

## 論文の内容の要旨

応用生命工学専攻  
平成 29 年度博士課程進学  
氏名 作田 郁子  
指導教員 野尻 秀昭

論文題目 細菌集団におけるプラスミドの受容菌選択機構

### 第 1 章 序論

プラスミドは自律的な複製単位であり、細菌間を接合伝達により移動して難分解性物質分解能、薬剤耐性、重金属耐性などの新規形質を水平伝播し、細菌の環境適応や進化において重要な役割を果たす。この新規形質を付与するという特徴から、実環境中でプラスミドの接合伝達を利用・制御することで、環境浄化能力を伝搬・向上させる装置とする技術や多剤耐性菌の蔓延防止に繋がる技術の開発が期待されている。しかし、従前の研究はプラスミドの複製分配や接合伝達のメカニズムに着目したものが多く、プラスミドの機能する場としての多様な実環境条件を考慮していないものが多かった。プラスミドの実応用を見据えた技術開発には、従来の知見に加え、環境因子がプラスミドの振る舞いに及ぼす影響についての基盤情報が重要となる。

所属研究室ではこれまで、様々な環境因子が接合伝達に及ぼす影響を異なる不和合性 (Incompatibility; Inc) 群に属するプラスミドを用いて評価してきた。含窒素芳香族化合物カルバゾール分解プラスミド pCAR1 (IncP-7)、ナフタレン分解プラスミド NAH7 (IncP-9)、多剤耐性プラスミド pB10 (IncP-1) および R388 (IncW) の 4 種のプラスミドと、pCAR1 を実環境中から単離した際の元の宿主である *Pseudomonas resinovorans* CA10 株の pCAR1 脱落株 (CA10dm4 株) や、環境細菌のモデルとして広く用いられる *Pseudomonas putida* KT2440 株を宿主として用いた実験が行われた。それらの研究により明らかにされた、菌密度 [1] や培地条件といった環境因子がプラスミドの挙動を変化させる現象から、従来見落とされてきた“プラスミドが機能する現場の環境条件”という要素の中に、プラスミドの真の挙動を決定する重要な因子が存在することが示唆される。そこで本研究ではプラスミドの真の挙動理解を目指し、環境因子のうち細菌の共存と培地成分が接合伝達に及ぼす影響に着目し、プラスミドの挙動決定に寄与する新規因子の同定およびその作用機序の解明を目的とした。

## 第2章 複数種の受容菌候補の存在が接合伝達に及ぼす影響の評価

従来の接合伝達実験が1種のプラスミド供与菌と1種の受容菌を用いている(1:1接合)のに対し、細菌集団中での接合伝達では供与菌の周囲に複数種の受容菌候補がいる点に注目し、最小単位として1種の供与菌に対し2種の受容菌候補がいる接合(1:2接合)実験系を構築した。本実験系を用い、前述の4種のプラスミドについて挙動評価を行った。

供与菌として *P. putida*、受容菌として *P. putida* および *P. resinovorans* を用い、1:1接合、1:2接合時の各プラスミドの接合伝達頻度 [接合伝達体数 (CFU/mL) / 供与菌数 (CFU/mL)] を比較した。液体中での1:1接合時には、いずれのプラスミドも *P. putida* への接合伝達頻度の方が高かった。1:2接合条件下でこの *P. putida* への伝達のしやすさの程度は、pCAR1については *P. resinovorans* が共存することによる影響を受けなかった

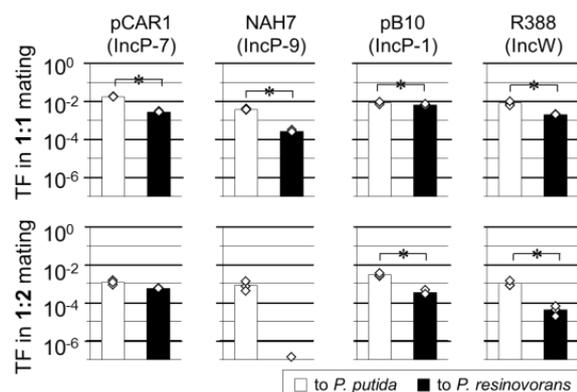


図1.4 種のプラスミドの1:1(上)、1:2接合(下)時の接合伝達頻度 (transfer frequency: TF)

