltic pumpに固定できるチューブで、培地を一定の速度で送るために重要である。内径は1.5 mmである。
- ③Bubble trap「バブ」：培地に含まれる泡を取り除く。
- ④Flowcell (STOVAL LIFE SCIENCE製)：3つのチャンネルが1枚のカバーガラスで覆われた構造である。各チャンネルの寸法は深さ1 mm x 幅4 mm x 長さ40 mmである。上部のカバーガラスにバイオフィルムを形成させる。
- ⑤Reducer tube connector (ISMATEC社製)：内径の異なるチューブ同士をつなぐ。内径は1.5 mm-2.5 mmである。
- ⑥エクステンションチューブ(NIPRO製)：Flowcellとbubble trapをつなぐ。内径は1.5 mmである。
- ⑦三方活栓(TERUMO社製)：ここより培養液を注入する。

Fig. 2-2. Flowcell の概略図.

LB 液体培地で 30°C, 300 rpm で14 時間振とう培養して前培養液を得た。これを, 10 倍希釈した LB 培地 (1/10LB) で OD<sub>600</sub> が 0.01 になるように希釈した。次に, 細胞懸濁液を三方活栓によりフロースセルに下流から注入した。この状態で, 室温にて1 時間静置した。最後に, peristaltic pump により 0.2 ml/min の速度で 1/10LB 培地の連続供給を開始し, 30°Cで 24 時間培養を行った。顕微鏡観察については, 共焦点レーザー顕微鏡による観察を行った。

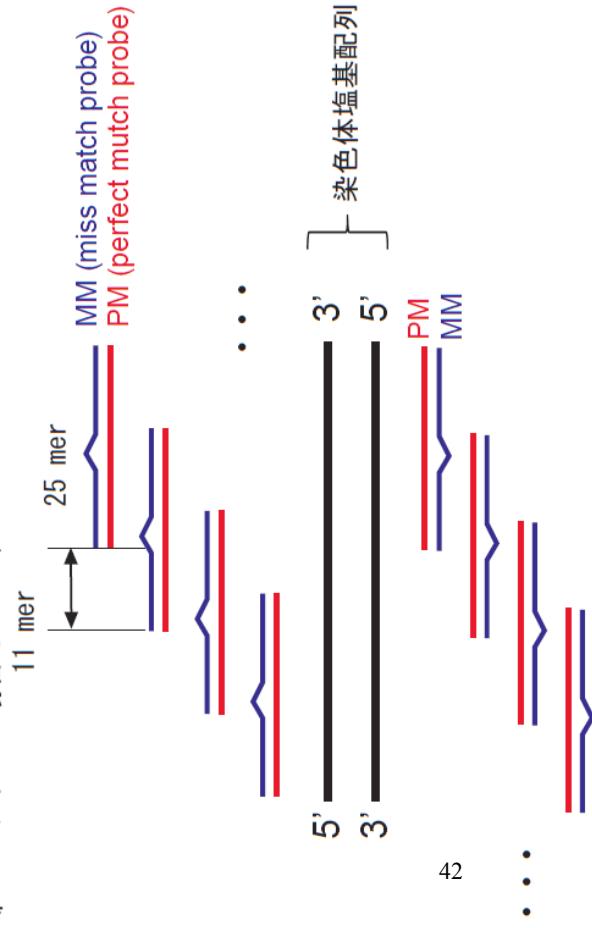


**Fig. 2-3. LB 液体培地で静置培養する時のバイオフィーム状態及び浮遊状態での pCAR1 保持率測定試験.**

CAR は carbazole, 黒矢印は白金耳を用いた植菌, 青矢印は  $OD_{600}$  が 0.01 となるように植菌, 赤矢印は滅菌つまようじを用いたパッチによる植菌したことを表す. まず, バイオフィーム状態ではシャーレ付着している菌を白金耳で LB 寒天培地に塗布し, 浮遊状態ではシャーレ付着しない培養液を白金耳で LB 寒天培地に塗布しコロニーを生じさせた後, CAR プレートにパッチし, CAR 質化能の有無の解析を行った. サンプルリングはバイオフィームが形成される 3 時間目およびはがれて行く 18 時間目で行った.

(A)

(pCAR1 チップの場合は 9 mer)



42

(B)

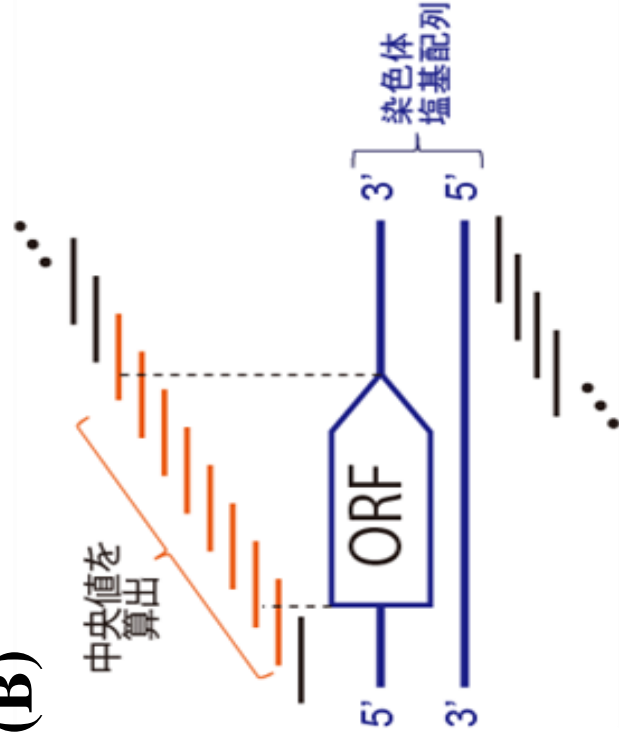
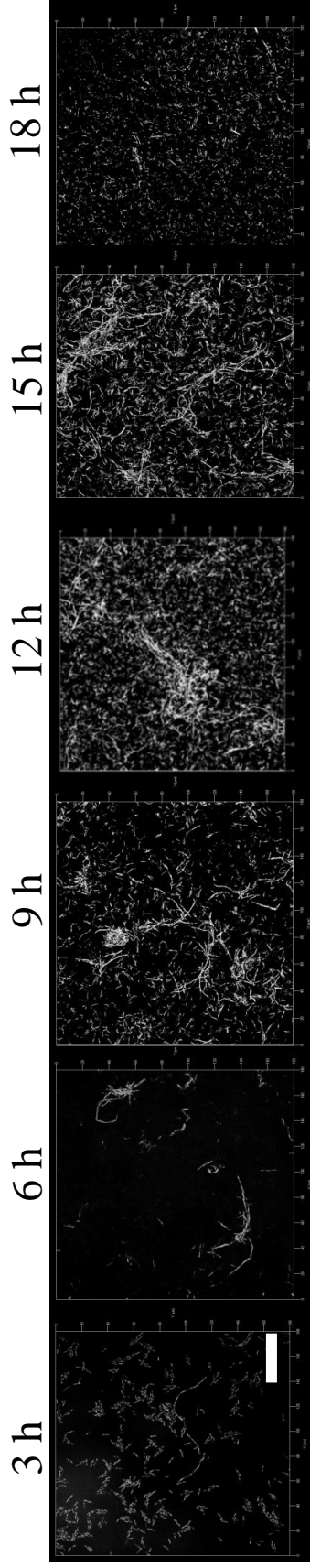


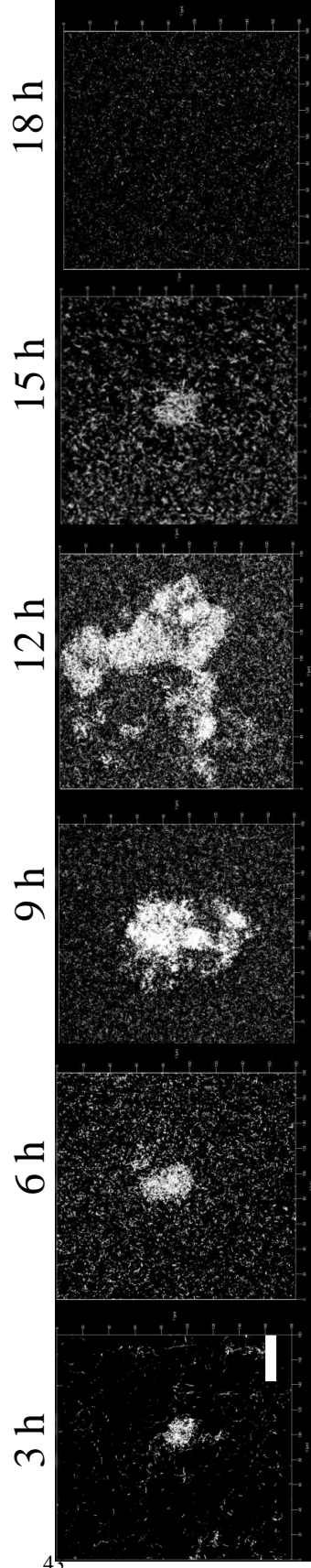
Fig. 2-4. カスタムタイリングアレイ上のプローブの並び方.

(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, 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. [高橋, 2012のFigure 2-3を引用]





## pCAR1あり

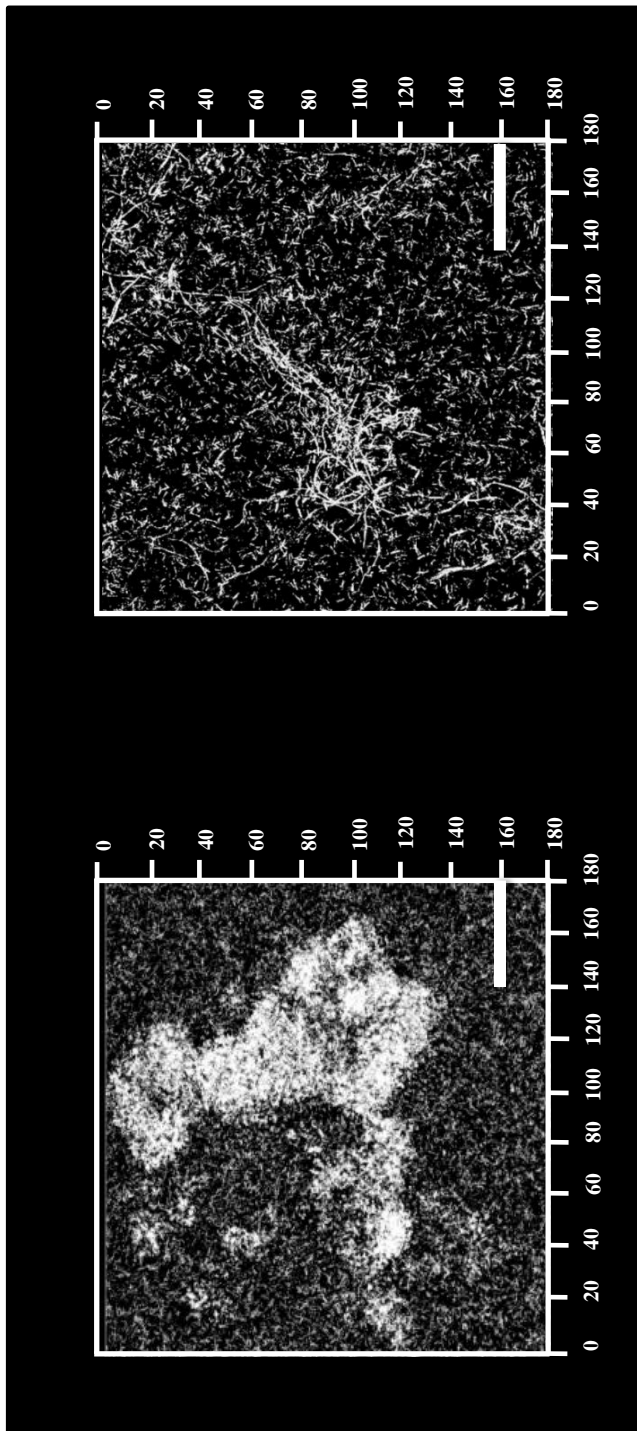


## pCAR1なし

**Fig. 2-5. KT2440株が LB 培地を用いた静置培養時に形成するバイオフィルムの経時的観察.**

上段：pCAR1 保持株，下段：pCAR1 非保持株

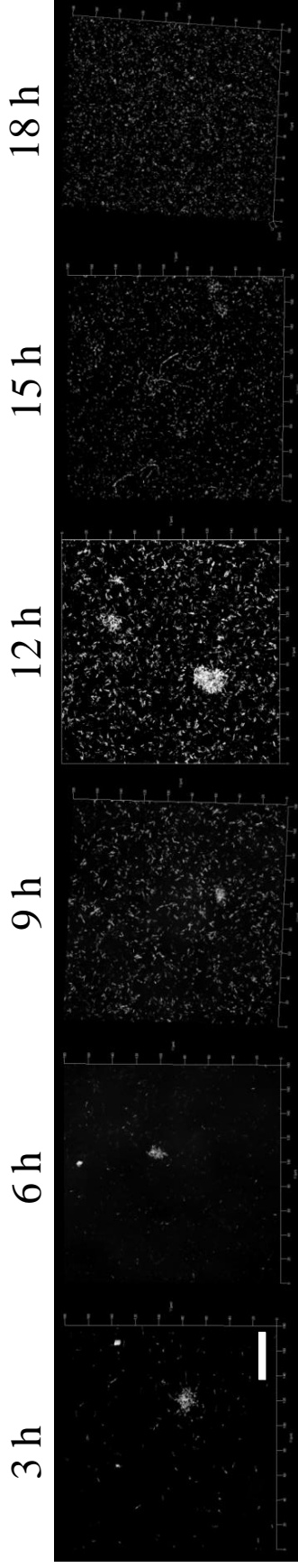
*P. putida* KT2440株，*P. putida* KT2440(pCAR1)株をそれぞれFig. 2-1に示す方法でLB 液体培地で静置培養し，培養開始後3，6，9，12，15，18 時間に共焦点顕微鏡を用いて画像を取得した．どちらも時間とともにバイオフィルムが形成され，はがれていくことが観察された．180 x 180  $\mu\text{m}$  (xy) の範囲を示す．画像は10枚の写真の中から代表的な例を示した．図中のスケールバーは40  $\mu\text{m}$  を示す．



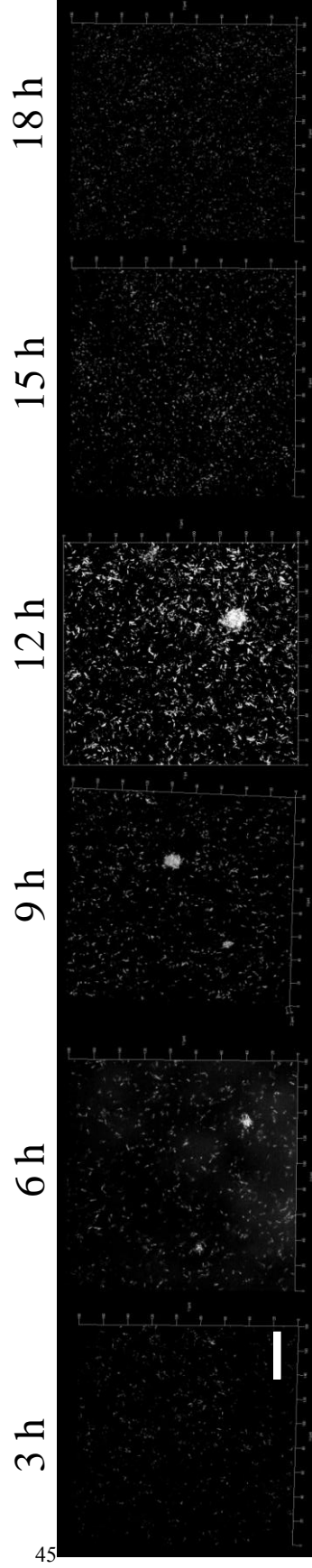
**Fig. 2-6. KT2440株が pCARI 有無によって形成するバイオフィルムの構造比較-静置培養.**

左：pCARI 非保持株，右：pCARI 保持株

pCARIを保持しないとマッシュルーム状のバイオフィルムを形成し(左)，pCARIを保持すると菌体が繊維状になりフラット状のバイオフィルムが形成された(右)．バイオフィルムの画像は，バイオフィルム形成開始 12 時間目の画像で，同じ時点でバイオフィルム試料の異なる位置から5つ画像を取って，代表的な例を示した．スケールバーは 40  $\mu\text{m}$  を示す． 180 x 180  $\mu\text{m}$  (xy) の範囲を示す．



## pCAR1あり



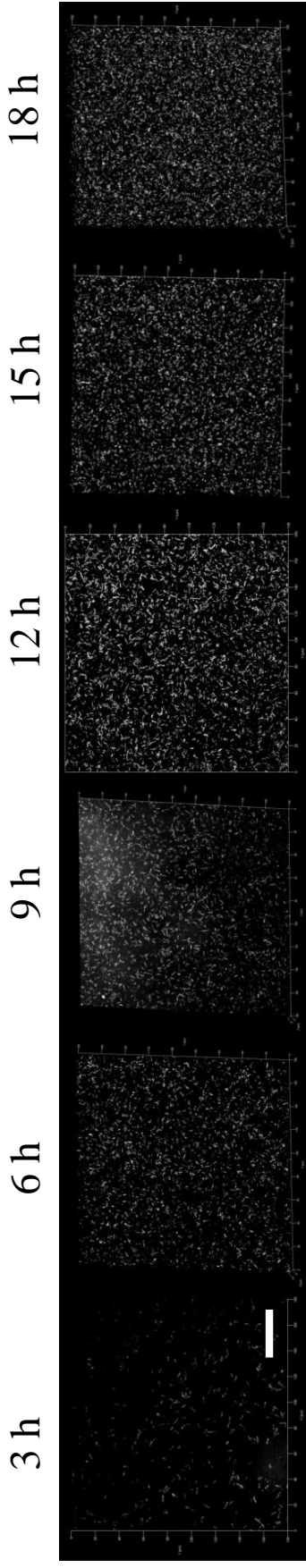
## pCAR1なし

**Fig. 2-7. PAO1株が LB 培地を用いた静置培養時に形成するバイオフィルムの経時的観察.**

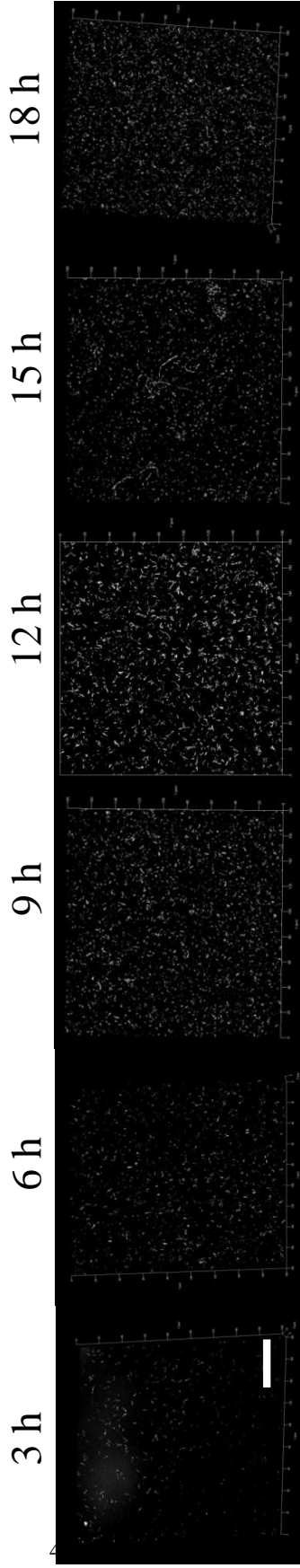
上段：pCAR1 保持株， 下段：pCAR1 非保持株

*P. aeruginosa* PAO1株， *P. aeruginosa* PAO1(pCAR1)株をそれぞれFig. 2-1に示す方法でLB 液体培地で静置培養し，培養開始後3，6，9，12，15，18 時間に共焦点顕微鏡を用いて画像を取得した． どちらも時間とともにバイオフィルムが形成され，はがれていくことが観察された． 180 x 180  $\mu\text{m}$  (xy) の範囲を示す． 画像は10 枚の写真の中から代表的な例を示した． 図中のスケールバーは 40  $\mu\text{m}$  を示す．





## pCARIあり

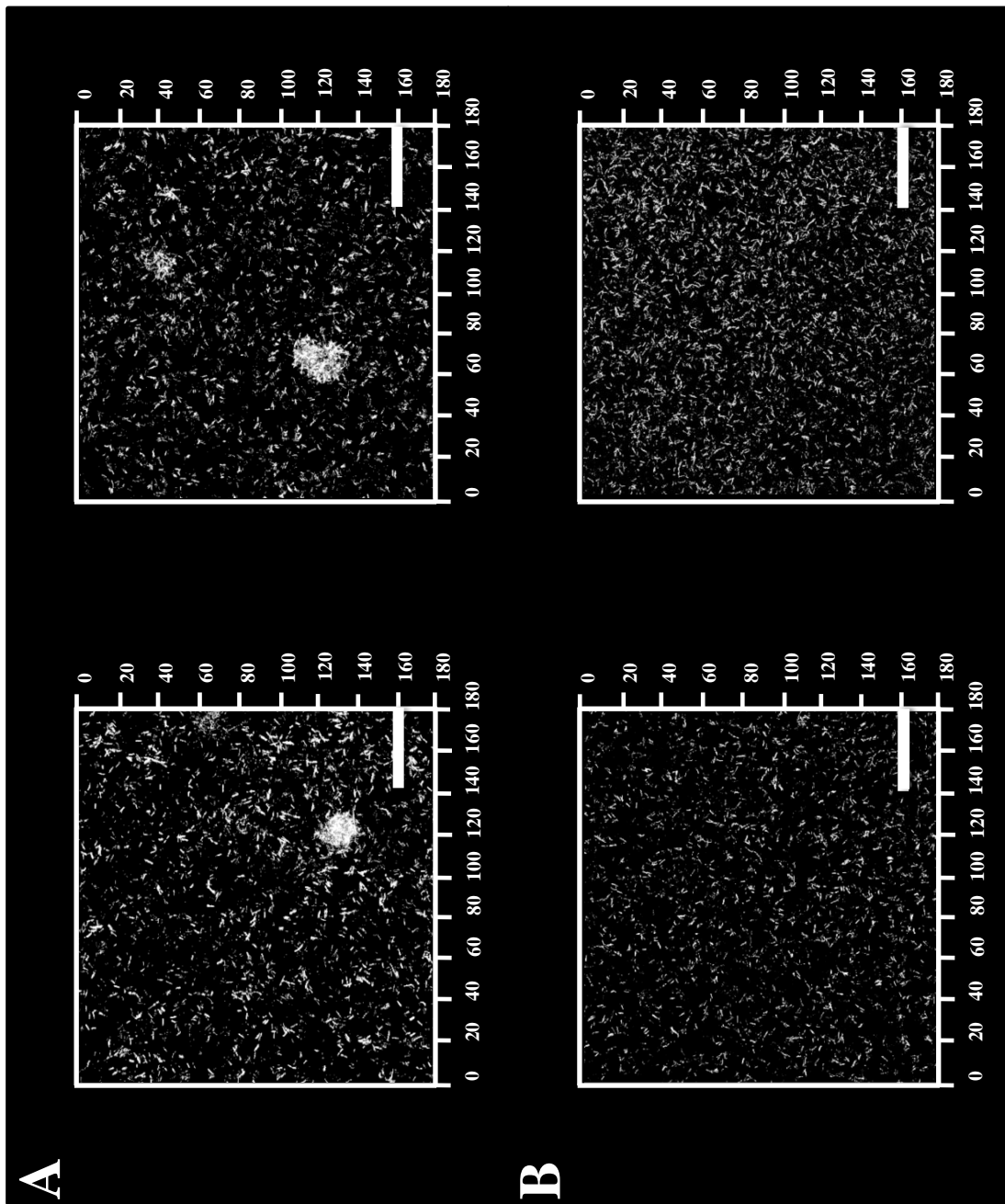


## pCARIなし

**Fig. 2-8. Pf0-1株が LB 培地を用いた静置培養時に形成するバイオフィルムの経時的観察.**

上段：pCARI 保持株， 下段：pCARI 非保持株

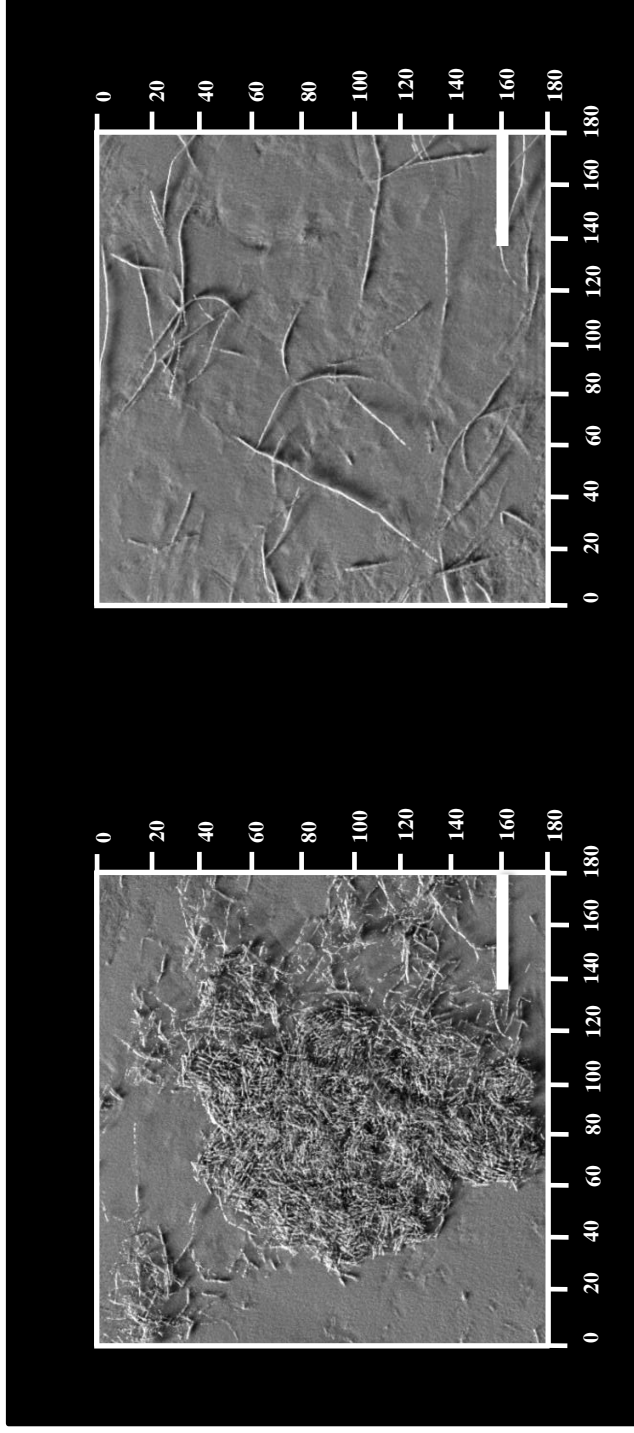
*P. fluorescence* Pf0-1株, *P. fluorescence* Pf0-1(pCARI)株をそれぞれFig. 2-1 に示す方法で LB 液体培地で静置培養し, 培養開始後 3, 6, 9, 12, 15, 18 時間に共焦点顕微鏡を用いて取得した画像であり, どちらも時間もバイオフィルムが形成され, はがれていくことが観察された. 180 x 180  $\mu\text{m}$  (xy) の範囲を示す. 画像は 10 枚の写真の中から代表的な例を示した. 図中のスケールバーは 40  $\mu\text{m}$  を示す.



**Fig. 2-9. PAO1株やPf0-1株が pCAR1 有無によって形成するバイオフィルムの構造比較.**

左：pCAR1 非保持株，右：pCAR1 保持株

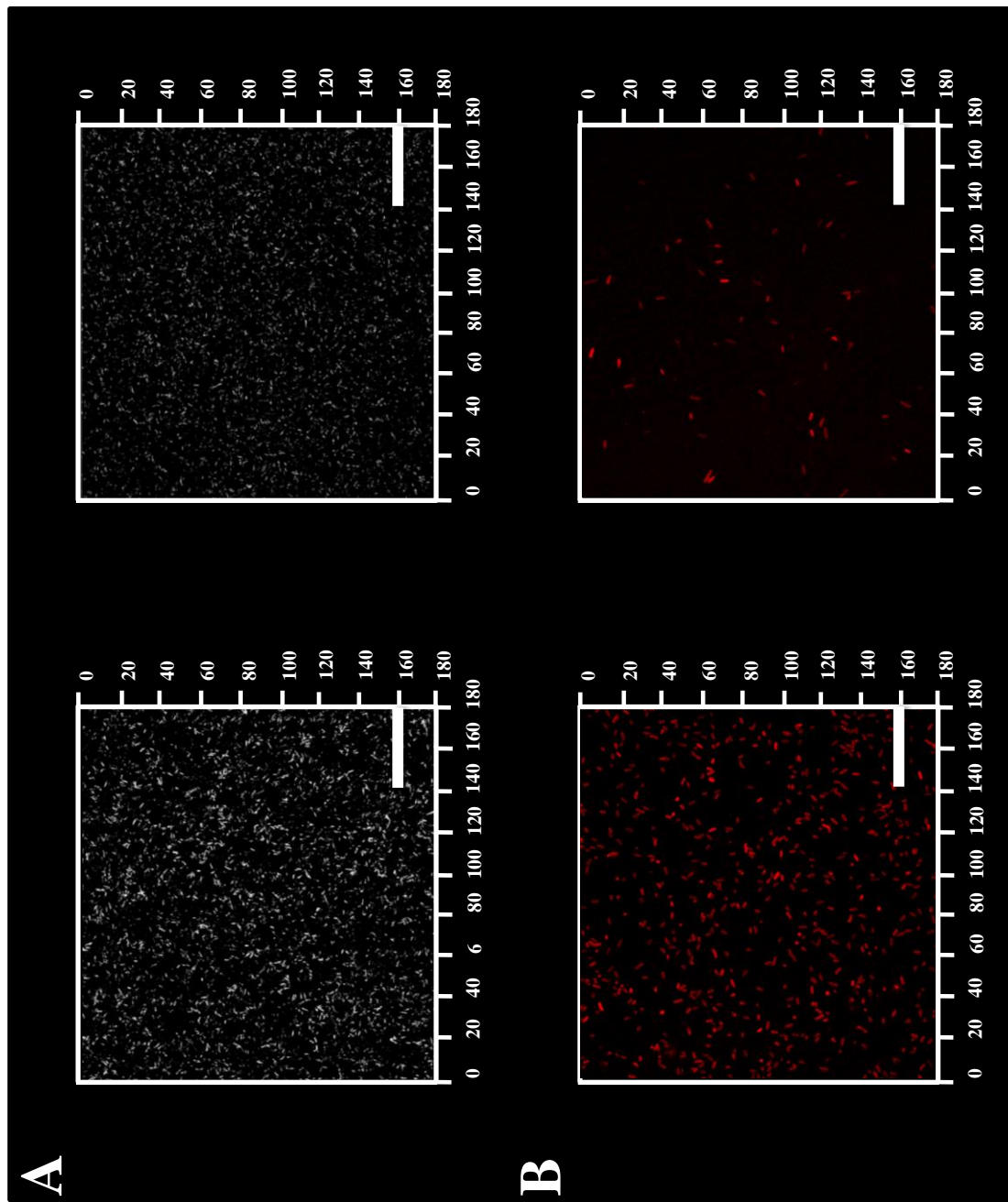
バイオフィルムの画像は、バイオフィルム形成開始 12 時間目の画像で、同じ時点でバイオフィルム試料の異なる位置から5つ画像を取って、代表的な例を示した。(A) PAO1株での画像(B) Pf0-1株での画像を示す180 x 180  $\mu\text{m}$  (xy) の範囲を示す。スケールバーは 40  $\mu\text{m}$  を示す。画像は5枚の写真の中から代表的な例を示した。



**Fig. 2-10. KT2440株が pCARI 有無によって形成するバイオフィルムの構造比較-連続培養.**

左：pCARI 非保持株，右：pCARI 保持株

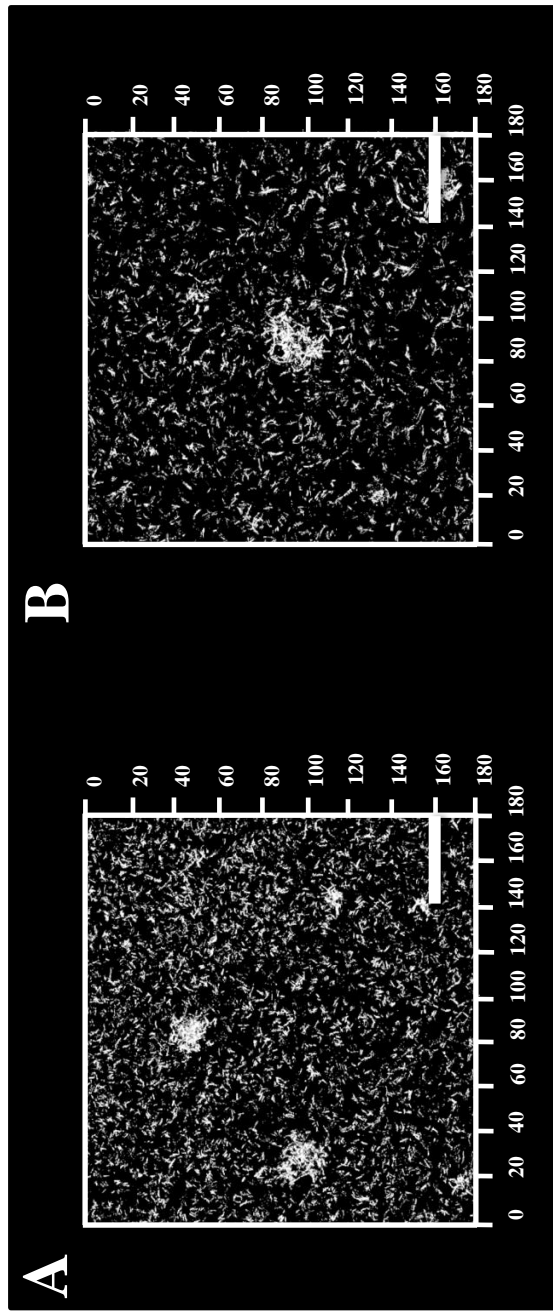
pCARI を保持しないとマッシュルーム状のバイオフィルムを形成し(左)，pCARI を保持すると菌体が繊維状になりフラット状のバイオフィルムが形成された(右)。バイオフィルムの画像は，バイオフィルム形成開始 12 時間目の画像で，同じ時点でバイオフィルム試料の異なる位置から 5 つ画像を取って，代表的な例を示した。スケールバーは 40 μm を示す。180 x 180 μm (xy) の範囲を示す。



**Fig. 2-11. KT2440株が pCAR1 有無によって形成する細胞の構造比較-振とう培養.**

左：pCAR1非保持株，右：pCAR1保持株

KT2440株をLB 液体培地で振とう培養し，培養開始後 12時間に共焦点顕微鏡を用いて画像を取得した．(A)非染色の画像(B) FM4-64 染色による細胞の構造を示す．図中のスケールバーは 40  $\mu\text{m}$  を示す．

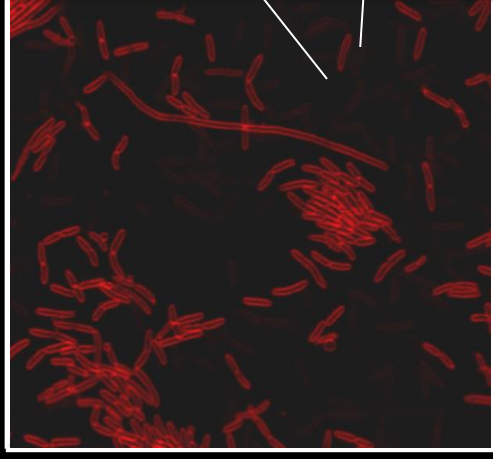
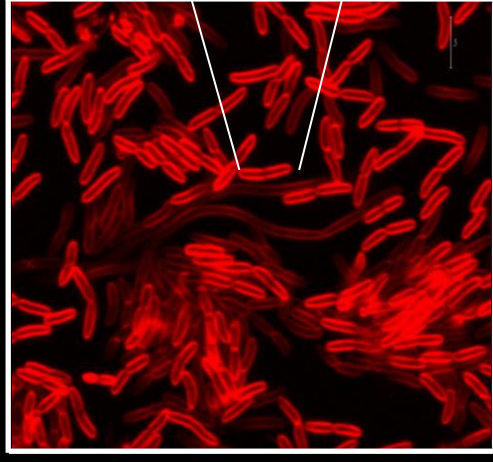
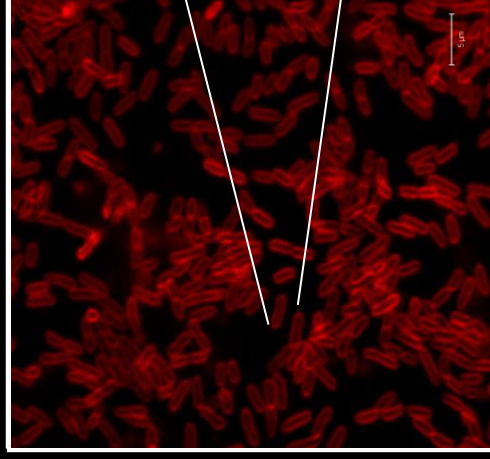
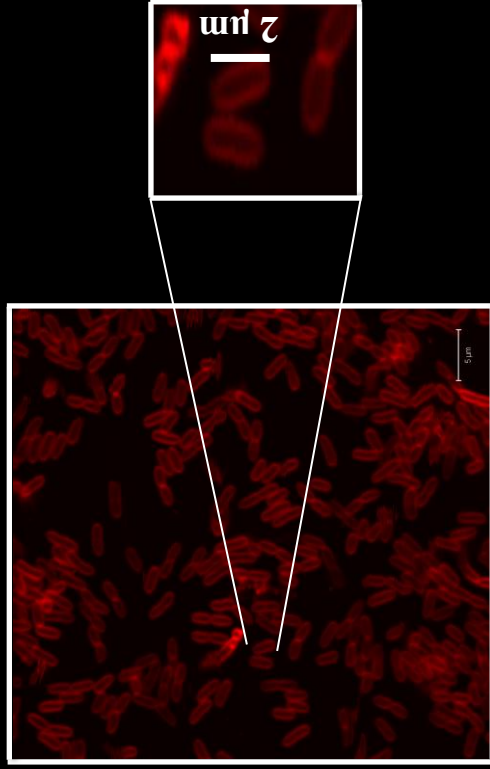


**Fig. 2-12. KT2440株がNAH7, RP4保持によって形成するバイオフィルムの構造観察.**

左：KT2440(NAH7)株, 右：KT2440(RP4)株

バイオフィルムの画像は、バイオフィルム形成開始 12 時間目の画像で、同じ時点でバイオフィルム試料の異なる位置から5つ画像を取って、代表的な例を示した。(A) KT2440(NAH7)株での画像 (B) KT2440(RP4)株での画像を示す。180 x 180  $\mu\text{m}$  (xy) の範囲を示す。スケールバーは 40  $\mu\text{m}$  を示す。

