

# 博士論文

論文題目 プラスミドの接合伝達に関与する新規因子の探索

氏名 松井 一泰

# プラスミドの接合伝達に関与する新規因子の探索

応用生命工学 専攻  
平成 22 年度博士課程 進学  
氏 名 松井 一泰  
指導教員名 野尻 秀昭

## 目次

### 第 1 章 序論

1-1. はじめに	1
1-2. プラスミドの接合伝達機構	4
1-3. プラスミドの分類	14
1-4. プラスミドの環境中における挙動解析	17
1-5. プラスミドの接合伝達と核様体タンパク質 (NAPs)	24
1-6. プラスミドの接合伝達と CRISPR/Cas システム	25
1-7. 自己伝達性プラスミド pCAR1	28
1-8. IncP-7 群プラスミドの接合伝達関連遺伝子と接合伝達	30
1-9. pCAR1 上にコードされた核様体タンパク質	31
1-10. 環境中における pCAR1 の接合伝達と宿主域	32
1-11. 本研究の目的と内容	33

### 第 2 章 IncP-7 群カルバゾール分解プラスミド pCAR1 の

#### 実環境中における宿主域の解析

2-1. 緒言	34
2-2. 実験材料及び方法	35
2-2-1. 使用した菌株, プラスミド, 培地, 及び培養条件	35
2-2-2. 環境サンプルからの環境細菌の抽出	35
2-2-3. 環境細菌画分の濃縮	35
2-2-4. 環境細菌画分中の菌体数測定及び供与菌の接種	38
2-2-5. 接合伝達能の確認	38
2-2-6. 接合伝達体の検出	38
2-2-7. 接合伝達体であることの確認	39
2-2-8. 濃縮した細菌画分からの鉱物等の粒子の除去	39
2-2-9. Histodenz 混入による接合伝達への影響の調査	41
2-2-10. 濃縮環境細菌画分中の菌体数測定及び供与菌の接種	41
2-2-11. 接合伝達体の検出・分取系の構築	41
2-2-12. 接合伝達体の検出・分取	42

2-2-13. 接合伝達体の解析の前処理	42
2-2-14. 接合伝達体の解析	43
2-3. 結果	44
2-3-1. 環境細菌画分中の菌体数測定	44
2-3-2. 接合伝達能の確認	44
2-3-3. 接合伝達体候補株の検出	44
2-3-4. 接合伝達体であることの確認	48
2-3-5. Histodenz 混入による接合伝達への影響の調査	51
2-3-6. 濃縮細菌画分中の菌体数測定	51
2-3-7. 接合伝達体の検出及び分取系の構築	51
2-3-8. 接合伝達体の検出・分取	54
2-3-9. FACS にて分取した接合伝達体候補株の プレート塗布による確認	57
2-3-10. マイクロマニピュレータを用いた接合伝達体の確認	65
2-4. 考察	66

### 第 3 章 $\text{Ca}^{2+}$ と $\text{Mg}^{2+}$ が pCAR1 の接合伝達に及ぼす影響の評価

3-1. 諸言	70
3-2. 材料と方法	71
3-2-1. 使用した菌株, プラスミド, 培地, 及び培養条件	71
3-2-2. $\text{Ca}^{2+}$ , $\text{Mg}^{2+}$ の有無が各種プラスミドの接合伝達頻度に 与える影響の定量的評価	73
3-2-3. $\text{Ca}^{2+}$ , $\text{Mg}^{2+}$ の濃度が pCAR1 の接合伝達頻度に与える 影響の定量的評価	73
3-3. 結果	75
3-3-1. $\text{Ca}^{2+}$ , $\text{Mg}^{2+}$ の有無が各種プラスミドの接合伝達頻度に 与える影響の定量的評価	75
3-3-3. $\text{Ca}^{2+}$ , $\text{Mg}^{2+}$ の濃度が pCAR1 の接合伝達頻度に与える 影響の定量的評価	76
3-4. 考察	81

### 第 4 章 $\text{Ca}^{2+}$ , $\text{Mg}^{2+}$ の有無により転写変動する遺伝子の探索

4-1. 諸言	83
4-2. 材料と方法	84

4-2-1. 使用した菌株, プラスミド, 培地, 及び培養条件	84
4-2-2. マイクロアレイに供するサンプルの作成および 接合伝達頻度の評価	84
4-2-3. マイクロアレイのサンプル調整	86
4-3. 結果	91
4-3-1. マイクロアレイに供したサンプルの 接合伝達頻度の確認	91
4-3-2. $\text{Ca}^{2+}$ と $\text{Mg}^{2+}$ の有無で転写変動する遺伝子の 網羅的抽出	92
4-4. 考察	94

## 第 5 章 NAPs 破壊が pCAR1 の接合伝達に及ぼす影響の評価

5-1. 諸言	106
5-2. 材料と方法	107
5-2-1. 使用した菌株, プラスミド, 培地, 及び培養条件	107
5-2-2. NAPs 破壊株の接合実験	109
5-3. 結果	110
5-3-1. NAPs 単独破壊株の接合伝達頻度	110
5-3-2. NAPs 二重破壊株の接合伝達頻度	110
5-3-3. プラスミド上に <i>pmr</i> を相補した NAPs 二重破壊株の接合伝達頻度	110
5-4. 考察	

## 第 6 章 総括と展望

## 参考文献

## 補章

## 謝辞

## 略語表

bp	base pares
CAR	carbazole
COG	Clusters of Orthologous Groups of Proteins
Gm	gentamicin
hr	hour(s)
H-NS	histone-like nucleoid structuring protein
HU	histone-like protein from Escherichia coli strain U93
Km	kanamycin
Min	minute(s)
MvaT	transcriptional activator of the mvaAB operon
NAPs	nucleoid-associated proteins
OD	optical density
ORF	open reading frame
PCR	polymerase chain reaction
Phu	plasmid-encoded HU-like protein
Pmr	plasmid-encoded MvaT-like regulator
Pnd	plasmid-encoded NdpA-like protein
Rif	Rifampicin
rpm	round per minute

## 論文の内容の要旨

応用生命工学 専攻

平成 22 年度博士課程 進学

氏 名 松井 一泰

指導教員名 野尻 秀昭

論文題目 プラスミドの接合伝達に関与する新規因子の探索

### 第1章 序論

プラスミドは様々な細菌間を接合伝達によって移動する可動性遺伝因子である。プラスミドは、薬剤耐性や病原性など種々な形質の原因遺伝子を伝播することで細菌の急速な進化・適応の原動力となるため、古くから研究がなされてきた。それによれば、プラスミドの接合伝達は、宿主の置かれた環境の何らかの因子（温度・栄養条件など）に応答して開始されるとされている。プラスミドの接合伝達頻度は、プラスミドの種類や、供与菌と受容菌の組合せ、接合時の環境条件などによって著しく変化する。例えば、腸チフス原因菌である *Salmonella enterica* serovar Typhi 由来の不和合性群 (Inc) IncHI 多剤耐性プラスミドでは、接合に必要な遺伝子の転写が低温下で誘導される接合伝達頻度が上昇する事が知られている。一方、IncF プラスミドは長く柔らかい性繊毛を持ち液体中で接合しやすく、IncP プラスミドは短く硬い性繊毛を持ち固体表面上で接合しやすいといったことが明らかにされている。しかし、環境条件により接合伝達頻度が変化する現象の大半で、その変化の理由は不明であり、接合伝達の成否を決める環境因子とその作用機構について知見は不足していると言って良い。

当研究室では、原油中の含窒素芳香族化合物カルバゾール(CAR) 分解菌 *Pseudomonas resinovorans* CA10 株が有する CAR 分解プラスミド pCAR1 の研究を行ってきた。これまでに、その全塩基配列を決定するとともに、IncP-7 群に属すること、主に *Pseudomonas* 属細菌を宿主とする接合伝達性プラスミドであることが示されてきた。また、モデル環境中での挙動解析の結果、接合伝達体の出現には  $\text{Ca}^{2+}$  と  $\text{Mg}^{2+}$  が必須なことが示された。同時に、供与菌・受容菌一種類ずつの接合実験と、複数の細菌が混在する環境下での接合実験では、接合伝達頻度や、その成否（受容菌域）すら変化してしまうことが明らかになった。以上の背景から、本研究では、プラスミドの接合伝達の成否を決める環

境因子とその作用機構を明らかにするために、pCAR1 の接合伝達に関与する新規因子の探索を試みた。

## 第2章 pCAR1 の実環境における宿主域の解析

これまでプラスミドの宿主域は、限定された種類の細菌を用いた試験管レベルでの解析を元に議論されてきた。しかし、環境中には未培養・難培養の菌が大量に存在し、人為的な培地で培養できる細菌は全体の 1% にも満たないことが知られている。すなわち、以前の宿主域についての情報が実環境での振る舞いを十分反映しているとは考え難い。そこで本章では、従来の寒天培地を用いた接合伝達体の検出方法の他に、培養を介さない接合伝達体の検出方法を導入し、IncP-7 群プラスミドの実環境中における“真の”宿主域の解析を試みた。pCAR1 の接合伝達を検出するために、*lac* 改変プロモーターの下流にレポーター遺伝子として赤色蛍光タンパク質 (RFP) 遺伝子、もしくは緑色蛍光タンパク質 (GFP) 遺伝子を挿入した pCAR1::*rfp*, pCAR1::*gfp* を用いた。さらに、この pCAR1 派生物の供与菌として、*lac<sup>+</sup>* を染色体上に挿入した供与菌を用いた。蛍光タンパク質遺伝子は供与菌内では発現せず菌体は蛍光を示さないが、pCAR1 を受け取った接合伝達体では *lac<sup>+</sup>* の抑制が外れレポーター遺伝子の発現が誘導されて菌体は蛍光を示す。この蛍光を検出することで、接合伝達体を検出した。まず、湖沼水や土壌から細菌を回収し、環境細菌とモデル供与菌との液体接合を行った。接合実験サンプルとしては、①環境 [湖沼水 ( $10^5 \sim 10^6$  cells/ml), 土壌 ( $10^5 \sim 10^7$  cells/ml)], ②供与菌 [*Pseudomonas putida* SM1443(pCAR1::*gfp*), *P. putida* SM1443(pCAR1::*rfp*), *Pseudomonas chlororaphis* IAM1511L(pCAR1::*rfp*), *P. resinovorans* CA10dm4L(pCAR1::*rfp*), 環境細菌の 1/10 量を接種], ③カルバゾール添加 (100 ppm) の有無、の 3 つの条件の全ての組み合わせを作製した。供与菌を接種後、経時的に 3 種類の寒天培地に塗布した。蛍光を目視で観察することで接合伝達体候補株 600 株以上を検出したが、遺伝子解析を行った 60 株のうち、供与菌が 25 株、供与菌でも接合伝達体でもないその他の細菌が 35 株であり、上記方法は雑多な細菌が存在する環境サンプル中での接合伝達の解析には不向きであると考えられた。

そこで、fluorescence activated cell sorting (FACS) を用いた接合伝達体の検出・分取系の構築を行った。密度勾配遠心により実環境サンプル中から細菌よりも密度の大きい鉍物等の粒子を除去し、細菌画分とした。環境細菌と供与菌との液体接合実験後の細菌画分を FACS にて測定し、ゲート内に検出された粒子を分取した。6 回の試行により、湖沼水、土壌サンプルからそれぞれ合計で約  $10^3$ , 約  $10^6$  個の蛍光を示す粒子を分取した。培養せずに 1 細胞を解析することは研究開始当初困難であったため、蛍光を示す粒子を FACS で多数分取後、プレートに塗布し、生育した菌株の遺伝子解析を行った。その結果、200 株以上の菌株が生育し、解析が終了した 25 株中、接合伝達体は 11 株であった。RFLP 解析から、*Pseudomonas* 属細菌とは異なる属種の細菌が含まれることが示唆された。そこで 16S rRNA の塩基配列を解読したところ、*Bacteroidetes* の *Flectobacillus* 属細菌、*Flexibacter* 属細菌、 $\alpha$ -*Proteobacteria* の *Brevundimonas* 属細菌、 $\beta$ -*Proteobacteria* の *Delftia* 属細菌、*Cupriavidus* 属細菌と高い相同性を示した。IncP-7 群プラスミドは主に  $\gamma$ -*Proteobacteria* の *Pseudomonas* 属細菌を宿主とすると考えられてきたが、本研究により  $\gamma$ -*Proteobacteria* 以外にも接合伝達する可能性が示唆された。

## 第3章 $\text{Ca}^{2+}$ と $\text{Mg}^{2+}$ が pCAR1 の接合伝達に及ぼす影響の評価

過去に行われた pCAR1 のモデル環境中での挙動解析の結果、pCAR1 の接合伝達には環境中に  $\text{Ca}^{2+}$  もしくは  $\text{Mg}^{2+}$  が存在する必要があることが示された。そこで、環境中の  $\text{Ca}^{2+}$  と  $\text{Mg}^{2+}$  の有無が他のプラスミドの接合伝達にも影響を与えるか調べた。pCAR1 (IncP-7,  $\text{MOB}_{\text{HII}}$ ,  $\text{MPF}_{\text{I}}$ ) の他に、対照として pB10 (IncP-1 $\beta$ ,  $\text{MOB}_{\text{PII}}$ ,  $\text{MPF}_{\text{I}}$ )、R388 (IncW,  $\text{MOB}_{\text{FII}}$ ,  $\text{MPF}_{\text{I}}$ ) を用いて接合実験を行った。その結果、pCAR1 は  $\text{Ca}^{2+}$  と  $\text{Mg}^{2+}$  を各 400  $\mu\text{M}$  ずつ添加した培地と比較して、無添加培地中では接合伝達



頻度（接合伝達体の CFU／供与菌の CFU）が  $1.2 \times 10^{-4}$  から検出限界以下（ $3.5 \times 10^{-7}$ ）へと顕著に減少したのに対し、pB10, R388 では、接合伝達頻度への顕著な影響は見られなかった。このことから、pCAR1 は環境中の  $\text{Ca}^{2+}$  と  $\text{Mg}^{2+}$  の有無によって接合伝達頻度に影響を受けやすいプラスミドであることが明らかになった。

次に、 $\text{Ca}^{2+}$  と  $\text{Mg}^{2+}$  の濃度が pCAR1 の接合伝達頻度に与える影響を定量的に評価した。4 種類のゲノム既知の供与菌（*P. putida* SM1443 株、*P. resinovorans* CA10dm4L 株、*P. fluorescens* Pf0-1L 株、*P. chlororaphis* IAM1511L 株）と 5 種類のゲノム既知の受容菌（*P. putida* KT2440RG 株、*P. resinovorans* CA10dm4RG 株、*P. fluorescens* Pf0-1RG 株、*P. chlororaphis* IAM1511RG 株、*P. putida* IAM1236RG 株）を用い、 $\text{Ca}^{2+}$  と  $\text{Mg}^{2+}$  の濃度をそれぞれ 0, 0.4, 4, 40, 400  $\mu\text{M}$  と変化させ、各濃度における接合伝達頻度を測定した。その結果、多くで  $\text{Ca}^{2+}$  と  $\text{Mg}^{2+}$  の濃度依存的な接合伝達頻度の上昇が観察された一方で、*P. chlororaphis* を供与菌と受容菌のいずれかとして用いた場合、*P. putida* IAM1236RG 株を受容菌として用いた場合に、いずれも接合伝達頻度が低く、 $\text{Ca}^{2+}$  と  $\text{Mg}^{2+}$  の影響が見られないことが明らかになった。このことから、同一のプラスミドであっても、供与菌や受容菌によって、 $\text{Ca}^{2+}$  と  $\text{Mg}^{2+}$  の影響に違いがあることが示された。

#### 第 4 章 $\text{Ca}^{2+}$ , $\text{Mg}^{2+}$ の有無により転写変動する遺伝子の探索

環境中の  $\text{Ca}^{2+}$  と  $\text{Mg}^{2+}$  の有無が pCAR1 の接合伝達に与える影響を網羅的に解析する為に、Pf0-1L(pCAR1::rfp) 株を供与菌、KT2440 株を受容菌として接合実験を行い、 $\text{Ca}^{2+}$  及び  $\text{Mg}^{2+}$  添加・非添加、供与菌及び受容菌単独・混合時における染色体とプラスミドのトランスクリプトームデータを取得した。

##### ① pCAR1 上の遺伝子の転写変動

供与菌単独では、 $\text{Ca}^{2+}$  と  $\text{Mg}^{2+}$  の有無によって転写変動した pCAR1 上の遺伝子 (fold change  $\geq 2$ ) は選抜されなかったが、受容菌と混合した際には、 $\text{Ca}^{2+}$  ,  $\text{Mg}^{2+}$  添加により ORF145a と ORF145 の 2 個の遺伝子が 3 倍以上転写誘導された。これらの遺伝子の機能は明らかになっていないが、ORF145 は pCAR1 の接合伝達に必須ではないものの、破壊することで接合伝達頻度が減少することが明らかになっている。また、受容菌と混合することで、 $\text{Ca}^{2+}$  ,  $\text{Mg}^{2+}$  添加時には 24 個、非添加時には 17 個の pCAR1 上の遺伝子が転写変動しており、このうち 13 個の遺伝子が共通していた。

##### ② 供与菌染色体上の遺伝子の転写変動

受容菌混合時において、供与菌染色体上の遺伝子は  $\text{Ca}^{2+}$  ,  $\text{Mg}^{2+}$  添加により 25 個の遺伝子が転写誘導され、36 個の遺伝子が転写抑制された。この中には脂質輸送・代謝関連遺伝子が 10 個と多く含まれていた。

##### ③ 受容菌染色体上の遺伝子の転写変動

受容菌単独では  $\text{Ca}^{2+}$  と  $\text{Mg}^{2+}$  の有無によって転写変動した受容菌染色体上の遺伝子は 530 個、供与菌混合時には 122 個であり、このうち共通して 31 個が転写誘導され、3 個が転写抑制されていた。共通して転写誘導された遺伝子のうち、無機イオンの輸送に関わる遺伝子が 6 個含まれていた。

#### 第 5 章 NAPs 破壊が pCAR1 の接合伝達に及ぼす影響の評価

pCAR1 上には 3 種類の核様体タンパク質 (NAPs, nucleoid-associated proteins) がコードされている。他のプラスミドで、プラスミド上にコードされる NAPs が接合伝達の制御に関わることが知られており、pCAR1 もこれら 3 種類の NAPs が接合伝達に関わる可能性が考えられる。そこで本章では、*phu*, *pmr*, *pnd* を単独、あるいは複数破壊した際の接合伝達頻度や接合関連遺伝子の転写変動を調べた。

コントロールとして用いた NAPs を破壊していない pCAR1pmrHis ( $9.1 \times 10^{-4} \sim 1.1 \times 10^{-3}$ ) と比較して、pCAR1 $\Delta$ phu ( $2.0 \times 10^{-5}$ ) において接合伝達頻度が 1/10 程に低下したものの、他の単独破壊株

では大きな変化は見られなかった。これに対し、NAPs を二重破壊した  $pCAR1\Delta phu\Delta pmr$ 、及び  $pCAR1\Delta pmr\Delta pnd$  の接合伝達頻度は検出限界以下(それぞれ $<4.0\times 10^{-7}$ ,  $<4.1\times 10^{-7}$ )と大きく減少した。また、この接合伝達頻度の減少は、 $pCAR1$  上に  $pmr$  を相補しても回復しなかった(それぞれ $<6.7\times 10^{-7}$ ,  $<2.2\times 10^{-6}$ )。コハク酸培養時の NAPs 遺伝子単独破壊株、二重破壊株のトランスクリプトーム解析では、 $pCAR1$  上の多くの接合関連遺伝子の転写量が  $pCAR1\Delta pmr$ 、 $pCAR1\Delta phu\Delta pmr$ 、 $pCAR1\Delta pmr\Delta pnd$  のいずれの場合においても増加しており、各破壊株における接合伝達頻度の評価とは合致しないものであった。今後は、相補した  $pmr$  の転写量の確認を行うとともに、接合条件下でのトランスクリプトーム解析を行う必要があると考えられる。

## 第6章 総括と展望

本研究では、環境因子や遺伝因子がプラスミドの接合伝達にどのような影響を与えるかを定量的に解析した。 $pCAR1$  の接合伝達関連遺伝子の発現制御機構は全く解明されていないが、本研究で得られたトランスクリプトームを詳細に解析することで、発現制御機構の解明への糸口が得られると考えられる。今後、本研究と同様に、様々なプラスミドや宿主を用いて環境変化によって接合伝達頻度がどのように変わっていくかを調べ、その原因をトランスクリプトームレベルで解析することで、環境中でのプラスミドの挙動をより理解できると期待される。

# 第 1 章 序論

## 1. はじめに

微生物，特に細菌細胞において遺伝子の伝搬が生じることは古くから知られているが，最近，110 種の細菌のゲノムデータベースから，細菌が有する新しい遺伝子の 88.98%は水平伝搬によって獲得されており，細菌間の遺伝子の水平伝搬は従来考えられているよりも頻繁に生じているという報告がなされた(1)．微生物における遺伝子の伝搬は可動性遺伝因子（mobile genetic elements; MGEs）とよばれる遺伝因子によって担われる．MGE は，プラスミド，バクテリオファージ，integrative conjugative elements (ICEs)，ゲノミックアイランド，トランスポゾン，インテグロンの 6 種類が知られている（Table 1-1）．

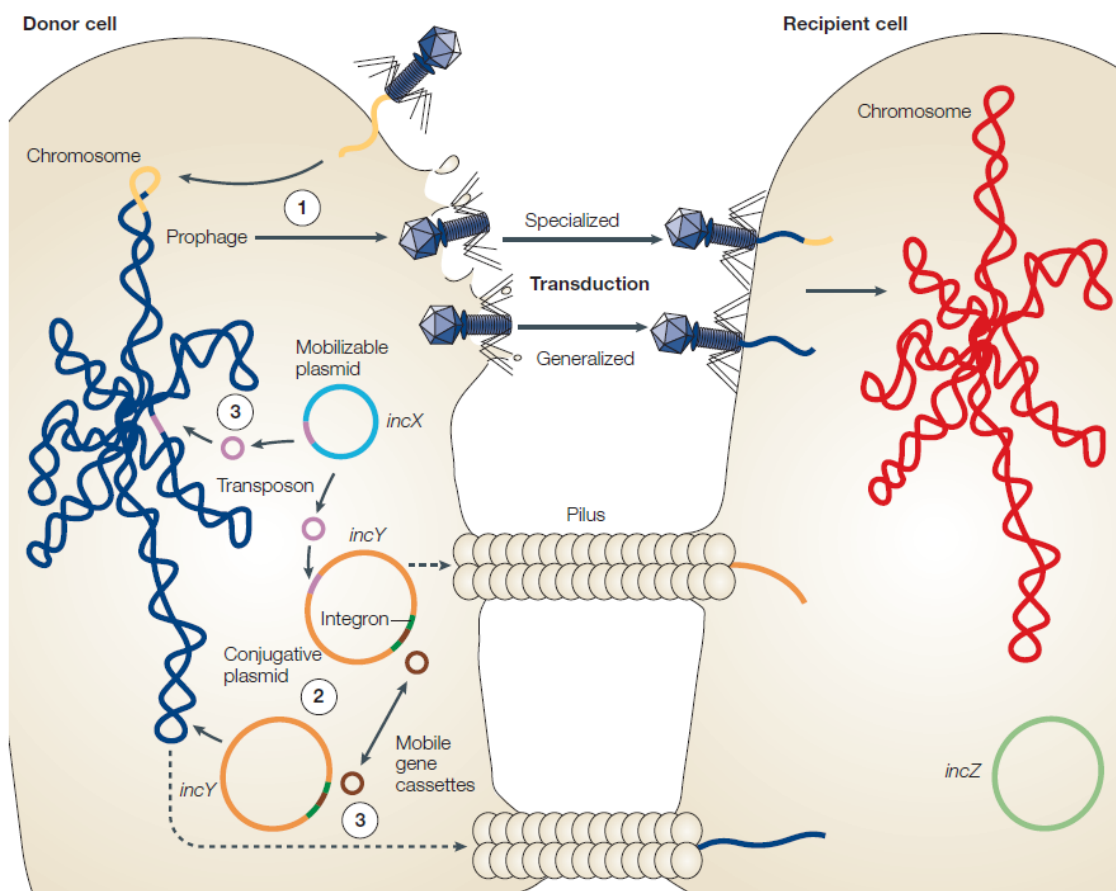
Table 1-1. 可動性遺伝因子

名称	特徴
プラスミド	環状，または線状の宿主染色体とは異なる複製単位であり，接合伝達という機構によって細菌間を移動可能な遺伝因子．
バクテリオファージ	原核細胞に感染するウィルス．感染時に自身の遺伝情報を宿主の染色体内に組み込むため，それに伴って遺伝子の伝搬が生じる．
Integrative and conjugative element (ICE)	通常細菌細胞内の染色体内に存在するが，染色体から切り出されて環状化し，プラスミドのように細菌間を移動可能な遺伝因子．
ゲノミックアイランド	宿主の染色体上に存在する DNA 領域で，その末端を繰り返し配列に挟まれており，染色体内に挿入されたり，切り出されたりすることが可能で，宿主がその進化の過程で獲得した外来の遺伝子領域．
トランスポゾン	細菌細胞内 DNA の異なる位置に移動（転移）可能な遺伝因子で，他の MGE 上に転移することで，トランスポゾン内の遺伝子が伝搬される．
インテグロン	インテグラゼという部位特異的な組換え酵素をコードし，その標的となる特定の配列と，プロモーター配列を周囲にもつ．他の遺伝子領域に存在する遺伝子カセットを切り出し，標的配列に挿入することで，新たな遺伝子を獲得する．インテグロンがさらに他の MGE に付随することで遺伝子の伝搬が生じる．

MGE による細菌間における遺伝子の伝搬機構としては，微生物自体が DNA そのものを細胞内に取り込むことで伝搬される形質転換，バクテリオファージによる形質導入，プラ

スミド・ICE による接合伝達の 3 つに分けられる。接合伝達は、染色体とは独立したレプリコンが必要であるという点で、他の MGEs とは異なる (Fig. 1-1) (2)。

天然由来のプラスミドは、10 kb 未満の小型のものから 1 Mb に及ぶ巨大なものまで様々であり、プラスミドを接合伝達によって獲得することは、宿主が新しい遺伝情報を一度に大量に得ることになり、宿主本来の遺伝子に変異を蓄積するよりも速く、宿主の表現型を著しく変化させる。従って、微生物の特徴の一つである、急速な進化・適応能力を促す原動力と考えられている。このことから、プラスミドは MGEs の中でも最も重要な遺伝因子であると言われている。



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

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

## 2. プラスミドの接合伝達機構

自己伝達性プラスミドは *oriT* (origin of transfer), relaxase, type IV coupling protein (T4CP) からなる遺伝子領域で構成される MOB (Mobility) もしくは Dtr (DNA transfer and replication) と、タンパク質分泌機構である type IV secretion system (T4SS) を構成する MPF (mating pair formation) を持ち、MOB がプラスミド DNA の切断や複製を行い、MPF が供与菌と受容菌の菌体間を接着し、双方をつなぐ管状の接合橋を形成する。可動性プラスミドは MPF を持たず、なかには T4CP も持たないものもあり、細胞内の他の因子が持つ MPF を利用して接合伝達される (Fig. 1-2A) (3)。なお、データベースに登録されているプラスミドのサイズは二極化しており、約 20 kb で極小値となる (Fig. 1-3) (4)。可動性プラスミドのサイズの中央値は 35 kb であり、自己伝達性プラスミドは 181 kb である。また、自己伝達性プラスミドは平均 100 kb の正規分布を示すのに対し、可動性プラスミドは 5 kb で極大となり、広く平らな分布が見られ、150 kb で第二のピークが現れる (Fig. 1-3) (4)。

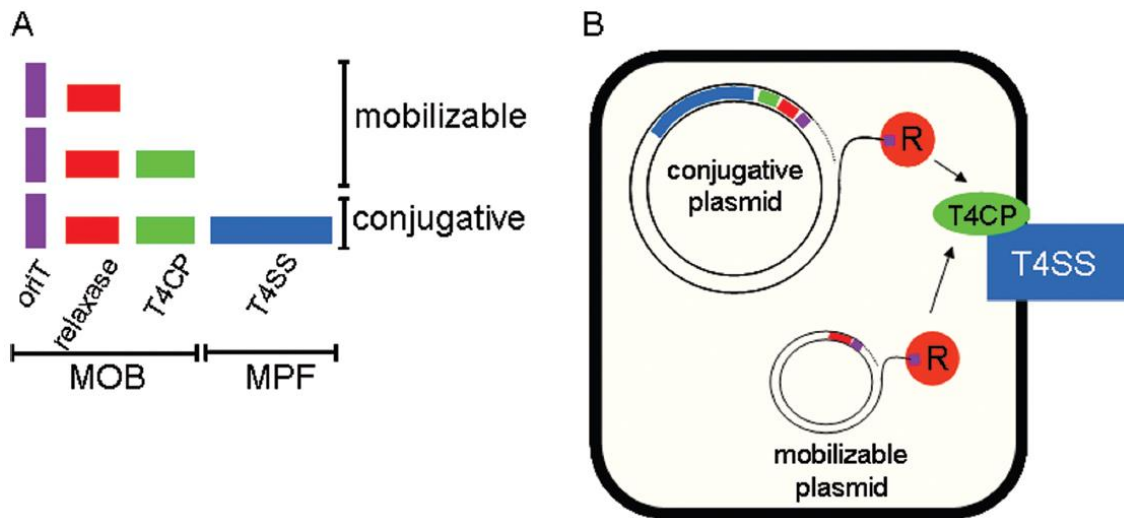
プラスミドの接合伝達では、まず、relaxase がプラスミド DNA の *oriT* 領域に結合し、二本鎖 DNA に *nic* (切れ目) を入れ、二本鎖を開裂する。この relaxase - 輸送 DNA 複合体は T4CP によって T4SS に連結され、T4CP が ATP を消費してタンパク質 - DNA 複合体を T4SS を通して受容菌に輸送する。受容菌内では、relaxase が供与菌から輸送される一本鎖 DNA のもう一方の末端を認識し、再環化する。プラスミドは受容菌内に侵入した後、受容菌からの制限・修飾系を回避しながら複製されることで初めて接合伝達が成立し、さらに安定に分配されることで、プラスミドを獲得した接合伝達体コロニーが得られる (Fig. 1-2B, 1-4) (3, 5)。

T4SS は二重膜の内外にわたって構成される巨大なナノマシーンである。T4SS の構成は大きく分けて、伝達の駆動力を供給する細胞質内の ATPase, 輸送チャネルコンポーネント、繊毛タンパク質、その他に分類される (6)。

*Agrobacterium tumefaciens* の T4SS は *virB1* - *virB11* と *virD4* の直線状に配置された 12 個の遺伝子からなる。*virD4* はカップリングタンパク質であり、relaxosome と 11 の *virB* タンパク質によって構成される分泌チャネルを結び付ける。また、VirB4 と VirB11 の 2 つの ATPase とともに、分泌機構において重要な働きをする。輸送チャネルは、膜内在性タンパク質の VirB3, VirB6, VirB8, VirB10 と、外膜関連タンパク質の VirB7, VirB9, VirB10 によって二重膜を貫通して存在する。VirB10 は二重膜間にまたがって内膜と外膜に挿入されている独特なタンパク質である。繊毛を構成する主要なタンパク質は多量体化した VirB2 であり、微量の繊毛タンパク質である VirB5 は繊毛の先端に位置するアドヘシン (レクチン様糖鎖認識タンパク質) であると考えられている。VirB1 は溶菌性の transglycosylase であり、T4SS の巨大な構造がペプチドグリカン層を貫通するための補助を行っている (Fig. 1-5) (6)。

1980 年、David Bradley によってプラスミドの不和合性群ごとに接合繊毛の形態学的な分類が行われた (7)。それによれば、①薄く柔軟な繊毛 (IncI complex, IncB, -K), ②厚く

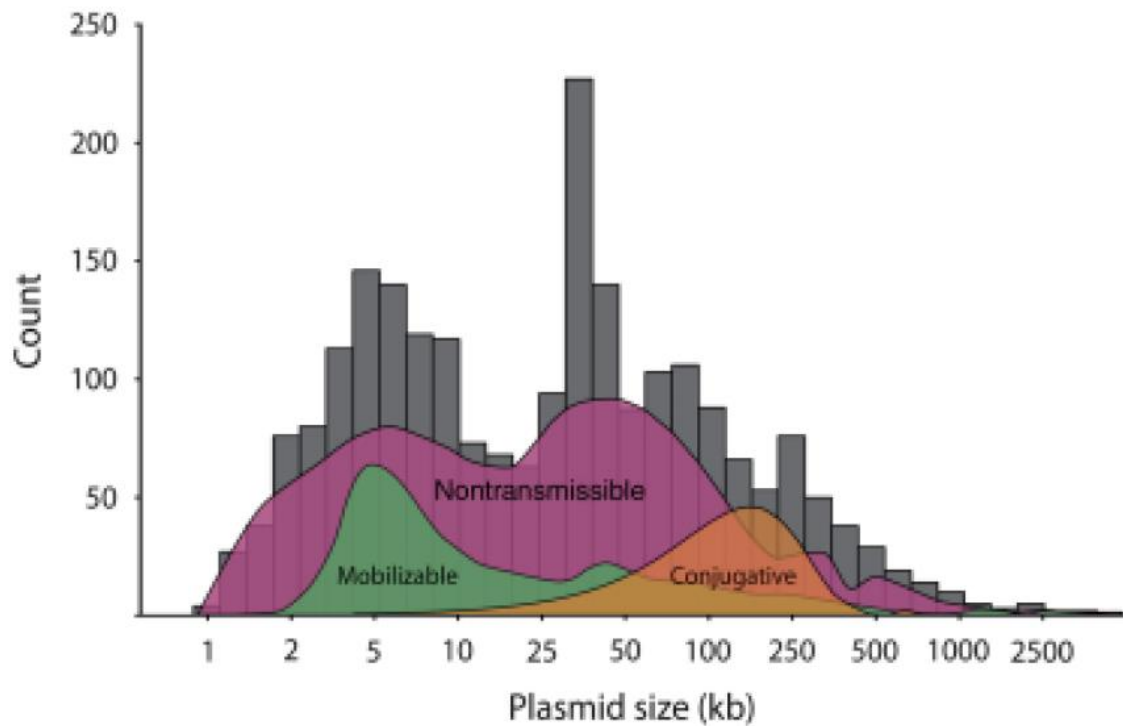
柔軟な繊毛 (IncF complex, IncH1, -H2, -J, -T, -V, -X, etc.), ③固い繊毛 (IncM, -N, -P, -W, etc.) の 3 グループに分けられる. この分類は配列比較からも立証されており, それによると薄く柔軟な繊毛は確かに mating pair stabilization (Mps) に寄与する type IV pili, 厚く柔軟な繊毛は Mpf, 繊毛の退縮, Mps を含む F 様 T4SS の多くの特徴を示し, 固い繊毛は VirB11-like ATPase をもった P 様の T4SS にコードされている. 固い繊毛は Mpf の機能はあるが, 繊毛の退縮や Mps には寄与していない. また, Bradley らは, 接合のタイプを 3 つに分類した (8). ① “一般的” なタイプは液体, 固体ともによく接合し, 接合伝達関連領域にコードされる Mps システムは薄く柔軟な繊毛 (IncI) か厚く柔軟な繊毛 (IncF) であり, ② “固体表面を好む” タイプは厚く柔軟な繊毛 (IncC, -D, -T, -X), ③ “固体表面が必須” なタイプは固い繊毛 (IncM, -N, -P, -W) である. さらに, Bradley は, *Pseudomonas aeruginosa* 由来のプラスミドについても同様の分類を行った (9). IncI プラスミドの R64 は薄く柔軟な繊毛と固い繊毛の両方をコードしており, 薄く柔軟な繊毛を欠損すると “固体表面が必須” な接合様式を示す (10, 11).



**Fig. 1-2. 接合伝達機構** (Smillie et al., 2010, Fig. 1 より引用)

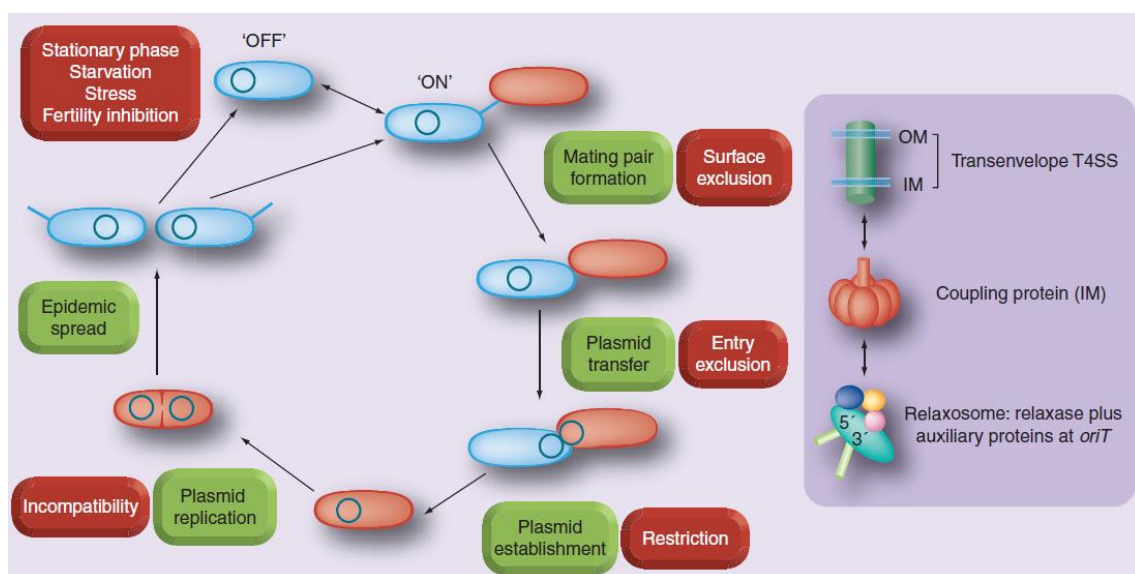
(A) Schematic view of the genetic constitution of transmissible plasmids. Self-transmissible or conjugative plasmids code for the four components of a conjugative apparatus: an origin of transfer (*oriT*) (violet), a relaxase (R) (red), a type IV coupling protein (T4CP) (green), and a type IV secretion system (T4SS) (blue). The T4SS is, in fact, a complex of 12 to 30 proteins, depending on the system (see text). Mobilizable plasmids contain just a MOB module (with or without the T4CP) and need the MPF of a coresident conjugative plasmid to become transmissible by conjugation. (B) Scheme of some essential interactions in the process of conjugation. The relaxase cleaves a specific site within *oriT*, and this step starts conjugation. The DNA strand that contains the relaxase protein covalently bound to its 5' end is displaced by an ongoing conjugative DNA replication process. The relaxase interacts with the T4CP and then with other components of the T4SS. As a result, it is transported to the recipient cell, with the DNA threaded to it. Subsequently, the DNA is pumped into the recipient by the ATPase activity of the T4CP.





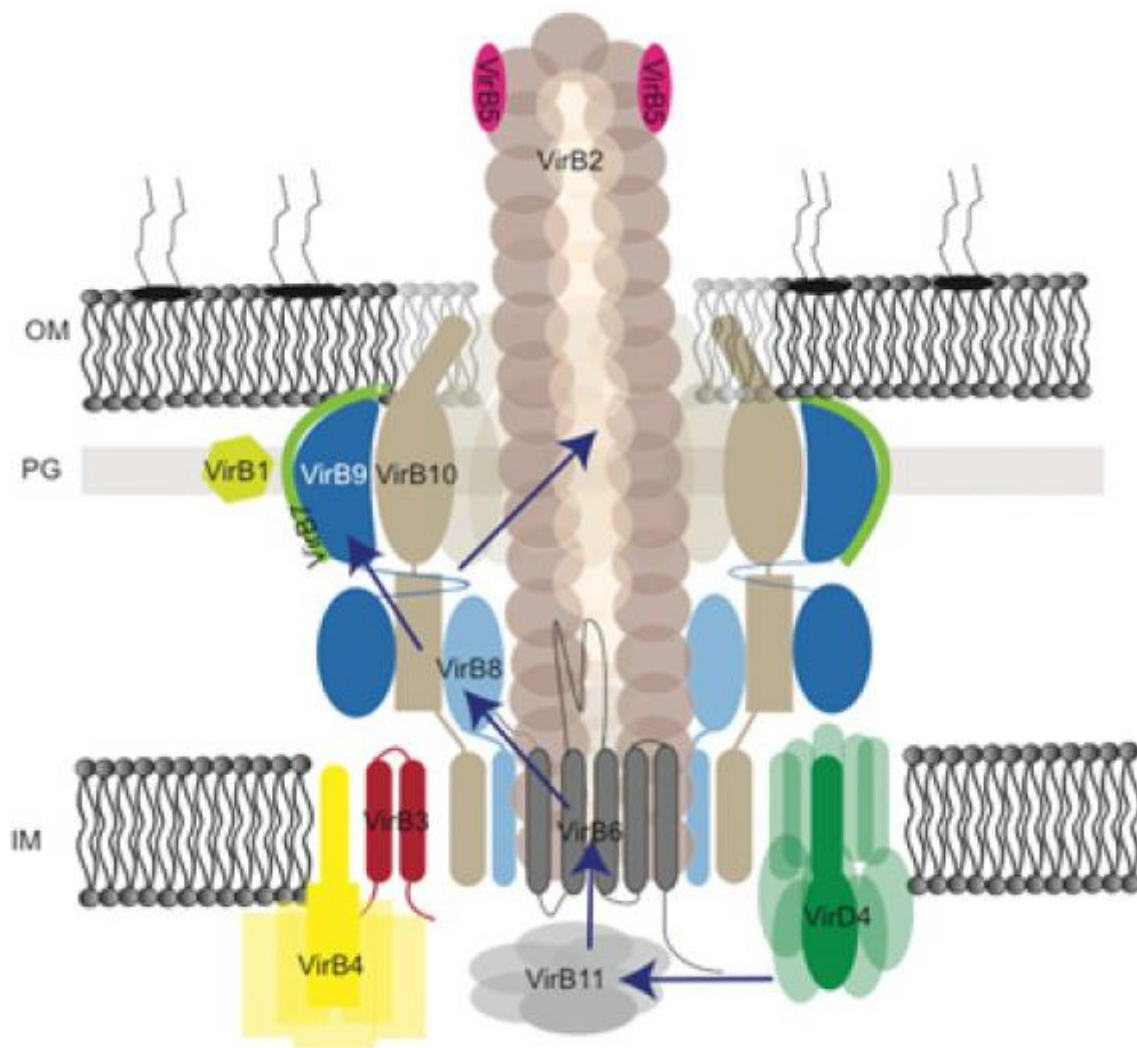
**Fig. 1-3. プラスミドのサイズと可動性** (Garcillán-Barcia et al., 2011, Fig. 2 より引用)

Mobility of plasmids according to their size. Distribution of conjugative (i.e. self-transmissible by conjugation), mobilizable (i.e. transmissible by conjugation only in the presence of a helper conjugative plasmid) and nontransmissible plasmids, according to their size. Curves were created from a polynomial interpolation of the histograms of each class. The figure is an update from Smillie et al. (2010), using the database as of October 2010.



**Fig. 1-4. プラスミドの接合伝達の流れ** (Frost et al., 2010, Fig. 1 より引用)

The inset shows the main components of the transfer apparatus. All conjugative systems require a coupling protein, an ATPase that energizes transfer. Most Gram-negative and -positive conjugative systems require a T4SS, which forms the conjugative pore, and a relaxosome composed of the relaxase, which nicks at *oriT* and other auxiliary proteins. Gram-negative systems, but not Gram-positive ones, produce an extracellular appendage called a pilus, which identifies a suitable recipient cell. Some systems, such as in *Streptomyces*, require only a coupling protein for DNA transfer. Main diagram: the donor cell in blue binds the recipient cell in red via the pilus, which retracts and brings the cells together. A signal is transmitted through the T4SS to the coupling protein that then attracts the relaxosome to the conjugative pore. A single strand of DNA, covalently linked to the relaxase, is transported into the recipient cell, followed by the establishment and replication of the plasmid, or in the case of an integrating conjugative element, incorporation into the recipient chromosome. Recipient cells that are newly converted to donor cell status exhibit high frequency of transfer, which can lead to epidemic spread. Many control elements alter the level of transfer gene expression in the donor cell or interfere with the transfer and establishment of the plasmid in the recipient. The major negative influences are indicated in red boxes whereas the steps in conjugation and establishment are indicated in green boxes. IM: Inner membrane; OM: Outer membrane.



**Fig. 1-5. T4SS のモデル** (Chandran, 2013, Fig. A より引用)

Model of the T4S secretion system. The various components of the *A. tumefaciens* VirB/D4 T4S system are shown. OM, outer membrane; IM, inner membrane; PG, peptidoglycan layer in the periplasm. Various transmembrane domains are shown in the respective membranes. For components that lack structural information, the number of transmembrane regions and oligomeric state are not confirmative.

接合伝達関連遺伝子の発現は、受容菌が生産する特殊なシグナルへの応答によって、または、厳密に制御された宿主染色体上やプラスミド上にコードされた因子によって誘導される。後者の場合、受容菌や受容菌が生産するシグナル分子に依存せず、宿主細胞集団中に接合伝達関連遺伝子を発現する集団が存在する。これまでに詳細に研究がなされているグラム陰性細菌のプラスミド IncF, -H, -I, P, および-W において、接合伝達能は転写や転写後のメカニズムによって、宿主に大きな負荷がかからないように制限されていることが知られている (5)。

F プラスミドや他の狭宿主域プラスミドは、多くの宿主由来の制御因子 (DNA レベルではアクチベーターやリプレッサー, Dam methylation, RNA レベルでは RNase による分解, タンパク質レベルでは抑制因子の結合やタンパク質分解, 構造変化) を利用して接合伝達関連遺伝子の制御を行っている。これに対し, IncP-1 プラスミドや他の広宿主域プラスミドは、プラスミド上にコードされたリプレッサーによって接合伝達関連遺伝子の転写制御を行っている。このシステムは、多種多様な細菌が存在する自然界において、宿主の制御機構の関与から逃れるためであると考えられる (5)。

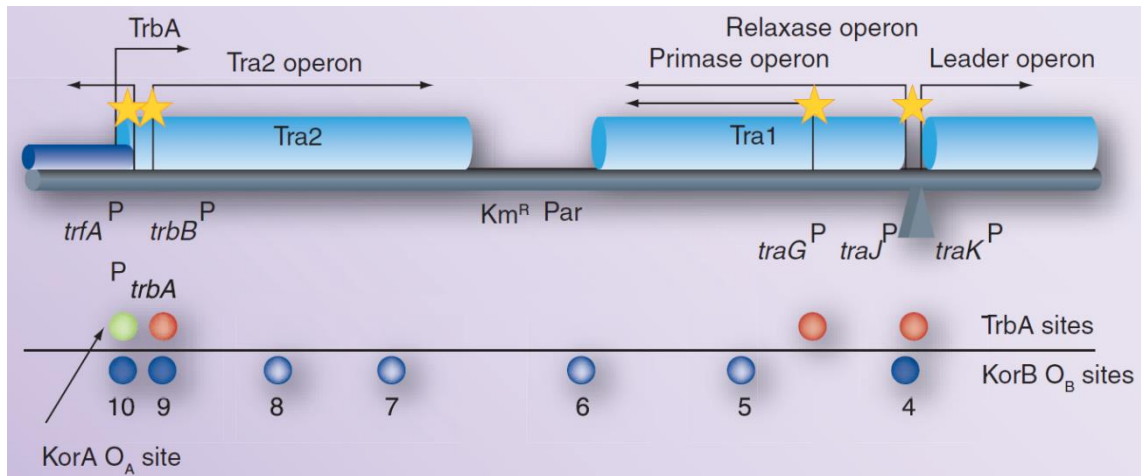
F, R1, R100, pRK100, pSLT などの IncF プラスミドは、2 つのモノシストロニックな *traM*, *traJ*, と, *traY*-X オペロンの計 30 kbp 以上にもなる接合遺伝子領域を持つ (Fig. 1-6)。*traM* は *nic* サイトを含む *oriT* に隣接している。TraM は接合の前段階の DNA の切断に必須であり、自身の P<sub>M</sub> プロモーターをオートレギュレートしている。次に、*traJ* がコードされている。TraJ は *tra* 遺伝子の主要な転写誘導因子であり、自身の P<sub>J</sub> プロモーターも転写誘導する。以降の *tra* オペロンは *traY* から *traX* の 30 以上の遺伝子をコードしており、これらの遺伝子は DNA 代謝や T4SS, 接合伝達能の制御に関わっている。*tra* オペロンの最初の転写産物である TraY は接合の前段階の DNA の切断に重要な役割を果たしており、自身の主要なプロモーターである P<sub>Y</sub> をオートレギュレートしている (5, 12)。P<sub>Y</sub> は TraJ 以外に、global transcription factors cyclicAMP receptor protein (Crp), leucine-responsive regulatory protein (Lrp), Dam-mediated DNA methylation のような、宿主の栄養状態やストレスなどに反応する宿主由来のタンパク質によっても制御されている。H-NS (後述する 5. 参照) は P<sub>M</sub>, P<sub>J</sub>, P<sub>Y</sub> プロモーターからの転写のサイレンサーとして働く。TraJ は P<sub>Y</sub> プロモーターの転写誘導因子というよりも、むしろアンチサイレンサーの機能があると考えられている。TraJ に加えて、TraY と ArcA も P<sub>Y</sub> プロモーター付近に結合し、*tra* オペロンを制御していることが知られている。TraJ による P<sub>Y</sub> プロモーターの転写誘導は、おそらく細胞の酸化還元状態に反応している。TraY は P<sub>Y</sub> プロモーターの転写制御因子であり、個々のプラスミドのシステムに依存して、正、または負の働きをする。宿主由来の応答制御因子である ArcA もまた、P<sub>Y</sub> プロモーターによって *tra* オペロンを制御している (5, 12)。

IncF や IncHI1 などの狭宿主域プラスミドとは対照的に、IncP-1 などの広宿主域プラスミドは、まったく異なる接合伝達関連遺伝子の制御機構をもっている。広宿主域プラスミドは、プラスミド上にコードされた因子によって接合伝達関連遺伝子の転写を抑制してお

り、宿主染色体上にコードされた NAPs（後述する 5. 参照）による制御を受けないと考えられている。これらのプラスミドは複製や分配、接合の遺伝子を **KorA**, **-B**, **-C**, **TrbA** の 4 つの制御因子によって同時に制御している。5 つめの因子として、複製の制御を行っている **TrfA** は *trbAp* プロモーターとオーバーラップした *trfAp* プロモーターと結合する。**KorA**, **-B**, **TrbA** の結合サイトに **TrfA** が結合することで、複製と接合関連遺伝子を協調的に転写している (Fig. 1-7) (5)。分配タンパク質としても機能する **KorB** は、*IncP-1α* プラスミド **RK2** 上に 12 箇所の結合サイトをもつ。このことから、**H-NS** の代わりに広宿主域プラスミドが多様な宿主内において環境や生理状態に応じて遺伝子の発現を調整する役割を担っていると考えられる。

**RK2** の接合伝達関連遺伝子は、2 つの **Tra** 領域内の 4 つのプロモーターから発現する。これらの発現は **Tra2** 領域の最初の遺伝子産物である **TrbA** によって抑制されている。**TrbA** は特に受容菌細胞内でのプラスミドの安定性のために接合伝達関連遺伝子の過剰発現を抑制していると考えられるのに対し、**KorB** は恒常的な発現に寄与している。**KorB** は **TrbA** と協調して接合伝達関連遺伝子のプロモーターからの転写抑制能を強化することができる。したがって、これらのシステムは非常に強固に接合伝達の抑制を維持し、宿主の負荷を最小限に抑えている (5, 13)。





**Fig. 1-7. IncP-1 プラスミドにおける KorAB と TrbA による tra オペロンの制御**

(Frost & Koraimann 2010, Fig. 4 より引用)

Blocks of transfer genes are represented by Tra1 (relaxase and primase overlapping operons) and Tra2 (Tra2 operon) whereas the transfer-related leader region is shown to the right and replication-related genes are shown on the left as a blue box. Promoters of interest are shown below the boxes whereas the direction of transcription is shown as angled arrows above the boxes. Green and red circles above the lower black line represent one KorA binding site (OA) and TrbA binding sites, respectively, whereas blue circles represent KorB binding sites (OB) 10 to 4 as discussed by Chiu *et al.* [85]. Dark blue circles represent strong KorB binding sites whereas light blue circles represent weaker binding sites. The stars represent sites for cooperative interaction between KorA and TrbA or TrfA, with TrfA being the connection between the regulation of replication and conjugation.