のに対し、他の3種は *P. putida* へより高頻度で伝達した。中でも NAH7 は1:2接合条件下で *P. resinovorans* へほとんど伝達しなかった(図1)。また、*P. resinovorans* を供与菌とした接合実験および固体培地上での挙動評価も行い、概して1:2接合条件下で「供与菌と同種の菌」への伝達が優先される傾向が見られ、その度合いはプラスミドや宿主の組み合わせによって大きく影響を受けることを明らかにした。さらに、本現象が同種の細菌間での菌体凝集や培養上清中に分泌される因子には起因しない現象であることも明らかにした [2]。

上述の現象から、プラスミドが受容菌を認識・区別する未知の機構の存在が示唆された。そこで、*P. putida* を供与菌とした1:2接合条件下で NAH7 が *P. resinovorans* へほとんど伝達しない現象に着目し、第3章、第4章では本現象に関与する宿主・プラスミド由来の因子の探索を行い、原理理解を目指した。

## 第3章 受容菌選択に寄与する宿主由来の因子の探索と機能解析

受容菌染色体由来の因子探索として、受容菌 *P. putida* 染色体上に「同種への接合伝達を優先させる(1:2接合時に *P. putida* として認識させる)」因子の存在を仮定し、*P. putida* 染色体ゲノム(約6.0 Mb)を100~150 kbに断片化した bacterial arificial chromosome (BAC) ライブラリーを受容菌 *P. resinovorans* に導入した株のスクリーニングを行った。その結果、300株から1:2接合条件下で NAH7 が高頻度で伝達する株を16株取得し、取得した各クローンには10箇所の異なる *P. putida* 染色体上の領域(一部は重複)が導入されており、受容菌染色体上の複数の因子の関与が示唆された。

過去の報告において、受容菌の細胞外膜成分の接合対(接合伝達時に性線毛を介して形成される供与菌-受容菌の complex)安定化への寄与が推測されていた。また、本論文第5章

に示すように *P. putida* の外膜タンパク質 outer membrane protein H1 (OprH) の pCAR1 の接合伝達における二価カチオン要求性への関与が示唆されていることから、本研究では、関与が示唆された領域上の因子の中でも OprH に着目することとした。OprH の受容菌選択への関与を検証するため、oprH 破壊株を受容菌として用いた 1:2 接合実験を行った結果、oprH 破壊株への 1:1 接合時の伝達頻度の低下および 1:2 接合時の受容菌選択性の低下が確認された。このことから、プラスミドによる受容菌選択への OprH の関与が示唆された。

次に、OprH が接合対の安定化に寄与している可能性を考え、NAH7 の性線毛先端を構成するタンパク質 MpfD と受容菌 *P. putida* あるいは *P. resinovorans* の OprH との結合親和性を評価した。大腸菌を宿主とした異種発現系を用いて、GST タグを付加した MpfD および、His タグを付加した各 OprH を取得し、プルダウンアッセイを行った。MpfD は *P. putida* の OprH と相互作用した一方で、*P. resinovorans* の OprH との相互作用は検出されなかったことから、外膜タンパク質 OprH - 性線毛間の親和性の違いが受容菌の選択性に反映されている可能性が示唆された。

さらに、受容菌認識に寄与する新規因子の同定を目指し、MpfD と相互作用する受容菌の膜タンパク質をプルダウンアッセイにより探索した。現在までに、*P. putida* の膜タンパク質画分中に存在し、MpfD との相互作用が期待されるタンパク質のバンドを SDS-PAGE にて確認しており、質量分析による当該タンパク質の同定が期待される。

#### 第4章 受容菌選択に寄与するプラスミド由来の因子の探索

第2章で用いた4種のプラスミドのうち、NAH7において特に顕著な受容菌選択性が見られたことから、NAH7上にも因子が存在することが推定された。プラスミド上にランダムにトランスポゾン (Tn) を導入して作製した遺伝子破壊ライブラリーのスクリーニングを行い、260株から1:2接合条件下で *P. putida* から *P. resinovorans* へ高頻度で伝達する株を8株取得した。それらの Tn はそれぞれ異なる領域に挿入されており、うち6個についてはナフタレン分解遺伝子群を含む Tn4655 上に挿入されていた。Tn4655 を含む領域を欠損した NAH7 を用いた接合実験の結果、1:2 接合条件下で受容菌の選択性が低下したことから、当該領域の受容菌選択性への関与が示唆された。

