

宿主の代謝能力に適応した分解プラスミドの遺伝子構造変化 Gene Organization of Degradative Plasmid Changed to Adapt Metabolic Capacities of Host

高橋裕里香, 新谷政己, 山根久和, 野尻秀昭*

YURIKA TAKAHASHI, MASAKI SHINTANI, HISAKAZU YAMANE and HIDEAKI NOJIRI

東京大学生物生産工学研究センター 〒113-8657 文京区弥生 1-1-1

*TEL: 03-5841-3064 FAX: 03-5841-8030

*E-mail: anojiri@mail.ecc.u-tokyo.ac.jp

Biotechnology Research Center, The University of Tokyo, 1-1-1 Yayoi, Bunkyo-ku, Tokyo 113-8657, Japan

キーワード: 遺伝子構造変化, IncP-7 群プラスミド, pCAR1, カルバゾール, シュードモナス

Key words: evolution, IncP-7 plasmid, pCAR1, carbazole, *Pseudomonas*

(原稿受付 2008年10月30日/原稿受理 2008年11月4日)

1. はじめに

プラスミドは微生物の環境適応, 進化の過程で重要な役割を果たしていると考えられているが^{1,17)}, 接合伝達性のプラスミドが多様な宿主の間を移動する中でそれぞれの宿主と相互作用しながら宿主に形質を付与する仕組みにはまだ不明な点が多く残されている。

著者らの研究グループでは, カルバゾール資化菌 *Pseudomonas resinovorans* CA10 株¹¹⁾ より単離した分解プラスミド pCAR1¹⁰⁾ の解析を行ってきた。カルバゾール(構造式・分解経路は図4を参照のこと)はダイオキシンの構造類似体であり, 毒性・変異原性を有する難分解性化合物である。pCAR1の全塩基配列(200,231 bp)は既に決定されており^{5,16)}, カルバゾール分解に関わる遺伝子群(図4)については, 各遺伝子産物の活性やそれらの転写調節機構が詳細に解析されている⁹⁾。また, 不和合性(Inc) P-7群に属し, 自己伝達性を有する(少なくとも *Pseudomonas* 属と *Stenotrophomonas* 属に接合伝達可能である)ことも明らかになっている^{13,14)}。

本研究では, 複数の pCAR1 保持株のカルバゾール分解能やプラスミド安定性を比較することで, プラスミド上にコードされた形質が, 宿主が変化したときにどのように変化するのかを解析することを目的とした。

2. pCAR1 を保持する 3 種の *Pseudomonas* 属細菌の生育比較

ゲノム配列既知の *Pseudomonas* 属細菌である, *P. putida* KT2440 株⁸⁾, *P. aeruginosa* PAO1 株¹⁵⁾, *P. fluorescens* Pf0-1 株²⁾ にそれぞれ接合実験によって pCAR1 を保持させた (Pf0-1 株は選択マーカーとしてカナマイシン耐性遺伝子を染色体に組み込んだため, 以降 Pf0-1Km 株と表記する)。これら 3 種の pCAR1 保持株を, コハ

ク酸とカルバゾール (0.1%, w/v) をそれぞれ唯一の炭素源とする無機液体培地で培養し生育曲線を作製した(図1)。コハク酸培養では 3 株の生育に大きな差は見られなかったが, カルバゾール培養では Pf0-1Km (pCAR1) 株の生育に著しい遅れが見られた。この原因として, (1) pCAR1 そのものまたはカルバゾール分解遺伝子群が安定に保持されずに脱落してしまっている可能性, (2) 分解遺伝子群は保持されていても, それらが正常に発現していない可能性が考えられた。以降, これらの可能性をひとつずつ検証した結果を示す。

