

博士論文（要約）

細菌集団におけるプラスミドの受容菌選択機構

作田 郁子

目次

目次

要旨

略語表

第1章	序論	1
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	
2-1	緒言	21
2-2	材料と方法	22
2-3	結果	
2-3-1	1:2 接合実験系の遺伝子レベルでの評価	32
2-3-2	<i>P. putida</i> を供与菌とした液体接合実験	32
2-3-3	<i>P. resinovorans</i> を供与菌とした液体接合実験	35
2-3-4	接合時間が 1:2 接合伝達に与える影響の評価	37
2-3-5	<i>P. putida</i> を供与菌とした固体培地上での接合実験	37
2-3-6	<i>P. resinovorans</i> を供与菌とした固体培地上での接合実験	39
2-3-7	菌体凝集が接合伝達に及ぼす影響の評価	42
2-3-8	培養上清が接合伝達に及ぼす影響の評価	44
2-4	考察	46
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	
3-1	緒言	51
3-2	材料と方法	52
3-3	結果	
3-3-1	BAC ライブラリーを用いた受容菌選択に作用する因子の探索	63
3-3-2	<i>oprH</i> 破壊株を受容菌とした接合実験	69
3-3-3	OprH と MpfD の相互作用解析 [プルダウンアッセイ]	69
3-3-4	OprH と MpfD の定量的な相互作用解析の試み [ITC]	79
3-3-5	MpfD と相互作用する膜タンパク質の探索	79
3-4	考察	89

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	
4-1	緒言	93
4-2	材料と方法	94
4-3	結果	
4-3-1	トランスポゾン挿入遺伝子破壊ライブラリーを用いた因子の探索	100
4-3-2	NAH7の大規模遺伝子欠損体の挙動評価	103
4-3-3	IncP-9群プラスミドのコア領域の関与の検証	103
4-4	考察	106
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	
5-1	緒言	108
5-2	材料と方法	109
5-3	結果	
5-3-1	様々なプラスミドにおける二価カチオン要求性の評価	113
5-3-2	様々な供与菌-受容菌の組み合わせにおける二価カチオン要求性の評価	113
5-3-3	二価カチオンが菌体凝集に及ぼす影響の評価	118
5-3-4	二価カチオンが菌体増殖およびプラスミドの安定性に及ぼす影響の評価	118
5-3-5	タイリングアレイ解析による二価カチオン要求性に寄与する因子探索	121
5-3-6	OprHの二価カチオン要求性への寄与の検証	123
5-4	考察	125
第6章	総括と展望	127
補章1	菌密度が接合伝達に及ぼす影響の評価	
S1-1	緒言	130
S1-2	材料と方法	131
S1-3	結果	
S1-3-1	菌密度が接合伝達頻度に及ぼす影響の評価	133
S1-3-2	接合時間が接合伝達頻度に及ぼす影響の評価	134
S1-3-3	受容菌数を考慮した接合伝達頻度の算出	135
S1-4	考察	139
補章2	二価カチオン添加により転写変動した遺伝子のリスト	141
補章3	詳細な実験操作	151
参考文献		168

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

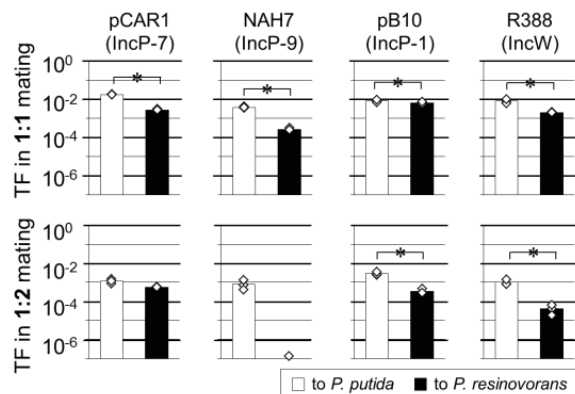


図1.4種のプラスミドの1:1(上)、1:2接合(下)時の接合伝達頻度 (transfer frequency: TF)

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 artificial 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^{2+} および Mg^{2+}) 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]。