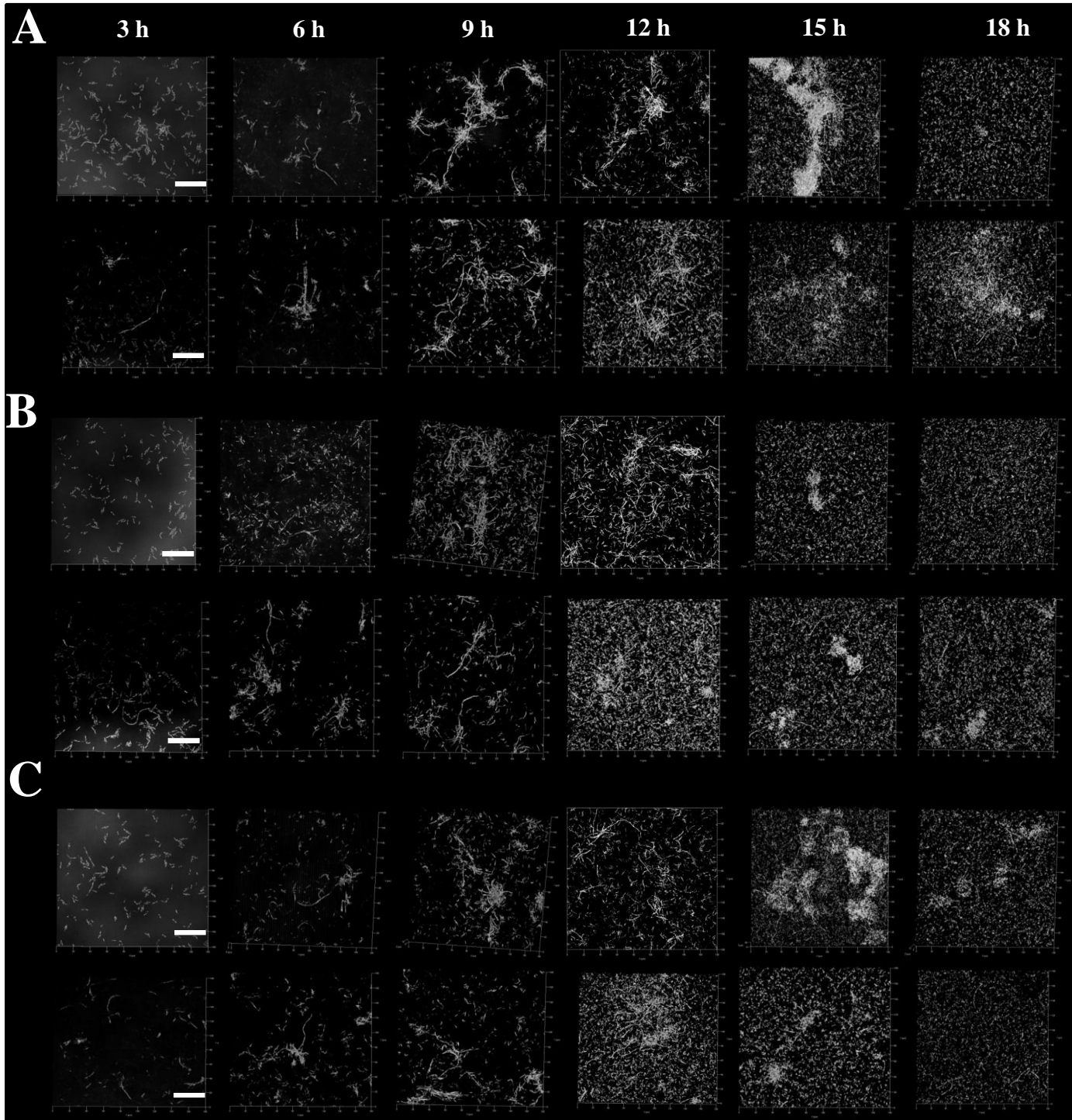




**Fig. 2-13. FM4-64 染色によるKT2440株, KT2440(pCAR1)が形成する細胞の構造観察.**

左：培養6時間，右：培養12時間

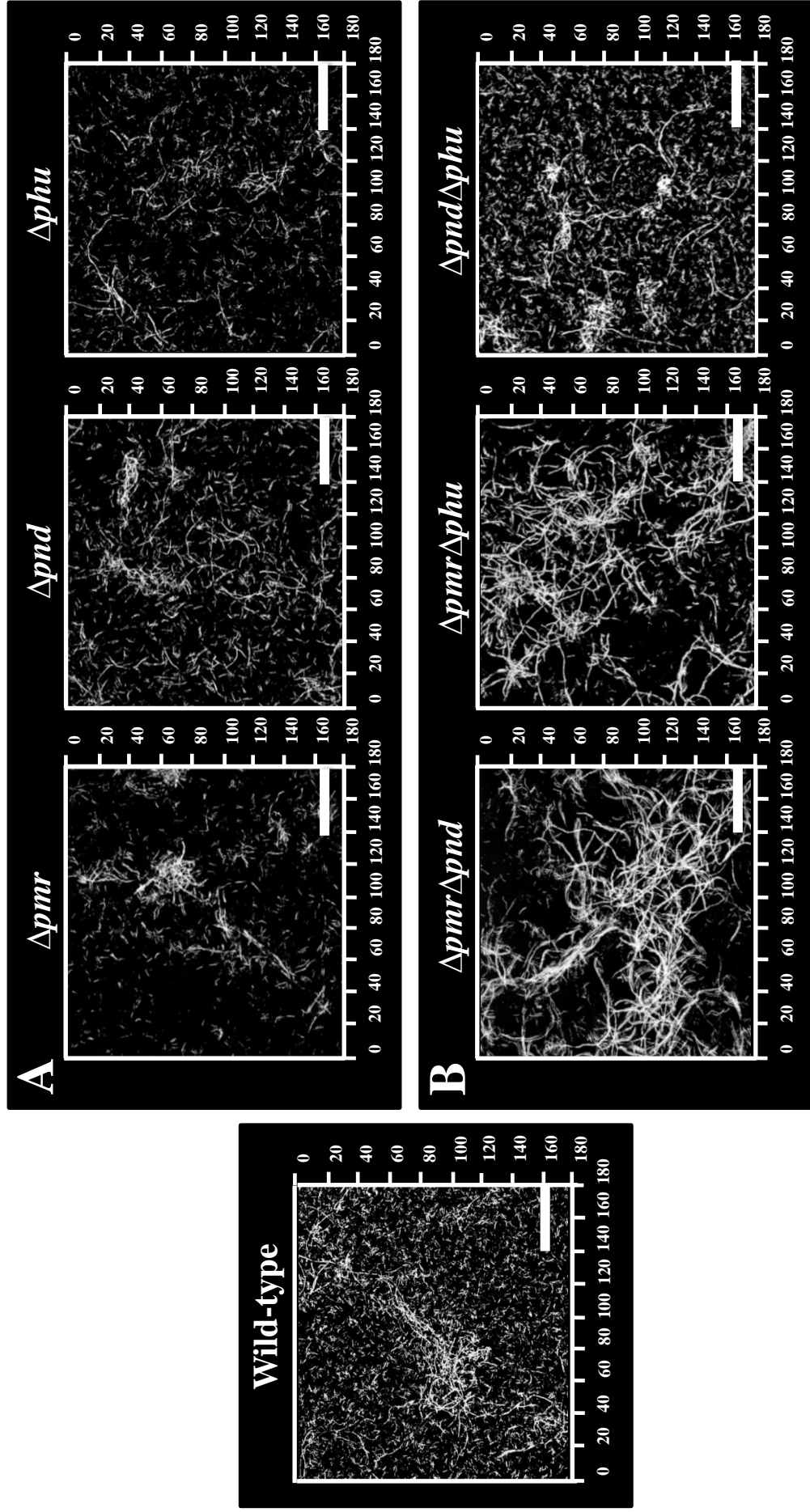
*P. putida* KT2440株 (A) やKT2440(pCAR1)株 (B) をFig. 2-1 において記した方法で，底ガラスシャーレを用いて30℃で静置培養したものを染色して観察に供した．6, 12時間の培養後にシャーレの培養液を捨て，終濃度0.2 μMのFM4-64染色液を1 ml加えて室温で約20分間静置培養した．最後に，共焦点レーザー顕微鏡による6, 12時間目のバイオフィルム構造の観察を行った．画像は10枚の写真の中から代表的な例を示した．スケールバーは5 μmを示す．



**Fig. 2-14. 単独破壊株が LB 培地を用いた静置培養時に形成するバイオフィルムの経時的観察.**

上段：1回目，下段：2回目

(A) KT2440(pCAR1 $\Delta$ *pmr*), (B) KT2440(pCAR1 $\Delta$ *pnd*), (C) KT2440(pCAR1 $\Delta$ *phu*)株をFig. 2-1に示す方法でLB液体培地で静置培養し、培養開始後3, 6, 9, 12, 15, 18時間に共焦点顕微鏡を用いて取得した画像であり、どちらも時間とともにバイオフィルムが形成され、はがれていくことが観察された。180 x 180  $\mu\text{m}$  (xy) の<sup>5</sup>範囲を示す。画像は10枚の写真の中から代表的な例を示した。図中のスケールバーは40  $\mu\text{m}$ を示す。

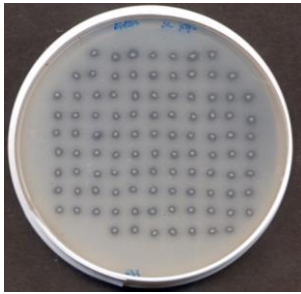


**Fig. 2-15.** 単独破壊株，二重破壊株と野生型株のバイオフィルムの構造比較.

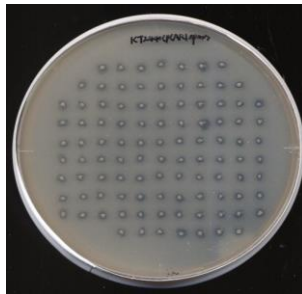
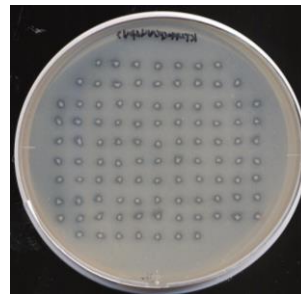
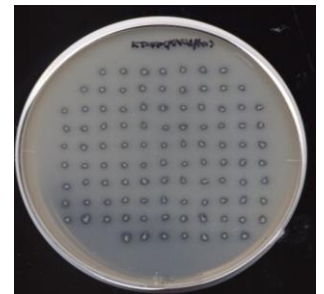
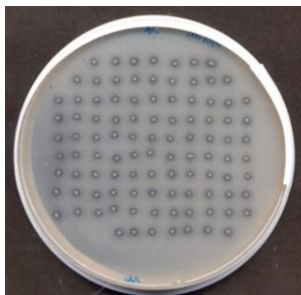
単独破壊株 (A) 二重破壊株 (B) をそれぞれ Fig. 2-1 に示す方法で LB 液体培地で静置培養し，培養開始後 3，6，9，12，15，18 時間に共焦点顕微鏡を用いて画像を取得した．バイオフィルムの画像は，バイオフィルム形成開始 12 時間目の画像で，同じ時点でバイオフィルム試料の異なる位置から 5 つ画像を取って，代表的な例を示した．180 x 180  $\mu m$  (xy) の範囲を示す．ケールバーは 40  $\mu m$  を示す．

**A**

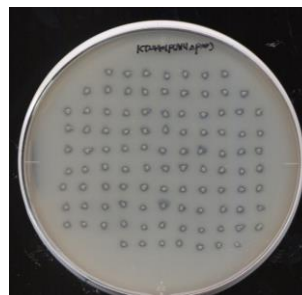
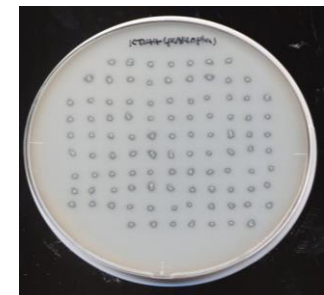
	CAR資化能保持率(%)			
	3時間	平均	18時間	平均
KT2440(pCAR1)	100	100	100	100
	100		100	
KT2440(pCAR1 $\Delta$ <i>pmr</i> )	100	99.5	100	100
	99		100	
KT2440(pCAR1 $\Delta$ <i>pnd</i> )	100	100	100	100
	100		100	
KT2440(pCAR1 $\Delta$ <i>phu</i> )	100	100	100	100
	100		99	

**B**

KT2440(pCAR1)

KT2440(pCAR1 $\Delta$ *pmr*)KT2440(pCAR1 $\Delta$ *pnd*)KT2440(pCAR1 $\Delta$ *phu*)**C**

KT2440(pCAR1)

KT2440(pCAR1 $\Delta$ *pmr*)KT2440(pCAR1 $\Delta$ *pnd*)KT2440(pCAR1 $\Delta$ *phu*)

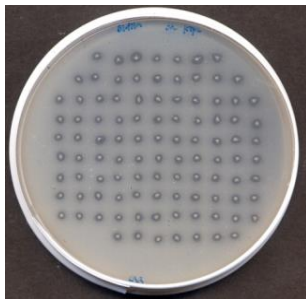
**Fig. 2-16. KT2440(pCAR1)株および単独破壊株を静置培養時のバイオフィルム状態での CAR 資化能保持率測定.**

(A) 各株について 2 連の実験の平均値を示す. (B) 培養 3 時間目の各株を 100 コロニーずつ CAR プレートにパッチした様子を示す. CAR 資化能を有するコロニーはプレート上でクリアゾーンを形成する. (C) 培養 18 時間目の各株を 100 コロニーずつ CAR プレートにパッチした様子を示す. CAR 資化能を有するコロニーはプレート上でクリアゾーンを形成する. いずれの株も CAR 資化能を安定に保持していた.

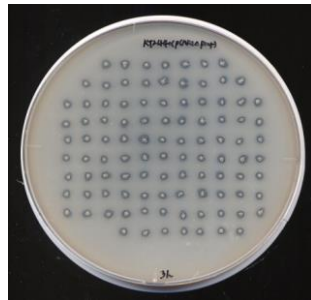
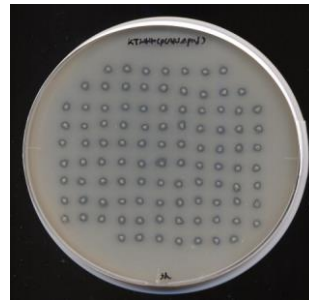
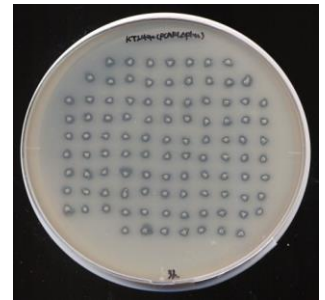
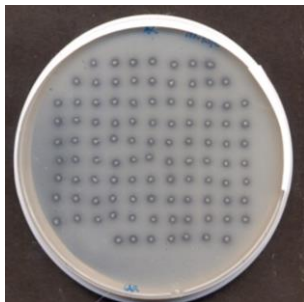


**A**

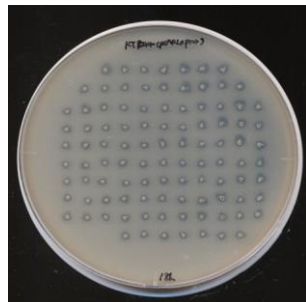
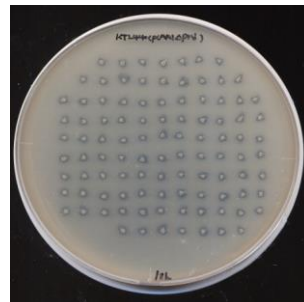
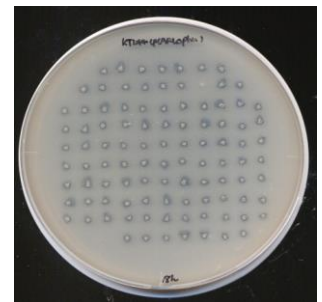
	CAR資化能保持率(%)			
	3時間	平均	18時間	平均
KT2440(pCAR1)	100	100	100	100
	100		100	
KT2440(pCAR1 $\Delta$ <i>pmr</i> )	100	100	100	100
	100		100	
KT2440(pCAR1 $\Delta$ <i>pnd</i> )	100	100	100	100
	100		100	
KT2440(pCAR1 $\Delta$ <i>phu</i> )	100	100	100	99.5
	100		99	

**B**

KT2440(pCAR1)

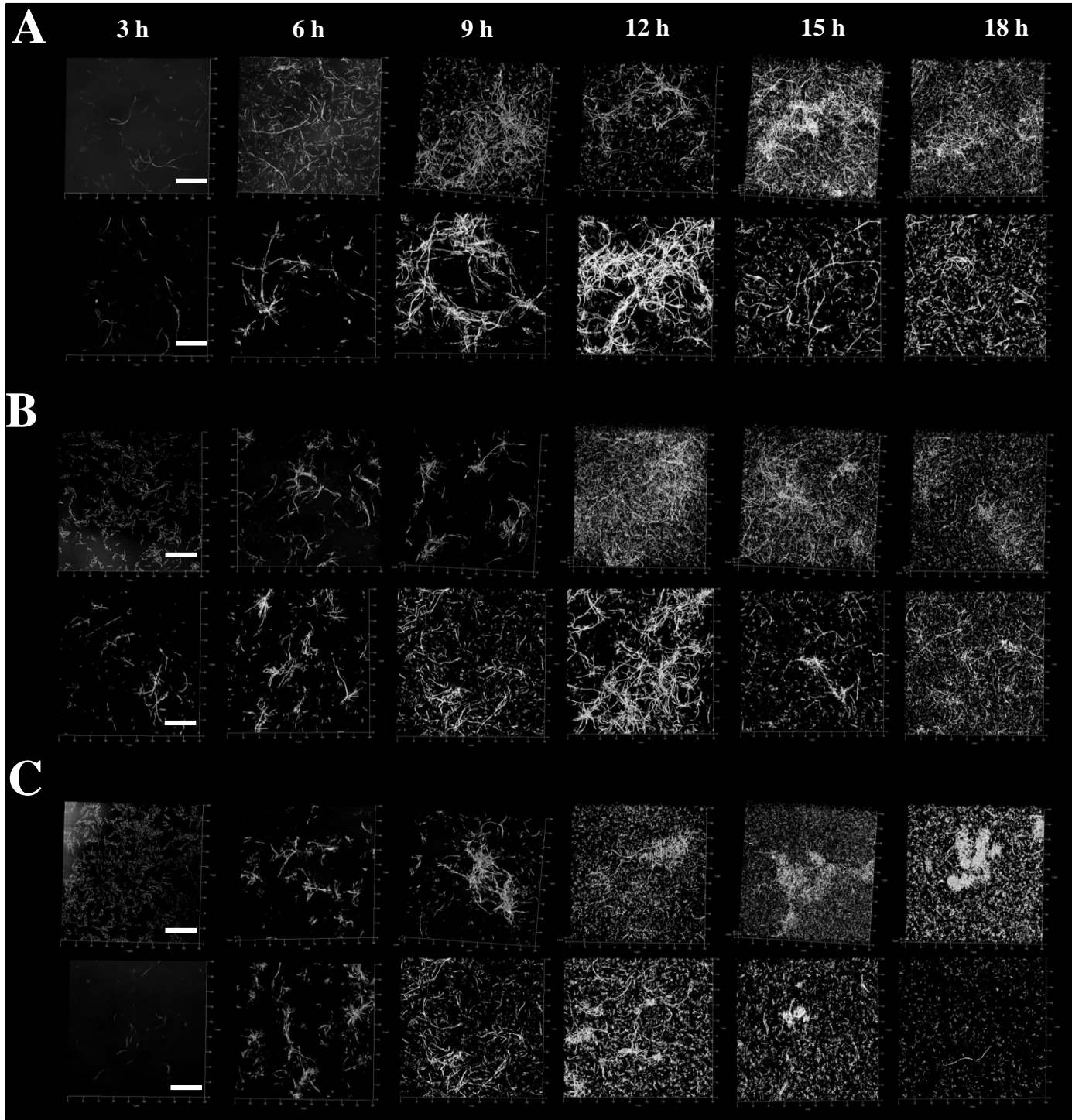
KT2440(pCAR1 $\Delta$ *pmr*)KT2440(pCAR1 $\Delta$ *pnd*)KT2440(pCAR1 $\Delta$ *phu*)**C**

KT2440(pCAR1)

KT2440(pCAR1 $\Delta$ *pmr*)KT2440(pCAR1 $\Delta$ *pnd*)KT2440(pCAR1 $\Delta$ *phu*)

**Fig. 2-17. KT2440(pCAR1)株および単独破壊株を静置培養時浮遊状態でのCAR資化能保持率測定.**

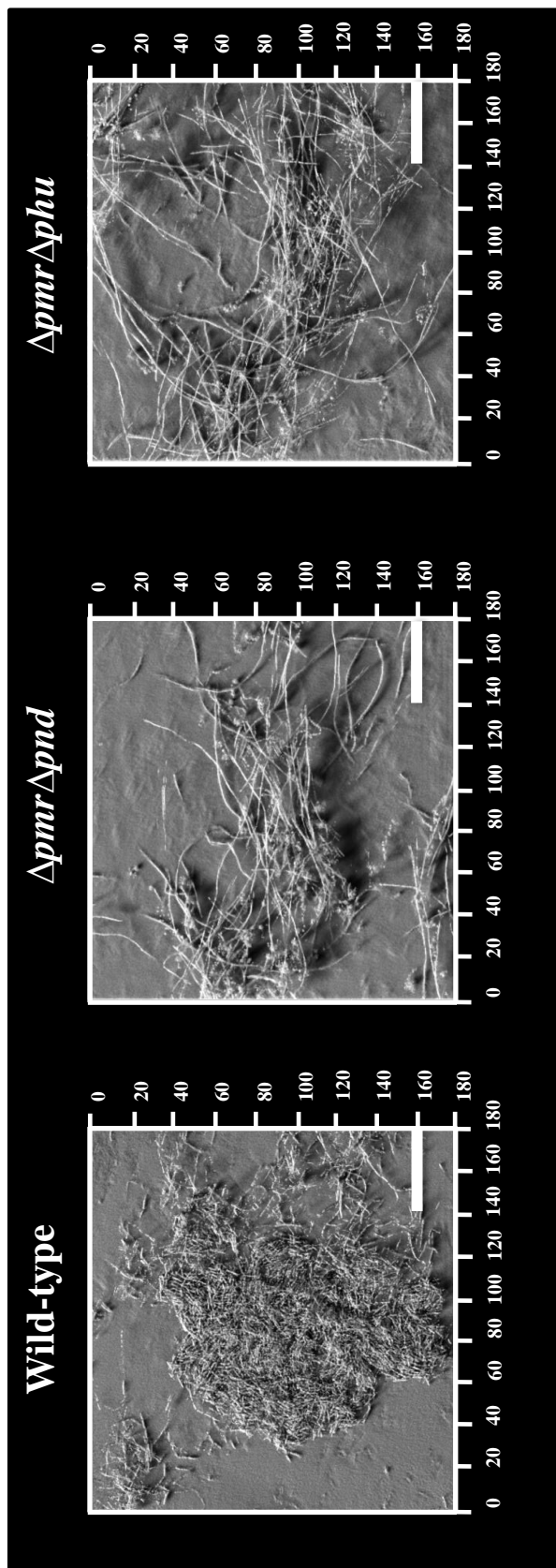
(A) 各株について2連の実験の平均値を示す。(B) 培養3時間目の各株を100コロニーずつCARプレートにパッチした様子を示す。CAR資化能を有するコロニーはプレート上でクリアゾーンを形成する。(C) 培養18時間目の各株を100コロニーずつCARプレートにパッチした様子を示す。CAR資化能を有するコロニーはプレート上でクリアゾーンを形成する。いずれの株もCAR資化能を安定に保持していた。



**Fig. 2-18.** 二重破壊株が LB 培地を用いた静置培養時に形成するバイオフィルムの経時的観察.

上段：1回目，下段：2回目

(A) KT2440(pCAR1ΔpmrΔpnd), (B) KT2440(pCAR1ΔpmrΔphu), (C) KT2440(pCAR1ΔpndΔphu) 株を Fig. 2-1 に示す方法で LB 液体培地で静置培養し，培養開始後 3, 6, 9, 12, 15, 18 時間に共焦点顕微鏡を用いて取得した画像であり，どちらも時間とともにバイオフィルムが形成され，はがれていくことが観察された． $180 \times 180 \mu\text{m}$  (xy) の範囲を示す．画像は 10 枚の写真の中から代表的な例を示した．図中のスケールバーは  $40 \mu\text{m}$  を示す．

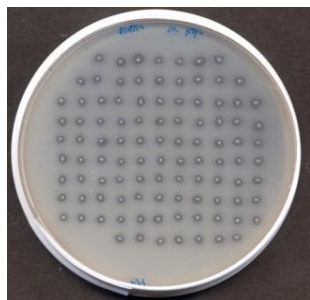


**Fig. 2-19.** 二重破壊株と野生型株のバイオフィルムの構造比較 - 連続培養.

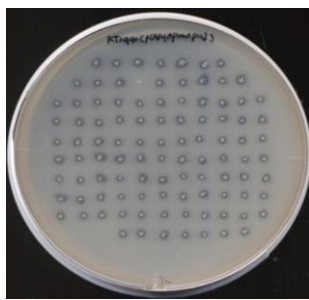
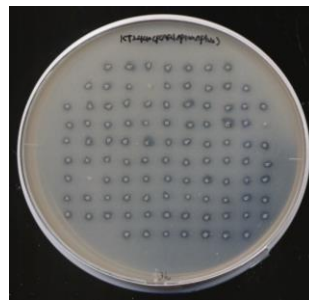
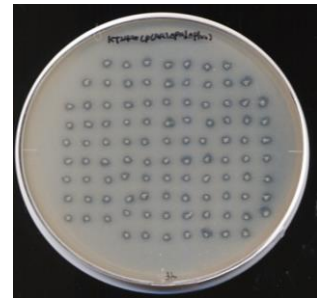
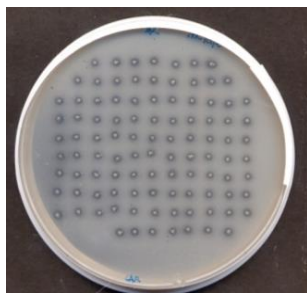
KT2440(pCAR1 $\Delta pmr\Delta pnd$ )とKT2440(pCAR1 $\Delta pmr\Delta phu$ )株をそれぞれ Fig. 2-2 に示す方法で連続培養し、培養開始後 24 時間に共焦点顕微鏡を用いて取得した画像である。180 x 180  $\mu m$  (xy) の範囲を示す。スケールバーは 40  $\mu m$  を示す。画像は 5 枚の写真の中から代表的な例を示した。

**A**

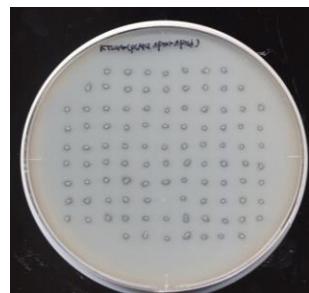
	CAR資化能保持率(%)			
	3時間	平均	18時間	平均
KT2440(pCAR1)	100	100	100	100
KT2440(pCAR1 $\Delta$ pmr $\Delta$ pnd)	99	99.5	99	99.5
KT2440(pCAR1 $\Delta$ pmr $\Delta$ phu)	97	97.5	99	99.5
KT2440(pCAR1 $\Delta$ pnd $\Delta$ phu)	100	100	99	99

**B**

KT2440(pCAR1)

KT2440  
(pCAR1 $\Delta$ pmr $\Delta$ pnd)KT2440  
(pCAR1 $\Delta$ pmr $\Delta$ phu)KT2440  
(pCAR1 $\Delta$ pnd $\Delta$ phu)**C**

KT2440(pCAR1)

KT2440  
(pCAR1 $\Delta$ pmr $\Delta$ pnd)KT2440  
(pCAR1 $\Delta$ pmr $\Delta$ phu)KT2440  
(pCAR1 $\Delta$ pnd $\Delta$ phu)

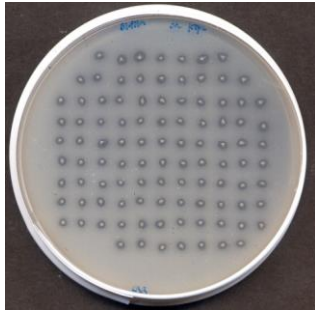
**Fig. 2-20. KT2440(pCAR1)株および二重破壊株を静置培養時バイオフィルム状態での CAR 資化能保持率測定.**

(A) 各株について2連の実験の平均値を示す. (B) 培養3時間目の各株を100コロニーずつ CAR プレートにパッチした様子を示す. CAR 資化能を有するコロニーはpプレート上でクリアゾーンを形成する. (C) 培養18時間目の各株を100コロニーずつ CAR プレートにパッチした様子を示す. CAR 資化能を有するコロニーはプレート上でクリアゾーンを形成する. いずれの株も CAR 資化能を安定に保持していた.

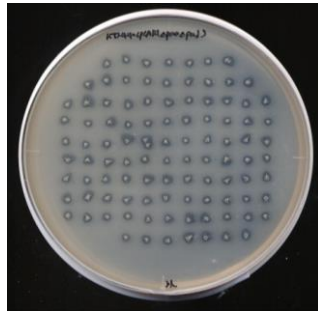
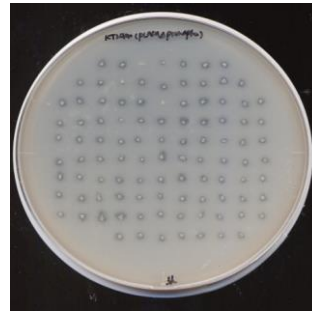
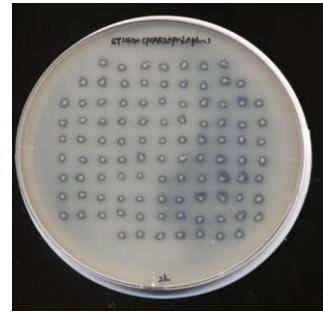
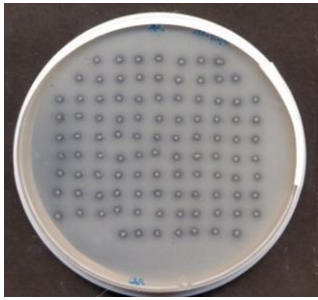


**A**

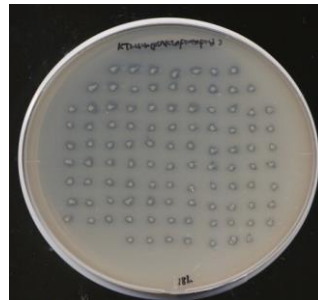
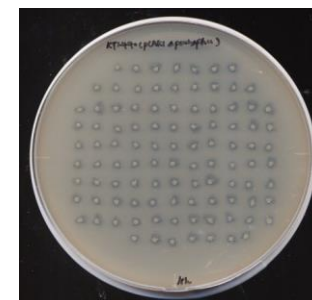
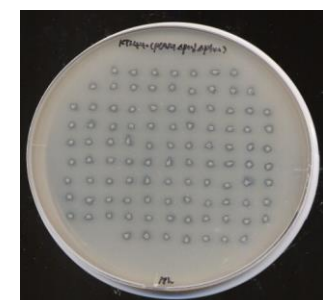
	CAR資化能保持率(%)			
	3時間	平均	18時間	平均
KT2440(pCAR1)	100	100	100	100
KT2440(pCAR1 $\Delta$ pmr $\Delta$ pnd)	100	100	100	100
KT2440(pCAR1 $\Delta$ pmr $\Delta$ phu)	98	97.5	100	100
KT2440(pCAR1 $\Delta$ pnd $\Delta$ phu)	100	100	100	100

**B**

KT2440(pCAR1)

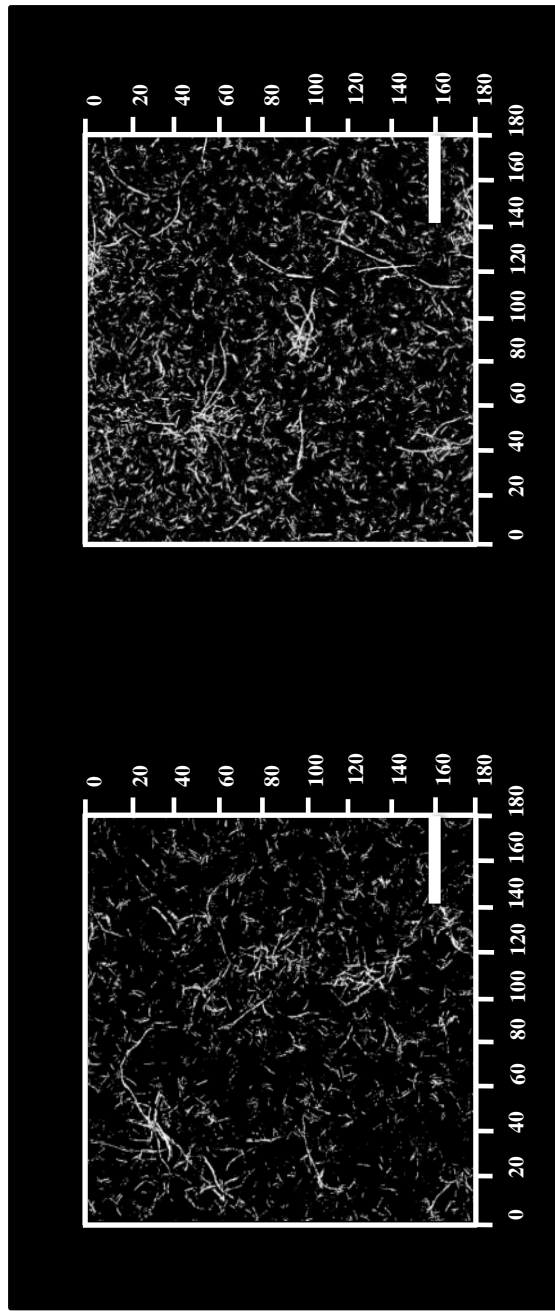
KT2440  
(pCAR1 $\Delta$ pmr $\Delta$ pnd)KT2440  
(pCAR1 $\Delta$ pmr $\Delta$ phu)KT2440  
(pCAR1 $\Delta$ pnd $\Delta$ phu)**C**

KT2440(pCAR1)

KT2440  
(pCAR1 $\Delta$ pmr $\Delta$ pnd)KT2440  
(pCAR1 $\Delta$ pmr $\Delta$ phu)KT2440  
(pCAR1 $\Delta$ pnd $\Delta$ phu)

**Fig. 2-21. KT2440(pCAR1)株および二重破壊株を静置培養時浮遊状態でのCAR資化能保持率測定.**

(A) 各株について2連の実験の平均値を示す。(B) 培養3時間目の各株を100コロニーずつCARプレートにパッチした様子を示す。CAR資化能を有するコロニーはプレート上でクリアゾーンを形成する。(C) 培養18時間目の各株を100コロニーずつCARプレートにパッチした様子を示す。CAR資化能を有するコロニーはプレート上でクリアゾーンを形成する。いずれの株もCAR資化能を安定に保持していた。



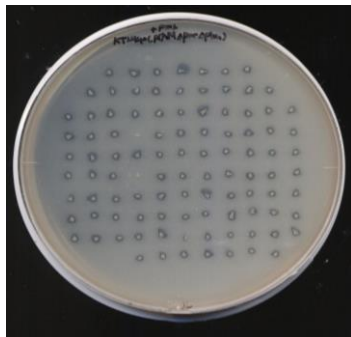
**Fig. 2-22.** 相補株が形成するバイオフィルムの観察.

左 : KT2440(pCAR1[ $\Delta$ pmr $\Delta$ phu]::pmr)株, 右 : KT2440(pCAR1[ $\Delta$ pmr $\Delta$ pnd]::pmr)株

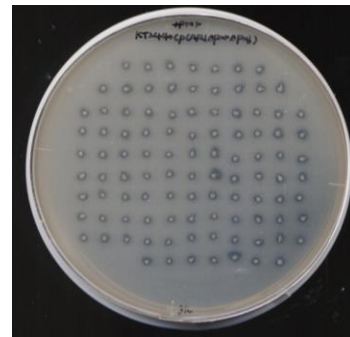
KT2440(pCAR1[ $\Delta$ pmr $\Delta$ phu]::pmr)株とKT2440(pCAR1[ $\Delta$ pmr $\Delta$ pnd]::pmr)株をそれぞれFig. 2-2に示す方法で連続培養し、培養開始後12時間共焦点顕微鏡を用いて取得した画像である. 180 x 180  $\mu$ m (xy) の範囲を示す. スケールバーは40  $\mu$ mを示す. 画像は5枚の写真の中から代表的な例を示した.

**A**

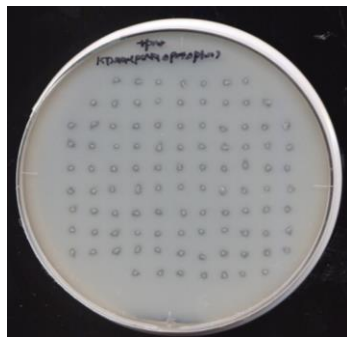
	CAR資化能保持率(%)			
	3時間	平均	18時間	平均
KT2440(pCAR1[ <i>pmr</i> Δ <i>phu</i> ]:: <i>pmr</i> )	98	98.5	100	100
	99		100	
KT2440(pCAR1[ <i>pmr</i> Δ <i>pnd</i> ]:: <i>pmr</i> )	100	99.5	100	100
	99		100	

**B**

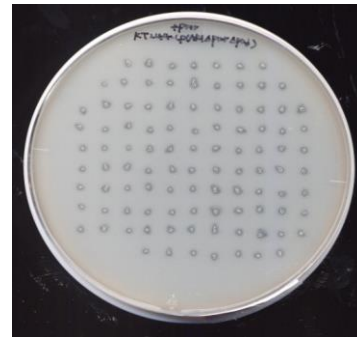
KT2440  
(pCAR1[Δ*pmr*Δ*phu*]::*pmr*)



KT2440  
(pCAR1[Δ*pmr*Δ*pnd*]::*pmr*)

**C**

KT2440  
(pCAR1[Δ*pmr*Δ*phu*]::*pmr*)

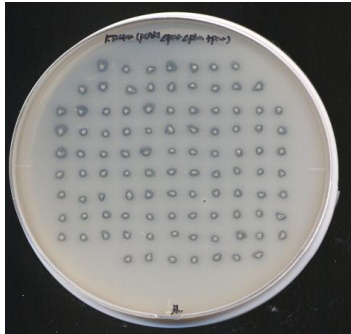


KT2440  
(pCAR1[Δ*pmr*Δ*pnd*]::*pmr*)

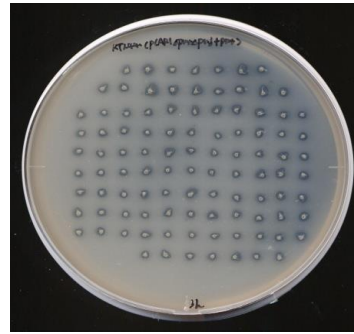
**Fig. 2-23. 相補株の静置培養時バイオフィーム状態でのCAR資化能保持率測定.** (A) 各株について2連の実験の平均値を示す. (B) 培養3時間目の各株を100コロニーずつCARプレートにパッチした様子を示す. CAR資化能を有するコロニーはプレート上でクリアゾーンを形成する. (C) 培養18時間目の各株を100コロニーずつCARプレートにパッチした様子を示す. CAR資化能を有するコロニーはプレート上でクリアゾーンを形成する. いずれの株もCAR資化能を安定に保持していた.

**A**

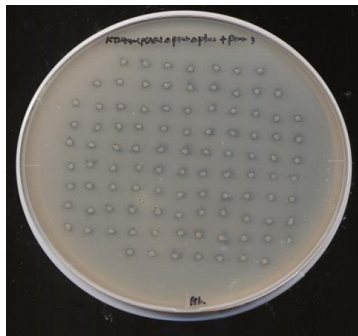
	CAR資化能保持率(%)			
	3時間	平均	18時間	平均
KT2440(pCAR1[ <i>pmr</i> Δ <i>phu</i> ]:: <i>pmr</i> )	100	100	100	100
	99		100	
KT2440(pCAR1[ <i>pmr</i> Δ <i>pnd</i> ]:: <i>pmr</i> )	100	100	100	100
	100		100	

**B**

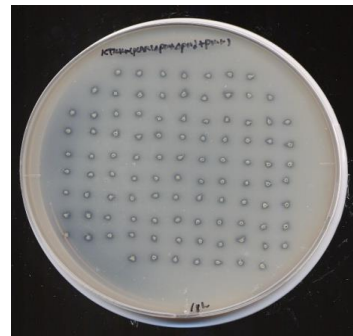
KT2440  
(pCAR1[Δ*pmr*Δ*phu*]::*pmr*)



KT2440  
(pCAR1[Δ*pmr*Δ*pnd*]::*pmr*)

**C**

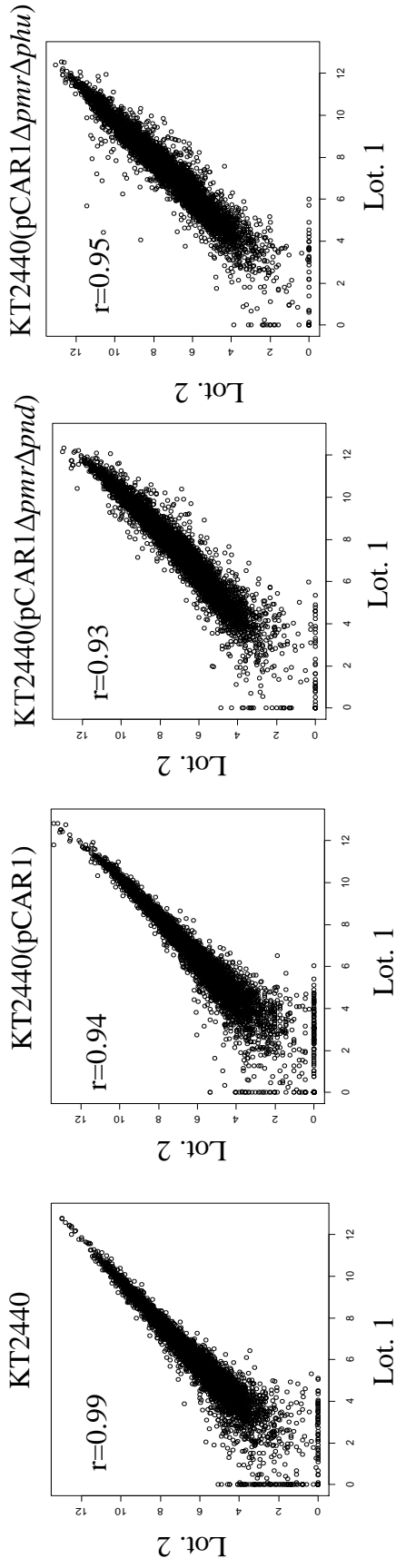
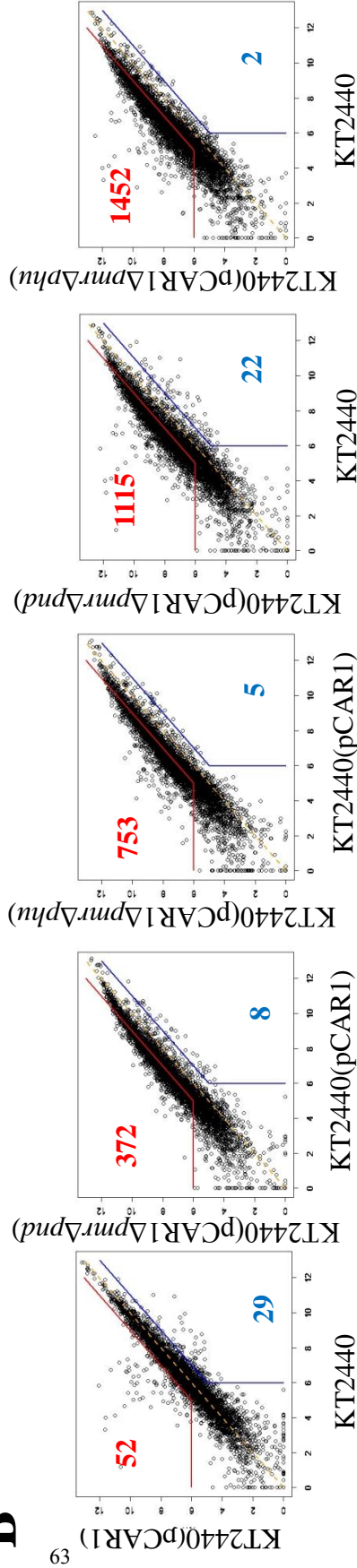
KT2440  
(pCAR1[Δ*pmr*Δ*phu*]::*pmr*)



KT2440  
(pCAR1[Δ*pmr*Δ*pnd*]::*pmr*)

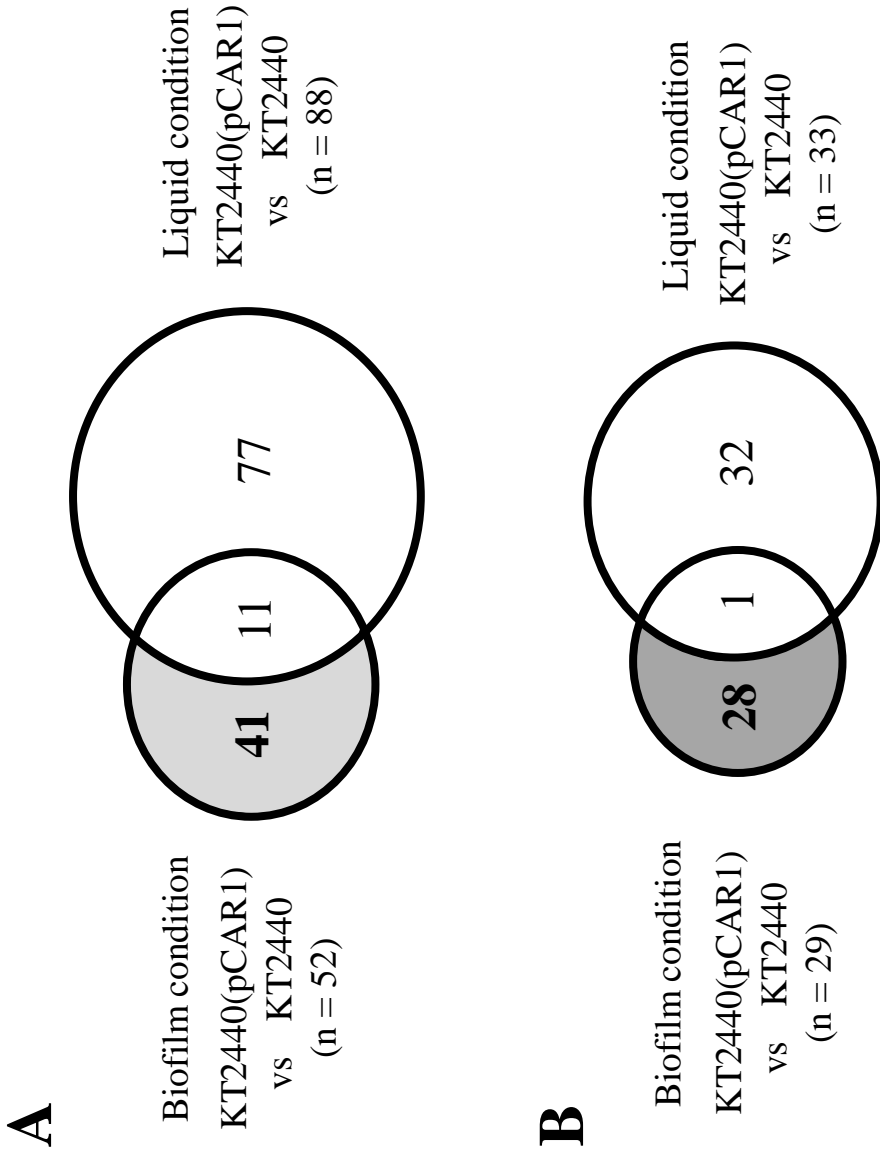
**Fig. 2-24. 相補株の静置培養時浮遊状態でのCAR資化能保持率測定.**

(A) 各株について2連の実験の平均値を示す. (B) 培養3時間目の各株を100コロニーずつCARプレートにパッチした様子を示す. CAR資化能を有するコロニーはプレート上でクリアゾーンを形成する. (C) 培養18時間目の各株を100コロニーずつCARプレートにパッチした様子を示す. CAR資化能を有するコロニーはプレート上でクリアゾーンを形成する. いずれの株もCAR資化能を安定に保持していた.