### 3. プラスミドの分類

2 種類のプラスミドが同じ細胞内で安定に共存できるとき、両者の複製・分配機構が異なり、和合性 (compatibility) であるという。これに対し、同じ複製・分配機構をもつプラスミド同士が同じ細胞内に存在すると、干渉し合って安定に共存できないことを不和合性 (incompatibility) であるという (14)。この不和合性はプラスミドの分類の指標として用いられており、グラム陰性細菌については、大腸菌を宿主とした際の 26 種 (IncA ~ IncZ) の分類 (Table 1-2)、あるいは、自然界に広く分布している *Pseudomonas* 属細菌を宿主とした際の 14 種 (IncP-1 ~ IncP-14) の分類が (Table 1-3) が用いられてきた (15)。なお、大腸菌を宿主とした分類には重複があり、両分類間にも重複がある (Table 1-2, 3)。しかし、不和合性による分類では、共通の宿主が存在しないプラスミドを分類できず、また、非常に類似したプラスミド同士でも 1 塩基の違いで和合性となる例も知られている (16)。そこで、プラスミドにコードされた複製領域の塩基配列の類似性を指標とした分類が提唱された (17)。しかし、複数の *rep* 領域をもつプラスミドや *rep* 領域が組み換えられたプラスミドが多く発見されたことから、*rep* 領域も分類の指標には適していない。そこで、接合伝達性プラスミドについては、不和合性による分類とは別に、その接合伝達時に必要な DNA の複製・移動を担うタンパク質 (MOB : mobilization) と、細胞間の接触を促進するタンパク質 (MPF: mating pair formation) のアミノ酸配列の相同性に基づく分類が行われた (Smillie et al., 2010)。6 種の MOB (MOB<sub>F</sub>, MOB<sub>H</sub>, MOB<sub>Q</sub>, MOB<sub>C</sub>, MOB<sub>P</sub>, MOB<sub>V</sub>) と 4 種の MPF (MPF<sub>F</sub>, MPF<sub>I</sub>, MPF<sub>G</sub>, MPF<sub>T</sub>) による分類を組み合わせることで、広範囲のプラスミドが分類可能となる (Table 1-2, 3) (3)。

また、プラスミドの宿主となる微生物の種類の幅を宿主域とよぶが、その宿主の分類上、異なる門 (phylum) や綱 (class) に属する細菌間を伝達し複製される“広宿主域 (broad host range)”プラスミドと、同一の属 (genus) や種 (species) および類縁の株 (strain) 間のみ伝達し複製される“狭宿主域 (narrow host range)”プラスミドに大別されてきた。



**Table 1-2. 大腸菌におけるプラスミドの分類**（新谷ら 2013 一部改変）

不和合性群 <sup>a</sup>	プラスミド（例） <sup>b</sup>	MOB <sup>c</sup>	MPF <sup>c</sup>	接合伝達性	宿主域 <sup>d</sup>
IncA/C	RA1	MOB <sub>H</sub>	MPF <sub>F</sub>	self-transmissible	broad
IncB/O	R724	MOB <sub>P</sub>	MPF <sub>I</sub>	self-transmissible	narrow?
IncD	R711b	-	-	self-transmissible	narrow?
IncF	F	MOB <sub>F</sub>	MPF <sub>F</sub>	self-transmissible	narrow
IncG/U (=IncP-6)	Rms149	MOB <sub>P</sub>	-	mobilizable	intermediate
IncH	R27	MOB <sub>H</sub>	MPF <sub>F</sub>	self-transmissible	narrow
IncI	R64	MOB <sub>P</sub>	MPF <sub>I</sub>	self-transmissible	narrow
IncK	R387	MOB <sub>P</sub>	MPF <sub>I</sub>	self-transmissible	narrow
IncL/M	R446b, pIP135	MOB <sub>P</sub>	MPF <sub>I</sub>	self-transmissible	broad
IncN	N3	MOB <sub>F</sub>	MPF <sub>T</sub>	self-transmissible	broad
IncP (=IncP-1)	RK2	MOB <sub>P</sub>	MPF <sub>T</sub>	self-transmissible	broad
IncQ (=IncP-4)	RSF1010	MOB <sub>Q</sub>	-	mobilizable	broad
IncS (=IncHI2)	R478	MOB <sub>H</sub>	MPF <sub>F</sub>	self-transmissible	narrow
IncT	Rts1, R401	MOB <sub>H</sub>	MPF <sub>F</sub>	self-transmissible	narrow
IncW	R388	MOB <sub>F</sub>	MPF <sub>T</sub>	self-transmissible	broad
IncX	R6K	MOB <sub>P</sub>	MPF <sub>T</sub>	self-transmissible	narrow?

<sup>a</sup>IncA と IncC 等，いくつかの Inc 群については重複している．また，Table1-3 における *Pseudomonas* 属細菌における Inc 群とも重複する場合もある．<sup>b</sup>例として挙げたプラスミドについては，Lawley ら，および Sota & Top の総説（18, 19）に基づく．<sup>c</sup>MOB, MPF の分類については Smillie らの総説（3）に基づく．「-」は情報が無い，あるいは元来もっていないことを示す．

**Table 1-3. *Pseudomonas* 属細菌におけるプラスミドの分類** (新谷ら 2013 一部改変)

不和合性群 <sup>a</sup>	プラスミド (例) <sup>b</sup>	MOB <sup>c</sup>	MPF <sup>c</sup>	接合伝達性	宿主域 <sup>d</sup>
IncP-1 (=IncP)	RK2, pB10	MOB <sub>P</sub>	MPF <sub>T</sub>	self-transmissible	broad
IncP-2	CAM	-	-	self-transmissible	narrow
IncP-3 (=IncA/IncC)	RIP64	MOB <sub>H</sub>	MPF <sub>F</sub>	self-transmissible	broad
IncP-4 (=IncQ)	RSF1010	MOB <sub>Q</sub>	-	mobilizable	broad
IncP-5	Rms163	-	-	self-transmissible	narrow
IncP-6 (=IncG/IncU)	Rms149	MOB <sub>P</sub>	-	mobilizable	broad
IncP-7	pCAR1, pDK1	MOB <sub>H</sub>	MPF <sub>F</sub>	self-transmissible	narrow
IncP-8	FP2	-	-	NA	NA
IncP-9	pWW0, NAH7	MOB <sub>F</sub>	MPF <sub>T</sub>	self-transmissible	narrow
IncP-10	R91	-	-	NA	narrow
IncP-11	pMG39	-	-	NA	NA
IncP-12	R716	-	-	NA	narrow
IncP-13	pMG25	-	-	NA	narrow
IncP-14	pBS222	-	-	NA	broad

<sup>a</sup>いくつかの Inc 群については Table 1-2 に示した腸内細菌における Inc 群とも重複する. <sup>b</sup>例として挙げたプラスミドについては, Thomas & Haines の総説 (20) に基づく. <sup>c</sup>MOB, MPF の分類については Smillie らの総説 (3) に基づく. 「-」は情報が無い, あるいは元来もっていないことを示す. <sup>d</sup>宿主域は, 腸内細菌 (Enterobacteriaceae 科) のみを宿主とできる場合に narrow, 腸内細菌と他の  $\gamma$ -Proteobacteria 網細菌を宿主とできる場合に intermediate, 複数の網にまたがる細菌を宿主にできる場合に broad とした. NA については情報が十分でないことを示す.

#### 4. プラスミドの環境中における挙動解析

土壌・海洋・河川・湖沼など実際の環境では、実験室内での接合実験に比べ微生物集団の密度が低く、利用可能な栄養源も少ない上に温度も低いことが多い。また、自然環境中の微生物の大半は、“生きているが培養できない”難培養性微生物と考えられている。こうした微生物は、まだ培養法が確立していない細菌や、著しく生育速度の低い細菌、または種々の条件によって培養できない状態に変化した細菌など、多様な細菌を含む。実際、環境試料中から、細菌細胞を染色して顕微鏡下で観察・計測した細菌数に対し、平板培地上で生育する細菌数が著しく低いことから、環境中の細菌の大半（通常 90%以上）が培養できないと考えられている。従って、実験室内で培養可能な細菌のみを対象とした接合実験や、その結果算出されたプラスミドの接合伝達頻度および宿主域は、自然環境におけるプラスミドの接合現象の実態を必ずしも正確に反映していないと考えられる。このような観点から、難培養性微生物を含む、非滅菌の環境試料を用いたモデル環境を作製し、プラスミドの接合伝達頻度の測定や、宿主域の調査も実施されてきた（Table 1-4, 5 に例を示す）

(15). このようなモデル環境における接合伝達現象を検出するにあたって、当初はプラスミド上にコードされる抗生物質耐性能を指標とした研究が多かったが、各環境試料中に元来存在する耐性菌による偽陽性が生じやすいため、近年は GFP 等の蛍光タンパク質が利用されている。特にこれらの蛍光タンパク質を供与菌内では発現しないようにしておき、受容菌内で発現するようなシステムを用いて、蛍光を示す細胞、またはコロニーを接合伝達体として検出する方法が良く用いられている。

**Table 1-4. 土壌中でのプラスミドの接合実験実施例**（新谷ら 2013 より引用）

実験環境	実験条件など	接合期間	接合実験に用いた供与菌・受容菌の組合せ	結果	文献
土壌	滅菌; 28°C	12 d	D: <i>Echerichia coli</i> HB101(pBLK1-2) R: <i>Rhizobium fredii</i> USDA 201	$1.8 \times 10^{-4}$ 受容菌あたり	21
土壌	栄養源を添加した非滅菌土壌, 28°C	3-6 d	D: <i>Echerichia coli</i> R: <i>E. coli</i> CV601	pTH16: $6.2 \times 10^{-4}$ pIE1037: $2.3 \times 10^{-4}$ pIE1056: $8.4 \times 10^{-4}$ pIE639: $3.1 \times 10^{-6}$ pIE1055: 検出されず pIE1040: 検出されず いずれも受容菌あたり	22
土壌	土壌抽出物から作製した培地にフィルターをのせて接合実験, 25°C	48 h	D: <i>P. putida</i> KT2442 <i>lacF</i> :: <i>dsRed</i> (RP4::gfp) R: 土着の細菌	$1.49 \times 10^{-4}$ 受容菌あたり	23
土壌	非滅菌, 砂質土壌(水分含量 60%), 4, 10, 15, 25°C	22 d	D: <i>E. coli</i> K12 J5-3(RP4) R: 土着の細菌	$4.6 \times 10^{-3}$ 供与菌あたり	24
腐植土	非滅菌土壌に加えて菌糸が付着したオオムギの葉, またはしていない葉, 25°C	17 d	D: KT2442LacIq/TOL <sub>gfp</sub> , Km R: KT2440 <sup>+</sup> Tc <sup>+</sup>	菌糸なし: $1.46 \times 10^{-3}$ . 菌糸あり: $5.75 \times 10^{-5}$ いずれも供与菌と受容菌を掛け合わせた数の平方根あたり	25
根圏	コムギ根圏, 非滅菌, 16 h 明条件 20°C, 8 h 暗条件 16°C サイクル	8 d	D: <i>Pseudomonas</i> sp. R2f (RP4) R: <i>Pseudomonas</i> sp. R2f	$1.7 \times 10^{-2}$ 供与菌あたり	26
根圏	非滅菌, オオムギ根圏, 室温	7 d	D: <i>P. putida</i> KT2440:: <i>lacF</i> <sup>1</sup> (pKJK10) R: 土着の細菌	$6.32 \times 10^{-2} \sim 1.12 \times 10^{-1}$ 供与菌あたり	27

Table 1-4. の続き

根圏	非滅菌, エンド ウマメ, オオム ギ根圏, 12 h ごと に明, 暗条件 サイクル, 20- 22℃	6 d	D: <i>P. putida</i> KT2442(pKJK5::gfp)  R: <i>P. putida</i> LM24	Pea: $4.0 \times 10^{-2}$  Barley: $5.9 \times 10^{-3}$  いずれも供与菌あたり.	28
	滅菌, ヒエ根 圏, 砂+植物, 砂, 12 h ごとに 明条件 (25℃), 暗条 件(15℃)サイク ル	95 h	D: <i>Pseudomonas fluorescens</i> AS12(pSS501)  R: <i>Serratia</i> sp. RF7	根圏: $8.9 \times 10^{-11}$ 砂+植物: $1.2 \times 10^{-12}$ 砂: $5.5 \times 10^{-15}$  いずれも供与菌と受 容菌数を掛け合わせ た数あたり	29
根圏	非滅菌, コムギ 根圏 16 h 明条 件 20℃, 8 h 暗 条件 16℃サイ クル	7 d	D: <i>Pseudomonas</i> sp. R2f (RP4)  R: <i>Pseudomonas</i> sp. R2f または土着の細菌	R2f: $7.1 \times 10^{-3}$ 土着細菌: $1.1 \times 10^{-3}$  いずれも供与菌あたり	30
根圏	非滅菌, ビート 根圏にフィルタ ーを投入, 15 - 20℃	24 h	D: <i>Pseudomonas marginalis</i> 376N(pQBR11)  R: <i>Pseudomonas aureofaciens</i> 381R	$1.3 \times 10^{-8} \sim 5.1 \times 10^{-5}$  受容菌あたり	31
植物 アルファ ルファ	非滅菌の種お よび芽, 22℃	9 d	D: <i>Lactococcus lactis</i> SH4174  R: <i>L. lactis</i> BU-2-60	$1.1 \times 10^{-1} \sim 3.9 \times 10^{-1}$  受容菌あたり	32
芽 アルファ ルファ	非滅菌, 芽, 20℃	9 d	D: <i>P. putida</i> LM50(pKJK5::gfp), <i>P. putida</i> LM50(TOL::gfp)  R: 土着の細菌	pKJK5: $3.4 \times 10^{-4}$  TOL: $2.0 \times 10^{-6}$  いずれも供与菌あたり	33
葉上	リン酸カリウム バッファー中の マメ植物葉, 温 度記載なし	2 d	D: <i>Pseudomonas syringae</i> Cit7p(RP1)  R: <i>Pseudomonas syringae</i> Cit7xylE	$1.0 \times 10^{-2}$  供与菌あたり	34

**Table 1-4. の続き**

土壌+動物	非滅菌土壌, ミズ, 20℃	14 d	D: <i>Pseudomonas fluorescens</i> C5t (pJP4)	ミミズなし: $2.8 \times 10^{-4}$	35
			R: 土着の細菌	ミミズあり: $6.9 \times 10^{-2}$	
				いずれも供与菌あたり	
土壌+動物	非滅菌土壌, ミズ, 20℃	14 d	D: <i>Alcaligenes eutrophus</i> JMP222N(pJP4)	ミミズなし: 伝達せず <sup>a</sup>	36
			R: <i>P. fluorescens</i> C5t	ミミズあり: $1.9 \times 10^{-6} \sim 2.3 \times 10^{-6}$	
				いずれも供与菌あたり	

<sup>a</sup>D は供与菌を, R は受容菌を表す.

**Table 1-5. 水中でのプラスミドの接合実験実施例**（新谷ら 2013 より引用）

実験環境	実験条件など	実験期間	接合実験に用いた供与菌・受容菌の組合せ	結果	文献
海水	非滅菌, 37℃	20 h	D: <i>E. coli</i> 15(pRAB15) R: <i>E. coli</i> K12 185	$4.9 \times 10^{-9}$ 供与菌あたり	37
海水	非滅菌; 6 or 20℃	24 h	D: <i>Vibrio cholerae</i> NVH4122/ <i>E. coli</i> NVH4061 R: <i>Aeromonas salmonicida</i> subsp. <i>salmonicida</i> AL2027	$3.0 \times 10^{-7} \sim 5.0 \times 10^{-3}$ 受容菌あたり	38
海水	滅菌, 15-20℃, 可動性プラスミド pCE328 の伝達頻度を測定	48 h	M and R: 土着細菌 D: <i>E. coli</i> K12 UB1832(pCE328)	$8.5 \times 10^{-6}$ 供与菌あたり	39
人工海水	滅菌, フィルターを投入, 24-28℃	24 h	D: <i>Vibrio</i> sp. S142(RP4), <i>E. coli</i> 803(RP1) R: <i>Vibrio</i> sp. S141	$3.6 \times 10^{-2}$ 受容菌あたり	40
海水, 堆積物	滅菌, 20-23℃	18 d	D: <i>E. coli</i> LCB69 C600(RP4) R: <i>E. coli</i> LCB402 CGSC 6173	$1 \times 10^{-4}$ 供与菌あたり	41
海水, 堆積物	非滅菌; 15℃	44 d	D: <i>Aeromonas salmonicida</i> 718(pRAS1) R: 土着の細菌	$3.4 \times 10^{-1}$ 受容菌あたり	42
河川水	滅菌, 20℃	96 h	D: <i>E. coli</i> EC <sub>15</sub> (river water isolate) R: <i>E. coli</i> 416S または J62	$1.6 \times 10^{-4}$ 受容菌あたり	43
河口水/堆積物	非滅菌, 20℃	5 d	D: <i>Pseudomonas putida</i> PF015(pGTE26) または KT2442(pGTE26) R: <i>P. putida</i> KT2442-nalr, PF015(pGTE27) または土着の細菌	pGTE27 が PF015 間でのみ伝達 $4.8 \times 10^{-2}$ 受容菌あたり	44
河川の岩に付着した細菌群集	非滅菌, 岩上の細菌群集の上にフィルターをのせる, 10-20℃	24 h	D: 土着細菌のもつ天然の水銀耐性プラスミド R: <i>P. putida</i> KT2440	$3.7 \times 10^{-6}$ 受容菌あたり	45

Table 1-5. の続き

河川の岩 に付着し た細菌群 集	非滅菌, 岩上 の細菌群集の 上にフィルター をのせる, 20°C	24 h	D and M: <i>P. putida</i> KT2440 (pD10, pQKH6 または pQKH9)  R: <i>P. putida</i> UWC6 または UWC5	pD10 の可動性 Up to $7.2 \times 10^{-4}$  受容菌あたり	46
河川水/ボ ウフラ	非滅菌, 河川 水, 10 または 25°C		D: <i>Bacillus thuringiensis</i> subsp. <i>israelensis</i> IPS82(pBC16),	河川水:	47
	滅菌水+ボウ フラ, 明条件 18 h, 暗条件 6 h		<i>B. thuringiensis</i> subsp. <i>israelensis</i> AND931(pXO16::Tn5401)	pBC16 は伝達せず	
	のサイクル, 25°C	15 d/3 d	R: <i>B. thuringiensis</i> subsp. <i>israelensis</i> GBJ002/IPS70	pXO16, 10°C $7.7 \times 10^{-4}$	
				pXO16, 25°C $3.5 \times 10^{-2}$ ボウフラ: pBC16 は伝達せず pXO16, $1.0 \times 10^{-3}$ い ずれも供与菌あたり	
湖水	滅菌および非 滅菌, 16-37°C	72 h	D: <i>P. aeruginosa</i> RM2100(R68.45)  または RM2180(FP5)  R: <i>P. aeruginosa</i> RM273 または土着細菌	滅菌水 R68.45 が RM273 に伝達 $2.0 \times 10^{-3}$ その他は検出されず 供与菌あたり	48



Table 1-5. の続き

湖水	栄養源のない 合成湖水, 21°C	18 h	D: <i>P. aeruginosa</i> PAO4032(R68.45)  R: <i>P. aeruginosa</i> PAO1168 または土着細菌	土着細菌には伝達せず.  PAO1168: 6.8×10 <sup>-5</sup> (bulk water) 5.6×10 <sup>-3</sup> (neuston)  供与菌あたり	49
飲料水	滅菌, 25°C, 可動性プラス ミド pHSV106 の伝達頻度を 測定	24 h	M: <i>E. coli</i> ED2149(R100-1) D: <i>E. coli</i> HB101(pHSV106)  R: <i>E. cloacae</i> 107A	2.43×10 <sup>-9</sup> ~2.14×10 <sup>-7</sup> 受容菌あたり	50
汚染水	非滅菌, 廃水 処理反応槽, 18-22°C	32 d	D: <i>P. putida</i> KT2442(pWW0::gfp)  R: 土着の細菌	1.9×10 <sup>-1</sup> ~ 8.9×10 <sup>-1</sup> 供与菌あたり	51
下水	濾過滅菌, 22.1°C	31 d	D: <i>P. putida</i> UWC8 (pQKH6),  <i>Serratia fonticola</i> IB4r(pQKH6)  R: <i>P. putida</i> UWC9	<i>P. putida</i> UWC8: 8.40×10 <sup>-4</sup>  <i>Serratia fonticola</i> IB4r: 3.10×10 <sup>-6</sup>  いずれも受容菌あたり	52

<sup>a</sup>D は供与菌を, R は受容菌を表す. また, M は可動性プラスミドの伝達を促すヘルパープラスミドをもつ菌株を表す.

## 5. プラスミドの接合伝達と核様体タンパク質 (NAPs)

核様体タンパク質 (nucleoid-associated proteins, NAPs) は、細菌の DNA と結合し、コンパクトに折りたたまれた核様体と呼ばれる構造を形成することで、多くの遺伝子の転写を制御する global regulator として機能する (53). 腸内細菌では、factor for inversion stimulation (Fis), histone-like nucleoid structuring protein (H-NS), histone-like protein from *Escherichia coli* strain U93 (HU), integration host factor (IHF), leucine-responsive regulatory protein (Lrp) がよく知られている.

2010 年 4 月時点で全塩基配列が解読されていた 2,260 個のプラスミドのうち、155 個 (7%) が既知の NAPs と相同なタンパク質をコードする遺伝子をもつことが明らかとなっている (54). また、グラム陰性細菌由来のプラスミド 1,382 個のうち、136 個のプラスミド上に計 210 個の NAPs 遺伝子が存在し、NAPs を 1 つもつプラスミド、あるいは複数もつプラスミドの平均サイズ (それぞれ 199 kb, 790 kb) は、1,382 個の平均サイズ (83 kb) よりも大きいことが示された (54).

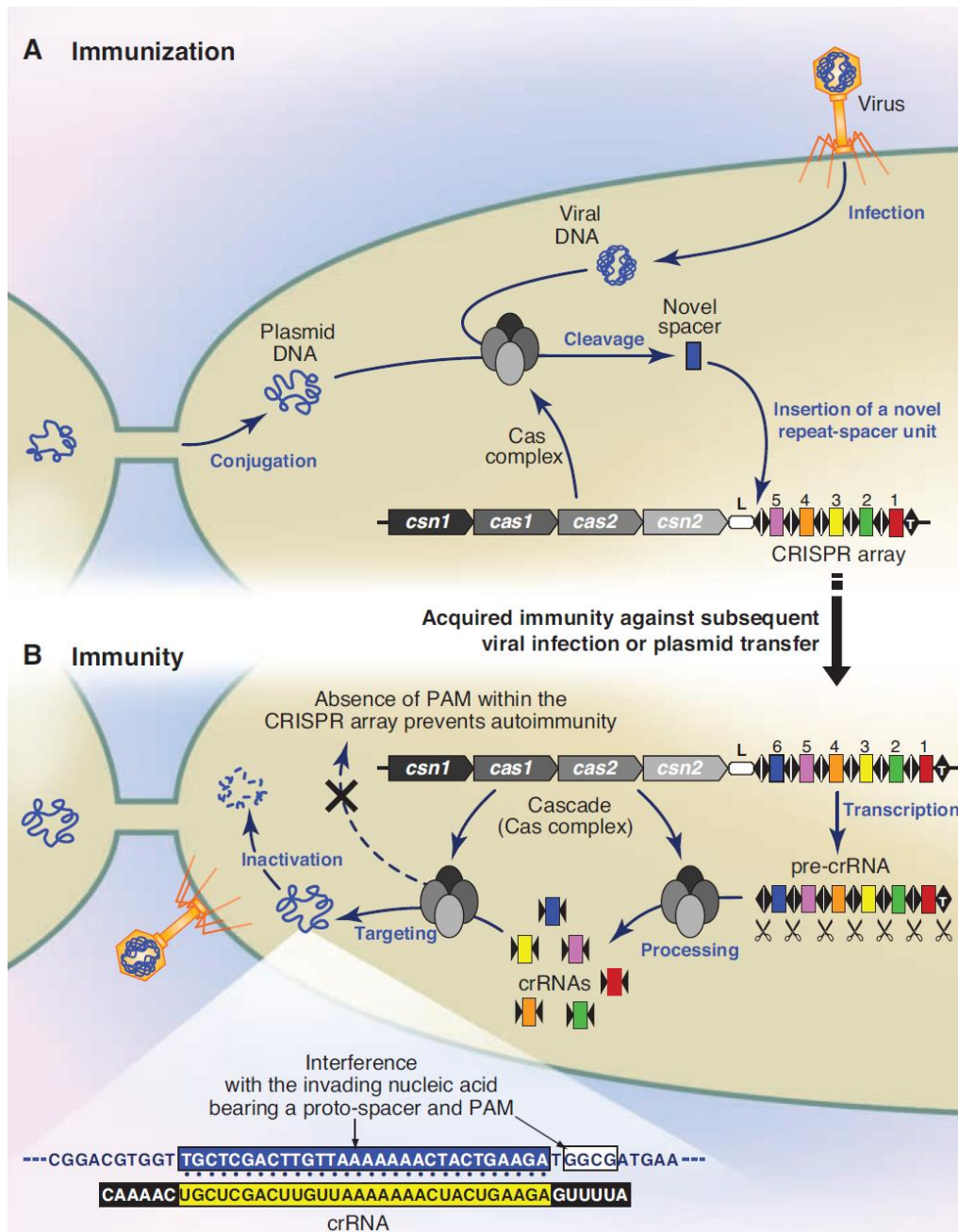
*Shigella flexneri* 2a strain 2457T 由来の自己伝達性 IncHI1 プラスミド pSf-R27 は、H-NS 様因子である Sfh をコードする遺伝子を持つ. Doyle らによって、*Salmonella enterica* serovar Typhimurium SL1344 の野生株、pSf-R27 を保持した株、*sfh* を破壊した pSf-R27 を保持した株の 3 株のトランスクリプトーム比較から、Sfh が転写制御する遺伝子の網羅的な解析が行われた. その結果、*sfh* を破壊することで、pSf-R27 を保持したときよりも多くの遺伝子が転写変動すること、宿主の fitness が低下することが明らかにされた (55). 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、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ことが原因であると推測された. Doyle らは、Sfh が H-NS と同様に染色体上、プラスミド上の AT-rich な領域に結合することで、H-NS の不足を補い、プラスミドを保持することによる宿主への負担を軽減する “stealth” 機能を持つと述べている (55).

*Salmonella enterica* serovar Typhimurium 由来の自己伝達性 IncHI1 プラスミド R27 の接合伝達機構は温度感受性を示し、腸内細菌としては低温の 25-30 °C で接合伝達頻度が最大となり、温度上昇にともない接合伝達頻度が減少することが知られている (56). R27 は、大腸菌において温度依存的に転写制御を行う H-NS, Hha と相同なタンパク質をコードする遺伝子を持ち、プラスミド上、大腸菌染色体上の H-NS と Hha を破壊することで、本来接合伝達しない 33 °C において接合伝達が可能となると報告された (57).

## 6. プラスミドの接合伝達と CRISPR/Cas システム

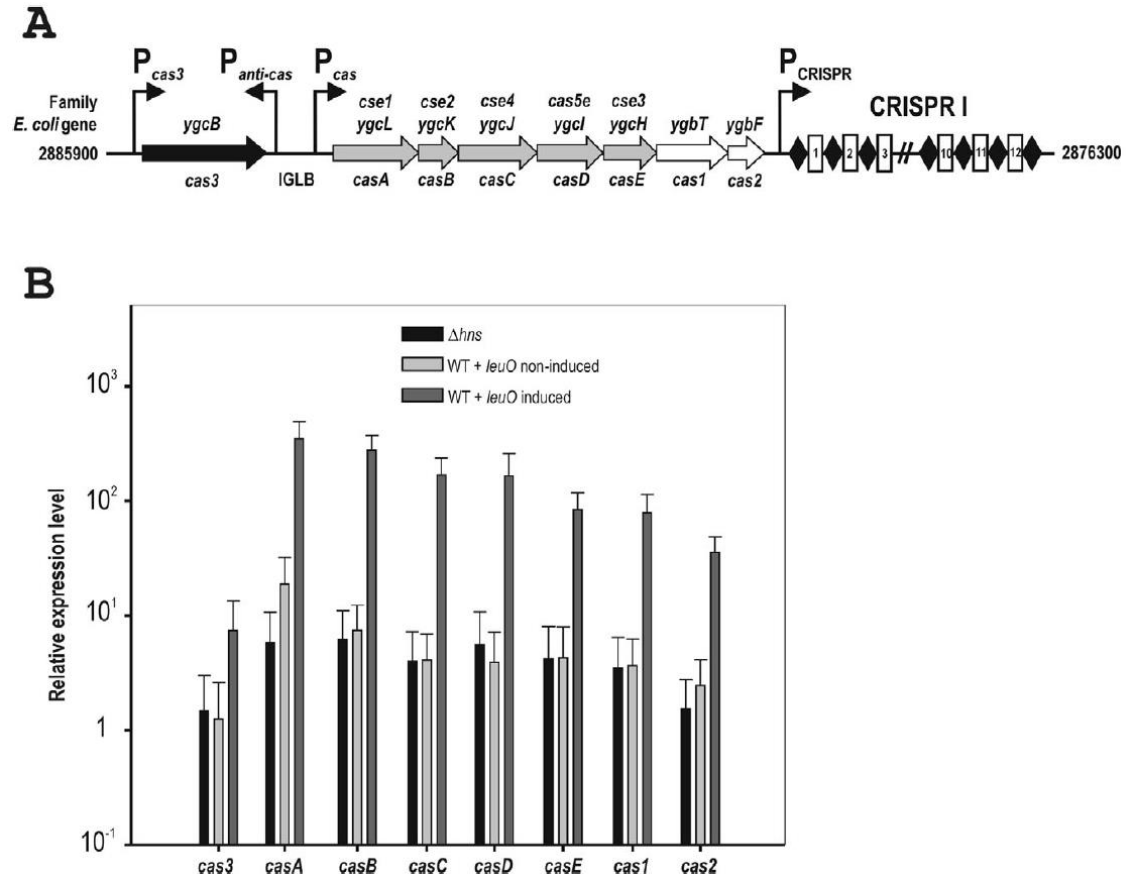
細菌は、Clustered regularly interspaced short palindromic repeat (CRISPR) (58), および隣接する CRISPR-associated 遺伝子群 (Cas) (59) からなる CRISPR/Cas システムによって、外来遺伝子に対する獲得免疫機構を持つことが知られている (60, 61). ゲノム配列が解読されている真正細菌の 50%, 古細菌の 90%が CRISPR をもつことが報告されている (62). CRISPR は、リピート配列 (Repeat) がゲノム上に局所的に密集し (Clustered), 隣接リピート間の間隔は規則的な長さで (Regularly Interspaced), リピート配列自体は短い回文構造をもつ (Short Palindromic) ことを示している (63). 細菌は、プラスミドやバクテリオファージ, ウィルスなどの外来遺伝子が侵入すると, その一部の塩基配列 (スペーサー配列) を CRISPR に取り込む. 次に, この塩基配列が転写されるとともに, Cas タンパク質群によってプロセッシングされ, スペーサーと相同な塩基配列をもつ外来遺伝子が侵入した際に, 相補的に結合して標的遺伝子を切断する (Fig. 1-8) (62, 64).

近年 Pul らによって, *Escherichia coli* K12 株において, H-NS が *casA* および CRISPR I プロモーター (Fig. 1-9A) からの転写を抑制することが示された (65). マイクロアレイ解析から, *E. coli* K12 $\Delta$ *hns* 株において, *casABC* と *cas2* の転写量が上昇することが明らかになっている (66). さらに, H-NS は *cas3-casA* 遺伝子間領域に強い結合親和性をもつこと (65, 67), H-NS は AT-rich な領域に結合しやすく (68), そこを核として bridging により周囲の DNA 領域に広がるように結合していく結合モデルが提唱されている (69). その後, Westra らによって, LysR-type transcription factor の LeuO が *casA* プロモーターと H-NS 結合サイトとの間に結合することで, H-NS による抑制を脱抑制することが示された (70). したがって, 大腸菌内において H-NS と LeuO の拮抗作用により CRISPR/Cas システムによる免疫獲得機構が制御されていると考えられている.



**Fig. 1-8. CRISPR/Cas システムの概要** (Horvath and Barrangou 2010, Fig. 2 より引用)

Overview of the CRISPR/Cas mechanism of action. (A) Immunization process: After insertion of exogenous DNA from viruses or plasmids, a Cas complex recognizes foreign DNA and integrates a novel repeat-spacer unit at the leader end of the CRISPR locus. (B) Immunity process: The CRISPR repeat-spacer array is transcribed into a pre-crRNA that is processed into mature crRNAs, which are subsequently used as a guide by a Cas complex to interfere with the corresponding invading nucleic acid. Repeats are represented as diamonds, spacers as rectangles, and the CRISPR leader is labeled L.

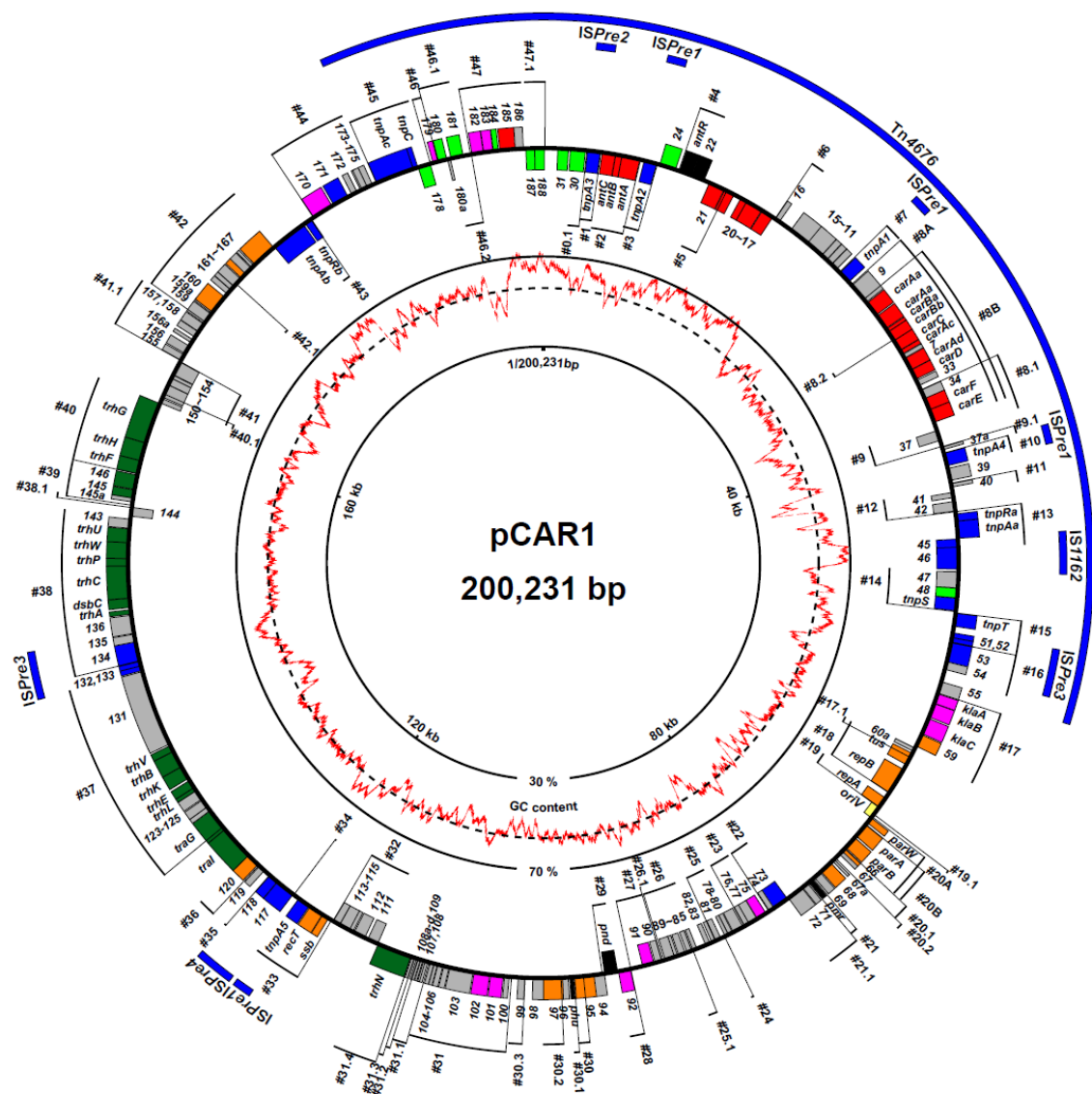


**Fig. 1-9. LeuO と H-NS による *cas* 遺伝子の発現制御** (Westra et al., 2010, Fig. 1 より引用)

A. Schematic illustration of the CRISPR/Cas locus in *E. coli* K12 that consists of eight *cas* genes [*cas3* (*ygcB*), *casA* (*ygcL* or *cse1*), *casB* (*ygcK* or *cse2*), *casC* (*ygcJ* or *cse4*) *casD* (*ygcI* or *cas5e*), *casE* (*ygcH* or *cse3*), *cas1* (*ygbT*) and *cas2* (*ygbF*)] and a downstream CRISPR locus containing 12 spacers and 13 repeats (CRISPR I). The *cas3*, anti-*cas3* (anti-*Pcas*), *casA* (*Pcas*) and CRISPR I promoter are indicated with an arrow (Pul *et al.*, 2010). B. qPCR analysis of *cas* gene transcript abundance in *E. coli* *Dhns* and *E. coli* W3110 expressing *leuO* (induced or non-uninduced). Fold changes are given as compared with *wt E. coli* W3110 expression levels. Error bars indicate one standard deviation.

## 7. 自己伝達性プラスミド pCAR1

筆者らの研究室では、原油中に含まれるヘテロ環式芳香族化合物 carbazole を唯一の炭素源・窒素源・エネルギー源として生育可能な *Pseudomonas resinovorans* CA10 株を活性汚泥中から単離し、その詳細な解析を行ってきた (71). 難分解性物質の分解遺伝子群もプラスミドによって細菌間を水平伝播することが多いが (72, 73, 74, 75), CA10 株の carbazole 代謝に必要な酵素をコードする *car* 遺伝子群もプラスミド pCAR1 上に存在していた (76, 77, 78). 筆者らのグループでは pCAR1 の全長約 200 kb の全塩基配列を決定し (Fig. 1-10) (79, 80, 81), pCAR1 がプラスミドの不和合性群という分類上 IncP-7 群に属することを示した (82). また、塩基配列情報から推定された pCAR1 の複製・保持・接合伝達に関わる機能の基本性質を明らかにした (83). これは IncP-7 群プラスミドの基本機能を詳細に解析した最初の例であった. IncP-7 群プラスミドは土壌・水圏・動物体内など環境に広く分布する *Pseudomonas* 属細菌間を接合伝達によって移動する (84). IncP-7 群のプラスミドとしては, toluene/xylene 分解プラスミド pWW53 (85), pDK1 (86, 87) や naphthalene 分解プラスミド pND6-1 (88), pAK5, pFME4, pFME5, pNK33, pNK43, pOS18, pOS19 (89) など近年急速に報告例が増加しており、環境中での分解関連遺伝子の重要な運び手の一つであることが示されつつある.



**Fig. 1-10. pCAR1 の全塩基配列** (高橋 2011, Fig. 1-3 より引用)

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

## 8. IncP-7 群プラスミドの接合伝達関連遺伝子と接合伝達

pCAR1 上には、*Proteus vulgaris* の Rts1 (IncT) (90), *Salmonella typhi* の R27 (IncHI) (91, 92), *Providencia rettgeri* の R391 (93), *S. enterica* の SGI1 (94) の接合伝達に関する Trh タンパク質や Tra タンパク質とアミノ酸レベルで 19~50% の相同性を示す ORF が存在する。また、同じ IncP-7 群に属する自己伝達性プラスミド pDK1 上には、それらと 83~99% の高い相同性を示す遺伝子群が存在する (95)。

ORF121<sub>pCAR1</sub> がコードするタンパク質(全長 900 アミノ酸)の N 末端側 373 アミノ酸は、R391 と R27 の TraI タンパク質(それぞれ全長 717 アミノ酸と 1,012 アミノ酸)の N 末端側とそれぞれ 36% と 32% の相同性を有する。R27 の TraI<sub>R27</sub> は relaxase に保存された 3 つのモチーフ (I~III) を持ち、*oriT* の位置で DNA に nick を入れ接合伝達を開始する機能を持つ relaxase であると考えられている (92, 96)。ORF121<sub>pCAR1</sub> タンパク質上には、relaxase のモチーフ I と II は明確には見いだせないが、モチーフ III は保存されていた。一方、ORF122<sub>pCAR1</sub> がコードするタンパク質は R391 の TraD<sub>R391</sub> と R27 の TraG<sub>R27</sub> とそれぞれ全長で 47% と 28% の相同性を示した。R27 の TraG<sub>R27</sub> は 2 つの膜貫通ドメインと ATP/GTP 結合モチーフ A を持ち、RP4 の TraG<sub>RP4</sub> や F プラスミドの TraD<sub>F</sub> のように anchoring/coupling タンパク質であると考えられている (97)。pCAR1 の ORF122<sub>pCAR1</sub> にも ATP/GTP 結合モチーフ A が存在する。上で述べた特徴は、ORF121<sub>pCAR1</sub> と ORF122<sub>pCAR1</sub> は接合時にそれぞれ relaxase と anchoring/coupling タンパク質として機能することを示唆している。そこで ORF121<sub>pCAR1</sub> と ORF122<sub>pCAR1</sub> を *traI*<sub>pCAR1</sub> と *traG*<sub>pCAR1</sub> と命名した (79, 98)。先に述べた Garcillan-Barcia らの分類に基づく、pCAR1 の TraI<sub>pCAR1</sub> の相同性に基づいて pCAR1 の接合伝達システムは MOB<sub>H</sub> に分類される (99)。

Rts1 の *oriT* 領域 (455 bp) は ORF251<sub>Rts1</sub> と ORF252<sub>Rts1</sub> の遺伝子間領域に存在する。pCAR1 の ORF155<sub>pCAR1</sub> は Rts1 の ORF252<sub>Rts1</sub> と 43% の相同性を示す。pCAR1 の TraI<sub>pCAR1</sub> と Rts1 の TraI<sub>Rts1</sub> が高い相同性を示すことから、これら 2 つのプラスミドの *oriT* も互いに相同性があると思われる。実際に、pCAR1 の ORF155<sub>pCAR1</sub> 近傍に 465 bp からなる推定 *oriT* 領域が存在し、Rts1 の *oriT* 領域と 42% の相同性を示した。Rts1 の *oriT* 領域には Tra タンパク質が認識すると思われる 3 つの逆方向反復配列が存在するが、pCAR1 上の推定 *oriT* 領域にも 2 つの逆方向反復配列が存在する (79, 98)。

ORF145<sub>pCAR1</sub> と ORF146<sub>pCAR1</sub> は Rts1 と R391 上にコードされる機能未知タンパク質と部分的な相同性を示した。ORF145<sub>pCAR1</sub> と ORF146<sub>pCAR1</sub> を欠失した pCAR1 を保持する *P. putida* KT2440 株から、pCAR1 を保持しない KT2440 株への接合伝達頻度は、野生型の pCAR1 と比較して約 1/100 以下まで減少することが示されている (100)。IncP-7 群プラスミドのミニレプリコンを *Pseudomonas* 属細菌内にエレクトロポレーションによって導入した結果、接合伝達では IncP-7 群プラスミドを受容できない細菌であっても、ミニレプリコンを有する形質転換体を得られた (98)。このことは、複製能によって決められる IncP-7 群プラスミドの宿主域の方が、接合伝達能によって決められる宿主域よりも広く、接合伝達の成否に



よって IncP-7 群プラスミドの宿主域が決められることを示している (82, 98).

IncHI プラスミドの性繊毛は「柔らかく」、接合伝達頻度は土壌のような「固い」環境中に比べて水環境中の方が高いという性質がある (18). このことから、IncHI の性繊毛と相同性のある pCAR1 の性繊毛も「柔らかく」、水環境中において効率的に接合伝達すると考えられる. IncHI プラスミドのもう一つの特徴として、温度依存的な接合伝達機構があり、接合伝達頻度が 25~30°C で最大となり、温度が上昇するにつれて減少する (101). また、R27 には核様体タンパク質 (nucleoid-associated proteins, NAPs) の一種である H-NS (Histone-like Nucleoid Structuring) 様タンパク質と、H-NS のホモログであり DNA 結合領域を欠失した Hha 様タンパク質 (大腸菌内での温度、浸透圧依存的な病原遺伝子の発現に関与するタンパク質) がコードされているが (92), R27 上の NAPs や大腸菌染色体上の NAPs を破壊すると、野生型 R27 は接合伝達できない 33°C でも接合伝達が可能となる (57). しかし、*P. putida* HS01 株から *P. fluorescens* IAM112022RG 株への pCAR1 の接合伝達頻度は 25°C, 37°C, 42°C の条件下では差は認められず (102), pCAR1 の接合伝達機構が IncHI プラスミドとは異なる可能性が示唆されている. また、実験室内環境で *Pseudomonas* 属に属する 5 株の pCAR1 の保持菌 (供与菌) と *Pseudomonas* 属・非 *Pseudomonas* 属細菌 10 株との接合実験を行ったところ、供与菌の種類によって pCAR1 の接合伝達頻度が変化すること、*P. putida* HS01 株を供与菌とした際には、*P. resinovorans* CA10 株や *P. putida* KT2440 株を供与菌とした場合よりも接合伝達体が検出される受容菌の種類が多いことが示された (102). この実験では、*Pseudomonas* 属細菌以外への pCAR1 の接合伝達は認められなかった. また、*P. putida* KT2440 株を受容菌にした場合のように、供与菌の組み合わせによっては同じ種への接合伝達が検出できない例もあった.