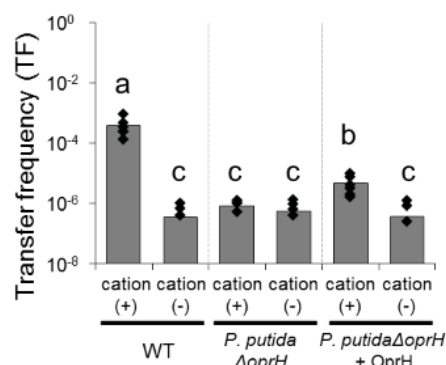


図2. *oprH* 破壊株および相補株における二価カチオン要求性

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

略語表

Ap	ampicillin
APS	ammonium persulfate
bp	base pairs
BSA	bovine serum albumin
CF	carbon free
CFU	colony forming unit
CMC	critical micelle concentration
CTAB	hexadecyltrimethyl ammonium bromide
DIG	digoxigenin
DHPC	1,2-dihexanoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphocholine
EDTA	ethylendiamine tetraacetic acid
Gm	gentamicin
GST	glutathione <i>S</i> -transferase
Inc	incompatibility
IPTG	isopropyl β -D-thiogalactopyranoside
ITC	isothermal titration calorimetry
kb	kilo bases
Km	kanamycin
OD	optical density
ORF	open reading frame
PAGE	polyacrylamide gel electrophoresis
PCR	polymerase chain reaction
Rif	rifampicin
rpm	round per minute
RT	room temperature
SDS	sodium dodecylsulfate
TAE	tris-acetate-EDTA
Tc	tetracycline
Tris	tris (hydroxymethyl) aminomethane

第1章

序論

1-1. 遺伝子の伝播

細菌における遺伝子の伝播は、垂直伝播と水平伝播 (horizontal gene transfer; HGT) の二種に分けられる。垂直伝播は遺伝子が次世代に継代されることであり、細菌が細胞分裂・増殖することで行われる。対する水平伝播は、二つの異なる個体間で遺伝子が伝播することであり、外部から遺伝子が取り込まれることを指す。細菌の有する新規遺伝子の 88~98%は水平伝播によって獲得されているという報告もあり [Treangen and Rocha, 2011]、水平伝播は細菌の新規遺伝子の獲得と進化・環境適応に大きく寄与してきたと考えられている。

遺伝子の主な水平伝播機構としては、形質転換 (transformation)、接合伝達 (conjugation)、形質導入 (transduction) の三種類が知られている (Fig. 1-1) [Frost *et al.*, 2005]。これらの機構を担う可動性遺伝因子 (mobile genetic elements; MGEs) にはトランスポゾン、プラスミド、バクテリオファージなどが存在する。また、上述の三種に加え、gene transfer agents (GTAs) を介した遺伝子の伝播 [Solioz *et al.*, 1975; Lang *et al.*, 2012]、cell fusion と呼ばれる細胞融合、細胞外小胞体である membrane vesicles (MV) を介した経路 [Kolling and Matthews, 1999, Domingues and Nielsen, 2017] や、nanotubes を介した経路 [Dubey and Ben-Yehuda, 2011] など報告されており、多様な遺伝子の伝播機構を利用した細菌の生存戦略の存在が明らかになっている。

中でも、プラスミドの接合伝達は広い宿主域を持っていることや [Amabile-Cuevas and Chicurel, 1992; Halary *et al.*, 2010]、また高い頻度で一度に多くの遺伝子を伝播し、世代の短い細菌において宿主の表現型を著しく変化させるという点で、特に重要である。また、プラスミドは細菌に限らず、酵母、植物やヒト培養細胞など、多様な生物へ伝達可能であることが報告されており [Lacroix and Citovsky, 2016]、環境中ではプラスミドを介した様々な生物種への細菌由来の遺伝的形質の伝播が生じていることが推測される。

また、プラスミドは環境中で多様な遺伝子を保存するプールとしても機能すると考えられている [Norman *et al.*, 2009]。ハロゲン化合物や芳香族化合物などの難分解性の環境汚染物質を分解・資化する分解遺伝子群はプラスミド上に見出される場合が多く [Springael and Top, 2004; Tsuda *et al.*, 2014]、そのようなプラスミドを保持した分解菌を利用した環境浄化技術の開発も期待されている。さらに、プラスミドは薬剤耐性や病原性などヒトにとって有害な形質を発揮する遺伝子を保持している場合もあり、院内感染の原因などにもなることからその挙動理解の必要性は高い。加えて、プラスミドは遺伝子操作のベクターとして有用なツールとしても幅広く用いられている。このように、プラスミドの接合伝達は実応用面からも重要な研究対象であると言える。