**A****B**

**Fig. 2-25.** 各株での2連間のサンプルの一致度及び転写変動する遺伝子の数.

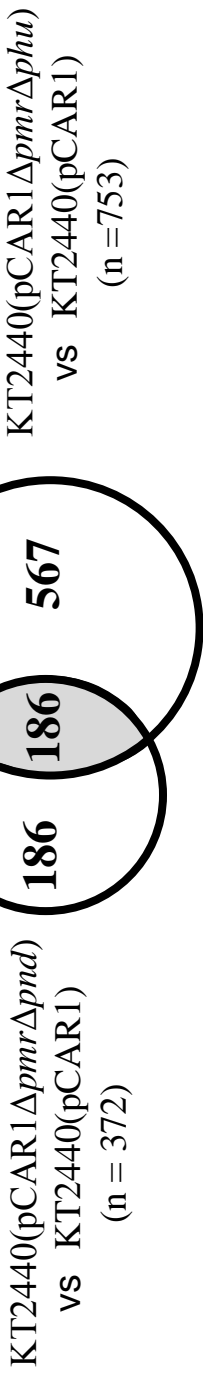
1 連ずつのデータから各 ORF 内のプロープ内のシグナル値より中央値を算出し、各 ORF について、1 連目の中央値を横軸にとり、2 連目の中央値を縦軸にとり、各 ORF 内のシグナル値の対数を取った散点図を描いた。軸は底を 2 とする対数目盛になっている。各パネル左上の  $r$  は相関係数を表す。いづれも相関係数 0.93 以上の高い相関を示した(A)。(B)はサンプルの様々な組み合わせの散布図を示している。転写誘導および転写抑制される遺伝子の数は、赤と青で示す。



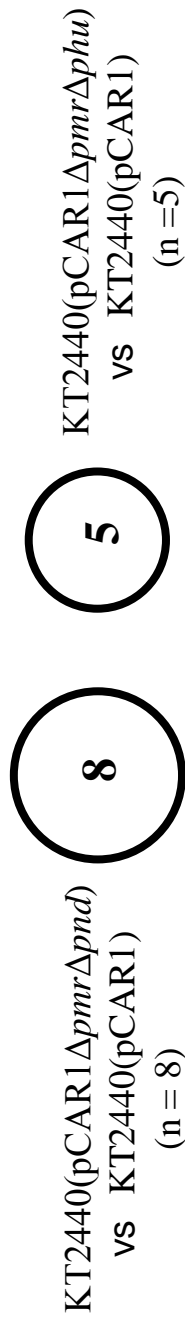
**Fig. 2-26.** バイオフィルム状態で特異的に転写変動する染色体上の遺伝子.

バイオフィルム状態と浮遊状態 [Shintani *et al.*, 2010] の比較により(A) 転写量が増加する (B) 転写量が減少する, 染色体上の遺伝子数をベン図で示す. n は変動した遺伝子の総数の数を表す. 灰色: バイオフィルム状態で特異的に変動した染色体上の遺伝子 (増加 41 個, 減少 28 個) の数を示す.

**A**

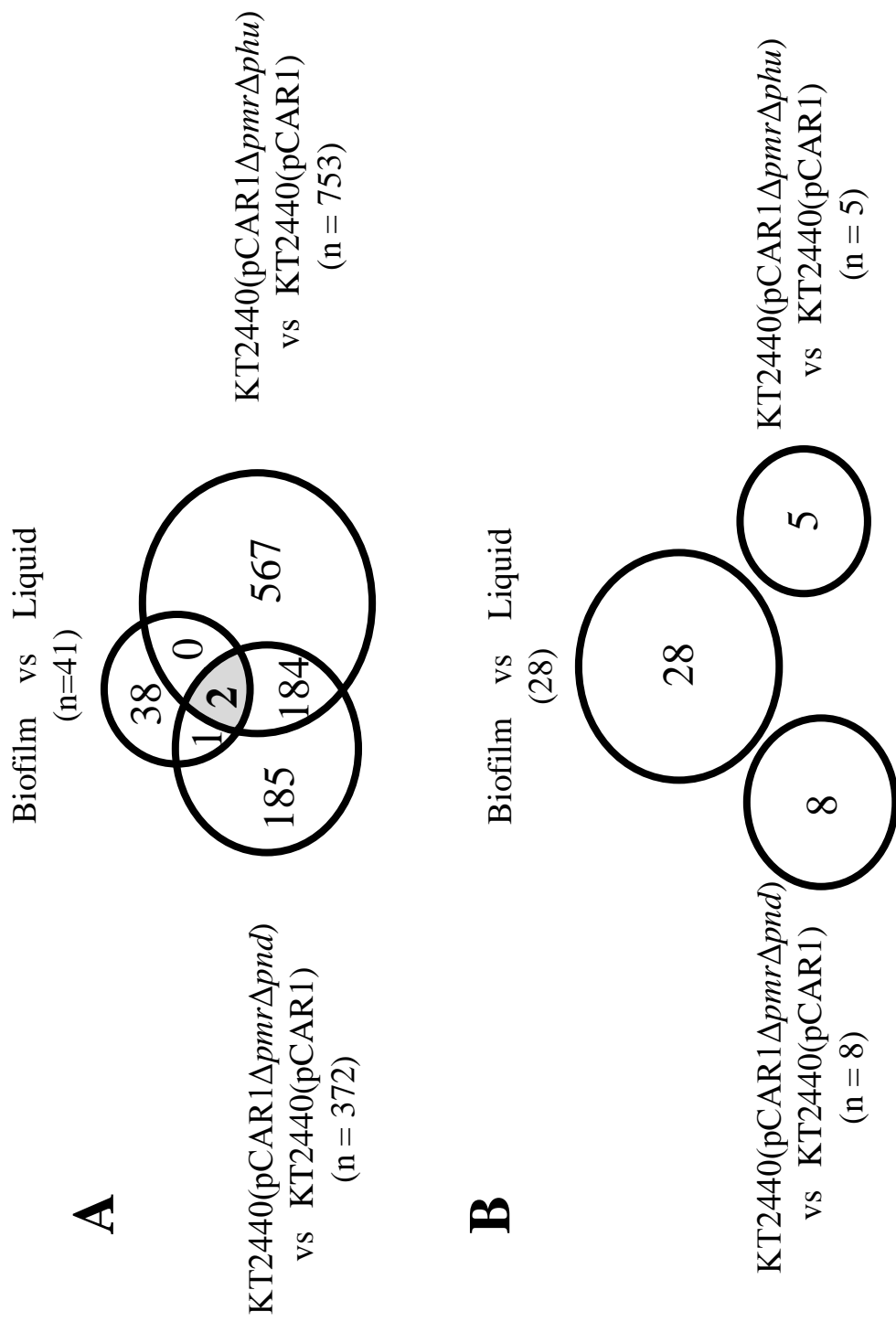


**B**



**Fig. 2-27. *pmr* を含む 2 つの NAPs 遺伝子二重破壊株で転写変動する遺伝子の重なり.**

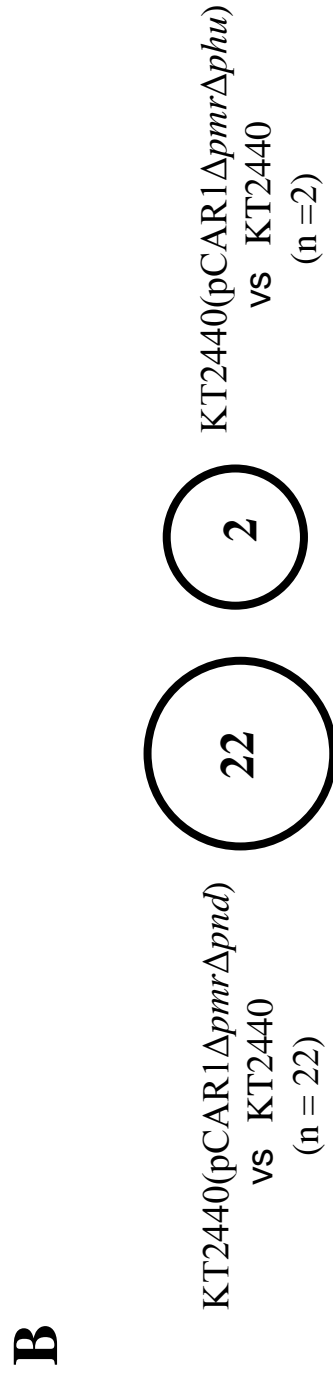
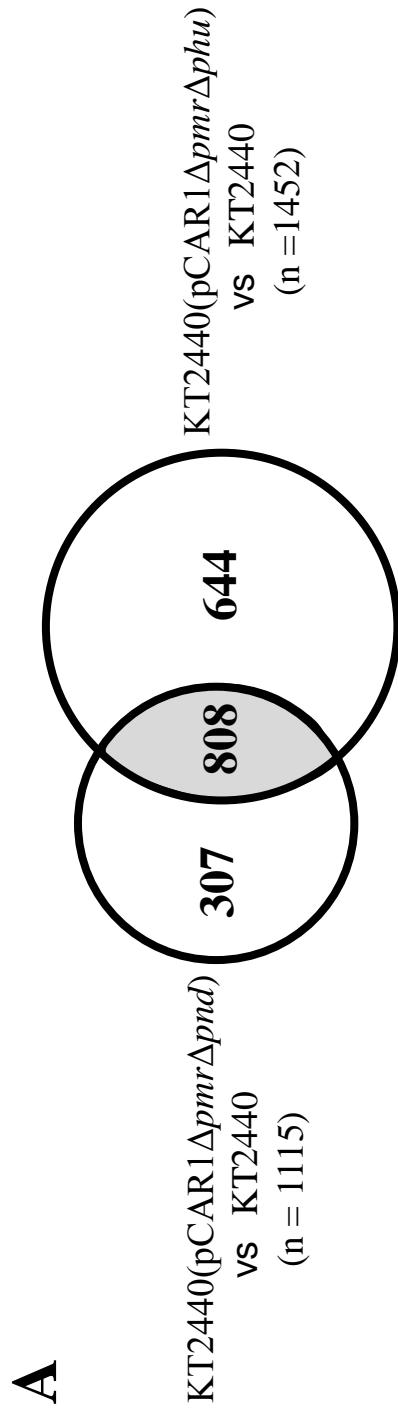
*pmr* と *pnd*, *pmr* と *phu* を 2 つ除去した二重破壊株より (A) 共通に転写量が増加する (B) 共通に転写量が減少する, 染色体上の遺伝子数をベン図で示す. n は変動した遺伝子の総数を表す. 灰色: 共通に転写変動した遺伝子(増加 186個, 減少 0個)の数を示す.



**Fig. 2-28.** 絨毛状態を亢進する可能性が高い遺伝子の選抜.

バイオフィルム状態で特異的に転写変動した遺伝子や*pmr*と*pnd*, *pmr*と*phu*を2つ除去した二重破壊株より (A) 共通に転写量が増加する (B) 共通に転写量が減少する, 染色体上の遺伝子数をベン図で示す. nは変動した遺伝子の総数を表す. 灰色: 共通に転写変動した遺伝子 (増加 2個, 減少 0個) の数を示す.



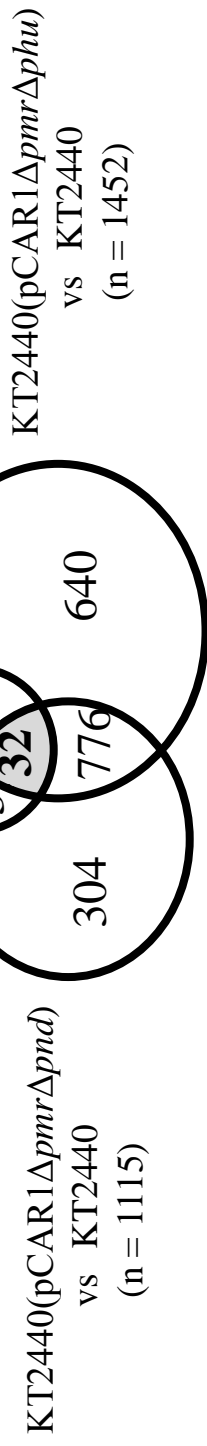


**Fig. 2-29. *pmr* を含む 2 つの NAPs 遺伝子二重破壊株で転写変動する遺伝子の重なり.**

*pmr* と *pnd*, *pmr* と *phu* を 2 つ除去した二重破壊株より (A) 共通に転写量が増加する (B) 共通に転写量が減少する, 染色体上の遺伝子数をベン図で示す. n は変動した遺伝子の総数を表す. 灰色: 共通に転写変動した遺伝子(増加 808 個, 減少 0 個)の数を示す.

**A**

Biofilm-specific regulated genes  
(n = 41)

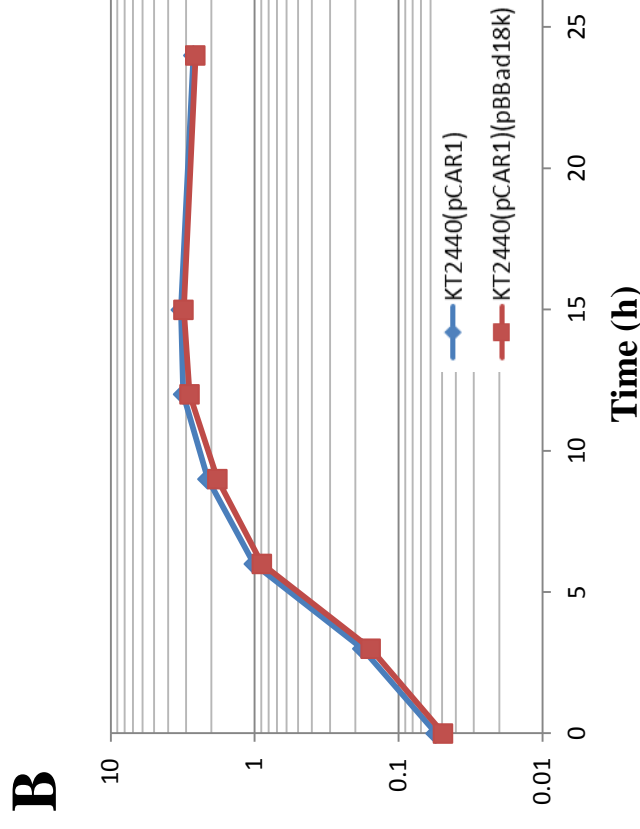
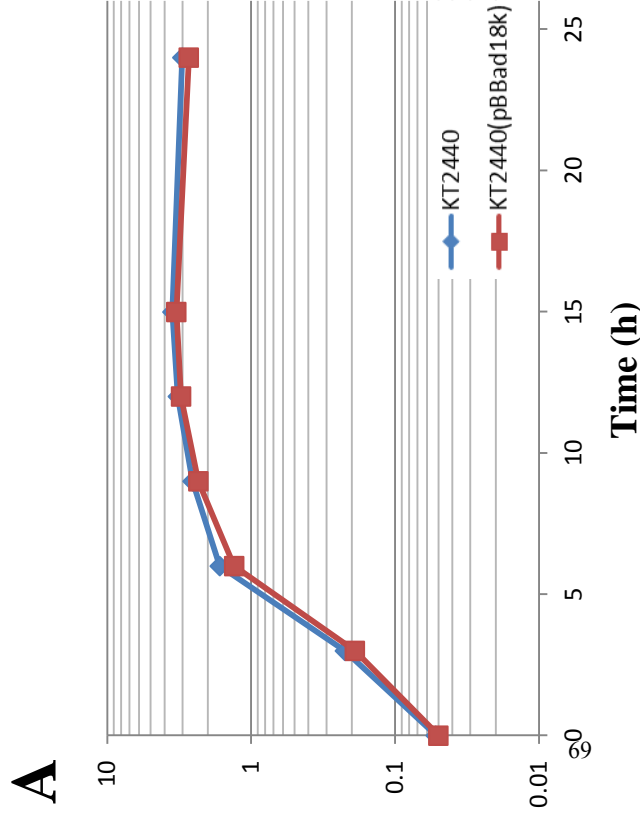
**B**

Biofilm-specific regulated genes  
(n = 28)



**Fig. 2-30.** 絨毛状化の原因になる可能性が高い遺伝子の選抜.

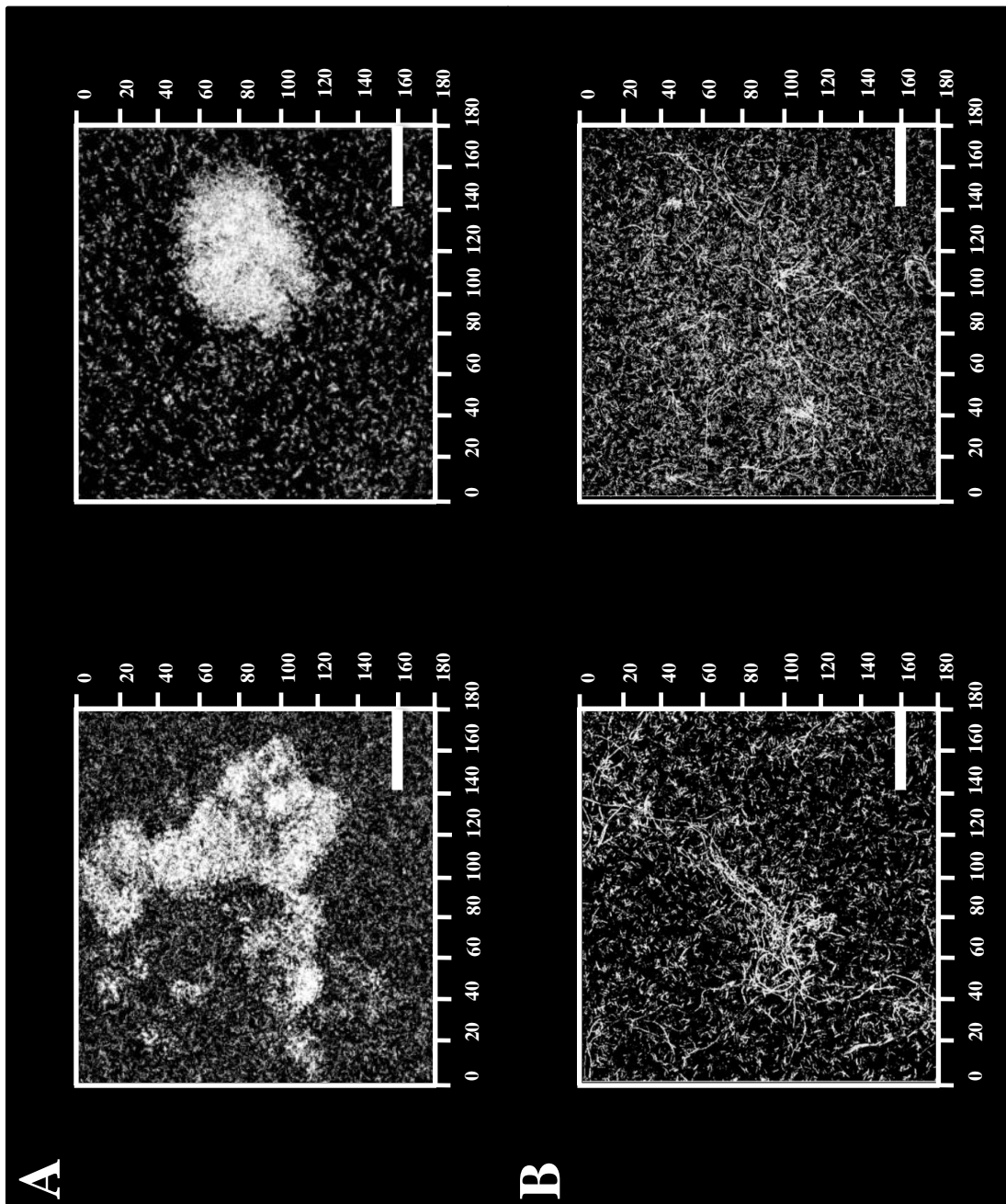
バイオフィーム状態で特異的に転写変動した遺伝子や*pmr*と*pnd*, *pmr*と*phu*を2つ除去した二重破壊株より (A) 共通に転写量が増加する (B) 共通に転写量が減少する, 染色体上の遺伝子数をベン図で示す. nは変動した遺伝子の総数を表す. 灰色: 共通に転写変動した遺伝子(増加 32個, 減少0個)の数を示す.



**Fig. 2-31. LB培養における野生型株 (青) とpBBad18k保持株 (赤) の生育曲線.**

A : KT2440株, B : KT2440(pCAR)株

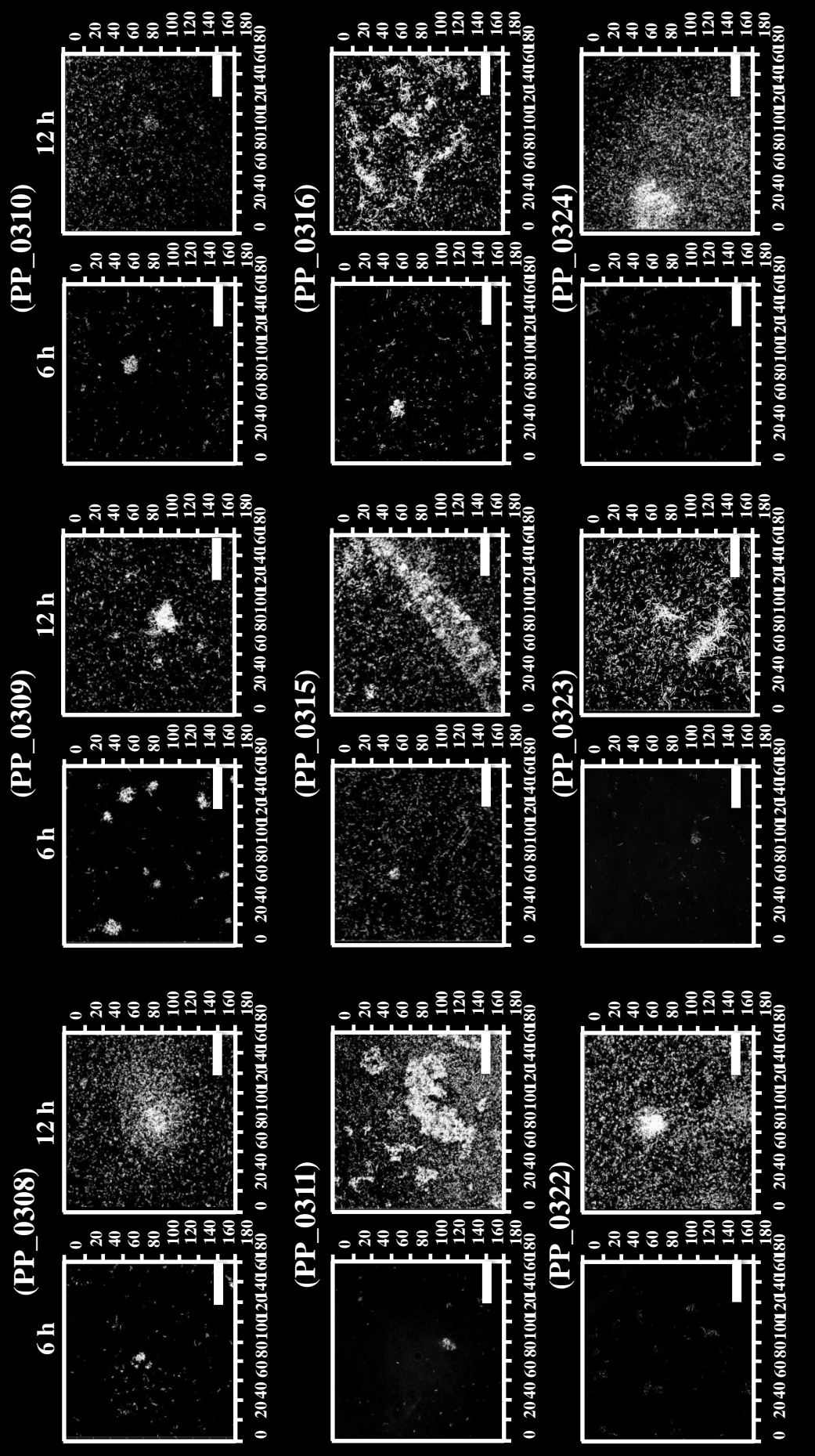
*P. putida* KT2440 株, *P. putida* KT2440(pCAR1)株のpBBad18k 保持株・非保持株を, それぞれLB培地や0.02% (w/v)のアラビノースを添加したLB培地で培養し, OD<sub>600</sub>を経時的に測定した. 1本の線は1回の実験の測定値を表し, 1つの株につき, 独立した2回の実験を行った.



**Fig. 2-32. KT2440株やKT2440(pCAR1)株が pBBad18k 有無によって形成するバイオフィルムの構造比較.**

左：pBBad18k 非保持株，右：pBBad18k 保持株

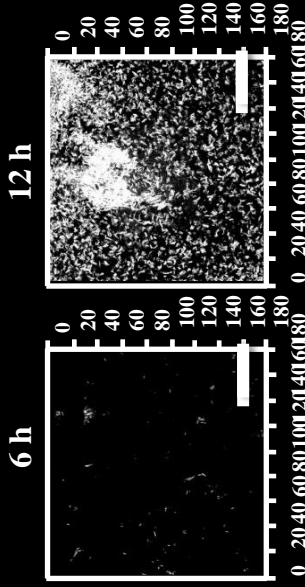
バイオフィルムの画像は，バイオフィルム形成開始 12 時間目の画像で，同じ時点でバイオフィルム試料の異なる位置から5つ画像を取って，代表的な例を示した．(A) KT2440株での画像 (B) KT2440(pCAR1)株での画像を示す．180 x 180 μm (xy) の範囲を示す．スケールバーは 40 μm を示す．



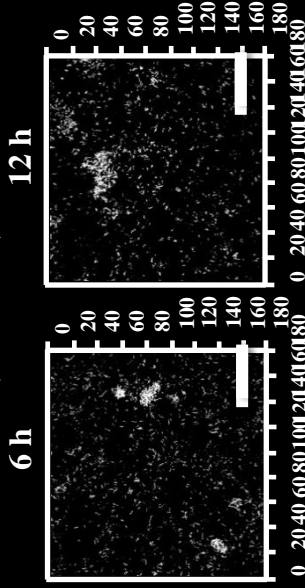
**Fig. 2-33. KT2440株のバイオフィルム形成に対する32個の遺伝子の過剰発現の影響.**

Fig. 2-1 において記した方法で、シャールレを用いて 30°C で静置培養したものを観察に供した。6, 12時間の培養後にシャールレの培養液を捨て、pBBad18k 保持株には0.02 mMのアラビノースを添加して培養した。最後に、共焦点レーザー顕微鏡による6, 12時間間のバイオフィルム構造の観察を行った。180 x 180 μm (xy) の範囲を示す。スケールバーは 40 μm を示す。画像は5枚の写真の中から代表的な例を示した。

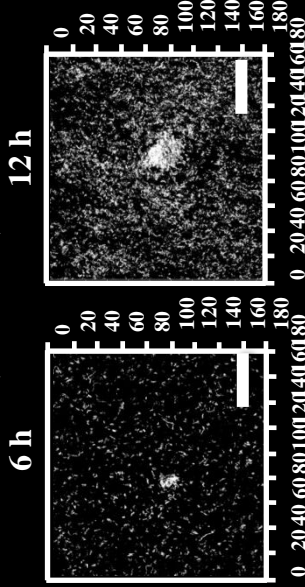
(PP\_0325)



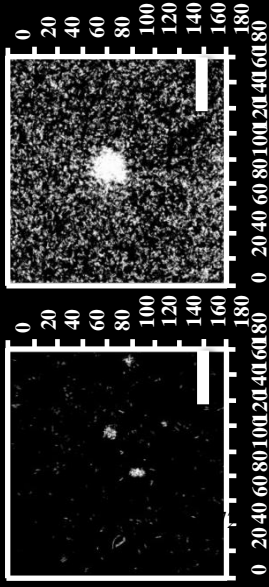
(PP\_0327)



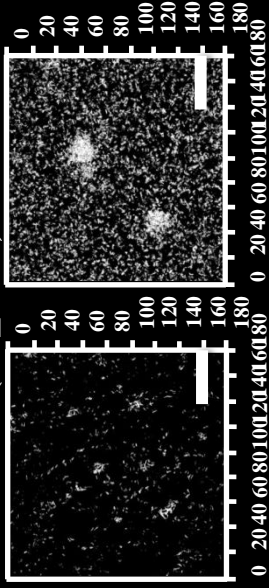
(PP\_0328)



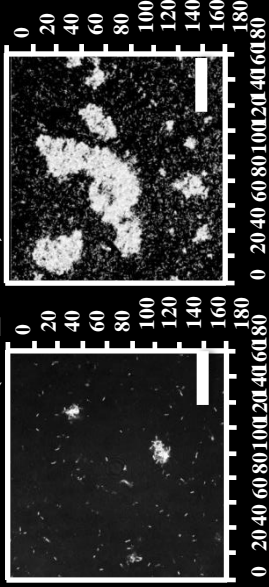
(PP\_0704)



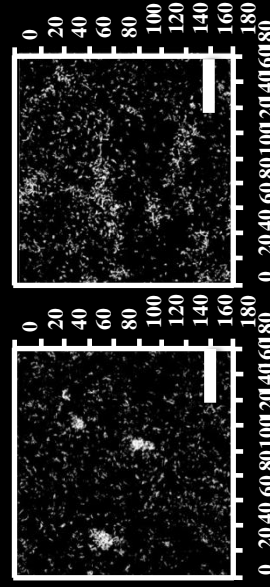
(PP\_0894)



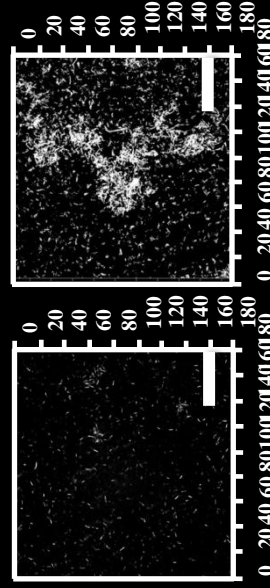
(PP\_0895)



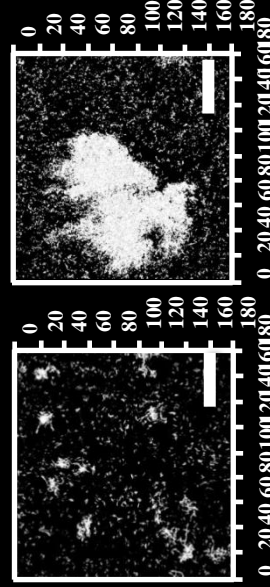
(PP\_0913)



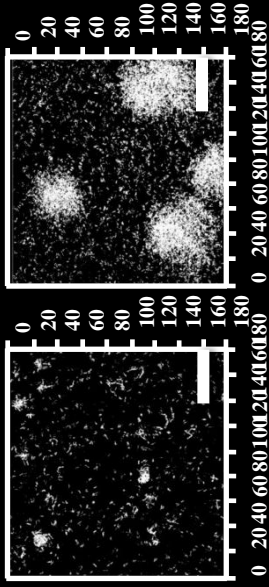
(PP\_1616)



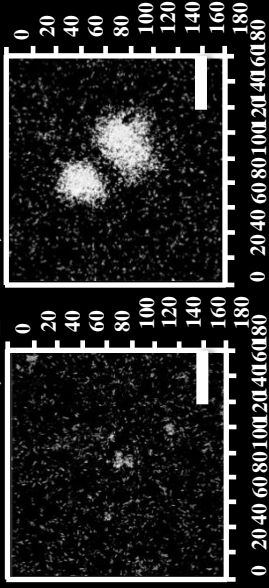
(PP\_1617)



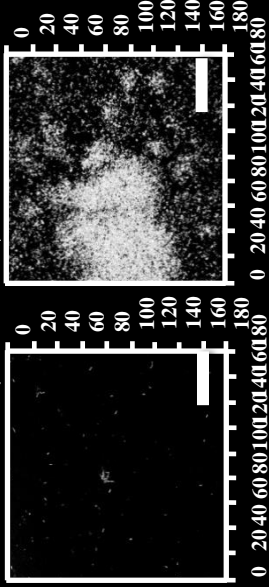
(PP\_1741)



(PP\_2183)

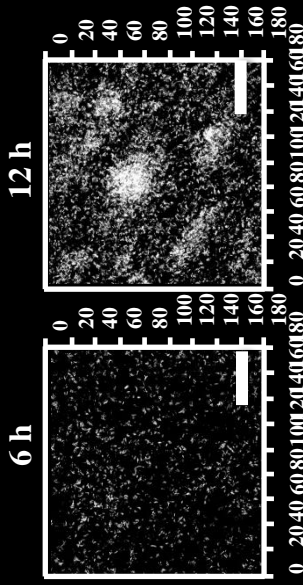


(PP\_2184)

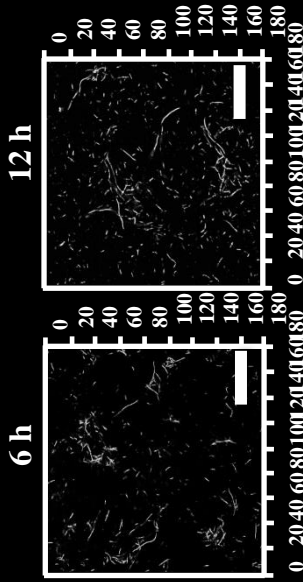




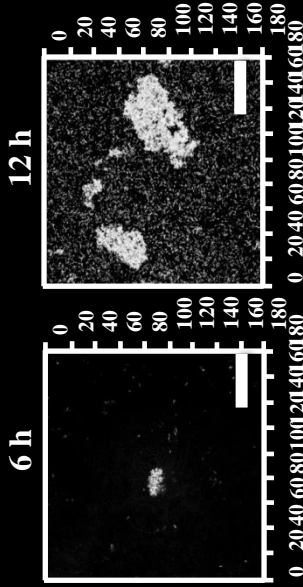
(PP\_2185)



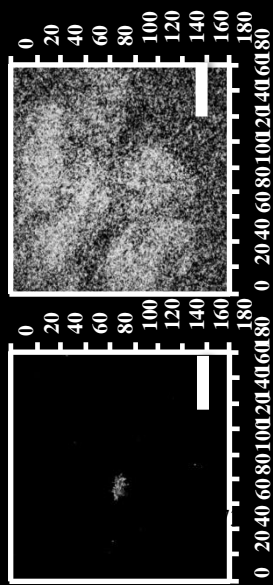
(PP\_2193)



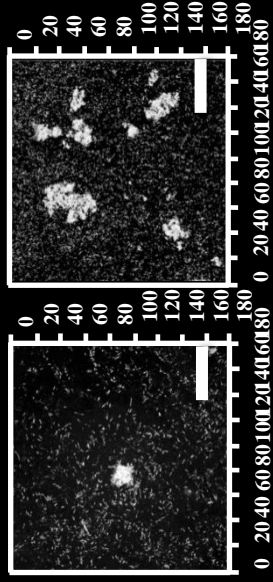
(PP\_2791)



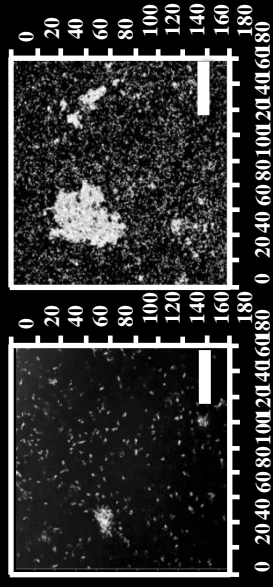
(PP\_3190)



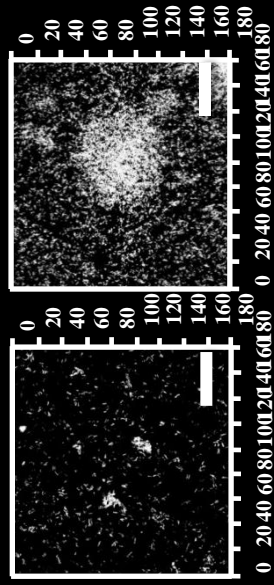
(PP\_3191)



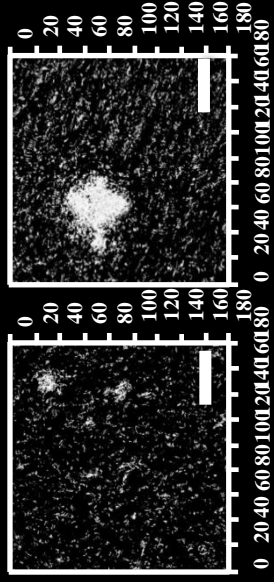
(PP\_4389)



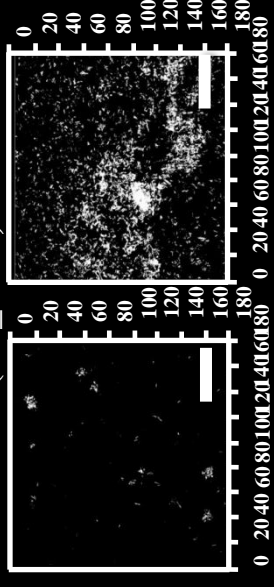
(PP\_4665)



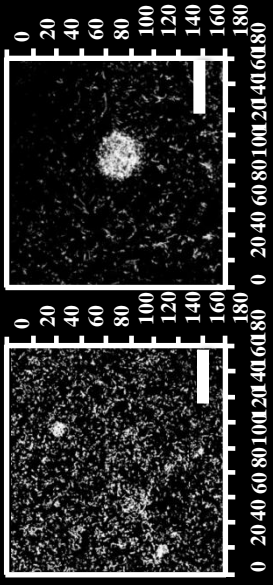
(PP\_4858)



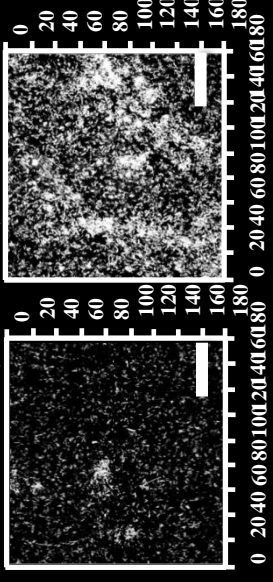
(PP\_4859)

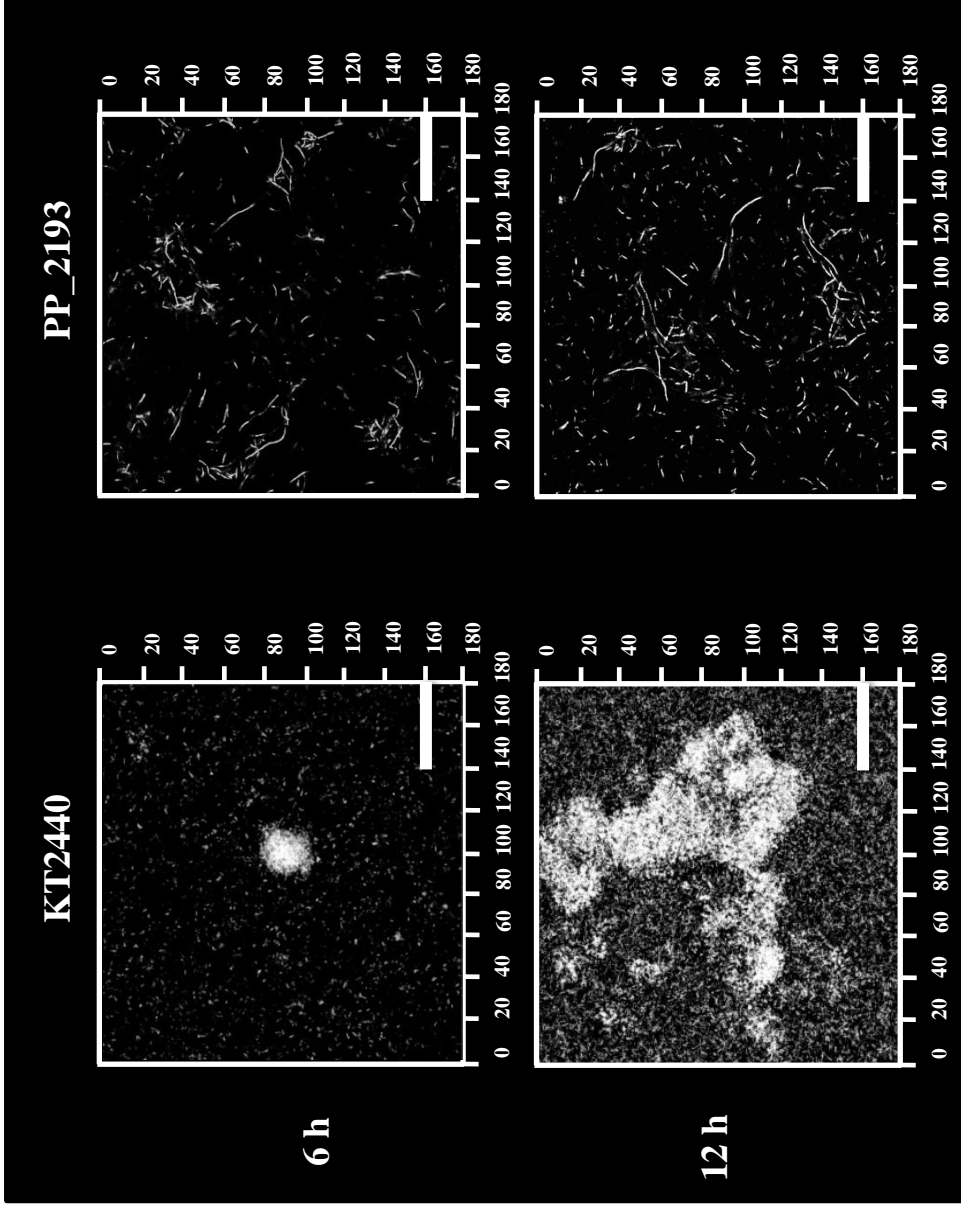


(PP\_5033)