プラスミド上には、プラスミドの複製分配に必須なコア領域、および分解遺伝子や薬剤耐性遺伝子など複製分配に必須ではないアクセサリ領域が存在する。アクセサリ領域である Tn4655 領域の関与が示唆されたことから、次にコア領域の受容菌選択性への関与の有無に興味を持たれた。そこで NAH7 と同様の複製分配の機構を有する pWW0 (IncP-9) を用いた接合実験を行った。*P. putida* を供与菌とした場合、1:1 接合時には NAH7 と同様に *P. putida* への接合伝達頻度の方が高い傾向が見られた。一方で、NAH7 とは異なり、pWW0 は 1:2 接合条件下でも 1:1 接合時と同程度の比率で2種の受容菌へ接合伝達した。以上の結果から、受容菌の選択性に NAH7 と pWW0 で共通するコア領域は関与しない可能性が示唆された。

## 第5章 プラスミドの接合伝達における二価カチオン要求性の解析

本章では培地成分に着目し、過去に報告された pCAR1 の接合伝達における二価カチオン (Ca<sup>2+</sup>および Mg<sup>2+</sup>) 要求性について原理理解を目指した。まず現象の一般性の評価を目的とし、5種のプラスミドについて二価カチオン要求性の評価を行った。*Pseudomonas* 属細菌を宿主とした接合実験の結果、いずれのプラスミドにおいても共通して二価カチオン要求性が見られ、中でも IncP-7 群プラスミドにおいて顕著な二価カチオン要求性が見られた。

この二価カチオン要求性に寄与する因子探索を目的として共同研究者により行われたトランスクリプトーム解析において、二価カチオン添加によって転写変動した受容菌染色体上の遺伝子として *oprH* が選抜されていた。そこで、pCAR1 を保持した *P. fluorescens* を供与菌、*oprH* を破壊した *P. putida* を受容菌とした接合実験を行った結果、破壊株では二価カチオン要求性が見られなくなり、OprH を相補した株では二価カチオン要求性が不完全ながらも回復したことから (図 2)、OprH の二価カチオン要求性への関与を明らかにした [3]。

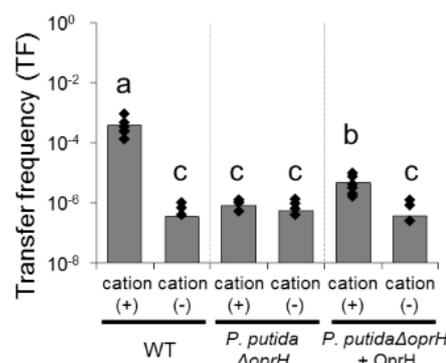


図 2. *oprH* 破壊株および相補株における二価カチオン要求性

## 第6章 総括と展望

本研究では、2種の受容菌候補の共存がプラスミドの受容菌選択に影響を及ぼし、その程度はプラスミド-宿主の組み合わせにより異なることを明らかにした。この受容菌選択に影響を及ぼす因子は、受容菌染色体上およびプラスミド上のいずれにも存在し、中でも受容菌外膜タンパク質 OprH とプラスミドの性線毛構成タンパク質 MpfD との相互作用が受容菌選択に寄与している可能性を明らかにした。また、OprH が接合伝達における二価カチオン要求性にも寄与していることを示した。本研究は、これまで未解明であったプラスミドによる受容菌の認識機構や、細菌集団中での接合伝達の宿主域 (conjugative host range) 決定機構解明の足がかりとなる効果が期待できる。さらには、複合微生物系を扱う分野におけるプラスミドの挙動制御などへの応用も可能になると考えている。

### 発表論文

- [1] Yanagida, K., Sakuda, A., Suzuki-Minakuchi, C., Shintani, M., Matsui, K., Okada, K., Nojiri, H. (2016) Comparisons of the transferability of plasmids pCAR1, pB10, R388, and NAH7 among *Pseudomonas putida* at different cell densities. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* **80**: 1020-1023
- [2] Sakuda, A., Suzuki-Minakuchi, C., Okada, K., Nojiri, H. (2018) Conjugative selectivity of plasmids is affected by coexisting recipient candidates. *mSphere* **3**: e00490-18
- [3] Sakuda, A., Suzuki-Minakuchi, C., Matsui, K., Takahashi, Y., Okada, K., Yamane, H., Shintani, M., Nojiri, H. (2018) Divalent cations increase the conjugation efficiency of the incompatibility P-7 group plasmid pCAR1 among different *Pseudomonas* hosts. *Microbiology* **164**: 20-27