3. コハク酸培養・カルバゾール培養における pCAR1 の安定性解析

まず pCAR1 及び分解遺伝子群が安定に保持されているかを調べるため, 3 種の pCAR1 保持株それぞれについてコハク酸培養及びカルバゾール培養中に経時的なサンプリングを行い, 各時点 100 コロニーをコロニーハイブリダイゼーションに供して pCAR1 上の遺伝子の有無を調べた。プローブとしては, プラスミドの複製に必要な *repA* 遺伝子¹⁴⁾ とカルバゾールの初発酸化に必要な *carAa* 遺伝子を使用した。同時に, これら 100 コロニーのカルバゾール分解能をクリアゾーン形成を指標に調べた。宿主・炭素源に関わらず, *repA* はすべてのコロニーに保持されていたことから, pCAR1 そのものは今回用いた宿主・培養条件で極めて安定に保持されることがわかった(染色体外遺伝因子として保持されて細胞内からなくなるといふ意味。遺伝子構造が変化しないという意味ではない)。一方, KT2440 (pCAR1) 株・PAO1 (pCAR1) 株では炭素源によらず, Pf0-1Km (pCAR1) 株ではコハク酸培養時に, いずれの経時点でも 96% 以上のコロニーが *carAa* 遺伝子及びカルバゾール分解能を保持していたが, カルバゾール培養時の Pf0-1Km

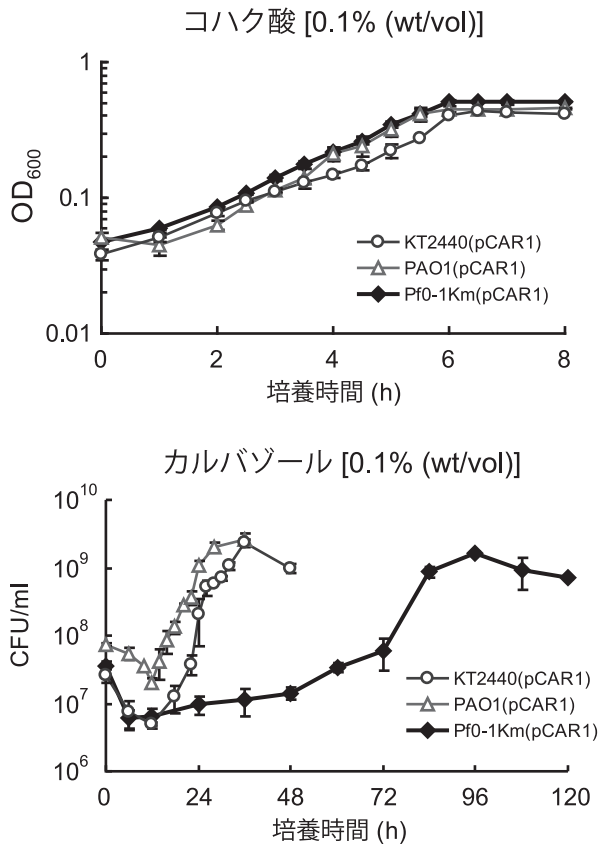


図1. コハク酸培養（上）とカルバゾール培養（下）における3種のpCAR1保持株の生育曲線。コハク酸とカルバゾールをそれぞれ唯一の炭素源とする無機液体培地で培養し、OD₆₀₀またはCFU/mlを経時的に測定した。独立した3回の実験の平均値を、標準誤差とともに示す。

(pCAR1)株ではカルバゾール非分解株(Δ株)・弱分解株(d株)が培養中期に出現し次第に優先化していくことがわかった(図2)。pCAR1上の複数の領域のPCRとシーケンス解析によって、これらの株の保持するpCAR1では挿入配列(IS)間の相同性組換えによってカルバゾール分解遺伝子群やその転写制御因子の遺伝子が失われていることが明らかになった(図3)。Δ株はカルバゾール分解遺伝子群全体を欠失しているために分解能を完全に失っている株、d株は分解遺伝子群の転写制御因子をコードする*antR*遺伝子を欠失しているために分解遺伝子群の転写誘導がかからず、構成的プロモーターからの弱い転写しか起こらないために分解力がきわめて弱くなっている株であった。カルバゾールを唯一の炭素源とする培地では、カルバゾールを分解できる株のほうが有利に生育できるはずだが、なぜこれらのカルバゾール非分解株・弱分解株が優先化するのか興味を持たれた。

4. カルバゾール分解に必要な分解遺伝子群の転写解析

そこで、2番目の可能性である、*P. fluorescens* Pf0-1株の菌体内ではpCAR1上の分解遺伝子群が発現しているのかどうかを調べるため、qRT-PCRを用いた転写解