(PP\_5306)





**Fig. 2-34. KT2440株のバイオフィーム形成に対するPP\_2193の過剰発現の影響**

KT2440株をFig. 2-1 において記した方法で、シャーレを用いて30°Cで静置培養したものを観察に供した。6, 12時間の培養後にシャーレの培養液を捨て、pBBad18k 保持株には0.02 mMのアラビノスを添加して培養した。最後に、共焦点レーザー顕微鏡による6, 12 時間目のバイオフィーム構造の観察を行った。画像は10枚の写真の中から代表的な例を示した。スケールバーは40 μmを示す。



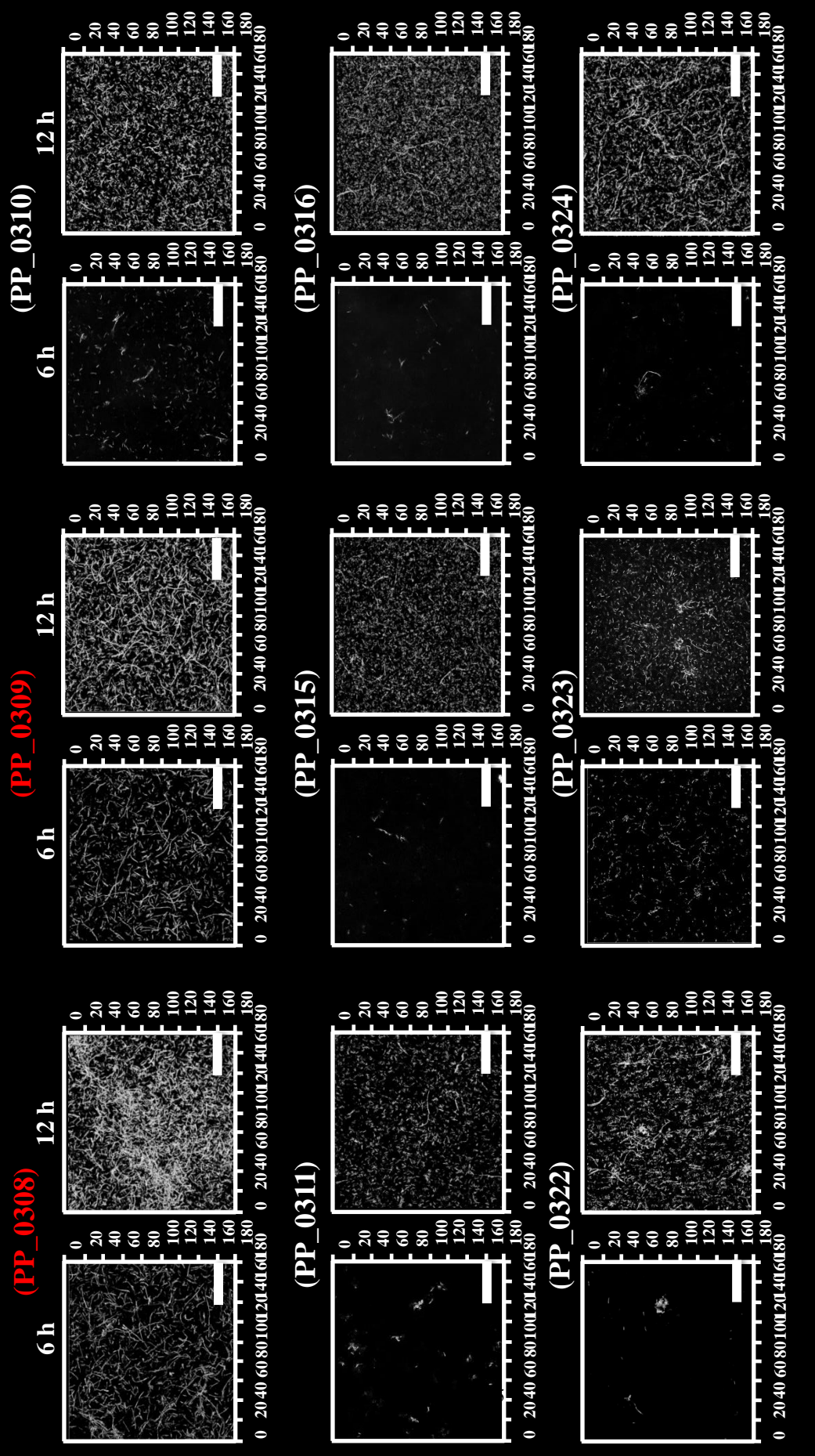
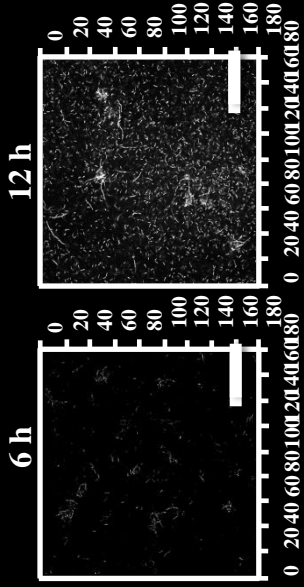


Fig. 2-35. KT2440(pCAR1)株のバイオルム形成に対する32個の遺伝子の過剰発現の影響

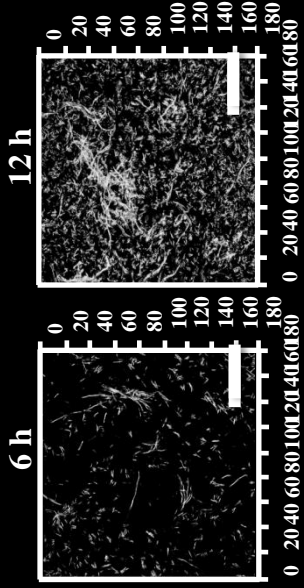
Fig. 2-1 において記した方法で、シャーレを用いて30℃で静置培養したものを観察に供した。6, 12時間の培養後にシャーレの培養液を捨て、pBBad18k 保持株には0.02 mMのアラビノースを添加して培養した。最後に、共焦点レーザー顕微鏡による6, 12時間間のバイオルム構造の観察を行った。180 x 180  $\mu\text{m}$  (xy) の範囲を示す。スケールバーは40  $\mu\text{m}$  を示す。画像は5枚の写真の中から代表的な例を示した。

(3 ページ中2 ページ目)

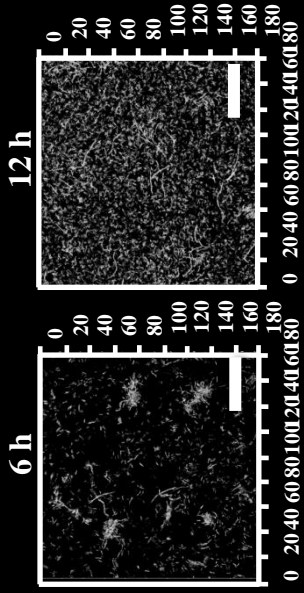
(PP\_0325)



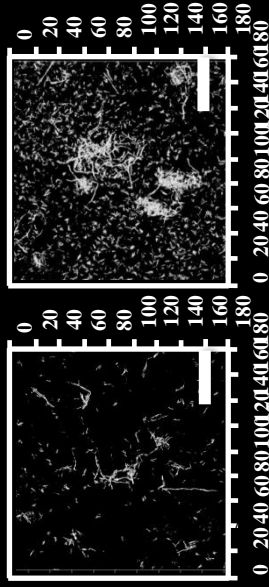
(PP\_0327)



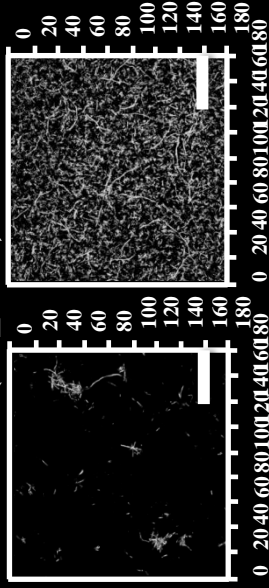
(PP\_0328)



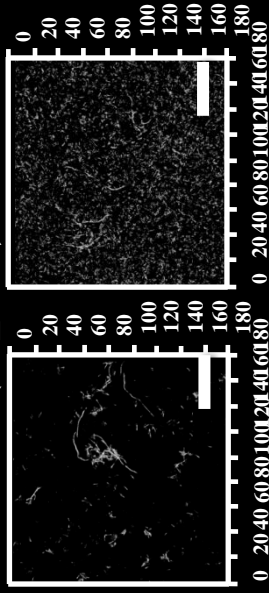
(PP\_0704)



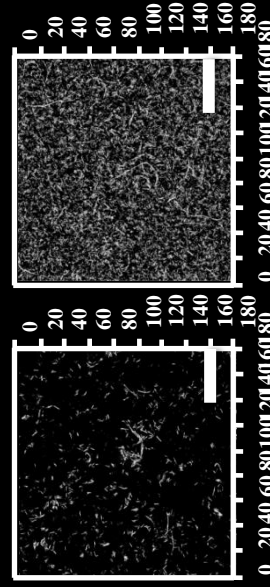
(PP\_0894)



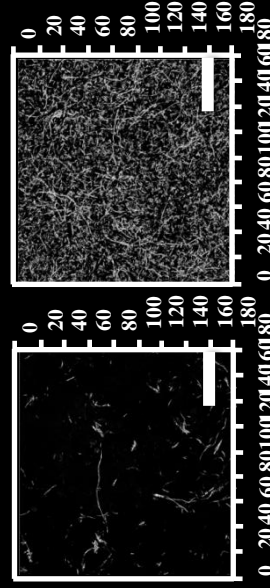
(PP\_0895)



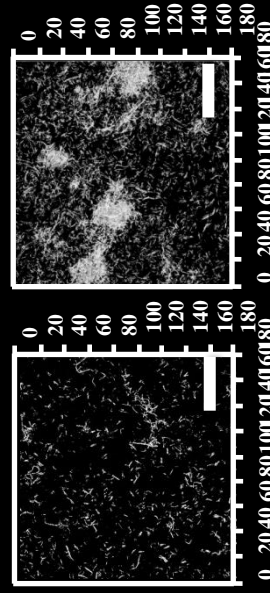
(PP\_0913)



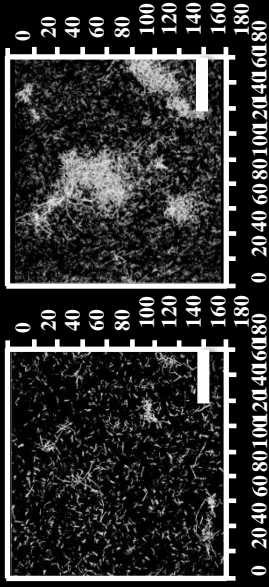
(PP\_1616)



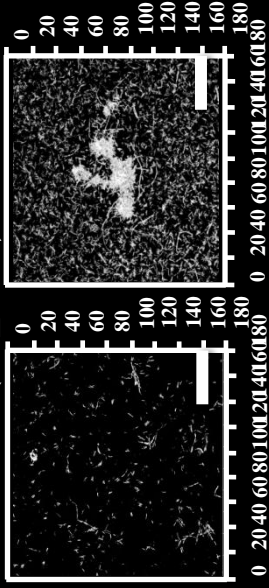
(PP\_1617)



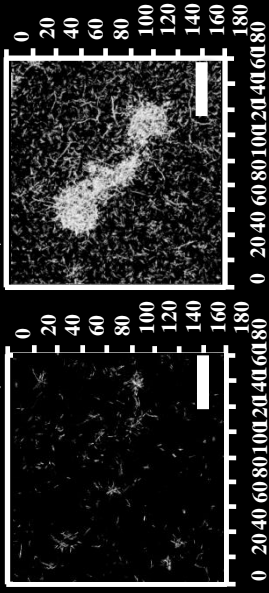
(PP\_1741)



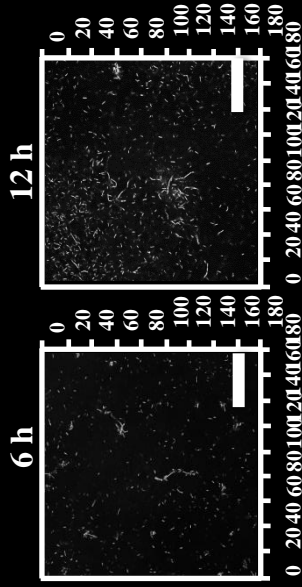
(PP\_2183)



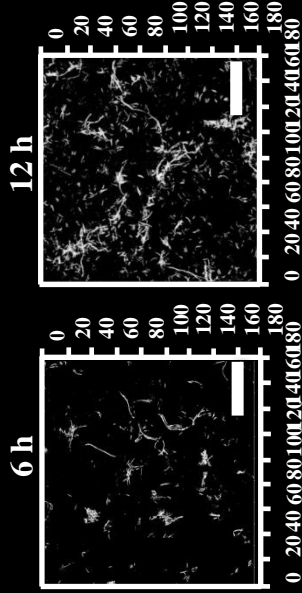
(PP\_2184)



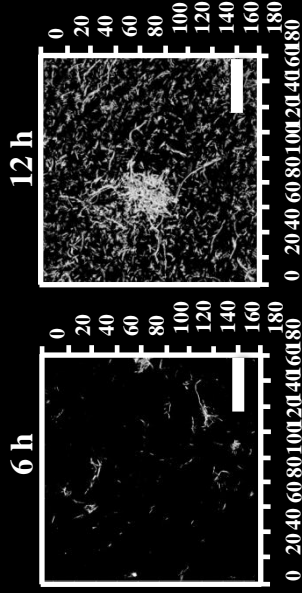
(PP\_2185)



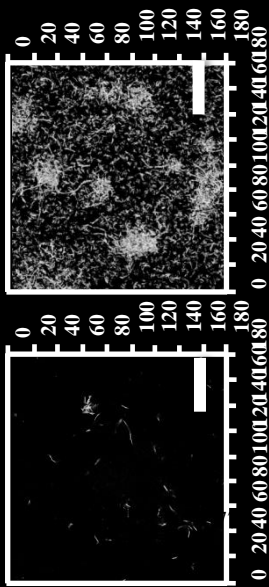
(PP\_2193)



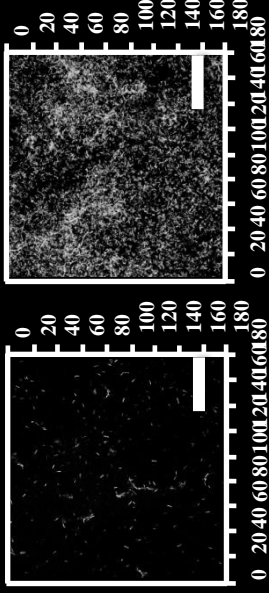
(PP\_2791)



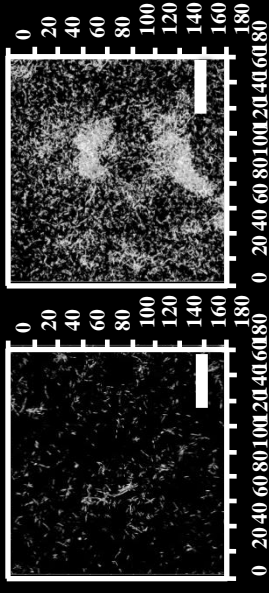
(PP\_3190)



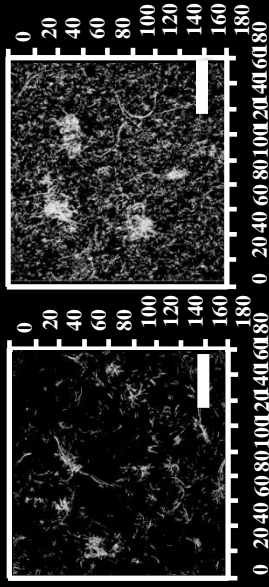
(PP\_3191)



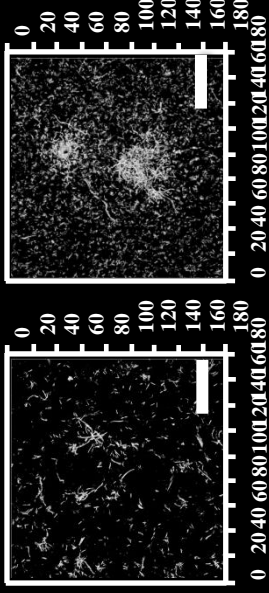
(PP\_4389)



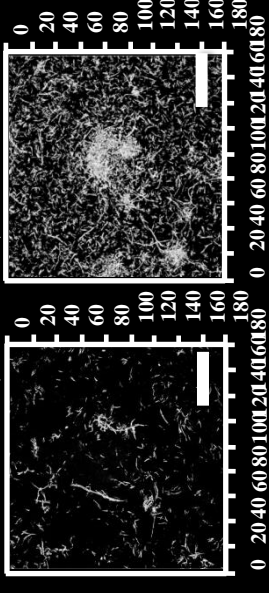
(PP\_4665)



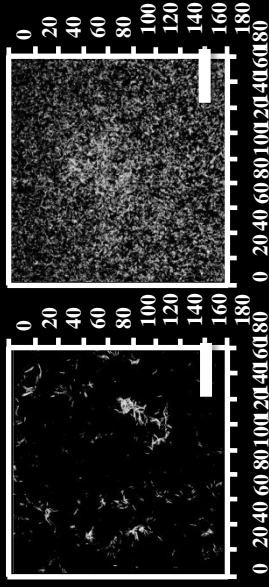
(PP\_4858)



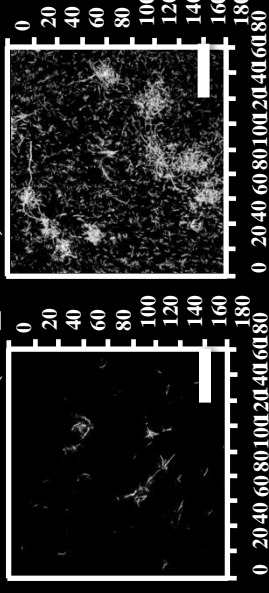
(PP\_4859)

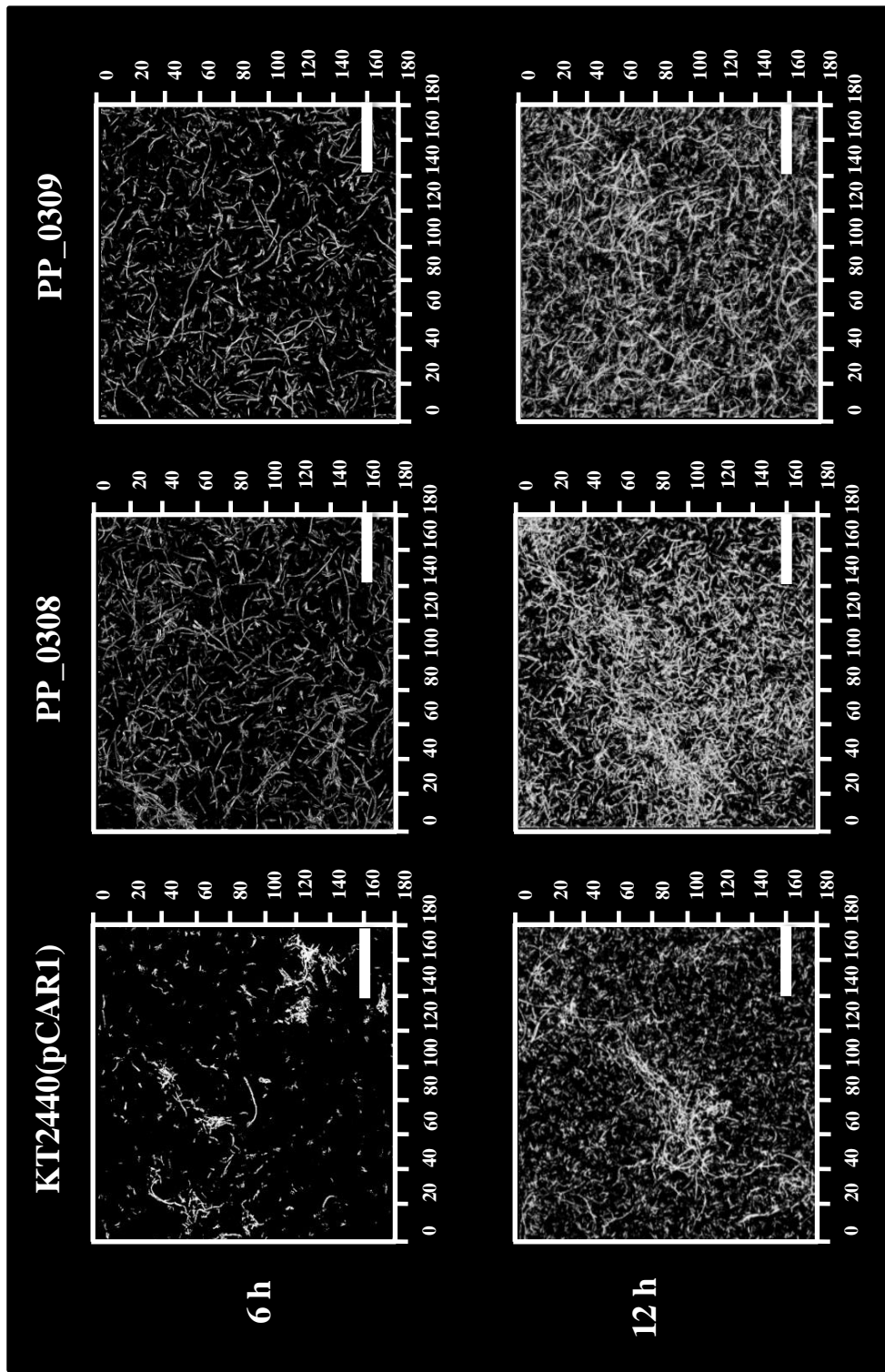


(PP\_5033)



(PP\_5306)

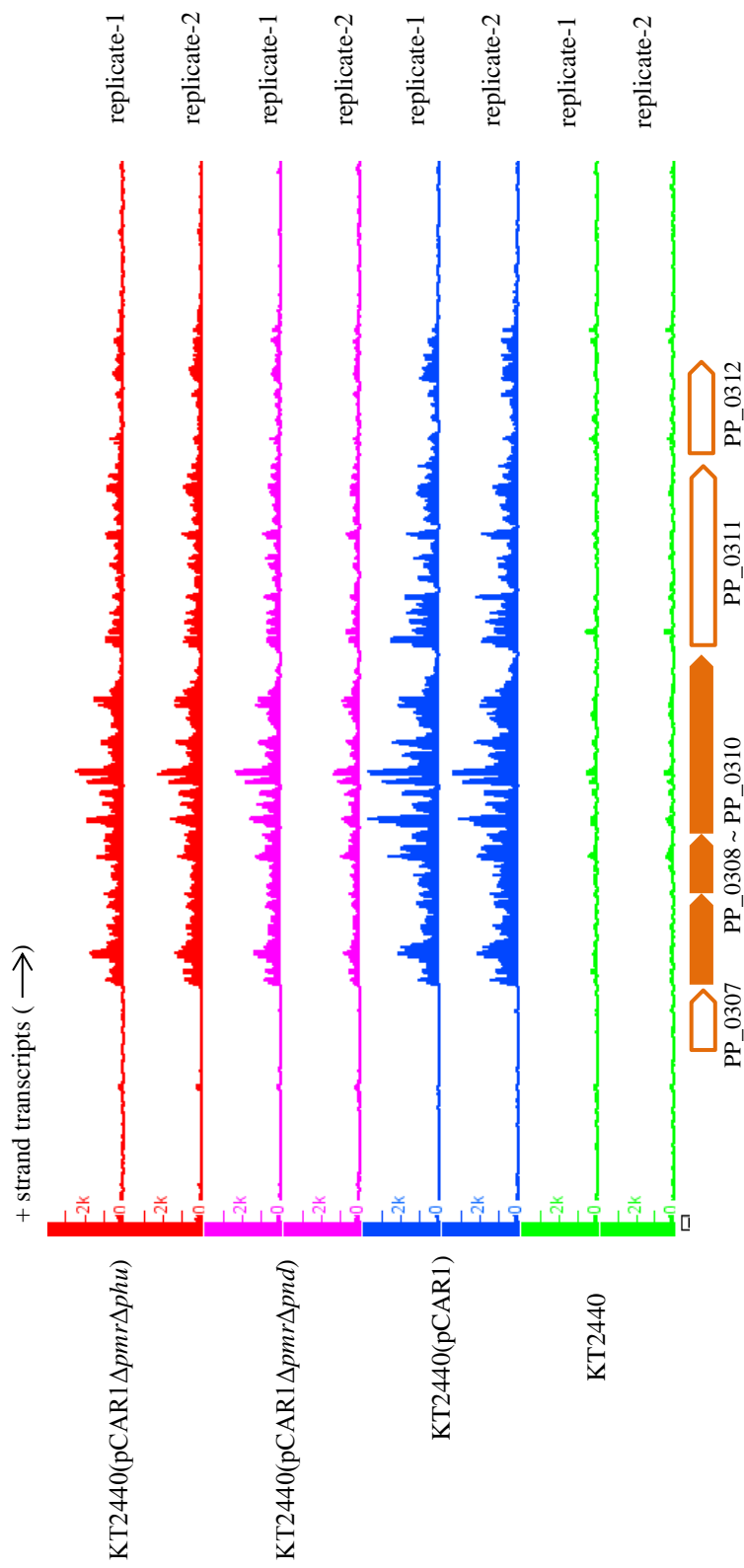




**Fig. 2-36. KT2440(pCAR1)株のバイオフィルム形成に対するPP\_0308, PP\_0309の過剰発現の影響.**

KT2440(pCAR1)株をFig. 2-1 において記した方法で、シャーレを用いて30℃で静置培養したものを観察に供した。6, 12時間の培養後にシャーレの培養液を捨て、pBBad18k 保持株には0.02 mMのアラビノースを添加して培養した。最後に、共焦点レーザー顕微鏡による6, 12時間目のバイオフィルム構造の観察を行った。画像は10枚の写真の中から代表的な例を示した。スケールバーは40 μmを示す。





**Fig. 2-37. 各株におけるRNAマッピング結果.**

x 軸は染色体塩基配列, y 軸は各プロープの示したシグナル値の大きさそれぞれ表しており, 橙色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. 緑色: KT2440株, 青色: KT2440(pCAR1)株, 桃色: KT2440(pCAR1ΔpmrΔpnd)株, 赤色: KT2440(pCAR1ΔpmrΔphu)で示す. 各株2連ずつの結果を示した (replicate-1,-2).

## 第3章

### pCAR1 保持株・非保持株が共存した際のバイオフィルムの解析

#### 3-1. 緒言

実際の環境中では、均一化された集団は存在せず、たとえ同じゲノムを持つ菌でも土壌中、河川・湖沼中と異なる環境に生きているものは全く異なる生理状態を示す。例えば河川水中では、水面近くで棲息するものと嫌氣的な川底に付着してバイオフィルムを形成して棲息するものには、大きな生理的違いが生じていることは疑いようがない。しかもそこにいるのは単一の菌ではなく、多様な菌が混ざり合いひしめき合いながらも微小な空間で棲み分けを果たしていると考えられる [Hibbing *et al.*, 2009]。第2章では「単独培養で同一のプラスミドを保持する3宿主を比較する」という着眼点で研究を進めてきたが、上述のように実環境中には多数の土着の菌が存在している。また、プラスミドが宿主のバイオフィルム形成に与える影響についての既存の報告の多くは単独の宿主を使用している。以上を考慮すれば、複数の宿主が存在する場合のプラスミド保持株の挙動を解析することは、実環境中、特にバイオフィルム形成条件で生育する宿主の振る舞いに対してプラスミド保持がどのような意味を持つかを解明する重要な鍵になる。

そこで本章では、第2章で得られた知見を基に、pCAR1 保持株・非保持株を混合して培養することでバイオフィルムを形成させ、プラスミド保持株と非保持株の挙動を解析し、バイオフィルム内での棲み分けや生き残りについてプラスミドが果たす役割を解明することを目的とした。

## 3-2. 材料と方法

### 3-2-1. 使用した菌株, プラスミド, 培地

本章で使用した培地はLBであり, 組成はTable 2-1に示した. 使用した菌株およびプラスミドはTable 3-1に示した.

### 3-2-2. 試薬, 酵素, 基本的な実験操作

第 2 章の 2-2-2 に示した.

### 3-2-3. GFPやmCherryを保持したプラスミドの作製とその宿主株の作製

混合培養した場合の挙動を解析するため, 各株にそれぞれ緑色蛍光タンパク質 (GFP) と赤色蛍光タンパク質 (mCherry) を挿入した株を作製した. プラスミドの作製法の詳細は以下の通り.

まず, *gfp* 遺伝子は, pKEN GFP mut3b (Addgene, Cambridge, MA, USA) から *XbaI-PstI* の制限酵素で切り出した産物を pZerO™-2 ベクター (Invitrogen, Carlsbad CA) にクローニングしシーケンスを確認した. 得られたプラスミドをマルチクローニングサイト内の *BamHI* と *XbaI* サイトで切断し, 同じ制限酵素 (*BamHI-XbaI*) で処理した pBBR1MCS-5 [Kovach *et al.*, 1995] とそれぞれライゲーションし, 目的のプラスミドを得た (Fig. 3-1).

mCherryについては pGEM-mCherry [Lagendijk *et al.*, 2010] から *BamHI* の制限酵素で切り出し, 同じ制限酵素 (*BamHI*) で処理した pBBR1MCS-5 とライゲーションし, 目的のプラスミドを得た (Fig. 3-2). 作製したプラスミドをそれぞれエレクトロポレーション法 (第 2 章の 2-2-5) によって pCAR1 保持・非保持の 3 種の *Pseudomonas* 属細菌 (*P. putida* KT2440, *P. aeruginosa* PAO1, *P. fluorescens* Pf0-1) にそれぞれ導入した.

### 3-2-4. 単独バイオフィルムの形成試験

第 2 章の 2-2-6 に示した.

### 3-2-5. 共存バイオフィルムの形成試験

混合培養の実験は静置培養系と連続培養系の二つの方法を用いて行った. 前培養までは第 2 章の 2-2-6 に示した方法を用いた. その後の操作については以下に示す.

#### ・静置培養系

得られた各株の培養液を比率が 1:1 (2 種併せて OD<sub>600</sub> が 0.01 となるように植菌した) となるようにシャーレに混合植菌し, 60° 程度傾けた状態で, 30°C で静置培養した. 培養開始 6, 12 時間後に, 2-2-7 に示す方法で共焦点レーザー顕微鏡によるバイオフィルムの観察を行った.

**Table 3-1. 本章で用いた菌株とプラスミド.**

Strain or plasmid	Relevant characteristics	Source or reference
Bacterial strains		
<i>P. putida</i> KT2440	naturally Ap <sup>r</sup> , naturally Cm <sup>r</sup> , naturally Gm <sup>r</sup> , naturally Km <sup>r</sup> , naturally Rif <sup>r</sup> , naturally Sm <sup>r</sup> , naturally Tc <sup>r</sup>	Nelson <i>et al.</i> , 2002
<i>P. putida</i> KT2440(pCAR1)	<i>P. putida</i> KT2440 harboring pCAR1, naturally Tc <sup>r</sup> , naturally Cm <sup>r</sup>	Miyakoshi <i>et al.</i> , 2007
<i>P. putida</i> KT2440(pBBR1MCS-5::gfp)	<i>P. putida</i> KT2440 carrying pBBR1MCS-5::gfp	This study
<i>P. putida</i> KT2440(pBBR1MCS-5::mCherry)	<i>P. putida</i> KT2440 carrying pBBR1MCS-5::mCherry	This study
<i>P. putida</i> KT2440(pCAR1) (pBBR1MCS-5::gfp)	<i>P. putida</i> KT2440(pCAR1) carrying pBBR1MCS-5::gfp	This study
<i>P. putida</i> KT2440(pCAR1) (pBBR1MCS-5::mCherry)	<i>P. putida</i> KT2440 (pCAR1)carrying pBBR1MCS-5::mCherry naturally Km <sup>r</sup>	This study
<i>P. aeruginosa</i> PAO1	<i>P. aeruginosa</i> PAO1 harboring pCAR1, naturally Km <sup>r</sup>	Stover <i>et al.</i> , 2000
<i>P. aeruginosa</i> PAO1(pCAR1)	<i>P. aeruginosa</i> PAO1 carrying pBBR1MCS-5::gfp	Takahashi <i>et al.</i> , 2009
<i>P. aeruginosa</i> PAO1(pBBR1MCS-5::gfp)	<i>P. aeruginosa</i> PAO1 carrying pBBR1MCS-5::gfp	This study
<i>P. aeruginosa</i> PAO1(pBBR1MCS-5::mCherry)	<i>P. aeruginosa</i> PAO1 carrying pBBR1MCS-5::mCherry	This study
<i>P. aeruginosa</i> PAO1 (pCAR1) (pBBR1MCS-5::gfp)	<i>P. aeruginosa</i> PAO1(pCAR1) carrying pBBR1MCS-5::gfp	This study
<i>P. aeruginosa</i> PAO1 (pCAR1) (pBBR1MCS-5::mCherry)	<i>P. aeruginosa</i> PAO1(pCAR1) carrying pBBR1MCS-5::mCherry naturally Tc <sup>r</sup>	This study
<i>P. fluorescens</i> Pf0-1	<i>P. fluorescens</i> Pf0-1-derivative strain with the introduced Km <sup>r</sup> gene into Pf101_0559	Deflaun <i>et al.</i> , 1990
<i>P. fluorescens</i> Pf0-1 Km	<i>P. fluorescens</i> Pf0-1 Km harboring pCAR1	Takahashi <i>et al.</i> , 2009
<i>P. fluorescens</i> Pf0-1 Km(pCAR1)	<i>P. fluorescens</i> Pf0-1 Km carrying pBBR1MCS-5::gfp	Takahashi <i>et al.</i> , 2009
<i>P. fluorescens</i> Pf0-1 (pBBR1MCS-5::gfp)	<i>P. fluorescens</i> Pf0-1 carrying pBBR1MCS-5::gfp	This study
<i>P. fluorescens</i> Pf0-1 (pBBR1MCS-5::mCherry)	<i>P. fluorescens</i> Pf0-1 carrying pBBR1MCS-5::mCherry	This study
<i>P. fluorescens</i> Pf0-1 Km(pCAR1) (pBBR1MCS-5::gfp)	<i>P. fluorescens</i> Pf0-1 Km(pCAR1) carrying pBBR1MCS-5::gfp	This study
<i>P. fluorescens</i> Pf0-1 Km(pCAR1) (pBBR1MCS-5::mCherry)	<i>P. fluorescens</i> Pf0-1 Km(pCAR1) carrying pBBR1MCS-5::mCherry	This study
<i>E. coli</i> DH5α	F <sup>-</sup> , φ80dlacZAM15, Δ( <i>lacZ</i> YA- <i>argF</i> )U169, <i>endA</i> I, <i>recA</i> I, <i>hsdR</i> I7(r <sub>K</sub> m <sub>K</sub> <sup>+</sup> ), <i>deoR</i> , <i>thi</i> -1, <i>supE</i> 44, <i>gyrA</i> 96, <i>relA</i> I, λ, <i>phoA</i>	Toyobo
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> , 2006;
pBBR1MCS-5	Gm <sup>r</sup> , <i>lacZa</i> mob; compatible with IncP, IncQ and IncW plasmids	Takahashi <i>et al.</i> 2009
pZER-O-2	Cloning vector, MCS in <i>lacZ'</i> , <i>neo</i> , Km <sup>r</sup>	Kovach <i>et al.</i> 1995
pKEN-Gfp mut3b	pKEN, Apr, gfp	Invitrogen Add gene



### ・連続培養系

得られた各株の培養液を比率が 1:1 (2 種併せて OD<sub>600</sub> が 0.01 となるように植菌した) となるように希釈した. 三方活栓により 300 µl の細胞懸濁液を下流から注入し, 室温で 1 時間静置することで微生物の付着を促した. その後 0.2 ml/min の速度で 1/10 LB 培地の連続供給を開始し, 30°C で 144 時間まで培養を行った. バイオフィルムの観察は共焦点レーザー顕微鏡で 24 時間ごとに行った.

### 3-2-6. 共焦点レーザー顕微鏡によるバイオフィルムの観察及び画像獲得

蛍光タンパク質が挿入されていない株については, 第 2 章の 2-2-7 に示した非破壊, 非染色など無処理でバイオフィルムの構造の可視化ができる手法で検出した. 蛍光タンパクを保持している株の観察については, GFP の場合, 波長 488 nm のアルゴンレーザーを照射し, 波長 509 nm の蛍光を検出した. mCherry の場合は波長 543 nm のヘリウムネオンレーザーで照射し, 波長 610 nm の蛍光を検出した.

### 3-2-7. フローサイトメトリー (Flow cytometry)

フローサイトメトリーは細胞の大きさや内部構造の違い, 蛍光強度などを 1 個ずつ測定する方法で, 1 回の操作で多くのパラメーターを客観的かつ高速に測定することができるものである. 手順の説明を以下に示す.

GFP や mCherry を保持する pCAR1 保持・非保持の 3 種の *Pseudomonas* 属細菌に関し, 混合培養した際の各株の比率をそれぞれ定量した. 前培養までは第 2 章の 2-2-6 に示した方法を用い, 得られた培養液をそれぞれ初期 OD<sub>600</sub> が 0.05 となるように 500 ml 容へそ付フラスコに入った 100 ml の LB 液体培地に混合植菌し, 30°C, 120 rpm で培養した. 24 時間ごとに新しい LB 液体培地に植え継ぎ, 計 144 時間培養した. 解析にはフローサイトメトリー (BD Biosciences, USA) を用いて培養開始 24, 48, 72, 96, 120, 144 時間培養した菌株を使用した. 解析に用いたパラメーターを以下に示す.

- ・前方散乱光 (Forward scatter : FSC) =細胞の大きさや表面積を示す
- ・側方散乱光(Side scatter : SSC) =細胞内部構造の複雑さを示す
- ・FITC (fluorescein isothiocyanate) : GFP 蛍光検出用
- ・PE (Phycoerythrin) : mCherry 蛍光検出用

### 3-2-8. 生育曲線の作成

GFP や mCherry を保持した株の生育について, LB 培地で OD<sub>600</sub> を経時的に測定する事で観察した. なお, 詳細な手順は補章 1 に記した.

### 3-2-9. pCAR1 保持率測定試験

pCAR1 を保持している株 [KT2440(pCAR1), PAO1(pCAR1), Pf0-1(pCAR1)] において,

pBBR1MCS-5::gfp や pBBR1MCS-5::mCherry ベクターの保持が pCAR1 の安定性に影響を及ぼさないかを LB 培地で培養開始 3 時間目と 18 時間目で生じたコロニーを CAR プレートにパッチし CAR 資化能を有するコロニーの割合を測定することで確認した。実験の手順は補章 1 に記した。

### 3-3. 結果と考察

#### 3-3-1. 単独培養によるバイオフィーム形成

蛍光タンパク質はしばしば細胞の生理状態の変化を引き起こすため、まず作製した株をそれぞれ単独培養し、**2-3-1**で見られた蛍光タンパク質を保持していない野生型株での表現型の再現ができるかなどの基盤情報を取得する。さらに、同じ株で蛍光タンパク質を入れ換えたものを作製し、これらの影響を見ることで蛍光タンパクによるバイオフィーム表現型への影響も確認した。次に、蛍光タンパク質の遺伝子を組み込んだ菌株の単独でのデータが蓄積したら、各株を混合培養した場合の挙動を、共焦点走査型レーザー顕微鏡を用いて解析を行った。

まず、pBBR1MCS-5::gfpやpBBR1MCS-5::mCherryベクターが各株に生育負荷を与えないか確認した。**3-2-8**に示した方法で培養し、3時間ごとに24時間まで生育曲線の作成を行った。その結果、pCAR1保持株やpCAR1保持株にpBBR1MCS-5::gfp、pBBR1MCS-5::mCherryベクターが入っているほとんどの株で生育に違いは見られず(Fig. 3-3, Fig. 3-4, Fig. 3-5)、これらのベクターの保持に伴う生育への影響は無いことを確認した。また、pCAR1やGFP、mCherry発現ベクターが時間経過に伴い脱落していく可能性を検討するために、三つのpCAR1保持株 [KT2440(pCAR1), PAO1(pCAR1) 又は Pf0-1(pCAR1)] にGFP、mCherry発現ベクターを保持させた株の安定性試験を、**3-2-9**の方法でCAR資化能や蛍光を発する株の割合を測定することで行った。培養開始3時間目と24時間目で各株についてそれぞれ100コロニーずつCARプレート、LBプレートにパッチして培養し、CARプレートではクリアゾーンの有無によりCAR資化能の保持率を、LBプレートでは蛍光を発する株の割合を測定した。その結果、いずれも99%以上のコロニーでCAR資化能やGFP、mCherryの発現が見られ、これらの株でpCAR1やGFP、mCherry発現ベクターが安定に保持されることが確認された (Fig. 3-6)。

次に、Fig. 2-1に示す方法でシャーレに12時間までバイオフィームを形成させ、共焦点レーザー顕微鏡による画像を取得した。その結果、KT2440株はマッシュルーム状や繊維状のフラットなバイオフィームを形成し、PAO1株やPf0-1株ではマッシュルーム状またはフラット状のバイオフィームになる様子が観察され、野生型株と差がないことを確認した (Fig. 3-7, Fig. 3-8, Fig. 3-9)。さらに、取得した画像についてCOMSTATを用いてバイオフィーム量を定量した結果、ほとんどの株が野生型株とほぼ同じ数値を示し (Table 3-2)、GFP、mCherry発現ベクターが入ることによってバイオフィーム量にも影響がないことを確かめることができた。このことから、pBBR1MCS-5::gfp又はpBBR1MCS-5::mCherry保持株・非保持株や蛍光タンパク質を入れ換えたものでバイオフィーム形状に差が見られず、**2-3-1**で見られた表現型の再現性が確認できたため、これらの株を次の混合培養の実験に使用することにした。

Table 3-2. COMSTATを用いたバイオフィルム量の定量.