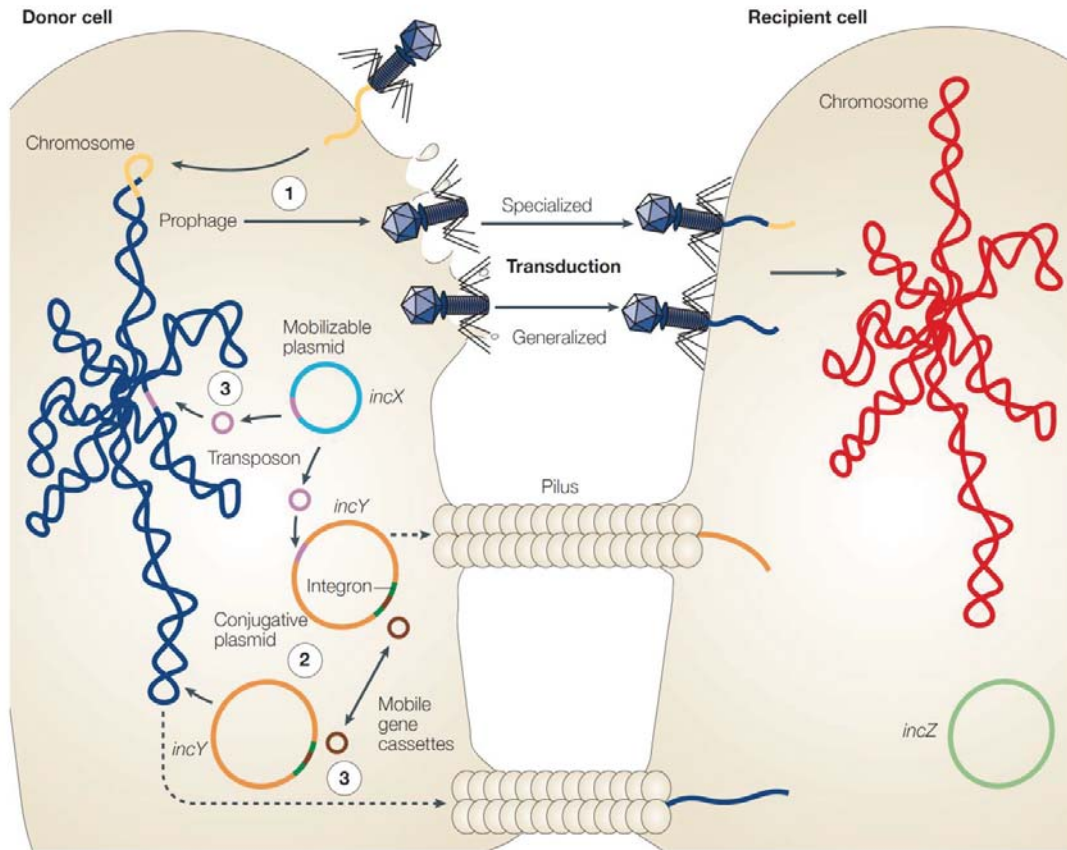


Fig. 1-1. 遺伝子の伝播 [Frost *et al.*, 2005のFig. 1より引用]

細菌間における代表的な遺伝子の伝搬機構を示す。①形質導入 (transduction); バクテリオファージにより伝播される。ホストのゲノム (濃い青色) のみを伝播する場合 (generalized transduction) と、自らのDNA (黄色) も伝播する場合 (specialized transduction) がある。②接合伝達 (conjugation); 性線毛 (pili) と呼ばれる構造体を介して、受容菌との接触およびプラスミドDNA (オレンジ色) の輸送が行われる。受容菌細胞へ輸送されたDNAは受容菌細胞内のプラスミド (淡い緑色) と不和合性が異なる場合には環状のプラスミドDNAとなり自律的に複製する。あるいは、受容菌染色体ゲノム (赤色) 上に組み込まれる場合も存在する。③トランスポゾンを経た形質転換 (transformation); 細菌が細胞内に取り込んだDNA (紫色) が、染色体やプラスミドゲノム上に組み込まれることで完了する。