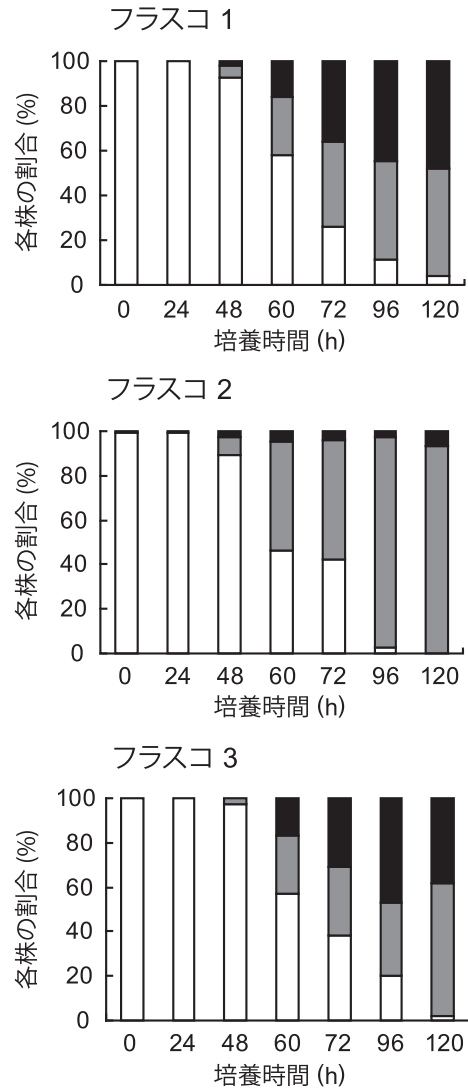


図2. カルバゾール培養におけるPf0-1Km(pCAR1)株の多様化。カルバゾールを唯一の炭素源とする無機液体培地で*P. fluorescens* Pf0-1Km(pCAR1)株(wild type, 図中白色)を培養した場合に、カルバゾール分解能を失った株(Δ株, 図中黒色)や分解能が弱くなった株(d株, 図中灰色)が培養中期に出現し、次第に優先化していく。

析を行った。カルバゾールの分解経路において、カルバゾールはpCAR1上にコードされた酵素によって、TCAサイクルの中間体とカテコールまで分解される(図4上段)。これらの酵素をコードする遺伝子はpCAR1上で2つのオペロンを構成しており、両オペロンは中間代謝産物であるアントラニル酸によって協調的に誘導されることが以前に明らかになっていた^{7,18)}(図4下段)。そこで、カルバゾール、アントラニル酸、コハク酸(図4上段で、丸で囲んだ)をそれぞれ誘導基質として培養したPf0-1Km(pCAR1)株からtotal RNAを抽出し、qRT-PCRによって両オペロンの転写量を定量した。前項の結果から、長時間培養した菌体ではpCAR1上の分解遺伝子群が欠失することがわかってきたため、培養時間は6時間(コハク酸のみ4時間)と短くした。両オペロンの転写量は、アントラニル酸、カルバゾールを基質としたときにはコハク酸を基質としたときの約10~40倍に増加し