	Biomass( $\mu\text{m}^3/\mu\text{m}^2$ )
KT2440	1.57 ± 0.13
KT2440(pBBRMCS-5::gfp)	1.51 ± 0.32
KT2440(pBBRMCS-5::mCherry)	1.53 ± 0.19
KT2440(pCARI)	0.69 ± 0.11
KT2440(pCARI)(pBBRMCS-5::gfp)	0.67 ± 0.30
KT2440(pCARI)(pBBRMCS-5::mCherry)	0.69 ± 0.37
PAO1	2.15 ± 0.23
PAO1(pBBRMCS-5::gfp)	2.32 ± 0.04
PAO1(pBBRMCS-5::mCherry)	1.92 ± 0.04
PAO1(pCARI)	2.26 ± 0.07
PAO1(pCARI)(pBBRMCS-5::gfp)	2.32 ± 0.32
PAO1(pCARI)(pBBRMCS-5::mCherry)	2.05 ± 0.47
Pf0-1	1.10 ± 0.02
Pf0-1(pBBRMCS-5::gfp)	1.20 ± 0.11
Pf0-1(pBBRMCS-5::mCherry)	1.06 ± 0.08
Pf0-1(pCARI)	1.06 ± 0.08
Pf0-1(pCARI)(pBBRMCS-5::gfp)	1.21 ± 0.15
Pf0-1(pCARI)(pBBRMCS-5::mCherry)	1.21 ± 0.38

The values are the means of data from at least 3 image stacks. (Standard deviations is included as ±)

### 3-3-2. 混合培養によるバイオフィーム形成

以上の単独培養での結果を受けて、各株について混合培養した場合の影響を解析することにした。各株の混合培養の組み合わせは Table 3-3 に示した (グループ-A, B の違いは同じ株で蛍光タンパク質を入れ換えたもの)。グループ-A, B の株を、各々 Fig. 2-1 や 3-2-5 に示す方法で LB 培地を用いて静置培養し、培養開始後 6, 12 時間目に共焦点レーザー顕微鏡により気液界面付近に形成されたバイオフィームを観察した。その結果、各グループ-A, B の組み合わせで 6, 12 時間共にバイオフィームが形成されることが観察された。またグループ間に形成されたバイオフィーム構造にも差が見られず、同じ構造を示めすことを確認した (Fig. 3-10)。混合培養での観察結果から、二つの興味深い現象が見られた。まず、PAO1 株で pCAR1 保持株や非保持株を他の株と混合培養した場合に各株はマッシュルーム状のバイオフィームを形成し、他の株の存在はほとんど見られない、すなわちこれらの株が他の株を優占化する傾向が見られた (Fig. 3-11)。次に、同一の細胞の pCAR1 保持株や非保持株をそれぞれ混合した三つの組み合わせ [KT2440 + KT2440(pCAR1), PAO1 + PAO1(pCAR1), Pf0-1 + Pf0-1(pCAR1)] で、ある一つの株が優占化することではなく、混ざらない状態、すなわち各株がそれぞれバイオフィームを形成している状態で存在する傾向が観察された (Fig. 3-12)。混合培養した場合のバイオフィーム形態については、①両株がバイオフィームを形成し離れている形態 [Nielsen *et al.*, 2000], ②両株が共凝集してバイオフィームを形成した形態 [Rickard *et al.*, 2006], ③両株が共凝集をしてバイオフィームを形成するが、それぞれの株が階層化している形態 [Hansen *et al.*, 2007b] の三つがよく知られている [Elias and Banin, 2012]。しかし、こうした研究では、プラスミド保持に伴うバイオフィーム形態への影響は考慮しないことがほとんどであった。そこで、三つのプラスミド保持株・非保持株の組み合わせに注目し研究を進めることにした。

### 3-3-3. pCAR1 保持株と非保持株を混合した場合の生残率の解析

以前の研究において、浮遊状態で 3 種の *Pseudomonas* 属細菌 (*P. putida* KT2440 株, *P. aeruginosa* PAO1 株, *P. fluorescens* Pf0-1 株) を用い pCAR1 保持株と非保持株の競合培養した際に、pCAR1 保持株の比率が顕著に減少し、淘汰される速度は宿主により異なる (KT2440 株 > PAO1 株 > Pf0-1 株の順) ことが明らかにされていた [Takahashi *et al.*, 2014]。一方、上記 3-3-2 のバイオフィーム状態では、KT2440 + KT2440(pCAR1), PAO1 + PAO1(pCAR1), Pf0-1 + Pf0-1(pCAR1) 株を混合培養した場合、pCAR1 保持株も非保持株と共にバイオフィーム形成し、pCAR1 保持株の淘汰は見られないことが明らかになった。このようにプラスミド保持株がバイオフィーム状態と浮遊状態で異なる挙動を示したため、浮遊状態とバイオフィーム状態でプラスミド保持株の淘汰されやすさを比較することにした。解析手法として、バイオフィーム状態では共焦点レーザー顕微鏡を用い、浮遊状態では顕微鏡法に加えてサンプル中の細菌の大きさや内部構造の違い、蛍光

Table 3-3. 混合培養した株の組み合わせ.

**Group A (15)**

- KT2440-pBBR1MCS-5::gfp + KT2440(pCAR1)-pBBR1MCS-5::mCherry
- KT2440-pBBR1MCS-5::gfp + PAO1-pBBR1MCS-5::mCherry
- KT2440-pBBR1MCS-5::gfp + PAO1(pCAR1)-pBBR1MCS-5::mCherry
- KT2440-pBBR1MCS-5::gfp + Pf01-pBBR1MCS-5mCherry
- KT2440-pBBR1MCS-5::gfp + Pf01(pCAR1)-pBBR1MCS-5::mCherry
- KT2440(pCAR1)-pBBR1MCS-5::gfp + PAO1-pBBR1MCS-5::mCherry
- KT2440(pCAR1)-pBBR1MCS-5::gfp + PAO1(pCAR1)-pBBR1MCS-5::mCherry
- KT2440(pCAR1)-pBBR1MCS-5::gfp + Pf01(pCAR1)-pBBR1MCS-5::mCherry
- KT2440(pCAR1)-pBBR1MCS-5::gfp + Pf01-pBBR1MCS-5::mCherry
- KT2440(pCAR1)-pBBR1MCS-5::gfp + Pf01(pCAR1)-pBBR1MCS-5::mCherry
- PAO1-pBBR1MCS-5::gfp + PAO1(pCAR1)-pBBR1MCS-5::mCherry
- PAO1-pBBR1MCS-5::gfp + Pf01-pBBR1MCS-5::mCherry
- PAO1-pBBR1MCS-5::gfp + Pf01(pCAR1)-pBBR1MCS-5::mCherry
- PAO1(pCAR1)-pBBR1MCS-5::gfp + Pf01-pBBR1MCS-5::mCherry
- PAO1(pCAR1)-pBBR1MCS-5::gfp + Pf01(pCAR1)-pBBR1MCS-5::mCherry
- Pf01-pBBR1MCS-5::gfp + Pf01(pCAR1)-pBBR1MCS-5::mCherry

**Group B (15)**

- KT2440-pBBR1MCS-5::mCherry+ KT2440(pCAR1)-pBBR1MCS-5::gfp
- KT2440-pBBR1MCS-5::mCherry + PAO1-pBBR1MCS-5::gfp
- KT2440-pBBR1MCS-5::mCherry + PAO1(pCAR1)-pBBR1MCS-5::gfp
- KT2440-pBBR1MCS-5::mCherry+ Pf01-pBBR1MCS-5::gfp
- KT2440-pBBR1MCS-5::mCherry+ Pf01(pCAR1)-pBBR1MCS-5::gfp
- KT2440(pCAR1)-pBBR1MCS-5::mCherry+ PAO1-pBBR1MCS-5::gfp
- KT2440(pCAR1)-pBBR1MCS-5::mCherry + PAO1(pCAR1)-pBBR1MCS-5::gfp
- KT2440(pCAR1)-pBBR1MCS-5::mCherry+ Pf01-pBBR1MCS-5::gfp
- KT2440(pCAR1)-pBBR1MCS-5::mCherry + Pf01(pCAR1)-pBBR1MCS-5::gfp
- Pf01-pBBR1MCS-5::mCherry + Pf01(pCAR1)-pBBR1MCS-5::gfp
- KT2440(pCAR1)-pBBR1MCS-5::mCherry + Pf01(pCAR1)-pBBR1MCS-5::gfp
- PAO1-pBBR1MCS-5::mCherry + PAO1(pCAR1)-pBBR1MCS-5::gfp
- PAO1-pBBR1MCS-5::mCherry + Pf01-pBBR1MCS-5::gfp
- PAO1-pBBR1MCS-5::mCherry + Pf01(pCAR1)-pBBR1MCS-5::gfp
- PAO1(pCAR1)-pBBR1MCS-5::mCherry + Pf01-pBBR1MCS-5::gfp
- PAO1(pCAR1)-pBBR1MCS-5::mCherry + Pf01(pCAR1)-pBBR1MCS-5::gfp
- Pf01-pBBR1MCS-5::mCherry + Pf01(pCAR1)-pBBR1MCS-5::gfp

強度などを一細胞毎に測定できるフローサイトメトリーを用いた (Fig. 3-13).

以前の浮遊状態での研究は、コハク酸を唯一の炭素源とする液体無機培地で 24 時間ごとに 1/100 量ずつ植え継ぎを繰り返しながら、合計 144 時間培養したものをコロニーハイブリダイゼーション法によりプラスミド保持株の比率を算出したが、今回は蛍光タンパク質発現ベクターの保持や培地の違いなど実験条件が異なっていた。そこで 24 時間ごとに LB 培地で植え継ぎを繰り返しながら合計 144 時間まで培養し、プラスミド保持株が以前と同様に淘汰されるかフローサイトメトリーや共焦点走査型レーザー顕微鏡を用いて確認した。その結果、KT2440 + KT2440(pCAR1), PAO1 + PAO1(pCAR1), Pf0-1 + Pf0-1(pCAR1)株の全ての組み合わせ共通に pCAR1 非保持株の比率は上昇が見られたものの、pCAR1 保持株の比率は減少して行く傾向が見られた (Fig. 3-14 上, Fig. 3-15 上, Fig. 3-16 上, Fig. 3-17 左)。さらに、蛍光タンパク質を入れ換えた株でも pCAR1 保持株の比率が減少し、上記の結果と一致している (Fig. 3-14 下, Fig. 3-15 下, Fig. 3-16 下, Fig. 3-17 右)。このことから、浮遊状態で pCAR1 保持株と非保持株を混合して継代培養すると、やはり pCAR1 保持株の比率が減少することが確認された。また、上記と同じように LB 培地に植え継ぎを繰り返しながら合計 144 時間まで培養し、24 時間ごとに共焦点レーザー顕微鏡を用いて解析を行った。画像解析ソフトウェア IMARIS を用いて細胞の画像を取得したところ、目で区別可能なほどに、培養時間に伴い pCAR1 保持株の淘汰が見られた (Fig. 3-18, Fig. 3-19, Fig. 3-20)。また、得られた画像から COMSTAT でプラスミド保持株と非保持株の比率を定量したところ、pCAR1 保持株の比率が顕著に減少し (Table. 3-4)、フローサイトメトリーの結果と一致していた。以上より、混合培養した浮遊状態の集団中では、pCAR1 非保持株が優占化することが確認された。

次に、混合培養したバイオフィーム状態での結果を示す。バイオフィーム状態では 3-2-5 に示した連続培養系を用いて 144 時間まで培養しながら、24 時間ごとに共焦点レーザー顕微鏡による画像を取得し、IMARIS や COMSTAT を用いてバイオフィームの画像の処理や定量を行った。まず、3-3-2 の静置培養系で得られた結果と表現型が一致しているかどうかを同じ時点である 12 時間後に観察した。その結果、三つの組み合わせ [KT2440 + KT2440(pCAR1), PAO1 + PAO1(pCAR1), Pf0-1 + Pf0-1(pCAR1)] で、静置培養系での観察結果と同様の結果が得られた (データ示さず)。さらに、これらを長期培養すると KT2440 + KT2440(pCAR1)や Pf0-1 + Pf0-1(pCAR1)ではバイオフィーム形態に変化は見られなかったものの、PAO1 + PAO1(pCAR1)を長期培養すると pCAR1 保持株のバイオフィーム形態に変化が見られなかったのに対し、pCAR1 非保持株はマッシュルーム状態からフラット状なバイオフィームへの形態変化が見られた (Fig. 3-21)。

また、24 時間ごとに 144 時間まで取得した各画像について、COMSTAT 用いて pCAR1 保持株と非保持株の比率を定量した (Table. 3-5)。その結果、KT2440 + KT2440(pCAR1), Pf0-1 + Pf0-1(pCAR1)株の両方の組み合わせで、時間が経過するにつれて pCAR1 保持株の淘汰は見られず、プラスミド保持・非保持株が形成するバイオフィームの量はほぼ同

**Table 3-4. COMSTATを用いたpCAR1保持・非保持株の比率の定量 (浮遊状態).**

	Biomass( $\mu\text{m}^3/\mu\text{m}^2$ )				
	24 h	48 h	72 h	96 h	144 h
<b>KT2440 + KT2440(pCAR1)</b>					
gfp	0.12 ± 0.01	0.13 ± 0.02	0.18 ± 0.01	0.16 ± 0.01	0.15 ± 0.02
mCherry	0.16 ± 0.05	0.15 ± 0.03	0.07 ± 0.01	0.06 ± 0.01	0.02 ± 0.00
mCherry	0.15 ± 0.04	0.17 ± 0.06	0.19 ± 0.02	0.15 ± 0.01	0.29 ± 0.01
mCherry+gfp	0.14 ± 0.05	0.08 ± 0.02	0.06 ± 0.01	0.05 ± 0.01	0.06 ± 0.01
<b>PAO1 + PAO1(pCAR1)</b>					
Biomass( $\mu\text{m}^3/\mu\text{m}^2$ )					
	24 h	48 h	72 h	96 h	144 h
gfp	0.11 ± 0.01	0.13 ± 0.00	0.22 ± 0.01	0.20 ± 0.01	0.15 ± 0.01
mCherry	0.11 ± 0.01	0.09 ± 0.00	0.06 ± 0.00	0.05 ± 0.01	0.03 ± 0.02
mCherry	0.13 ± 0.00	0.15 ± 0.03	0.21 ± 0.02	0.19 ± 0.02	0.16 ± 0.01
mCherry+gfp	0.14 ± 0.04	0.08 ± 0.01	0.07 ± 0.02	0.06 ± 0.02	0.01 ± 0.01
<b>Pf0-1 + Pf0-1(pCAR1)</b>					
Biomass( $\mu\text{m}^3/\mu\text{m}^2$ )					
	24 h	48 h	72 h	96 h	144 h
gfp	0.11 ± 0.05	0.29 ± 0.13	0.21 ± 0.04	0.15 ± 0.05	0.15 ± 0.00
mCherry	0.15 ± 0.06	0.25 ± 0.02	0.09 ± 0.02	0.06 ± 0.02	0.05 ± 0.01
mCherry	0.14 ± 0.02	0.17 ± 0.01	0.34 ± 0.09	0.36 ± 0.06	0.32 ± 0.01
mCherry+gfp	0.17 ± 0.03	0.18 ± 0.01	0.17 ± 0.05	0.19 ± 0.02	0.04 ± 0.01

The values are the means of data from at least 2 image stacks. (Standard deviations is included as  $\pm$ )



**Table 3-5. COMSTATを用いたpCARI保持・非保持株の比率の定量(バイオフィルム状態).**

	Biomass( $\mu\text{m}^3/\mu\text{m}^2$ )					
	24 h	48 h	72 h	96 h	120 h	144 h
<b>KT2440 + KT2440(pCARI)</b>						
gfp+mCherry	0.02 ± 0.00	0.04 ± 0.02	0.05 ± 0.00	0.05 ± 0.02	0.05 ± 0.00	0.05 ± 0.01
mCherry	0.02 ± 0.01	0.03 ± 0.02	0.03 ± 0.00	0.03 ± 0.00	0.03 ± 0.01	0.06 ± 0.01
mCherry	0.03 ± 0.01	0.05 ± 0.02	0.15 ± 0.04	0.17 ± 0.02	0.21 ± 0.03	0.19 ± 0.07
mCherry+gfp	0.05 ± 0.01	0.06 ± 0.04	0.17 ± 0.00	0.15 ± 0.05	0.14 ± 0.02	0.13 ± 0.03
<b>PAO1 + PAO1(pCARI)</b>						
Biomass( $\mu\text{m}^3/\mu\text{m}^2$ )						
	24 h	48 h	72 h	96 h	120 h	144 h
gfp	0.15 ± 0.01	0.12 ± 0.01	0.15 ± 0.04	0.38 ± 0.01	0.31 ± 0.04	0.36 ± 0.01
mCherry	0.13 ± 0.03	0.16 ± 0.03	0.18 ± 0.07	0.15 ± 0.02	0.17 ± 0.05	0.15 ± 0.01
mCherry	0.17 ± 0.02	0.16 ± 0.03	0.47 ± 0.20	0.16 ± 0.01	0.21 ± 0.10	0.37 ± 0.10
mCherry+gfp	0.19 ± 0.09	0.21 ± 0.02	0.41 ± 0.11	0.29 ± 0.02	0.30 ± 0.05	0.31 ± 0.06
<b>Pf0-1 + Pf0-1(pCARI)</b>						
Biomass( $\mu\text{m}^3/\mu\text{m}^2$ )						
	24 h	48 h	72 h	96 h	120 h	144 h
gfp	0.19 ± 0.02	0.21 ± 0.06	0.29 ± 0.02	0.25 ± 0.00	0.30 ± 0.02	0.28 ± 0.00
mCherry	0.20 ± 0.02	0.22 ± 0.08	0.31 ± 0.04	0.24 ± 0.03	0.32 ± 0.00	0.31 ± 0.01
mCherry	0.22 ± 0.02	0.29 ± 0.06	0.25 ± 0.02	0.17 ± 0.00	0.23 ± 0.03	0.26 ± 0.04
mCherry+gfp	0.21 ± 0.02	0.32 ± 0.00	0.31 ± 0.02	0.24 ± 0.07	0.26 ± 0.01	0.30 ± 0.00

The values are the means of data from at least 2 image stacks. (Standard deviations is included as ±)

じ数値を示していた。さらに、蛍光タンパク質を入れ換えたものでも上記の結果と一致していることが確認された。しかし、PAO1 + PAO1(pCAR1)株では72時間までにプラスミド保持・非保持株はほぼ同じ数値を示しているが、92時間目からプラスミド非保持株の比率の増加が見られた。その理由としてプラスミド保持・非保持株が形成するバイオフィルムの厚さは同じだとするとマッシュルーム状態よりフラット状への形態変化をしたプラスミド非保持株が単位面積あたりのバイオフィルム量が多いことを考えられる。以上より、プラスミド保持菌は浮遊状態よりバイオフィルム状態で生存に有利に働くことができ、バイオフィルム状態でプラスミドを保持する菌が生き残りやすいと考えられる。以前の研究で *P. putida* KT2442 株を用いて浮遊状態とバイオフィルム中でトルエン分解プラスミド (pWW0) の分離による脱落頻度を調べた結果、浮遊状態よりバイオフィルム状態でプラスミドの脱落頻度が高く、さらにバイオフィルム内部より外側の層でプラスミドの脱落頻度が高いという、今回の結果と反対になる報告がある [Ma *et al.*, 2013]。Madsen らは立体構造を持つバイオフィルム状態では基質に対する濃度勾配が生じているため、長期培養すると基部にあるプラスミド保持菌は濃度勾配による影響が浮遊状態での保持菌より受けにくい、すなわちバイオフィルムの基部にあるプラスミド保持菌は活動が低いいため、分離によるプラスミドの脱落もなくそのまま保持しているという仮説を立てた [Madsen *et al.*, 2013]。以前の研究は、単独培養した時での結果で、さらに長期培養するとバイオフィルム状態でプラスミド保持株の比率が高くなるなどの仮説を示したが、本研究では、異なる実験条件のため同列に議論することはできないが、この仮説を実験的に検証することもできたのは重要な意義があると考えられる。

また、バイオフィルム内で生存する個々の細胞は浮遊状態の細胞と生理学・形態学的に異なる形質を示すことが知られている。さらに、バイオフィルム状態と浮遊状態での接合頻度の違いについて、事実、バイオフィルム内の密接した状態は接合伝達に有利になるという報告もある [Babic *et al.*, 2011]。プラスミドの保持によるバイオフィルム量の変化や表現型への影響を考えるとプラスミド保持株が混合培養したバイオフィルム状態と浮遊状態で異なる挙動を示めすことは、プラスミドの接合伝達により細胞内物質の変化を引きこされる可能性も考えられる。さらに、pCAR1 のコピー数の違いが原因である可能性が考えられる。以前、浮遊状態でコハク酸を唯一の炭素源とする液体培地で上記3宿主におけるコピー数を測定した結果、1~3 でほぼ一定であることが知られている [Takahashi *et al.*, 2014]。しかし、立体構造を持つバイオフィルム状態では基質に対する濃度勾配が発生し、形成されたバイオフィルムの各位置による pCAR1 のコピー数の違いが生じている可能性が考え、今後は時間と共に細かい解析が必要であると考えられる。

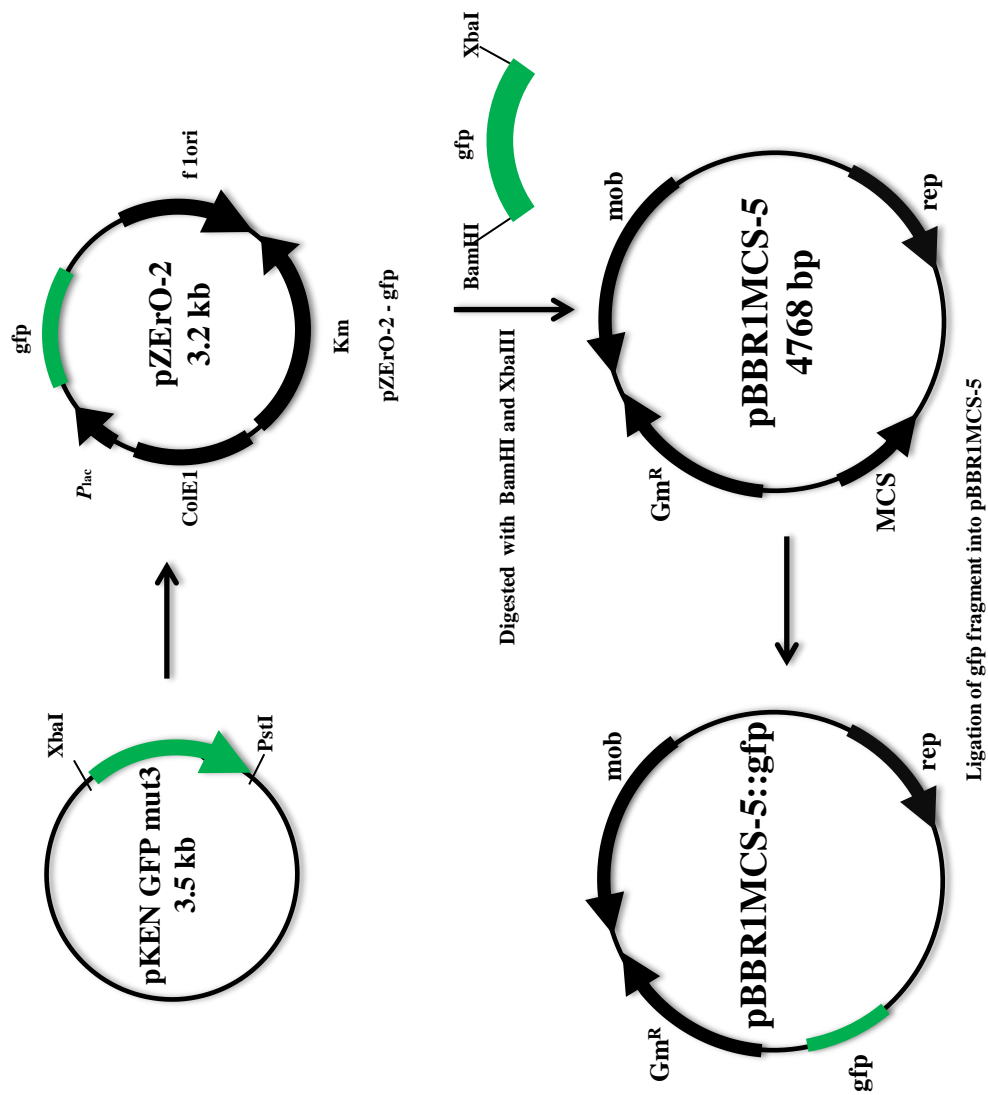


Fig. 3-1. *gfp* 遺伝子を挿入したプラスミドの作製

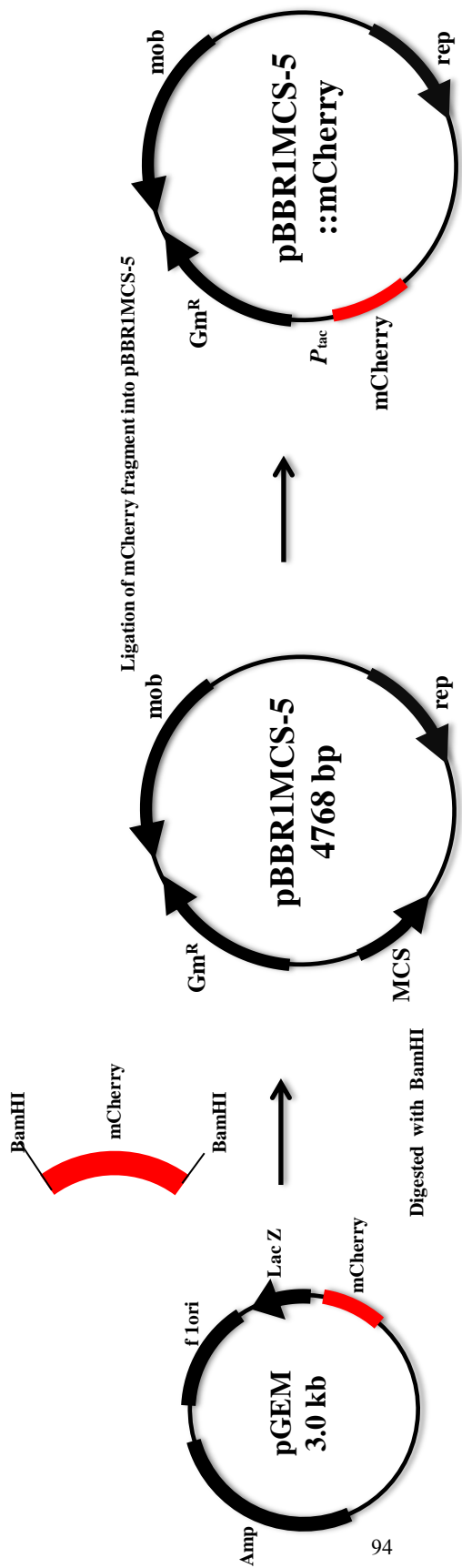
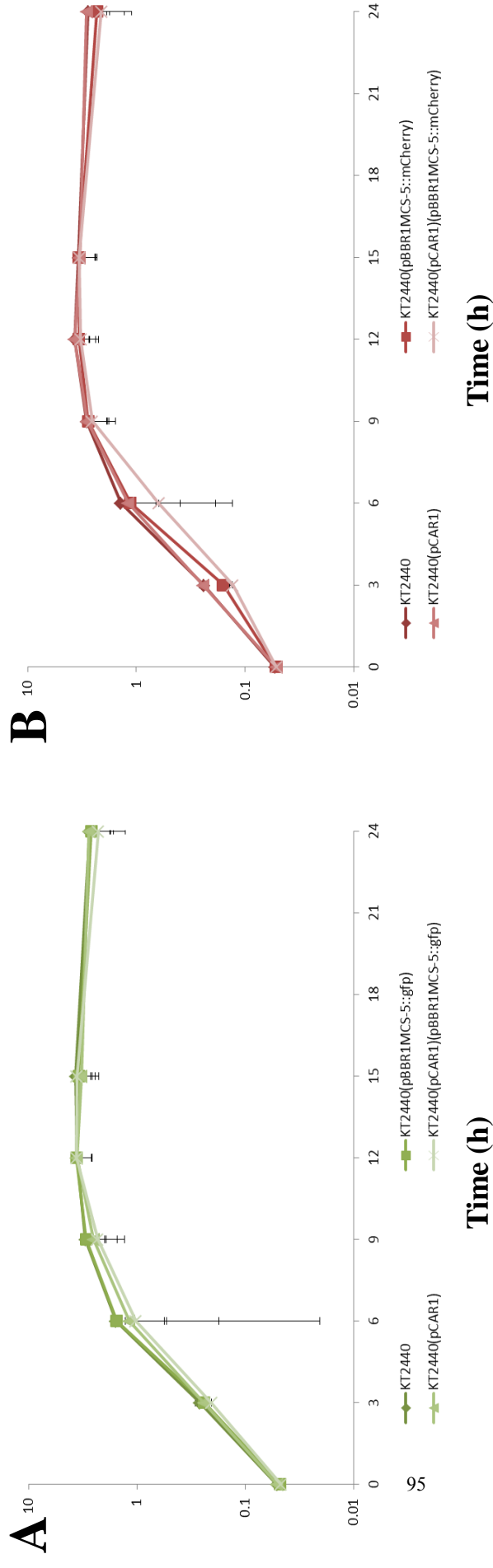
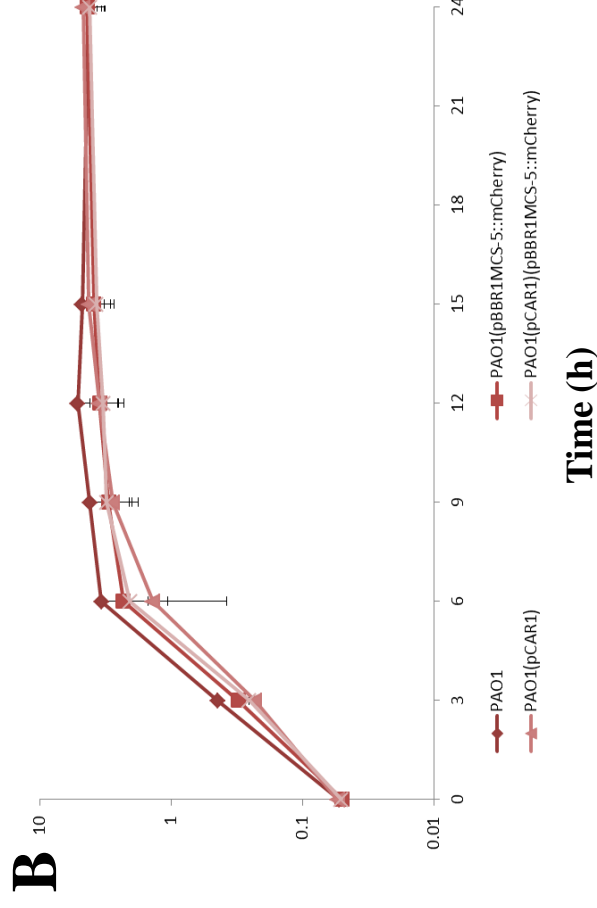
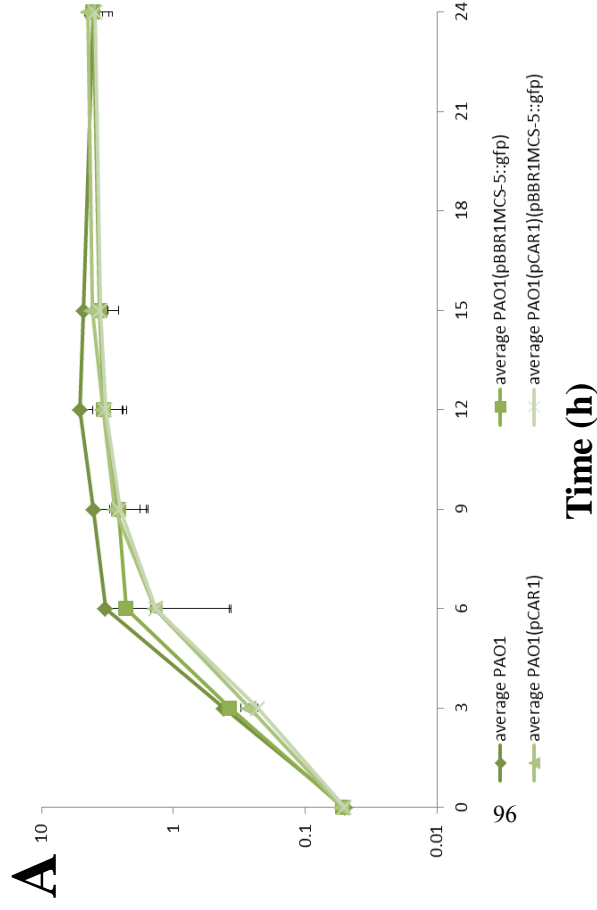


Fig. 3-2. *mCherry* 遺伝子を挿入したプラスミドの作製



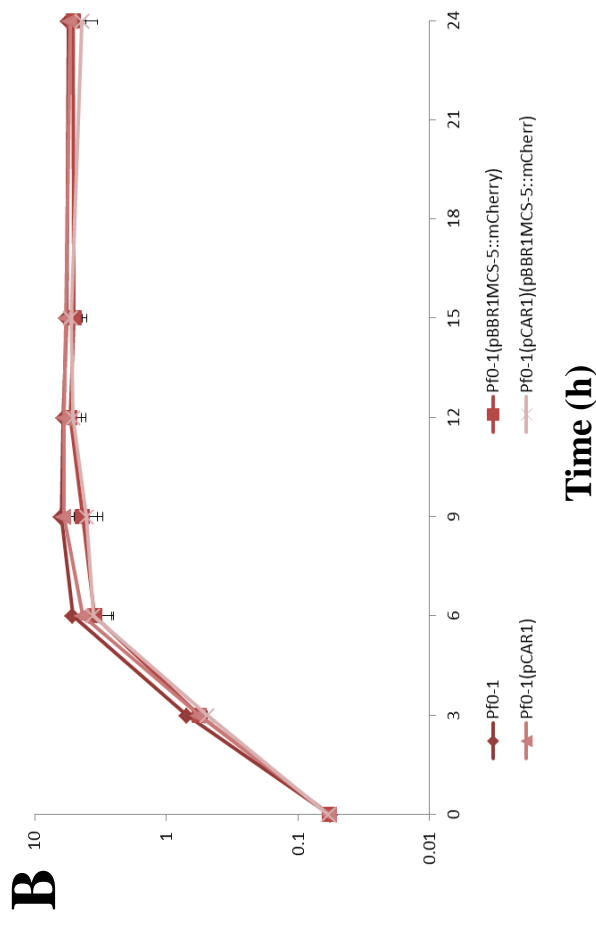
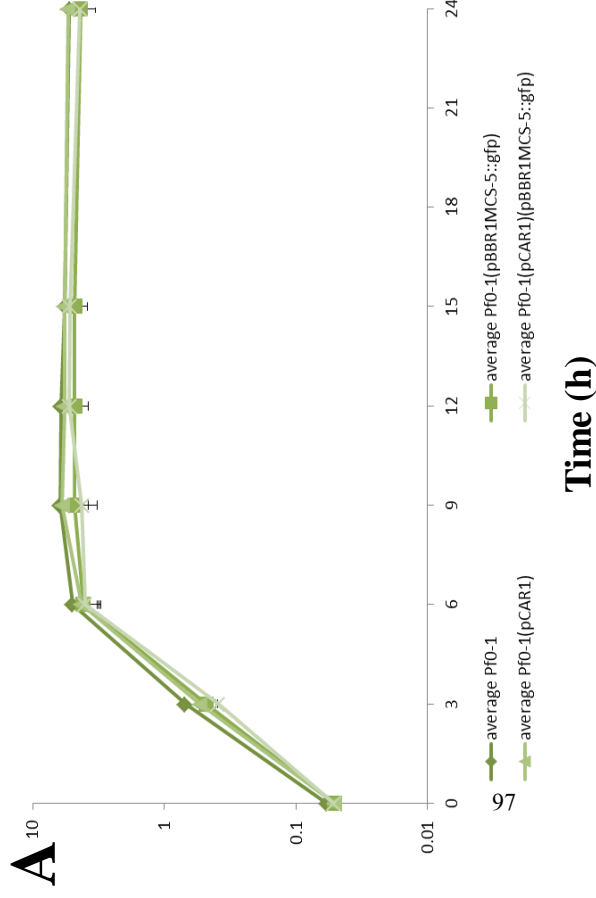
**Fig. 3-3. LB培養における *P. putida* KT2440株, *P. putida* KT2440(pCAR1)株とGFP, mCherry発現株の生育曲線**

*P. putida* KT2440 株, *P. putida* KT2440(pCAR1)株のGFP (A) やmCherry (B) 発現ベクター一保持株・非保持株を, それぞれLB培地で培養し, OD<sub>600</sub>を経時的に測定した. 独立した3回の実験の平均値を, エラーバー(標準誤差)とともに示している.



**Fig. 3-4. LB培養における*P. aeruginosa* PAO1株, *P. aeruginosa* PAO1(pCAR1)株とGFP, mCherry発現株の生育曲線**

*P. aeruginosa* PAO1株, *P. aeruginosa* PAO1(pCAR1)株のGFP (A) やmCherry (B) 発現ベクター保持株・非保持株を, それぞれLB培地で培養し, OD<sub>600</sub>を経時的に測定した. 独立した3回の実験の平均値を, エラーバー(標準誤差)とともに示している.



**Fig. 3-5. LB培養における*P. fluorescens* Pf0-1株, *P. fluorescens* Pf0-1(pCAR1)株とGFP, mCherry発現株の生育曲線**

*P. fluorescens* Pf0-1株, *P. fluorescens* Pf0-1(pCAR1)株のGFP (A) やmCherry (B) 発現ベクター保持株・非保持株を, それぞれLB培地で培養し, OD<sub>600</sub>を経時的に測定した. 独立し3回の実験の平均値を, エラーバー(標準誤差)とともに示している.