## 9. pCAR1 上にコードされた核様体タンパク質

上記 5. で述べたように、核様体タンパク質 (nucleoid-associated proteins, NAPs) は細菌の DNA と結合し、コンパクトに折りたたまれた核様体と呼ばれる構造を形成することで、多くの遺伝子の転写を制御する global regulator として機能する.

pCAR1 上には HU ホモログ Phu (plasmid-encoded HU-like protein), H-NS 様因子である MvaT ホモログ Pmr (plasmid-encoded MvaT-like regulator), NdpA ホモログ Pnd (plasmid-encoded NdpA-like protein) の 3 種類の NAPs がコードされている (54). これまでに行われた、*pmr* を破壊した KT2440(pCAR1) 株のトランスクリプトーム解析の結果から、Pmr が stealth 機能 (上記 5. 参照) を有することが示された (103). また、ChAP-chip (chromatin affinity purification cupled with high density tiling chip) 解析から、Pmr は AT-rich な領域を好んで結合することが明らかになった. さらに、Pmr は自身と多量体を形成するほか、KT2440 染色体上にコードされた H-NS 様因子の TurA, TurB とも相互作用して多量体を形成することが示された (104). *phu* と *pnd* をそれぞれ単独で破壊した場合は表現型に顕著な変化は見られたのに対し、*pmr* と *phu*, *pmr* と *pnd* の二重破壊株では、継代

培養を行うことで pCAR1 の構造が変化, または脱落が高い頻度で生じること (100), さらにバイオフィーム中で宿主菌体の繊維状化が促進されること (Lee et al., unpublished data) が示された.

## 10. 環境中における pCAR1 の接合伝達と宿主城

IncP-7 群プラスミドは一般に狭宿主域であり, 主に *Pseudomonas* 属細菌を宿主とすると考えられていた (84). しかし, 環境試料 (雑多な環境細菌を含む混合物) を受容菌群として接合実験を行ったところ, CAR 存在下という選択圧下では *Pseudomonas* 属細菌が接合伝達体として多く検出されたものの, 非選択圧下では *Stenotrophomonas* 属細菌のみが接合伝達体として検出された (105). *Pseudomonas* 属以外の細菌が IncP-7 群プラスミドを保持することは, この実験において初めて見いだされた事象である. これまでの実験室内環境での接合実験では, *P. putida* KT2440(pCAR1)から *Stenotrophomonas* 属細菌への接合伝達は認められていないことから (106), 自然環境中の何らかの物質が接合伝達を促進した可能性や, 他の細菌を経由して pCAR1 が水平伝播した可能性が考えられる. また, カルバゾール非存在下で *Pseudomonas* 属細菌以外が主要な宿主であった事実から考えると, 特別な選択圧がかからない自然環境下では, 必ずしも *Pseudomonas* 属細菌が IncP-7 群プラスミドの主要な宿主ではない可能性が考えられる. すなわち, *Pseudomonas* 属細菌は人為的な培地での生育の早さなどのバイアスによって, より頻繁に IncP-7 群プラスミドの宿主として検出されたもので, 実際の自然環境中では IncP-7 群プラスミドはより広範な細菌に保持されていると推測されている (105).

また, 我々は pCAR1 のモデル環境中での振る舞いを調べるために, 実際の土壌や環境水を模したモデル環境試料にカルバゾールを添加後, pCAR1 を保持する *P. putida* と 15 株の pCAR1 非保持菌株を接種し, カルバゾール残存量変化, 菌体数変化, 接合伝達のモニタリングを行った (107). その結果, 接合伝達体はモデル水環境中から検出されたが, モデル土壌中からは検出されなかったことから, pCAR1 は水環境中で伝達し易いことが示唆された. モデル水環境の成分分析の結果, 接合伝達体が出現した河川水や湖沼水と比較して, 接合伝達体が出現しなかった対照区 (リン酸系バッファー) では  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{SO}_4^{2-}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{2+}$  が検出されなかった. そこで, リン酸バッファーにこれらのイオンを添加し接合実験を行ったところ,  $\text{Ca}^{2+}$  もしくは  $\text{Mg}^{2+}$  を添加した際に接合伝達体が出現した. 添加するイオンの濃度を 1/10 に減少させても接合伝達体が検出されたことから, 少なくとも  $39.9\ \mu\text{M}$  の  $\text{Ca}^{2+}$  もしくは  $37\ \mu\text{M}$  の  $\text{Mg}^{2+}$  が存在すれば, pCAR1 が接合伝達することが示された (107). 対照的に, スラリー状のモデル土壌の上部に溜まった水層に存在するフミン酸が pCAR1 の接合伝達を阻害する現象も観察されている. フミン酸は二価の陽イオンをキレートすることが知られていることから, 水層の  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  イオン濃度が pCAR1 の接合伝達には不十分であったことが上記の阻害効果の原因と思われる. また, 接種する pCAR1 保持菌株を *P. chlororaphis*, *P. fluorescens*, *P. resinovorans* に変えて同様の実験を行ったところ, *P.*

*chlororaphis* を pCAR1 保持菌株として接種したサンプルのみ接合伝達体が出現した。興味深いことに、出現した接合伝達体は *P. putida* を pCAR1 保持菌株として接種したときと同様、すべて *P. resinovorans* であった (107, 108)。各モデル環境試料中に接種した pCAR1 の宿主とそれ以外の細菌 15 株には、供与菌・受容菌を一種類ずつ用いた接合実験では pCAR1 が接合伝達可能な組み合わせが複数存在するにもかかわらず (102)、試料から接合伝達体を検出できたのは、そのうちの一部にとどまった。従って pCAR1 の宿主によっては陽イオンの存在がその接合伝達に寄与しない可能性も考えられる。これらのことは、二価の陽イオンが環境中での pCAR1 の宿主域にも影響を与えている可能性を示唆している。

## 11. 本研究の目的と内容

本研究では、プラスミドの接合伝達の成否を決める環境因子とその作用機構を明らかにするために、pCAR1 の接合伝達に関与する新規因子の探索を試みた。

これまでプラスミドの宿主域は、限定された種類の細菌を用いた試験管レベルでの解析を元に議論されてきた。しかし、環境中には未培養・難培養の菌が大量に存在し、人為的な培地で培養できる細菌は全体の 1% にも満たないことが知られている。すなわち、以前の宿主域についての情報が実環境での振る舞いを十分反映しているとは考え難い。そこで第 2 章では、従来の寒天培地を用いた接合伝達体の検出方法の他に、培養を介さない接合伝達体の検出方法を導入し、IncP-7 群プラスミドの実環境中における“真の”宿主域の解析を試みた。

pCAR1 のモデル環境中での挙動解析の結果、pCAR1 の接合伝達には環境中に  $\text{Ca}^{2+}$  もしくは  $\text{Mg}^{2+}$  が存在する必要性があることが示された。そこで、第 3 章では、環境中の  $\text{Ca}^{2+}$  と  $\text{Mg}^{2+}$  の有無が他のプラスミドの接合伝達にも影響を与えるか、また、 $\text{Ca}^{2+}$  と  $\text{Mg}^{2+}$  の濃度が pCAR1 の接合伝達頻度を与える影響を定量的に評価した。

第 4 章では、環境中の  $\text{Ca}^{2+}$  と  $\text{Mg}^{2+}$  の有無が pCAR1 の接合伝達に与える影響を網羅的に解析する為に、Pf0-1L(pCAR1::rfp) 株を供与菌、KT2440 株を受容菌として接合実験を行い、 $\text{Ca}^{2+}$  及び  $\text{Mg}^{2+}$  添加・非添加、供与菌及び受容菌単独・混合時における染色体とプラスミドのトランスクリプトームデータを取得し、解析を行った。

pCAR1 上には 3 種類の核様体タンパク質 (NAPs) がコードされている。他のプラスミドで、プラスミド上にコードされる NAPs が接合伝達の制御に関わることが知られており、pCAR1 もこれら 3 種類の NAPs が接合伝達に関わる可能性が考えられる。そこで第 5 章では、*phu*, *pmr*, *pnd* を単独、あるいは複数破壊した際の接合伝達頻度や接合関連遺伝子の転写変動を調べた。

## 第 2 章

# IncP-7 群カルバゾール分解プラスミド pCAR1 の実環境中における宿主域の解析

### 2-1. 緒言

相手を限定しない様々な細菌との接合実験を行うために、湖沼水や土壌から細菌画分を抽出し、環境細菌と供与菌との液体接合を行った。接合実験サンプルとしては、①環境、②供与菌、③カルバゾール添加の有無、の 3 つの条件の全ての組み合わせを作製した。供与菌を接種後、経時的に 3 種類の寒天培地に塗布し、出現したコロニーの蛍光を目視で観察することで接合伝達体候補株検出し、遺伝子解析を行った。また、接合伝達が起こりやすいように環境サンプル中の細菌を濃縮した接合伝達実験も行った。

難培養性細菌も含めた実環境中の全ての細菌を対象として pCAR1 の宿主域を解析することで、プラスミドの実環境中における振る舞いについて新たな知見が得られることが期待される。そこで、環境細菌と供与菌との液体接合実験後に回収した細菌画分を FACS にて測定し、ゲート内に検出された粒子の分取を行った。分取した粒子を寒天培地に塗布し、生育したコロニーの遺伝子解析を試みた。

なお、本章の内容は、修士課程から博士課程 1 年目までの研究内容であり、その後、共同研究者である新谷政己現静岡大学准教授が中心となって研究を進め、論文として発表された。

### **“Single-Cell Analyses Revealed Transfer Ranges of IncP-1, IncP-7, and IncP-9 Plasmids in a Soil Bacterial Community “**

Masaki Shintani, Kazuhiro Matsui, Jun-ichi Inoue, Akira Hosoyama, Shoko Ohji, Atsushi Yamazoe, Hideaki Nojiri, Kazuhide Kimbara, Moriya Ohkuma

Applied and Environmental Microbiology, Volume 80, Number 1, p. 138-145, 2014

## 2-2. 実験材料及び方法

### 2-2-1. 使用した菌株，プラスミド，培地，及び培養条件

本章で培地に添加した抗生物質終濃度を Table 2-1 に，使用した菌株を Table 2-2 に [SM1443(pCAR1::gfp)の作製は補章 1 参照]，用いた 3 種類の培地を Table 2-3 に示した．寒天培地は 1/3LB medium と SAC medium では 1.6% (wt/vol) となるように微生物培養用精製寒天末 (Nakarai Teque, Inc., Kyoto, Japan) を加え，R2A medium は R2A Ager (Becton Dickinson) を用いた．各種 *Pseudomonas* 属細菌はそれぞれが耐性を持つ抗生物質を加えた 1/3LB 培地にて 30℃ で培養した．接合伝達体候補株の培養にはその菌株が検出された培地を用いた．

Table 2-1. 本章で使用した抗生物質

抗生物質 (略称)	終濃度	溶媒
Cycloheximide (Ch)	1 mg/ml	EtOH
Gentamicin (Gm)	15 µg/ml	H <sub>2</sub> O
Kanamycin (Km)	50 µg/ml	H <sub>2</sub> O
Rifampicin (Rif)	25 µg/ml	MeOH

### 2-2-2. 環境サンプルからの環境細菌の抽出

補章 2, 3 に手順の詳細を記し，ここでは概要のみ記述する．水環境から環境細菌を抽出するために，三四郎池（東京都文京区）の湖沼水を採取した．接合実験に用いる前処理として，孔径 5 µm と孔径 3 µm の濾紙を用いて吸引ろ過し，粗い粒子や原生動物を除去した．

土壌環境から環境細菌を抽出するために，東京大学圃場の黒ボク土を採取し，土壌抽出液を作製した．接合実験に用いる前処理として，孔径 5 µm と孔径 3 µm の濾紙を用いて吸引ろ過し，粗い粒子や原生動物を除去した．

抽出した環境細菌画分を 500 ml 容のガラス製容器に 100 ml 入れ，30℃ で静置した．

### 2-2-3. 環境細菌画分の濃縮

補章 4 に手順の詳細を記し，ここでは概要のみ記述する．抽出した環境細菌画分を，孔径 0.2 µm のメンブレンフィルター上に捕集し，滅菌環境水を用いて捕集した細菌を再懸濁した．懸濁液を 2 ml 容チューブに 1 ml ずつ分注した．

Table 2-2. 使用した菌株とプラスミド

菌株とプラスミド	関連する性質 <sup>a,b</sup>	入手先または参考文献
菌株		
<i>Pseudomonas chlororaphis</i> IAM1511L(pCAR1:: <i>rfp</i> )	IAM1511 with <i>lacI<sup>q</sup></i> , pCAR1:: <i>rfp</i>	108
<i>Pseudomonas putida</i> KT2440RG	Derivative of KT2440, spontaneous-Rif <sup>r</sup> , with introduced Gm <sup>r</sup> gene	102
<i>P. putida</i> KT2440RG(pCAR1:: <i>gfp</i> )	KT2440RG carrying pCAR1:: <i>gfp</i>	This study
<i>P. putida</i> KT2440RG(pCAR1:: <i>rfp</i> )	KT2440RG carrying pCAR1:: <i>rfp</i>	This study
<i>P. putida</i> SM1443(pCAR1:: <i>gfp</i> )	SM1443 (a derivative strain of KT2440) carrying pCAR1:: <i>gfp</i>	This study
<i>P. putida</i> SM1443(pCAR1:: <i>rfp</i> )	SM1443 (a derivative strain of KT2440) carrying pCAR1:: <i>rfp</i>	105
<i>Pseudomonas resinovorans</i> CA10L(pCAR1:: <i>rfp</i> )	CA10dm4 with <i>lacI<sup>q</sup></i> , pCAR1:: <i>rfp</i>	108
プラスミド		
pCAR1	Isolated from CA10, carries the <i>car</i> and <i>ant</i> operons, IncP-7 group self-transmissible	79, 80
pJBA28	Ap <sup>r</sup> -, Km <sup>r</sup> -, delivery plasmid for mini-Tn5-Km-P <sub>AI/04/03</sub> -RBSII- <i>gfp</i> mut3*-T <sub>0</sub> -T <sub>1</sub>	109

<sup>a</sup>Ap<sup>r</sup>, Gm<sup>r</sup>, Km<sup>r</sup>, Rif<sup>r</sup>はそれぞれ ampicillin, gentamicin, kanamycin, 及び rifampicin への耐性を示す

<sup>b</sup>*rfp* は pCAR1 上の ORF186 内部に逆向きに, *gfp* は pCAR1 上の ORF9 内部に正向きに挿入されている

Table. 2-3. 本章で使用した培地

1/3LB medium	R2A medium		SAC medium		
Bacto tryptone	3.33 g	Yeast extracte	0.5 g	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	2.2 g
Yeast extracte	1.67 g	Proteose peptone No. 3	0.5 g	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.8 g
NaCl	3.33 g	Casamino Acids	0.5 g	NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	3.0 g
1N NaOH	1.67 ml	Dextrose	0.5 g	FeCl•6H <sub>2</sub> O	0.01 g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1.47 g	Soluble Starch	0.5 g	MgSO <sub>4</sub> •7H <sub>2</sub> O	0.2 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.53 g	Sodium Pyruvate	0.3 g	CaCl <sub>2</sub> •2H <sub>2</sub> O	0.01 g
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	2.00 g	Dipotassium Phosphate	0.3 g	Disodium Succinate Hexahydrate	2.0 g
pH 7.0		Magnesium Sulfate	0.05 g	Sodium Acetate Trihydrate	2.0 g
	per litter		per litter	Trisodium Citrate Dihydrate	2.0 g
					per litter

固体培地は1/3LB mediumとSAC medium (Shintani *et al.*, 2008a) では1.6% (wt/vol) となるように微生物培養用精製寒天末 (Nakarai Teque, Inc., Kyoto, Japan) を加え, R2A mediumはR2A Ager (Becton Dickinson) を用いた.

#### 2-2-4. 環境細菌画分中の菌体数測定及び供与菌の接種

補章 5 に手順の詳細を記し、ここでは概要のみ記述する．環境細菌画分中の菌体数と供与菌の比を 10:1 にするために、環境細菌画分中の菌体数と供与菌の菌体数を測定した．測定方法は、細菌を蛍光色素で染色し蛍光顕微鏡で観察される 1 視野当たりの菌体数からサンプル中の菌体数を計算する方法を用いた．

蛍光色素として、生細胞の 2 本鎖 DNA を選択的に染色する SYBR Green I (INVITROGEN) を用いた、SYBR Green I は 2 本鎖 DNA に結合すると青色光 (488 nm) により励起し、緑色 (522 nm) の蛍光を発する．染色した菌体を孔径 0.22  $\mu\text{m}$  のメンブレンフィルターに捕集し、蛍光顕微鏡 (対物レンズ 100 倍) の 1 視野における菌体数を測定した．懸濁液 1 ml 当たりの生菌体数を下記の式を用いて算出した．

$$\text{菌体数 (cells/ml)} = 1 \text{ 視野菌体数 (対物レンズ 100 倍)} \times 3645 \times \text{希釈率}$$

菌体数が環境細菌画分の 1/10 となるように希釈した供与菌を環境細菌画分に接種し、30℃で 1 week 静置した．接合条件は、①環境細菌 (湖沼水、土壌)、②供与菌 [SM1443(pCAR1::gfp), SM1443(pCAR1::rfp), IAM1511L(pCAR1::rfp), CA10L(pCAR1::rfp)], ③CAR 添加 (100 ppm) の有無、の 3 つの条件の全ての組み合わせ (計 16 サンプル) を作製した．CAR は 0.01 g/ml DMSO 溶液として 1 ml 加えた．同時に、寒天培地上での菌体数測定も行った．環境細菌画分を適宜希釈し、R2A、及び 1/3 寒天培地に塗布し、30℃で 1 week 培養後、CFU を測定した．

次に、濃縮した環境細菌画分を用いた接合実験を行った．接合条件は上記の①、②の 2 つの条件の組み合わせ (計 8 サンプル) を作製した．

#### 2-2-5. 接合伝達能の確認

補章 6 に手順の詳細を記し、ここでは概要のみ記述する．環境細菌画分への供与菌の接種と平行して、接種した供与菌と、pCAR1 を接合伝達により受容できる既知の受容菌 (*P. putida* KT2440RG) との接合実験を行い、接種した供与菌が他の菌株にプラスミドを接合伝達することを確認した．

#### 2-2-6. 接合伝達体の検出

供与菌を接種した環境細菌画分から経時的にサンプルを採取し、適宜希釈して 100  $\mu\text{l}$  を寒天培地に塗布した．本実験では R2A, 1/3LB, SAC にそれぞれ Km と Ch を加えた 3 種類の寒天培地を用いた．サンプルを塗布した寒天培地は 30℃



で静置培養した。

濃縮した環境細菌画分に供与菌を接種したサンプルは、接種 1 週間後に上記と同様に寒天培地に塗布した。

寒天培地上に生じたコロニーを、Clare Chemical Research 社製の Dark Reader DR45M Transilluminator（通称：ダークリーダー）を用いて観察した（補章 7 参照）。pCAR1::*rfp* を保持する供与菌を接種したサンプルからは赤色蛍光を示すコロニーを、pCAR1::*gfp* を保持する供与菌を接種したサンプルからは緑色蛍光を示すコロニーを接合伝達体候補株（以後候補株と呼ぶ）として検出した。

#### 2-2-7. 接合伝達体であることの確認

本章で使用した PCR 用プライマーを Table 2-4 に示す。本研究で新たに設計した *lacI*-F, *lacI*-R については、*E. coli* DH1 と *E. coli* BL21(DE3) の *LacI* 遺伝子の塩基配列から、Primer3 ver 0.4.0 ([http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3\\_www.cgi](http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi)) を用いて設計し、Sigma genosis 社に委託して合成したものを用いた。まず、候補株から total DNA を抽出した（補章 8 参照）。次に、得られた候補株が供与菌ではないことの確認として、供与菌の染色体上に挿入した *lacI* を PCR（補章 9 参照）により増幅し、アガロースゲル電気泳動（補章 10 参照）を行いバンドの有無を確認した。次に、候補株が pCAR1 を保持していることの確認として、pCAR1 上の遺伝子である *repA*（プラスミドの複製に必要な遺伝子）、*carF*（CAR 代謝遺伝子）、*traI*（プラスミドの接合伝達に必要な遺伝子）、*rfp*（赤色蛍光タンパク質をコードする遺伝子、pCAR1::*rfp* の確認のみに使用）を PCR（補章 9 参照）により増幅し、アガロースゲル電気泳動を行いバンドの有無を確認した。*lacI* の増幅が検出されず、*repA*、*carF*、*traI*、*rfp* の増幅が検出されれば、その菌株は接合伝達体である。

PCR は抽出した total DNA を鋳型として、Table 2-4 に示す染色体上もしくは pCAR1 上の領域を増幅するプライマーセットを用いて行った。昇温プログラムは全て共通で、96°C（2 min）、[96°C（20 sec）、60°C（20 sec）、72°C（30 sec）] × 30 サイクル、72°C（7 min）である。補章 9 に PCR 反応の詳細を記した。

#### 2-2-8. 濃縮した細菌画分からの鉱物等の粒子の除去

環境サンプル中に含まれる鉱物等の自家蛍光を示す粒子は、FACS において強い蛍光を示す粒子として検出されてしまう。そこで、histodenz を用いた遠心（補章 11 参照）を行い、密度の違いを利用して、濃縮した環境細菌画分から細菌以外の粒子を除去し（以後 histodenz 処理と呼ぶ）、新たに環境細菌画分とした。これを試験管に移し、今後の実験に用いた。

**Table 2-4. 本章で用いたプライマー**

名称	配列 (5' to 3')	参考文献
供与菌の染色体上の遺伝子の増幅		
lacI-F	TGGTGGTGTCTGATGGTAGAA	This study
lacI-R	GCATTAATGAATCGGCCAAC	This study
pCAR1 保持の確認		
probe08-F	TTGGGATTTACGGGACTGCT	Shintani <i>et al.</i> , 2008b
probe08-R	TCGGATGCCTATCAACGATT	Shintani <i>et al.</i> , 2008b
carF-F	GCAAAGGTAGCAATTATCGGGTCG	Takahashi <i>et al.</i> , 2009b
carF-R	CGCCTTTCCTTTCGATGCTCCGCC	Takahashi <i>et al.</i> , 2009b
traI-F	CGAAGAGCCGTCACAGTTTTT	Shintani <i>et al.</i> , 2005a
traI-R	TTCCTGATGCTCACTCAGCG	Shintani <i>et al.</i> , 2005a
rfp-F2	GGAGGCCACAATACCGTAAA	Shintani <i>et al.</i> , 2008a
rfp-R2	CGTCCCTCGGTTCTTTCATA	Shintani <i>et al.</i> , 2008a
16S rRNA 遺伝子の増幅		
27F	AGAGTTTGATCMTGGCTCAG	Heuer <i>et al.</i> , 1997
1378R	CGGTGTGTACAAGGCCCGGAACG	Heuer <i>et al.</i> , 1997

本研究で新たに設計した lacI-F, lacI-R については, *E. coli* DH1 と *E. coli* BL21 (DE3) の LacI 遺伝子の塩基配列から, Primer3 ver 0.4.0 ([http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3\\_www.cgi](http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi)) を用いて設計し, Sigma genosys 社に委託して合成したものを用いた.

#### 2-2-9. Histodenz 混入による接合伝達への影響の調査

細菌画分中への histodenz の混入が接合伝達頻度に影響を与えるか調べるために、histodenz を混入させた培地中で SM1443(pCAR1::*rfp*)と KT2440RG との液体接合実験を行い、接合伝達頻度の変化を調べた。

SM1443(pCAR1::*rfp*)と KT2440RG をそれぞれ 1/3LB+Km, 1/3LB+Gm+Rif 液体培地で一晚培養後、それぞれの培養液 1 ml から菌体を 15,000 rpm, 2 min で遠心し、上清を捨てた。菌体を 1 ml の 1/3LB に再懸濁し遠心後上清を捨て洗浄した。集菌した菌体をそれぞれ①1 ml の 1/3LB 液体培地、②0.13 g/ml histodenz 1/3LB 溶液、③0.65 g/ml histodenz 1/3LB 溶液の 3 通りで再懸濁した。菌懸濁液を適宜希釈し、SM1443(pCAR1::*rfp*)は 1/3LB+Km, KT2440RG は 1/3LB+Gm+Rif 寒天培地に塗布し、30℃で静置培養した。生育したコロニーの数から供与菌と受容菌の CFU を測定した。

また、histodenz の濃度が同じ供与菌懸濁液 200 µl と受容菌懸濁液 200 µl (上記供与菌①と受容菌①、供与菌②と受容菌②、供与菌③と受容菌③)を 2 ml 容チューブ内で混合し、30℃で一晩静置した。次に、菌懸濁液を適宜希釈後、1/3LB+Km+Gm+Rif 寒天培地に塗布し、30℃で静置培養した。生育したコロニーの数から接合伝達体の CFU を測定した。

接合伝達体の CFU を供与菌の CFU で割った値を計算し、各量の histodenz 混入時における接合伝達頻度を算出した。

#### 2-2-10. 濃縮環境細菌画分中の菌体数測定及び供与菌の接種

接合条件として、①histodenz 処理した濃縮環境細菌画分 (湖沼水、土壌)、②供与菌 [SM1443(pCAR1::*gfp*), SM1443(pCAR1::*rfp*), IAM1511L(pCAR1::*rfp*), CA10L(pCAR1::*rfp*)], の 2 つの条件の組み合わせ (計 8 条件) を作製した。供与菌接種後、30℃で 1 週間静置した。

#### 2-2-11. 接合伝達体の検出・分取系の構築

FACS により接合伝達体の検出及び分取を行った。FACS はシース液によりサンプル液に圧力を加え、サンプル流の流径を小さくし、液滴を作製する。液滴中の粒子や細胞にレーザーを照射し、それによって生じた前方散乱光 (forward scatter : 粒子の大きさを反映)、側方散乱光 (side scatter : 粒子の内部構造を反映)、及び蛍光を検出することで、個々の粒子の物理・生物学的性質を測定する装置である。

本研究ではハイスピードセルソーター MoFlo XDP (BECMAN COULTER) を用いた。MoFlo XDP は 100 MHz でシグナルをサンプリングすることにより、1

秒間に 10 万個のデータ解析と 7 万個の分取が可能である。また、固体青色レーザー（488 nm, 200 mW）や固体 UV レーザー（355 nm, 100 mW）など 1 光路最大 3 本までのレーザーと、最大 18 個の蛍光検出器を搭載することもできる。

本章では、蛍光タンパク質を発現する菌株と発現が抑制されている菌株（供与菌）を FACS で測定することで、蛍光タンパク質を発現している細胞が検出される領域（ゲート）を設定した。

実際の実験操作として、まず RFP 発現株 KT2440RG(pCAR1::*rfp*)、及び GFP 発現株 KT2440RG(pCAR1::*gfp*)をそれぞれ 1/3LB+Km+Gm+Rif 液体培地に、RFP の発現が抑制されている菌株 SM1443(pCAR1::*rfp*)、及び GFP の発現が抑制されている菌株 SM1443(pCAR1::*gfp*)（供与菌）をそれぞれ 1/3LB+Km 液体培地に植菌し、30℃で培養した。その後集菌し、CF buffer で再懸濁後適宜希釈した。これらの菌懸濁液をそれぞれ FACS に供し、液中の細胞の前方散乱、側方散乱、赤色蛍光、緑色蛍光を測定した。得られた個々の粒子のデータから、縦軸を前方散乱、横軸を蛍光強度としたドットプロットを作製した。このドットプロット上にて、蛍光タンパク質を発現している細胞のみが検出されるゲートを設定した。

#### 2-2-12. 接合伝達体の検出・分取

まず、供与菌を接種していない環境細菌画分と供与菌を接種した環境細菌画分を測定し、供与菌接種によりゲートに検出される粒子の数が優位に増加することを確認した。次に、供与菌を接種した環境細菌画分から、ゲート内に検出された粒子を 2 ml 容チューブに分取した。2 ml 容チューブには 1 ml の滅菌環境水を予め分注しておいた。

分取には純度優先モードを使用した。このモードでは、目的の粒子が含まれる液滴の前後の液滴に目的外の粒子が含まれていると、その目的の粒子に分取しない設定である。純度優先モードを使用することで、分取する粒子の 99%以上が目的の粒子となる。

#### 2-2-13. 接合伝達体の解析の前処理

培養せずに 1 細胞の遺伝子解析を行うことはこの研究を開始した当初は困難であったため、本章では以下の 2 通りの方法での解析を試みた。

##### I. コロニー形成による解析

分取した粒子をそれぞれ Km（pCAR1 上に耐性遺伝子あり）と Ch（カビなどの真核生物の生育を抑制するため）を添加した R2A、及び 1/3LB 寒天培地に塗

布し、生育したコロニーの解析を試みた。

## II. マイクロコロニー形成による解析

マイクロマニピュレータは土壌圏科学研究室にお借りして実験を行わせて頂いた。

分取した粒子を蛍光顕微鏡にて観察し、赤色蛍光もしくは緑色蛍光を示す細菌をマイクロマニピュレータを用いて菌体捕集用の孔径 0.22  $\mu\text{m}$  ポリカーボネート製黒色メンブレンフィルター (MILLIPORE) 上に分取した。メンブレンフィルターを Km と Ch を添加した R2A 寒天培地上に乗せ、30℃で静置培養した。

培養後、メンブレンフィルターを蛍光顕微鏡で観察し、赤色蛍光もしくは緑色蛍光を示すコロニー、もしくはマイクロコロニーの解析を試みた。

### 2-2-14. 接合伝達体の解析

一般に、細菌の分類は保存性の高い 16S rRNA の配列の類似性により決定することができる。そこで本研究では、接合伝達体から抽出した total DNA (補章 8 参照) を鋳型として PCR により 16S rRNA 遺伝子を増幅した (補章 12 参照)。増幅した DNA 断片のエタノール沈殿 (補章 13 参照) 後、制限酵素処理 (補章 14 参照) を行い、アガロースゲル電気泳動による RFLP 解析を行った。制限酵素は *Sau3A1* ( $\downarrow$  GATC) を用いた。

PCR は抽出した total DNA を鋳型として、Table 2-4 に示す 16S rRNA 遺伝子を増幅するプライマーセットを用いて行った。昇温プログラムは、95℃ (5 min), [95℃ (1 min), 55℃ (1 min), 72℃ (1.5 min)]  $\times$  30 サイクル, 72℃ (7 min) である。なお、補章 12 に手順の詳細を記し、ここでは概要のみ記述した。

## 2-3. 結果

### 2-3-1. 環境細菌画分中の菌体数測定

SYBR Green I で染色した環境細菌画分を蛍光顕微鏡で観察した (Fig. 2-1 に一例を示す). その結果, 湖沼水サンプルでは約  $10^5 \sim 10^6$  cells/ml, 土壌サンプルでは  $10^5 \sim 10^7$  cells/ml の環境細菌が観察された. また, 環境細菌画分を R2A, 及び 1/3 寒天培地に塗布した結果, 湖沼水サンプルでは R2A 寒天培地上で  $10^4 \sim 10^5$  CFU/ml, 1/3LB 寒天培地上で  $10^3 \sim 10^4$  CFU/ml, 土壌サンプルでは R2A 寒天培地上で  $10^5 \sim 10^6$  CFU/ml, 1/3LB 寒天培地上で  $10^5 \sim 10^6$  CFU/ml の環境細菌が生育した.

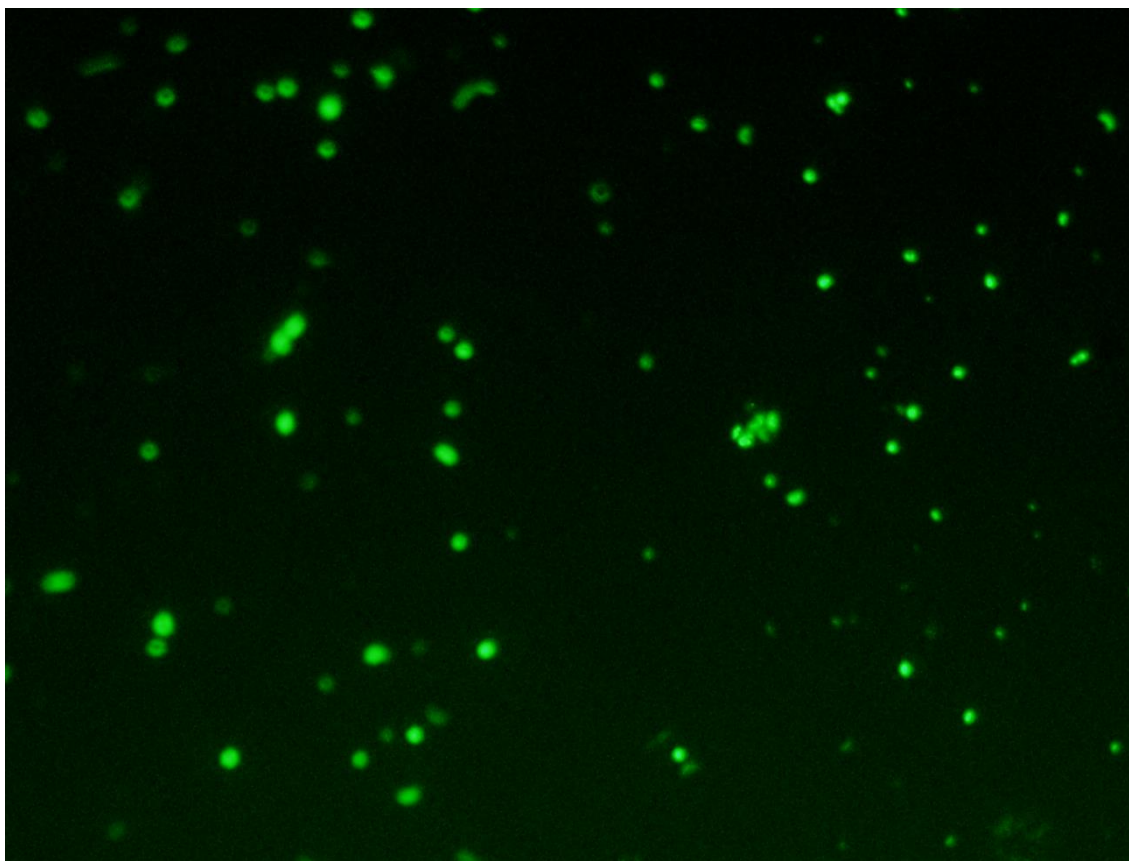
濃縮した環境細菌画分を蛍光顕微鏡で観察した結果, 湖沼水サンプルでは約  $10^7 \sim 10^9$  cells/ml, 土壌サンプルでは  $10^7 \sim 10^9$  cells/ml の環境細菌が観察された.

### 2-3-2. 接合伝達能の確認

本実験で用いた全ての供与菌から接合伝達体が検出された. 接合伝達頻度 (接合伝達体 / 供与菌) はそれぞれ SM1443(pCAR1::*gfp*) で  $10^{-7} \sim 10^{-5}$ , SM1443(pCAR1::*rfp*) で  $10^{-3} \sim 10^{-2}$ , CA10L(pCAR1::*rfp*) で  $10^{-8} \sim 10^{-6}$ , IAM1511L(pCAR1::*rfp*) で  $10^{-8} \sim 10^{-9}$  であった. また, 得られた接合伝達体をダークリーダーで観察したところ, 蛍光を示すことが確認された.

### 2-3-3. 接合伝達体候補株の検出

Table 2-5 に各試行において用いた環境サンプルと供与菌, 及び蛍光を示すコロニーの検出結果のまとめを示した. 供与菌摂取後の環境細菌画分を塗布した寒天培地をダークリーダーを用いて観察したところ, 蛍光を示すコロニーが検出された (Fig. 2-2 に一例を示す). 候補株が検出された Run 7 における各接合条件から得られた候補株の数を Table 2-6 に示す.



**Fig. 2-1. SYBR Green I で染色した環境細菌の蛍光顕微鏡による観察**

生細胞の 2 本鎖 DNA を選択的に染色する SYBR Green I を用いて染色した環境細菌を、蛍光顕微鏡（対物レンズ 100 倍）で観察した。SYBR Green I は 2 本鎖 DNA に結合すると青色光（488 nm）により励起し、緑色（522 nm）の蛍光を発する。

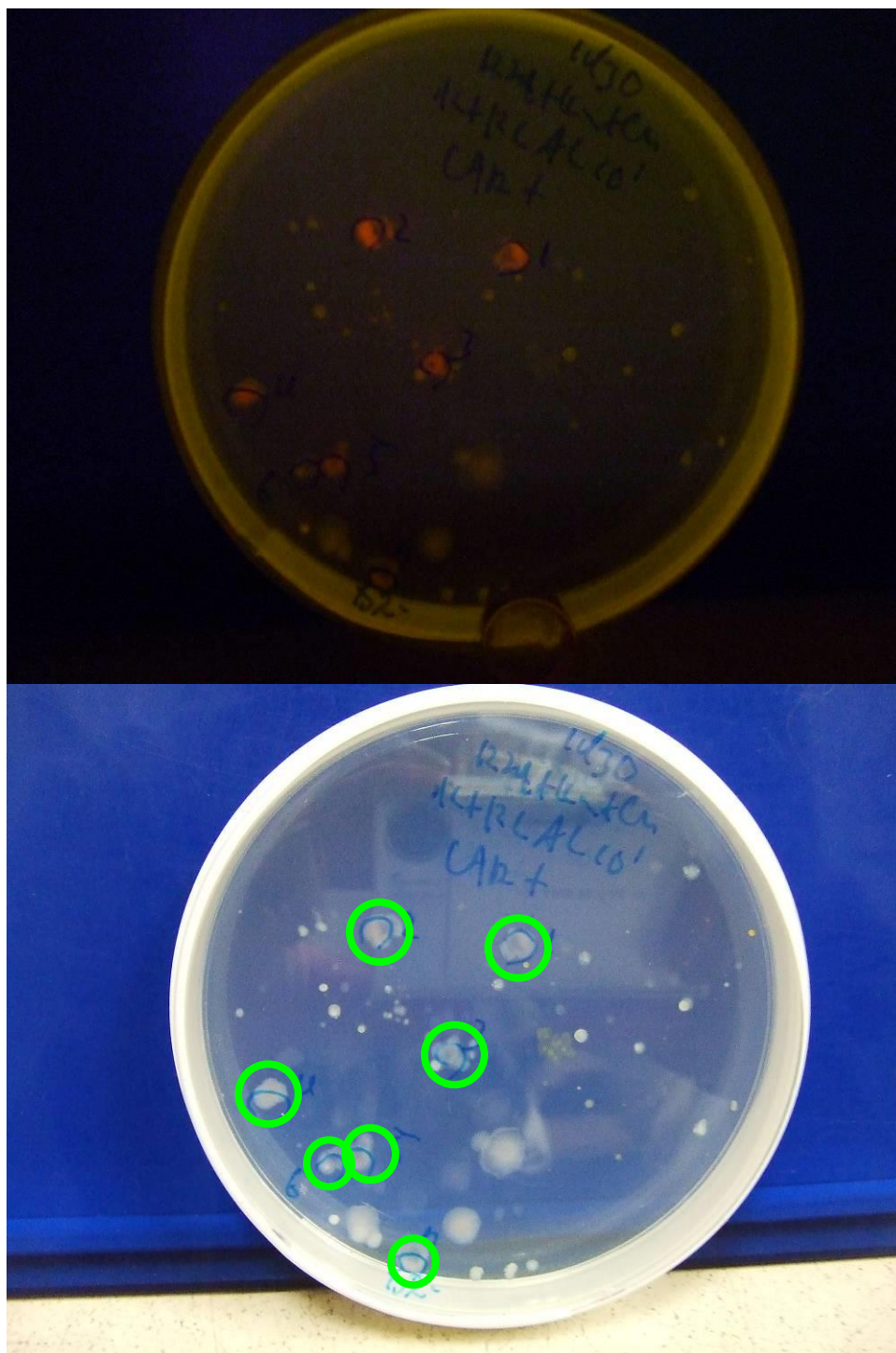
Table 2-5. 接合実験の試行と結果

Run No.	環境サンプル	供与菌	結果
Run1	20080520 採取三四郎池	SM1443(pCAR1:: <i>rfp</i> )	検出されず
Run2	20090207 採取三四郎池	SM1443(pCAR1:: <i>gfp</i> ) SM1443(pCAR1:: <i>rfp</i> )	検出されず
Run3	20090406 採取濃縮三四郎池	SM1443(pCAR1:: <i>gfp</i> ) SM1443(pCAR1:: <i>rfp</i> )	検出されず
Run4	20090514 採取濃縮三四郎池	SM1443(pCAR1:: <i>gfp</i> ) SM1443(pCAR1:: <i>rfp</i> ) CA10L(pCAR1:: <i>rfp</i> ) IAM1511L(pCAR1:: <i>rfp</i> )	検出されず
Run5	20090617 採取濃縮三四郎池	SM1443(pCAR1:: <i>gfp</i> ) SM1443(pCAR1:: <i>rfp</i> ) CA10L(pCAR1:: <i>rfp</i> ) IAM1511L(pCAR1:: <i>rfp</i> )	検出されず
Run6	20090708 採取濃縮三四郎池 20090708 採取濃縮黒ボク土	SM1443(pCAR1:: <i>gfp</i> ) SM1443(pCAR1:: <i>rfp</i> )	検出されず
Run7	20091020 採取濃縮三四郎池 20091021 採取濃縮黒ボク土	SM1443(pCAR1:: <i>gfp</i> ) SM1443(pCAR1:: <i>rfp</i> )	Table 2-6 参照

Run7 以外のサンプルからは蛍光を示すコロニーは検出されなかった。

Run7 で検出されたコロニーの個数を Table 2-6 に示した。





**Fig. 2-2. ダークリーダーを用いた接合伝達体の検出**

ダークリーダーを用いて、供与菌接種後の環境細菌画分を塗布した寒天培地を観察したところ、赤色蛍光を示すコロニー（図中緑丸）が検出された。

Table 2-6. 接合伝達体候補株数

サンプル	供与菌	CAR有無	各経過日数における接合伝達体候補株数														
			7 day					14 day					21 day				
			R2A	1/3LB	SAC	R2A	1/3LB	SAC	R2A	1/3LB	SAC	R2A	1/3LB	SAC	R2A	1/3LB	SAC
湖沼水	SM1443	+	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	(pCAR1::gfp)	-	1	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	SM1443	+	5	1	0	8	0	0	6	0	0	1	0	0	1	0	0
	(pCAR1::rfp)	-	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
	IAM1511L	+	0	>100(32)	>100	3	0	0	3	1	0	15	0	0	0	0	>200
	(pCAR1::rfp)	-	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4	1	0	0	5	5
土壌	CA10L	+	30(30)	1	0	0	20	0	0	0	0	5	0	0	5	0	0
	(pCAR1::rfp)	-	19(19)	7	0	0	4	16	5	0	0	0	0	0	0	0	0
	SM1443	+	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	(pCAR1::gfp)	-	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	SM1443	+	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	130	0
	(pCAR1::rfp)	-	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	9	0	0	10	10
土壌	IAM1511L	+	0	>100	17	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	>100
	(pCAR1::rfp)	-	0	15	0	1	1	0	0	1	0	0	4	0	0	22	22
	CA10L	+	0	0	0	1	11	1	0	0	0	32	1	0	0	46	46
	(pCAR1::rfp)	-	0	3	0	0	0	0	0	5	0	0	1	0	0	9	9

候補株数の括弧内の数字は解析が終了した株数を示す。

#### 2-3-4. 接合伝達体であることの確認

Run 7 において蛍光を示したコロニーを，検出された寒天培地と同じ組成の液体培地に 81 株植菌し，生育した 60 株から total DNA を抽出した．その 60 株のうち，*lacI*，*repA*，*carF*，*traI*，*rfp* の全てのプライマーセットで増幅が確認された菌株（供与菌）が 25 株，全てのプライマーセットで増幅が確認されなかった菌株（供与菌でも接合伝達体でもないその他の細菌）が 35 株であった．Table2-7 に結果のまとめを示した．

Table 2-7. 候補株の解析結果

環境	供与菌	CAR 添加	検出した培地	経過日数	接合伝達体	供与菌	その他の細菌
湖沼水	CA10L(pCAR1:: <i>rfp</i> )	+	R2A	7	0	2	20
湖沼水	CA10L(pCAR1:: <i>rfp</i> )	—	R2A	7	0	2	14
湖沼水	IAM1511L(pCAR1:: <i>rfp</i> )	+	1/3LB	7	0	21	1

### 2-3-5. Histodenz 混入による接合伝達への影響の調査

各濃度の histodenz 溶液中での接合実験を行ったところ、Table 2-8 の結果が得られた。Histodenz 濃度が 0.65 g/ml での接合伝達頻度は、より低濃度の histodenz 混入時と比較して 1/10 程度に減少した。Histodenz 非混入時 (histodenz 0 g/ml)、及び histodenz 濃度 0.13 g/ml の接合伝達頻度を比較すると、0.13 g/ml の histodenz 混入による接合伝達頻度の減少は確認されなかった。

Table 2-8. 各 histodenz 濃度における接合伝達頻度

Histodenz 濃度 (g/ml)	接合伝達頻度 (接合伝達体/供与菌)
0	$3.1 \times 10^{-3} \pm 2.5 \times 10^{-4}$
0.13	$4.6 \times 10^{-3} \pm 9.0 \times 10^{-4}$
0.65	$4.3 \times 10^{-4} \pm 1.7 \times 10^{-5}$

※接合伝達頻度はそれぞれ 3 連行った実験の平均と標準偏差を示した。

### 2-3-6. 濃縮細菌画分中の菌体数測定

SYBR Green I で染色した濃縮環境細菌画分を蛍光顕微鏡で観察した。その結果、湖沼水サンプルでは  $10^6 \sim 10^9$  cells/ml、土壌サンプルでは  $10^6 \sim 10^7$  cells/ml の環境細菌が観察された (Table 2-9)。

### 2-3-7. 接合伝達体の検出及び分取系の構築

本実験は Run 5 の分取を行った実験を例として記述した。それ以外のサンプルについては結果のまとめを Table 2-9 に示した。

GFP の発現が抑制されている菌株 (Fig. 2-3A) と GFP を発現する菌株 (Fig. 2-3B) を FACS にて測定した。その結果、GFP の発現が抑制されている菌株に比べ、GFP を発現する菌株ではドットプロットが右側 (緑色蛍光が強い方向) へシフトしていた。そこで、強い緑色蛍光を示す細胞が検出されるゲートを設定した (Fig. 2-3A, B の黒枠内部)。同様に、RFP の発現が抑制されている菌株 (Fig. 2-3C) と RFP を発現する菌株 (Fig. 2-3D) を FACS にて測定した。その結果、RFP の発現が抑制されている菌株に比べ、RFP を発現する菌株ではドットプロットが右側 (赤色蛍光が強い方向) へシフトしていた。そこで、強い赤色蛍光を示す細胞が検出されるゲートを設定した (Fig. 2-3C, D 右の黒枠内部)。上記ゲートの設定は測定毎に行った。