1-2. プラスミドの接合伝達機構

プラスミドは染色体とは独立した自律的な複製単位であり、個体間を接合伝達によって移動することが出来る [松原, 1976; Thomas, 2000]。これまでに、プラスミドを分子遺伝学における有用なツールとして用いることを主な目的として、大腸菌 *Escherichia coli* などのモデル生物を用いてその伝達機構の解析がなされてきた。

プラスミドの接合伝達はプラスミド上にコードされた、供与菌内で二本鎖 DNA から一本鎖 DNA (ssDNA) を生成し DNA の複製および輸送を担うシステム (mobilization; MOB) と、供与菌と受容菌間を連結する性線毛を合成し ssDNA 輸送体を構築するシステム (mating-pair formation; MPF) により制御されている [Smillie *et al.*, 2010]。MOB は接合伝達開始領域である *oriT*、relaxase、coupling protein からなる。MPF が DNA の分泌装置として機能するために重要な役割を果たすのが coupling protein であり、MPF 構造体と relaxase-ssDNA 複合体を共役させる働きを有している。

T4SS を介した DNA 輸送は次のように進行する (Fig. 1-2) [Williams and Hergenrother, 2008; Grohman *et al.*, 2018]。

- ①. Relaxase がプラスミド DNA の接合伝達開始領域 *oriT* 近傍に結合する。
- ②. Relaxase が二本鎖 DNA の *nic* site に切れ込み (nick) を入れ DNA の開裂反応を触媒する。Nick の入った DNA の 5'末端は relaxase の N 末端ドメインの tyrosine 残基と共有結合して、relaxase-ssDNA 複合体を形成する [Gonzalez-Perez *et al.*, 2007]。
- ③. Nick の入っていない一本鎖 DNA を鋳型として、供与菌内で rolling-circle 型の DNA 複製が進行する。
- ④. Relaxase の tyrosine 残基が再び DNA 上に nick を入れ、relaxase-ssDNA 複合体と伸長鎖が開裂する。
- ⑤. Relaxase-ssDNA 複合体は coupling protein を介して MPF 構造体に受け渡される。T4SS を介して受容菌細胞内へと伝達された ssDNA は、relaxase の機能により再環状化する。
- ⑥. 再環状化した ssDNA は宿主の複製装置によって環状二本鎖 DNA に再合成される [Draper *et al.*, 2005; Garcillán-Barcia *et al.*, 2009]。

MPF の伝達システムは四型分泌装置 (type IV secretion system; T4SS) に属しており、T4SS はその構造から P-type、F-type、I-type に分類されている (Fig. 1-3) [Christie, 2016; Chandran Darbari and Waksman, 2015]。P-type の T4SS を有する代表的な例としては、*Agrobacterium tumefaciens* の Ti プラスミド [Christie, 2004] やプラスミド R388 (Incompatibility group (Inc) W; プラスミドの分類法については 1-4. にて後述) [Datta and Hedges, 1972; Fernández-López *et al.*, 2012; Low *et al.*, 2014] が知られている。また、F-type の例としては F プラスミド (IncF) [Lawley *et al.*, 2003] が、I-type の例としてはプラスミド R64 (IncI1) [Komano *et al.*, 2000] や *Legionella pneumophila* の Dot/Icm システム [Segal *et al.*, 2005] が知られている。