*P. putida* KT2440

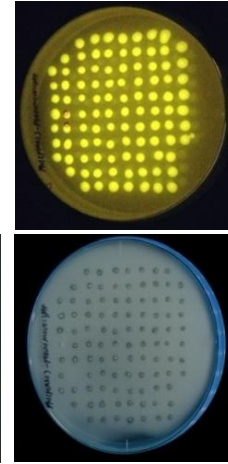
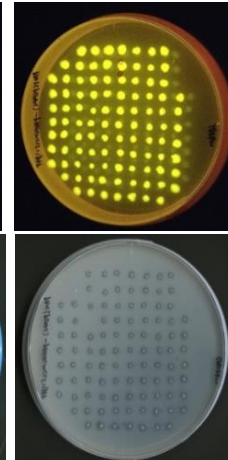
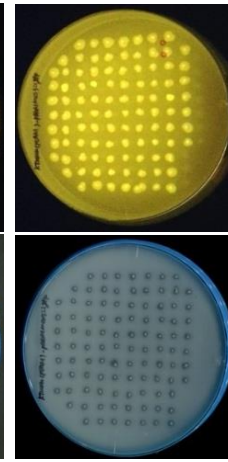
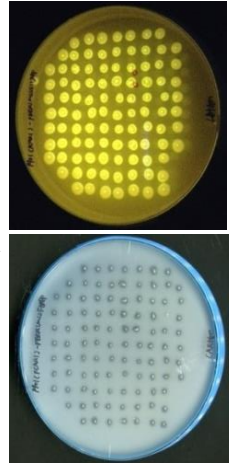
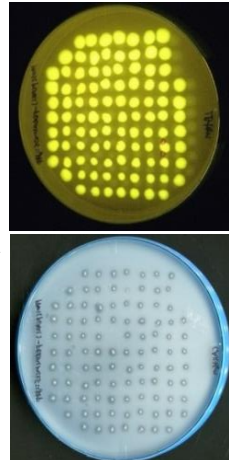
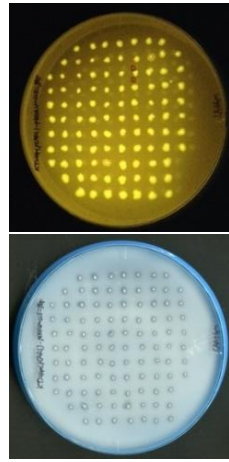
*P. aeruginosa* PAO1

*P. fluorescens* Pf01

CAR プレート LB プレート

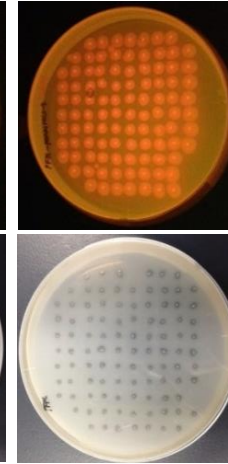
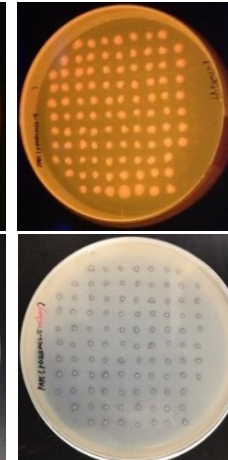
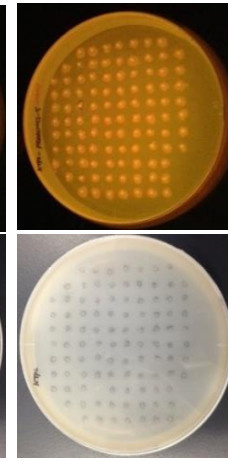
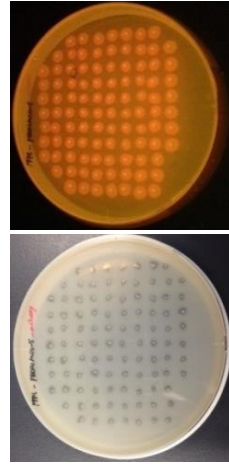
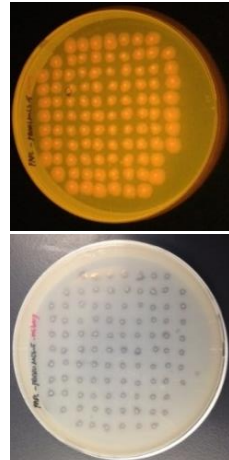
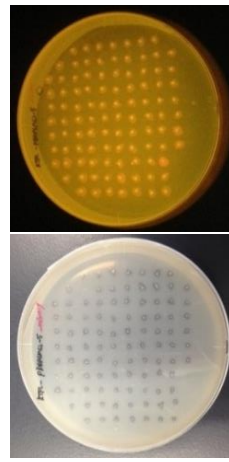
CAR プレート LB プレート

CAR プレート LB プレート



3 h

18 h



3 h

18 h

GFP

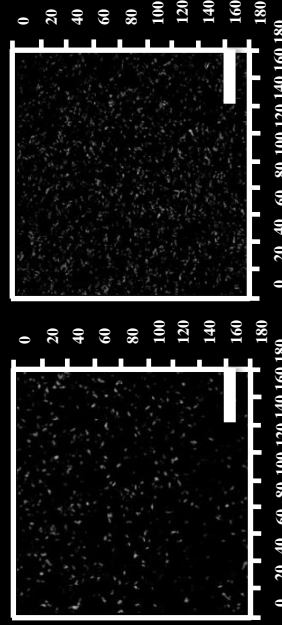
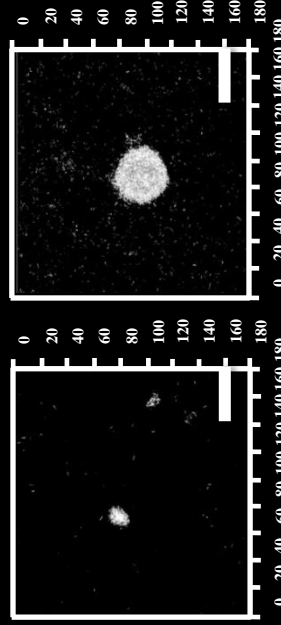
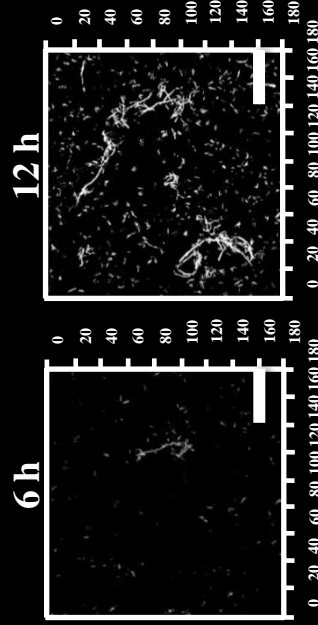
mCherry

Fig. 3-6. GFP及びmCherry発現株でのプラスチックミッド安定性試験

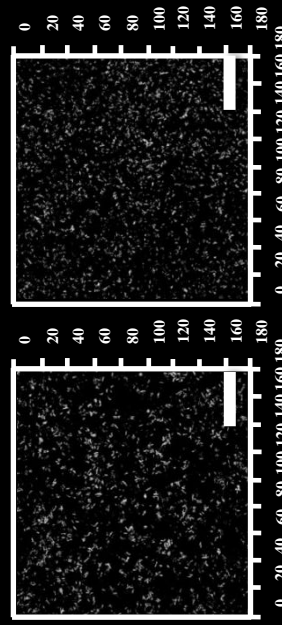
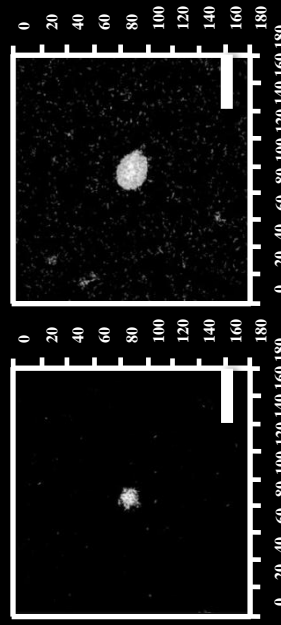
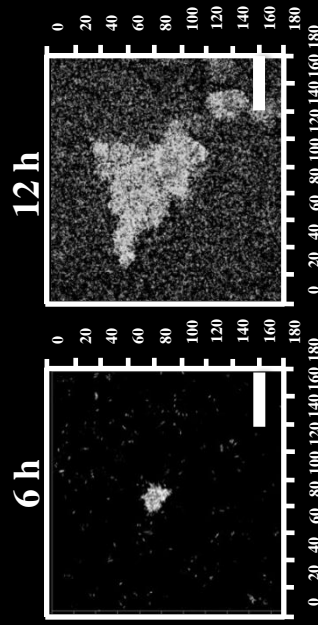
培養開始3時間と24時間目の各株を100コロニーずつCARとLBプレートにパッチした様子を示す。CAR発現能を有するコロニーはCARプレート上でクリアゾーンを形成する。GFP発現株は緑にmCherry発現株は赤にmCherry発現株LBプレート上で赤く光っている。



**pCAR1-carrying**



**pCAR1-free**



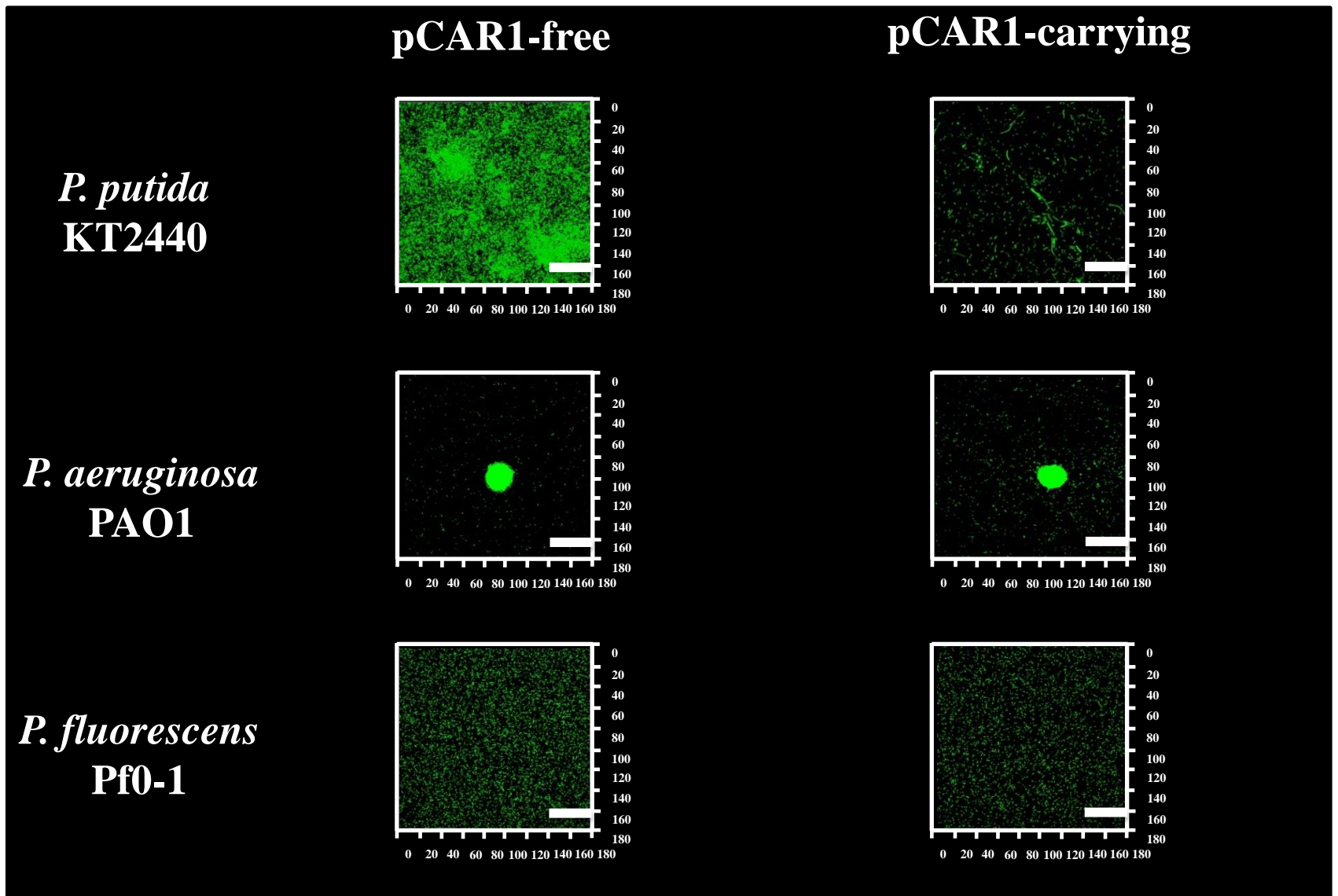
*P. putida*  
KT2440

*P. aeruginosa*  
PAO1

*P. fluorescens*  
Pf0-1

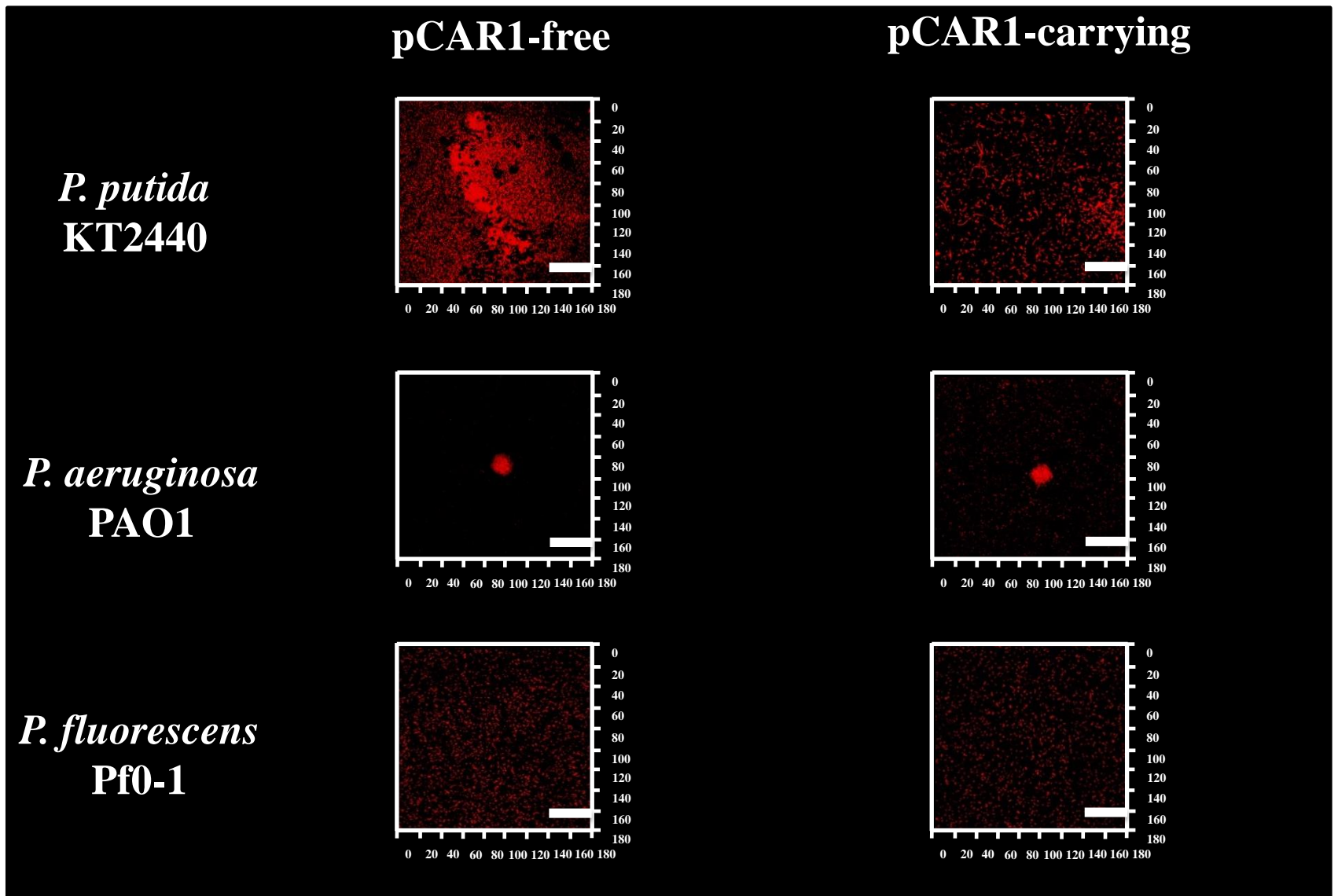
**Fig. 3-7. 野生型株が形成するバイオフィルムの観察**

各pCAR1保持・非保持株をそれぞれFig. 2-1 に示す方法でLB 液体培地で静置培養し、培養開始後6, 12時間目に共焦点顕微鏡を用いて画像を取得した。180 x 180 μm (xy) の範囲を示す。画像は5枚の写真の中から代表的な例を示した。図中のスケールバーは40 μm を示す。



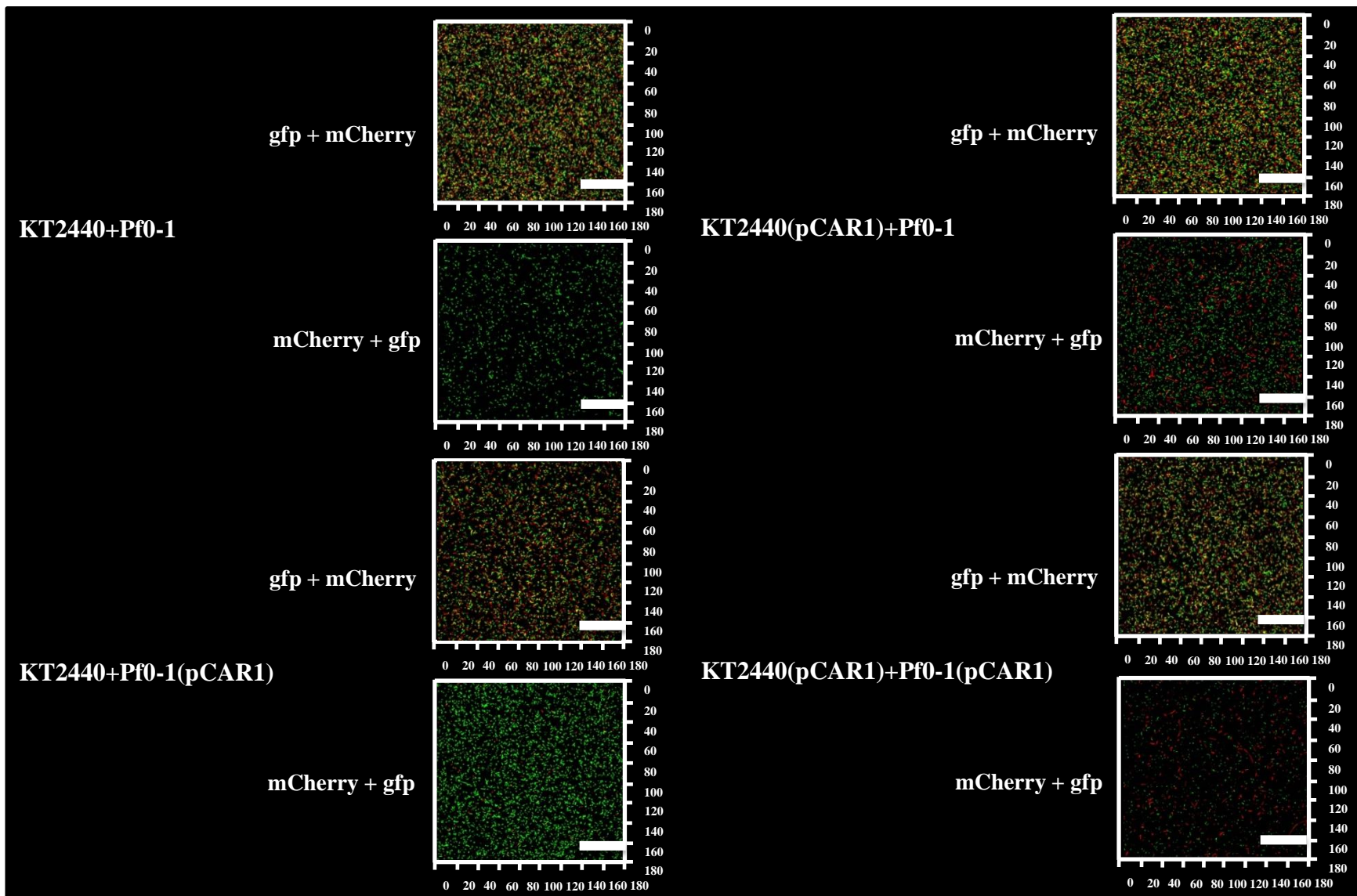
**Fig. 3-8. GFP発現株が形成するバイオフィルムの観察**

GFP発現株をそれぞれFig. 2-1 に示す方法でLB 液体培地で静置培養し、培養開始後 12時間目に共焦点顕微鏡を用いて画像を取得した。180 x 180  $\mu\text{m}$  (xy) の範囲を示す。画像は 5 枚の写真の中から代表的な例を示した。図中のスケールバーは 40  $\mu\text{m}$  を示す。



**Fig. 3-9. mCherry発現株が形成するバイオフィルムの観察**

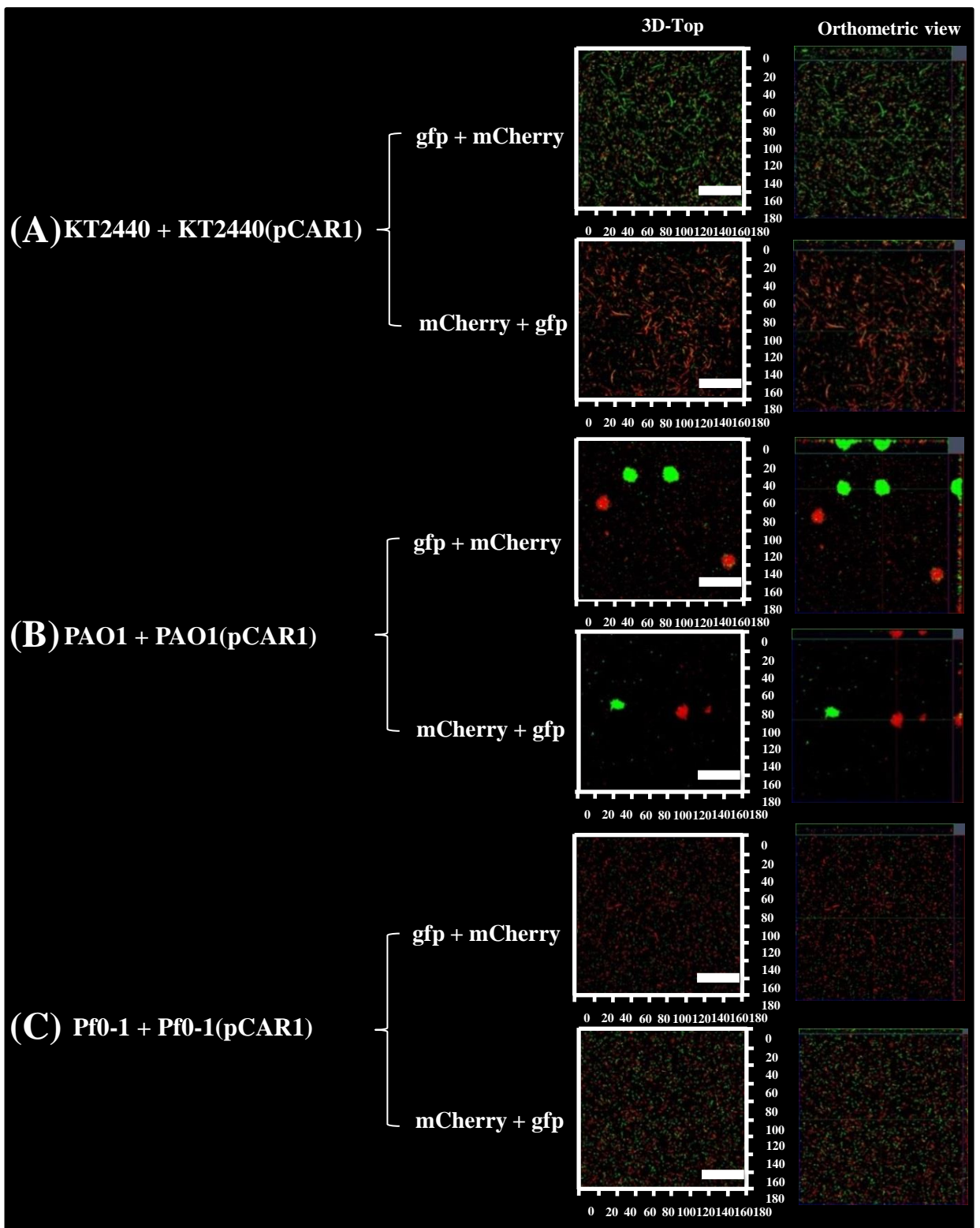
mCherry発現株をそれぞれFig. 2-1 に示す方法で LB 液体培地で静置培養し，培養開始後 12時間目に共焦点顕微鏡を用いて画像を取得した．180 x 180  $\mu\text{m}$  (xy) の範囲を示す．画像は 5 枚の写真の中から代表的な例を示した．図中のスケールバーは 40  $\mu\text{m}$  を示す．



**Fig. 3-10.** 様々な組み合わせで混合培養した場合に形成するバイオフィルムの観察

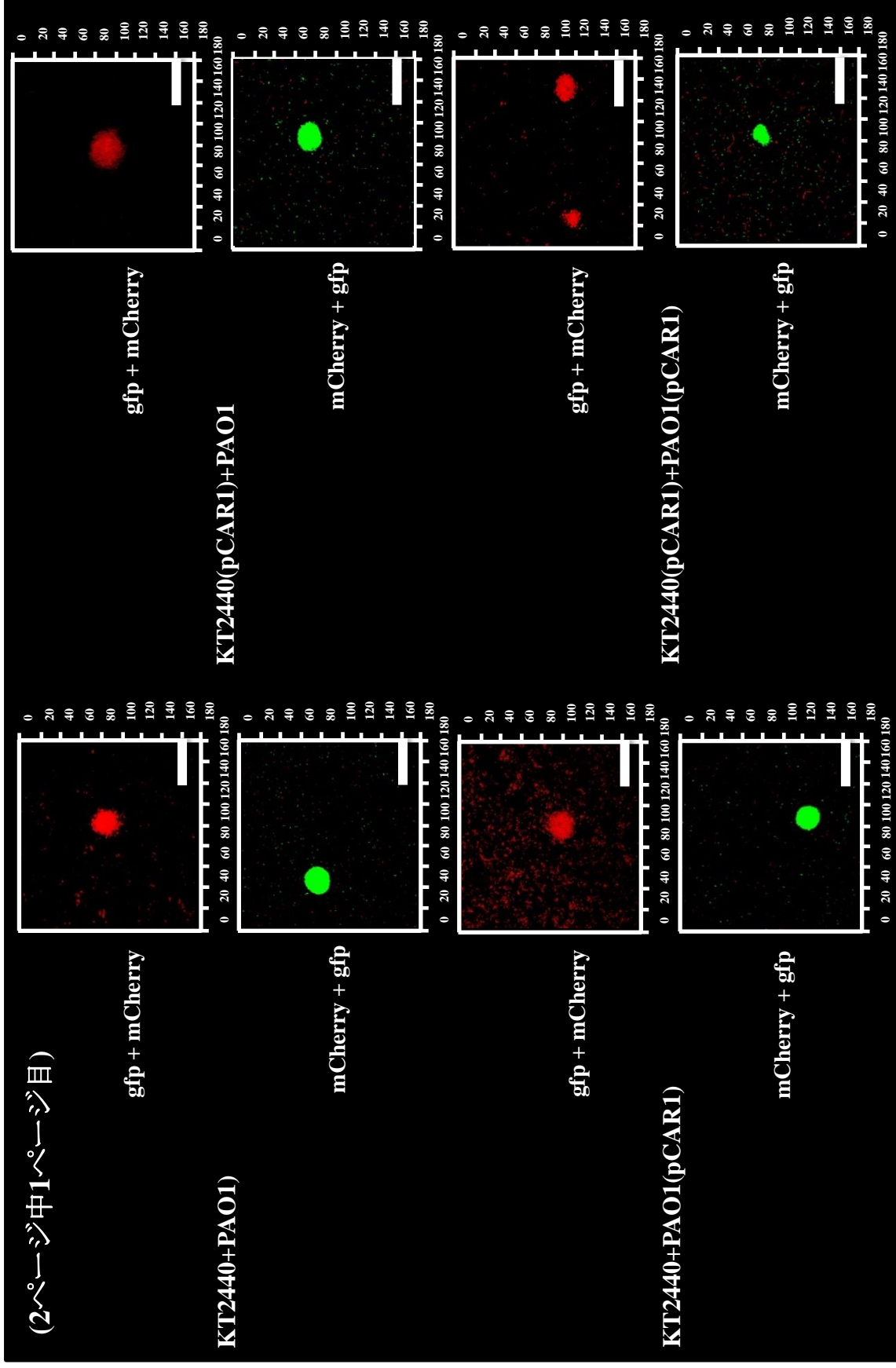
Table. 3-3 に示す組み合わせで、Fig. 2-1 に示す方法で LB 液体培地で静置培養し、培養開始後12時間目に共焦点顕微鏡を用いて画像を取得した。各組み合わせで蛍光タンパク質を入れ替えたもので *gfp + mCherry* 又は *mCherry + gfp* に示す。180 x 180 μm (xy) の範囲を示す。画像は 5 枚の写真の中から代表的な例を示した。図中のスケールバーは 40 μm を示す。





**Fig. 3-11. pCAR1保持・非保持株を混合培養した時に形成するバイオフィルムの観察**

3種類のpCAR1保持と非保持の組み合わせを、Fig. 2-1に示す方法でLB液体培地で静置培養し、培養開始後12時間目に共焦点顕微鏡を用いて画像を取得した。各組み合わせで蛍光タンパク質を入れ換えたものをgfp + mCherry (上) 又はmCherry + GFP (下) に示す。180 x 180 μm (xy) の範囲を示す。(A) KT2440 + KT2440(pCAR1), (B) PAO1 + PAO1(pCAR1), (C) Pf0-1 + Pf0-1(pCAR1)を示す画像は3枚の写真の中から代表的な例を示した。図中のスケールバーは40 μmを示す。

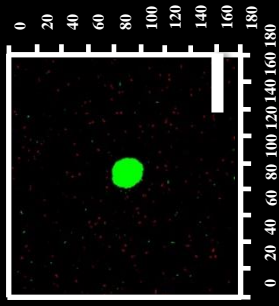


**Fig. 3-12. PAO1株のpCARI保持株・非保持株を他の株と混合培養した場合のバイオフィルム表現型**

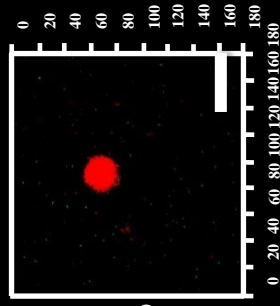
Fig. 2-1 に示す方法で LB 液体培地で静置培養し、培養開始後 12 時間目に共焦点顕微鏡を用いて画像を取得した。各組み合わせで蛍光タンパク質を入れ換えたものを gfp + mCherry 又は mCherry + gfp に示す。180 x 180  $\mu\text{m}$  (xy) の範囲を示す。画像は 3 枚の写真の中から代表的な例を示した。図中のスケールバーは 40  $\mu\text{m}$  を示す。

(2ページ中2ページ目)

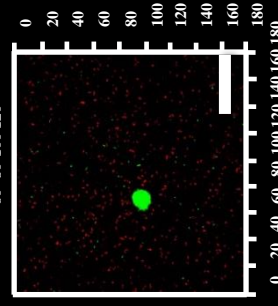
PAO1+Pf0-1



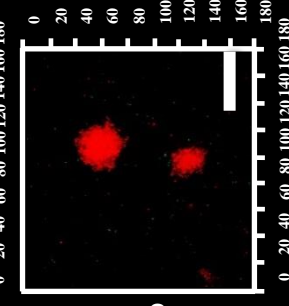
gfp + mCherry



mCherry + gfp

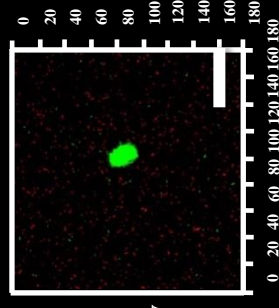


gfp + mCherry

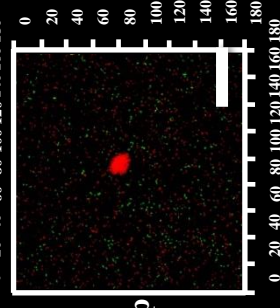


mCherry + gfp

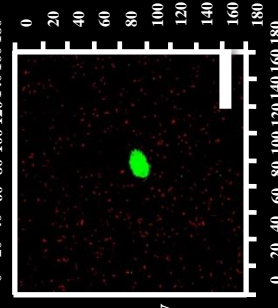
PAO1(pCAR1)+Pf0-1



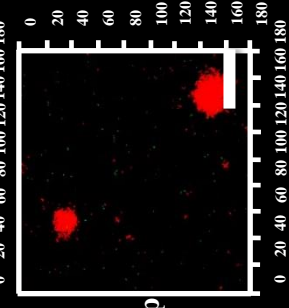
gfp + mCherry



mCherry + gfp

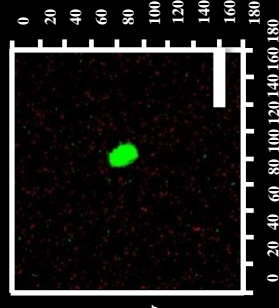


gfp + mCherry

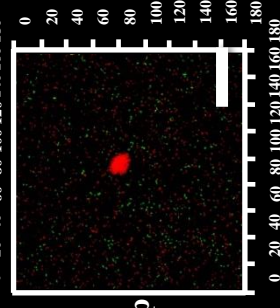


mCherry + gfp

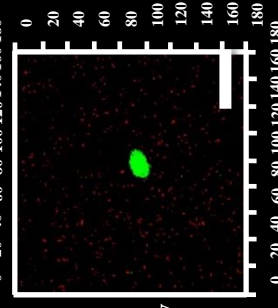
PAO1(pCAR1)+Pf0-1(pCAR1)



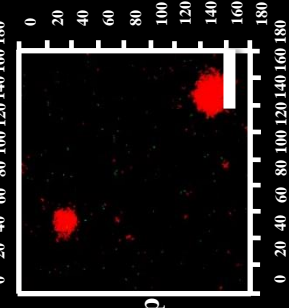
gfp + mCherry



mCherry + gfp



gfp + mCherry



mCherry + gfp

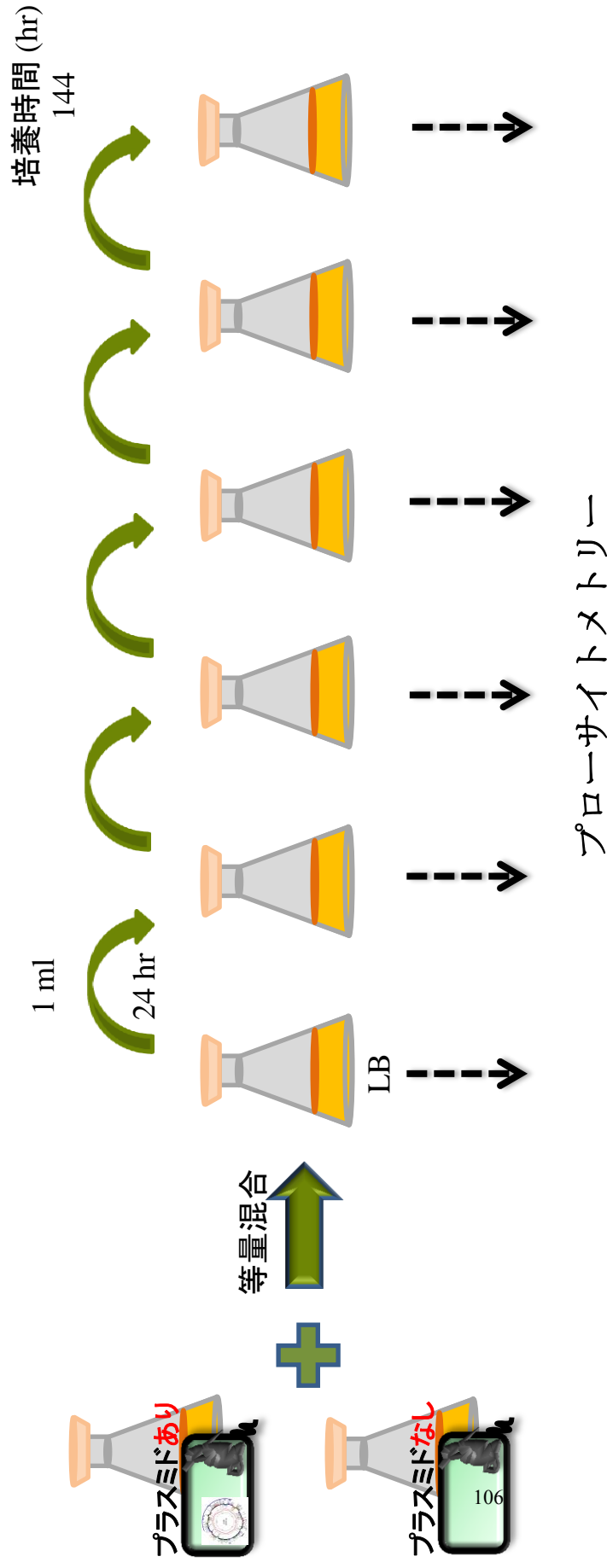


Fig. 3-13. プロローサイトメトリーを用いたpCAR1保持・非保持株の比率を定量の概略図

14-14.5 時間前培養した各株をそれぞれに500 ml容へそ付フラスコに入った比率が1:1 (2種併せてOD<sub>600</sub>が0.05となるように植菌した) となるように混合植菌し, 30°C, 120 rpm で培養した. 24時間ごとに培養液を, LB液体培地に入れたフラスコに1ml ずつ植え継ぎ, 計144時間培養した. 解析にはプロローサイトメトリーを用いて24時間ごとに行った.



24 h

48 h

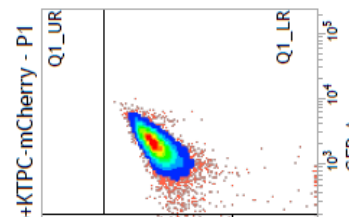
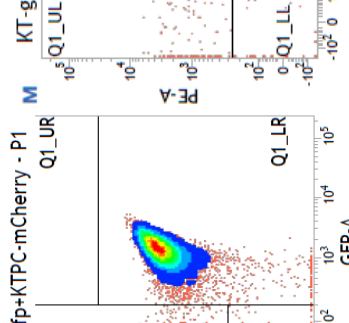
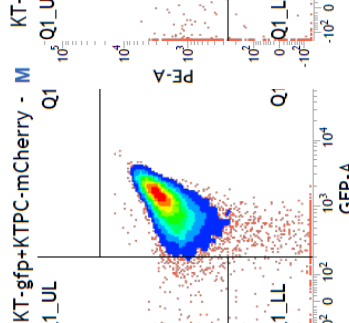
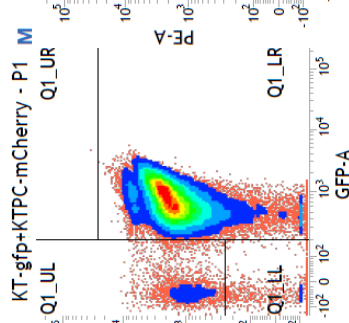
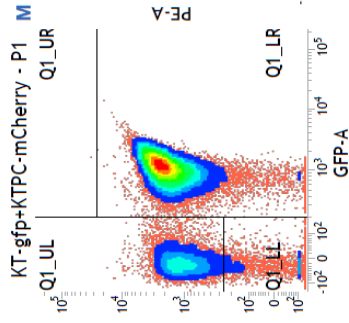
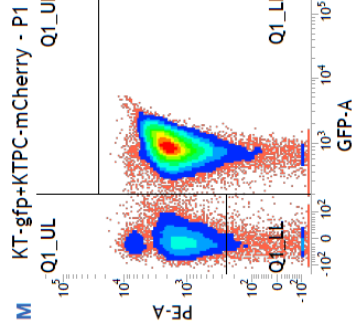
72 h

96 h

120 h

144 h

KT2440(pBBR1MCS-5::gfp)+ KT2440(pCAR1)(pBBR1MCS-5::mCherry)



KT2440(pBBR1MCS-5::mCherry)+ KT2440(pCAR1)(pBBR1MCS-5::gfp)

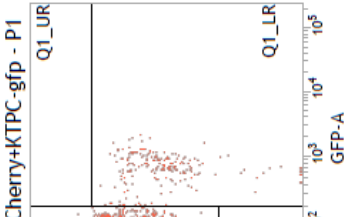
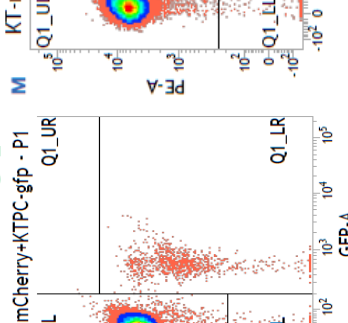
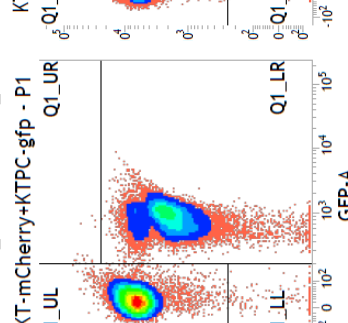
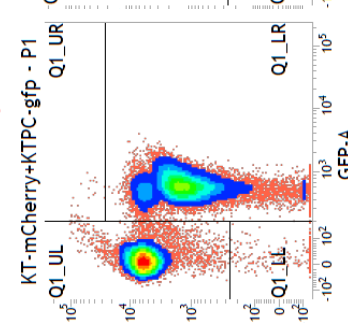
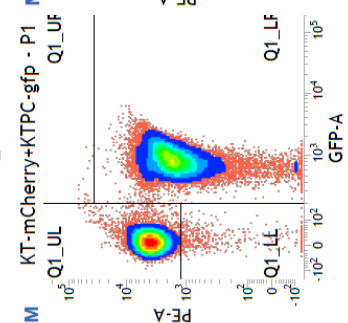
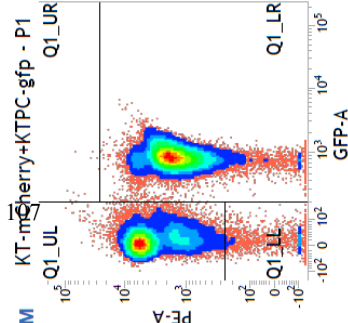


Fig. 3-14. プロローサーサイトメトリーを用いたKT2440株でのpCAR1保持・非保持株の比率

Fig. 3-13 に示す方法で、24 時間ごとにLB培地で植え継ぎを繰り返しながら合計144 時間まで培養し、24 時間ごとにプロローサーサイトメトリーを用いてpCAR1保持・非保持の比率を定量した。横軸：GFPの蛍光強度，縦軸：mCherryの蛍光強度を示す。Q1\_LR枠に入ったものはGFP発現株に入ったものはmCherry発現株を示す。各組み合わせで蛍光タンパク質を入れ換えたものをgfp + mCherry (上) 又はmCherry + gfp (下) に示す。

24 h

48 h

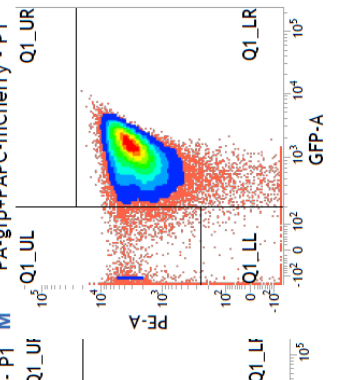
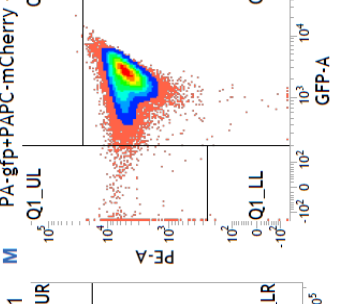
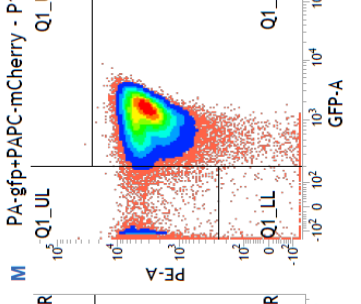
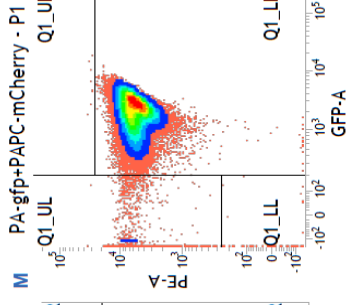
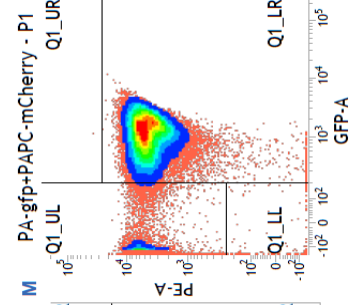
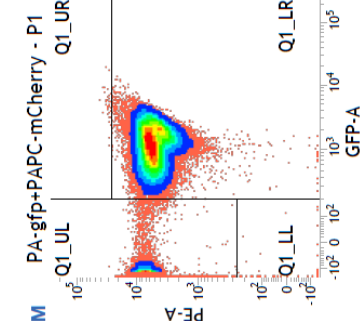
72 h

96 h

120 h

144 h

PAO1(pBBR1MCS-5::gfp)+ PAO1(pCARI)(pBBR1MCS-5::mCherry)



PAO1(pBBR1MCS-5::mCherry)+ PAO1(pCARI)(pBBR1MCS-5::gfp)

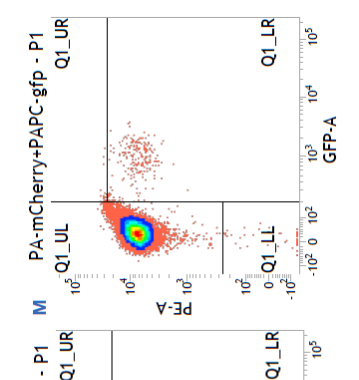
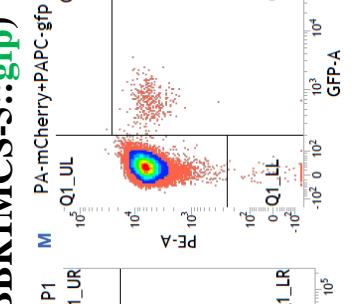
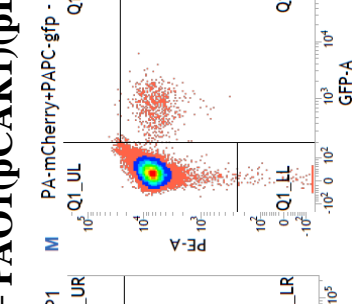
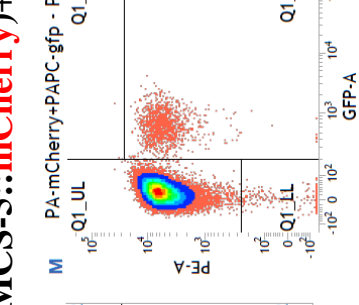
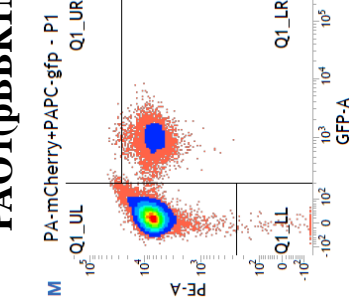
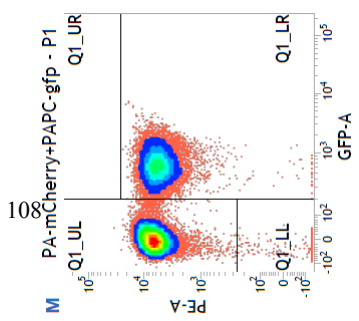


Fig. 3-15. プロローサイトメトリーを用いたPAO1株でのpCARI保持・非保持株の比率

Fig. 3-13 に示す方法で、24 時間ごとにLB培地で植え継ぎを繰り返しながら合計144 時間まで培養し、24 時間ごとにプロローサイトメトリーを用いてpCARI保持・非保持の比率を定量した。横軸：GFPの蛍光強度，縦軸：mCherryの蛍光強度を示す。Q1\_LRに入ったものはGFP発現株に入ったものはmCherry発現株を示す。各組み合わせで蛍光タンパク質を入れ替えたものをgfp + mCherry (上) 又はmCherry + gfp (下) に示す。