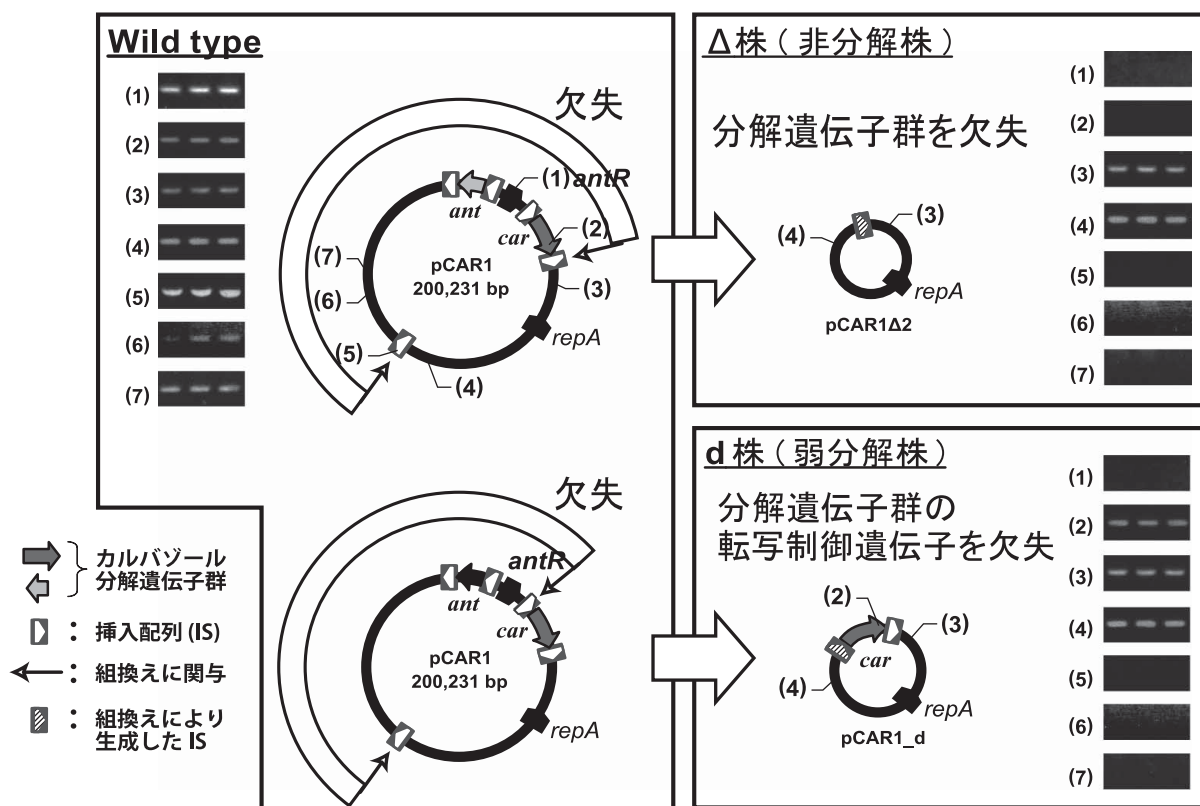


図3. カルバゾール培養における Pf0-1Km (pCAR1) 株内での pCAR1 構造変化。PCR で増幅した領域の位置をカッコ付きの数字で示す。組換えによって生成した挿入配列を挟むようにプライマーを設計し、得られた PCR 産物の塩基配列を決定することで、組換え位置を確認した。

ており、転写誘導が認められた (図4 下段)。この結果から、カルバゾール培養液中の Pf0-1Km (pCAR1) 株内で pCAR1 上の分解遺伝子は正常に発現しており、カルバゾールからカテコールまでは分解が進むことがわかった。

次に、カテコール以降の分解経路が正常に機能しているか調べるため、宿主染色体上のカテコール分解 (*cat*) 遺伝子群についても同様に転写解析を行った (図5)。*cat* 遺伝子群は *Pseudomonas* 属細菌をはじめとする土壌細菌に広く分布しており、酵素反応や転写制御機構について詳細な解析が行われている遺伝子群である³⁾。KT2440 (pCAR1) 株と PAO1 (pCAR1) 株ではカルバゾール培養時に *cat* オペロンの転写誘導がかかることが既に示されており⁶⁾ (Shintani et al., unpublished), これは既に報告³⁾ のあるように、カテコールの分解産物である *cis,cis*-ムコン酸によって転写制御因子 CatR が誘導されるためと考えられる (図5 中段)。一方、Pf0-1Km (pCAR1) 株の qRT-PCR の結果、2 コピーの *cat* 遺伝子群は安息香酸を誘導基質としたときには転写誘導が認められたが、カルバゾールを誘導基質に用いたときにはいずれもコハク酸を基質とした場合と同程度の転写量しかなく、転写誘導は認められなかった (図5 下段)。2 コピーの *cat* 遺伝子群はいずれも安息香酸分解 (*ben*) オペロンの一部として存在しているため、安息香酸によって誘導される転写制御因子 BenR の制御を受けると考えられる。したがって、Pf0-1Km (pCAR1) 株のカルバゾール培養時には、pCAR1 上にコードされた分解遺伝子群に