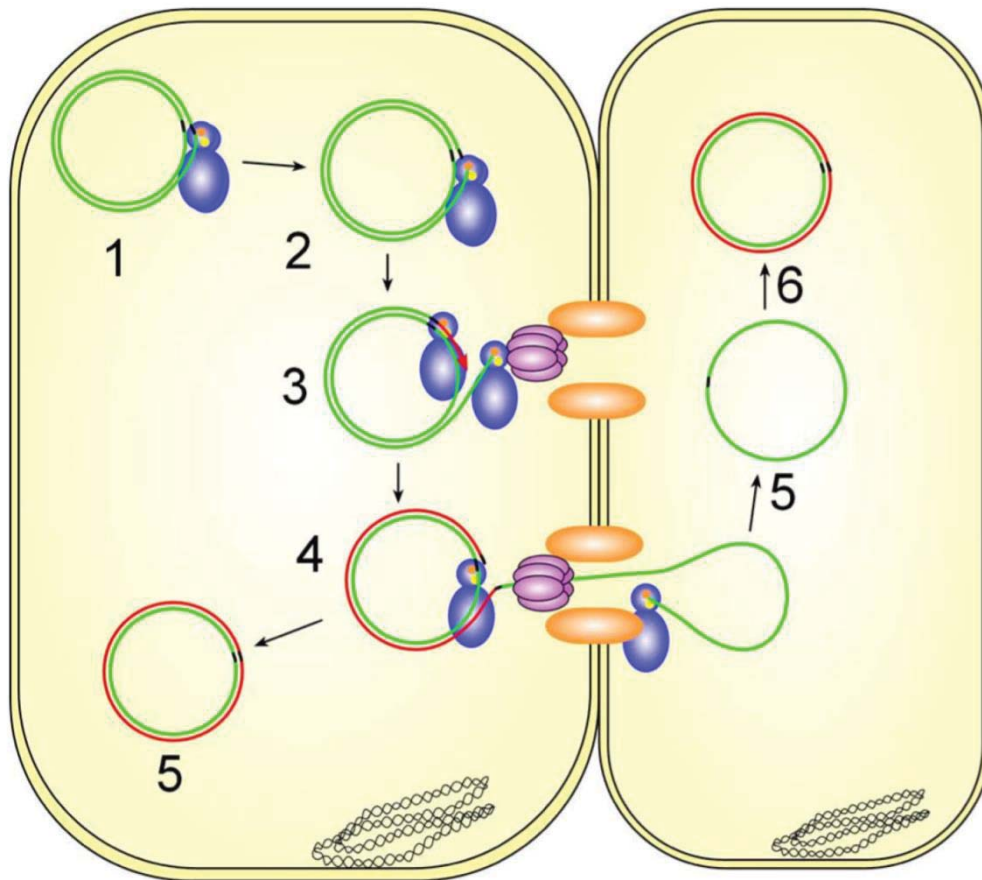


Fig. 1-2. プラスミドの接合伝達のメカニズム [Williams and Hergenrother, 2008のFig. 3より一部改変して引用]

プラスミドR388の接合伝達について、供与菌および受容菌細胞内での進行メカニズムを示す。Relaxaseはrelaxaseドメイン (青色丸状)とhelicaseドメイン (青色楕円状)を有する。①Relaxaseドメインが伝達されるプラスミドDNA (T-strand) の接合伝達開始領域 (*oriT*) 近傍に結合する。②Relaxaseは*nic* siteに切れ込み (nick) を入れ、DNAの開裂反応を触媒する。Nickの入ったDNAの5'末端は、relaxaseのN末端ドメインの18番目のtyrosine残基 (オレンジ色) と共有結合してrelaxase-ssDNA複合体を形成する。③Nickの入っていない一本鎖DNAを鋳型としてrolling-circle型の複製が進行する。④26番目のtyrosine残基 (黄色) が再びnickを入れ、T-strandと伸長鎖 (赤色) が開裂する。⑤Relaxase-ssDNA複合体は受容菌細胞内へと伝達され、再環状化する。⑥受容菌の複製装置を使い環状二本鎖DNAに再合成される。