24 h

48 h

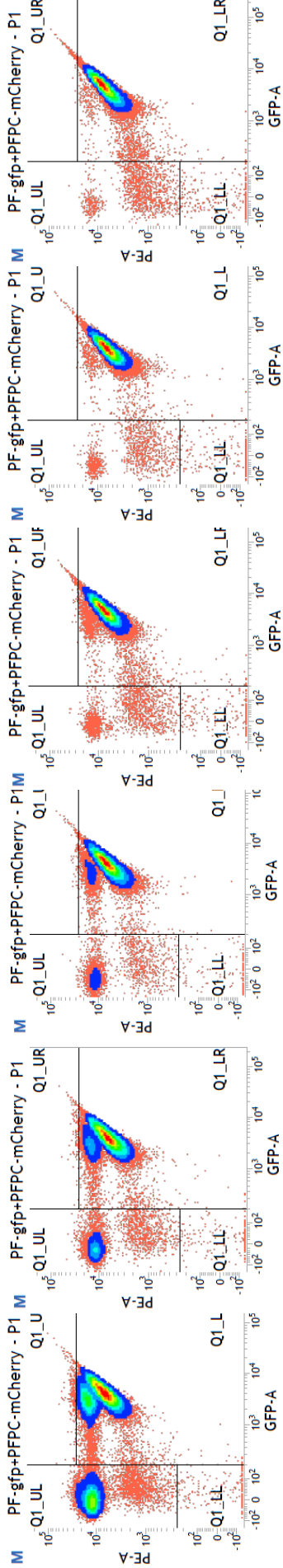
72 h

96 h

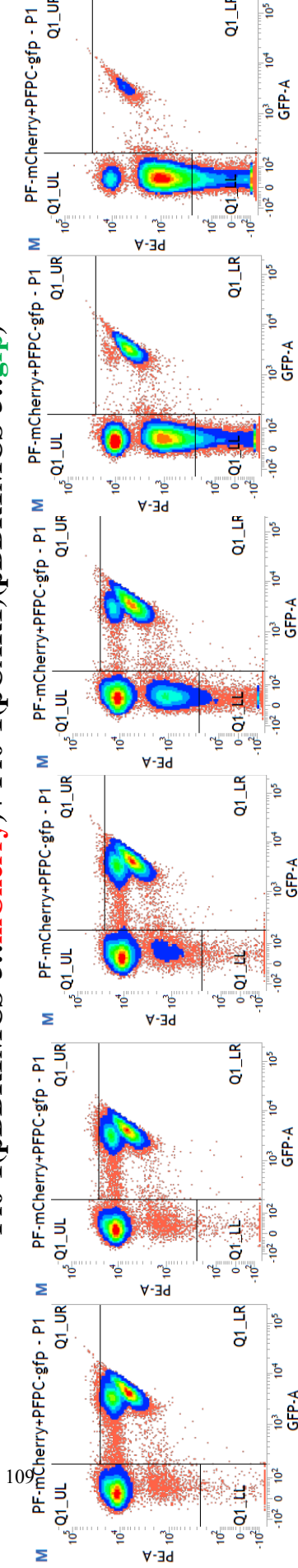
120 h

144 h

### Pf0-1(pBBRIMCS-5::gfp)+ Pf0-1(pCAR1)(pBBRIMCS-5::mCherry)



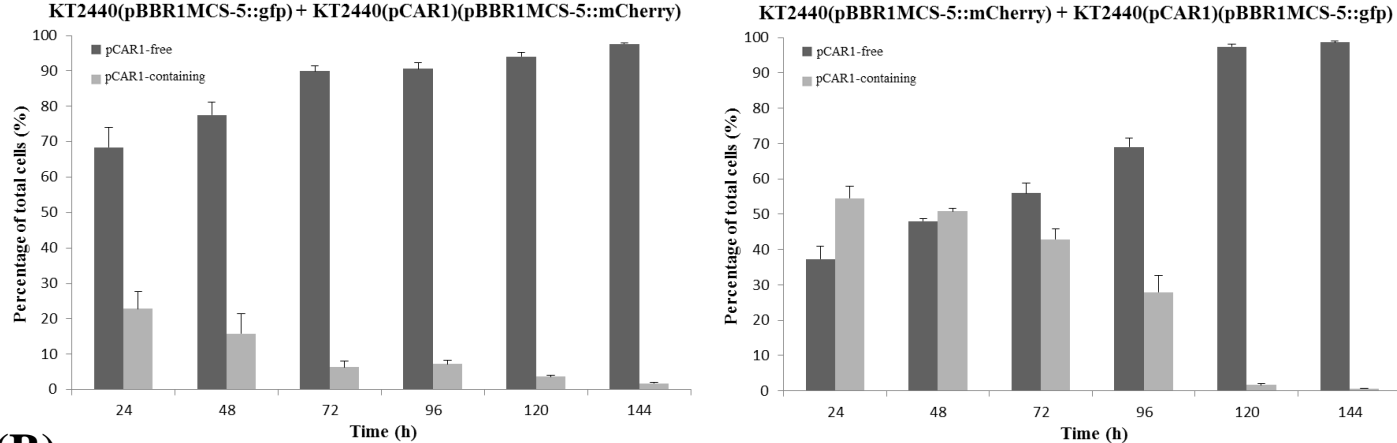
### Pf0-1(pBBRIMCS-5::mCherry)+ Pf0-1(pCAR1)(pBBRIMCS-5::gfp)



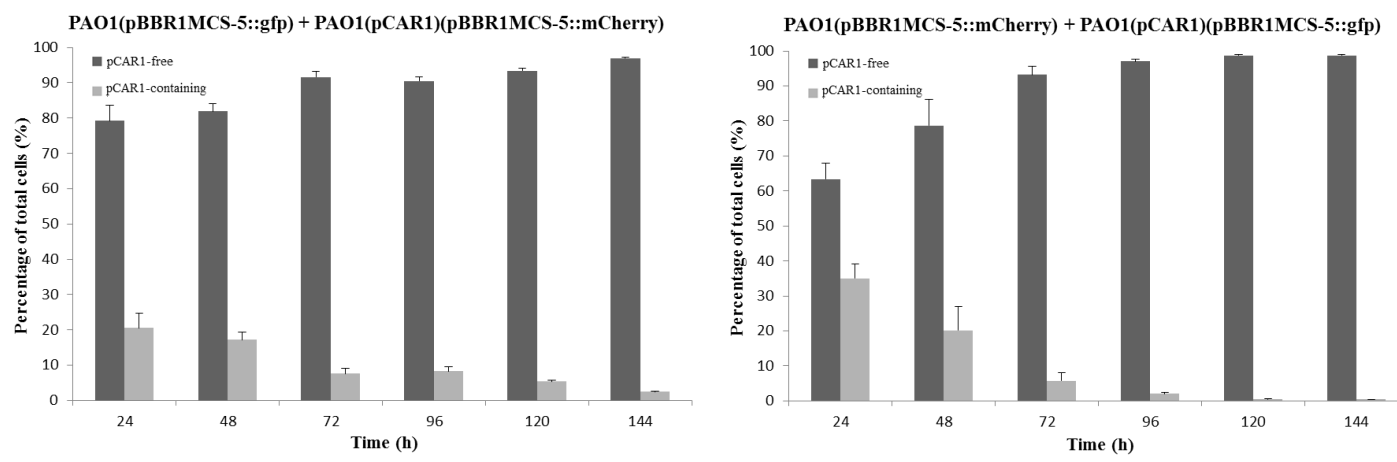
**Fig. 3-16.** プロローサイトメトリーを用いたPf0-1株でのpCAR1保持・非保持株の比率

Fig. 3-13 に示す方法で、24 時間ごとにLB培地で植え継ぎを繰り返しながら合計144 時間まで培養し、24 時間ごとにプロローサイトメトリーを用いてpCAR1保持・非保持の比率を定量した。横軸：GFPの蛍光強度，縦軸：mCherryの蛍光強度を示す。Q1\_LR枠に入ったものはGFP発現株に入ったものはmCherry発現株を示す。各組み合わせで蛍光タンパク質を入れ替えたものをgfp + mCherry (上) 又はmCherry + gfp (下) に示す。

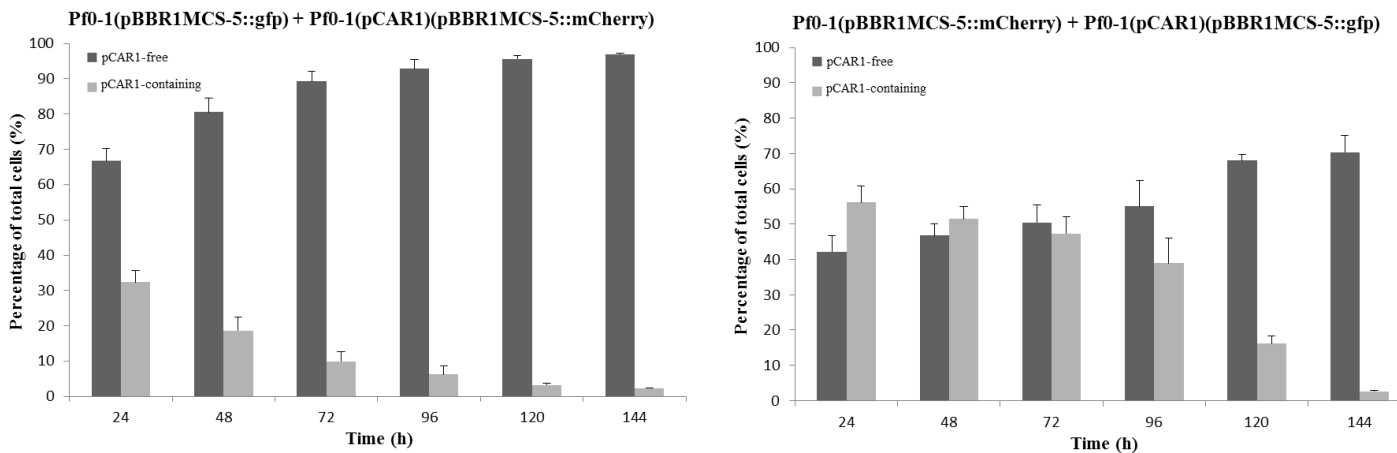
(A)



(B)



(C)



**Fig. 3-17.プローサイトメトリーを用いたpCAR1保持・非保持株の比率**

Fig. 3-13 に示す方法で、24 時間ごとにLB培地で植え継ぎを繰り返しながら合計144 時間まで培養し、24 時間ごとにプローサイトメトリーを用いてpCAR1保持・非保持の比率を定量した。  
 (A) KT2440 + KT2440(pCAR1), (B) PAO1 + PAO1(pCAR1), (C) Pf0-1 + Pf0-1(pCAR1)を示す。横軸：培養時間、縦軸：総細胞の割合 (%)を示す。左：gfp + mCherry, 右：mCherry + GFP の組み合わせを示す。独立した3回の実験の平均値を、エラーバー (標準誤差) とともに示している。



KT2440(pBBR1MCS-5::gfp)+KT2440(pCAR1)(pBBR1MCS-5::mCherry)

24 h

48 h

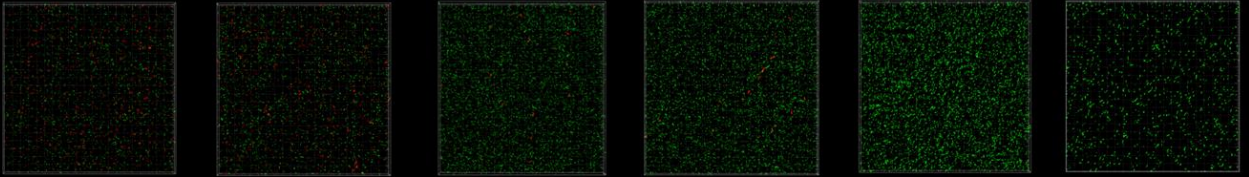
72 h

96 h

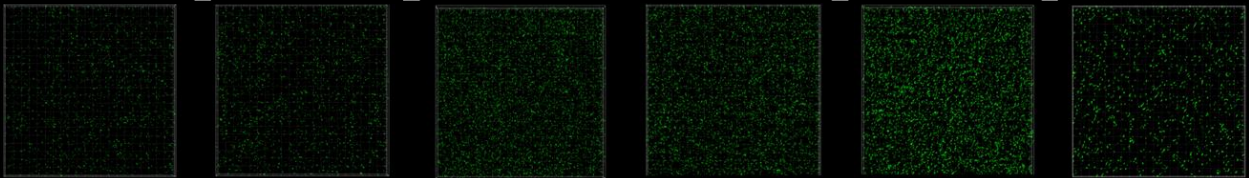
120 h

144 h

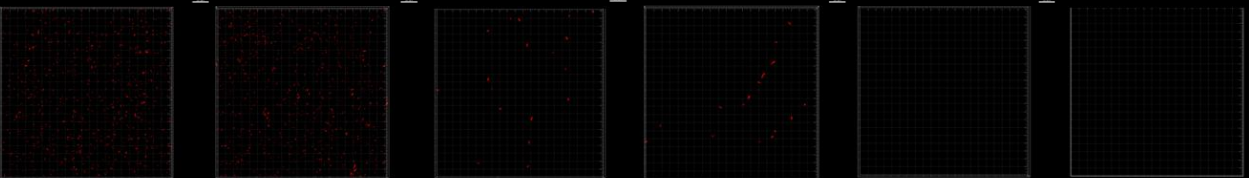
merge



gfp



mCherry



KT2440(pBBR1MCS-5::mCherry)+KT2440(pCAR1)(pBBR1MCS-5::gfp)

24 h

48 h

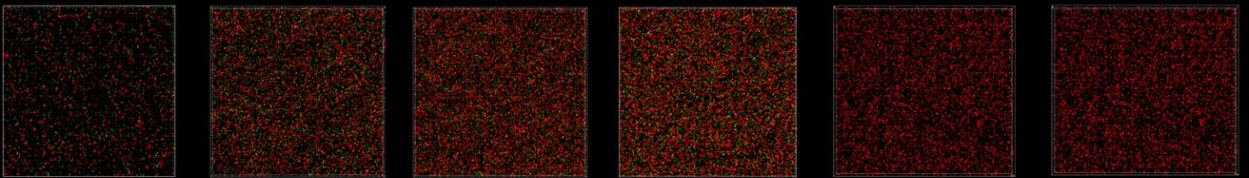
72 h

96 h

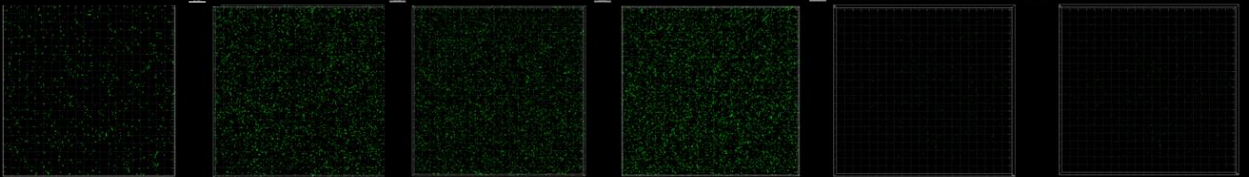
120 h

144 h

merge



gfp



mCherry

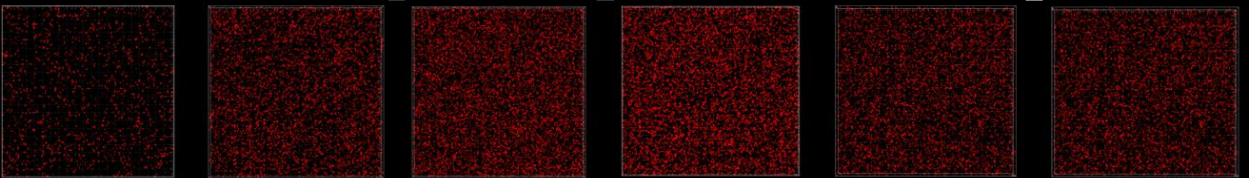


Fig. 3-18.共焦点顕微鏡を用いたKT2440株のpCAR1保持・非保持株の画像

Fig. 3-13 に示す方法で、24 時間ごとにLB培地で植え継ぎを繰り返しながら合計144 時間まで培養し、24 時間ごとに共焦点顕微鏡を用いて画像を取得した。pCAR1保持・非保持の比率を定量した。(上) gfp + mCherry, (下) mCherry + gfp の各組み合わせを示す。画像は3枚の写真の中から代表的な例を示した。スケールバーは20  $\mu$ m を示す。



PAO1(pBBR1MCS-5::gfp)+PAO1(pCAR1)(pBBR1MCS-5::mCherry)

24 h

48 h

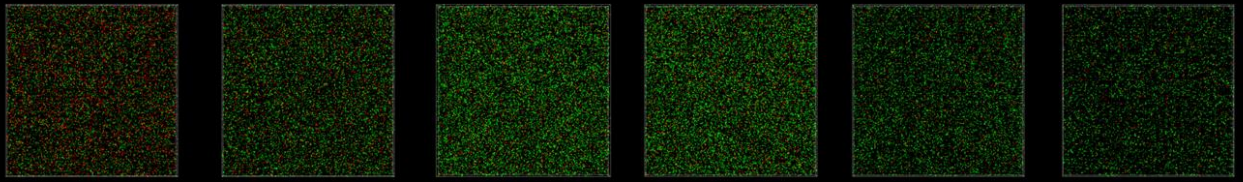
72 h

96 h

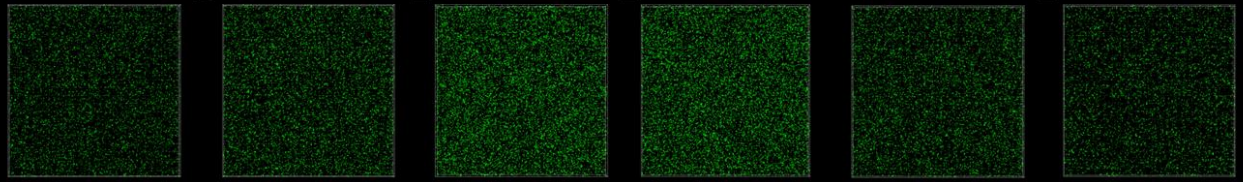
120 h

144 h

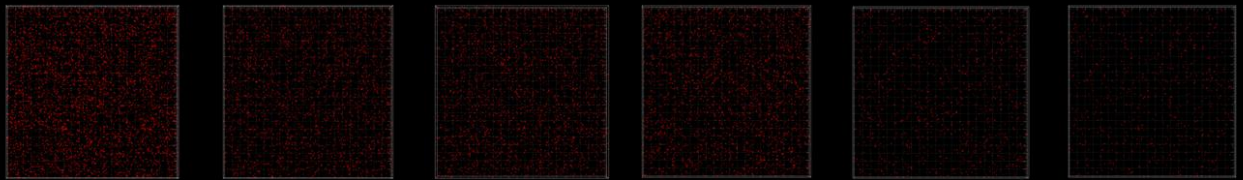
merge



gfp



mCherry



PAO1(pBBR1MCS-5::mCherry)+PAO1(pCAR1)(pBBR1MCS-5::gfp)

24 h

48 h

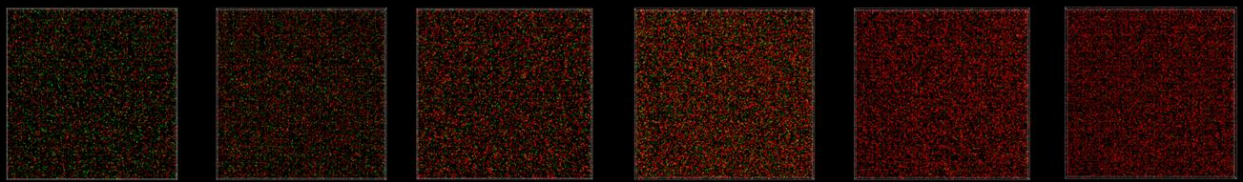
72 h

96 h

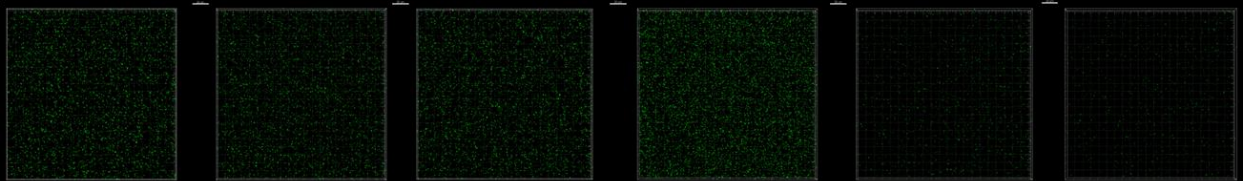
120 h

144 h

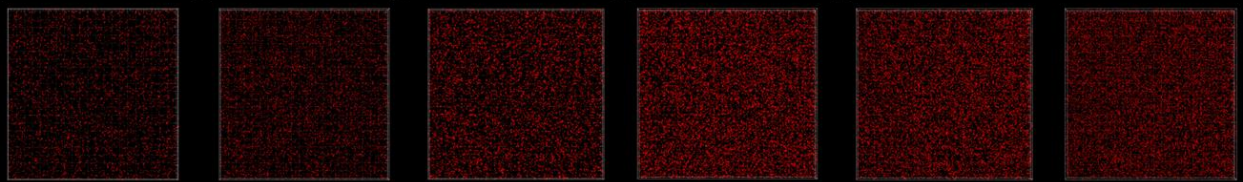
merge



gfp



mCherry



**Fig. 3-19.**共焦点顕微鏡を用いたPAO1株のpCAR1保持・非保持株の比率を測定

Fig. 3-13 に示す方法で、24 時間ごとにLB培地で植え継ぎを繰り返しながら合計144 時間まで培養し、24 時間ごとに共焦点顕微鏡を用いて画像を取得した。pCAR1保持・非保持の比率を定量した。(上) gfp + mCherry, (下) mCherry + gfp の各組み合わせを示す。画像は3枚の写真の中から代表的な例を示した。スケールバーは20  $\mu$ m を示す。



Pf0-1(pBBR1MCS-5::gfp)+Pf0-1(pCAR1)(pBBR1MCS-5::mCherry)

24 h

48 h

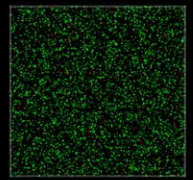
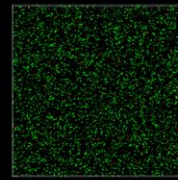
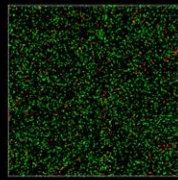
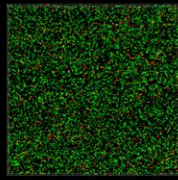
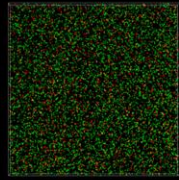
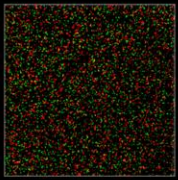
72 h

96 h

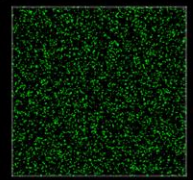
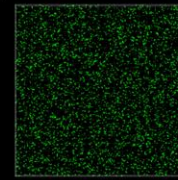
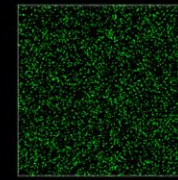
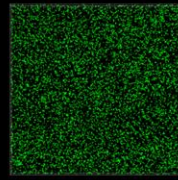
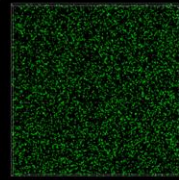
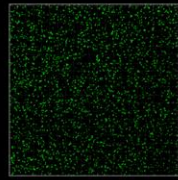
120 h

144 h

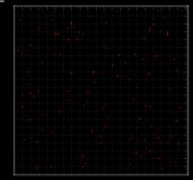
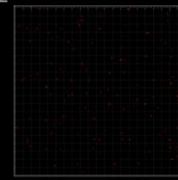
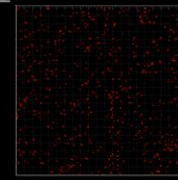
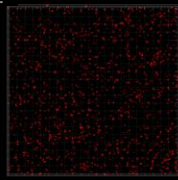
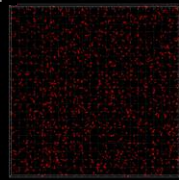
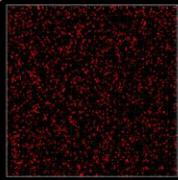
merge



gfp



mCherry



Pf01-(pBBR1MCS-5::mCherry)+Pf0-1(pCAR1)(pBBR1MCS-5::gfp)

24 h

48 h

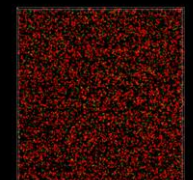
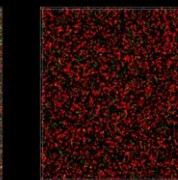
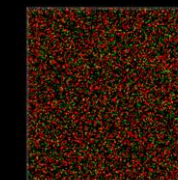
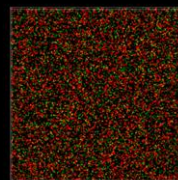
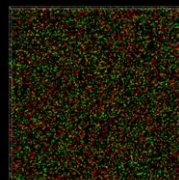
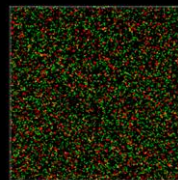
72 h

96 h

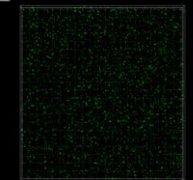
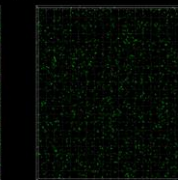
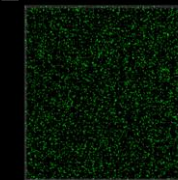
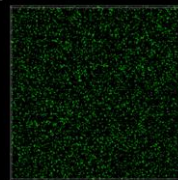
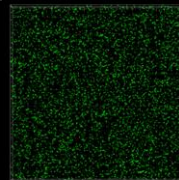
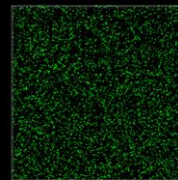
120 h

144 h

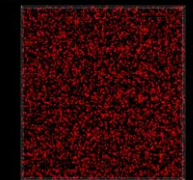
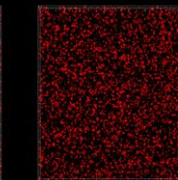
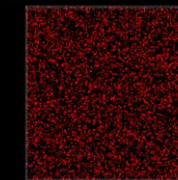
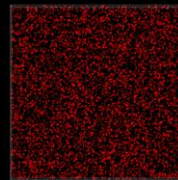
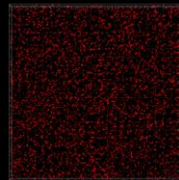
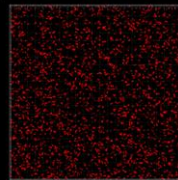
merge



gfp



mCherry



**Fig. 3-20.**共焦点顕微鏡を用いたPf0-1株のpCAR1保持・非保持株の比率を測定

Fig. 3-13 に示す方法で、24 時間ごとにLB培地で植え継ぎを繰り返しながら合計144 時間まで培養し、24 時間ごとに共焦点顕微鏡を用いて画像を取得した。pCAR1保持・非保持の比率を定量した。(上) gfp + mCherry, (下) mCherry + gfp の各組み合わせを示す。画像は3枚の写真の中から代表的な例を示した。スケールバーは20  $\mu$ m を示す。



KT2440+KT2440(pCAR1)

24 h

48 h

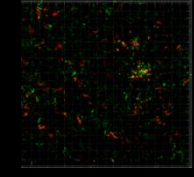
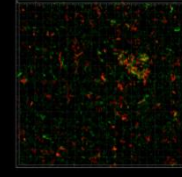
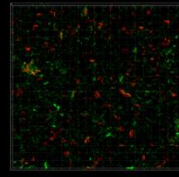
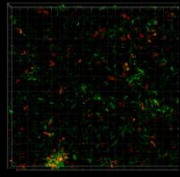
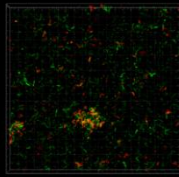
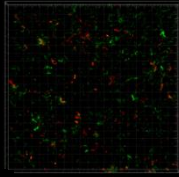
72 h

96 h

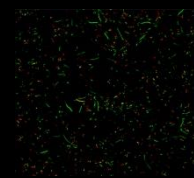
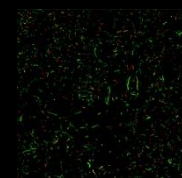
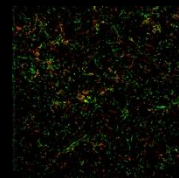
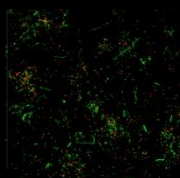
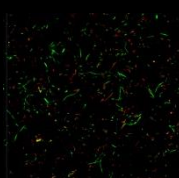
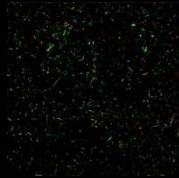
120 h

144 h

(A)



(B)



PAO1+PAO1(pCAR1)

24 h

48 h

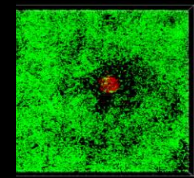
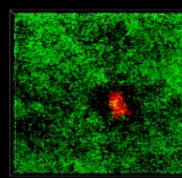
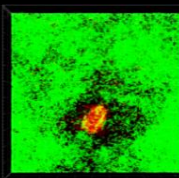
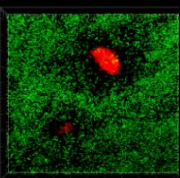
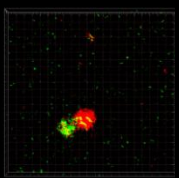
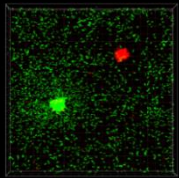
72 h

96 h

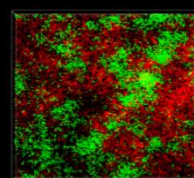
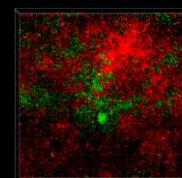
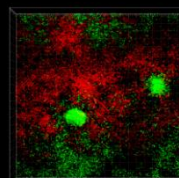
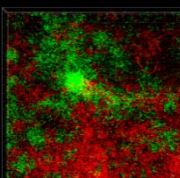
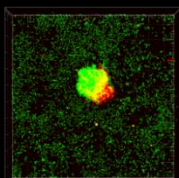
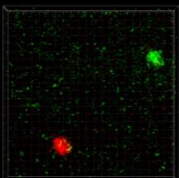
120 h

144 h

(A)



(B)



Pf0-1+Pf0-1 (pCAR1)

24 h

48 h

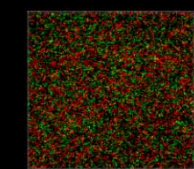
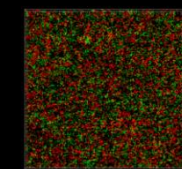
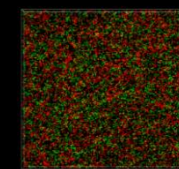
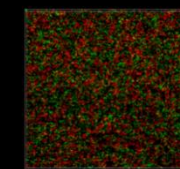
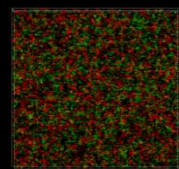
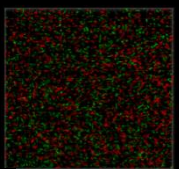
72 h

96 h

120 h

144 h

(A)



(B)

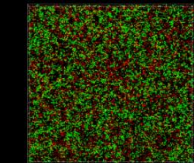
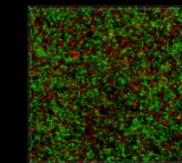
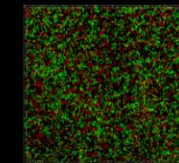
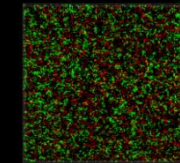
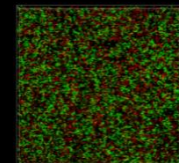
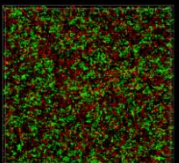


Fig. 3-21.共焦点顕微鏡を用いたpCAR1保持・非保持株を混合培養した時の画像

3-2-5に示してある連続培養系を用いてLB培地で144時間まで培養しながら、24時間ごとに共焦点レーザー顕微鏡による画像を獲得した。(A) *gfp* + *mCherry*, (B) *mCherry* + *gfp* の各組み合わせを示す。(上) KT2440 + KT2440(pCAR1), (中) PAO1 + PAO1(pCAR1), (下) Pf0-1 + Pf0-1(pCAR1)を示す。画像は3枚の写真の中から代表的な例を示した。スケールバーは20  $\mu$ mを示す。



## 第4章

### 総括と展望

本研究では、IncP-7 群カルバゾール分解プラスミド pCAR1 が宿主のバイオフィーム形成にどのような影響を与えるのか、その効果が宿主ごとにどのように異なるのかを調べると共に、その原理の解明を試みた。さらに、pCAR1 保持株・非保持株を混合培養したバイオフィーム中におけるプラスミド保持株と非保持株の挙動を解析することで、複合的なバイオフィーム内での棲み分け・生き残りにおいてプラスミドが果たす役割を明らかにした。

第2章では、*P. putida* KT2440, *P. aeruginosa* PAO1, *P. fluorescens* Pf0-1 株が pCAR1 保持・非保持時に形成するバイオフィームの形状を観察した。PAO1 株と Pf0-1 株では pCAR1 保持に伴う目立った変化は見られなかったのに対し、KT2440 株では pCAR1 保持に伴いバイオフィームがフラットに変化し細胞も繊維状に変化した。また、他の Inc 群に属するプラスミド NAH7 (IncP-1), RP4 (IncP-9) を保持した KT2440 株では繊維状化は観察されなかったことから、この現象は pCAR1 (IncP-7) 特異的に起こることが示唆された。pCAR1 上には宿主染色体の転写制御ネットワークを変え得る因子として 3 つの NAPs 遺伝子が存在しているため、これら NAPs 遺伝子の単独破壊株及び二重破壊株が形成するバイオフィームの形状を観察したところ、単独破壊株では KT2440(pCAR1)株との差は見られなかったものの、*pmr* と *phu*, *pmr* と *pnd* の二つの二重破壊株ではバイオフィームの繊維状化が劇的に亢進することが明らかとなった。すなわち pCAR1 上にコードされる NAPs は、pCAR1 が宿主のバイオフィームの形状を変化させる際に重要な鍵因子であることが示された。

上記の繊維状化の原因を探るため、pCAR1 の保持や NAPs 遺伝子の破壊がバイオフィーム形成時のトランスクリプトームに及ぼす影響を、高密度タイリングアレイを用いて網羅的に調べた。その結果、繊維状化の原因となる、あるいは繊維状化を亢進する可能性がある 32 個の候補遺伝子を見出した。選抜された 32 個の遺伝子について、繊維状化しない宿主である KT2440 株と繊維状化する KT2440(pCAR1)株を用いて過剰発現株を作製し、各遺伝子の発現がバイオフィームへ及ぼす影響を共焦点レーザー顕微鏡にて評価した。その結果、KT2440 株を用いた過剰発現株では PP\_2193 (TonB-dependent siderophore receptor) を高発現させた株で菌体が伸びる現象が観察された。また、KT2440(pCAR1) 株を用いた過剰発現株では PP\_0308 (membrane dipeptidase) や PP\_0309 (hypothetical protein) を高発現させた株で繊維状化の亢進が観察された。PP\_2193 は鉄欠乏の時に転写されると考える遺伝子であり、菌体の繊維状化への変化することによる細

胞中の鉄欠乏が起きる可能性が示唆された。一方、PP\_0309 や PP\_0308 については詳細な解析は行われておらず、生理機能は不明である。以上より、KT2440 株の pCAR1 保持に伴う繊維状化には、複数の遺伝子が関与することが示唆された。

第3章では、第2章の単独培養で得られた知見を基に、3種の *Pseudomonas* 属細菌 (*P. putida* KT2440 株, *P. aeruginosa* PAO1 株, *P. fluorescens* Pf0-1 株) について pCAR1 保持株・非保持株を様々な組み合わせで混合培養し、pCAR1 保持が複合的なバイオフィルムに及ぼす影響を解析した。その結果、PAO1 株を他の株と混合培養すると pCAR1 保持・非保持に関わらずバイオフィルム中で優占化すること、同一細菌間で pCAR1 保持・非保持株を混合培養すると [KT2440 + KT2440(pCAR1), PAO1 + PAO1(pCAR1), Pf0-1 + Pf0-1(pCAR1)] 一方の優占化は見られず、各株それぞれがバイオフィルムを形成し、混ざらない状態で存在することが明らかとなった。

過去当研究室では、pCAR1 保持株と非保持株の競合培養を行うと pCAR1 保持株が淘汰されること、pCAR1 保持株の淘汰されやすさは宿主ごとに異なることが明らかにされていた [Takahashi *et al.*, 2014]。そこでフローサイトメトリーや共焦点レーザー顕微鏡を用いてバイオフィルム状態と浮遊状態における各株の割合を比較したところ、立体構造を持つバイオフィルム状態ではプラスミド保持株が淘汰されずに生き残っていることが明らかとなった。細菌は実環境中において、多種多様な細菌群から形成されるバイオフィルム形態をとって生きていることが多い。本研究で見出した、浮遊状態とバイオフィルム状態における pCAR1 保持株の淘汰されやすさの違いは、プラスミド保持株の実環境中での生態を深く理解する上で重要であると考えられる。

本研究は、KT2440 株において pCAR1 保持がバイオフィルムの繊維状化を引き起こすメカニズムの解明には至らなかったものの、繊維状化に関与する3つの遺伝子が取得できたという点で、一定の成果を挙げたと言える。さらに、複合微生物系におけるプラスミドの挙動についても、浮遊状態とバイオフィルム状態ではプラスミド保持株の生き残りやすさが異なることを明らかにすることができた。

これらの現象を別な視点で眺めれば、本研究の目指すものは、接合伝達性プラスミドを保持した細菌が非保持菌集団内に存在する場合に、どのようにプラスミドが水平伝播していくのか、という点を解析することに似ている。バイオフィルム内のように個々の細胞が密接した状態は接合伝達には有利と考えられ、事実、そのような空間的に近接した細胞はプラスミドの接合に有利になるという報告もある [Babic *et al.*, 2011]。今後は多様な細菌集団におけるプラスミドの接合伝達現象の解析を行うことで、プラスミドを受け取った少数の接合伝達体の挙動がより実環境に則した状態で明らかになると期待される。さらにプラスミドが宿主染色体の遺伝子発現様式を変化させる因子であることを考慮すれば、複合微生物系バイオフィルム内での接合伝達現象を理解することは細菌

ゲノム・プラスミドの進化を考える上で重要な糧となるだろう.

## 参考文献

- Babic A, Berkmen MB, Lee CA, Grossman AD.** 2011. Efficient Gene Transfer in Bacterial Cell Chains. *Mbio.* **2(2)**: e00027-11
- Belik AS, Tarasova NN, Khmel' IA.** 2008. Regulation of biofilm formation in *Escherichia coli* K12: effect of mutations in the genes HNS, StpA, Lon, RpoN. *Mol Gen Microbiol Virol.* **23**: 159–162.
- Beloin C, Deighan P, Doyle M, Dorman CJ.** 2003. *Shigella flexneri* 2a strain 2457T expresses three members of the H-NS-like protein family: characterization of the Sfh protein. *Mol. Genet. Genomics.* **270(1)**: 66-77.
- Caiazza NC, Merritt JH, Brothers KM, O'Toole GA.** 2007. Inverse regulation of biofilm formation and swarming motility by *Pseudomonas aeruginosa* PA14. *J. Bacteriol.* **189**: 3603-3612.
- Carattoli A.** 2003. Plasmid-mediated antimicrobial resistance in *Salmonella enterica*. *Curr. Issues Mol. Biol.* **5(4)**: 113–122.
- Castang S, McManus HR, Turner KH, Dove SL.** 2008. H-NS family members function coordinately in an opportunistic pathogen. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **105(48)**: 18947-18952.
- Claret L, Rouvière-Yaniv J.** 1997. Variation in HU composition during growth of *Escherichia coli*: the heterodimer is required for long term survival. *J. Mol. Biol.* **273**: 93–104.
- Costerton JW, Lewandowski Z, Caldwell DE, Korber DR, Lappin-Scott HM.** 1995. Microbial biofilms. *Annu. Rev. Microbiol.* **49**: 711-745.
- Costerton JW, Stewart PS, Greenberg EP.** 1999. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science.* **284**: 1318-1322.
- Crabbé A, Leroy B, Wattiez R, Aertsen A, Leys N, Cornelis P, Van Houdt R.** 2012. Differential proteomics and physiology of *Pseudomonas putida* KT2440 under filament-inducing conditions. *BMC Microbiol.* **12**: 282
- D'Alvise PW, Sjöholm OR, Yankelevich T, Jin Y, Wuertz S, Smets BF.** 2010. TOL plasmid carriage enhances biofilm formation and increases extracellular DNA content in *Pseudomonas putida* KT2440. *FEMS Microbiol. Lett.* **312**: 84-92.
- de Beer D, Stoodley P, Roe F, Lewandowski Z.** 1994. Effects of biofilm structures on oxygen distribution and mass transport. *Biotechbol. Bioeng.* **43**: 1131-1138.
- Deighan P, Beloin C, Dorman CJ.** 2003. Three-way interactions among the Sfh, StpA and H-NS nucleoid-structuring proteins of *Shigella flexneri* 2a strain 2457T. *Mol. Microbiol.* **48(5)**: 1401-1416.

- Diggle SP, Winzer K, Lazdunski A, Williams P, Cámara M.** 2002. Advancing the quorum in *Pseudomonas aeruginosa*: MvaT and the regulation of N-acylhomoserine lactone production and virulence gene expression. *J. Bacteriol.* **184(10)**: 2576-2586.
- Dillon SC, Cameron AD, Hokamp K, Lucchini S, Hinton JC, Dorman CJ.** 2010. Genome-wide analysis of the H-NS and Sfh regulatory networks in *Salmonella Typhimurium* identifies a plasmid-encoded transcription silencing mechanism. *Mol. Microbiol.* **76**: 1250-1265.
- Dillon SC, Dorman CJ.** 2010. Bacterial nucleoid-associated proteins, nucleoid structure and gene expression. *Nat. Rev. Microbiol.* **8**:185-195.
- Donlan RM, Costerton JW.** 2002. Biofilm: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clin. Microbiol. Rev.* **15**: 167-193.
- Doyle M, Fookes M, Ivens A, Mangan MW, Wain J, Dorman CJ.** 2007. An H-NS-like stealth protein aids horizontal DNA transmission in bacteria. *Science.* **315(5809)**: 251–252.
- Drenkard E.** 2003. Antimicrobial resistance of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Microbes Infect.* **5**: 1213-1219.
- Elias S, Banin E.** 2012. Multi-species biofilms: living with friendly neighbors. *FEMS Microbiol. Rev.* **36**: 990–1004.
- Fang FC, Rimsky S.** 2008. New insights into transcriptional regulation by H-NS. *Curr. Opin. Microbiol.* **11(2)**: 113-120.
- Hansen SK, Haagensen JAJ, Gjermansen M, Jorgensen TM, Tolker-Nielsen T and Molin S.** 2007b. Characterization of a *Pseudomonas putida* rough variant evolved in a mixed-species biofilm with *Acinetobacter* sp. strain C6. *J. Bacteriol.* **189**: 4932–4943.
- Henderson IR, Owen P, Nataro JP.** 1999. Molecular switches—the ON and OFF of bacterial phase variation. *Mol. Microbiol.* **33**: 919-932.
- Heydorn A, Nielsen AT, Hentzer M, Sternberg C, Givskov M, Ersbøll M, Molin S.** 2000. Quantification of biofilm structures by the novel computer program COMSTAT. *Microbiology.* **146**: 2395-2407.
- Hibbing ME, Fuqua C, Parsek MR, Peterson SB.** 2010. Bacterial competition: surviving and thriving in the microbial jungle. *Nat Rev Microbiol.* **8**:15–25
- Inoue K, Widada J, Nakai S, Endoh T, Urata M, Ashikawa Y, Shintani M, Saiki Y, Yoshida T, Habe H, Omori T, Nojiri H.** 2004. Divergent structures of carbazole degradative car operons isolated from gram-negative bacteria. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **68(7)**:1467-80.
- Juhas M, van der Meer JR, Gaillard M, Harding RM, Hood DW, Crook DW.** 2009. Genomic islands: tools of

bacterial horizontal gene transfer and evolution. *FEMS Microbiol. Rev.* **33(2)**: 376–393.