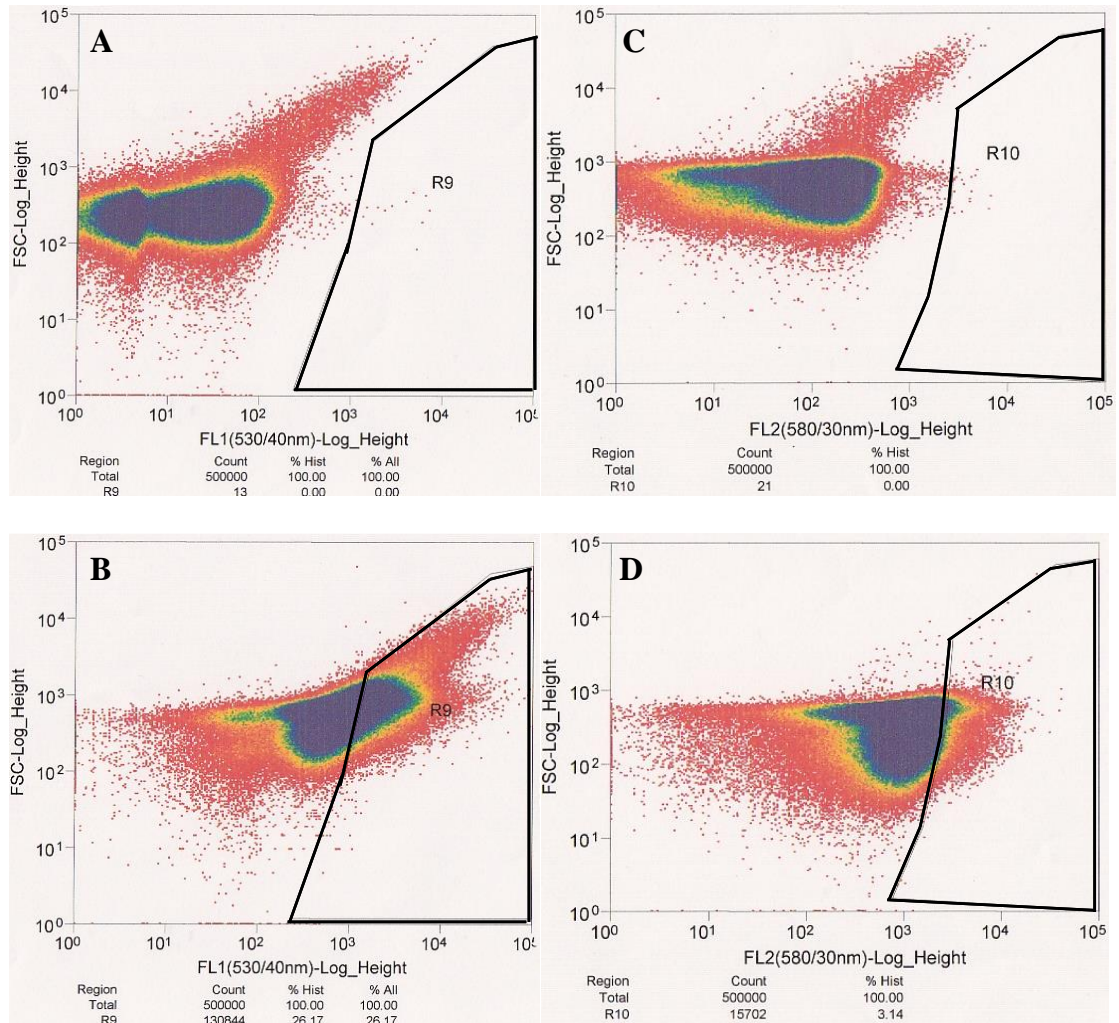
**Table 2-9. 各接合実験での候補株の分取数と生育したコロニー数**

Run	環境	菌体数 (cells/ml)	供与菌	分取数	生育したコロニー数	
					R2A	1/3LB
Run 1	20090406採取 三四郎池	$1.5 \times 10^9$	SM1443(pCAR1::gfp)	$1.0 \times 10^4$	1 (4,000)	4 (4,000)
			SM1443(pCAR1::rfp)	$1.0 \times 10^4$	1 (4,000)	1 (4,000)
Run 2	20090514採取 三四郎池	$2.8 \times 10^7$	SM1443(pCAR1::gfp)	ND	—	—
			SM1443(pCAR1::rfp)	ND	—	—
			CA10L(pCAR1::rfp)	ND	—	—
			IAM1511L(pCAR1::rfp)	ND	—	—
Run 3	20090617採取 三四郎池	$7.1 \times 10^8$	SM1443(pCAR1::gfp)	6,000	0 (2,400)	1 (2,400)
			SM1443(pCAR1::rfp)	10,000	0 (4,000)	1 (4,000)
			CA10L(pCAR1::rfp)	ND	—	—
			IAM1511L(pCAR1::rfp)	ND	—	—
Run 4	20090708採取 三四郎池	$5.2 \times 10^6$	SM1443(pCAR1::gfp)	5,470	58 (2,735)	72 (2,735)
			SM1443(pCAR1::rfp)	1,500	108 (750)	108 (750)
	20090708採取 黒ボク土	$1.4 \times 10^7$	SM1443(pCAR1::gfp)	$1.5 \times 10^5$	> 300 ( $7.5 \times 10^4$ )	> 300 ( $7.5 \times 10^4$ )
			SM1443(pCAR1::rfp)	$1.0 \times 10^6$	> 300 ( $5.0 \times 10^5$ )	> 300 ( $5.0 \times 10^5$ )
Run 5	20091020採取 三四郎池	$2.5 \times 10^7$	SM1443(pCAR1::gfp)	2,920	0 (1460)	0 (1460)
			SM1443(pCAR1::rfp)	301	0 (301)	—
			CA10L(pCAR1::rfp)	ND	—	—
			IAM1511L(pCAR1::rfp)	ND	—	—
	20091021採取 黒ボク土	$2.5 \times 10^6$	SM1443(pCAR1::gfp)	ND	—	—
			SM1443(pCAR1::rfp)	74	0 (74)	—
			CA10L(pCAR1::rfp)	ND	—	—
			IAM1511L(pCAR1::rfp)	ND	—	—
Run 6	20091116採取 三四郎池	$3.4 \times 10^9$	SM1443(pCAR1::gfp)	1,800	124 (720)	16 (720)
			SM1443(pCAR1::rfp)	2919	38 (1,168)	2 (1,168)
			CA10L(pCAR1::rfp)	3,012	> 300 (1,506)	14 (1,506)
			IAM1511L(pCAR1::rfp)	2,527	191 (1,011)	12 (1,011)
	20091116採取 黒ボク土	$3.9 \times 10^7$	SM1443(pCAR1::gfp)	ND	—	—
			SM1443(pCAR1::rfp)	ND	—	—
			CA10L(pCAR1::rfp)	ND	—	—
			IAM1511L(pCAR1::rfp)	ND	—	—

ND は検出されなかった，もしくは環境中の粒子と分離できず分取しなかったことを表す．

生育したコロニー数の括弧内の数字は寒天培地に塗布した粒子数を表す．

—は寒天培地に候補株を塗布していないことを表す．



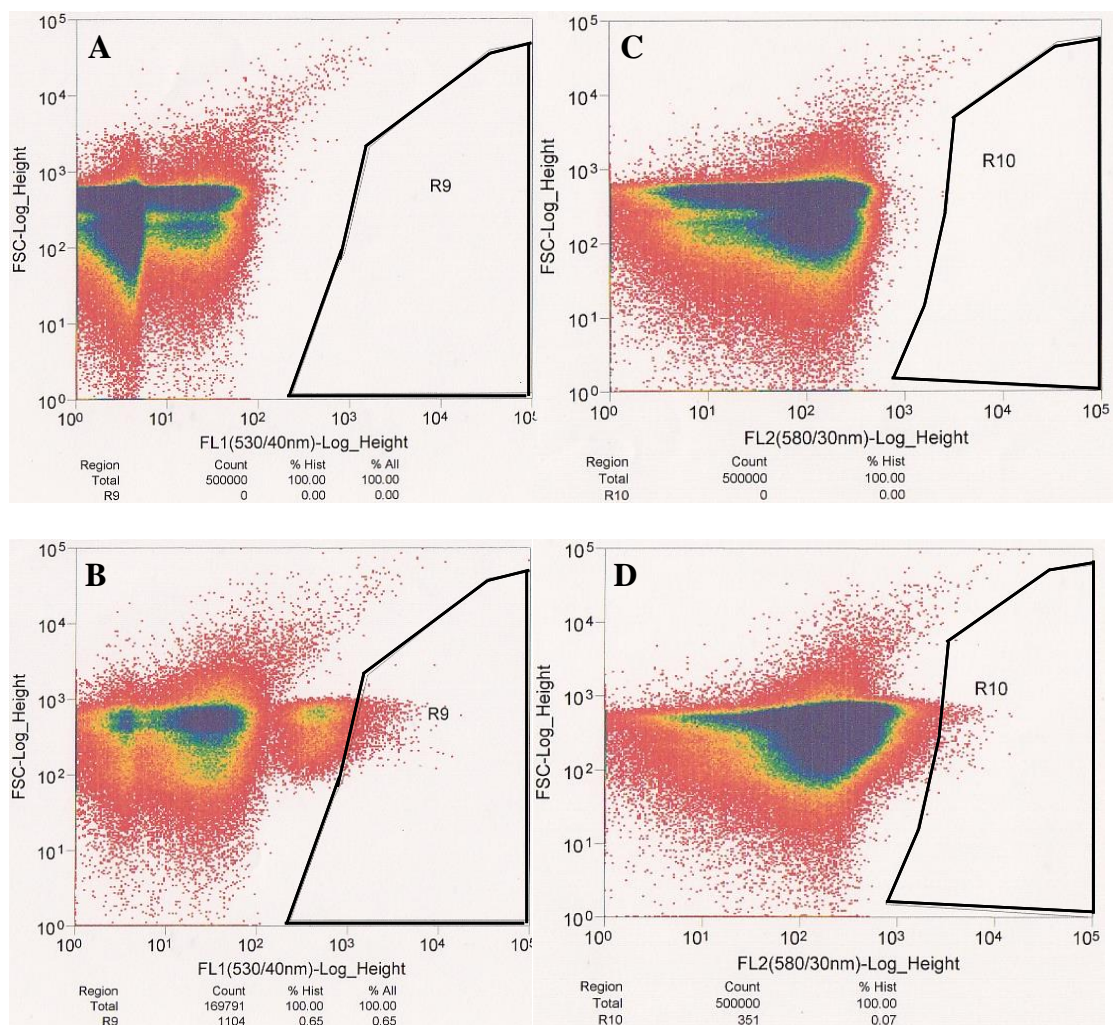
**Fig. 2-3. FACS による蛍光タンパク質発現株と発現抑制株の測定**

FACS にて測定したデータをドットプロットとして示した．縦軸は前方散乱の対数を，横軸は蛍光強度の対数を表す．A は GFP の発現が抑制されている菌株（供与菌），B は GFP を発現する菌株，C は赤色蛍光の発現が抑制されている菌株（供与菌），D は赤色蛍光を発現する菌株である．また，図中の黒枠はこの日に使用したゲートである．

#### 2-3-8. 接合伝達体の検出・分取

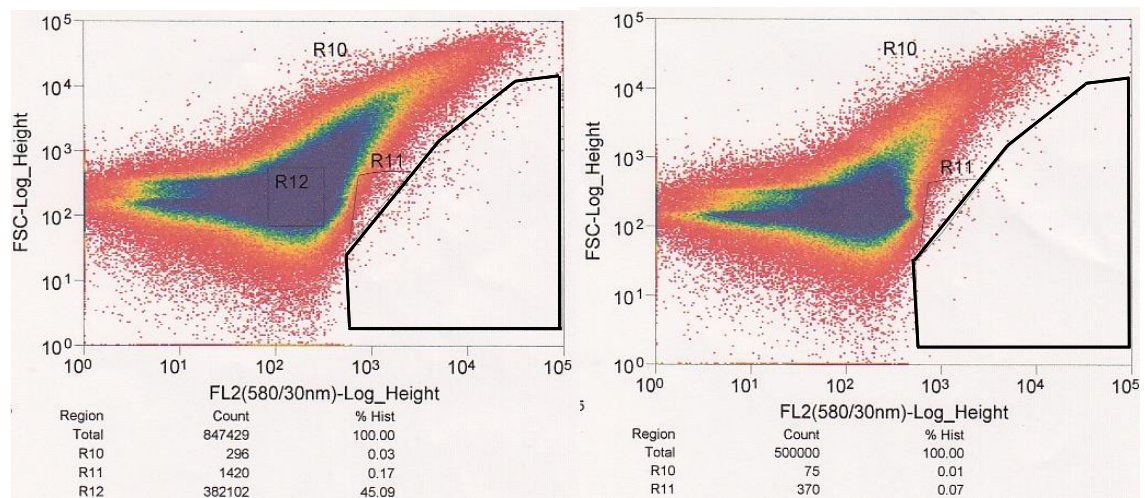
上記と同様に、本実験は **Run 5** の分取を行った実験を例として記述した。それ以外のサンプルについては結果のまとめを **Table 2-9** に示した。供与菌を接種していない湖沼水細菌画分 (**Fig. 2-4**, **A** が緑色蛍光を測定した図, **C** が赤色蛍光を測定した図) と供与菌を接種した湖沼水細菌画分 [**Fig. 2-4**, **B** が **SM1443(pCAR1::gfp)** を接種したサンプル, **D** が **SM1443(pCAR1::rfp)** を接種したサンプル] を **FACS** にて測定したところ、供与菌接種前後で蛍光を示す粒子の数が優位に増加した。そこで、供与菌を接種した環境細菌画分からゲートに検出された粒子を分取した。また、環境サンプル中に強い蛍光を示す粒子が多く存在しているために、接合伝達体との区別ができず、接合伝達体を分取することができなかったサンプルもあった (**Fig. 2-5** に **Run 6** の例を示す。左は供与菌接種前の湖沼水細菌画分の赤色蛍光を測定した図、右は供与菌接種後の湖沼水細菌画分の赤色蛍光を測定した図)。





**Fig. 2-4. FACS による供与菌接種前後の環境サンプルの測定.**

A は供与菌を接種していない湖沼水細菌画分の緑色蛍光を測定した図, B は供与菌を接種していない湖沼水細菌画分の赤色蛍光を測定した図, C は供与菌を接種した湖沼水細菌画分の緑色蛍光を測定した図, D は供与菌を接種した湖沼水細菌画分の赤色蛍光を測定した図.



**Fig. 2-5. 接合伝達体を分取することができなかったサンプルの例**

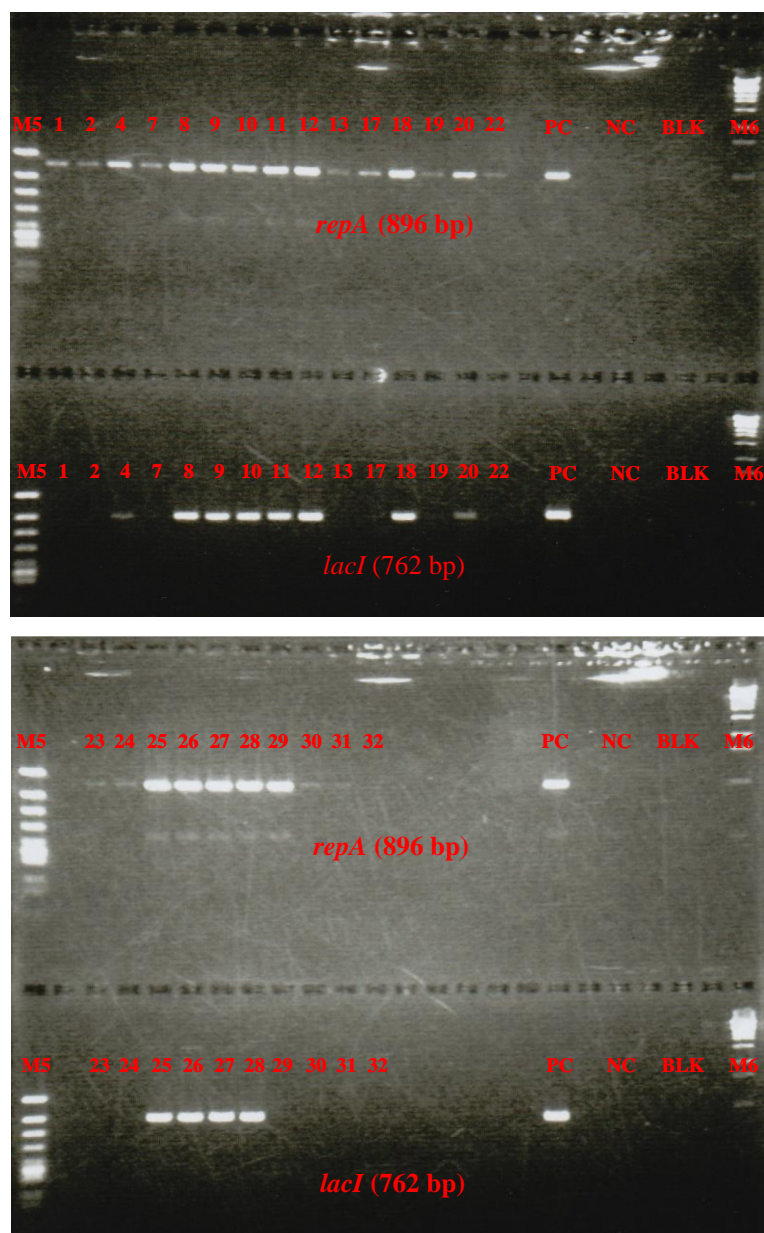
左は Run 6 における供与菌接種前の湖沼水細菌画分の赤色蛍光を測定した図，  
右は Run 6 供与菌接種後の湖沼水細菌画分の赤色蛍光を測定した図．

### 2-3-9. FACS にて分取した接合伝達体候補株のプレート塗布による確認

Run1～Run6で分取した粒子をそれぞれ Km と Ch を添加した R2A, 及び 1/3LB 寒天培地に塗布したところ, 多数のコロニーが得られた (Table 2-9). Run 1 と Run 3 で得られたコロニーは全てその他の細菌であり, Run 6 については未解析なため, ここでは Run 4 の結果を示す.

供与菌に SM1443(pCAR::*rfp*)を用いた接合実験では, 湖沼水サンプルを塗布した R2A, 1/3LB 培地からそれぞれ 8 コロニー (No. 1～16 と番号を振った), 土壌サンプルを塗布した R2A, 1/3LB 培地からそれぞれ 8 コロニー (No. 17～32 と番号を振った) の計 32 株をランダムに選抜し, 液体培地に植菌したところ, 計 25 コロニーが生育した. これらの total DNA を抽出し (補章 8 参照), *lacI*, *repA*, *carF*, *traI*, *rfp* 遺伝子の有無を PCR により確認した. Fig. 2-6 に *repA* と *lacI*, Fig. 2-7 に *carF* と *traI*, Fig. 2-8 に *rfp* 遺伝子の増幅断片のアガロースゲル電気泳動の写真を, Table 2-10 に結果のまとめを示す. この結果から, 25 株中 12 株が供与菌, 13 株が接合伝達体であることが確認された. 単離源と培地の内訳として, 湖沼水サンプルを塗布した R2A 培地からは供与菌が 2 株, 接合伝達体が 3 株, 1/3LB 培地からは供与菌が 4 株, 接合伝達体が 1 株得られ, 土壌サンプルを塗布した R2A 培地からは供与菌が 2 株, 接合伝達体が 5 株, 1/3LB 培地からは供与菌が 4 株, 接合伝達体が 4 株得られた. また, RFLP 解析の結果から, 得られた接合伝達体 13 株全てが *P. putida* と異なるバンドパターンを示し, パターンは計 4 種類であった (Fig. 2-9). このことは, 得られた接合伝達体が *P. putida* 以外の細菌である可能性を示唆している. そこで 16S rRNA の塩基配列を解読したところ, *Bacteroidetes* の *Flectobacillus* 属細菌, *Flexibacter* 属細菌,  $\alpha$ -*Proteobacteria* の *Brevundimonas* 属細菌,  $\beta$ -*Proteobacteria* の *Delftia* 属細菌, *Cupriavidus* 属細菌と高い相同性を示した (Fig. 2-9).

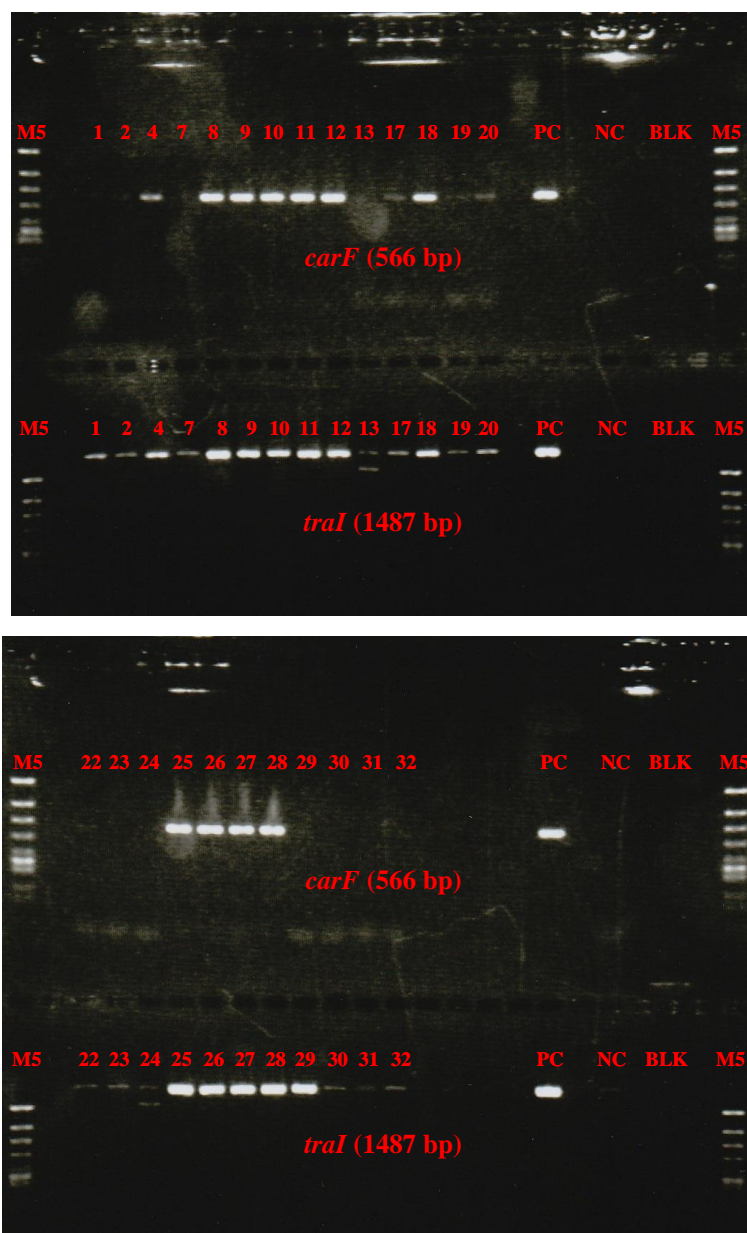
同様に, SM1443(pCAR::*gfp*)を供与菌とした際に得られた候補株を確認したところ, 32 株中 26 株が成育し, 供与菌が 2 株, その他の細菌が 5 株, 接合伝達体が 19 株であった (Fig. 2-11 に *repA* と *lacI* 遺伝子の増幅断片のアガロースゲル電気泳動の写真を示す). RFLP 解析の結果から, これら 19 株は全て *P. putida* と同様のバンドパターンを示したため (Fig. 2-12), *P. putida* もしくは極めて類縁な細菌であることが予想された.



**Fig. 2-6. Run 4 で得られた候補株の *repA* 遺伝子と *lacI* 遺伝子の確認 1**

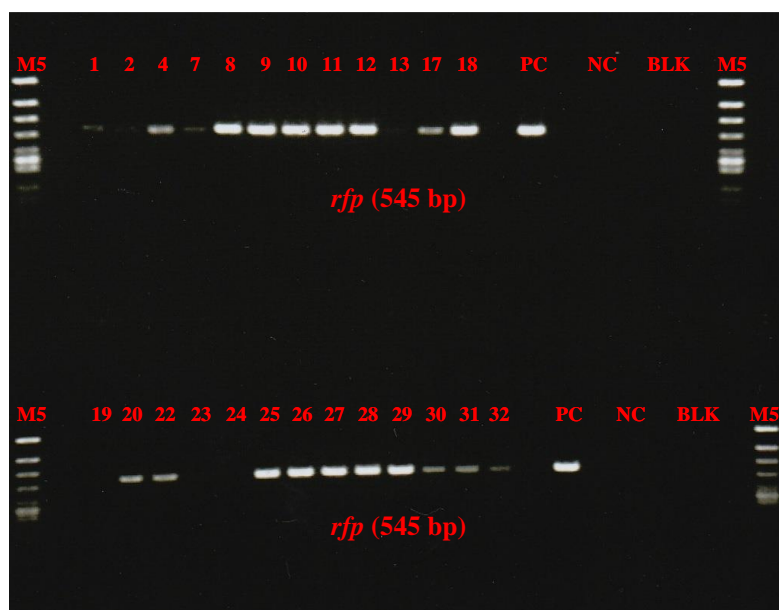
各アガロースゲル電気泳動写真の上が *repA* 遺伝子の増幅断片 (896 bp), 下が *lacI* 遺伝子の増幅断片 (762 bp) のアガロースゲル電気泳動結果. M5, M6 はそれぞれ分子量マーカを表し, PC は SM1443(pCAR1::*rfp*), NC は KT2440RG, BLK は鋳型となる DNA を入れずに PCR を行ったサンプルを表す. 各番号は Fig. 2-7~2-9, 及び Table 2-10 の番号と対応しており, 同じ番号は同じ菌株を示す.





**Fig. 2-7. Run 4 で得られた候補株の *carF* 遺伝子と *traI* 遺伝子**

各アガロースゲル電気泳動写真の上が *carF* 遺伝子の増幅断片 (566 bp), 下が *traI* 遺伝子の増幅断片 (1487 bp) のアガロースゲル電気泳動結果. M5, M6 はそれぞれ分子量マーカを表し, PC は SM1443(pCAR1::*rfp*), NC は KT2440RG, BLK は鋳型となる DNA を入れずに PCR を行ったサンプルを表す. 各番号は Fig. 2-6, 2-8, 2-9, 及び Table 2-10 の番号と対応しており, 同じ番号は同じ菌株を示す.



**Fig. 2-8. Run 4 で得られた候補株の *rfp* 遺伝子**

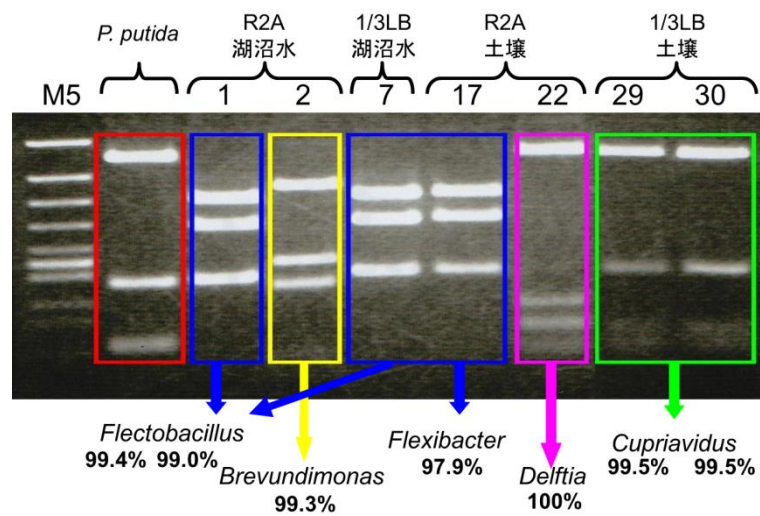
*rfp* 遺伝子の増幅断片（545 bp）のアガロースゲル電気泳動結果．M5，M6 はそれぞれ分子量マーカを表し，PC は SM1443(pCAR1::*rfp*)，NC は KT2440RG，BLK は鋳型となる DNA を入れずに PCR を行ったサンプルを表す．各番号は Fig. 2-6，2-7，2-9，及び Table 2-10 の番号と対応しており，同じ番号は同じ菌株を示す．

Table 2-10. Run 4 の遺伝子確認のまとめ

環境	単離した培地	サンプル No.	増幅した遺伝子				
			<i>lacI</i>	<i>repA</i>	<i>carF</i>	<i>traI</i>	<i>rfp</i>
湖沼水	R2A	1	—	+	—	+	+
		2	—	+	—	+	—
		4	+	++	+	++	+
		7	—	+	—	+	+
		8	++	++	++	++	++
	1/3LB	9	++	++	++	++	++
		10	++	++	++	++	++
		11	++	++	++	++	++
		12	++	++	++	++	++
		13	—	+	—	+	—
土壌	R2A	17	—	+	+	+	+
		18	++	++	++	++	++
		19	—	+	+	+	—
		20	+	++	+	+	+
		22	—	+	—	+	+
		23	—	+	—	+	—
		24	—	+	—	+	—
	1/3LB	25	++	++	++	++	++
		26	++	++	++	++	++
		27	++	++	++	++	++
		28	++	++	++	++	++
		29	—	++	—	++	++
		30	—	+	—	+	+
		31	—	+	—	+	+
		32	—	+	—	+	+

菌株の番号は Fig. 2-6～2-9 の番号と対応しており、同じ番号は同じ菌株を示す。

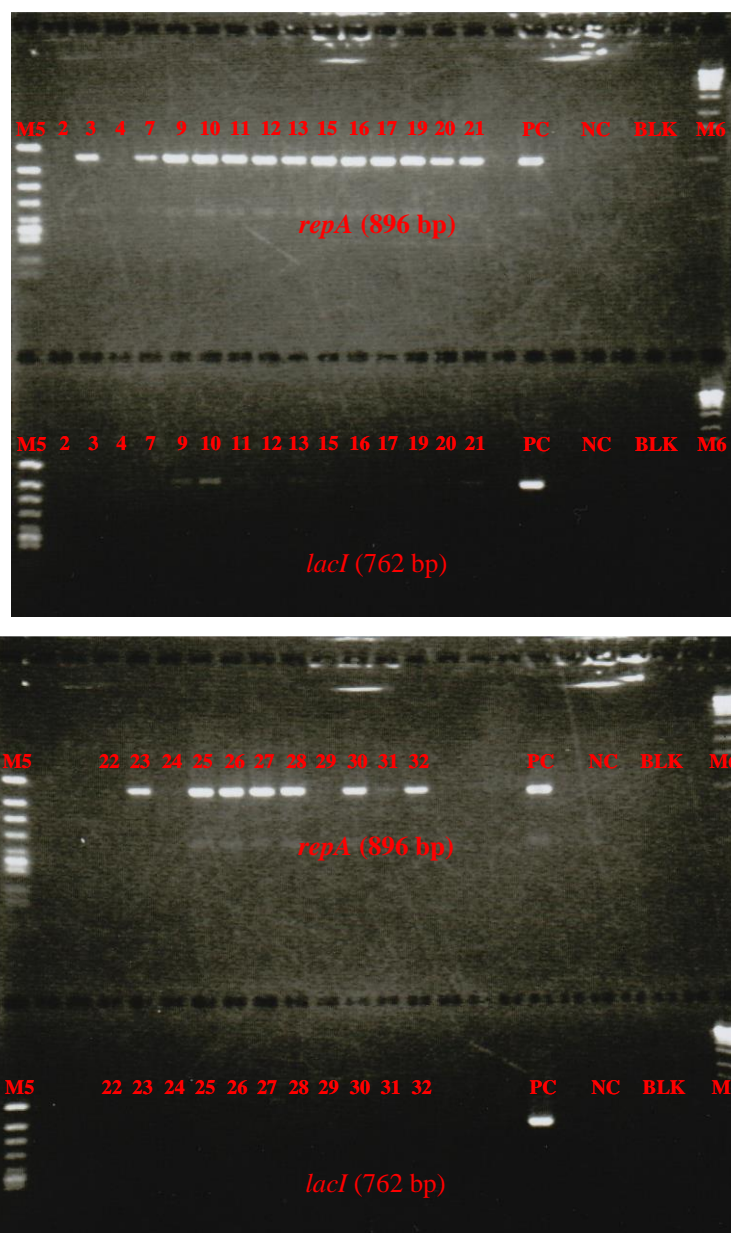
++はアガロースゲル電気泳動の結果ポジティブコントロールと同程度の増幅が認められた菌株、+はバンドが認められたもののポジティブコントロールよりはバンドが薄い菌株、—はバンドが認められなかった菌株。



**Fig. 2-9. Run 4 で得られた候補株の 16S rRNA 遺伝子の RFLP 解析 1**

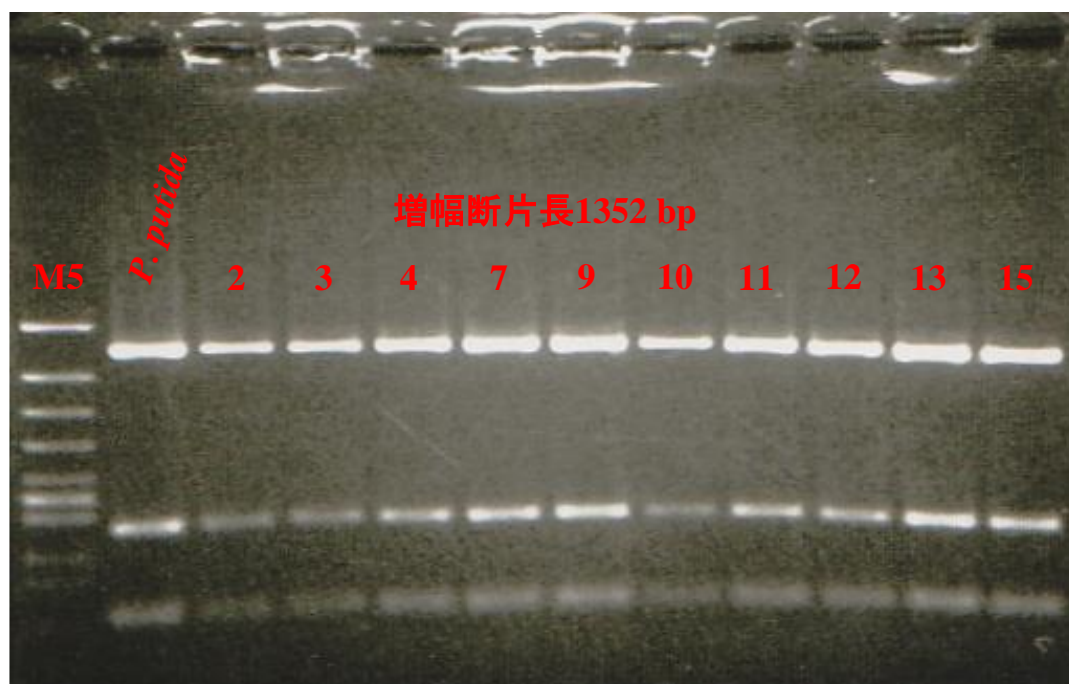
16S rRNA 遺伝子内の 1352 bp を PCR により増幅し、増幅断片を *Sau*3A I で切断した。M5 は分子量マーカーを表し、R2A と 1/3LB は単離した培地、湖沼水と土壌は採取した環境を表す。また、各番号は Fig. 2-6～2-9、及び Table 2-10 の番号と対応しており、同じ番号は同じ菌株を示す。





**Fig. 2-10. Run 4 で得られた候補株の *repA* 遺伝子と *lacI* 遺伝子の確認 2**

各アガロースゲル電気泳動写真の上が *repA* 遺伝子の増幅断片（896 bp），下が *lacI* 遺伝子の増幅断片（762 bp）のアガロースゲル電気泳動結果．M5，M6 はそれぞれ分子量マーカを表し，PC は SM1443(pCAR1::*rfp*)，NC は KT2440RG，BLK は鋳型となる DNA を入れずに PCR を行ったサンプルを表す．各番号は Fig. 2-11 の番号と対応しており，同じ番号は同じ菌株を示す．



**Fig. 2-11. Run 4 で得られた候補株の 16S rRNA 遺伝子の RFLP 解析 2**

16S rRNA 遺伝子内の 1352 bp を PCR により増幅し，増幅断片を *Sau*3A I で切断した．M5 は分子量マーカーを表し，R2A と 1/3LB は単離した培地，湖沼水と土壌は採取した環境を表す．また，各番号は Fig. 2-10 の番号と対応しており，同じ番号は同じ菌株を示す．

#### 2-3-10. マイクロマニピュレータを用いた接合伝達体の確認

湖沼水細菌画分と供与菌 SM1443(pCAR1::gfp)との接合実験からゲート内に得られた 360 粒子を 200  $\mu$ l の滅菌環境水に分取し、蛍光顕微鏡で観察したところ、緑色蛍光を示す細菌が確認された。マイクロマニピュレータ(補章 15 参照)を用いてこの細菌の分取を試みたところ、2 細菌の分取ができたように思われた。分取した細菌をメンブレンフィルター上に滴下し、Km と Ch を添加した R2A 寒天培地上にフィルターを置き、30℃で培養した。3 日後にフィルターを観察したところコロニーは確認できず、また、蛍光顕微鏡にて観察したところ蛍光を示す細菌は確認できなかった。

今回マニピュレーションに用いたサンプルは液滴の高さ(z 軸方向)が大きく、細胞とガラスキャピラリーの先端とのピントをうまく合わせることができなかった。溶液の表面張力を小さくすれば液滴の高さが小さくなると考えたため、溶液にシリカビーズを加えてみた。すると液滴の高さは低くなり、細胞とガラスキャピラリーの先端とのピントを合わせることができるようになった。しかし、シリカビーズが大きく、マニピュレーションの邪魔をしてしまった。そこで、①粒径の小さな砂を混ぜる、②細胞を破壊しない界面活性剤を添加する、の 2 通りの方法で表面張力を減少させられないか検討する予定である。また、手作業で作製したガラスシリンジの孔径が大きすぎた(20~40  $\mu$ m)ため、目的の細胞のみを分取することが難しかった。マイクロマニピュレータの操作には技術が必要なため、今後はマニピュレーションやガラスキャピラリー作製の練習を行いたいと考えている。

## 2-4. 考察

本実験で用いた供与菌から受容菌への pCAR1 の接合伝達頻度（接合伝達体／供与菌）はそれぞれ SM1443(pCAR1::gfp) :  $10^{-7} \sim 10^{-5}$  , SM1443(pCAR1::rfp) :  $10^{-3} \sim 10^{-2}$  , CA10L(pCAR1::rfp) :  $10^{-8} \sim 10^{-6}$  , IAM1511L(pCAR1::rfp) :  $10^{-8} \sim 10^{-9}$  であった。また、過去に行われたフィルター接合を用いた接合実験では、*P. putida* KT2440RG を受容菌とした際の接合伝達頻度が KT2440(pCAR1) :  $10^{-3} \sim 10^{-1}$  , CA10(pCAR1) :  $10^{-5} \sim 10^{-3}$  , IAM1511(pCAR2) :  $10^{-7} \sim 10^{-5}$  であった (Shintani *et al.*, 2005a)。pCAR2 は、pCAR1 の transposase 遺伝子内部に 1 塩基の置換が起きたプラスミドであるが、置換された塩基はコドンの 3 塩基目であり、アミノ酸残基は変化せず、機能的には全く同一のプラスミドである (Takahashi *et al.*, 2009a)。本実験と過去のフィルター接合による実験結果を比較すると、接合伝達頻度に違いが見られるが、接合伝達頻度は *P. chlororaphis* < *P. resinovorans* < *P. putida* の順で大きくなるという傾向は同じであった。本実験と過去の実験との間で接合伝達頻度に違いが見られた理由は、主に接合方法の違いによるものであると考えられる。本実験から、用いた全ての供与菌が接合伝達によりプラスミドを受容菌へと伝達することが確認された。

本実験の参考とした Gelder らの研究では、プラスミド供与菌を接種していないサンプルからは赤色蛍光を示すコロニーは検出されなかった。また、供与菌を接種したサンプルからは供与菌のコロニーと比較して赤色蛍光を示すコロニーが容易に検出でき、それら全てが接合伝達体であったと報告されている (Gelder *et al.*, 2005)。しかし、本研究で得られた赤色蛍光を示すコロニーの中には接合伝達体以外の細菌が含まれていた。例えば Fig. 2-2 で赤色蛍光を示している 7 つのコロニーはいずれも、供与菌ではなく、プラスミドも持たないその他の細菌であった。本検出系は蛍光を目視で確認するため、このような自家蛍光を示すその他の細菌と接合伝達体とを区別することは難しい。

Gelder らの研究で用いたプラスミドは広宿主域 IncP-1  $\beta$  に属する pB10 であり、その接合伝達頻度は *E. coli*, *Pseudomonas* sp., *Sinorhizobium meliloti* の間で 0.1~0.9 (接合伝達体／受容菌) と非常に高頻度である (Dröge *et al.*, 2000)。このことが、Gelder らの研究で多くの接合伝達体が多かった主な理由であると考えられる。しかし、pCAR1 の接合伝達頻度が低い [実験室内での理想的な系でも約  $10^{-3}$  (接合伝達体／供与菌)] ため、例え理想系と同程度の頻度で接合伝達が起きても、サンプル中の細菌の割合は全体を 100 とすると、その他の細菌:供与菌:接合伝達体 90:10:0.01 となる。したがって、サンプル中に接合伝達体は 1/10,000 しか存在しないことになり、多くの接合伝達体を解析するためには膨大な量の細菌を解析しなくてはならない。しかし、プレート上での解析方法では、解析できる細菌の数に限度があるため、より多くの細菌を短時間で解析できる手法が必要である。そこで、新たな接合伝達体の検出・分取系の構築を行うこととした。

本実験系では多数の接合伝達体を得難いにも関わらず、特殊な検出装置を用いる必要のない簡便さや、これまでの実績 (Shintani *et al.*, 2008)、得られた接合伝達体の扱い易さから、依然有効な実験系であると言える。未だ解析の終了していない接合伝達体候補株も多く残

っているので、さらに解析を進めることで新たな属種の接合伝達体が発見される可能性はある。また、本実験ではゲル化剤に寒天を用いたが、gellan gum (Janssen *et al.*, 2002; Sá-Correia *et al.*, 2002; Tamaki *et al.*, 2005, 2009; Tsudome *et al.*, 2009) を用いることで、アガロースゲルでは検出されなかった属種の細菌が検出させるかもしれない。さらに、温度や用いる環境サンプルなどの接合条件を変えることで、新たな宿主の発見が期待される。

難培養性細菌も含めた実環境中の全ての細菌を対象として pCAR1 の宿主域を解析するために、FACS を用いた接合伝達体の検出・分取系を構築した。次に、pCAR1 供与菌と環境細菌画分との接合実験を行い、FACS を用いて接合伝達体の分取を試みた。

実環境サンプルを FACS に供するに当たって、環境サンプル中に含まれる鉱物等の自家蛍光を示す粒子の除去を行った (Berry *et al.*, 2003; Koch *et al.*, 2001; Musovic *et al.*, 2006; Unge *et al.*, 1999; Williamson *et al.*, 2007 の手法を一部改変)。Histodenz が接合伝達に影響を与えるかどうかは不明であったため、histodenz を混入させた液体培地中で pCAR1 供与菌と既知の受容菌との液体接合実験を行い、histodenz 非混入時と比較して接合伝達頻度が変化するかどうかを調べた。その結果、histodenz 濃度が 0.13 g/ml の液体培地では histodenz 非混入時と比較して接合伝達頻度は減少しなかった (Table 2-8)。この後に行う実環境サンプルの histodenz 処理では、処理後に 3 回の洗浄を行うことから、最終的な histodenz の混入は 0.13 g/ml 未満であると考えられたため、本実験において histodenz の混入は接合伝達頻度に影響しないことが示唆された。そこで、実環境サンプルの histodenz 処理を行うことにした。Histodenz 濃度が 0.65 g/ml の液体培地ではより低濃度の場合と比較して接合伝達頻度の減少が見られた (Table 2-8)。接合実験を行った液体培地を観察すると、histodenz 非混入時、及び histodenz 濃度が 0.13 g/ml の液体培地では菌体が沈殿していたが、histodenz 濃度が 0.65 g/ml の液体培地では菌体の沈殿は見られなかった。

次に、サンプル中の接合伝達体を検出するゲートの設定を行った。蛍光タンパク質を発現する菌株と蛍光タンパク質の発現が抑制されているプラスミド供与菌を FACS にて測定し、得られた個々の粒子のデータから、縦軸を前方散乱、横軸を蛍光強度としたドットプロットを作製した。このドットプロット上にて、蛍光タンパク質を発現している細胞のみが検出されるゲートの設定した。しかし、供与菌を接種していない環境細菌画分を FACS に供したところ、Fig. 2-5 の様に強い蛍光を示す粒子が検出される例もあった。環境細菌画分中には自家蛍光を示す細菌も存在すると考えられるが、本実験で設定したゲートでは、自家蛍光を示す細菌と接合伝達体とを分離することはできない。このことから、今後 1 細胞単位での解析を行うためには、自家蛍光を示す環境細菌と接合伝達体の分離が今後の課題となる。解決策として、①pCAR1 上の塩基配列をプローブとした fluorescence *in situ* hybridization (FISH) により、複数の蛍光標識を利用して分離する、②pCAR1 上に 2 種類の蛍光タンパク質遺伝子を挿入し、2 種類の蛍光をレポーターとして分離する、といった分離方法が考えられる。①の FISH と FACS を併用する手法 (FISH-FACS) は広く用いられてお

り、FISH-FACS を用いることで pCAR1 を保持する細菌のみを分取することができると思われる。しかし FISH を用いた場合、細菌を固定する必要があるため、得られた接合伝達体が培養可能かどうか調べることができなくなってしまうという欠点がある。②の 2 種の蛍光をレポーターとする方法は、2 種類の励起光と蛍光を用いることで自家蛍光を示す細菌の混入は減少すると考えられるが、2 種類の蛍光タンパク質を発現し得る接合伝達体しか検出できず、また、生きた接合伝達体を分取するためには励起光として UV を用いることができないという欠点もある。しかし、生きた接合伝達体を高純度で分取できる可能性があるため、今後この手法を検討する予定である。

分取した粒子を寒天培地に塗布し、生育したコロニーの解析を行う手法では、寒天培地塗布後に生育したコロニーの数は塗布した粒子の 0~17.2% と再現性の悪い結果となった (Table 2-9)。これは、Run 毎にゲート設定や環境細菌画分が異なることで、分取した粒子内にその他の細菌や鉱物等が混入する割合も異なるためであると考えられる。また、Run 4 において 51 株中 14 株が供与菌、5 株がその他の細菌、32 株が接合伝達体であった (Table 2-10)。分取した粒子が鉱物や難培養性細菌の場合、コロニーを形成しないことが供与菌の混入の割合を大きくする要因の 1 つと考えられる。得られたコロニーの約 60% が接合伝達体であったことから、本研究で構築した FACS を用いた実験系により接合伝達体を分取することが可能であると示された。

本研究で得られた接合伝達体のうち、多くの菌株が *carF* 遺伝子を欠失していた (Table 2-10)。これまでに、pCAR1 を保持した *P. fluorescence* を CAR 培養すると *carF* を含む領域が欠失することが知られている (Takahashi *et al.*, 2009b)。pCAR1 上には CAR 代謝の上流を担う *car*, *ant* オペロンが存在し、これらの分解遺伝子群により CAR はカテコールにまで分解される。しかし、pCAR1 上にはカテコール分解 *cat* 遺伝子群は存在せず、*P. fluorescence* では CAR 分解によりカテコール分解遺伝子の転写が誘導されずカテコールが蓄積する (110)。カテコールは原核生物や真核生物の幅広い生物種に毒性を示すことが報告されていることから (111,112,113)、pCAR1 を保持した *P. fluorescence* は生育が遅くなると考えられる。しかし、実際には pCAR1 上の ISPre1 同士の相同性組み換えにより、CAR 分解能の弱くなった株や CAR 分解能を失った株が優先化してくるのである (110)。したがって、カテコール分解遺伝子を保持しない、もしくは CAR 分解によりカテコール分解遺伝子の転写が誘導されない宿主では、相同性組み換えにより *carF* を欠失することが考えられる。このことが今回 *carF* を含む領域が欠失した接合伝達体が多く得られた原因であるかもしれない。

本研究から、pCAR1 の新たな宿主の可能性が強く示唆された。今後得られた接合伝達体の属種の決定を第一に行うとともに、本研究で構築した手法を用いてさらに多くの接合伝達体を獲得し、pCAR1 の宿主域の解析を行う必要がある。また、1 細胞単位での解析を行うためにはより確実に接合伝達体のみを分取する必要がある。今後実験系を改善し、90% 以上の確率で接合伝達体を分取できるようになれば、マルチウェルプレートの 1 つのウェルに接合伝達体を 1 細胞ずつ分取し、1 細胞からの whole genome amplification による解析を行

う有効性が増す。1 細胞からの **whole genome amplification** による DNA の増幅は、現在の技術では目的外の細胞の混入を防げないため困難であり、少なくとも同じ細胞が 5 細胞必要であるとの報告がある (114, 115, 116)。しかし、マルチウェルプレート内で接合伝達体が数回分裂すれば解析が可能になるとも考えられる。また、得た接合伝達体が培養可能かどうかを調べないのであれば、分取した接合伝達体の集団からクローンライブラリーを作製し、培養を経ずに属種の決定ができると考えられる。

## 第3章

### $\text{Ca}^{2+}$ と $\text{Mg}^{2+}$ が pCAR1 の接合伝達に及ぼす影響の評価

#### 3-1. 諸言

本章では、環境中の  $\text{Ca}^{2+}$  と  $\text{Mg}^{2+}$  がプラスミドの接合伝達に与える影響を、プラスミドや供与菌と受容菌の組み合わせを変えて接合伝達頻度として定量的に評価した。



## 3-2. 材料と方法

### 3-2-1. 使用した菌株, プラスミド, 培地, 及び培養条件

本章で使用した抗生物資との略称と終濃度, 溶媒を Table 3-1 に, 菌株及びプラスミドを Table 3-2 に示す. 菌株の培養には LB 培地 (10 g/l Bacto trypton, 5 g/l Yeast extract, 10 g/l NaCl, pH7.0) を用いて 30 °C で培養した. 5 ml の試験管を用いて培養する際は, 300 rpm で振とうした. 平板培地には微生物培養用精製寒天末 (Nakarai Tesqu, Inc., Tokyo, Japan ) を培地に対して 1.6 % (w/v) となるように添加した. 接合実験には CF buffer (2.2 g/l Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.8 g/l KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 3.0 g/l NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>) を用いた. CF buffer 作製の際は Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup> を除去するために, 事前に使用する器具を milliQ 水でよく洗浄した. 接合時に加えるミネラルは CaCl<sub>2</sub>, MgSO<sub>4</sub> それぞれ 400 mM のストックとして添加した.