よって生成したカテコールは、宿主染色体上の分解遺伝子群が十分に発現しないために、細胞内に蓄積することが示唆された。

このことを裏付ける現象として、Pf0-1Km (pCAR1) 株ではカルバゾール培養中に菌体の色が次第に黒くなる様子が観察される。これは他の2株では観察されない現象である。Pf0-1Km 株のカテコール分解能が KT2440 株や PAO1 株のものより弱いことを示すため、カテコール (0.01%, w/v) を唯一の炭素源とした無機液体培地に3株をそれぞれ植菌し、培養後の菌数変化を調べた。初期植菌量を $5-8 \times 10^5$ CFU/ml としたときの1日培養後の菌数は、KT2440 株と PAO1 株では 10^7-10^8 CFU/ml と生育が見られたのに対し Pf0-1Km 株では 10^3 CFU/ml まで減少していた。カテコールは細胞内で活性酸素種を生成し、DNA やタンパク質などの生体分子にダメージを与えることで、細胞の生育を阻害することが知られており^{4,12)}、この条件で Pf0-1Km 株だけがカテコールによる生育阻害を受けることが示された。

5. ま と め

以上の結果をまとめると、完全な pCAR1 を保持する Pf0-1Km 株 (wild type) ではカルバゾール培養時に、代謝中間産物であるカテコールが菌体内に蓄積する。一方、相同性組換えが起こってカルバゾール分解遺伝子群 (またはその転写制御因子) を失った pCAR1 を保持する株 (Δ株・d株) ではカテコールの蓄積は起こらず、wild