**Klausen M, Heydorn A, Ragas P, Lambertsen L, Aaes-Jørgensen A, Molin S, Tolker-Nielsen T.** 2003. Biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa* wild type, flagella and type IV pili mutants. *Mol. Microbiol.* **48**: 1511-1524.

**Kovachet ME, Elzer PH, Hill DS, Robertson GT, Farris MA, Roop RM, and Peterson KM.** 1995. Four new derivatives of the broad-host-range cloning vector pBBR1MCS, carrying different antibiotic-resistance cassettes. *Gene* **166(1)**:175-6.

**Lagendijk EL, Validov S, Lamers GE, de Weert S, Bloemberg GV.** 2010 Genetic tools for tagging Gram-negative bacteria with mCherry for visualization in vitro and in natural habitats, biofilm and pathogenicity studies. *FEMS Microbiol. Lett.* **305**:81-90

**Leoni L, Orsi N, de Lorenzo V, Visca P.** 2000. Functional analysis of PvdS, an iron starvation sigma factor of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol.* **182**: 1481-1491.

**Luijsterburg MS, Noom MC, Wuite GJ, Dame RT.** 2006. The architectural role of nucleoid-associated proteins in the organization of bacterial chromatin: a molecular perspective. *J. Struct. Biol.* **156(2)**: 262–272.

**Ma H, Katzenmeyer KN, Bryers JD.** 2013. Non-invasive in situ monitoring and quantification of TOL plasmid segregational loss within *Pseudomonas putida* biofilms. *Biotechnol Bioeng.* **110**: 2949-2958.

**Madsen JS, Burmølle M, Sørensen SJ.** 2013. A spatiotemporal view of plasmid loss in biofilms and planktonic cultures. *Biotechnol Bioeng.* **110(11)**: 2949-2958

**Maeda K, Nojiri H, Shintani M, Yoshida T, Habe H, Omori T.** 2003. Complete nucleotide sequence of carbazole/dioxin-degrading plasmid pCAR1 in *Pseudomonas resinovorans* strain CA10 indicates its mosaicity and the presence of large catabolic transposon Tn4676. *J. Mol. Biol.* **326(1)**: 21-33.

**Mah TF, Pitts B, Pellock B, Walker GC, Stewart PS, O'Toole GA.** 2003. A genetic basis for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm antibiotic resistance. *Nature.* **426**: 306-310.

**Missiakas D, Raina S.** 1998. The extracytoplasmic function sigma factors: role and regulation. *Mol Microbiol.* **28**: 1059-1066.

**Miyakoshi M, Nishida H, Shintani M, Yamane H, Nojiri H.** 2009. High-resolution mapping of plasmid transcriptomes in different host bacteria. *BMC Genomics.* **10**, 12.

**Murphy LD, Rosner JL, Zimmerman SB, Esposito D.** 1999. Identification of two new proteins in spermidine nucleoids isolated from *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **181(12)**: 3842-3844.

- Nielsen AT, Tolker-Nielsen T, Barken KB and Molin S.** 2000. Role of commensal relationships on the spatial structure of a surface-attached microbial consortium. *Environ Microbiol.* **2**: 59–68.
- Nickel JC, Ruseska I, Wright JB, Costerton JW.** 1985. Tobramycin resistance of *Pseudomonas aeruginosa* cells growing as a biofilm on urinary catheter material. *Anti-microob. Agent. Chemother.* **27**: 619-624.
- Nojiri H, Sekiguchi H, Maeda K, Urata M, Nakai S, Yoshida T, Habe H, Omori T.** 2001. Genetic characterization and evolutionary implications of a *car* gene cluster in the carbazole degrader *Pseudomonas* sp. strain CA10. *J. Bacteriol.* **183(12)**: 3663-3679.
- Nojiri H.** 2012. Structural and molecular denetic anayses of the bacterial carbazole degradation system. *Biosci. Bacteriol. Biochem.* **76(1)**: 110620-1-18
- Oberto J, Nabti S, Jooste V, Mignot H, Rouviere-Yaniv J.** 2009. The HU regulon is composed of genes responding to anaerobiosis, acid stress, high osmolarity and SOS induction. *PLoS One.* **4(2)**: e4367.
- Ouchiyama N, Zhang Y, Omori T, Kodama T.** 1993. Biodegradation of Carbazole by *Pseudomonas* spp. CA06 and CA10. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **57**: 455-460.
- Palmer RJ.** 1999. Microscopy flowcells: perfusion chambers for real-time study of biofilm. *Methods Enzymol.* **310**: 160-6.
- Perocchi FL, Xu Z, Clauder-Münster S, Steinmetz LM.** 2007. Antisense artifacts in transcriptome microarray experiments are resolved by actinomycin D. *Nucleic Acid Research.* **35**, e128.
- Prigent-Combaret C, Vidal O, Dorel C, Lejeune P.** 1999. Abiotic surface sensing and biofilm-dependent regulation of gene expression in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **181**: 5993-6002.
- Rescalli E, Saini S, Bartocci C, Rychlewski L, De Lorenzo V, Bertoni G.** 2004. Novel physiological modulation of the promoter of TOL plasmid: negative regulatory role of the TurA protein of *Pseudomonas putida* in the response to suboptimal growth temperatures. *J. Biol. Chem.* **279(9)**: 7777-7784.
- Rickard AH, Palmer RJ Jr, Blehert DS, Campagna SR, Semmelhack MF, Eglund PG, Bassler BL, Kolenbrander PE.** 2006. Autoinducer 2: a concentration-dependent signal for mutualistic bacterial biofilm growth. *Mol Microbiol.* **60**: 1446–1456.
- Rouviere-Yaniv, J, Gros, F.** 1975. Characterization of a novel, low-molecular-weight DNA-binding protein from *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **72**: 3428–3432
- Rosenthal RS, Rodwell VW.** 1998. Purification and characterization of the heteromeric transcriptional activator MvaT of the *Pseudomonas mevalonii mvaAB* operon. *Protein Sci.* **7(1)**: 178-184.

- Sauer K, Camper AK, Ehrlich GD, Costerton JW, Davies DG.** 2002. *Pseudomonas aeruginosa* displays multiple phenotypes during development as a biofilm. *J. Bacteriol.* **184**: 1140-1154.
- Sawada I, Maseda H, Nakae T, Uchiyama H, Nomura N.** 2004. A quorum-sensing autoinducer enhances the mexAB-oprM efflux-pump expression without the MexR-mediated regulation in *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiol. Immunol.* **48**: 435-9.
- Shintani M, Yoshida T, Habe H, Omori T, Nojiri H.** 2005a. Large plasmid pCAR2 and class II transposon Tn4676 are functional mobile genetic elements to distribute the carbazole/dioxin-degradative car gene cluster in different bacteria. *Appl Microbiol Biotechnol.* **67(3)**: 370-82.
- Shintani M, Habe H, Tsuda M, Omori T, Yamane H, Nojiri H.** 2005b. Recipient range of IncP-7 conjugative plasmid pCAR2 from *Pseudomonas putida* HS01 is broader than from other *Pseudomonas* strains. *Biotechnol Lett.* **27(23-24)**:1847-53.
- Shintani M, Yano H, Habe H, Omori T, Yamane H, Tsuda M, Nojiri H.** 2006. Characterization of the replication, maintenance, and transfer features of the IncP-7 plasmid pCAR1, which carries genes involved in carbazole and dioxin degradation. *Appl. Environ. Microbiol.* **72(5)**: 3206-3216.
- Shintani M, Takahashi Y, Tokumaru H, Kadota K, Hara H, Miyakoshi M, Naito K, Yamane H, Nishida H, Nojiri H.** 2010. Response of the *Pseudomonas* host chromosomal transcriptome to carriage of the IncP-7 plasmid pCAR1. *Environ. Microbiol.* **12(6)**: 1413-1426.
- Shintani M, Takahashi Y, Tokumaru H, Kadota K, Hara H, Miyakoshi M, Naito K, Yamane H, Nishida H, Nojiri H.** 2011. Alterations of RNA maps of IncP-7 plasmid pCAR1 in various *Pseudomonas* bacteria. *Plasmid.* **66(2)**: 85-92.
- Shintani M, Matsui K, Inoue J, Hosoyama A, Ohji S, Yamazoe A, Nojiri H, Kimbara K, Ohkuma M.** 2014. Single-cell analyses revealed transfer ranges of IncP-1, IncP-7, and IncP-9 plasmids in a soil bacterial community. *Appl Environ. Microbiol.* **80(1)**:138-45.
- Sonden B, Uhlin BE.** 1996. Coordinated and differential expression of histone-like proteins in *Escherichia coli*: regulation and function of the H-NS analog StpA. *EMBO J.* **15(18)**: 4970-80.
- Sukchawalit R, Vattanaviboon P, Sallabhan R, Mongkolsuk S.** 1999. Construction and characterization of regulated L-arabinose-inducible broad host range expression vectors in *Xanthomonas*. *FEMS Microbiol. Lett.* **181**: 217-223.
- Swinger KK, Lemberg KM, Zhang Y, Rice PA.** 2003. Flexible DNA bending in HU-DNA cocrystal structures. *EMBO J.* **22(14)**: 3749-3760.
- Swinger KK, Rice PA.** 2004. IHF and HU: flexible architects of bent DNA. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **14(1)**: 28-35.
- Takahashi Y, Shintani M, Yamane H, Nojiri H.** 2009a. The complete nucleotide sequence of pCAR2: pCAR2 and pCAR1 were structurally identical IncP-7 carbazole degradative plasmids. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **73(3)**: 744-746.



**Takahashi Y, Shintani M, Li L, Yamane H, Nojiri H.** 2009b. Carbazole-degradative IncP-7 plasmid pCAR1.2 is structurally unstable in *Pseudomonas fluorescens* Pf0-1, which accumulates catechol, the intermediate of the carbazole degradation pathway. *Appl. Environ. Microbiol.* **75(12)**: 3920-3929.

**Takahashi Y, Shintani M, Takase N, Kazo Y, Kawamura F, Hara H, Nishida H, Okada K, Yamane H, Nojiri H.** 2014. Modulation of primary cell function of host *Pseudomonas* bacteria by the conjugative plasmid pCAR1. *Environmental Microbiology*. doi: 10.1111/1462-2920.12515. [Epub ahead of print]

**Takeda T, Yun CS, Shintani M, Yamane H, Nojiri H.** 2011. Distribution of genes encoding nucleoid-associated protein homologs in plasmids. *International Journal of Evolutionary Biology* **2011**, 1-30.

**Tatusov RL, Koonin EV, Lipman DJ.** 1997. A genomic perspective on protein families. *Science* **278**, 631-637.

**Visca P, Imperi F, Lamont IL.** 2007. Pyoverdine siderophores: from biogenesis to biosignificance. *Trends. Microbiol.* **15**: 22-30.

**Tendeng C, Soutourina OA, Danchin A, Bertin PN.** 2003. MvaT proteins in *Pseudomonas* spp.: a novel class of H-NS-like proteins. *Microbiology*. **149(Pt 11)**: 3047-3050.

**Vallet-Gely I, Donovan KE, Fang R, Joung JK, Dove SL.** 2005. Repression of phase-variable *cup* gene expression by H-NS-like proteins in *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **102(31)**: 11082-11087.

**Yano H, Garruto CE, Sota M, Ohtsubo Y, Nagata Y, Zylstra GJ, Williams PA, Tsuda M.** 2007. Complete sequence determination combined with analysis of transposition/site-specific recombination events to explain genetic organization of IncP-7 TOL plasmid pWW53 and related mobile genetic elements. *J Mol Biol.* **369(1)**: 11-26.

**Yano H, Miyakoshi M, Ohshima K, Tabata M, Nagata Y, Hattori M, Tsuda M.** 2010. Complete nucleotide sequence of TOL plasmid pDK1 provides evidence for evolutionary history of IncP-7 catabolic plasmids. *J Bacteriol.* **192(17)**: 4337-4347.

**Yang X, Ma Q, Wood TK.** 2008. The R1 conjugative plasmid increases *Escherichia coli* biofilm formation through an envelope stress response. *Appl Environ Microbiol.* **74**: 2690-2699.

**Yawata Y, Toda K, Setoyama E, Fukuda J, Suzuki H, Uchiyama H, Nomura N.** 2010. Monitoring biofilm development in a microfluidic device using modified confocal reflection microscopy. *J Biosci Bioeng.* **110**: 377-380.

**Yun CS, Suzuki C, Naito K, Takeda T, Takahashi Y, Sai F, Terabayashi T, Miyakoshi M, Shintani M, Nishida H, Yamane H, Nojiri H.** 2010. Pmr, a histone-like protein H1 (H-NS) family protein encoded by the IncP-7 plasmid pCAR1, is a key global regulator that alters host function. *J. Bacteriol.* **192(18)**: 4720-4731.

**Zhang A, Rimsky S, Reaban ME, Buc H, Belfort M.** 1996. *Escherichia coli* protein analogs StpA and

H-NS:regulatory loops,similar and disparate effects on nucleic acid dynamics. *EMBO J.* **15**:1340-1349.

高橋裕里香 (2012). 東京大学大学院博士論文

武田俊春 (2011). 東京大学大学院博士論文

松井一泰(2014). 東京大学大学院博士論文

李昇昱 (2012). 東京大学大学院修士論文

## 補章 1. 実験操作の詳細な手順

### 本章内での目次

補章 1. 実験操作の詳細な手順 ..エラー! ブックマークが定義されていません。	
補 1-1. アガロースゲル電気泳動エラー! ブックマークが定義されていません。	
補 1-2. DNA 断片の精製.....エラー! ブックマークが定義されていません。	
補 1-3. 大腸菌からのプラスミド抽出 .....	2
補 1-4. 大腸菌の形質転換 .....	3
補 1-5. エレクトロポレーション用のコンピテントセルの調製 .....	3
補 1-6. pCAR1 保持率測定試験 .....	4
補 1-7. 生育曲線の作製 .....	4
補 1-8. RNA マッピングの手順.....	4

### 補章 1-1. アガロースゲル電気泳動

アガロースゲル電気泳動は Mupid 小型電気泳動槽 (ADVANCE Co. Ltd., Tokyo, Japan) を用いて、室温において 100 V で行った。詳細な手順は以下の通り。

#### 試薬

- アガロース ME 中電気浸透 (Nacalai Tesque)
- 50×TAE (1 L)  
242 g トリス塩基  
57.1 mL 酢酸  
100 mL 0.5 M ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) (pH=8.0)  
700 mL の dH<sub>2</sub>O に上記の順で溶解させ、1000 mL に fill up して調製した(常温保存)。  
使用時は dH<sub>2</sub>O で 50 倍に希釈し、1×TAE として用いた。
- 10×Loading Dye (Takara Bio)
- One STEP Marker 5 (Nippon Gene) (分子量マーカー)
- One STEP Marker 6 (Nippon Gene) (分子量マーカー)
- Ethidium bromide (EtBr) solution (Nippon Gene) (染色液)  
dH<sub>2</sub>O で推奨濃度に希釈して使用した。

#### 操作

＜アガロースゲルの作製＞

(1) アガロース濃度は、泳動する DNA 断片の長さに応じて、0.9% (目的バンド $\geq$ 1000 bp) または 2% (300 bp $\leq$ 目的バンド $<$ 1000 bp) のアガロース ME を 1×TAE に加え、電子レンジで加熱しながら寒天粉末を完全に溶解させた。

(2) ゲルメーカーに静かに流し込み、コームを差して室温で 40 分程度静置し、完全に固まってからコームを抜いた。

#### <電気泳動と検出>

電気泳動用のバッファーには 1×TAE を使用した。

(1) サンプルに 10×Loading Dye を加えてゲルにアプライし、100 V で dye がゲルの下端に移動するまで (30~40 分程度) 泳動を行った。

(2) ゲルを EtBr 溶液に浸して 15 分間静置した。その後 FAS (Toyobo) で検出を行った。

### 補章 1-2. DNA 断片の精製

ゲルからの DNA の回収には、E.Z.N.A.<sup>®</sup> Gel Extraction Kit (Omega Bio-Tek, Doraville, GA) を使用してアガロースゲルから精製した。操作は添付のプロトコールに従った。

### 補章 1-3. 大腸菌からのプラスミド抽出

#### 試薬及び酵素

- Solution I
  - 25 mM Tris-HCl (pH 8.0)
  - 10 mM EDTA
  - 50 mM glucose
- Solution II (用時調製)
  - 0.2 N NaOH
  - 1% (w/v) sodium dodecyl sulfate (SDS)
- Solution III
  - potassium acetate 29.4 g
  - AcOH 11.5 ml
  - dH<sub>2</sub>O fill up to 100 ml
- TE buffer
  - 1 M Tris-HCL (pH 8.0) 1 ml
  - 0.5 M EDTA 0.2 ml
- フェノール/クロロホルム
- 100% (w/v) エタノール
- 70% (w/v) エタノール
- RNase A (Nippon Gene)

#### 操作

- (1) *E. coli* の培養液 2 mL を 2 mL チューブに分注し、15,000 rpm, 4°C で 1 分間遠心を行うことにより集菌した。遠心後、上清を除去した。
- (2) 100 µL の solution I を加えて菌体を懸濁した (vortex) 。
- (3) 200 µL の solution II を加え、チューブをゆっくりと回転倒させることにより中身を混合させた後、氷上で 5 分間静置した。
- (4) 150 µL の solution III を加え、チューブをゆっくりと 5 回転倒させることにより中身を混合させた後、氷上で 5 分間静置した。

- (5) 15,000 rpm, 室温で 5 分間遠心を行った後, 上清を新しい 1.5 mL チューブに移した.
- (6) 上清と等量のフェノール/クロロホルムを加えてよく混合した.
- (7) 15,000 rpm, 室温で 10 分間遠心を行った後, 上層を新しい 1.5 mL チューブに移した.
- (8) 1 mL の 100%エタノールを加えてよく混合し, 氷上で 5 分間静置した.
- (9) 15,000 rpm, 4°C で 15 分間遠心を行った後, 上清を除去した.
- (10) 400  $\mu$ L の 70%エタノールを加え, チューブ壁面を穏やかに洗浄した.
- (11) 15,000 rpm, 4°C で 5 分間遠心を行った後, 上清を除去し, デシケーターで 10 分程度乾燥させた.
- (12) 100  $\mu$ L の TE buffer を加えて沈殿を溶解させた.
- (13) 終濃度 10  $\mu$ g/ml の RNaseA (DNase free) (Nippon gene) を含む TE buffer を 40  $\mu$ L 加えて  
ペレットを溶解し, 37°C でインキュベート (15 min 以上) した. その後 -20°C で保存した.

#### 補章1-4. 大腸菌の形質転換

コンピテントセル (50  $\mu$ l) にプラスミド溶液またはライゲーション産物を加え, 氷上で 30 分間静置した. その後 42°C で 90 秒間インキュベートし, 氷上で 5 分程静置した. これに 500  $\mu$ l の LB 培地を加えて, 37°C で 1 時間の回復培養を行い, Gm を添加した LB 選択プレートに塗布し, 37°C で 16 時間静置培養を行い, 形質転換株を取得した.

#### 補章1-5. エレクトロポレーション用のコンピテントセルの調製

*Pseudomonas* 属のコンピテントセルは Itoh らの方法 [Itoh *et al.*, 1994] をもとに作製した. 詳しい手順を以下に示す.

- (1) *P. putida* KT2440 株及び *P. putida* KT2440(pCAR1) 株のグリセロールストックより LB プレートに白金耳を用いて植菌し, 30°C、24 h 培養した.
- (2) 出現したシングルコロニーを滅菌つまようじを用いて, LB プレートと CAR プレートに 10 個程度パッチし, 30°C で培養した (24 hour 以内).
- (3) *P. putida* KT2440(pCAR1) 株は CAR プレート上にクリアゾーンを作ったコロニーを、*P. putida* KT2440 株ではクリアゾーンを作っていない株の LB プレート上のコロニーを白金耳で 5 ml の LB 液体培地にそれぞれ植菌し, 30°C、300 rpm で 24 h 培養した.
- (4) 培養液を回収前に氷上で 10 min 静置した (これ以降の操作は全て 4°C で行う).
- (5) 2 ml の培養液を遠心し, 菌体を回収した (12,000 rpm, 5 min, 4°C).
- (6) 2 ml のエレクトロポレーションバッファー (300 mM sucrose, 5mM potassium

dihydrogenphosphate) で 2 回洗菌した。

- (7) 0.5 ml の同バッファーに懸濁した。
- (8) 作製したコンピテントセルは 100  $\mu$ l ずつ分注した後，残りは使用時まで-80°Cで保存した。

### 補章 1-6. pCAR1 保持率測定試験

- (1) 各株を滅菌つまようじを用いて CAR プレート上にパッチし，pCAR1 由来の CAR 資化能を有することを確認した。
- (2) 5 ml の LB 液体培地に植菌し，30°C、300 rpm で 14 時間振とう培養した。
- (3) 得られた培養液を底がガラスになっているシャーレに OD<sub>600</sub> が 0.01 となるように植菌し，それを 60°程度の傾けた状態で，30°Cで静置培養した。
- (4) バイオフィームが形成し初める 3 時間目とはがれていく 18 時間目で，一つの同じシャーレの培養液から白金耳で LB 寒天培地にストリークし (浮遊状態)，シャーレに付着しているバイオフィルを白金耳で LB 寒天培地にストリークし，30°C、24 時間培養した。
- (5) 生じたコロニーを滅菌つまようじを用いて 100 コロニーずつ CAR プレートにパッチした。
- (6) CAR プレート上で CAR 資化能を有するコロニーの割合を測定する。

### 補章1-7. 生育曲線の作製

- (1) グリセロールストックを白金耳で LB プレートにストリークし，30°C で培養した (24 hour 以内)。
- (2) 出現したシングルコロニーを滅菌つまようじを用いて，LB プレートと CAR プレートに 10 個程度パッチし，30°C で培養した (24 hour 以内)。
- (3) CAR プレート上にクリアゾーンを作った株の LB プレート上のコロニーを白金耳で 5 ml の LB 液体培地に植菌し，30°C、300 rpm で 14-14.5 h 培養した (前培養)。
- (4) 前培養液を LB 液体培地で，OD<sub>600</sub> を測定し，開始 OD<sub>600</sub> が 0.05 となるように植菌量を計算した。
- (5) 計算した前培養液量をそれぞれ 500 ml 容へそ付フラスコに入った 100 ml の LB 液体培地に入れ，30°C，120 rpm で培養しながら，生育曲線の作成を行った。
- (6) 生育は OD<sub>600</sub> を測定することでモニタリングした。吸光光度計には，Pharmacia Biotech 社の Ultrospec 1000 を用いた。

### 補章 1-8. RNA マッピングの手順

#### RNA の粗抽出

菌体からの RNA の抽出には，NucleoSpin<sup>(R)</sup> RNA II キット (MACHEREY-NAGEL) を

使用し、添付のプロトコルを以下のように変更して行った。主な変更点は、溶菌液の filtration に QIA shredder (QIAGEN) を用いた点と、キット付属の DNase 処理を行わない点である。

- (1) サンプルングした菌体に TE buffer (lysozyme を 0.2 mg/ml 含む) を 100  $\mu$ l 加え、ピペッティングと vortex ミキサーによってペレットをよく懸濁し、37°C で 10 min インキュベートした。
- (2) RA1 buffer を 350  $\mu$ l,  $\beta$ -mercaptoethanol を 3.5  $\mu$ l 加え、軽く混合 (vortex, 2~3 sec) した。
- (3) QIA shredder カラムに全量アプライし、遠心 (5,000  $\times$ g, 5 min, RT) した。
- (4) 溶出液に 99.5% EtOH を 250  $\mu$ l 加え、ピペッティングにより混合した。
- (5) NucleoSpin RNA II カラムに全量 (約 700  $\mu$ l) アプライし、遠心 (11,000  $\times$ g, 30 sec, RT) した [カラムへの吸着]。
- (6) カラムを新しい collection tube に移し、RA3 buffer を 600  $\mu$ l アプライして、遠心 (11,000  $\times$ g, 30 sec, RT) した。
- (7) カラムを新しい collection tube に移し、RA3 buffer を 250  $\mu$ l アプライして、遠心 (11,000  $\times$ g, 2 min, RT) した [洗浄 2]。
- (8) カラムを RNase free 1.5 ml 容チューブに移し、dH<sub>2</sub>O を 40  $\mu$ l (カラムの中央にのるように慎重に)アプライし、静置 (1 min) した後、遠心 (11,000  $\times$ g, 2 min, RT) した。
- (9) 1  $\mu$ l を濃度測定のためにとりおき、残りをすみやかに DNase I 処理に供した。濃度測定および純度評価は、TE buffer で 50 倍希釈したサンプルを Beckman 社の DU 800 Spectrophotometer で吸光度 ( $A_{260}$ ,  $A_{280}$ ) を測定することで行った。  
[濃度 (ng/ $\mu$ l) =  $A_{260} \times 40$  (RNA の吸光係数)  $\times$  50 (希釈倍率)]

#### DNase I 処理

RQ1 DNase (Promega) を用い、添付のプロトコルに従って以下のように行った。

- (1) 以下の組成で RNA と DNase を混合し、37°C で 30 min 反応させた。(この間に前項の濃度測定を行う)

total RNA	(全量)	40 $\mu$ l
10X reaction buffer		5 $\mu$ l
RQ1 DNase (Promega)	(1 unit / $\mu$ l)	5 $\mu$ l
計		50 $\mu$ l

- (2) Stop solution を 5  $\mu$ l 加えて、65 °C (ヒートブロック) で 10 min 加熱し、反応を停止した。

## RNA 精製

- (1) DNase I 処理後のサンプル (110  $\mu$ l) に, RA1 buffer を 350  $\mu$ l,  $\beta$ -mercaptoethanol を 3.5  $\mu$ l 加えた.
- (2) 99.5% EtOH を 250  $\mu$ l 加えてピペッティングにより混合した.
- (3) NucleoSpin RNA II カラムに全量をアプライし, 遠心 (11,000  $\times$ g, 30 sec, RT) した [Binding]. フロースルーをもう一度カラムにアプライし, 遠心 (11,000  $\times$ g, 30 sec, RT) した.
- (4) カラムを新しい collection tube に移し, RA3 buffer を 600  $\mu$ l アプライして, 遠心 (11,000  $\times$ g, 30 sec, RT) した [洗浄 1].
- (5) カラムを新しい collection tube に移し, RA3 buffer を 250  $\mu$ l アプライして, 遠心 (11,000  $\times$ g, 2 min, RT) した [洗浄 2].
- (6) カラムを RNase free 1.5 ml 容チューブに移し, dH<sub>2</sub>O を 40  $\mu$ l (カラムの中央にのるよ  
うに慎重に)アプライし, 静置 (1 min) した後, 遠心 (11,000  $\times$ g, 2 min, RT) した [溶  
出 1].
- (7) 溶出液を再びカラムにアプライし, 静置 (1 min) した後, 遠心 (11,000  $\times$ g, 2 min, RT)  
した [溶出 2].

## cDNA 合成・RNA 加水分解

ランダムプライマーには Random Primer (3  $\mu$ g/ $\mu$ l, Invitrogen) を 75 ng/ $\mu$ l に希釈して用  
い, 逆転写酵素には SuperScript™ II Reverse Transcriptase (Invitrogen) を用いて, 以下の  
手順で行った.

- (1) 以下のように RNA とプライマーを PCR チューブに混合し, 以下のプログラムでア  
ニールさせた.

total RNA	12 $\mu$ g 相当		温度	時間	サイクル数
		20 $\mu$ l	70 °C	10:00	1
RNase free H <sub>2</sub> O			25 °C	10:00	1
Random primer (Invitrogen)	(75 $\mu$ g / ml)	10 $\mu$ l	4 °C	hold	1
計		30 $\mu$ l			

- (2) 反応後のチューブをタッピング→フラッシングした後, 以下の試薬を追加し, 逆転  
写反応を行った.

5X First-Strand Buffer	12 $\mu$ l	温度	時間	サイクル数
0.1M DTT	6 $\mu$ l	25 °C	10:00	1
10 mM dNTP + dUTP	3 $\mu$ l	37 °C	60:00	1



RNaseOUT	40 units / ml	1.5 $\mu$ l	42 °C	60:00	1
SuperScript™	200 units / ml	7.5 $\mu$ l	70 °C	10:00	1
総計		60 $\mu$ l	4 °C	hold	1

(3) 反応後のチューブをタッピング→フラッシングしてから、全量を 1.5 ml 容チューブに移し、1N NaOH を 20  $\mu$ l 加えた。65 °C (ヒートブロック) で 30 min 加熱し、RNA を加水分解した。

(4) 1N HCl を 20  $\mu$ l 加えて中和した。

### cDNA 精製

QIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN)を用いた。これは、サンプルから 40 bp 以下の DNA (primer など) や未反応のヌクレオチド、ポリメラーゼ、塩を除き、100 bp から 10 kbp の二本鎖・一本鎖 DNA を回収するキットである。

### 試薬

キットに添付

- PB buffer (標準の PBI バッファの pH 指示薬を含まないもの、Qiagen 社に問い合わせると送付してもらえる。pH 指示薬の成分は企業秘密だが、励起波長 367 nm, エミッション波長 570 nm であり、アレイの検出時にバックグラウンドを上げてしまう恐れがあると Qiagen 社は警告している)
- PE buffer (開封時に 99.5% EtOH を指示量加える)
- EB buffer (10 mM Tris-Cl, pH 8.5)

始める前に

- PE buffer のフタに EtOH を加えた印があるか確かめる。
- PB buffer および EB buffer の pH を pH 試験紙で確かめる。PB buffer は pH  $\leq$  7.5, EB buffer は pH  $\geq$  8.5 であればよい。この範囲にない場合は、3 M sodium acetate (pH 5.0) で調整する。

- (1) RNA 加水分解後のサンプル (100  $\mu$ l) に PB buffer を 500  $\mu$ l (5 倍量) 加えた。
- (2) QIAquick Spin Column (以下カラム) に全量をアプライし、遠心 (17,900  $\times$  g, 1 min, RT) した。フロースルーは捨てずに、精製後の cDNA 濃度を確かめるまで保存した。
- (3) カラムに PE buffer を 750  $\mu$ l アプライし、遠心 (17,900  $\times$  g, 1 min, RT) した。フロースルーは捨てずに、精製後の cDNA 濃度を確かめるまで保存した。
- (4) さらに遠心 (17,900  $\times$  g, 1 min, RT) して、カラムを dry up した。
- (5) カラムを 1.5 ml tube にセットし、EB buffer を 30  $\mu$ l (カラムの中央にのるように慎重に)アプライし、静置 (1 min) した。

- (6) 遠心 (17,900 × g, 1 min, RT) して, cDNA を溶出した. (添付の説明書によると, 30 μl で溶出した場合の液量は約 28 μl になる. )
- (7) 溶出液を再びカラムにアプライし, 静置 (1 min) した後, 遠心 (11,000 × g, 2 min, RT) した.
- (8) 1 μl をとって EB buffer で 50 倍希釈し, Beckman 社の DU 800 Spectrophotometer で吸光度 ( $A_{260}$ ,  $A_{280}$ ) を測定することで濃度測定および純度評価を行った.  
[濃度 (ng/μl) =  $A_{260} \times 33$  (single-stranded cDNA の吸光係数) × 50 (希釈倍率)]

#### 断片化・ラベリング

- (1) 以下の組成で cDNA と試薬を PCR チューブに混合し, サーマルサイクラーを用いて以下のプログラムで反応させた.

ss DNA	5 μg 相当			温度	時間	サイクル数
		39.5	μl	37 °C	60:00	1
RNase free H <sub>2</sub> O				93 °C	2:00	1
10X buffer		4.8	μl	4 °C	2-10 min	1
APE1		2.25	μl			
UDG		1.5	μl			
計		48.05	μl			

- (2) 3 μl を分取してアガロースゲル電気泳動に供し, 断片化の程度を確認した.
- (3) 残り全量に, 以下の試薬を追加し, サーマルサイクラーを用いて以下のプログラムでラベリング反応を行った.

断片化 cDNA		45	μl	温度	時間	サイクル数
5X buffer		12	μl	37 °C	60:00	1
TdT		2	μl	70 °C	10:00	1
Biotin ddUTP	5 mM	1	μl	4 °C	2-10 min	1
計		60	μl			

#### ハイブリダイゼーション

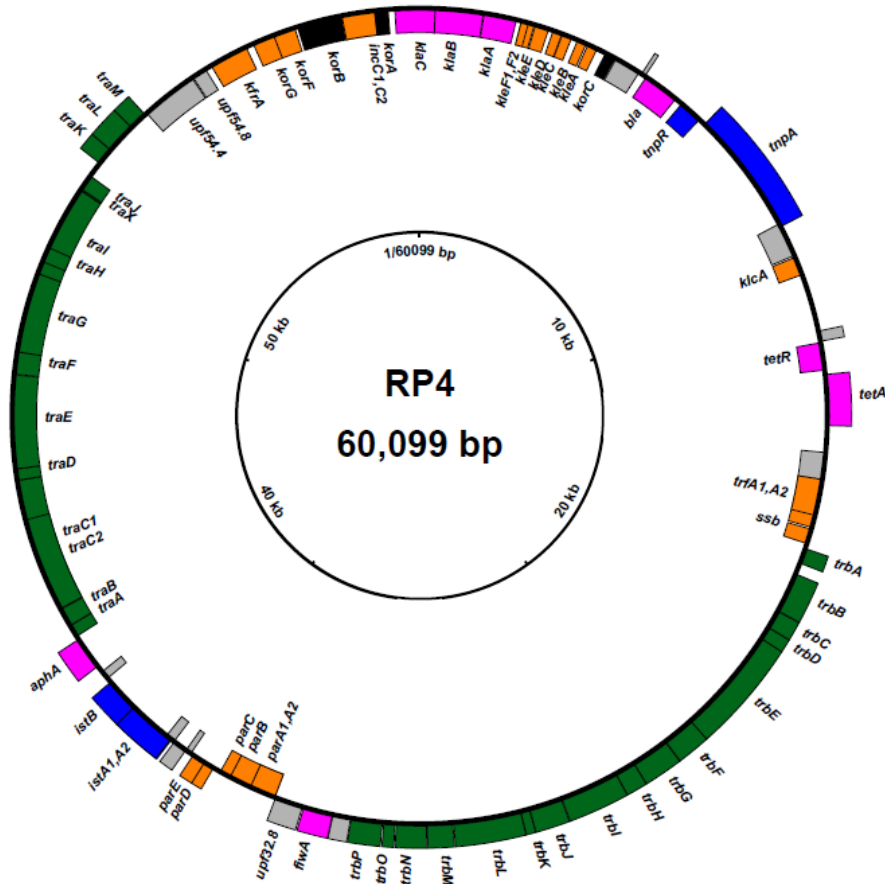
GeneChip Hybridization, Wash and Stain Kit (Affymetrix) を用い, 以下の手順で行った.

- (1) 以下の組成で labeled cDNA と試薬を 1.5 ml 容チューブに混合し, hybridization cocktail を調製した. すぐにハイブリさせない場合の保存は 6-8 時間なら 4°C, 数日なら -20°C とし, 半永久的に保存する場合は -80°C とした.

Labeled cDNA		60	μl
Control Oligonucleotide B2	3 nM	3.3	μl
2X Hybridization mix		100	μl
DMSO	室温保存	14	μl
RNase free H <sub>2</sub> O		23.7	μl
計		200	μl

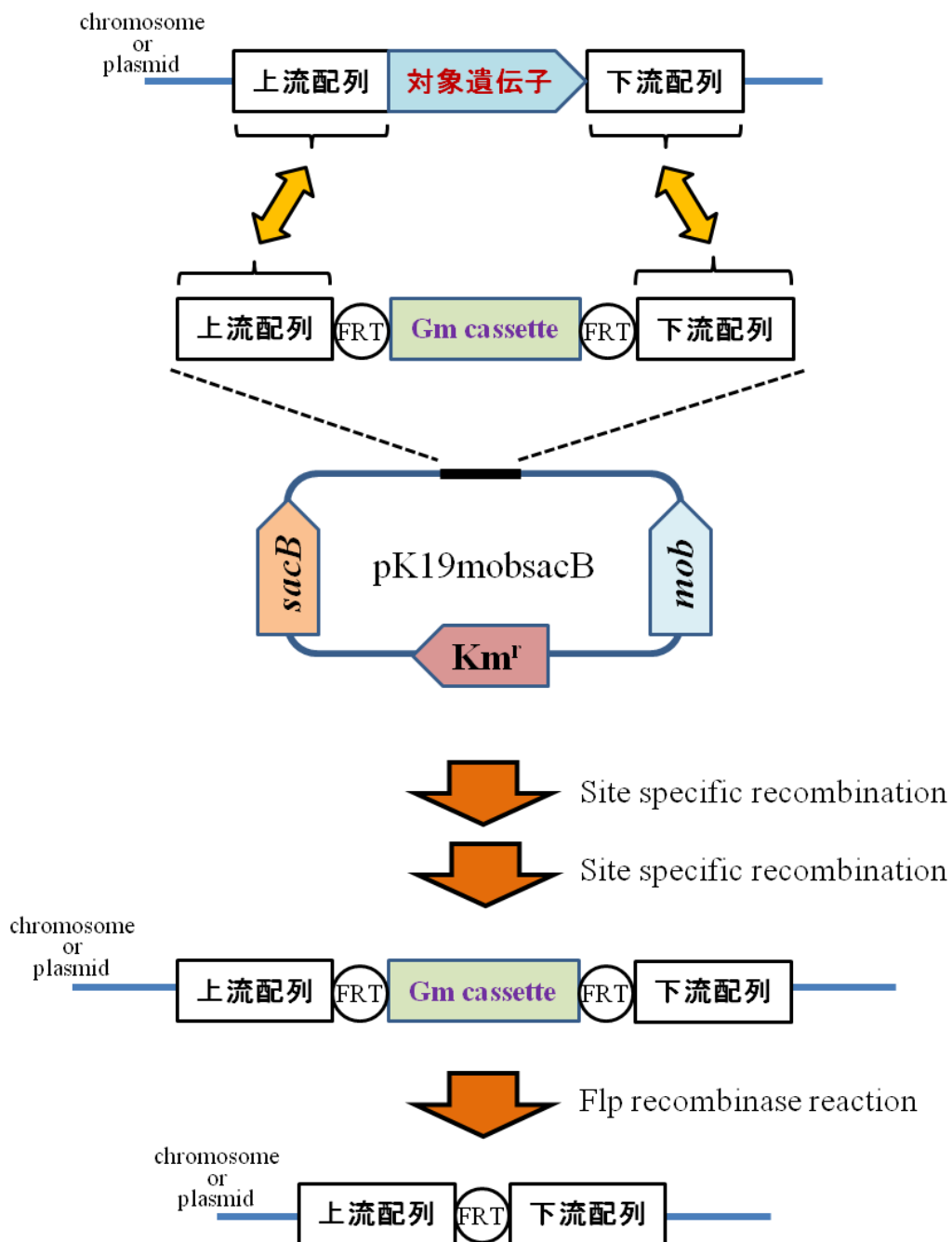
- (2) Hybridization cocktail をタッピング、フラッシングし、99°C のヒートブロックで 5 分間加熱した。
- (3) 50°C のヒートブロックに移し、5 分間加熱した (pCAR1 チップの場合は 45°C にする)。
- (4) 室温で 15,000rpm にて 1 分間遠心した。
- (5) 室温に戻したアレイチップに全量 (200 μl) 注入した (pCAR1 チップの場合は 130 μl にする)。
- (6) 50°C のハイブリオーブンに入れ、60 rpm で回転させながら、16 時間ハイブリさせた (pCAR1 チップの場合は 45°C にする)。





**Figure 2. RP4 の環状遺伝子マップ**

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 (外側の扇形が時計回り、内側の扇形が反時計回りに転写される ORF)。各 ORF は相同性を示したタンパク質の機能の種類によって色分けした。(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、ピンク：その他の機能、黒色：転写制御、青色：転移因子・挿入因子、灰色：機能未知である。



**Figure 3.** 相同性組換えを利用した対象遺伝子の除去方法の概略図

pK19mobsacB 上に組み込まれた「上流配列」領域および「下流配列」領域それぞれで相同性組換えが生じることにより、対象遺伝子が「Gm cassette」に置き換わる。Gm cassette は FRT 配列に挟まれており、Flp recombinase を用いることで除去される。

## 謝辞

本研究を行うにあたり、素晴らしい研究環境とテーマを与えてくださると共に、公私共に親身なご指導と温かい励ましを頂きました東京大学生物生産工学研究センター環境保全工学部門教授野尻秀昭先生に心より感謝致します。また、本研究を進める上で様々なご配慮と励ましを頂きました同センター准教授 岡田憲典先生に深く感謝致します。また、卒業研究から博士課程一年目まで指導教員として直接ご指導いただき、異動後も折に触れて温かい励ましを頂きました現・帝京大学教授 山根久和先生に心より感謝致します。同様に常に励まし温かく見守って下さいました同研究室助教, 水口（鈴木）千穂先生に深く感謝申し上げます。

共焦点レーザー顕微鏡観察について、貴重なご指導、ご助言を賜りました、筑波大学大学院生命環境科の教授、野村暢先生に深く感謝申し上げます。また、有益なディスカッションをしていただきました、同研究室の皆さまには、折にふれ貴重なご助言・ご協力・励ましのお言葉を頂いただけでなく、公私にわたり様々なご配慮を頂きました。この場を借りて厚く御礼申し上げます。

実験操作の基本を一から教えて頂き、また研究の楽しさ・厳しさを教えて下さいました、現富山県立大学工学部生物工学科応用生物情報学講座助教、高橋裕里香に深く感謝申し上げます。また、お名前を挙げつくせませんが、同研究室の皆さまには、折にふれ貴重なご助言・ご協力・励ましのお言葉を頂いただけでなく、公私にわたり様々なご配慮を頂きました。この場を借りて厚く御礼申し上げます。

また、いつも応援して下さいました、韓国の先輩、同期、後輩、友人にも感謝いたします。特に友人の吳東曄君は研究が進まない時、つらい時等、それ以外にもご助言を頂きました。この場を借りて感謝申し上げます。

最後に、本研究を進めるにあたり支えとなり常に暖かく見守ってくれた、家族に深く感謝し、本論文の結びとさせていただきます。

2015年3月