Table 3-1. 本章で使用した抗生物質

抗生物質	略称	終濃度	溶媒
Kanamycin	Km	50 mg/ml	H <sub>2</sub> O
Gentamycin	Gm	30 mg/ml	H <sub>2</sub> O
Rifampicin	Rif	25 mg/ml	MeOH

Table 3-2. 本章で使した菌株とプラスミド

菌株とプラスミド	関連する性質	参考文献
Bacterial strains		
<i>Pseudomonas chlororaphis</i>		
IAM1511RG	Spontaneously Rif <sup>r</sup> , Gm <sup>r</sup> gene cassette	102
IAM1511L(pCAR1::rfp)	IAM1511 with <i>lacI</i> <sup>q</sup> , pCAR1::rfp	108
<i>Pseudomonas fluorescens</i>		
Pf0-1RG	Spontaneously Rif <sup>r</sup> , Gm <sup>r</sup> gene cassette	102
Pf0-1 L(pCAR1::rfp)	Pf0-1 with <i>lacI</i> <sup>q</sup> , pCAR1::rfp	108
<i>Pseudomonas putida</i>		
KT2440RG	Spontaneously Rif <sup>r</sup> , Gm <sup>r</sup> gene cassette	102
IAM1236RG	Spontaneously Rif <sup>r</sup> , Gm <sup>r</sup> gene cassette	102
SM1443(pB10::rfp)	SM1443 (a derivative strain of KT2440) carrying pB10::rfp	Shintani <i>et al.</i> , unpublished data
SM1443(pCAR1::rfp)	SM1443 (a derivative strain of KT2440) carrying pCAR1::rfp	105
SM1443(R388::rfp)	SM1443 (a derivative strain of KT2440) carrying R388::rfp	Shintani <i>et al.</i> , unpublished data
<i>Pseudomonas resinovorans</i>		
CA10dm4RG	Spontaneously Rif <sup>r</sup> , Gm <sup>r</sup> gene cassette	102
CA10L(pCAR1::rfp)	CA10dm4 with <i>lacI</i> <sup>q</sup> , pCAR1::rfp	
Plasmids		
pB10::rfp	pB10 tagged with RFP	Shintani <i>et al.</i> , unpublished data
pCAR1::rfp	pCAR1 tagged with RFP	105
R388::rfp	R388 tagged with RFP	Shintani <i>et al.</i> , unpublished data

### 3-2-2. $\text{Ca}^{2+}$ , $\text{Mg}^{2+}$ の有無が各種プラスミドの接合伝達頻度に与える影響の定量的評価

1. グリセロールストックから供与菌 [ SM1443(pCAR1::rfp), SM1443(pB10::rfp), SM1443(R388::rfp) ] を LB + Km 寒天培地に, 受容菌 (KT2440RG) を LB + Rif + Gm 寒天培地にストリークし, 30 °Cで静置培養した.
2. 供与菌を LB + Km 液体培地に, 受容菌を LB + Rif + Gm 液体培地に植菌し, 30 °Cで一晩振盪培養した.
3. 供与菌の培養液を 2 ml チューブに 2 ml , 受容菌の培養液を 2 本の 2 ml チューブに 2 ml ずつ分注した.
4. 13,000 rpm , 室温, 1 min 遠心した.
5. デカンテーション, 及び 200  $\mu\text{l}$  のピペットマンを用いて上清を捨て, 1 ml の CF buffer に再懸濁した.
6. 4. と 5. の操作 (洗菌) を 5 回行った.
7. 新しい 2 ml チューブに CF buffer を 900  $\mu\text{l}$  分注し, 再懸濁液を 100  $\mu\text{l}$  加え, 10 倍希釈し,  $\text{OD}_{600}$  を測定した.
8. 受容菌を  $\text{OD}_{600}$  が 2.0 となるように LB , CF buffer +  $\text{Ca}^{2+}$  (800  $\mu\text{M}$ ) +  $\text{Mg}^{2+}$  (800  $\mu\text{M}$ ), CF buffer の 3 種類の溶液で希釈した.
9. 供与菌を  $\text{OD}_{600}$  が 0.2 となるように CF buffer で希釈した.
10. 8. で調製した受容菌懸濁液 200  $\mu\text{l}$  と 9. で調製した供与菌懸濁液 200  $\mu\text{l}$  を新しい 2 ml チューブ内で混合した (以下接合溶液).
11. 小さく切った Gas Permeable Adhesive Seals (Thermo SCIENTIFIC) で 2 ml チューブにフタをし (チューブのフタは閉めない), 30 °Cで 3 hr 静置した.
12. 接合溶液の  $10^0 \sim 10^5$  希釈溶液を作成し, LB + Km プレートに  $10^3 \sim 10^5$  希釈溶液を, LB + Km + Rif + Gm プレートに  $10^0 \sim 10^3$  希釈溶液を 10  $\mu\text{l}$  ずつ 3 連で滴下した.
13. 30 °Cで静置培養し, 1 日後に LB + Km プレートに生育した供与菌のコロニー数を, 2 日後に LB + Km + Rif + Gm プレート上に生育した接合伝達体のコロニー数をカウントし, 5 連のデータのうち, 最大・最少の値を除いた 3 連のデータから接合伝達頻度 (接合伝達体の CFU / 供与菌の CFU) を算出した.

### 3-2-3. $\text{Ca}^{2+}$ , $\text{Mg}^{2+}$ の濃度が pCAR1 の接合伝達頻度に与える影響の定量的評価

1. グリセロールストックから供与菌を LB + Km 寒天培地に, 受容菌を LB + Rif + Gm 寒天培地にストリークし, 30 °Cで 2 日間静置培養した.
2. 供与菌を LB + Km 液体培地に, 受容菌を LB + Rif + Gm 液体培地に植菌し, 30 °Cで一晩振盪培養した.
3. 供与菌の培養液を 2 ml チューブに 2 ml , 受容菌の培養液を 2 本の 2 ml チューブに 2 ml ずつ分注した.
4. 13,000 rpm , 室温, 1 min 遠心した.

5. デカンテーション, 及び 200  $\mu$ l のピペットマンを用いて上清を捨て, 1 ml の CF buffer に再懸濁した.
6. 4. と 5. の操作 (洗菌) を 5 回行った.
7. 新しい 2 ml チューブに CF buffer を 900  $\mu$ l 分注し, 再懸濁液を 100  $\mu$ l 加え, 10 倍希釈し, OD<sub>600</sub> を測定した.
8. 受容菌を OD<sub>600</sub> が 2.0 となるように CF buffer で希釈した.
9. 供与菌を OD<sub>600</sub> が 0.2 となるように, Ca<sup>2+</sup> と Mg<sup>2+</sup> の濃度を適宜調整した CF buffer で希釈した.
10. 8. で調製した受容菌懸濁液 200  $\mu$ l と 9. で調製した供与菌懸濁液 200  $\mu$ l を新しい 2 ml チューブ内で混合した (以下接合溶液).
11. 小さく切った Gas Permeable Adhesive Seals (Thermo SCIENTIFIC) で 2 ml チューブにフタをし (チューブのフタは閉めない), 30 °C で 24 hr 静置した.
12. 接合溶液の 10<sup>0</sup> ~10<sup>5</sup> 希釈溶液を作成し, LB + Km プレートに 10<sup>3</sup> ~10<sup>5</sup> 希釈溶液を, LB + Km + Rif + Gm プレートに 10<sup>0</sup> ~10<sup>3</sup> 希釈溶液を 10  $\mu$ l ずつ 3 連で滴下した.
13. 30 °C で静置培養し, 1 日後に LB + Km プレートに生育した供与菌のコロニー数を, 2 日後に LB + Km + Rif + Gm プレート上に生育した接合伝達体のコロニー数をカウントし, 接合伝達頻度 (接合伝達体の CFU / 供与菌の CFU) を算出した.

### 3-3. 結果

#### 3-3-1. $\text{Ca}^{2+}$ , $\text{Mg}^{2+}$ の有無が各種プラスミドの接合伝達頻度に与える影響の定量的評価

環境中の  $\text{Ca}^{2+}$  と  $\text{Mg}^{2+}$  の有無が pCAR1 以外のプラスミドの接合伝達にも影響を与えるか調べるために、pCAR1, pB10, R388 の 3 種類の接合伝達性プラスミドを用いて接合実験を行った。その結果、pCAR1 においては  $\text{Ca}^{2+}$  と  $\text{Mg}^{2+}$  をそれぞれ 400  $\mu\text{M}$  ずつ添加した培地と比較して、添加していない培地中では接合伝達頻度が  $1.2 \times 10^{-4}$  から  $< 3.5 \times 10^{-7}$  へと顕著に減少したのに対し、pB10, R388 においては、それぞれ  $1.7 \times 10^{-3}$  から  $< 7.3 \times 10^{-3}$ ,  $6.3 \times 10^{-5}$  から  $< 1.4 \times 10^{-4}$  と顕著な減少は見られなかった (Fig. 3-1)。このことから、pB10 と R388 は環境中の  $\text{Ca}^{2+}$  と  $\text{Mg}^{2+}$  の有無によって接合伝達頻度に影響を受けにくく、pCAR1 は影響を受けやすいことが明らかになった。

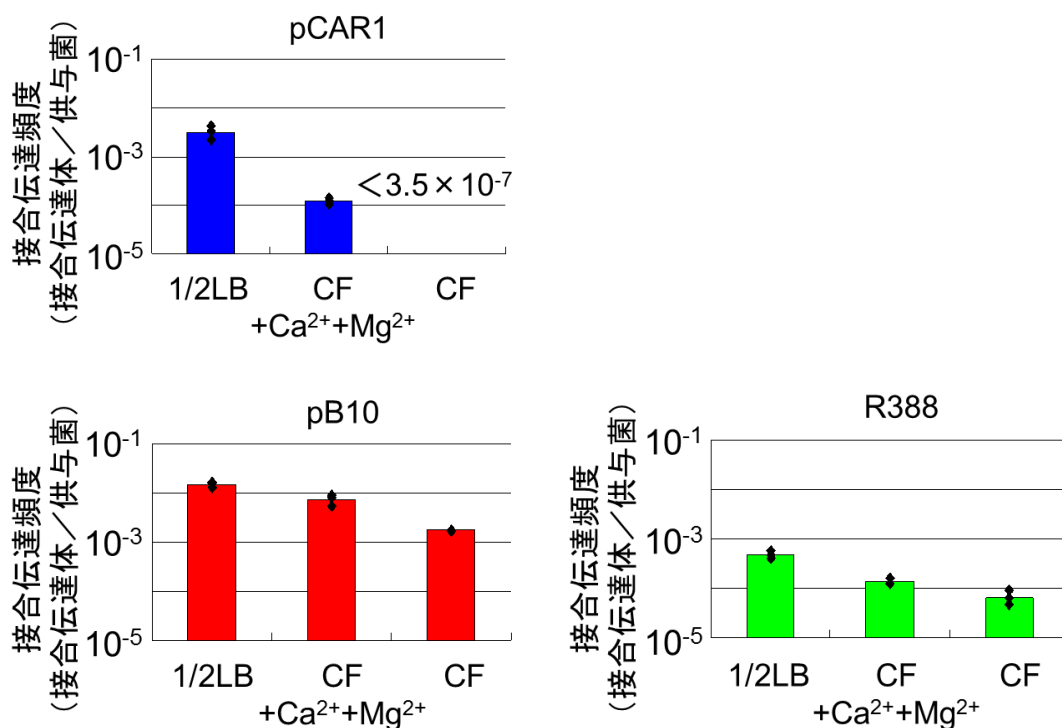


Fig. 3-1.  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  の有無が各種プラスミドの接合伝達頻度に与える影響の定量的評価

縦軸は接合伝達頻度 (接合伝達体の CFU / 供与菌の CFU) を、横軸は接合環境 [(1/2LB, CF buffer +  $\text{Ca}^{2+}$  (400  $\mu\text{M}$ ) +  $\text{Mg}^{2+}$  (400  $\mu\text{M}$ ), CF buffer] を示す。棒は 3 連の結果の相乗平均を表し、点は各々の結果を表し、図中の数字は検出限界を表す。

### 3-3-3. $\text{Ca}^{2+}$ , $\text{Mg}^{2+}$ の濃度が pCAR1 の接合伝達頻度に与える影響の定量的評価

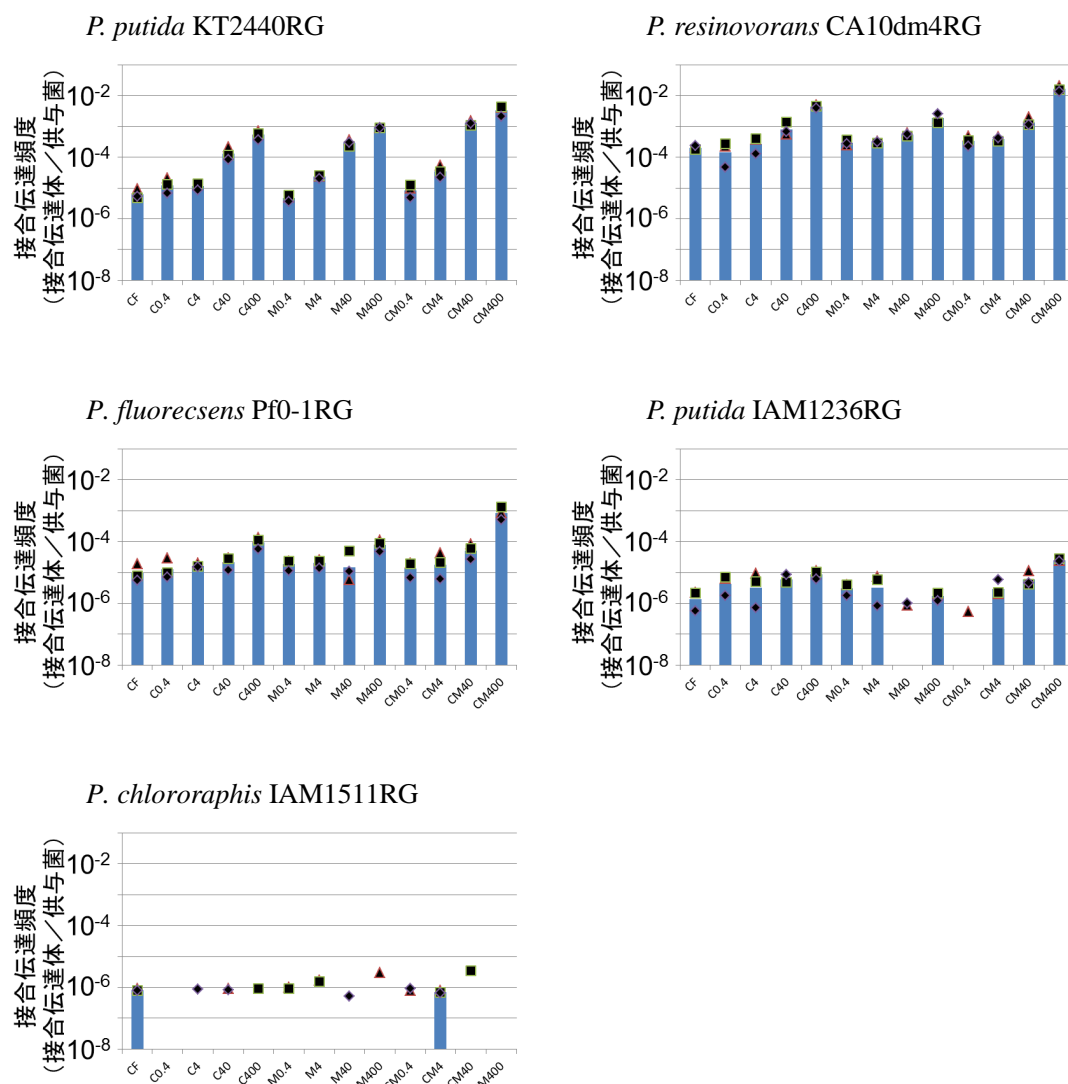
本実験では、環境中の  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  の濃度によって pCAR1 の接合伝達頻度にどのような変化が見られるかを定量的に評価した。4 種類のゲノム既知の供与菌 (*P. putida* KT2440 株の派生株である *P. putida* SM1443 株, pCAR1 のオリジナルホストの派生株である *P. resinovorans* CA10L 株, *P. fluorescens* Pf0-1L 株, *P. chlororaphis* IAM1511L 株) と 5 種類のゲノム既知の受容菌 (*P. putida* KT2440RG 株, *P. resinovorans* CA10dm4RG 株, *P. fluorescens* Pf0-1RG 株, *P. chlororaphis* IAM1511RG 株, *P. putida* IAM1236RG 株) を用い,  $\text{Ca}^{2+}$  と  $\text{Mg}^{2+}$  の濃度をそれぞれ 0, 0.4, 4, 40, 400  $\mu\text{M}$  と変化させ, 各濃度における接合伝達頻度を測定した。

*P. putida* SM1443 株を供与菌として用いた結果, *P. putida* KT2440RG 株, *P. resinovorans* CA10dm4RG 株, *P. fluorescens* Pf0-1RG 株が受容菌の際は  $\text{Ca}^{2+}$  と  $\text{Mg}^{2+}$  の濃度上昇に伴い, 接合伝達頻度の増加が見られたが, *P. chlororaphis* IAM1511RG 株, *P. putida* IAM1236RG 株が受容菌の際は接合伝達頻度が低く,  $\text{Ca}^{2+}$  と  $\text{Mg}^{2+}$  の濃度を変化させても接合伝達頻度に大きな変化は見られなかった (Fig. 3-2)。

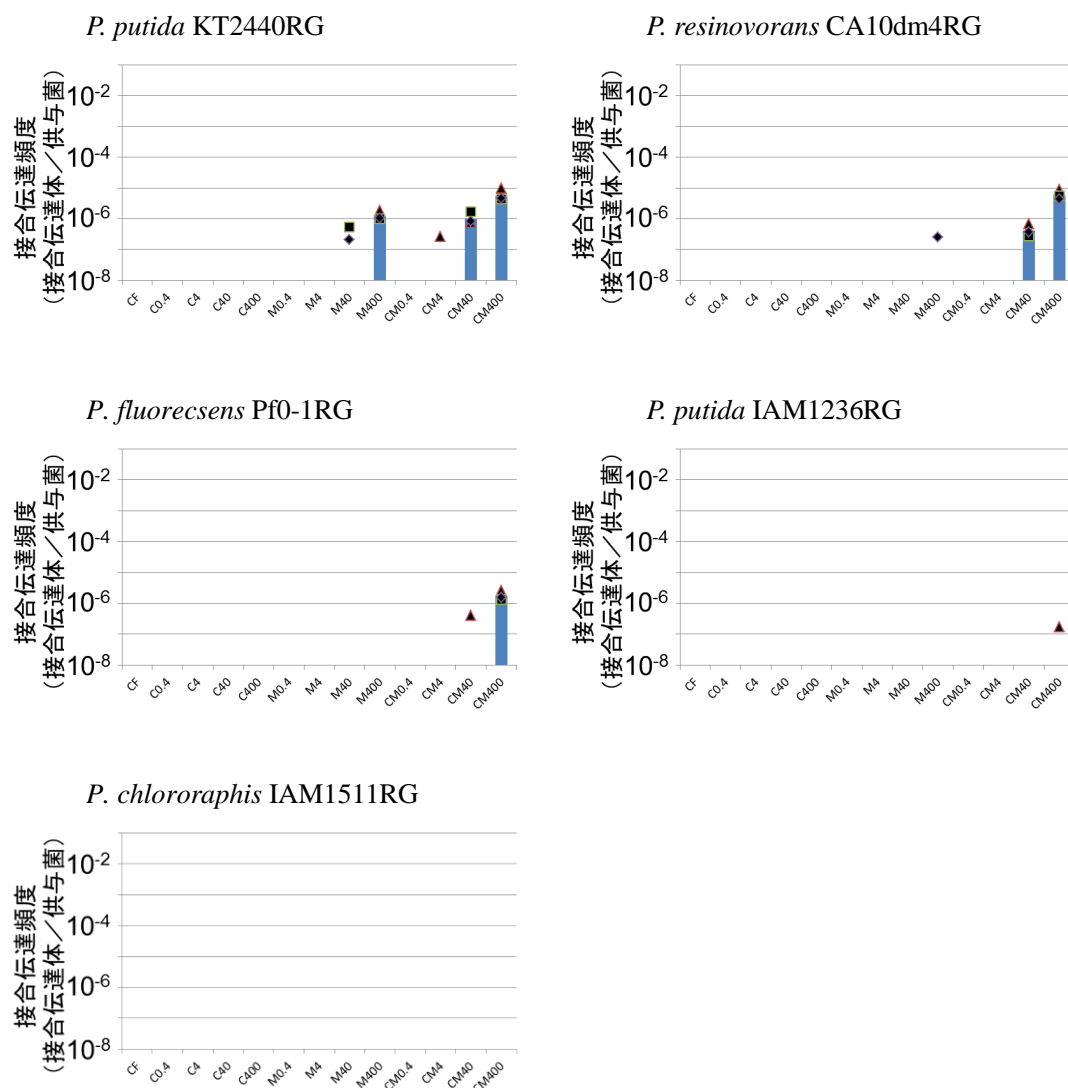
*P. resinovorans* CA10L 株を供与菌として用いた結果, *P. putida* KT2440RG 株が受容菌の際には  $\text{Mg}^{2+}$  が高濃度, *P. resinovorans* CA10dm4RG 株と *P. fluorescens* Pf0-1RG 株が受容菌の際は  $\text{Ca}^{2+}$  と  $\text{Mg}^{2+}$  両方が高濃度のときに接合伝達体が検出されたが, それ以外の条件では接合伝達頻度は検出限界以下であった (Fig. 3-3)。

*P. fluorescens* Pf0-1L 株を供与菌として用いた結果, *P. putida* KT2440RG 株が受容菌の際には  $\text{Mg}^{2+}$  が高濃度, *P. resinovorans* CA10dm4RG 株が受容菌の際は  $\text{Ca}^{2+}$  と  $\text{Mg}^{2+}$  両方が高濃度のときに接合伝達体が検出されたが, それ以外の条件では接合伝達頻度は検出限界以下であった (Fig. 3-4)。

*P. chlororaphis* IAM1511L 株を供与菌として用いた結果, 受容菌に因らず全体的に接合伝達頻度が低く,  $\text{Ca}^{2+}$  と  $\text{Mg}^{2+}$  の濃度を変化させても接合伝達頻度に大きな変化は見られなかった (Fig. 3-5)。



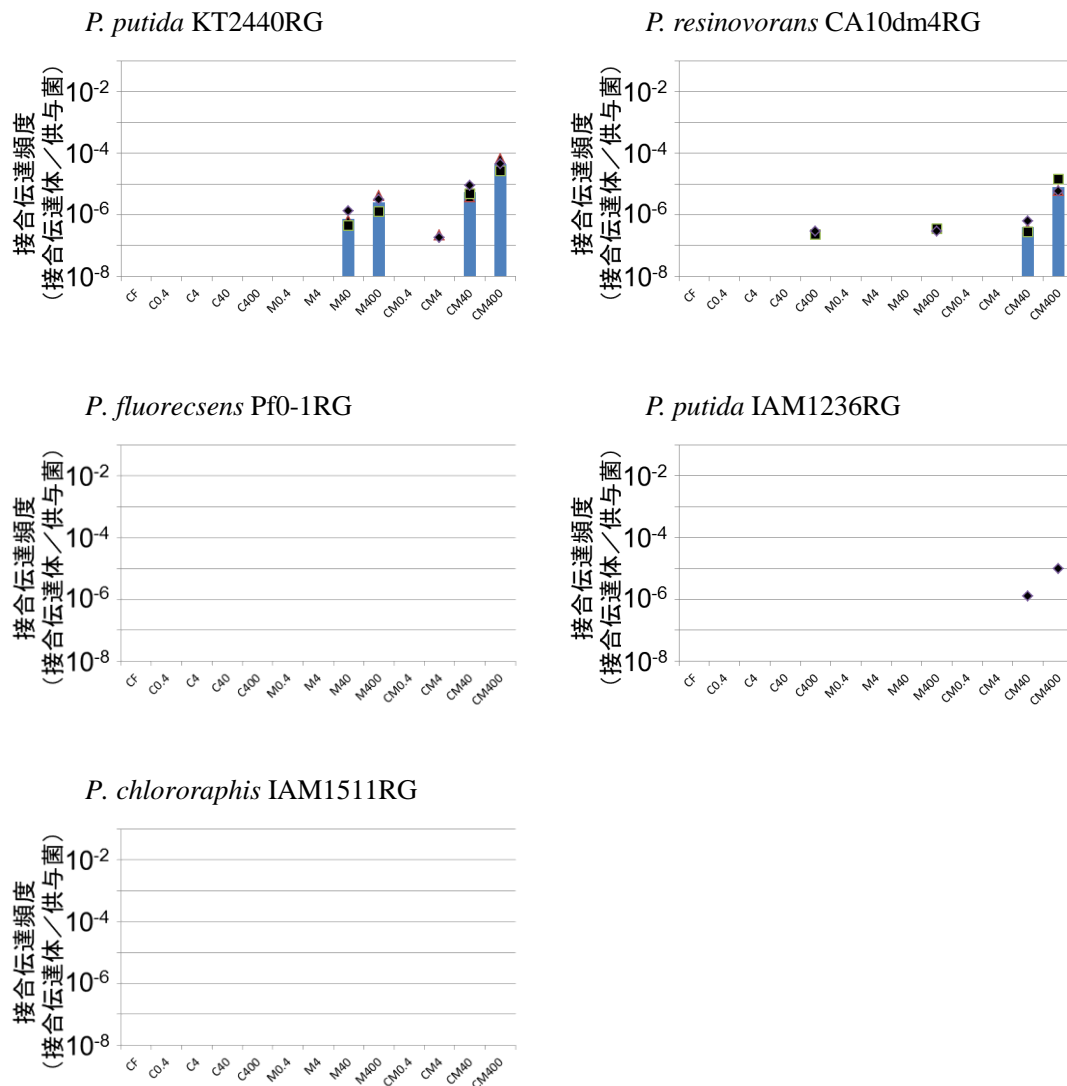
**Fig. 3-2.** *P. putida* SM1443 株を供与菌とした際の各  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  濃度における接合伝達頻度  
各グラフ上に用いた受容菌を示す. 縦軸は接合伝達頻度 (接合伝達体の CFU / 供与菌の CFU)  
を, 横軸は接合環境 [CF は CF buffer, C は  $\text{Ca}^{2+}$ , M は  $\text{Mg}^{2+}$ , 数字は濃度 ( $\mu\text{M}$ )] を示す.  
棒は 3 連の結果の相乗平均を表し, 点は各々の結果を表す.



**Fig. 3-3. *P. resinovorans* CA10L 株を供与菌とした際の各  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  濃度における接合伝達頻度**

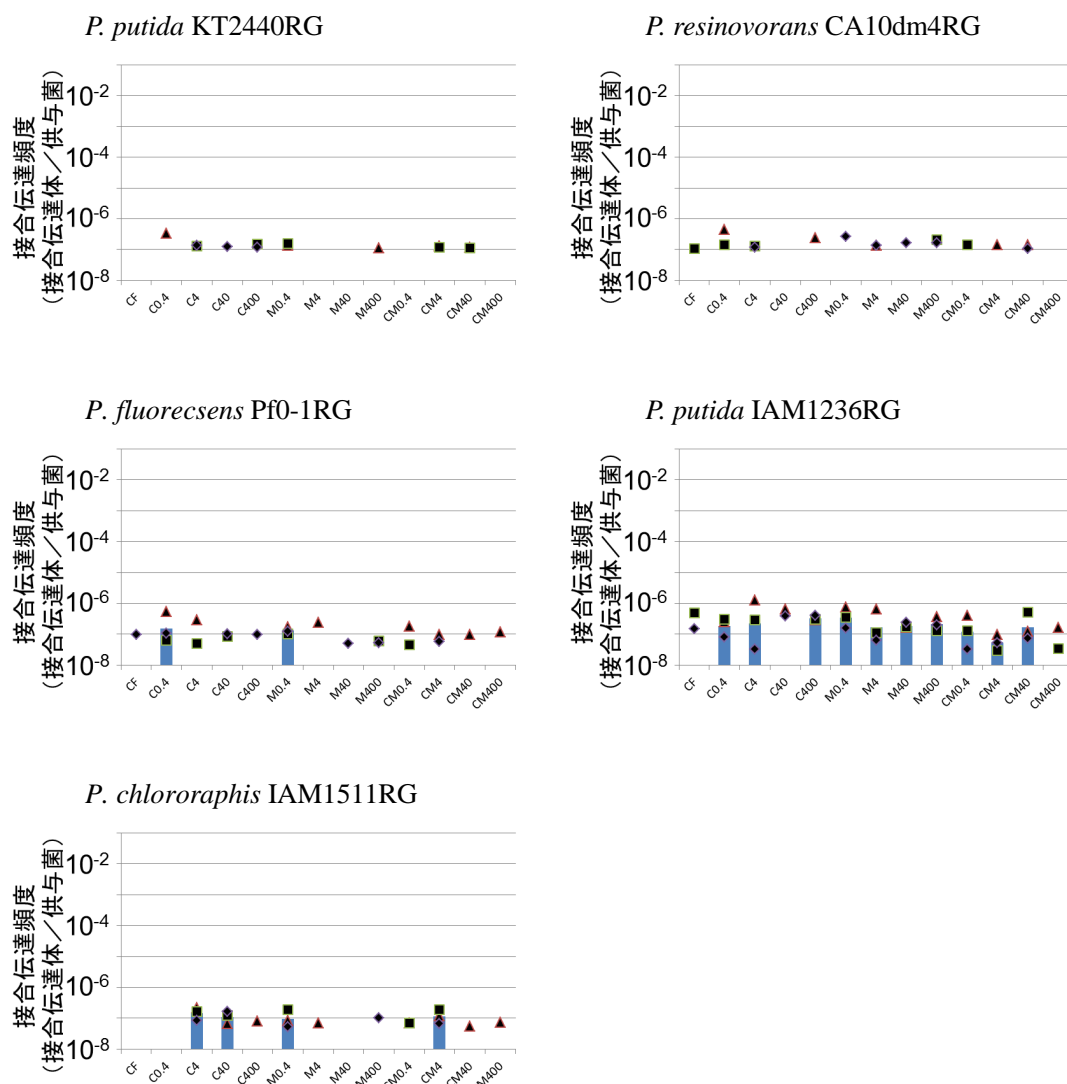
各グラフ上に用いた受容菌を示す. 縦軸は接合伝達頻度 (接合伝達体の CFU / 供与菌の CFU) を, 横軸は接合環境 [CF は CF buffer, C は  $\text{Ca}^{2+}$ , M は  $\text{Mg}^{2+}$ , 数字は濃度 ( $\mu\text{M}$ )] を示す. 棒は 3 連の結果の相乗平均を表し, 点は各々の結果を表す.





**Fig. 3-4. *P. fluorescens* Pf0-1L 株を供与菌とした際の各  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  濃度における接合伝達頻度**

各グラフ上に用いた受容菌を示す. 縦軸は接合伝達頻度 (接合伝達体の CFU / 供与菌の CFU) を, 横軸は接合環境 [CF は CF buffer, C は  $\text{Ca}^{2+}$ , M は  $\text{Mg}^{2+}$ , 数字は濃度 ( $\mu\text{M}$ )] を示す. 棒は 3 連の結果の相乗平均を表し, 点は各々の結果を表す.



**Fig. 3-5. *P. chlororaphis* IAM1511L 株を供与菌とした際の各  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  濃度における接合伝達頻度**

各グラフ上に用いた受容菌を示す. 縦軸は接合伝達頻度 (接合伝達体の CFU / 供与菌の CFU) を, 横軸は接合環境 [CF は CF buffer, C は  $\text{Ca}^{2+}$ , M は  $\text{Mg}^{2+}$ , 数字は濃度 ( $\mu\text{M}$ )] を示す. 棒は 3 連の結果の相乗平均を表し, 点は各々の結果を表す.

### 3-4. 考察

本章では、環境中の  $\text{Ca}^{2+}$  と  $\text{Mg}^{2+}$  の有無が pCAR1 以外のプラスミドの接合伝達にも影響を与えるか調べるために、pCAR1 (IncP-7,  $\text{MOB}_{\text{HII}}$ ,  $\text{MPF}_{\text{F}}$ ) とは異なる接合伝達機構 (MOB, MPF) をもつ pB10 (IncP-1 $\beta$ ,  $\text{MOB}_{\text{PII}}$ ,  $\text{MPF}_{\text{T}}$ ), R388 (IncW,  $\text{MOB}_{\text{FII}}$ ,  $\text{MPF}_{\text{T}}$ ) の3種類の接合伝達性プラスミドを用いて接合実験を行った。その結果、pCAR1 は環境中の  $\text{Ca}^{2+}$  と  $\text{Mg}^{2+}$  の有無によって接合伝達頻度に影響を受けやすく、pB10 と R388 は影響を受けにくいことが明らかになった。この現象が pCAR1 特異的なのか、または IncP7 群に共通する性質なのかを調べるために、他の IncP-7 群の自己伝達性プラスミドを用いて同様の実験を試みたが、pDK1 (98) は今回使用した *P. putida* KT2440 株には接合伝達しないことが知られており、使用することができなかった。また、最初に IncP-7 群プラスミドと決定された Rms148 (117) は *Pseudomonas aeruginosa* PAO1808 を宿主として保存されていたが、本菌株が種々の抗生物質に対して高い耐性を保持していた事、Rms148 が多くの *Pseudomonas* 属細菌がすでに耐性を有するストレプトマイシン耐性プラスミドであったことから、抗生物質耐性を指標とした本接合実験に用いることができなかった。そこで、トランスポゾンを用いて蛍光タンパク質をコードする遺伝子を Rms148 に挿入することで、蛍光タンパク質の発現を指標とした接合伝達体の検出方法を検討しているが、蛍光タンパク質遺伝子を挿入した Rms148 の取得には未だ至っていない。

プラスミドの接合伝達では、まず、relaxase がプラスミド DNA の *oriT* 領域に結合し、二本鎖 DNA に *nic* (切れ目) を入れ、二本鎖を開裂する。relaxase はプラスミドの接合伝達に必須であるが、relaxase の活性には二価の陽イオンが必要であることが知られており、*in vitro* において種々の二価の陽イオンを用いた活性測定が行われた (118, 119, 120, 121)。Larkin らは、F プラスミドの relaxase である TraI のアミノ酸残基を置換し、*in vitro* における  $\text{Mg}^{2+}$  と  $\text{Mn}^{2+}$  の活性の比較や、*in vivo* におけるプラスミドの接合伝達頻度の比較を行った (119)。それにより、*in vivo* において  $\text{Mn}^{2+}$  よりも  $\text{Mg}^{2+}$  の方が TraI の活性に重要であることが示された。また、Xia と Robertus は、IncI プラスミド pCU1 の relaxase である MobA は、*in vitro* において  $\text{Ca}^{2+}$  や  $\text{Mg}^{2+}$  よりも  $\text{Mn}^{2+}$  の方が親和性が高いものの、活性においては同等であると述べている (121)。

このように、二価の陽イオンがタンパク質レベルで接合伝達に重要な役割を果たしていることは知られているが、細胞外の環境中の二価の陽イオンの濃度、特に細胞内において高濃度存在する  $\text{Mg}^{2+}$  (122) が relaxase の活性に影響を与えているとは考えにくい。また、供与菌が同じでもプラスミドによって環境中の  $\text{Ca}^{2+}$  と  $\text{Mg}^{2+}$  の有無が接合伝達頻度に与える影響がことなることから、細胞内ではなく、例えば接合橋の構造や受容菌の細胞膜との親和性など、細胞外に原因があるのではないかと推察される。

ゲノム既知の4種類の供与菌と5種類の受容菌を用い、 $\text{Ca}^{2+}$  と  $\text{Mg}^{2+}$  の濃度を変化させ、各濃度における接合伝達頻度を測定した結果、多くの組み合わせで  $\text{Ca}^{2+}$  と  $\text{Mg}^{2+}$  の濃度依存的な接合伝達頻度の上昇が観察された。一方で、*P. chlororaphis* を供与菌と受容菌のいず

れかとして用いた場合、*P. putida* IAM1236RG 株を受容菌として用いた場合に、いずれも接合伝達頻度が低く、 $\text{Ca}^{2+}$  と  $\text{Mg}^{2+}$  の影響が見られないことが明らかになった。このことから、同一のプラスミドであっても、供与菌や受容菌によって、 $\text{Ca}^{2+}$  と  $\text{Mg}^{2+}$  の影響に違いがあることが示された。

本章の結果から、プラスミド、供与菌・受容菌の組み合わせによって、環境中の  $\text{Ca}^{2+}$  と  $\text{Mg}^{2+}$  の濃度が接合伝達頻度に与える影響に違いがあることが示された。この原因を調べるために、環境変化が供与菌や受容菌に与える影響の転写レベル、タンパク質レベルでの解析が必要であると考えられる。

## 第 4 章

### $\text{Ca}^{2+}$ , $\text{Mg}^{2+}$ の有無により転写変動する遺伝子の探索

#### 4-1. 諸言

環境中の  $\text{Ca}^{2+}$  と  $\text{Mg}^{2+}$  の有無によって pCAR1 の接合伝達頻度に違いが見られる原因として、プラスミド上の因子、供与菌の因子、受容菌の因子が考えられる．原因因子が遺伝子である場合、環境中の  $\text{Ca}^{2+}$  と  $\text{Mg}^{2+}$  の有無でその転写量に変化が見られる可能性がある．そこで、第 3 章において  $\text{Ca}^{2+}$  と  $\text{Mg}^{2+}$  の濃度変化によって pCAR1 の接合伝達頻度に顕著に違いが見られた供与菌と受容菌の組み合わせである Pf0-1L(pCAR1::*rfp*) 株を供与菌、KT2440 株を受容菌として接合実験を行い、 $\text{Ca}^{2+}$  及び  $\text{Mg}^{2+}$  添加・非添加、供与菌及び受容菌単独・混合時における染色体とプラスミドのトランスクリプトーム比較による原因遺伝子の探索を行った．

## 4-2. 材料と方法

### 4-2-1. 使用した菌株，プラスミド，培地，及び培養条件

本章で使用した抗生物質との略称と終濃度，溶媒を Table 4-1 に，菌株及びプラスミドを Table 4-2 に示す．菌株の培養には LB 培地 (10 g/l Bacto trypton, 5 g/l Yeast extract, 10 g/l NaCl, pH7.0) を用いて 30 °C で培養した．5 ml の試験管を用いて培養する際は，300 rpm で振とうした．平板培地には微生物培養用精製寒天末 (Nakarai Tesqu, Inc., Tokyo, Japan) を培地に対して 1.6 % (w/v) となるように添加した．接合実験には CF buffer (2.2 g/l Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.8 g/l KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 3.0 g/l NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>) を用いた．CF buffer 作製の際は Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup> を除去するために，事前に使用する器具を milliQ 水でよく洗浄した．接合時に加えるミネラルは CaCl<sub>2</sub>, MgSO<sub>4</sub> それぞれ 400 mM のストックとして添加した．

**Table 4-1.** 本章で使用した抗生物質

抗生物質	略称	終濃度	溶媒
Kanamycin	Km	50 mg/ml	H <sub>2</sub> O
Gentamycin	Gm	30 mg/ml	H <sub>2</sub> O
Rifampicin	Rif	25 mg/ml	MeOH

**Table 4-2.** 本章で使用した菌株

菌株	関連する性質	参考文献
<i>Pseudomonas fluorescens</i>		
Pf0-1RG	Spontaneously Rif <sup>r</sup> , Gm <sup>r</sup> gene cassette	Shintani <i>et al.</i> , 2005a
Pf0-1 L(pCAR1::rfp)	Pf0-1 with <i>lacI</i> , pCAR1::rfp	Shintani <i>et al.</i> , 2010
<i>Pseudomonas putida</i>		
KT2440RG	Spontaneously Rif <sup>r</sup> , Gm <sup>r</sup> gene cassette	Shintani <i>et al.</i> , 2005a
SM1443(pCAR1::rfp)	SM1443 (a derivative strain of KT2440) carrying pCAR1::rfp	Shintani <i>et al.</i> , 2008a

### 4-2-2. マイクロアレイに供するサンプルの作成および接合伝達頻度の評価

1. グリセロールストックから供与菌 [*P. fluorescens* Pf0-1 L(pCAR1::rfp)] を LB + Km 寒天培地に，受容菌 (*P. putida* KT2440RG) を LB + Rif + Gm 寒天培地にストリークし，30 °C で 2 日間静置培養した．
2. 供与菌を LB + Km 液体培地に，受容菌を LB + Rif + Gm 液体培地に植菌し，30 °C で一

晩振盪培養した。

3. 供与菌の培養液を 4 本の 2 ml チューブに 2 ml , 受容菌の培養液を 4 本の 2 ml チューブに 2 ml ずつ分注した。
4. 13,000 rpm , 室温, 1 min 遠心した。
5. デカンテーション, 及び 200  $\mu$ l のピペットマンを用いて上清を捨て, 1 ml の CF buffer に再懸濁した。
6. 4. と 5. の操作 (洗菌) を 5 回行った。
7. 新しい 2 ml チューブに CF buffer を 900  $\mu$ l 分注し, 再懸濁液を 100  $\mu$ l 加え, 10 倍希釈し, OD<sub>600</sub> を測定した。
8. 供与菌と受容菌を OD<sub>600</sub> が 2.0 となるように, Ca<sup>2+</sup> と Mg<sup>2+</sup> を 400  $\mu$ M ずつ添加した CF buffer と添加していない CF buffer で希釈した。
9. 8. で OD<sub>600</sub> を調整した菌懸濁液を用いて以下のサンプルを各菌株の OD<sub>600</sub> が 1.0 となるように 8 ml ずつ, 計 6 通りのサンプルを作製し, 50 ml チューブ内で混合した (以下接合溶液)。

**Table 4-3. マイクロアレイ解析に供したサンプル**

I.	供与菌+	受容菌-	Ca <sup>2+</sup> , Mg <sup>2+</sup> +
II.	供与菌+	受容菌-	Ca <sup>2+</sup> , Mg <sup>2+</sup> -
III.	供与菌-	受容菌+	Ca <sup>2+</sup> , Mg <sup>2+</sup> +
IV.	供与菌-	受容菌+	Ca <sup>2+</sup> , Mg <sup>2+</sup> -
V.	供与菌+	受容菌+	Ca <sup>2+</sup> , Mg <sup>2+</sup> +
VI.	供与菌+	受容菌+	Ca <sup>2+</sup> , Mg <sup>2+</sup> -

+ は添加, - は無添加を表す。

10. 小さく切った Gas Permeable Adhesive Seals (Thermo SCIENTIFIC) で 50ml チューブにフタをし (チューブのフタは閉めない), 30 °C で 24 hr 静置した。
11. 接合溶液を 200  $\mu$ l ずつ分注して残りを RNA 抽出に供した。
12. 分注した接合溶液から 10<sup>0</sup> ~10<sup>5</sup> 希釈溶液を作成し, LB + Km プレートに 10<sup>3</sup> ~10<sup>5</sup> 希釈溶液を, LB + Km + Rif + Gm プレートに 10<sup>0</sup> ~10<sup>3</sup> 希釈溶液を 10  $\mu$ l ずつ 3 連で滴下した。
13. 30 °C で静置培養し, 1 日後に LB + Km プレートに生育した供与菌のコロニー数を, 2 日後に LB + Km + Rif + Gm プレート上に生育した接合伝達体のコロニー数をカウントし, 接合伝達頻度 (接合伝達体の CFU / 供与菌の CFU) を算出した。

#### 4-2-3. マイクロアレイのサンプル調整

##### 【RNA 抽出】

RNAprotect BacteriaReagent (QIAGEN)と NucleoSpin® 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改変して行った.

1. RNA を安定化させるために速やかにサンプルと等量の RNAprotect BacteriaReagent を混合した.
2. 室温で 10 min 静置した後、遠心 ( $5,000 \times g$ , 10 min, RT) し、上清を捨てた.
3. サンプルを lysozyme を 0.2 mg/ml 含んだ TE buffer 100  $\mu$ l に懸濁した. その際、50 ml チューブの壁面に付着している菌体をチップで丁寧にこそぎ落とし、ピペッティングと vortex ミキサーを用いて塊が残らないようによく懸濁した.
4. 37 °Cで 10 min インキュベートした.
5. 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.
6. QIA shredder カラムに全量アプライし、遠心 ( $11,000 \times g$ , 1 min, RT) した.
7. 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.
8. 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 (吸着).
9. 溶出液を再び同じ 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 (吸着 2).
10. カラムを 2 ml チューブに移し、RA3 buffer を 600  $\mu$ l アプライし、遠心 ( $11,000 \times g$ , 30 sec, RT) した (洗浄 1).
11. カラムを 2 ml チューブに移し、RA3 buffer を 250  $\mu$ l アプライし、遠心 ( $11,000 \times g$ , 2 min, RT) した (洗浄 2).
12. カラムを 1.5 ml チューブに移し、dH<sub>2</sub>O をカラムの中央に 60  $\mu$ l アプライし、1 min 静置した後、遠心 ( $11,000 \times g$ , 2 min, RT) した (溶出 1).
13. 溶出液を再びカラムの中央に全量アプライし、1 min 静置した後、遠心 ( $11,000 \times g$ , 2 min, RT) した (溶出 2).
14. 1  $\mu$ l を濃度測定に用い、残りを DNase I 処理に供した. 濃度測定及び純度評価は、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. 濃度計算は以下の式で行った.

$$\text{濃度 (ng/}\mu\text{l)} = A_{260} \times 40 \quad (\text{RNA の吸光係数})$$

##### 【DNase I 処理】

RQ1 DNase (Promega) を用いて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.