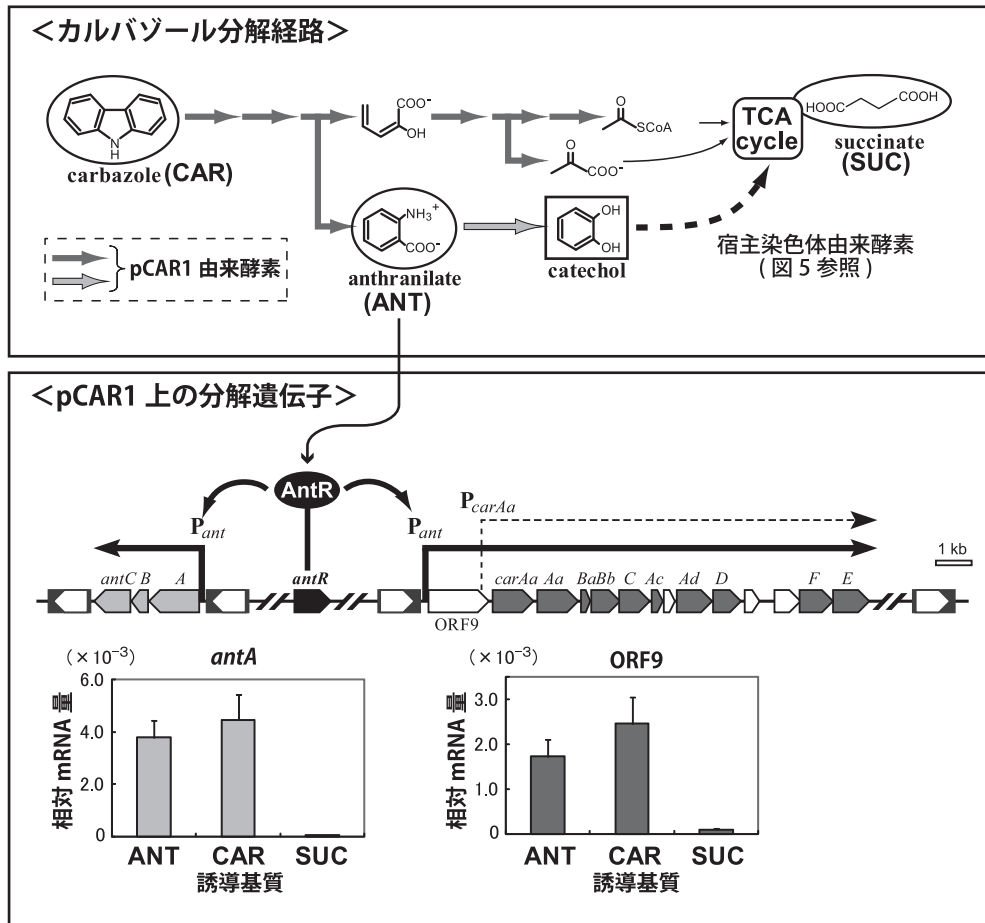


図4. カルバゾール分解経路 (上段) と pCAR1 上の分解遺伝子の転写解析 (下段)。

(上段) カルバゾール分解経路において、カルバゾールは pCAR1 上にコードされた酵素 (図中 2 種類の灰色矢印) によって TCA サイクルの中間体とカテコール (図中四角形で囲んだ) まで分解される。qRT-PCR において誘導基質として用いた化合物を丸で囲んだ。(下段) pCAR1 上でカルバゾール分解遺伝子は 2 つのオペロン (car オペロン, ant オペロン) を構成している。両オペロンの上流にはアントラニル酸によって誘導される AntR が結合するプロモーター P_{ant} がある。car オペロン上流には構成的プロモーター P_{carAa} も存在する。qRT-PCR により、各オペロン内の遺伝子の転写量を測定した。各転写量は 16S rRNA 量で割った値として示した。横軸の誘導基質名は、ANT, アントラニル酸; CAR, カルバゾール; SUC, コハク酸をそれぞれ表す。

type の死骸やその分解産物を利用できると考えられる。したがって、カルバゾールが唯一の炭素源であるにも関わらず、カルバゾール分解能を失った (または極めて弱くなった) Δ株・d 株のほうが、分解能を持つ wild type よりも生育が有利になり培養液中で優先化する、すなわち相同性組換えを起こした pCAR1 がプラスミド集団中で優先化すると考えられる。宿主のゲノム構造に起因する代謝能力の差によって、特定の宿主でプラスミドの遺伝子構造変化 (進化) が誘発されるという結果は、宿主がプラスミドに与える影響の大きさを示すものである。

分解能を失った (または極めて弱くなった) Δ株・d 株が優先化するものの、カルバゾール培養液中の Pf0-1Km (pCAR1) 株は、定常期には KT2440 (pCAR1) 株や PAO1 (pCAR1) 株と同程度の菌数に達する (図 1)。これは集団としてのカルバゾール分解能は失われていないことを意味する。Δ株・d 株の割合が増加するに伴って、宿主染色体由来のカテコール分解酵素量の pCAR1 由来のカルバゾール分解酵素量に対する割合が増加し、上流経路と下流経路のバランスがとれてくると考えられることから、プラスミド側の視点に立てば、この現象は

pCAR1 が宿主のカテコール代謝能力に適応して、自らの構造を変化させたものと捉えることもできる。実環境中では、pCAR1 のような接合伝達性の分解プラスミドは様々な代謝能力を持つ宿主間を移ってゆくと考えられるが、そのような場での分解プラスミドのふるまいを理解するには、菌群全体を一つの代謝システムと捉える視点が必要となってくるであろう。

謝 辞

本研究は生研センター基礎研究推進事業として行われた。

文 献

- 1) Bingle, L.E., and C.M. Thomas. 2001. Regulatory circuits for plasmid survival. *Curr. Opin. Microbiol.* 4: 194–200.
- 2) Deflaun, M.F., A.S. Tanzer, A.L. McAteer, B. Marshall, and S.B. Levy. 1990. Development of an adhesion assay and characterization of an adhesion-deficient mutant of *Pseudomonas fluorescens*. *Appl. Environ. Microbiol.* 56: 112–119.

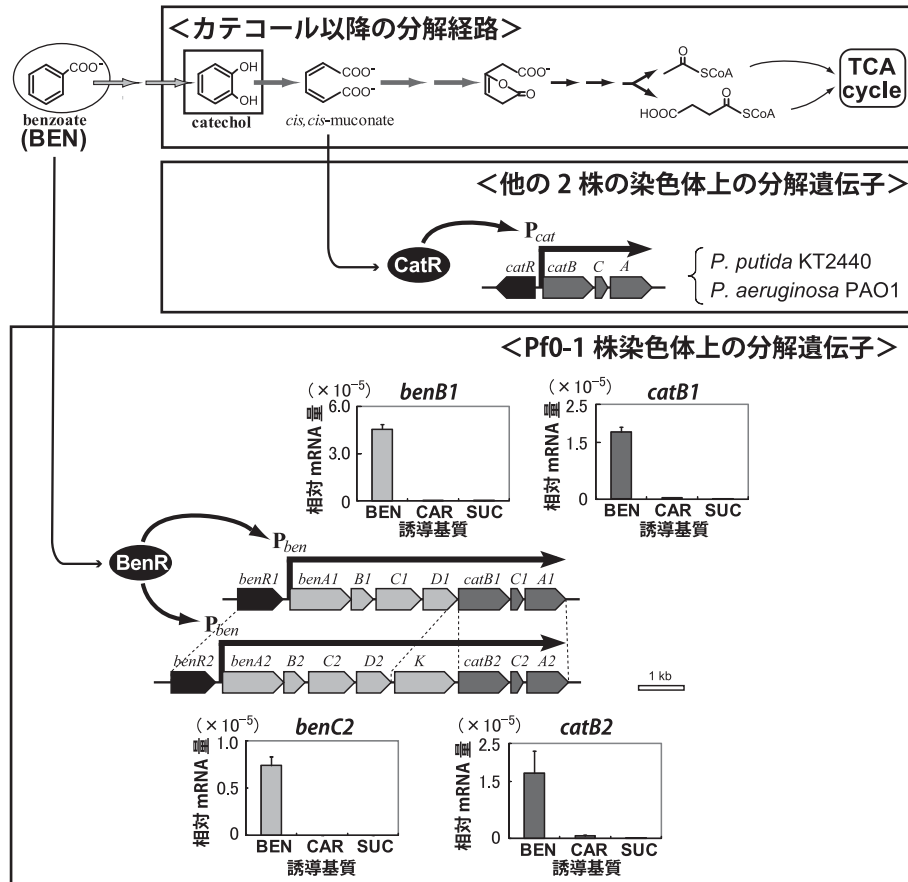


図5. カテコール分解経路（上段）と宿主染色体上の分解遺伝子の転写解析（中段・下段）。

（上段）カテコール分解経路。安息香酸（図中丸で囲んだ）からカテコール（図中四角形で囲んだ）までの経路も併せて示す。（中段）KT2440株・PAO1株では、カテコール分解産物である *cis,cis*-ムコン酸が生成すると転写制御因子 CatR が、*cat* 遺伝子群の転写を誘導する。（下段）Pf0-1株の2コピーの *cat* 遺伝子群は安息香酸分解 (*ben*) オペロンの一部として存在しているため、安息香酸によって誘導される転写制御因子 BenR の制御を受ける。qRT-PCRにより、*ben* 遺伝子群・*cat* 遺伝子群の遺伝子の転写量を測定した。各転写量は16S rRNA量で割った値として示した。横軸の誘導基質名は、BEN、安息香酸；CAR、カルバゾール；SUC、コハク酸をそれぞれ表す。