Total RNA	(全量)	60 $\mu$ l
10 $\times$ reaction buffer		8 $\mu$ l
RQ1 DNase (Promega)	(1 unit/ $\mu$ l)	8 $\mu$ l
dH <sub>2</sub> O		4 $\mu$ l
計		80 $\mu$ l

2. Stop solution を 5  $\mu$ l 加えて、65  $^{\circ}$ C で 10 min 加熱し、反応を停止した。

### 【RNA 精製】

NucleoSpin<sup>®</sup> RNA Clean-up キット (MACHEREY-NAGEL) を使用し、添付のプロトコルを以下のように改変して行った。

1. 85  $\mu$ l の RNA 粗抽出液に 15  $\mu$ l の dH<sub>2</sub>O を加え、100  $\mu$ l にした。
2. 300  $\mu$ l RA1 buffer と 300  $\mu$ l 99.5% EtOH の premix を作成し、ピペッティングにより RNA 粗抽出液と混合した。
3. NucleoSpin RNA II カラムに全量 (約 700  $\mu$ l) アプライし、遠心 (8,000  $\times$  g, 30 sec, RT) した (吸着)。
4. 溶出液を再び同じ NucleoSpin RNA II カラムに全量 (約 700  $\mu$ l) アプライし、遠心 (8,000  $\times$  g, 30 sec, RT) した (吸着 2)。
10. カラムを 2 ml チューブに移し、RA3 buffer を 700  $\mu$ l アプライし、遠心 (11,000  $\times$  g, 30 sec, RT) した (洗浄 1)。
11. カラムを 2 ml チューブに移し、RA3 buffer を 350  $\mu$ l アプライし、遠心 (11,000  $\times$  g, 2 min, RT) した (洗浄 2)。
12. カラムを 1.5 ml チューブに移し、dH<sub>2</sub>O をカラムの中央に 40  $\mu$ l アプライし、1 min 静置した後、遠心 (11,000  $\times$  g, 2 min, RT) した (溶出 1)。
13. 溶出液を再びカラムの中央に全量アプライし、1 min 静置した後、遠心 (11,000  $\times$  g, 2 min, RT) した (溶出 2)。
14. 1  $\mu$ l を濃度測定に用い、残りを DNase I 処理に供した。濃度測定及び純度評価は、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。濃度計算は以下の式で行った。

$$\text{濃度 (ng/ $\mu$ l)} = A_{260} \times 40 \quad (\text{RNA の吸光係数})$$

### 【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<sup>™</sup> II Reverse Transcriptase (Invitrogen) を用いて、以下の手順で行った。また、1 サンプルにつき 3 連で行った。

1. 精製した RNA とプライマーを PCR チューブ内で混合し、サーマルサイクラーを用いて

以下のプログラムでアニールさせた。

total RNA	12 µg	20 µl	温度	時間	サイクル数
RNase free H <sub>2</sub> O			70 °C	10:00	1
Random primer (75 ng/µl )		10 µl	25 °C	10:00	1
(Invitrogen)			4 °C	hold	1
計					
					30 µl

2. 反応液のチューブをタッピング、フラッシング後、以下の試薬を添加してサーマルサイクラーを用いて逆転写反応を行った。

5 × First-Strand Buffer	12 µl	温度	時間	サイクル数
0.1 M DTT	6 µl	25 °C	10:00	1
10 mM dNTP + dUTP	3 µl	37 °C	60:00	1
RNaseOUT 40 unit/µl	1.5 µl	42 °C	60:00	1
SuperScript™ II 200 unit/µl	7.5 µl	70 °C	10:00	1
計		4 °C	hold	1
				60 µl

3. 反応液のチューブをタッピング、フラッシング後、全量を 1.5 ml チューブに移し、1N NaOH を 20 µl 加えてヒートブロックを用いて 65 °C で 30 min 加熱し、RNA を加水分解した。

4. 1N HCl を 20 µl 加えて中和した。

#### 【cDNA 精製】

QIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN) を用いて添付のプロトコルに従った。ただし、標準の PBI バッファーにはアレイの検出時のバックグラウンドを上げてしまう pH 指示薬が添加されているため、pH 指示薬を含まない PB buffer を Qiagen 社から送付してもらった。また、2 連分の cDNA を同じカラムにまとめて吸着させた。

1. RNA 加水分解後のサンプルに PB buffer を 500 µl (5 倍量) 加え、ピペッティングにより混合した。
2. QIAquick spin Column に全量アプライし、遠心 (17,900 × g, 1 min, RT) した (吸着 1)。
3. 溶出液を再び同じ QIAquick spin Column に全量アプライし、遠心 (17,900 × g, 1 min, RT) した (吸着 2)。
4. カラムに PE buffer を 750 µl アプライし、遠心 (17,900 × g, 1 min, RT) した (洗浄 1)。
5. さらに遠心遠心 (17,900 × g, 1 min, RT) し、dry up した。
6. カラムを 1.5 ml チューブに移し、EB buffer をカラムの中央に 30 µl アプライし、1 min 静

置した後、遠心 ( $17,900 \times g$ , 1 min, RT) した (溶出 1)。

7. 溶出液を再びカラムの中央に全量アプライし, 1 min 静置した後, 遠心 ( $17,900 \times g$ , 2 min, RT) した (溶出 2)。
8. 1  $\mu$ l を濃度測定に用い, 残りを DNase I 処理に供した. 濃度測定及び純度評価は, 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. 濃度計算は以下の式で行った.

$$\text{濃度 (ng/}\mu\text{l)} = A_{260} \times 33 \quad (\text{single-stranded cDNA の吸光係数})$$

#### 【断片化・ラベリング】

1. 精製した cDNA と試薬を PCR チューブ内で混合し, 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.

cDNA	5 $\mu$ g	32.2 $\mu$ l	温度	時間	サイクル数
RNase free H <sub>2</sub> O			37 °C	60:00	1
10 $\times$ buffer		4.8 $\mu$ l	93 °C	2:00	1
APE1		7.0 $\mu$ l	4 °C	10:00	1
UDG		4.0 $\mu$ l			
計		48 $\mu$ l			

2. 3  $\mu$ l を分取してアガロースゲル電気泳動に供し, 断片化の度合いを確認した.
3. 残り全量に以下の試薬を添加して, 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 $\mu$ l	温度	時間	サイクル数
5 $\times$ buffer		12 $\mu$ l	37 °C	60:00	1
TdT		2 $\mu$ l	70 °C	2:00	1
Biotin ddUTP	5 mM	1 $\mu$ l	4 °C	10:00	1
計		60 $\mu$ l			

#### 【ハイブリダイゼーション】

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

1. 以下の組成でラベリング後の cDNA と試薬を 1.5 ml チューブ内で混合し, hybridization cocktail を調整した. すぐにハイブリダイゼーションさせない場合には 6-8 時間なら 4 °C, 数日なら -20 °C, 長期なら -80 °C で保存した.

Labeled cDNA		60 $\mu$ l
Control Oligonucleotide B2	3 nM	3.3 $\mu$ l
5 $\times$ Hybridization mix		100 $\mu$ l
DMSO	室温保存	14 $\mu$ l
RNase free H <sub>2</sub> O		23.7 $\mu$ l
計		60 $\mu$ l

2. hybridization cocktail をタッピング、フラッシングし、99  $^{\circ}$ C のヒートブロックで 5 min 加熱した。
3. 50  $^{\circ}$ C (pCAR1 のチップの場合は 45  $^{\circ}$ C) に移し、5 min 加熱した。
4. 遠心 (15,000 rpm, 1 min, RT) した。
5. 室温に戻したアレイチップに全量 (200  $\mu$ l, pCAR1 のチップの場合は 130  $\mu$ l) 注入した。
6. 50  $^{\circ}$ C (pCAR1 のチップの場合は 45  $^{\circ}$ C) のハイブリオーブンに入れ、60 rpm で回転させながら、16 hr ハイブリダイゼーションさせた。

#### 【用いた DNA チップ】

Affymetrix 社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用いた。染色体 DNA の両鎖について 25 mer の DNA プローブが KT2440 株で 1,110,578 本、Pf0-1 株で 1,175,336 本、11 塩基密度で敷き詰められている。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。

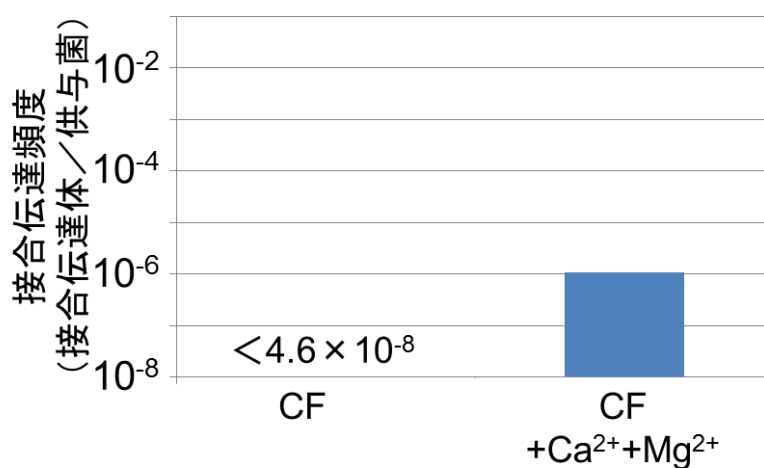
#### 【検出後のデータ処理】

Affymetrix 社の Tiling Analysis Software Ver1.1.02 を用いて行い、前後 2 本のプローブと合わせた 3 本のプローブの中央値を、そのプローブのシグナル値とした (ソフトウェアの設定で 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。なお、シグナル値が 64 未満のものは過去の例から再現性が低いことが知られており (123, 124, 125)、転写されていないとみなした。

## 4-3. 結果

### 4-3-1. マイクロアレイに供したサンプルの接合伝達頻度の確認

マイクロアレイに供するサンプルの接合伝達頻度を測定し、 $\text{Ca}^{2+}$  と  $\text{Mg}^{2+}$  の有無で接合伝達頻度に差があることを確認した。その結果、 $\text{Ca}^{2+}$  と  $\text{Mg}^{2+}$  を添加していないサンプルでは接合伝達頻度が検出限界以下 ( $<4.6 \times 10^{-8}$ ) であったのに対し、 $\text{Ca}^{2+}$  と  $\text{Mg}^{2+}$  を添加することで、接合伝達頻度が  $1.1 \times 10^{-6}$  まで上昇した。このことから、このサンプルは  $\text{Ca}^{2+}$  と  $\text{Mg}^{2+}$  の有無で接合伝達頻度に差がり、マイクロアレイ解析に用いることができると判断した。



**Fig. 4-1.** マイクロアレイに供したサンプルの接合伝達頻度

縦軸は接合伝達頻度（接合伝達体の CFU / 供与菌の CFU）を、横軸は接合環境 [CF buffer, CF buffer +  $\text{Ca}^{2+}$  (400  $\mu\text{M}$ ) +  $\text{Mg}^{2+}$  (400  $\mu\text{M}$ )] を示す。図中の数字は検出限界を表す。

#### 4-3-2. $\text{Ca}^{2+}$ と $\text{Mg}^{2+}$ の有無で転写変動する遺伝子の網羅的抽出

Pf0-1L(pCAR1::rfp) 株を供与菌，KT2440 株を受容菌として接合実験を行い， $\text{Ca}^{2+}$  及び  $\text{Mg}^{2+}$  添加・非添加，供与菌及び受容菌単独・混合時における染色体とプラスミドのトランスクリプトームデータを取得した．以下にマイクロアレイ解析に供したサンプルと評価した転写変動をまとめた表を示す．各条件においてサンプル中に含まれる要素を赤字で強調した．なお，サンプル I の供与菌染色体上の結果は，シグナル強度が極端に低く，他のサンプルと比較することができなかった．

**Table 4-3. マイクロアレイ解析に供したサンプル**

I.	<b>供与菌+</b>	受容菌－	<b><math>\text{Ca}^{2+}</math> , <math>\text{Mg}^{2+}</math> +</b>
II.	<b>供与菌+</b>	受容菌－	$\text{Ca}^{2+}$ , $\text{Mg}^{2+}$ －
III.	供与菌－	<b>受容菌+</b>	<b><math>\text{Ca}^{2+}</math> , <math>\text{Mg}^{2+}</math> +</b>
IV.	供与菌－	<b>受容菌+</b>	$\text{Ca}^{2+}$ , $\text{Mg}^{2+}$ －
V.	<b>供与菌+</b>	<b>受容菌+</b>	<b><math>\text{Ca}^{2+}</math> , <math>\text{Mg}^{2+}</math> +</b>
VI.	<b>供与菌+</b>	<b>受容菌+</b>	$\text{Ca}^{2+}$ , $\text{Mg}^{2+}$ －

+ は添加，- は無添加を表す．

**Table 4-4. トランスクリプトーム比較を行ったサンプルの組み合わせと評価する転写変動**

比較するサンプル	抽出する遺伝子	評価する転写変動
I + II	供与菌染色体，プラスミド	供与菌単独時に $\text{Ca}^{2+}$ と $\text{Mg}^{2+}$ が与える影響
III + IV	受容菌染色体	受容菌単独時に $\text{Ca}^{2+}$ と $\text{Mg}^{2+}$ が与える影響
V + VI	供与菌染色体，受容菌染色体， プラスミド	供与菌・受容菌混合時に $\text{Ca}^{2+}$ と $\text{Mg}^{2+}$ が与える影響
I + V	供与菌染色体，プラスミド	$\text{Ca}^{2+}$ と $\text{Mg}^{2+}$ 存在時に 受容菌が与える影響
II + VI	供与菌染色体，プラスミド	$\text{Ca}^{2+}$ と $\text{Mg}^{2+}$ 非存在時に 受容菌が与える影響
III + V	受容菌染色体	$\text{Ca}^{2+}$ と $\text{Mg}^{2+}$ 存在時に 供与菌が与える影響
IV + VI	受容菌染色体	$\text{Ca}^{2+}$ と $\text{Mg}^{2+}$ 非存在時に 供与菌が与える影響

### 【Ca<sup>2+</sup> と Mg<sup>2+</sup> が与える影響の解析】

#### ・ 供与菌単独時

供与菌単独で、Ca<sup>2+</sup> と Mg<sup>2+</sup> を添加したサンプルと添加していないサンプルのトランスクリプトームを比較した結果、pCAR1 上では、転写変動した遺伝子は抽出されなかった (Fig. 4-2, Table 4-5). また、供与菌染色体上の遺伝子については、シグナル強度が極端に低く、他のサンプルと比較することができなかった (Fig. 4-7).

#### ・ 受容菌単独時

受容菌単独で、Ca<sup>2+</sup> と Mg<sup>2+</sup> を添加したサンプルと添加していないサンプルのトランスクリプトームを比較した結果、受容菌染色体上では、全 5,530 個の遺伝子のうち、510 個の遺伝子の転写量が増加し、20 個の遺伝子の転写量が減少した (Fig. 4-3).

#### ・ 供与菌・受容菌混合時

供与菌と受容菌を混合し、Ca<sup>2+</sup> と Mg<sup>2+</sup> を添加したサンプルと添加していないサンプルのトランスクリプトームを比較した結果、pCAR1 上では、全 198 個の遺伝子のうち、2 個の遺伝子の転写量が増加し、転写量が減少した遺伝子は無かった (Fig. 4-2, Table 4-5). 供与菌染色体上では、全 5,722 個の遺伝子のうち、25 個の遺伝子の転写量が増加し、36 個の遺伝子の転写量が減少した (Fig. 4-7). 受容菌染色体上では、全 5,530 個の遺伝子のうち、98 個の遺伝子の転写量が増加し、24 個の遺伝子の転写量が減少した (Fig. 4-3).

### 【受容菌が与える影響の解析】

#### ・ Ca<sup>2+</sup> と Mg<sup>2+</sup> 存在時

Ca<sup>2+</sup> と Mg<sup>2+</sup> を添加し、供与菌単独のサンプルと供与菌と受容菌を混合したサンプルのトランスクリプトームを比較した結果、pCAR1 上では、全 198 個の遺伝子のうち、5 個の遺伝子の転写量が増加し、19 個の遺伝子の転写量が減少した (Fig. 4-2, Table 4-5). また、供与菌染色体上の遺伝子については、シグナル強度が極端に低く、他のサンプルと比較することができなかった (Fig. 4-7).

#### ・ Ca<sup>2+</sup> と Mg<sup>2+</sup> 非存在時

Ca<sup>2+</sup> と Mg<sup>2+</sup> を添加せず、供与菌単独のサンプルと供与菌と受容菌を混合したサンプルのトランスクリプトームを比較した結果、pCAR1 上では、全 198 個の遺伝子のうち、2 個の遺伝子の転写量が増加し、15 個の遺伝子の転写量が減少した (Fig. 4-2, Table 4-5). 供与菌染色体上では、全 5,722 個の遺伝子のうち、36 個の遺伝子の転写量が増加し、1,016 個の遺伝子の転写量が減少した (Fig. 4-7).

#### 【供与菌が与える影響の解析】

##### ・ $\text{Ca}^{2+}$ と $\text{Mg}^{2+}$ 存在時

$\text{Ca}^{2+}$  と  $\text{Mg}^{2+}$  を添加し、受容菌単独のサンプルと供与菌と受容菌を混合したサンプルのトランスクリプトームを比較した結果、受容菌染色体上では、全 5,530 個の遺伝子のうち、150 個の遺伝子の転写量が増加し、370 個の遺伝子の転写量が減少した (Fig. 4-5)。

##### ・ $\text{Ca}^{2+}$ と $\text{Mg}^{2+}$ 非存在時

$\text{Ca}^{2+}$  と  $\text{Mg}^{2+}$  を添加せず、受容菌単独のサンプルと供与菌と受容菌を混合したサンプルのトランスクリプトームを比較した結果、受容菌染色体上では、全 5,530 個の遺伝子のうち、147 個の遺伝子の転写量が増加し、116 個の遺伝子の転写量が減少した (Fig. 4-5)。

#### 4-4. 考察

本章では、環境中の  $\text{Ca}^{2+}$  と  $\text{Mg}^{2+}$  の有無が pCAR1 の接合伝達に与える影響を網羅的に解析した。第 3 章において、 $\text{Ca}^{2+}$  と  $\text{Mg}^{2+}$  の有無で接合伝達頻度に顕著な差がみられた供与菌と受容菌の組み合わせ [Pf0-1L(pCAR1::rfp) 株を供与菌, KT2440 株を受容菌] を用いて接合実験を行った。 $\text{Ca}^{2+}$  と  $\text{Mg}^{2+}$  の有無で pCAR1 の接合伝達頻度に顕著な差が見られる原因がプラスミド、供与菌、受容菌のいずれかが不明であり、また、この現象が供与菌、受容菌単独でも生じるか不明であるため、 $\text{Ca}^{2+}$  及び  $\text{Mg}^{2+}$  添加・非添加、供与菌及び受容菌単独、混合時における染色体とプラスミドのトランスクリプトームデータを取得した。

まず、マイクロアレイに供するサンプルが  $\text{Ca}^{2+}$  と  $\text{Mg}^{2+}$  の有無で接合伝達頻度に差があり、マイクロアレイ解析に用いることができることを確認した。次に、高密度タイリングアレイを用いてトランスクリプトームデータの取得を試みたが、供与菌単独で  $\text{Ca}^{2+}$  と  $\text{Mg}^{2+}$  を添加したサンプルにおいて、供与菌染色体上のデータを取得することができなかった (後述)。

#### 【pCAR1 上の遺伝子の転写変動】

供与菌単独では  $\text{Ca}^{2+}$  と  $\text{Mg}^{2+}$  の有無で転写変動した遺伝子は抽出されなかったが、受容菌存在時に  $\text{Ca}^{2+}$  と  $\text{Mg}^{2+}$  を添加することで、ORF145a および ORF145 の 2 つの遺伝子の転写量が 3 倍以上増加した (Table 4-5)。ORF145a, ORF145, ORF146 はオペロンを形成しており、異なる 6 種の宿主において転写量が異なることが知られている (125)。ORF145a は機能未知のタンパク質をコードしており、詳細な機能は明らかにされていない。ORF145, 146 は DNA primase をコードしており、詳細な機能は明らかにされていないが、ORF145, 146 を破壊することで pCAR1 の接合伝達頻度が減少することから、必須ではないものの、何らかの形で接合伝達に関わっていると考えられる (100)。また、形質転換によって導入した IncP-7 群プラスミドのミニレプリコンが多くの *Pseudomonas* 属内で複製することから



(82, 98), 接合伝達の効率が宿主域を決定している, つまり, IncP-7 群プラスミドの宿主域は, 複製システムではなく接合システムによって決定されていると考えられる (98). したがって, 接合伝達の効率に関与する ORF145a-ORF146 は IncP-7 群プラスミドの宿主域を決定する重要な要因であるかもしれない. また, これらの遺伝子は, 供与菌単独では  $\text{Ca}^{2+}$  と  $\text{Mg}^{2+}$  を添加しても転写量に変化が見られなかったことから, 受容菌が存在し, 接合伝達が起こる場合でのみ転写誘導されるように制御されている可能性がある. 今後はこれらの破壊株を用いて接合実験を行うことで, これらの遺伝子が  $\text{Ca}^{2+}$  と  $\text{Mg}^{2+}$  の有無で接合伝達頻度に顕著な差を生じる原因であるか確認する予定である. また, 興味深いことに, 他の接合伝達関連遺伝子の転写量は抽出されなかった. このことから, 接合伝達関連遺伝子は供与菌集団中の一部の細胞のみ転写量が増加していると思われる.

$\text{Ca}^{2+}$  と  $\text{Mg}^{2+}$  を添加し, 供与菌単独のサンプルと供与菌と受容菌を混合したサンプルのトランスクリプトームを比較することで, 受容菌の共存により転写変動する pCAR1 上の遺伝子を抽出した. その結果, 全 198 個の遺伝子のうち, 5 個の遺伝子の転写量が増加し, 19 個の遺伝子の転写量が減少した (Fig. 4-2). これらの遺伝子には受容菌を感知して接合伝達を促進する遺伝子が含まれると期待され, 転写量が増加した遺伝子には ORF145a, ORF145, 転写量が減少した遺伝子には核様体タンパク質 *phu*, *relaxase* である *traI* の直上流に位置し DNA recombination protein をコードする ORF120 が含まれていた. また,  $\text{Ca}^{2+}$  と  $\text{Mg}^{2+}$  を添加せず, 供与菌単独のサンプルと供与菌と受容菌を混合したサンプルのトランスクリプトームを比較することで, 受容菌の共存により転写変動する pCAR1 上の遺伝子を抽出した. その結果, 全 198 個の遺伝子のうち, 2 個の遺伝子の転写量が増加し, 15 個の遺伝子の転写量が減少した (Fig. 4-2). このうち, 共通して転写量が増加した遺伝子は *tnpS* (cointegrator) と *parA* (partitioning protein) の 2 個, 減少した遺伝子は 11 個であり, アントラニル酸代謝に関わる遺伝子や, outer membrane protein, putative ABC-transporter subunit などが含まれていた (Table 4-5). これらの遺伝子には, 接合伝達に関与せず受容菌の共存により転写変動する遺伝子が含まれていると期待される.  $\text{Ca}^{2+}$  と  $\text{Mg}^{2+}$  を添加し, 供与菌と受容菌を混合したときのみ転写変動した遺伝子は 8 個あり, *phu* が含まれていたが, その他に接合伝達に関与する遺伝子は抽出されなかった.

#### 【受容菌染色体上の遺伝子の転写変動】

受容菌単独で,  $\text{Ca}^{2+}$  と  $\text{Mg}^{2+}$  を添加したサンプルと添加していないサンプルのトランスクリプトームを比較することで,  $\text{Ca}^{2+}$  と  $\text{Mg}^{2+}$  の有無により転写変動する受容菌染色体上の遺伝子を抽出した. その結果, 全 5,530 個の遺伝子のうち, 510 個の遺伝子の転写量が増加し, 20 個の遺伝子の転写量が減少した (Fig. 4-3). COG 分類から, 転写や翻訳にかかわる遺伝子が多く転写誘導されていた (Fig. 4-4). また, 供与菌と受容菌を混合し,  $\text{Ca}^{2+}$  と  $\text{Mg}^{2+}$  を添加したサンプルと添加していないサンプルのトランスクリプトームを比較した結果, 受容菌染色体上では, 全 5,530 個の遺伝子のうち, 98 個の遺伝子の転写量が増加し,

24 個の遺伝子の転写量が減少した (Fig. 4-3). COG 分類から, 無機イオンの輸送にかかわる遺伝子が 9 個と多く転写誘導されていた (Fig. 4-4).  $\text{Ca}^{2+}$  と  $\text{Mg}^{2+}$  を添加しないと接合伝達が起こらないことから, 受容菌がプラスミドの侵入に対して何らかの防御応答を行っている可能性がある. しかし, プラスミドへの防御応答に関与する遺伝子は抽出されなかった. 両条件で共通して転写量が増加した遺伝子は 31 個あり, そのうち無機イオンの輸送にかかわる遺伝子が 6 個,  $\sigma$  因子が 4 個含まれており, 減少した遺伝子は 3 個であった (Fig. 4-3). 受容菌単独で転写量が増加した遺伝子は 510 個と数が多いが, 共通して転写量が増加した遺伝子はより確からしく  $\text{Ca}^{2+}$  と  $\text{Mg}^{2+}$  の添加により転写量が増加したと考えられる.

$\text{Ca}^{2+}$  と  $\text{Mg}^{2+}$  を添加し, 受容菌単独のサンプルと供与菌と受容菌を混合したサンプルのトランスクリプトームを比較することで, 供与菌の共存により転写変動する受容菌染色体上の遺伝子を抽出した. その結果, 全 5,530 個の遺伝子のうち, 150 個の遺伝子の転写量が増加し, 370 個の遺伝子の転写量が減少した (Fig. 4-5). COG 分類から, エネルギー生産にかかわる遺伝子が多く転写誘導され, 興味深いことに, 無機イオンの輸送にかかわる 11 個の遺伝子が転写抑制されていた (Fig. 4-6). また,  $\text{Ca}^{2+}$  と  $\text{Mg}^{2+}$  を添加せず, 受容菌単独のサンプルと供与菌と受容菌を混合したサンプルのトランスクリプトームを比較することで, 供与菌の共存により転写変動する受容菌染色体上の遺伝子を抽出した. その結果, 全 5,530 個の遺伝子のうち, 147 個の遺伝子の転写量が増加し, 116 個の遺伝子の転写量が減少した (Fig. 4-5). 興味深いことに, 鞭毛合成に関与する遺伝子 (*figA-D*, *fliL*, *O*) の転写量が減少していた. このうち, 共通して転写量が増加した遺伝子は 80 個, 減少した遺伝子は 78 個であった (Fig. 4-5).  $\text{Ca}^{2+}$  と  $\text{Mg}^{2+}$  の有無にかかわらず, プラスミドへの防御応答に関与する遺伝子は抽出されなかった.

#### 【供与菌染色体上の遺伝子の転写変動】

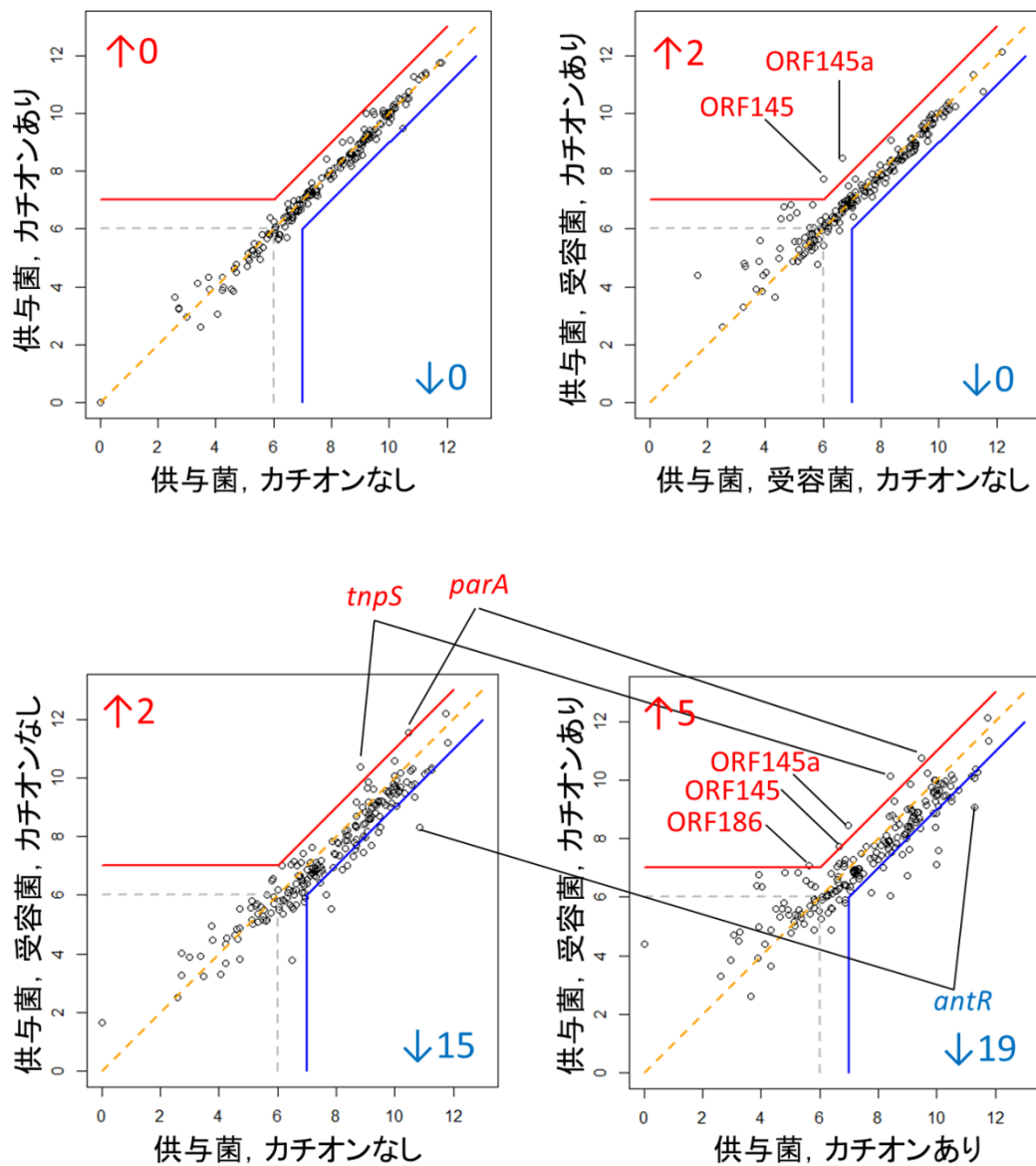
供与菌単独で,  $\text{Ca}^{2+}$  と  $\text{Mg}^{2+}$  を添加したサンプルと添加していないサンプルのトランスクリプトームを比較した結果, 添加したサンプルのシグナル強度が弱く, 散布図の分布が中心から大幅にずれており, 供与菌染色体上の遺伝子については比較できなかった (Fig. 4-7). また, 供与菌と受容菌を混合し,  $\text{Ca}^{2+}$  と  $\text{Mg}^{2+}$  を添加したサンプルと添加していないサンプルのトランスクリプトームを比較することで,  $\text{Ca}^{2+}$  と  $\text{Mg}^{2+}$  の有無により転写変動する供与菌染色体上の遺伝子を抽出した. 全 5,722 個の遺伝子のうち, 25 個の遺伝子の転写量が増加し, 36 個の遺伝子の転写量が減少した (Fig. 4-7). 転写量が減少した遺伝子のうち, 脂質輸送・代謝にかかわる遺伝子が 9 個と多かった (Fig. 4-8). これらの遺伝子には受容菌の感知やプラスミドの接合伝達を促進する遺伝子が含まれる可能性があるが, そのような遺伝子は抽出されなかった.

$\text{Ca}^{2+}$  と  $\text{Mg}^{2+}$  を添加し, 供与菌単独のサンプルと供与菌と受容菌を混合したサンプルのトランスクリプトームを比較した結果, 散布図の分布が中心から大幅にずれており, 供与菌染色体上の遺伝子については比較できなかった (Fig. 4-7). また,  $\text{Ca}^{2+}$  と  $\text{Mg}^{2+}$  を添加せ

ず、供与菌単独のサンプルと供与菌と受容菌を混合したサンプルのトランスクリプトームを比較した結果、供与菌染色体上では、全 5,722 個の遺伝子のうち、36 個の遺伝子の転写量が増加し、1,016 個の遺伝子の転写量が減少した (Fig. 4-7). 転写量の減少した遺伝子の数が 1,016 個と非常に多く抽出されたため、再現性を確認する必要がある。

本章にて行われたトランスクリプトーム解析の結果から、pCAR1 上の ORF145a と ORF145 が、 $\text{Ca}^{2+}$  と  $\text{Mg}^{2+}$  の有無や受容菌の有無によって接合伝達に影響を及ぼすことが示唆された。しかし、接合伝達において、供与菌が受容菌を認識し、そのシグナルがプラスミドに伝達されて接合伝達遺伝子の転写を誘導していると考えられるが、今回の結果からはこれらの遺伝子の転写制御を行っている因子は依然明らかにされていない。そこで今後は、本実験において取得できなかったデータの再取得や再現性を確認し、より詳細に解析する必要がある。より再現性の高いトランスクリプトームデータを比較解析することで、これまで全く知られていなかった IncP-7 群プラスミドの接合伝達メカニズムの解明につながると期待される。

本研究では原因因子を遺伝子に絞って探索を行ったが、 $\text{Ca}^{2+}$  と  $\text{Mg}^{2+}$  の有無によって、細胞膜の表面電荷、接合橋の構造、細胞の凝集など、転写以外にも様々な変化が考えられる。そこで今後は、タンパク質レベル、細菌群集構造レベルでの解析も行っていく必要がある。



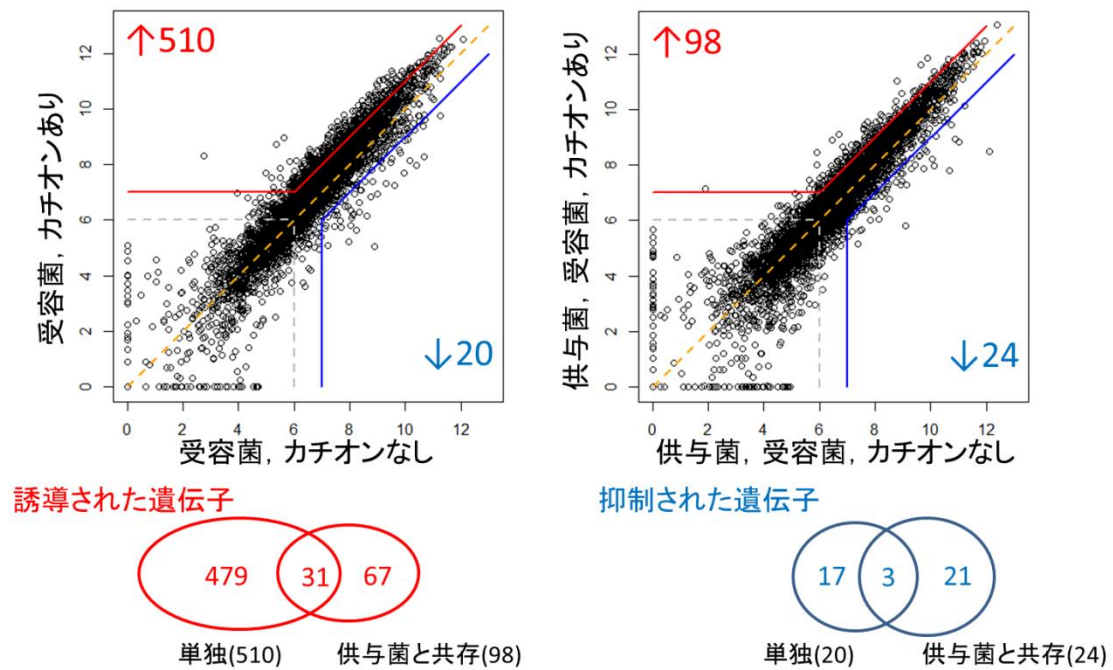
**Fig. 4-2. 転写変動した pCAR1 上の遺伝子数**

左上は  $\text{Ca}^{2+}$  と  $\text{Mg}^{2+}$  を添加した供与菌単独（縦軸）と  $\text{Ca}^{2+}$  と  $\text{Mg}^{2+}$  を添加していない供与菌単独（横軸），右上は  $\text{Ca}^{2+}$  と  $\text{Mg}^{2+}$  を添加した受容菌共存時（縦軸）と  $\text{Ca}^{2+}$  と  $\text{Mg}^{2+}$  を添加していない受容菌共存時（横軸），左下は  $\text{Ca}^{2+}$  と  $\text{Mg}^{2+}$  を添加していない受容菌共存時（縦軸）と  $\text{Ca}^{2+}$  と  $\text{Mg}^{2+}$  を添加していない供与菌単独（横軸），右下は  $\text{Ca}^{2+}$  と  $\text{Mg}^{2+}$  を添加した受容菌共存時（縦軸）と  $\text{Ca}^{2+}$  と  $\text{Mg}^{2+}$  を添加した供与菌単独（横軸）で，pCAR1 上の各 ORF の代表値（ORF 内に含まれるセンス側プローブの中央値）をプロットした散布図．

**Table 4-5. 転写変動した pCAR1 上の遺伝子**

Name	Product	Strand	D-	D+	DR-	DR+	D+/D-	DR+/DR-	DR-/D-	DR+/D+
antC	reductase component of anthranilate small subunit of terminal oxygenase	-	333	515	129	105	1.54	0.82	0.39	0.20
antB	component of anthranilate 1,2-dioxygenase	-	696	1073	283	191	1.54	0.68	0.41	0.18
antA	large subunit of terminal oxygenase component of anthranilate 1,2-dioxygenase	-	596	1012	208	137	1.70	0.66	0.35	0.14
antR	transcriptional regulator	+	1832	2486	321	539	1.36	1.68	0.18	0.22
ORF22	putative regulatory protein	+	226	344	46	67	1.52	1.05	0.28	0.19
ORF21	dienelactone hydrolase	-	487	449	177	178	0.92	1.00	0.36	0.40
ORF9	hypothetical protein	+	717	1005	414	330	1.40	0.80	0.58	0.33
carC	meta cleavage compound hydrolase	+	2454	2724	1242	1247	1.11	1.00	0.51	0.46
ORF7	hypothetical protein	+	2216	2492	1165	1065	1.12	0.91	0.53	0.43
carAd	ferredoxin reductase component of carbazole	+	1638	1710	882	811	1.04	0.92	0.54	0.47
carD	2-hydroxypenta-2,4-dienoate hydratase	+	937	950	569	467	1.01	0.82	0.61	0.49
ORF37	hypothetical protein	-	1059	1067	528	555	1.01	1.05	0.50	0.52
tnpS	cointegrase	-	456	340	1318	1134	0.74	0.86	2.89	3.34
ORF60a	hypothetical protein	-	2056	2313	1117	1111	1.13	0.99	0.54	0.48
parA	partitioning protein	+	1417	709	2975	1741	0.50	0.59	2.10	2.46
ORF76	hypothetical protein	-	388	351	159	186	0.90	1.17	0.41	0.53
ORF77	hypothetical protein	-	723	692	321	326	0.96	1.02	0.44	0.47
phu	DNA binding protein	+	931	1019	514	468	1.09	0.91	0.55	0.46
ORF120	putative DNA recombination protein	+	406	541	188	196	1.33	1.04	0.46	0.36
ORF123	hypothetical protein	+	175	165	86	99	0.94	1.14	0.49	0.60
ORF145a	hypothetical protein	+	104	125	101	349	1.20	3.47	0.97	2.79
ORF145	putative DNA primase	+	95	101	65	212	1.06	3.24	0.69	2.10
ORF167	probable helicase	+	1304	1456	709	674	1.12	0.95	0.54	0.46
tnpAc	transposase	+	515	494	252	293	0.96	1.17	0.49	0.59
ORF180	outer membrane protein	+	1629	1445	655	617	0.89	0.94	0.40	0.43
ORF186	hypothetical protein	+	72	50	129	134	0.89	1.04	1.79	2.10
ORF187	putative ABC-transporter subunit	-	201	216	65	72	1.07	1.10	0.33	0.33
ORF188	putative ABC-transporter subunit	-	298	286	118	129	0.96	1.10	0.39	0.45

D は供与菌, R は受容菌, +は Ca<sup>2+</sup> と Mg<sup>2+</sup> を添加, -は Ca<sup>2+</sup> と Mg<sup>2+</sup> を添加していないことを表す.



**Fig. 4-3.  $\text{Ca}^{2+}$  と  $\text{Mg}^{2+}$  の添加で転写変動した受容菌染色体遺伝子数**

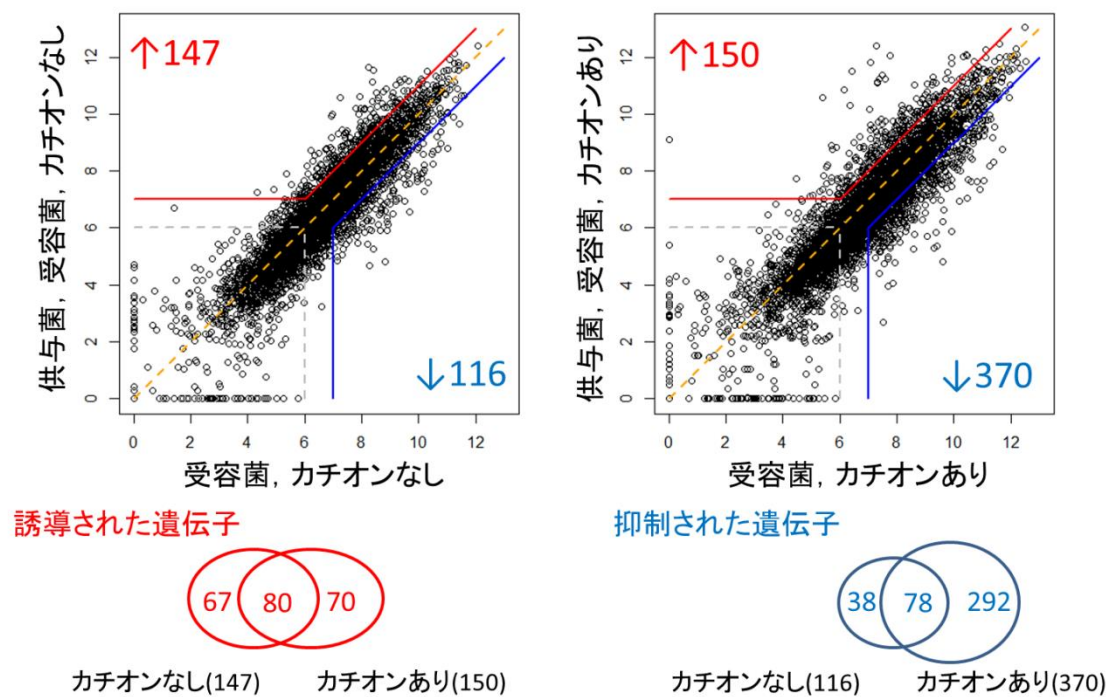
左上は  $\text{Ca}^{2+}$  と  $\text{Mg}^{2+}$  を添加した受容菌単独（縦軸）と  $\text{Ca}^{2+}$  と  $\text{Mg}^{2+}$  を添加していない受容菌単独（横軸），右上は  $\text{Ca}^{2+}$  と  $\text{Mg}^{2+}$  を添加した供与菌共存時（縦軸）と  $\text{Ca}^{2+}$  と  $\text{Mg}^{2+}$  を添加していない供与菌共存時（横軸）で，受容菌染色体上の各 ORF の代表値（ORF 内に含まれるセンス側プローブの中央値）をプロットした散布図．左下は  $\text{Ca}^{2+}$  と  $\text{Mg}^{2+}$  を添加により転写量が増加した遺伝子数，右下は  $\text{Ca}^{2+}$  と  $\text{Mg}^{2+}$  を添加により転写量が減少した遺伝子数のベン図．

	COG	Discription	誘導	抑制
Information storage and processing	[J]	Translation, ribosomal structure and biogenesis	53	0
	[A]	RNA processing and modification	0	0
	[K]	Transcription	35	0
	[L]	Replication, recombination and repair	15	1
Cellular processes and signaling	[B]	Chromatin structure and dynamics	0	0
	[D]	Cell cycle control, cell division, chromosome partitioning	6	0
	[V]	Defense mechanisms	1	1
	[T]	Signal transduction mechanisms	12	1
	[M]	Cell wall/membrane/envelope biogenesis	22	1
	[N]	Cell motility	12	0
Metabolism	[U]	Intracellular trafficking, secretion, and vesicular transport	5	0
	[O]	Posttranslational modification, protein turnover, chaperones	18	1
	[C]	Energy production and conversion	25	0
	[G]	Carbohydrate transport and metabolism	10	2
	[E]	Amino acid transport and metabolism	46	0
	[F]	Nucleotide transport and metabolism	18	2
	[H]	Coenzyme transport and metabolism	35	0
	[I]	Lipid transport and metabolism	12	0
Poorly characterized	[P]	Inorganic ion transport and metabolism	29	1
	[Q]	Secondary metabolites biosynthesis, transport and catabolism	2	0
	[R]	General function prediction only	34	5
	[S]	Function unknown	49	2
	[-]	Uncharacterized	71	3
	合計		510	20

	COG	Discription	誘導	抑制
Information storage and processing	[J]	Translation, ribosomal structure and biogenesis	0	0
	[A]	RNA processing and modification	0	0
	[K]	Transcription	4	1
	[L]	Replication, recombination and repair	3	0
Cellular processes and signaling	[B]	Chromatin structure and dynamics	0	0
	[D]	Cell cycle control, cell division, chromosome partitioning	0	0
	[V]	Defense mechanisms	0	0
	[T]	Signal transduction mechanisms	3	1
	[M]	Cell wall/membrane/envelope biogenesis	4	0
	[N]	Cell motility	0	1
Metabolism	[U]	Intracellular trafficking, secretion, and vesicular transport	0	0
	[O]	Posttranslational modification, protein turnover, chaperones	6	0
	[C]	Energy production and conversion	8	3
	[G]	Carbohydrate transport and metabolism	4	2
	[E]	Amino acid transport and metabolism	6	4
	[F]	Nucleotide transport and metabolism	1	1
	[H]	Coenzyme transport and metabolism	2	0
	[I]	Lipid transport and metabolism	4	1
Poorly characterized	[P]	Inorganic ion transport and metabolism	9	0
	[Q]	Secondary metabolites biosynthesis, transport and catabolism	1	1
	[R]	General function prediction only	10	1
	[S]	Function unknown	8	2
	[-]	Uncharacterized	25	6
	合計		98	24

**Fig. 4-4.  $\text{Ca}^{2+}$  と  $\text{Mg}^{2+}$  の添加で転写変動した受容菌染色体遺伝子の COG 分類**

受容菌単独で  $\text{Ca}^{2+}$  と  $\text{Mg}^{2+}$  の添加により変動した遺伝子の COG 分類（上）と供与菌共存時に  $\text{Ca}^{2+}$  と  $\text{Mg}^{2+}$  の添加により変動した遺伝子の COG 分類（下）。



**Fig. 4-5. 供与菌共存時に転写変動した受容菌染色体遺伝子数**

左上は  $\text{Ca}^{2+}$  と  $\text{Mg}^{2+}$  を添加していない供与菌共存時（縦軸）と  $\text{Ca}^{2+}$  と  $\text{Mg}^{2+}$  を添加していない受容菌単独（横軸），右上は  $\text{Ca}^{2+}$  と  $\text{Mg}^{2+}$  を添加した供与菌共存時（縦軸）と  $\text{Ca}^{2+}$  と  $\text{Mg}^{2+}$  を添加した受容菌単独（横軸）で，受容菌染色体上の各 ORF の代表値（ORF 内に含まれるセンス側プローブの中央値）をプロットした散布図．左下は供与菌が共存することにより転写量が増加した遺伝子数，右下は供与菌が共存することにより転写量が減少した遺伝子数のベン図．

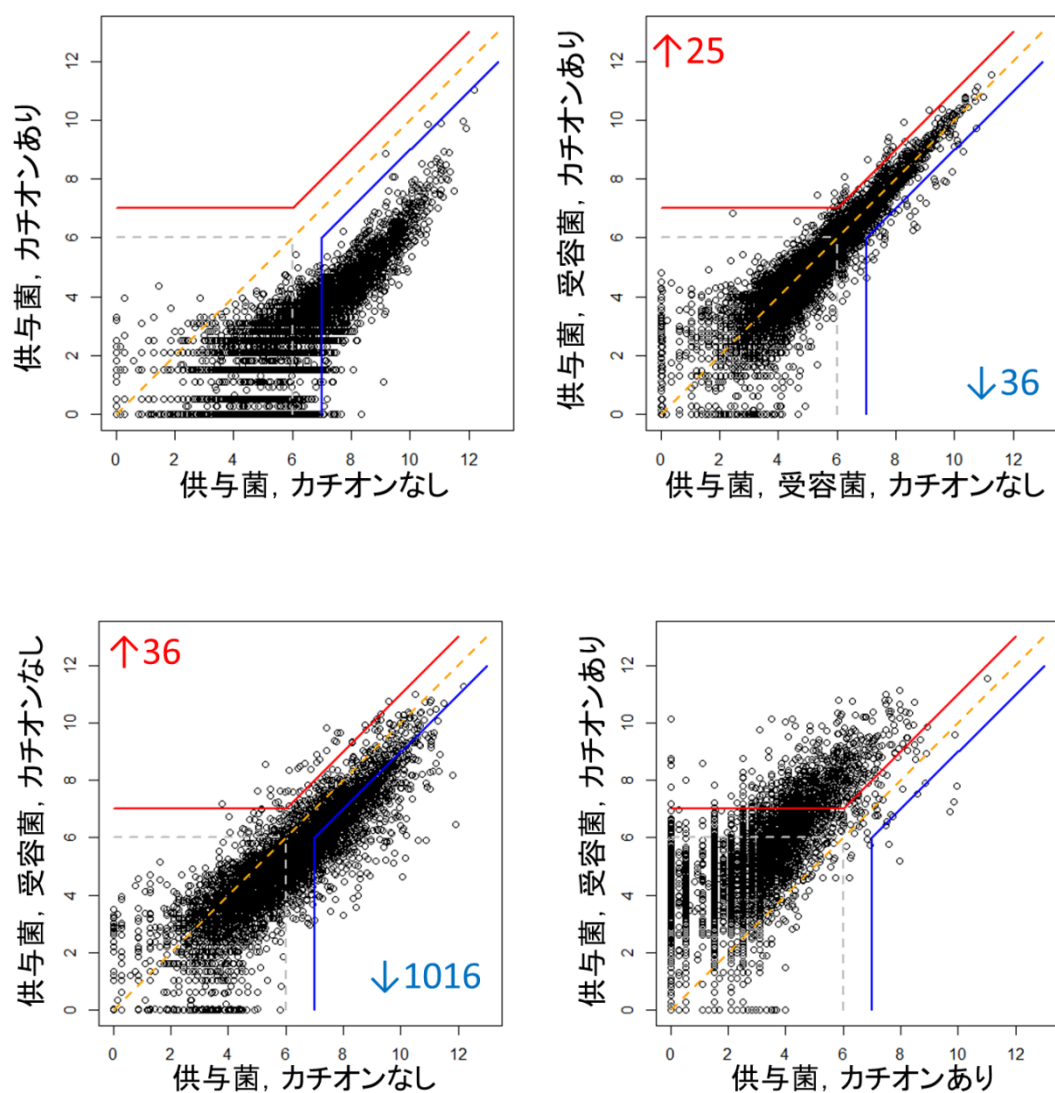


	COG	Discription	誘導	抑制
Information storage and processing	[J]	Translation, ribosomal structure and biogenesis	2	0
	[A]	RNA processing and modification	0	0
	[K]	Transcription	10	7
	[L]	Replication, recombination and repair	4	2
Cellular processes and signaling	[B]	Chromatin structure and dynamics	0	1
	[D]	Cell cycle control, cell division, chromosome partitioning	2	0
	[V]	Defense mechanisms	0	1
	[T]	Signal transduction mechanisms	2	4
	[M]	Cell wall/membrane/envelope biogenesis	9	3
	[N]	Cell motility	0	8
Metabolism	[U]	Intracellular trafficking, secretion, and vesicular transport	2	3
	[O]	Posttranslational modification, protein turnover, chaperones	11	0
	[C]	Energy production and conversion	20	2
	[G]	Carbohydrate transport and metabolism	6	4
	[E]	Amino acid transport and metabolism	16	9
	[F]	Nucleotide transport and metabolism	4	2
	[H]	Coenzyme transport and metabolism	1	1
	[I]	Lipid transport and metabolism	5	5
Poorly characterized	[P]	Inorganic ion transport and metabolism	2	11
	[Q]	Secondary metabolites biosynthesis, transport and catabolism	4	2
	[R]	General function prediction only	15	15
	[S]	Function unknown	12	11
	[-]	Uncharacterized	20	25
	合計		147	116

	COG	Discription	誘導	抑制
Information storage and processing	[J]	Translation, ribosomal structure and biogenesis	2	16
	[A]	RNA processing and modification	0	0
	[K]	Transcription	14	32
	[L]	Replication, recombination and repair	4	10
Cellular processes and signaling	[B]	Chromatin structure and dynamics	0	1
	[D]	Cell cycle control, cell division, chromosome partitioning	1	2
	[V]	Defense mechanisms	0	0
	[T]	Signal transduction mechanisms	4	19
	[M]	Cell wall/membrane/envelope biogenesis	9	11
	[N]	Cell motility	1	14
Metabolism	[U]	Intracellular trafficking, secretion, and vesicular transport	0	4
	[O]	Posttranslational modification, protein turnover, chaperones	15	11
	[C]	Energy production and conversion	12	12
	[G]	Carbohydrate transport and metabolism	7	16
	[E]	Amino acid transport and metabolism	6	25
	[F]	Nucleotide transport and metabolism	3	5
	[H]	Coenzyme transport and metabolism	2	19
	[I]	Lipid transport and metabolism	6	15
Poorly characterized	[P]	Inorganic ion transport and metabolism	5	23
	[Q]	Secondary metabolites biosynthesis, transport and catabolism	5	8
	[R]	General function prediction only	14	30
	[S]	Function unknown	10	33
	[-]	Uncharacterized	30	64
	合計		150	370

Fig. 4-6. 供与菌共存時に転写変動した受容菌染色体遺伝子の COG 分類

Ca<sup>2+</sup> と Mg<sup>2+</sup> の非存在時に供与菌と共存することで転写変動した遺伝子の COG 分類(上)と Ca<sup>2+</sup> と Mg<sup>2+</sup> の存在時に供与菌と共存することで転写変動した遺伝子の COG 分類(下).



**Fig. 4-7. 転写変動した供与菌染色体上の遺伝子数**

左上は  $\text{Ca}^{2+}$  と  $\text{Mg}^{2+}$  を添加した供与菌単独（縦軸）と  $\text{Ca}^{2+}$  と  $\text{Mg}^{2+}$  を添加していない供与菌単独（横軸），右上は  $\text{Ca}^{2+}$  と  $\text{Mg}^{2+}$  を添加した受容菌共存時（縦軸）と  $\text{Ca}^{2+}$  と  $\text{Mg}^{2+}$  を添加していない受容菌共存時（横軸），左下は  $\text{Ca}^{2+}$  と  $\text{Mg}^{2+}$  を添加していない受容菌共存時（縦軸）と  $\text{Ca}^{2+}$  と  $\text{Mg}^{2+}$  を添加していない供与菌単独（横軸），右下は  $\text{Ca}^{2+}$  と  $\text{Mg}^{2+}$  を添加した受容菌共存時（縦軸）と  $\text{Ca}^{2+}$  と  $\text{Mg}^{2+}$  を添加した供与菌単独（横軸）で，供与菌染色体上の各 ORF の代表値（ORF 内に含まれるセンス側プローブの中央値）をプロットした散布図．

	COG	Description	誘導	抑制
Information storage and processing	[J]	Translation, ribosomal structure and biogenesis	1	1
	[A]	RNA processing and modification	0	0
	[K]	Transcription	3	3
	[L]	Replication, recombination and repair	1	0
Cellular processes and signaling	[B]	Chromatin structure and dynamics	0	0
	[D]	Cell cycle control, cell division, chromosome partitioning	0	0
	[V]	Defense mechanisms	0	0
	[T]	Signal transduction mechanisms	2	0
	[M]	Cell wall/membrane/envelope biogenesis	0	3
	[N]	Cell motility	1	0
	[U]	Intracellular trafficking, secretion, and vesicular transport	0	0
Metabolism	[O]	Posttranslational modification, protein turnover, chaperones	0	1
	[C]	Energy production and conversion	1	1
	[G]	Carbohydrate transport and metabolism	0	1
	[E]	Amino acid transport and metabolism	2	2
	[F]	Nucleotide transport and metabolism	1	2
	[H]	Coenzyme transport and metabolism	0	2
	[I]	Lipid transport and metabolism	1	9
Poorly characterized	[P]	Inorganic ion transport and metabolism	0	2
	[Q]	Secondary metabolites biosynthesis, transport and catabolism	2	2
	[R]	General function prediction only	3	4
	[S]	Function unknown	1	1
	[-]	Uncharacterized	6	2
	合計		25	36

**Fig. 4-8. 受容菌共存時に  $\text{Ca}^{2+}$  と  $\text{Mg}^{2+}$  の添加で転写変動した供与菌染色体遺伝子の COG 分類**

$\text{Ca}^{2+}$  と  $\text{Mg}^{2+}$  の存在時に受容菌と共存することで転写変動した遺伝子の COG 分類

## 第 5 章

### NAPs 破壊が pCAR1 の接合伝達に及ぼす影響の評価

#### 5-1. 諸言

pCAR1 上には 3 種類の核様体タンパク質 (NAPs, nucleoid-associated proteins) がコードされている。他のプラスミドで、プラスミド上にコードされる NAPs が接合伝達の制御に関わることが知られており、pCAR1 もこれら 3 種類の NAPs が接合伝達に関わる可能性が考えられる。そこで本章では、*phu*, *pmr*, *pnd* を単独、あるいは複数破壊した際の接合伝達頻度や接合関連遺伝子の転写変動を調べた。

なお、本章の内容は論文として *Environmental Microbiology* に投稿中である。

“Cooperative function of the three different kinds of nucleoid-associated proteins encoded on the IncP-7 plasmid pCAR1.”

Suzuki, C., Hirotsu, R., Takahashi, Y., Matsui, K., Takeda, T., Yun, C., Shintani, M., Okada, K., Yamane, H. and Nojiri, H.

## 5-2. 材料と方法

### 5-2-1. 使用した菌株，プラスミド，培地，及び培養条件

本章で使用した抗生物質との略称と終濃度，溶媒を Table 5-1 に，菌株を Table 5-2 に示す．菌株の培養には LB 培地（10 g/l Bacto trypton, 5 g/l Yeast extract, 10 g/l NaCl, pH7.0），または 0.1%（w/v）の carbazole（CAR）を添加した NMM-4 培地（2.2 g/l Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.8 g/l KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 3.0 g/l NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>, 0.2 g/l MgSO<sub>4</sub>・7H<sub>2</sub>O, 0.01 g/l FeCl<sub>3</sub>・6H<sub>2</sub>O, 0.01 g/l CaCl<sub>2</sub>・2H<sub>2</sub>O）を用いて 30℃で培養した．5 ml の試験管を用いて培養する際は，300 rpm で振とうした．平板培地には微生物培養用精製寒天末（Nakarai Tesqu, Inc., Tokyo, Japan）を培地に対して 1.6%（w/v）となるように添加した．carbazole を添加した NMM-4 培地で平板培地を作成する際には，carbazole を添加していない NMM-4 培地の上に carbazole を添加した NMM-4 培地を重ねることで，クリアゾーンを短時間で確認できるようにした．

Table 5-1. 本章で使用した抗生物質

抗生物質	略称	終濃度	溶媒
Kanamycin	Km	50 mg/ml	H <sub>2</sub> O
Gentamycin	Gm	30 mg/ml	H <sub>2</sub> O
Rifampicin	Rif	25 mg/ml	MeOH

Table 5-2. 本章で使した菌株

菌株	関連する性質	参考文献
<i>Pseudomonas putida</i>		
KT2440KR	Spontaneously Rif <sup>r</sup> , Gm <sup>r</sup> gene cassette	100
KT2440(pCAR1pmrHis::Gm <sup>r</sup> )	KT2440(pCAR1pmrHis) harboring Gm <sup>r</sup> gene cassette and FRT sites	103
KT2440(pCAR1Δ <i>phu</i> ::Gm <sup>r</sup> )	KT2440 harboring pCAR1 carrying disrupted <i>phu</i> gene by Gm <sup>r</sup> gene cassette and FRT sites	100
KT2440(pCAR1Δ <i>pmr</i> ::Gm <sup>r</sup> )	KT2440 harboring pCAR1 carrying disrupted <i>pmr</i> gene by Gm <sup>r</sup> gene cassette and FRT sites	100
KT2440(pCAR1Δ <i>pnd</i> ::Gm <sup>r</sup> )	KT2440 harboring pCAR1 carrying disrupted <i>pnd</i> gene by Gm <sup>r</sup> gene cassette and FRT sites	100
KT2440(pCAR1Δ <i>pmr</i> Δ <i>phu</i> ::Gm <sup>r</sup> )	KT2440(pCAR1Δ <i>pmr</i> ) in which <i>phu</i> gene is disrupted by Gm <sup>r</sup> gene cassette and FRT sites	100
KT2440(pCAR1Δ <i>pmr</i> Δ <i>pnd</i> ::Gm <sup>r</sup> )	KT2440(pCAR1Δ <i>pmr</i> ) in which <i>pnd</i> gene is disrupted by Gm <sup>r</sup> gene cassette and FRT sites	100
KT2440(pCAR1Δ <i>pnd</i> Δ <i>phu</i> ::Gm <sup>r</sup> )	KT2440(pCAR1Δ <i>pnd</i> ) in which <i>phu</i> gene is disrupted by Gm <sup>r</sup> gene cassette and FRT sites	100
KT2440(pCAR1[Δ <i>pmr</i> Δ <i>pnd</i> ]:: <i>pmr</i> )	KT2440(pCAR1Δ <i>pmr</i> Δ <i>pnd</i> ) containing 0.57-kb <i>pmr</i> cassette inserted into 101,000-101,001 region of pCAR1	100
KT2440(pCAR1[Δ <i>pmr</i> Δ <i>phu</i> ]:: <i>pmr</i> )	KT2440(pCAR1Δ <i>pmr</i> Δ <i>phu</i> ) containing 0.57-kb <i>pmr</i> cassette inserted into 101,000-101,001 region of pCAR1	100

### 5-2-2. NAPs 破壊株の接合実験

1. グリセロールストックから供与菌を LB + Gm 寒天培地に, 受容菌を LB + Km + Rif 寒天培地にストリークし, 30 °Cで静置培養した.
2. 供与菌を CAR + Gm 寒天培地にパッチし, 30 °Cで静置培養した.
3. クリアゾーンの形成が確認された供与菌を LB + Gm 液体培地に, 受容菌を LB + Km + Rif 液体培地に植菌し, 30 °Cで一晩振盪培養した.
4. 供与菌の培養液を 2 ml チューブに 2 ml , 受容菌の培養液を 2 本の 2 ml チューブに 2 ml ずつ分注した.
5. 13,000 rpm , 室温, 1 min 遠心した.
6. デカンテーション, 及び 200 µl のピペットマンを用いて上清を捨て, 1 ml の LB 液体培地に再懸濁した.
7. 新しい 2 ml チューブに LB 液体培地を 900 µl 分注し, 再懸濁液を 100 µl 加え, 10 倍希釈し, OD<sub>600</sub> を測定した.
8. 受容菌を OD<sub>600</sub> が 2.0 となるように LB 液体培地で希釈した.
9. 供与菌を OD<sub>600</sub> が 0.2 となるように LB 液体培地で希釈した.
10. 8. で調製した受容菌懸濁液 200 µl と 9. で調製した供与菌懸濁液 200 µl を新しい 2 ml チューブ内で混合した (以下接合溶液).
11. 小さく切った Gas Permeable Adhesive Seals (Thermo SCIENTIFIC) で 2 ml チューブにフタをし (チューブのフタは閉めない), 30 °Cで 3 hr 静置した.
12. 接合溶液の 10<sup>0</sup> ~10<sup>5</sup> 希釈溶液を作成し, LB + Gm プレートに 10<sup>3</sup> ~10<sup>5</sup> 希釈溶液を, LB + Km + Rif + Gm プレートに 10<sup>0</sup> ~10<sup>3</sup> 希釈溶液を 10 µl ずつ 3 連で滴下した.
13. 30 °Cで静置培養し, 1 日後に LB + Gm プレートに生育した供与菌のコロニー数を, 2 日後に LB + Km + Rif + Gm プレート上に生育した接合伝達体のコロニー数をカウントし, 接合伝達頻度 (接合伝達体の CFU / 供与菌の CFU) を算出した.

## 5-3. 結果

### 5-3-1. NAPs 単独破壊株の接合伝達頻度

NAPs を単独で破壊した pCAR1 を保持する *P. putida* KT2440 株を供与菌、プラスミドを保持しない *P. putida* KT2440KR 株を受容菌として LB 液体培地中で接合実験を行い、プラスミド上に挿入されたゲンタマイシン耐性と受容菌のカナマイシン、リファンピシン耐性を指標として接合伝達頻度（接合伝達体の CFU／供与菌の CFU）を評価した。その結果、NAPs を破壊していないコントロールとして用いた pCAR1pmrHis::Gm<sup>r</sup> ( $9.1 \times 10^{-4} \sim 1.1 \times 10^{-3}$ ) と比較して、pCAR1 $\Delta$ phu::Gm<sup>r</sup> ( $2.0 \times 10^{-5}$ ) において接合伝達頻度が 1/10 程に低下したものの、他の単独破壊株では大きな変化は見られなかった (Fig. 5-1. 上段)。

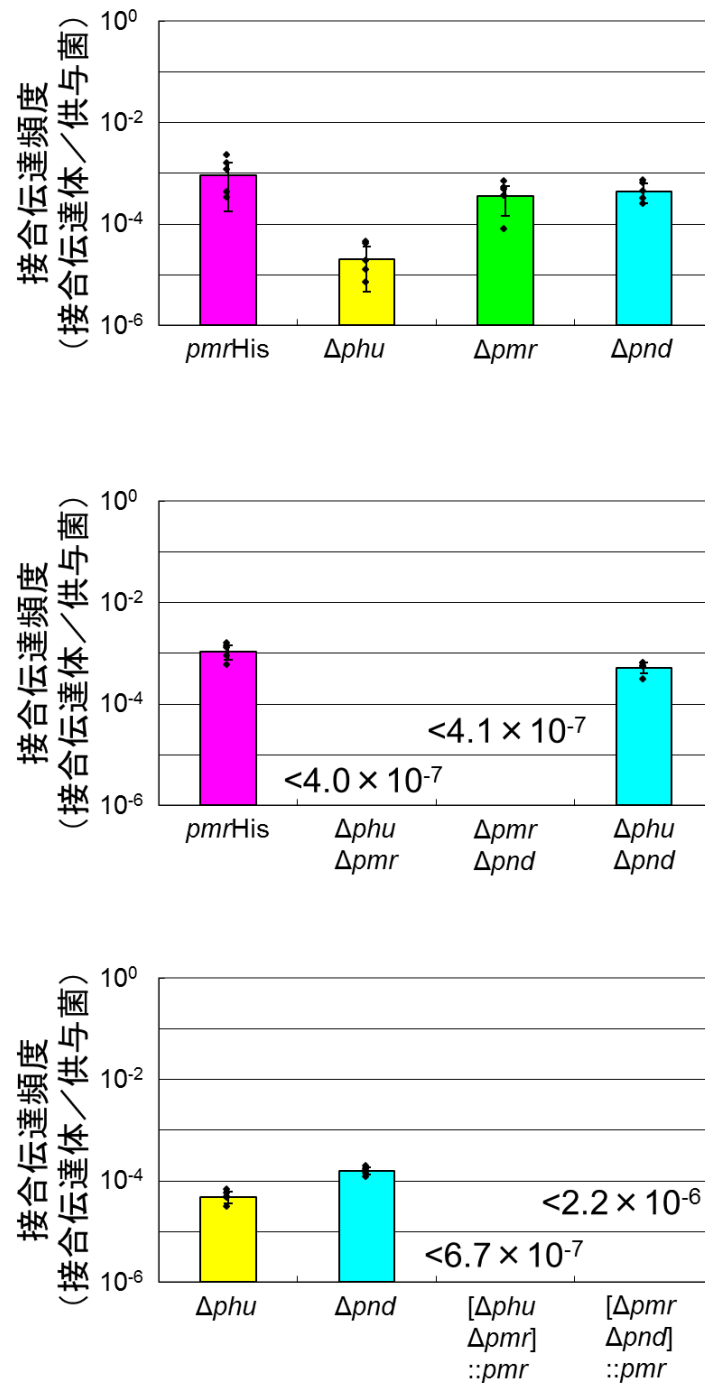
### 5-3-2. NAPs 二重破壊株の接合伝達頻度

NAPs を二重破壊した pCAR1 の接合伝達頻度を測定したところ、pCAR1pmrHis::Gm<sup>r</sup> と比較して pCAR1 $\Delta$ phu $\Delta$ pnd::Gm<sup>r</sup> では接合伝達頻度に変化が見られなかったのに対して ( $5.2 \times 10^{-4}$ )、pCAR1 $\Delta$ phu $\Delta$ pmr::Gm<sup>r</sup>、及び pCAR1 $\Delta$ pmr $\Delta$ pnd::Gm<sup>r</sup> は検出限界以下（それぞれ  $<4.0 \times 10^{-7}$ ,  $<4.1 \times 10^{-7}$ ）と大きく減少した (Fig. 5-1. 中段)。

### 5-3-3. プラスミド上に pmr を相補した NAPs 二重破壊株の接合伝達頻度

pCAR1 $\Delta$ phu $\Delta$ pmr::Gm<sup>r</sup>、及び pCAR1 $\Delta$ pmr $\Delta$ pnd::Gm<sup>r</sup> の ORF98-ORF99 遺伝子間領域に、pmr の推定プロモーター配列からターミネーター配列までを含む 0.57 kb の遺伝子断片を挿入することで pmr を相補し、接合伝達実験を行った。しかし、接合伝達頻度は依然検出限界以下（それぞれ  $<6.7 \times 10^{-7}$ ,  $<2.2 \times 10^{-6}$ ）であり、接合伝達頻度の回復は見られなかった (Fig. 5-1. 下段)。





**Fig. 5-1. 各 NAPs 破壊 pCAR1 の接合伝達頻度**

縦軸は接合伝達頻度（接合伝達体の CFU／供与菌の CFU）を，横軸は破壊した NAPs を示す．棒は 5 連の結果の相乗平均を表し，点は各々の結果を表し，図中の数字は検出限界を表す．上段：NAPs 単独破壊プラスミド，中段：NAPs 二重破壊プラスミド，下段：プラスミド上に *pmr* を相補した NAPs 二重破壊の結果を表す．

#### 5-4. 考察

本章では、pCAR1 上にコードされた 3 種類の核様体タンパク質遺伝子 *phu*, *pmr*, *pnd* を単独、あるいは複数破壊した際の接合伝達頻度や接合関連遺伝子の転写変動を調べた。

H-NS はおもにリプレッサーとして機能し、F プラスミドにおいて H-NS により接合伝達が抑制されていることから、pCAR1 も同様に Pmr によって接合伝達が抑制されており、*pmr* を破壊することで接合伝達頻度が上昇すると期待された。実際に、先行研究として行われたコハク酸培養時の NAPs 遺伝子単独破壊株のトランスクリプトーム解析 (Table 5-3, Suzuki et al., 2013 より転載) の結果から、野生型と比較して pCAR1Δ*pmr* では pCAR1 上の多くの接合関連遺伝子 (*trhK*, *trhV*, *trhA*, *dsbC*, ORF145, ORF146) の転写量が増加していることが示されていた。しかし、コントロールとして用いた NAPs を破壊していない pCAR1*pmrHis* と比較して、pCAR1Δ*pmr* の接合伝達頻度に違いは見られなかった (Fig. 5-1. 上段)。一方、pCAR1Δ*phu* では、トランスクリプトーム解析の結果から接合関連遺伝子の転写量に変化が見られなかったのに対し、接合伝達頻度は 1/10 程に低下していた (Fig. 5-1. 上段)。また、pCAR1Δ*pnd* では、接合関連遺伝子の転写量、接合伝達頻度ともに変化が見られなかった (Fig. 5-1. 上段)。

NAPs を二重破壊した pCAR1Δ*phu*Δ*pmr*, および pCAR1Δ*pmr*Δ*pnd* はプラスミドの安定性が低下し、継代培養を行うことで pCAR1 の構造が変化、または脱落が高い頻度で生じること (100), さらにバイオフィーム中で宿主菌体の繊維状化が促進されること (Lee et al., unpublished data) が示されている。また、トランスクリプトーム解析 (Table 5-3, Suzuki et al., 2013 より転載) の結果から、野生型と比較して、pCAR1Δ*phu*Δ*pmr* では *trhK*, *trhB*, *trhV*, *trhA*, *dsbC*, *trhC*, ORF145, ORF146, *trhF*, *trhH*, *trhG*, pCAR1Δ*pmr*Δ*pnd* では *trhK*, *trhV*, *trhA*, *dsbC*, ORF145, ORF146 と、pCAR1 上の多くの接合関連遺伝子の転写量が増加していることが示されていた。しかし、pCAR1Δ*phu*Δ*pmr*, および pCAR1Δ*pmr*Δ*pnd* の接合伝達頻度は検出限界以下と顕著に減少した (Fig. 5-1. 中段)。一方、興味深いことに、*phu* を単独で破壊することで接合伝達頻度が 1/10 程度に減少したのに対し、さらに *pnd* を破壊した、pCAR1Δ*phu*Δ*pnd* では、接合伝達頻度が pCAR1*pmrHis* と同程度まで上昇していた (Fig. 5-1. 中段)。

NAPs を二重破壊した pCAR1Δ*phu*Δ*pmr*, および pCAR1Δ*pmr*Δ*pnd* において、pCAR1 上の ORF98-ORF99 遺伝子間領域に *pmr* の推定プロモーター配列からターミネーター配列までを含む 0.57 kb の遺伝子断片を挿入し、*pmr* を相補することで安定性が回復していることが確認されている (100)。しかし、これらのプラスミドの接合伝達頻度は依然検出限界以下であった (Fig. 5-1. 下段)。相補した *pmr* の発現量がプラスミドの安定性を回復するには十分でも、接合伝達頻度を回復するためには不足している可能性が存在するため、相補した *pmr* の転写量の確認を行う必要がある。

本研究から得られた接合伝達頻度の結果は、先行研究として行われたコハク酸培養時のトランスクリプトーム解析から推測された結果とは一致しなかった。トランスクリプトー

ム解析を行った際と本実験とでは，培養条件などの菌体の状態が異なることから，このような違いが生じた可能性も考えられる．そこで今後は，接合条件下でのトランスクリプトム解析を行う必要がある．

Table 5-3. NAPs 破壊により転写変動した pCAR1 上の遺伝子.

Gene or ORF	Strand	Product name	Foldchange <sup>a</sup>						Signal value													
			$\Delta pmr$		$\Delta pnd$		$\Delta pmr$ $\Delta phu$		$\Delta pmr$ $\Delta pnd$		WT		$\Delta pmr$		$\Delta pnd$		$\Delta phu$		$\Delta pmr$ $\Delta pnd$		$\Delta pmr$ $\Delta phu$	
			$\Delta pmr$	$\Delta pnd$	$\Delta pmr$	$\Delta phu$	$\Delta pmr$	$\Delta pnd$	Replicate 1	Replicate 2	Replicate 1	Replicate 2	Replicate 1	Replicate 2	Replicate 1	Replicate 2	Replicate 1	Replicate 2	Replicate 1	Replicate 2	Replicate 1	Replicate 2
<i>antR</i>	+	transcriptional regulator	1.6	1.0	1.0	<b>2.4</b>	1.0	64	64	105	110	64	64	64	82	151	161	78	64			
<i>carD</i>	+	2-hydroxypenta-2,4-dienoate hydratase	1.1	<b>0.5</b>	0.6	1.1	0.6	407	507	592	570	130	186	289	385	598	560	64	236			
ORF33	+	hypothetical protein	1.0	<b>0.5</b>	0.7	1.1	0.8	237	353	364	370	84	117	253	367	453	394	64	180			
ORF40	+	hypothetical protein	<b>2.3</b>	0.9	1.1	<b>3.5</b>	<b>2.6</b>	64	71	160	175	64	64	81	84	306	250	188	181			
<i>tnpRa</i>	+	resolvase	0.7	<b>0.5</b>	0.8	1.5	0.6	421	526	384	373	207	153	418	401	769	862	533	310			
<i>tnpT</i>	+	cointegrase	1.4	0.7	1.2	<b>2.4</b>	0.9	96	137	185	201	64	65	159	187	330	347	199	127			
<i>parW</i>	+	partitioning protein	1.0	<b>0.5</b>	0.7	1.0	0.6	255	473	491	507	121	112	318	325	553	449	641	284			
ORF68	+	plasmid replication/partition related protein	0.9	<b>0.5</b>	0.6	1.2	0.9	172	263	252	243	80	64	160	194	365	308	462	235			
<i>pmr</i>	+	transcriptional regulator	<b>0.0</b>	0.6	0.8	<b>0.0</b>	<b>0.0</b>	1962	2601	64	64	1146	948	2166	2442	64	64	64	64			
ORF84	-	hypothetical protein	1.2	<b>0.4</b>	1.0	1.3	0.7	842	1137	1495	1390	351	291	1089	1111	1919	1503	2013	815			
ORF91	-	probable protease	<b>2.1</b>	0.6	1.0	1.9	1.3	142	170	352	367	86	75	171	230	369	328	365	217			
<i>pnd</i>	-	hypothetical protein	1.6	<b>0.2</b>	0.9	<b>0.2</b>	0.7	407	588	950	1092	64	64	545	694	64	64	840	394			
<i>phu</i>	+	DNA binding protein	1.8	0.6	<b>0.0</b>	1.1	<b>0.0</b>	2090	2853	5108	5600	1270	1191	64	64	3502	3065	64	64			
ORF100	+	hypothetical protein	<b>2.4</b>	1.2	1.7	<b>3.0</b>	<b>3.7</b>	1716	944	4147	4236	2817	2068	3097	2992	5172	5915	7665	6350			
ORF101	+	cobalamin biosynthesis protein	<b>2.7</b>	1.7	<b>2.0</b>	<b>4.1</b>	<b>4.5</b>	1143	758	3080	3070	2999	1953	2323	2379	4681	5163	6487	5142			
ORF102	+	cobalamine biosynthesis protein	<b>2.8</b>	1.5	1.8	<b>3.7</b>	<b>4.5</b>	1554	927	4347	4410	3407	2319	2897	2855	5811	6445	7939	7053			
ORF103	+	hypothetical protein	<b>2.3</b>	1.6	1.6	<b>3.2</b>	<b>3.8</b>	1228	747	2912	2809	2792	1906	2136	2011	3926	4511	5925	4685			
ORF104	+	hypothetical protein	<b>2.7</b>	1.4	<b>2.0</b>	<b>4.1</b>	<b>4.9</b>	943	620	2733	2546	1762	1361	1916	2022	4046	3854	5230	4662			
ORF105	+	hypothetical protein	<b>2.8</b>	1.2	2.0	<b>5.1</b>	<b>5.7</b>	469	291	1337	1335	878	558	935	926	2371	2531	3143	2693			
ORF106	+	hypothetical protein	<b>3.5</b>	1.6	1.7	<b>6.3</b>	<b>7.7</b>	346	188	1206	1238	921	542	579	684	2193	2183	2824	2649			
ORF107	+	hypothetical protein	<b>4.2</b>	1.3	<b>2.1</b>	<b>7.1</b>	<b>10.4</b>	66	64	277	279	164	83	153	140	556	468	684	723			
ORF108	+	hypothetical protein	<b>3.2</b>	1.4	1.6	<b>4.6</b>	<b>6.2</b>	524	302	1715	1662	1011	754	879	848	2436	2452	3308	3224			
ORF108a	+	hypothetical protein	<b>2.3</b>	1.6	1.4	<b>3.5</b>	<b>4.3</b>	761	400	1794	1749	1772	1232	1164	1041	2672	3020	4012	3300			
ORF108b	+	hypothetical protein	1.8	0.8	0.9	<b>2.9</b>	<b>3.8</b>	329	156	584	593	385	270	301	373	988	943	1259	1389			
ORF108c	+	hypothetical protein	1.5	0.6	1.0	<b>2.3</b>	<b>3.1</b>	821	343	1239	1242	775	499	820	829	2054	1922	2974	2537			
ORF109	+	hypothetical protein	<b>2.9</b>	1.0	1.6	<b>4.3</b>	<b>5.5</b>	131	108	382	414	212	126	204	227	574	556	849	715			
ORF113	-	hypothetical protein	<b>2.1</b>	0.5	1.1	<b>2.6</b>	1.7	91	119	250	255	84	64	136	163	377	307	291	199			
ORF114	-	hypothetical protein	<b>2.3</b>	0.6	1.3	<b>2.9</b>	<b>2.1</b>	93	113	319	257	74	64	150	150	399	330	325	241			
ORF115	-	hypothetical protein	<b>2.3</b>	1.1	1.1	<b>3.4</b>	<b>2.1</b>	108	168	380	403	122	77	182	259	630	572	411	357			
<i>ssb</i>	+	single-strand DNA (ssDNA) binding protein	<b>2.6</b>	0.9	1.5	<b>7.2</b>	<b>5.2</b>	167	177	464	451	235	158	272	271	1278	1271	1036	912			
<i>recT</i>	+	DNA recombination protein	1.7	1.0	1.4	<b>4.9</b>	<b>4.0</b>	66	64	113	128	84	64	105	95	350	325	268	274			

Table 5-3. 続き.

ORF125+	hypothetical protein	2.0	0.6	1.2	2.7	1.5	64	105	208	229	64	64	124	124	340	281	237	153
<i>trhK</i>	putative transfer protein	2.3	1.0	1.4	4.6	2.8	64	64	146	165	64	64	87	106	319	296	221	176
<i>trhB</i>	putative pilus assembly protein	1.6	1.0	1.0	2.6	1.7	64	64	104	107	64	64	64	64	185	163	129	111
<i>trhV</i>	putative pilus assembly protein	2.1	1.0	1.0	2.8	2.3	64	64	136	150	64	64	64	71	203	181	149	146
ORF135	hypothetical protein	1.1	0.5	0.8	1.1	0.7	246	411	488	461	119	98	334	367	519	450	585	268
ORF136	hypothetical protein	1.2	0.5	0.8	2.1	1.1	79	119	153	139	64	64	108	90	278	255	209	135
<i>trhA</i>	putative transfer protein	3.6	0.8	1.5	11.5	5.2	123	141	548	510	156	114	214	220	1624	1639	730	931
<i>dsbC</i>	putative disulfide bond isomerase	2.4	1.0	1.4	6.5	2.6	64	64	165	154	64	64	87	103	483	418	164	205
<i>trhC</i>	putative pilus assembly protein	1.6	0.8	1.1	3.0	1.5	64	83	131	132	64	64	88	111	282	253	135	123
ORF144	hypothetical protein	3.1	1.0	1.5	9.4	3.9	64	66	218	203	64	64	100	110	738	626	258	337
ORF145a	hypothetical protein	2.7	1.5	1.9	4.5	4.9	1760	1289	5099	4744	3492	2583	3384	3315	7937	9013	8540	8939
ORF145	putative DNA primase	2.9	1.7	1.7	6.4	5.8	1067	656	3363	3146	2645	1797	1862	1884	6838	7753	6197	7376
ORF146	putative DNA primase	2.8	1.4	1.8	8.5	6.6	499	414	1558	1378	965	677	957	915	4242	4631	3277	4248
<i>trhF</i>	putative pilus assembly protein	1.6	1.0	1.0	4.2	1.8	64	64	110	102	64	64	67	72	270	274	114	124
<i>trhH</i>	putative pilus assembly protein	1.7	1.0	1.0	3.4	1.6	64	64	109	126	64	64	64	84	249	219	100	129
<i>trhG</i>	putative pilus assembly protein	1.8	0.8	1.0	2.8	1.5	64	79	143	144	64	64	76	95	240	222	122	118
ORF150	hypothetical protein	1.9	0.7	1.0	2.6	1.3	126	167	416	314	75	89	167	218	453	433	314	223
ORF151	hypothetical protein	1.2	0.5	0.8	2.4	1.1	72	125	146	145	64	64	95	107	325	294	175	141
ORF153	hypothetical protein	1.1	1.0	1.0	2.1	1.0	64	64	72	85	64	64	64	64	177	137	91	64
ORF154	hypothetical protein	1.4	0.8	1.1	2.9	1.5	64	79	114	136	64	64	86	85	296	228	165	116
ORF155	hypothetical protein	1.9	1.0	1.2	4.8	2.2	91	130	252	310	86	64	162	189	680	622	319	286
ORF156	hypothetical protein	1.4	0.8	0.9	2.8	1.5	64	82	119	114	64	64	75	94	271	230	129	120
ORF156a	hypothetical protein	1.1	1.0	1.0	2.2	1.1	64	64	68	68	64	64	64	64	149	144	110	69
ORF157	hypothetical protein	1.9	1.0	1.2	3.1	1.6	64	67	134	130	64	64	80	98	239	211	165	110
ORF158	hypothetical protein	1.5	1.0	1.0	2.8	1.6	64	64	94	96	64	64	64	64	203	179	111	101
<i>tnpRb</i>	resolvase	0.9	0.7	0.7	2.0	1.1	194	247	219	224	128	64	191	179	534	502	332	263
<i>tnpAc</i>	transposase	1.6	0.4	0.9	1.1	1.3	381	520	839	947	161	155	460	587	733	594	509	257
ORF182	aerotaxis protein	2.1	0.6	1.1	2.5	1.2	446	590	1260	1230	245	192	622	698	1539	1470	1212	718
ORF183	probable sensory transduction histidine kinase	1.8	0.6	0.7	2.4	1.2	496	668	1217	1223	285	225	498	549	1730	1591	1168	833
ORF184	porin	1.4	0.5	0.7	2.1	1.2	595	811	1227	1159	301	201	608	591	1669	1704	1414	973
ORF185	FMN-dependent dehydrogenase	1.2	0.6	0.8	2.3	1.4	176	228	280	303	109	68	189	218	521	547	318	310
ORF186	hypothetical protein	1.2	0.6	0.8	2.1	1.5	125	162	228	195	64	72	134	189	407	343	249	238

\*Representative fold changes in the four data comparisons (between replicates 1 or 2 of KT244 or down-regulated (i.e. fold changes of >2.0 in all of the four data comparisons) are shown in r

## 第 6 章 総括と展望

本研究では、プラスミドの接合伝達の成否を決める環境因子とその作用機構を明らかにするために、pCAR1 の接合伝達に関与する新規因子の探索を試みた。

第 2 章では、従来の寒天培地を用いた接合伝達体の検出方法の他に、培養を介さない接合伝達体の検出方法を導入し、IncP-7 群プラスミドの実環境中における“真の”宿主域の解析を試みた。fluorescence activated cell sorting (FACS) を用い、蛍光タンパク質の発現を指標にした接合伝達体の検出・分取系を構築した。分取した接合伝達体と思われる粒子を平板培地上に塗布し、生育した菌株の遺伝子解析を行った。その結果、200 株以上の菌株が生育し、解析が終了した 25 株中、接合伝達体は 11 株であった。16S rRNA の塩基配列を解読したところ、*Bacteroidetes* の *Flectobacillus* 属細菌、*Flexibacter* 属細菌、 $\alpha$ -*Proteobacteria* の *Brevundimonas* 属細菌、 $\beta$ -*Proteobacteria* の *Delftia* 属細菌、*Cupriavidus* 属細菌と高い相同性を示した。IncP-7 群プラスミドは主に  $\gamma$ -*Proteobacteria* の *Pseudomonas* 属細菌を宿主とすると考えられてきたが、本研究により初めて  $\gamma$ -*Proteobacteria* 以外にも接合伝達する可能性が示唆された。しかし、これらの接合伝達体は pCAR1 を安定に保持することができなかった。IncP-7 群プラスミドは接合の宿主域よりも複製の宿主域の方が広いと考えられたが、これは *Pseudomonas* 属細菌での実験結果に基づく考えであり、実環境中では全く異なった宿主域を示すであろうと予想される。

第 3 章では、環境中の  $\text{Ca}^{2+}$  と  $\text{Mg}^{2+}$  の有無が他のプラスミドの接合伝達にも影響を与えるかを定量的に評価した。その結果、pCAR1 は環境中の  $\text{Ca}^{2+}$  と  $\text{Mg}^{2+}$  の有無によって接合伝達頻度に影響を受けやすく、pB10 と R388 は影響を受けにくいことが明らかになった。また、 $\text{Ca}^{2+}$  と  $\text{Mg}^{2+}$  の濃度が pCAR1 の接合伝達頻度に与える影響を定量的に評価した。ゲノム既知の 4 種類の供与菌と 5 種類の受容菌を用い、 $\text{Ca}^{2+}$  と  $\text{Mg}^{2+}$  の濃度を変化させ、各濃度における接合伝達頻度を測定した結果、多くの組み合わせで  $\text{Ca}^{2+}$  と  $\text{Mg}^{2+}$  の濃度依存的な接合伝達頻度の上昇が観察された。一方で、 $\text{Ca}^{2+}$  と  $\text{Mg}^{2+}$  の影響が見られない組み合わせも見つかった。このことから、同一のプラスミドであっても、供与菌や受容菌によって、 $\text{Ca}^{2+}$  と  $\text{Mg}^{2+}$  の影響に違いがあることが示された。

第 4 章では、環境中の  $\text{Ca}^{2+}$  と  $\text{Mg}^{2+}$  の有無が pCAR1 の接合伝達に与える影響を網羅的に解析する為に、Pf0-1L(pCAR1::rfp) 株を供与菌、KT2440 株を受容菌として接合実験を行い、 $\text{Ca}^{2+}$  及び  $\text{Mg}^{2+}$  添加・非添加、供与菌及び受容菌単独・混合時における染色体とプラスミドのトランスクリプトームデータを取得し、解析を行った。その結果、pCAR1 上の ORF145a と ORF145 が、 $\text{Ca}^{2+}$  と  $\text{Mg}^{2+}$  の有無や受容菌の有無によって接合伝達に影響を及ぼすことが示唆された。今後、より再現性の高いトランスクリプトームデータを比較解析することで、これまで全く知られていなかった IncP-7 群プラスミドの接合伝達メカニズムの解明につながると期待される。

第 5 章では, pCAR1 上にコードされている 3 種類の核様体タンパク質 (NAPs) *phu*, *pmr*, *pnd* を単独, あるいは複数破壊した際の接合伝達頻度や接合関連遺伝子の転写変動を調べた. その結果, pCAR1 $\Delta$ *phu* $\Delta$ *pmr*, および pCAR1 $\Delta$ *pmr* $\Delta$ *pnd* の接合伝達頻度は検出限界以下と大きく減少した. また, この接合伝達頻度の減少は, pCAR1 上に *pmr* を相補しても回復しなかった. コハク酸培養時の NAPs 遺伝子単独破壊株、二重破壊株のトランスクリプトーム解析では, pCAR1 上の多くの接合関連遺伝子の転写量が pCAR1 $\Delta$ *pmr*, pCAR1 $\Delta$ *phu* $\Delta$ *pmr*, pCAR1 $\Delta$ *pmr* $\Delta$ *pnd* のいずれの場合においても増加しており, 各破壊株における接合伝達頻度の評価とは合致しないものであった. 今後は, 相補した *pmr* の転写量の確認を行うとともに, 接合条件下でのトランスクリプトーム解析を行う必要があると考えられる.

本研究では, 環境因子や遺伝因子がプラスミドの接合伝達にどのような影響を与えるかを定量的に解析した. IncP-7 群プラスミドの接合伝達機構に関する知見は未だ乏しいが, 本研究で得られたトランスクリプトームを詳細に解析することで, 発現制御機構の解明への糸口が得られると考えられる. 今後, 本研究と同様に, 様々なプラスミドや宿主を用いて環境変化によって接合伝達頻度がどのように変わっていくかを調べ, その原因をトランスクリプトームレベルだけでなく, タンパク質レベル, 細菌群集構造レベルで解析することで, 環境中でのプラスミドの挙動をより理解できると期待される.

## 参考文献

1. Treangen, T.J., Rocha, E.P. 2011. Horizontal transfer, not duplication, drives the expansion of protein families in prokaryotes. *PLoS Genet.* 7: e1001284.
2. Frost, L., R. Leplae, A. Summers and A. Toussaint. 2005. Mobile genetic elements: the agents of open source evolution. *Nat. Rev. Microbiol.* 3: 722-732.
3. Smillie, C., M. P. Garcillán-Barcia, M. V. Francia, E. P. Rocha and F. de la Cruz. 2010. Mobility of plasmids. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 74: 434-452.
4. Garcillán-Barcia, M. P., A. Alvarado & F. de la Cruz. 2011. Identification of bacterial plasmids based on mobility and plasmid population biology. *FEMS Microbiol. Rev.* 35: 936-956.
5. Frost, L. S. and G. Koraimann. 2010. Regulation of bacterial conjugation: balancing opportunity with adversity. *Future Microbiol.* 5: 1057-1071.
6. Chandran, V. 2013. Type IV secretion machinery: molecular architecture and function. *Biochem. Soc. Trans.* 41: 17-28.
7. Bradley, D.E. 1980. Morphological and serological relationships of conjugative pili. *Plasmid* 4, 155-169.
8. Bradley, D.E., D. E. Taylor and D. R. Cohen. 1980. Specification of surface mating systems among conjugative drug resistance plasmids in *Escherichia coli* K-12. *J. Bacteriol.* 143, 1466-1470.
9. Bradley, D.E. 1983. Specification of the conjugative pili and surface mating systems of *Pseudomonas* plasmids. *J. Gen. Microbiol.* 129, 2545-2556.
10. Horiuchi, T., Komano, T. 1998. Mutational analysis of plasmid R64 thin pilus prepilin: the entire prepilin sequence is required for processing by type IV prepilin peptidase. *J. Bacteriol.* 180, 4613-4620.
11. Arutyunov, D. and L. S. Frost. 2013. F conjugation: Back to the beginning. *Plasmid.* 70: 18-32.



12. Wong, J.J., J. Lu and J. N. Mark Glover. 2012. Relaxosome function and conjugation regulation in F-like plasmids – a structural biology perspective. *Mol. Microbiol.* 85, 602–617.
13. Bingle LE, M. Zatyka, S. E. Manzoor, C. M. Thomas 2003. Co-operative interactions control conjugative transfer of broad host-range plasmid RK2: full effect of minor changes in TrbA operator depends on KorB. *Mol. Microbiol.* 49: 1095–1108.
14. 松原謙一 1976. プラスミド. 講談社サイエンティフィック
15. 新谷ら 2014. 環境バイオテクノロジー学会誌. 印刷中
16. del Solar G., R. Giraldo, M. J. Ruiz-Echevarria, M. Espinosa & R. Diaz-Orejas. 1998. Replication and control of circular bacterial plasmids. *Microbiol. Mol. Biol. R.* 62: 434–464.
17. Couturier, M., F. Bex, P. L. Bergquist and W. K. Maas. 1988. Identification and classification of bacterial plasmids. *Microbiol. Rev.* 52: 375-395.
18. Lawley, T., B. M. Wilkins and L. S. Frost. 2004. Bacterial conjugation in Gram-negative bacteria. pp. 203-226. In G. Phillips and B. Funnell (eds.), *Plasmid Biology*. ASM Press, Washington, DC, USA.
19. Sota, M. and E. Top. 2008. Horizontal gene transfer mediated by plasmids. In G. Lipps (ed.), *Plasmids: Current Research and Future Trends*. Horizon Scientific Press, Caister Academic Press, U. K.
20. Thomas, C. M. and A. S. Haines. 2004. Plasmids of the genus *Pseudomonas*. In J. L. Ramos (ed.), *Pseudomonas*. Plenum Publishing Corporation, New York, USA.
21. Richaume, A., E. Smit, G. Faurie and J. D. van Elsas. 1992. Influence of soil type on the transfer of plasmid RP4p from *Pseudomonas fluorescens* to introduced recipient and to indigenous bacteria. *FEMS Microbiol. Ecol.* 101: 281-292.
22. Pukall, R., H. Tschape and K. Smalla. 1996. Monitoring the spread of broad host and narrow host range plasmids in soil microcosms. *FEMS Microbiol. Ecol.* 20: 53-66.

23. Musovic, S., A. Dechesne, J. Sørensen and B. F. Smets. 2010. Novel assay to assess permissiveness of a soil microbial community toward receipt of mobile genetic elements. *Appl. Environ. Microbiol.* 76: 4813-4818.
24. Sørensen, S. J., T. Schyberg and R. Ronn. 1999. Predation by protozoa on *Escherichia coli* K12 in soil and transfer of resistance plasmid RP4 to indigenous bacteria in soil. *Appl. Soil Ecol.* 11: 79-90.
25. Sengeløv, G., G. A. Kowalchuk and S. J. Sørensen. 2000. Influence of fungal-bacterial interactions on bacterial conjugation in the residuesphere. *FEMS Microbiol. Ecol.* 31: 39-45.
26. van Elsas, J. D., J. T. Trevors and M. E. Starodub. 1988. Bacterial conjugation between *Pseudomonads* in the rhizosphere of wheat. *FEMS Microbiol. Ecol.* 53: 299-306.
27. Musovic, S., G. Oregaard, N. Kroer and S. Sørensen. 2006. Cultivation-independent examination of horizontal transfer and host range of an IncP-1 plasmid among gram-positive and gram-negative bacteria indigenous to the barley rhizosphere. *Appl. Environ. Microbiol.* 72: 6687-6692.
28. Mølbak, L., S. Molin and N. Kroer. 2007. Root growth and exudate production define the frequency of horizontal plasmid transfer in the rhizosphere. *FEMS Microbiol. Ecol.* 59: 167-176.
29. Kroer, N., T. Barkay, S. Sørensen and D. Weber. 1998. Effect of root exudates and bacterial metabolic activity on conjugal gene transfer in the rhizosphere of a marsh plant. *FEMS Microbiol. Ecol.* 25: 375-384.
30. Richaume, A., E. Smit, G. Faurie and J. D. van Elsas. 1992. Influence of soil type on the transfer of plasmid RP4p from *Pseudomonas fluorescens* to introduced recipient and to indigenous bacteria. *FEMS Microbiol. Ecol.* 101: 281-292.
31. Lilley, A. K., J. C. Fry, M. J. Day and M. J. Bailey. 1994. *In situ* transfer of an exogenously isolated plasmid between *Pseudomonas* spp in sugar-beet rhizosphere. *Microbiology* 140: 27-33.

32. Toomey, N., A. Monaghan, S. Fanning and D. Bolton. 2009. Transfer of antibiotic resistance marker genes between lactic acid bacteria in model rumen and plant environments. *Appl. Environ. Microbiol.* 75: 3146-3152.
33. Mølbaek, L., T. R. Licht, T. Kvist, N. Kroer and S. R. Andersen. 2003. Plasmid transfer from *Pseudomonas putida* to the indigenous bacteria on alfalfa sprouts: characterization, direct quantification, and *in situ* location of transconjugant cells. *Appl. Environ. Microbiol.* 69: 5536-5542.
34. Björklöf, K., A. Suoniemi, K. Haahtela and M. Romantschuk. 1995. High frequency of conjugation versus plasmid segregation of RP1 in epiphytic *Pseudomonas syringae* populations. *Microbiology* 141: 2719-2727.
35. Daane, L. L., J. A. E. Molina, E. C. Berry and M. J. Sadowsky. 1996: Influence of earthworm activity on gene transfer from *Pseudomonas fluorescens* to indigenous soil bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 62: 515-521.
36. Daane, L. L., J. A. E. Molina and M. J. Sadowsky, 1997: Plasmid transfer between spatially separated donor and recipient bacteria in earthworm-containing soil microcosms. *Appl. Environ. Microbiol.* 63: 679-686.
37. Combarro, M. P., M. J. Gauthier and V. A. Breittmayer. 1992. Conjugative transfer of R plasmids between *Escherichia coli* strains on saline selective media and in seawater. *J. Microbiol. Methods.* 14: 207-215.
38. Kruse, H. and H. Sørum. 1994. Transfer of multiple-drug resistance plasmids between bacteria of diverse origins in natural microenvironments. *Appl. Environ. Microbiol.* 60: 4015-4021.
39. Lebaron, P., N. Batailler and B. Baleux. 1994. Mobilization of a recombinant nonconjugative plasmid at the interface between waste water and the marine coastal environment. *FEMS Microbiol. Ecol.* 15: 61-70.
40. Goodman, A. E., E. Hild, K. C. Marshall and M. Hermansson. 1993. Conjugative plasmid transfer between bacteria under simulated marine oligotrophic conditions. *Appl. Environ. Microbiol.* 59: 1035-1040.