- Harwood, C.S., and R.E. Parales. 1996. The β -ketoacid pathway and the biology of self-identity. *Annu. Rev. Microbiol.* 50: 553–590.
- Hellmer, L., and G. Bolcsfoldi. 1992. An evaluation of the *E. coli* K-12 *uvrB/recA* DNA repair host-mediated assay. I. In vitro sensitivity of the bacteria to 61 compounds. *Mutat. Res.* 272: 145–160.
- Maeda, K., H. Nojiri, M. Shintani, T. Yoshida, H. Habe, and T. Omori. 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: 21–33.
- Miyakoshi, M., M. Shintani, T. Terabayashi, S. Kai, H. Yamane, and H. Nojiri. 2007. Transcriptome analysis of *Pseudomonas putida* KT2440 harboring the completely sequenced IncP-7 plasmid pCAR1. *J. Bacteriol.* 189: 6849–6860.
- Miyakoshi, M., M. Urata, H. Habe, T. Omori, H. Yamane, and H. Nojiri. 2006. Differentiation of carbazole catabolic operons by replacement of the regulated promoter via transposition of an insertion sequence. *J. Biol. Chem.* 281: 8450–8457.
- Nelson, K.E., C. Weinl, I.T. Paulsen, R.J. Dodson, H. Hilbert, V.A. Martins dos Santos, D.E. Fouts, S.R. Gill, M. Pop, M. Holmes, L. Brinkac, M. Beanan, R.T. DeBoy, S. Daugherty, J. Kolonay, R. Madupu, W. Nelson, O. White, J. Peterson, H. Khouri, I. Hance, P. Chris Lee, E. Holtzapple, D. Scanlan, K. Tran, A. Moazzez, T. Utterback, M. Rizzo, K. Lee, D. Kosack, D. Moestl, H. Wedler, J. Lauber, D. Stjepandic, J. Hoheisel, M. Straetz, S. Heim, C. Kiewitz, J.A. Eisen, K.N. Timmis, A. Dusterhoft, B. Tummeler, and C.M. Fraser. 2002. Complete genome sequence and comparative analysis of the metabolically versatile *Pseudomonas putida* KT2440. *Environ. Microbiol.* 4: 799–808.
- Nojiri, H., and T. Omori. 2007. Carbazole metabolism by pseudomonads, pp. 107–145. In J.L. Ramos and A. Filloux (ed.), *Pseudomonas*, vol. 5. Springer, New York, USA.
- Nojiri, H., H. Sekiguchi, K. Maeda, M. Urata, S. Nakai, T. Yoshida, H. Habe, and T. Omori. 2001. Genetic characterization and evolutionary implications of a *car* gene cluster in the carbazole degrader *Pseudomonas* sp. strain CA10. *J. Bacteriol.* 183: 3663–3679.
- Ouchiya, N., Y. Zhang, T. Omori, and T. Kodama. 1993. Biodegradation of Carbazole by *Pseudomonas* spp. CA06 and CA10. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 57: 455–460.
- Schweigert, N., A.J. Zehnder, and R.I. Eggen. 2001. Chemical properties of catechols and their molecular modes of toxic action in cells, from microorganisms to mammals. *Environ. Microbiol.* 3: 81–91.
- Shintani, M., N. Fukushima, M. Tezuka, H. Yamane, and H. Nojiri. 2008. Conjugative transfer of the IncP-7 carbazole degradative plasmid, pCAR1, in river water samples. *Biotechnol. Lett.* 30: 117–122.

- 14) Shintani, M., H. Yano, H. Habe, T. Omori, H. Yamane, M. Tsuda, and H. Nojiri. 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: 3206–3216.
- 15) Stover, C.K., X.Q. Pham, A.L. Erwin, S.D. Mizoguchi, P. Warrener, M.J. Hickey, F.S. Brinkman, W.O. Hufnagle, D.J. Kowalik, M. Lagrou, R.L. Garber, L. Goltry, E. Tolentino, S. Westbrook-Wadman, Y. Yuan, L.L. Brody, S.N. Coulter, K.R. Folger, A. Kas, K. Larbig, R. Lim, K. Smith, D. Spencer, G.K. Wong, Z. Wu, I.T. Paulsen, J. Reizer, M.H. Saier, R.E. Hancock, S. Lory, and M.V. Olson. 2000. Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, an opportunistic pathogen. *Nature* 406: 959–964.
- 16) Takahashi, Y., M. Shintani, H. Yamane, and H. Nojiri. Complete nucleotide sequence of pCAR2: pCAR2 and pCAR1 were structurally same IncP-7 carbazole degradative plasmids. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* inpress.
- 17) Thomas, C.M., and K.M. Nielsen. 2005. Mechanisms of, and barriers to, horizontal gene transfer between bacteria. *Nat. Rev. Microbiol.* 3: 711–721.
- 18) Urata, M., M. Miyakoshi, S. Kai, K. Maeda, H. Habe, T. Omori, H. Yamane, and H. Nojiri. 2004. Transcriptional regulation of the *ant* operon, encoding two-component anthranilate 1,2-dioxygenase, on the carbazole-degradative plasmid pCAR1 of *Pseudomonas resinovorans* strain CA10. *J. Bacteriol.* 186: 6815–6823.