41. Breittmayer, V. A. and M. J. Gauthier, 1990. Influence of glycine betaine on the transfer of plasmid RP4 between *Escherichia coli* strains in marine-sediments. Lett. Appl. Microbiol. 10: 65-68.
42. Sandaa, R. A. and O. Enger. 1994. Transfer in marine sediments of the naturally occurring plasmid pRAS1 encoding multiple antibiotic resistance. Appl. Environ. Microbiol. 60: 4234-4238.
43. Muela, A., M. Pocino, I. Arana, J. I. Justo, J. Iriberry and I. Barcina. 1994. Effect of growth phase and parental cell survival in river water on plasmid transfer between *Escherichia coli* strains. Appl. Environ. Microbiol. 60: 4273-4278.
44. Barkay, T., N. Kroer, L. D. Rasmussen and S. J. Sørensen. 1995. Conjugal transfer at natural-population densities in a microcosm simulating an estuarine environment. FEMS Microbiol. Ecol. 16: 43-53.
45. Bale, M. J., M. J. Day and J. C. Fry. 1988. Novel method for studying plasmid transfer in undisturbed river epilithon. Appl. Environ. Microbiol. 54: 2756-2758.
46. Hill, K. E., J. C. Fry and A. J. Weightman. 1994. Gene transfer in the aquatic environment persistence and mobilization of the catabolic recombinant plasmid pD10 in the epilithon. Microbiology 140: 1555-1563.
47. Thomas, D. J. I., J. A. W. Morgan, J. M. Whipps and J. R. Saunders. 2001. Plasmid transfer between *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* strains in laboratory culture, river water, and dipteran larvae. Appl. Environ. Microbiol. 67: 330-338.
48. O'morchoe, S. B., O. Ogunseitan, G. S. Sayler and R. V. Miller. 1988. Conjugal transfer of R6845 and Fp5 between *Pseudomonas aeruginosa* strains in a fresh water environment. Appl. Environ. Microbiol. 54: 1923-1929.
49. Jones, G. W., L. Baines and F. J. Genthner. 1991. Heterotrophic bacteria of the fresh water neuston and their ability to act as plasmid recipients under nutrient deprived conditions. Microb. Ecol. 22: 15-25.

50. Sandt, C. H. and D. S. Herson. 1991. Mobilization of the genetically engineered plasmid pHSV106 from *Escherichia coli* HB101(pHSV106) to *Enterobacter cloacae* in drinking water. *Appl. Environ. Microbiol.* 57: 194-200.
51. Mohan, S. V., C. Falkentoft, Y. V. Nancharaiah, B. S. M. Sturm, P. Wattiau, P. A. Wilderer, S. Wuertz and M. Hausner. 2009. Bioaugmentation of microbial communities in laboratory and pilot scale sequencing batch biofilm reactors using the TOL plasmid. *Bioresour. Technol.* 100: 1746-1753.
52. Ashelford, K. E., M. A. Learner and J. C. Fry. 2001. Gene transfer and plasmid instability within pilot-scale sewage filter beds and the invertebrates that live in them. *FEMS Microbiol. Ecol.* 35: 197-205.
53. Dillon, S.C., C. J. Dorman. 2010. Bacterial nucleoid-associated proteins, nucleoid structure and gene expression. *Nat. Rev. Microbiol.* 8: 185-195.
54. Takeda T, C. S. Yun, M. Shintani, H. Yamane and H. Nojiri. 2011. Distribution of genes encoding nucleoid-associated protein homologs in plasmids. *Int. J. Evol. Biol.* 2011: 685015.
55. Doyle M, M. Fookes, A. Ivens, M. W. Mangan, J. Wain and C. J. Dorman. 2007. An H-NS-like stealth protein aids horizontal DNA transmission in bacteria. *Science.* 315: 251–252.
56. Maher, D. and D. E. Taylor. 1993. Host range and transfer efficiency of incompatibility group HI plasmids. *Can. J. Microbiol.* 39: 581-587.
57. Forns, N., R. C. Baños, C. Balsalobre, A. Jua´rez and C. Madrid. 2005. Temperature-Dependent Conjugative Transfer of R27: Role of Chromosome- and Plasmid-Encoded Hha and H-NS Proteins. *J. Bacteriol.* 187: 3950-3959.
58. Ishino, Y., H. Shinagawa, K. Makino, M. Amemura and A. Nakata. 1987. Nucleotide sequence of the iap gene, responsible for alkaline phosphatase isozyme conversion in *Escherichia coli*, and identification of the gene product. *J. Bacteriol.* 169: 5429-5433.
59. Jansen, R., J. D. A. van Embden, W. Gaastra and L. M. Schouls. 2002. Identification of genes that are associated with DNA repeats in prokaryotes. *Mol. Microbiol.* 43: 1565-1575.

60. Barrangou, R., C. Fremaux, H. Deveau, M. Richards, P. Boyaval, S. Moineau, D. A. Romero and P. Horvath. 2007. CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes. *Science*. 315: 1709-1712.
61. Marraffini, L. A. and E. J. Sontheimer. 2008. CRISPR interference limits horizontal gene transfer in staphylococci by targeting DNA. *Science*. 322: 1843-1845.
62. Bhaya, D., M. Davison and R. Barrangou. 2011. CRISPRCas systems in bacteria and archaea versatile small RNAs for adaptive defense and regulation. *Annu. Rev. Genet.*
63. 渡辺ら 2013 日本農芸化学会学会誌 vol. 51, No.7, p441-444.
64. Horvath, P. and R. Barrangou. 2010. CRISPR Cas, the immune system of bacteria and archaea. *Science*. 327: 167-170.
65. Pul, U., R. Wurm, Z. Arslan, R. Geissen, N. Hofmann and R. Wagner. 2010. Identification and characterization of *E. coli* CRISPR-cas promoters and their silencing by H-NS. *Mol. Microbiol.* 75: 1495–1512.
66. Hommais, F., E. Krin, C. Laurent-Winter, O. Soutourina, A. Malpertuy, J. P. Le Caer, A. Danchin and P. Bertin. 2001. Large-scale monitoring of pleiotropic regulation of gene expression by the prokaryotic nucleoid-associated protein, H-NS. *Mol. Microbiol.* 40: 20–36.
67. Oshima, T., S. Ishikawa, K. Kurokawa, H. Aiba, and N. Ogasawara. 2006. *Escherichia coli* histone-like protein H-NS preferentially binds to horizontally acquired DNA in association with RNA polymerase. *DNA Res.* 13: 141–153.
68. Navarre, W. W., S. Porwollik, Y. Wang, M. McClelland, H. Rosen, S. J. Libby and F. C. Fang. 2006. Selective silencing of foreign DNA with low GC content by the H-NS protein in *Salmonella*. *Science*. 313: 236–238.
69. Lang, B., N. Blot, E. Bouffartigues, M. Buckle, M. Geertz, C. O. Gualerzi, R. Mavathur, G. Muskhelishvili, C. L. Pon, S. Rimsky, S. Stella, M. M. Babul and A. Travers. 2007. High-affinity DNA binding sites for H-NS provide a molecular basis for selective silencing within proteobacterial genomes. *Nucleic Acids Res.* 35: 6330–6337.

70. Westra, E. R., Ü. Pul, N. Heidrich, M. M. Jore, M. Lundgren, T. Stratmann, R. Wurm, A. Raine, M. Mescher, L. van Heereveld, M. Mastop, E. G. H. Wagner, K. Schnetz, J. van der Oost, R. Wagner and S. J. J. Brouns. 2010. H-NS-mediated repression of CRISPR-based immunity in *Escherichia coli* K12 can be relieved by the transcription activator LeuO. *Mol. Microbiol.* 77: 1380-1393.
71. Nojiri, H. 2012. Structural and molecular genetic analyses of the bacterial carbazole degradation system. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 76: 1-18.
72. Dennis, J. J. 2005. The evolution of IncP catabolic plasmid. *Curr. Opin. Biotechnol.* 16:291-298.
73. Nojiri, H., M. Shintani, and T. Omori. 2004. Divergence of mobile genetic elements involved in the distribution of xenobiotic-catabolic capacity. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 64:154-174.
74. Ogawa, N., Chakrabarty, A. M., and Zaborina, O. 2004. Degradative plasmids, p. 341-376. In E. Funnell and G. J. Philips (ed.), *Plasmid Biology*. ASM Press, Washinton, D. C.
75. Williams, P. A., Jones, R. M., and Zylstra, G. 2004. Genomics of catabolic plasmids, p. 165-195. In J. L. Ramos. (ed.), *Pseudomonas*, Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York.
76. 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.
77. Sato, S., N. Ouchiya, T. Kimura, H. Nojiri, H. Yamane, and T. Omori. 1997a. Cloning of genes involved in carbazole degradation of *Pseudomonas* sp. strain CA10: nucleotide sequences of genes and characterization of *meta*-cleavage enzymes and hydrolase. *J. Bacteriol.* 179:4841-4849.
78. Sato, S., J. W. Nam, K. Kasuga, H. Nojiri, H. Yamane, and T. Omori. 1997b Identification and characterization of genes encoding carbazole 1,9a-dioxygenase in *Pseudomonas* sp. strain CA10. *J. Bacteriol.* 179:4850-4858.

79. 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.
80. Takahashi, Y., M. Shintani, H. Yamane, and H. Nojiri. 2009. The complete nucleotide sequence of pCAR2: pCAR2 and pCAR1 were structurally identical IncP-7 carbazole degradative plasmid. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 73:744-746.
81. 高橋祐里香 平成 23 年度東京大学博士論文
82. 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.
83. Shintani, M., H. Yamane, and H. Nojiri. 2010. Behavior of various hosts of the IncP-7 carbazole-degradative plasmid pCAR1 in artificial microcosms. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 74:343-349.
84. Jacoby, G. A. 1986. Resistance plasmids of *Pseudomonas*, pp. 265-293. In: Sokatch JR (ed) *The bacteria*. Vol. X. Academic Press, Orlando, FL.
85. Tsuda, M., and H. Genka. 2001. Identification and characterization of Tn4656, a novel class II transposon carrying a set of toluene-degrading genes from TOL plasmid pWW53. *J. Bacteriol.* 183:6215-6224.
86. Kunz, D. A., and P. J. Chapman. 1981. Isolation and characterization of spontaneously occurring TOL plasmid mutants of *Pseudomonas putida* HS1. *J. Bacteriol.* 146:952-964.
87. Yano, H., C. E. Garruto, M. Sota, Y. Ohtsubo, Y. Nagata, G. J. Zylstra, P. A. Williams, and M. Tsuda. 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.* 369:11-26.



88. Li, W., J. Shi, X. Wang, Y. Han, W. Tong, L. Ma, B. Liu, and B. Cai. 2004. Complete nucleotide sequence and organization of the naphthalene catabolic plasmid pND6-1 from *Pseudomonas* sp. strain ND6. *Gene* 336:231–240.
89. Izmalkova, T. Y., O. I. Sazonova, S. L. Sokolov, I. A. Kosheleva, and A. M. Boronin. 2005. The P-7 incompatibility group plasmids responsible for biodegradation of naphthalene and salicylate in fluorescent *Pseudomonads*. *Microbiology (Pleiades Publishing)* 74:342–348.
90. Murata, T., M. Ohnishi, T. Ara, J. Kaneko, C. G. Han, Y. F. Li, K. Takashima, H. Nojima, K. Nakayama, A. Kaji, Y. Kamio, T. Miki, H. Mori, E. Ohtsubo, Y. Terawaki, and T. Hayashi. 2002. Complete nucleotide sequence of plasmid Rts1: implications for evolution of large plasmid genomes. *J. Bacteriol.* 184:3194–3202.
91. Lawley, T. D., M. W. Gilmour, J. E. Gunton, L. J. Standeven, and D. E. Taylor. 2002. Functional and mutational analysis of conjugative transfer region 1 (Tra1) from the IncHI1 plasmid R27. *J. Bacteriol.* 184:2173–2180.
92. Sherburne, C. K., T. D. Lawley, M. W. Gilmour, F. R. Blattner, V. Burland, E. Grotbeck, D. J. Rose, and D. E. Taylor. 2000. The complete DNA sequence and analysis of R27, a large IncHI plasmid from *Salmonella typhi* that is temperature sensitive for transfer. *Nucl. Acids Res.* 28:2177–2186.
93. Böltner, D., C. MacMahon, J. T. Pembroke, P. Strike, and A. M. Osborn. 2002. R391: a conjugative integrating mosaic comprised of phage, plasmid, and transposon elements. *J. Bacteriol.* 184:5158–5169.
94. Boyd, D., G. A. Peters, A. Cloeckert, K. S. Boumedine, E. Chaslus-Dancla, H. Imberechts, and M. R. Mulvey. 2001. Complete nucleotide sequence of a 43-kilobase genomic island associated with the multidrug resistance region of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium DT104 and its identification in phage type DT120 and serovar Agona. *J. Bacteriol.* 183:5725–5732.
95. 松井ら, 環境バイオテクノロジー学会誌, vol. 11, No. 1-2, p69-75, 2011
96. Llosa, M., S. Bolland, and F. de la Cruz. 1994. Genetic organization of the conjugal DNA processing region of the IncW plasmid R388. *J. Mol. Biol.* 235:448–464.

97. Zatyka, M. and C. M. Thomas. 1998. Control of genes for conjugative transfer of plasmids and other mobile elements. *FEMS Microbiol. Rev.* 21. 291–319.
98. Yano, H., M. Miyakoshi, K. Ohshima, M. Tabata, Y. Nagata, M. Hattori, and M. Tsuda. 2010. Complete nucleotide sequence of TOL plasmid pDK1 provides evidence for evolutionary history of IncP-7 catabolic plasmids. *J. Bacteriol.* 192:4337–4347.
99. Garcillan-Barcia, M. P., M. V. Francia, and F. de la Cruz. 2009. The diversity of conjugative relaxases and its application in plasmid classification. *FEMS Microbiol. Rev.* 33:657–687.
100. Suzuki, C., R. Hirotsu, Y. Takahashi, K. Matsui, T. Takeda, C. S. Yun, M. Shintani, K. Okada, H. Yamane and H. Nojiri 2013. Cooperative function of the three different kinds of nucleoid-associated proteins encoded on the IncP-7 plasmid pCAR1. under review.
101. Rodriguez-Lemoine, V, A. E. Jacob, R. W. Hedges, and N. Datta. 1975. Thermosensitive production of their transfer systems by group S plasmids. *J. Gen. Microbiol.* 86:111–114.
102. Shintani, M., H. Habe, M. Tsuda, T. Omori, H. Yamane, and H. Nojiri. 2005. Recipient range of IncP-7 conjugative plasmid pCAR2 from *Pseudomonas putida* HS01 is broader than from other *Pseudomonas* strains. *Biotechnol. Lett.* 27:1847-1853.
103. Yun, C. S., C. Suzuki, K. Naito, T. Takeda, Y. Takahashi, F. Sai, T. Terabayashi, M. Miyakoshi, M. Shintani, H. Nishida, H. Yamane and H. Nojiri. 2010. Pmr, a histone-like protein H1 (H-NS) family protein encoded by the IncP-7 plasmid pCAR1, is a key global regulator that alters host function. *J. Bacteriol.* 192: 4720-4731.
104. Suzuki, C., C. S. Yun, T. Umeda, T. Terabayashi, K. Watanabe, H. Yamane and H. Nojiri. 2011. Oligomerization and DNA-binding capacity of Pmr, a histone-like protein H1 (H-NS) family protein encoded on IncP-7 carbazole-degradative plasmid pCAR1. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 75: 711-717.
105. Shintani, M., N. Fukushima, M. Tezuka, H. Yamane, and H. Nojiri. 2008a. Conjugative transfer of the IncP-7 carbazole degradative plasmid, pCAR1, in river water samples. *Biotechnol. Lett.* 30:117-122.

106. Shintani, M., K. Matsui, J. Inoue, A. Hosoyama, S. Ohji, A. Yamazoe, H. Nojiri, K. Kimbara and M. Ohkuma. 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: 138-145.
107. Shintani, M., K. Matsui, T. Takemura, H. Yamane, and H. Nojiri. 2008b. Behavior of the IncP-7 carbazole-degradative plasmid pCAR1 in artificial environmental samples. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 80:485-497.
108. Shintani, M., H. Yamane, and H. Nojiri. 2010. Behavior of various hosts of the IncP-7 carbazole-degradative plasmid pCAR1 in artificial microcosms. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 74:343-349.
109. Andersen J.B., C. Sternberg, L. K. Poulsen, S. P. Bjorn, M. Givskov and S. Molin 1998. New unstable variants of green fluorescent protein for studies of transient gene expression in bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 64:2240–2246.
110. Takahashi, Y., M. Shintani, L. Li, H. Yamane and H. Nojiri. 2009. 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: 3920-3929.
111. 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.
112. 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.
113. Tsutsui, T., N. Hayashi, H. Maizumi, J. Huff, and J. C. Barrett. 1997. Benzene-, catechol-, hydroquinone- and phenol-induced cell transformation, gene mutations, chromosome aberrations, aneuploidy, sister chromatid exchanges and unscheduled DNA synthesis in Syrian hamster embryo cells. *Mutat. Res.* 373:113–123.

114. Kalyuzhnaya, M. G., R. Zabinsky, S. Bowerman, D. R. Baker, M. E. Lidstrom and L. Chistoserdova. 2006. Fluorescence in situ hybridization flow cytometry-cell sorting based method for separation and enrichment of type I and type II methanotroph populations. *Appl. Environ. Microbiol.* 72:4293–4301.
115. Podar, M., C. B. Abulencia, M. Walcher, D. Hutchison, K. Zengler, J. A. Garcia, T. Holland, D. Cotton, L. Hauser and M. Keller. 2007. Targeted access to the genomes of low-abundance organisms in complex microbial communities. *Appl. Environ. Microbiol.* 73:3205-3214.
116. Zhang, K., A. C. Martiny, N. B. Reppas, K. W. Barry, J. Malek, S. W. Chisholm and G. M. Church. 2006. Sequencing genomes from single cells by polymerase cloning. *Nat. Biotechnol.* 24:680–686.
117. Sagai, H., K. Hasuda, S. Iyobe, E. Bryan, B. W. Holloway and S. Mitsuhashi. 1976. Classification of R plasmids by incompatibility in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemoter.* 10: 573-578.
118. Lujan, S. A., L. M. Guogas, H. Ragonese, S. W. Matson, M. R. Redinbo. 2007. Disrupting antibiotic resistance propagation by inhibiting the conjugative DNA relaxase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 104: 12282-12287.
119. Larkin, C., R. J. Haft, M. J. Harley, B. Traxler, J. F. Schildbach. 2007. Roles of active site residues and the HUH motif of the F plasmid TraI relaxase. *J. Biol. Chem.* 282: 33707-33713.
120. Boer, R., S. Russi, A. Guasch, M. Lucas, A. G. Blanco, R. Perez-Luque, M. Coll, F. de la Cruz. 2006. Unveiling the molecular mechanism of a conjugative relaxase The structure of TrwC complexed with a 27mer DNA comprising the recognition hairpin and the cleavage site. *J. Mol. Biol.* 358: 857-869.
121. Xia, S. and J. D. Robertus. 2009. Effect of divalent ions on the minimal relaxase domain of MobA. *Arch. Biochem. Biophys.* 488: 42-47.
122. Finney, L. A. and T. V. O'Halloran. 2003. Transition metal speciation in the cell insights from the chemistry of metal ion receptors. *Science.* 300: 931-936.

123. Miyakoshi, M., H. Nishida, M. Shintani, H. Yamane and H. Nojiri. 2009. High-resolution mapping of plasmid transcriptomes in different host bacteria. *BMC Genomics*. 10: 12.
124. Shintani, M., Y. Takahashi, H. Tokumaru, K. Kadota, H. Hara, M. Miyakoshi, K. Naito, H. Yamane, H. Nishida and H. Nojiri. 2010. Response of the *Pseudomonas* host chromosomal transcriptome to carriage of the IncP-7 plasmid pCAR1. *Environ. Microbiol.* 12: 1413-1426.
125. Shintani, M., H. Tokumaru, Y. Takahashi, M. Miyakoshi, H. Yamane, H. Nishida and H. Nojiri. 2011. Alterations of RNA maps of IncP-7 plasmid pCAR1 in various *Pseudomonas* bacteria. *Plasmid*. 66: 85-92.

## 補章

### 補章 1. SM1443(pCAR1::*gfp*)の作製

1. pJBA28 を大腸菌 S17-1  $\lambda$  *pir* 株より KT2440(pCAR1)株に接合伝達させた.
2. Km 耐性, Tc 耐性 [KT2440(pCAR1)を選抜するためのマーカー], 及び緑色蛍光を示すコロニーをランダムに選び, pCAR1, *gfp* を保持することを確認した.
3. 2 で得られた菌株を供与菌, *P. resinovorans* CA10dm4RG 株 (pCAR1 を保持しない CA10 株, Rif, Gm 耐性) を受容菌として接合実験を行い, プラスミド上に mini-Tn5-Km-P<sub>A1/04/03</sub>-RBSII-*gfp*mut3\*-T<sub>0</sub>-T<sub>1</sub> が挿入された pCAR1 を選抜した.
4. 得られた *P. resinovorans* CA10dm4RG(pCAR1::*gfp*) について, mini-Tn5-Km-P<sub>A1/04/03</sub>-RBSII-*gfp*mut3\*-T<sub>0</sub>-T<sub>1</sub> の挿入位置を, total DNA を鋳型とした直接シーケンスにより決定した.
5. *P. resinovorans* CA10dm4RG(pCAR1::*gfp*)を供与菌, 染色体上に *lacI<sup>q</sup>* を挿入した *P. putida* SM1443 を受容菌として接合させ, 得られた菌株を SM1443(pCAR1::*gfp*)と命名した.

### 補章 2. 水環境サンプルからの環境細菌の抽出

水環境から環境細菌を抽出するために, 湖沼水を環境サンプルとして採取した. 接合実験に用いる前処理として, 粗い粒子や原生動物を除去した.

#### 【操作】

1. 三四郎池から湖沼水を採取した.
2. 孔径 5  $\mu$ m の定性濾紙 (ADVANTEC, No.2,  $\phi$  90 mm) を用いて吸引濾過した.
3. 濾液を孔径 3  $\mu$ m の定性濾紙 (ADVANTEC, No.131,  $\phi$  90 mm) を用いて吸引濾過した.
4. 濾液を 500 ml 容のガラス製容器に入れ, 30℃で静置した.

### 補章 3. 土壌環境サンプルからの環境細菌の抽出

土壌環境から環境細菌を抽出するために, 土壌を採取し, 土壌抽出液を作製した. 接合実験に用いる前処理として, 粗い粒子や原生動物を除去した.

#### 【操作】

1. 東京大学農学部圃場から黒ボク土を採取した.
2. 500 ml 容のガラス製容器に黒ボク土 100 g と滅菌水 200 ml を入れた.
3. 30℃, 120 rpm で一晩振盪した.
- 4 上清を孔径 5  $\mu\text{m}$  の定性濾紙 (ADVANTEC, No.2,  $\phi$  90 mm) を用いて吸引濾過した.
5. 濾液を孔径 3  $\mu\text{m}$  の定性濾紙 (ADVANTEC, No.131,  $\phi$  90 mm) を用いて吸引濾過した.
6. 濾液を 500 ml 容のガラス製容器に入れ, 30℃で静置した.

#### 補章 4. 細菌画分の濃縮

接合伝達頻度を大きくするために, 環境細菌画分中の細菌を限外濾過濃縮した.

#### 【操作】

1. 環境細菌画分中の細菌を, リューザブルフィルターユニット (Nalge Nunc International) を用いて孔径 0.2  $\mu\text{m}$  のセルロースアセテート製白色メンブレンフィルター (ADVANTEC, C020A047A) 上に捕集した.
2. 濾液を 121℃, 20 min オートクレーブし, 滅菌環境水 (滅菌湖沼水, 滅菌土壌抽出液) とした.
3. 細菌を捕集したメンブレンフィルターを 50 ml 容遠沈管 (Corning) に入れ, 滅菌環境水を 10 ml 入れた.
4. DIRECT MIXER DM-301 (ASONE) を用いてメンブレンフィルター上に捕集した細菌を再懸濁した.
5. 2 ml 容チューブに 1 ml ずつ分注した.

#### 補章 5. 蛍光顕微鏡観察による菌体数の測定

蛍光色素として, 生細胞の 2 本鎖 DNA を選択的に染色する SYBR Green I (INVITROGEN) を用いた, SYBR Green I は 2 本鎖 DNA に結合すると青色光 (488 nm) により励起し, 緑色 (522 nm) の蛍光を発する.

#### 【試薬】

##### ・ SYBR Green I (INVITROGEN)

SYBR Green I は  $\times 10,000$  stock の DMSO 溶液として市販されているので, DMSO で 10 倍希釈し,  $\times 1,000$  stock として使用した.

### 【操作】

1. 菌懸濁液 1 ml に×1,000 SYBR Green I stock を 1 µl 添加した.
2. Vortex mixer で 1 min 攪拌した.
3. 暗所で 30 min 静置した.
4. 染色した菌体をフィルターホルダー (ADVANTEC) を用いて菌体捕集用の孔径 0.22 µm ポリカーボネート製黒色メンブレンフィルター (MILLIPORE, GTBP02500) に捕集した.
5. 細菌を捕集したフィルターをスライドガラス上に置き, その上に Microscopy Immersion oil (MERCK) を 25 µl 滴下した.
6. フィルターの上にカバーガラスを置き, その上に Microscopy Immersion oil を 25 µl 滴下した.
7. 蛍光顕微鏡 (OLYMPUS AX80) の対物レンズ (100 倍) を用いて 1 視野における菌体数を測定した.
8. 懸濁液 1 ml 当たりの生菌体数を下記の式を用いて算出した.

$$\text{菌体数 (cells/ml)} = 1 \text{ 視野菌体数 (対物レンズ 100 倍)} \times 3645 \times \text{希釈率}$$

3645 は観察実視野の面積とメンブレンフィルターの面積の比率であり, 下記の式から算出した.

$$\begin{aligned} \text{観察実視野の直径} (\phi \text{ mm}) &= \text{接眼レンズの視野数/対物レンズの倍率} \\ &= 26.5/100 \\ &= 0.265 \text{ (mm)} \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{観察実視野の面積} (\text{mm}^2) &= \pi (0.265/2)^2 \\ &= 0.01756 \pi (\text{mm}^2) \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{メンブレンフィルターの面積} (\text{mm}^2) &= \pi (16/2)^2 \\ &= 64 \pi (\text{mm}^2) \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} 64 \pi / 0.01756 \pi &= 3644.646925 \\ &= 3645 \end{aligned}$$

### 補章 6. 接合実験 (液体接合)

1. 供与菌と受容菌をそれぞれ 5 ml の 1/3LB 培地に植菌し, 30℃で一晩振盪培



- 養（300 strokes/min）した．供与菌の培地には Km，受容菌の培地には Rif，Gm を添加した．
2. 各培養液から 1 ml を 2 ml 容チューブに取り，室温で 15,000rpm，2 min 遠心し，上清を捨てた．
  3. 1/3LB を 1 ml 加えて菌体をピペッティングにより懸濁した．
  4. 蛍光顕微鏡観察による菌体数測定を行った．
  5. 菌体数が供与菌：受容菌＝1：10 となるように供与菌と受容菌の菌懸濁液を希釈した．
  6. 菌懸濁液を 1/3LB で適宜希釈し，それぞれ 20  $\mu$ l を固体選択培地にスポットし，30℃で一晩培養した．
  7. 5 で供与菌：受容菌＝1：10 となるように希釈した供与菌と受容菌を，それぞれ 300  $\mu$ l，2 ml 容チューブ内で混合した．
  8. 30℃で一晩静置した．
  9. 懸濁液を 1/3LB で適宜希釈し，それぞれ 20  $\mu$ l を Km，Rif，Gm を添加した固体選択培地にスポットし，30℃で一晩培養した．
  10. 6 で生育したコロニー数から供与菌の CFU を測定し，9 で生育したコロニー数から接合伝達体の CFU を測定し，接合伝達頻度（接合伝達体 / 供与菌）を算出した．

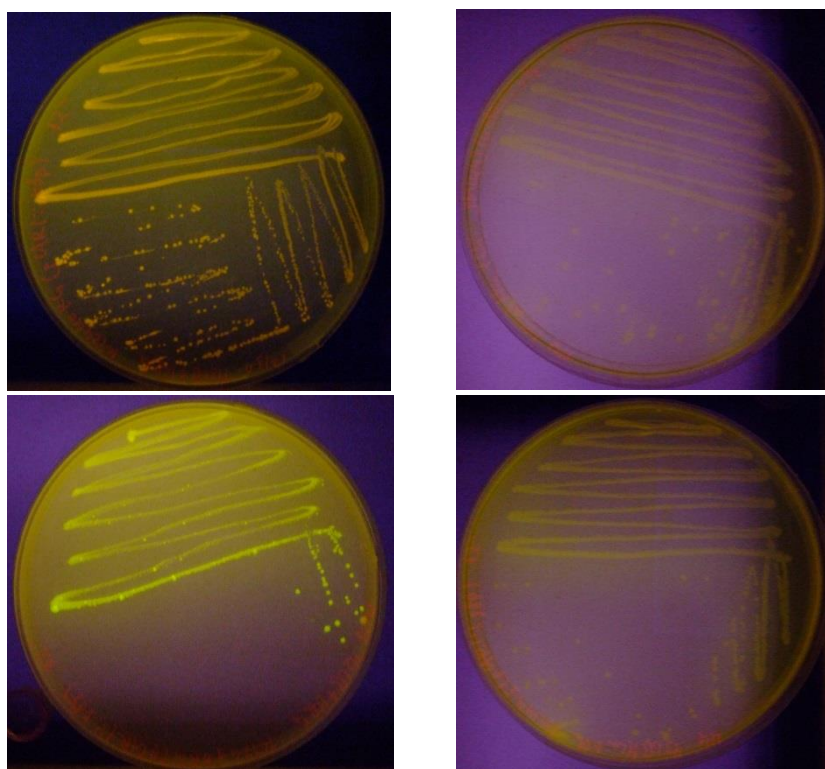
## 補章 7. ダークリーダーを用いた蛍光観察

固体培地上に生じたコロニーにおける RFP もしくは GFP の蛍光の検出には，Clare Chemical Research 社製の Dark Reader DR45M Transilluminator（通称：ダークリーダー，Fig. S1）を用いた．ダークリーダーは 400-500 nm の波長の光を照射する機器であり，この波長帯により GFP や RFP などの蛍光タンパク質やエチジウムブロマイドなどの蛍光色素を励起させることができる．可視光が蛍光タンパク質の励起に用いられる場合，光源からの大量の入射光によって，裸眼では蛍光物質由来の蛍光を直接検出できない．そこでダークリーダーは，光源由来の緑色・赤色蛍光を除去し青色励起光のみをサンプルに照射するためのフィルター（光源とサンプルの間に位置）と，青色の入射光を除去し緑色・赤色蛍光を透過するフィルター（アンバースクリーン；サンプルと観測者の間に位置）の 2 段階のフィルター処理を行う．ダークリーダーを用いることで，pCAR1::*rfp*，もしくは pCAR1::*gfp* を保持する接合伝達体は，選択培地上に生育したコロニーに青色蛍光（400-500 nm）を照射した際，赤色，もしくは緑色蛍光を示すコロニーとして検出される（Fig. S2）．



**Fig. S1. ダークリーダー**

光源由来の緑色・赤色蛍光を除去し青色励起光のみをサンプルに照射するためのフィルター（本体上部の青色のフィルター）と，青色の入射光を除去し緑色・赤色蛍光を透過するフィルター（橙色のフィルター）の２段階のフィルター処理を行う．サンプルを観察する際は，ダークリーダー上（青色のフィルター上）に固体培地を置き，その上に橙色のフィルターを置き，暗所にて青色励起光を照射する．



**Fig. S2. ダークリーダーを用いた蛍光観察**

RFP 発現株（左上），RFP 発現抑制株（右上），GFP 発現株（左下），GFP 発現抑制株（右下）．RFP 発現株，及び GFP 発現株はそれぞれ赤色，緑色蛍光を示しているのに対し，RFP 発現抑制株，及び GFP 発現抑制株は蛍光を示していない．

## 補章 8. Total DNA 抽出

### 【試薬】

- TE buffer
  - 10 mM tris (hydroxymethyl) aminomethane (Tris)-HCl (pH8.0)
  - 1 mM ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA)
- 10% sodium dodecylsulfate (SDS)
- 20 mg/ml proteinase K solution (ProK)
  - 200 mg の proteinase K を 10 ml の滅菌水に溶解した.
- 5M NaCl
- CTAB/NaCl solution
  - 4.1%(wt/vol) NaCl
  - 10%(wt/vol) hexadecyltrimethyl ammonium bromide (CTAB)
- クロロホルム
- TE 飽和フェノール/クロロホルム
  - TE 飽和フェノールとクロロホルムを等量混合した.
- 2-プロパノール
- 70%(vol/vol)エタノール (-30℃で保存)
- 10 mg/ml RNaseA (DNase free) Glycerol Solution (Nippon gene)

### 【操作】

1. 細菌を液体培地に植菌して 30 °Cで生育するまで振盪培養した.
2. 2 ml 容チューブに培養液を 2 ml 移し, 室温で 15,000 rpm, 2 min 遠心し, 上清を捨てた.
3. TE buffer 570  $\mu$ l を加え, 懸濁した.
4. ProK 3  $\mu$ l, 10%SDS 30  $\mu$ l を加え, ローテーターで 15 min 攪拌した.
5. 37 °Cで 1 hr 以上 incubate した.
6. 水浴を 65 °Cにセットし, 水浴に CTAB/NaCl を入れた.
7. 5M NaCl 100  $\mu$ l と 65 °Cになった CTAB/NaCl 80  $\mu$ l を加え, ローテーターで 5 min 攪拌した.
8. 浮き輪を用いて 65 °Cの水浴で 10 min incubate した.
9. クロロホルム 800  $\mu$ l を加えてローテーターで 10 min 攪拌した.
10. 室温で 15,000 rpm, 15 min 遠心した.
11. 先端を cut したチップを用いて界面を吸い込まないように上層 ~700  $\mu$ l を新しい 2 ml 容チューブに取った.
12. TE 飽和フェノール/クロロホルム 700  $\mu$ l を加え, ローテーターで 10 min 攪

- 拌した.
13. 室温で 15,000 rpm, 15 min 遠心した.
  14. 先端を cut したチップを用いて界面を吸い込まないように上層 ~600  $\mu$ l を新しい 1.5 ml 容チューブに取った.
  15. 2-プロパノール 700  $\mu$ l を加え, ローテーターで 30 min 攪拌した.
  16. 室温で 15,000 rpm, 15 min 遠心し, 上清を捨てた.
  17. 冷凍保存してある 70%エタノール 400  $\mu$ l でリンスした.
  18. 4°C, 15,000 rpm, 15 min 遠心した.
  19. 上清を捨て, デシケーターとアスピレーターを用いて 5 min dry up した.  
その際, チューブは紙製のチューブ立てに立て, アルミホイルで包んだ.
  20. 終濃度 20  $\mu$ g/ml の RNaseA (DNase free) (Nippon gene) を含む TE buffer 溶液 30  $\mu$ l を加え, タッピング, フラッシングし, ペレットを溶解した.
  21. 37 °C で 15 min ~ 一晩 incubate した後, 4°C または -30°C で使用時まで保存した.

## 補章 9. Polymerase chain reaction (PCR)

### 【反応系】

DNA polymerase にはタカラバイオ社の *Ex Taq*®を用いた. 反応液の組成を Table S1 に示す.

Table S1. PCR の反応系

試薬	遺伝子の確認用
Template DNA	50 ng 相当
Primer-F (50 $\mu$ M)	0.125 $\mu$ l
Primer-R (50 $\mu$ M)	0.125 $\mu$ l
10× <i>Ex Taq</i> buffer	2.5 $\mu$ l
dNTP mix (各 2.5 mM)	2.0 $\mu$ l
<i>Ex Taq</i>	0.125 $\mu$ l
dH <sub>2</sub> O	fill up to 25 $\mu$ l

### 【反応サイクル】

サーマルサイクラーには PCR Thermal Cycler dice Standard (Takara Bio, Shiga, Japan)を用い, 下記 Table S2 のプログラムで行った.

Table S2. PCR のプログラム

96℃	2 min	1 cycle
96℃	20 sec	
60℃	20 sec	
72℃	30 sec	30-35 cycle
72℃	7 min	
4℃	∞	1 cycle

## 補章 10. アガロースゲル電気泳動

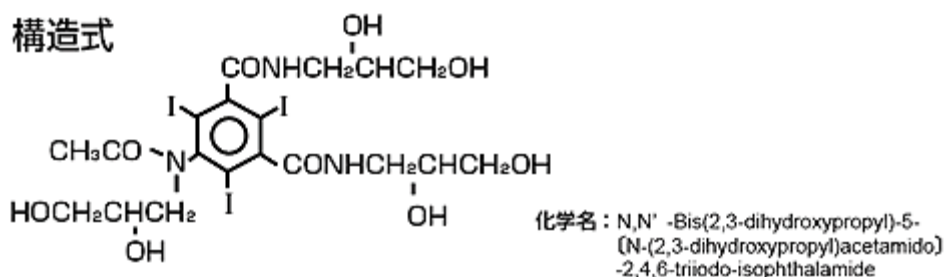
アガロースゲルはアガロース ME（ナカライテスクジャパン）を Tris-acetate-EDTA (TAE) buffer (2M Tris-acetate, 0.05 M EDTA, pH8.0)に溶解させて作製し，アガロースの濃度は 2.0%とした．泳動には Mupid 小型電気泳動槽（ADVANTEC Co. Ltd., Tokyo, Japan）を用い，室温において 100 V で行った．分子量マーカーには，One Step Marker 5 及び One Step Marker 6（Nippon gene）を用いた．バンドの塩基長はそれぞれ，Marker 6: 19.33, 7.74, 6.22, 4.26, 3.47, 2.69, 1.88, 1.49, 0.93 (kbp)，Marker 5: 1057, 770, 612, 495, 392, 345, 341, 335, 297, 291, 210, 162, 79 (bp)である．泳動するサンプルには Loading Buffer (10×)（Takara Bio）を加えた．

## 補章 11. Histodenz を用いた細菌画分の分離

Histodenz™（SIGMA；別名 Nycodenz®，コスモ・バイオ株式会社）は多用途密度勾配遠心分離媒体である．以下に histodenz の特長を列挙する．

- ・細胞毒性が無く非イオン性である．
- ・連続的密度勾配が簡単に短時間で調製できる．
- ・水系で 80%以上，非水系でも 50%以上溶解できる．
- ・熱に安定でオートクレーブ処理ができる．
- ・ショ糖に比べ，低粘度，低浸透圧の分離用媒体が作製できる．
- ・ローター内で自己密度勾配形成が可能．
- ・本品を含む溶液中で，核酸，タンパク質，多糖類を化学的に測定することができる．
- ・サンプルの回収が容易．本品を除去せず細胞培養することも可能．
- ・密度勾配遠心法により核酸，タンパク質，多糖類，核タンパク質，細胞オルガネラ，細胞，ウィルス，細菌の分離が可能．

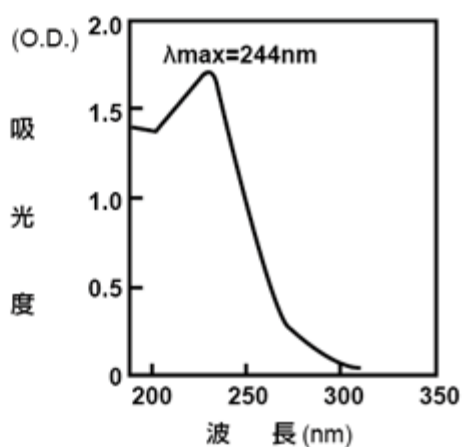
### 構造式



(図 1)

分子量: 821	最大吸収波長: 244nm
密度: 2.1 g/mL	( $E_{244}^{1\%} = 342$ )
融点: 178 ~ 180°C	溶解度: 80%(w/v) 以上

### 吸収スペクトル



(図 2)

(コスモ・バイオ株式会社ホームページより引用)

Histodenz を用いた細菌画分の分離は, Berry らの手法を改変して行った (Berry *et al.*, 2003; Koch *et al.*, 2001; Musovic *et al.*, 2006; Unge *et al.*, 1999; Williamson *et al.*, 2007).

### 【試薬】

- 1.3 g/ml histodenz 水溶液

50 ml 容遠沈管 (Corning) に histodenz を 30 g 入れ, 滅菌水で 50 ml にフィルアップた. histodenz の粉末が完全に溶けるまで vortex mixer で懸濁後, 121°C, 20 min オートクレーブし, 1.3 g/ml histodenz 水溶液を調製した. 1.3 g/ml histodenz 水溶液は 4°C で保存した.

- 滅菌環境水

湖沼水, または土壌懸濁液を濾過滅菌後, 121°C, 20 min オートクレーブして用いた.

### 【操作】

1. 菌懸濁液を分注した 2 ml 容チューブの下端から, 1 ml ツベルクリン用テルモシリンジ (TERUMO) と 21 G×1 1/2" (0.80×38 mm) テルモ注射 針 (TERUMO) を用いて 1.3 g/ml histodenz 水溶液を 1 ml 加えた.
2. 4℃, 10,000×g, 30 min 遠心した.
3. 水層と histodenz 層の界面付近 400 µl を新しい 2 ml 容チューブに移した.
4. 4℃, 15,000 rpm, 15 min 遠心し, 上清を捨てた.
5. 菌懸濁液と同じ環境サンプルから作製した滅菌環境水 1 ml で再懸濁した.
6. 4, 5 の操作を 3 回繰り返し, 混入している histodenz を除去した.
7. 菌懸濁液を試験管に移し, 30℃で静置した.

## 補章 12. Polymerase chain reaction (PCR)

### 【反応系】

DNA polymerase にはタカラバイオ社の *Ex Taq*®を用いた. 反応液の組成を Table S3 に示す.

Table S3. PCR の反応系

試薬	16S rRNA 解析用
Template DNA	100 ng 相当
Primer-F (50 µM)	1.0 µl
Primer-R (50 µM)	1.0 µl
10× <i>Ex Taq</i> buffer	10 µl
dNTP mix (各 2.5 mM)	8.0 µl
<i>Ex Taq</i>	0.5 µl
dH <sub>2</sub> O	fill up to 100 µl

### 【反応サイクル】

サーマルサイクラーには PCR Thermal Cycler dice Standard (Takara Bio, Shiga, Japan)を用い, 下記 Table S44 のプログラムで行った.

Table S4. PCR のプログラム

5 min	1 cycle
1 min	

1 min	
1.5 min	30 cycle
7 min	
∞	1 cycle

### 補章 13. エタノール沈殿

#### 【試薬】

- TE buffer
  - 10 mM tris (hydroxymethyl) aminomethane (Tris)-HCl (pH8.0)
  - 1 mM ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA)
- 5M NaCl
- Ethachinmate (Nippon gene)
- 99.5%エタノール (-30℃で保存)
- 70%(vol/vol)エタノール (-30℃で保存)

#### 【操作】

1. PCR 産物 100  $\mu$ l を 1.5 ml 容チューブに移した.
2. TE buffer 300  $\mu$ l, 5M NaCl 40  $\mu$ l, Ethachinmate 0.5  $\mu$ l を加えた.
3. 5 sec vortex mixer で攪拌した.
4. 冷凍保存している 99.5%エタノール 1 ml を加えた.
5. 氷上で 5~10 min 静置した.
6. 15,000 rpm, 4  $^{\circ}$ C, 15 min 遠心し, 上清を捨てた.
7. 冷凍保存している 70%エタノール 400  $\mu$ l でリンスした.
8. 15,000 rpm, 4  $^{\circ}$ C, 15 min 遠心し, 上清を捨てた.
9. デシケーターとアスピレーターを用いて 5 min dry up した. その際, チューブは紙製のチューブ立てに立て, アルミホイルで包んだ.
10. TE buffer 15  $\mu$ l に懸濁した.
11. 37  $^{\circ}$ C で 15 min~一晩 incubate した後, 4 $^{\circ}$ Cまたは-30 $^{\circ}$ Cで使用时まで保存した.

### 補章 14. RFLP 解析

氷上にて以下のように反応液を調製し, 37 $^{\circ}$ C で 2 hr~一晩静置後, アガロースゲル電気泳動を行った.



エタノール沈殿後の 16S rRNA	3.0 $\mu$ l
Buffer H	1.0 $\mu$ l
<i>Sau</i> 3A I	0.5 $\mu$ l
dH <sub>2</sub> O	3.5 $\mu$ l
Total	8.0 $\mu$ l

## 補章 15. マイクロマニピュレータ

マイクロマニピュレータ (Fig. S3) は顕微鏡下での作業により、ガラスキャピラリー内に細胞を吸い込むことで目的の細胞のみを分取することができる装置である。

### 【操作】

1. ガラスキャピラリーをバーナーで炙り、孔径を小さく ( $\sim 20 \mu\text{m}$ ) 加工した。
2. 予めオートクレーブ処理により滅菌したマイクロインジェクター内を、シリンジを用いて滅菌水で満たした。
3. マイクロインジェクターの先端のピペットホルダーにガラスキャピラリーを接続し、キャピラリーの先端部まで滅菌水を満たした。
4. スライドガラス上にサンプル溶液を 100 $\sim$ 200  $\mu$ l 滴下し、ステージ上に設置した。
5. 明視野で細胞とガラスキャピラリーの先端のピントが合うように調節した。
6. 蛍光視野で蛍光を示す細胞をガラスキャピラリー内に吸い込んだ。
7. 孔径 0.22  $\mu\text{m}$  ポリカーボネート製黒色メンブレンフィルター (MILLIPORE, GTBP02500) 上に細胞を滴下した。
8. メンブレンフィルターを Km と Ch を添加した R2A 寒天培地上に置き、30 $^{\circ}\text{C}$  で静置培養した。



**Fig. S3. マイクロマニピュレータを設置した顕微鏡**

大和ユニオン社製マイクロマニピュレータを設置した顕微鏡の改造例（有限会社大和ユニオンホームページより引用）.



**Fig. S4. マイクロインジェクターとピペットホルダー**

大和ユニオン社製マイクロインジェクターとピペットホルダー（有限会社大和ユニオンホームページより引用）. マイクロインジェクター下部のダイヤルを回すことでガラスキャピラリー内に空気圧をかけ，細胞を出し入れする.

## 謝辞

本博士論文研究を行うに当たりまして、多くの方々からご指導、ご協力を賜りました。この場をお借りして厚く御礼申し上げます。

すばらしい研究環境を与えて下さり、また厳しくも暖かく、大変貴重なご助言を賜り、日頃より直接ご指導頂きました、東京大学生物生産工学研究センター環境保全工学研究室教授野尻秀昭先生に深く感謝いたします。

常に励まし、暖かく見守って下さりました、同センター環境保全工学研究室准教授岡田憲典先生に厚く御礼申し上げます。

暖かいご指導とご教示を賜りました、帝京大学教授山根久和先生に深く感謝いたします。

学部四年生の卒業研究の頃から今日に至るまで、実験操作や研究者としての在り方を直接熱心に指導して下さいました、静岡大学准教授新谷政己先生に深く感謝いたします。

長年にわたって日々の生活の中で親身なご助言、ご協力を頂きました、堀寄允文博士、清水崇史博士、武田俊春博士、岩田修博士、宮本皓司博士をはじめとする同センター環境保全工学研究室卒業生の皆様に深く感謝いたします。

本研究を行うにあたり親身なご助言、ご指導頂きました高橋裕里香博士に厚く御礼申し上げます。

日々研究について議論をして下さり、研究のみならず事務手続きなどにも多くのご助言を頂きました鈴木千穂氏に深く感謝いたします。

実験の補助をして頂いた佐久間芽生氏をはじめとする同センター環境保全工学研究室の皆様に深く感謝いたします。

最後に、本研究を進めるにあたり常に暖かく見守り、日々の研究生生活を支えて頂きました家族に心から感謝申し上げ、この論文を捧げます。

2013 年 12 月