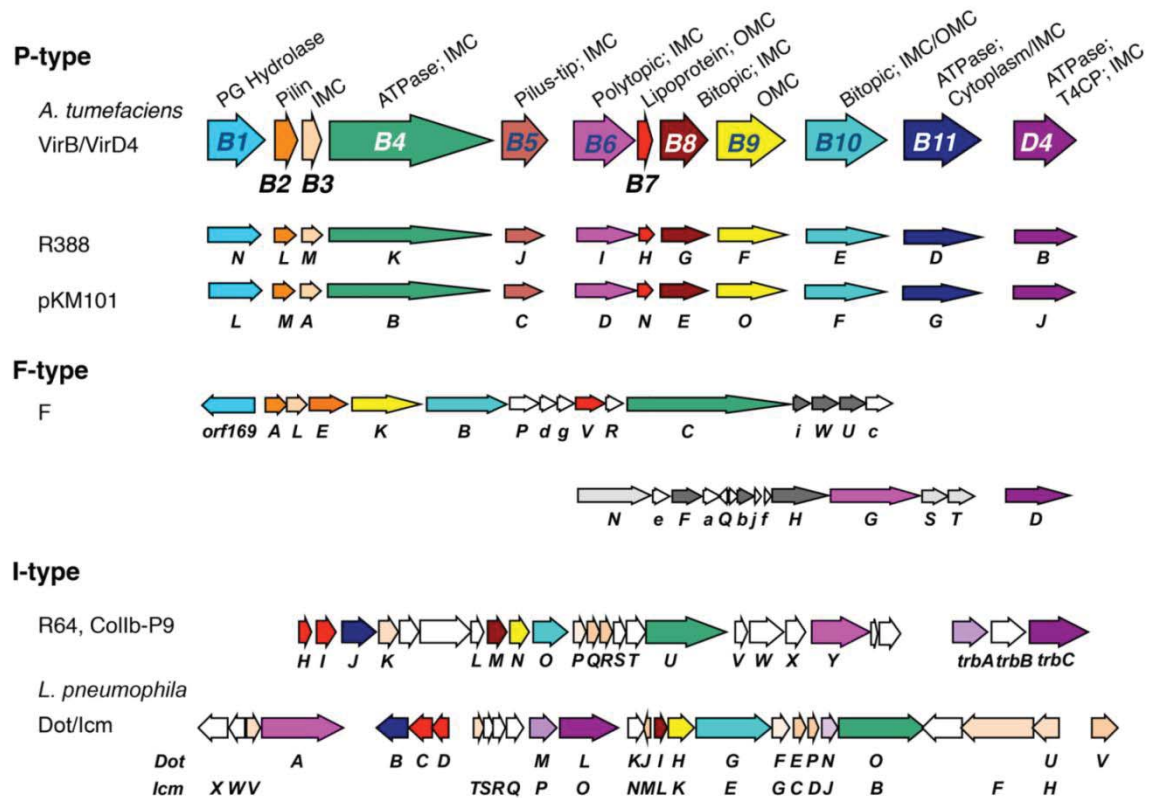


Fig. 1-3. T4SSの分類および構成遺伝子の保存性 [Christie, 2016のFig. 1より引用]

T4SSはP、FおよびIタイプに分類される。(P-type) *A. tumefaciens*のVirB/VirD4システムを元に各因子の分布および機能を示している。IMCはinner membrane complex、OMCはouter membrane complex、PG Hydrolaseはpeptidoglycan hydrolase、T4CPはtype IV coupling proteinを意味する。(F-type) *virB/virD4*システムを構成する遺伝子と関連した機能を有する遺伝子を同色で示している。F-piliの伸長/退縮に関与する遺伝子は濃い灰色で、接合対の安定性あるいはsurface exclusionに関与する遺伝子は淡い灰色で示している。上段は *tra*遺伝子、下段は *trb*遺伝子である。(I-type) *virB/virD4*システムを構成する遺伝子と似た機能を有する遺伝子を同色で示している。I-type特異的なinner membraneに存在するものをベージュ色で、T4CPと相互作用するものを紫色で示している。

P-type の T4SS のうち、Ti プラスミドに代表される VirB/VirD4 システムはその構造解析が行われており、また R388 の T4SS についてもネガティブ染色法による電子顕微鏡観察により複合体構造が明らかになっている (Fig. 1-4)。VirB/VirD4 システムは VirB1、VirB2、VirB3、VirB4、VirB5、VirB6、VirB7、VirB8、VirB9、VirB10、VirB11、VirD4 の 12 個のタンパク質から構成されている。

VirB/VirD4 システムの構成因子はその役割から性線毛 (pilus)、outer membrane complex (OMC)、inner membrane complex (IMC)、coupling protein および ATPase に分けられる。性線毛の主要な構成因子は VirB2 であり、VirB5 は性線毛先端に存在し、受容菌との細胞接着に関与していると考えられている [Yeo *et al.*, 2003]。溶菌性の transglycosylase である VirB1 は T4SS がペプチドグリカン層を貫通するための補助をされると考えられている。OMC は VirB7、VirB9 および VirB10 から構成され、構造体の安定性に寄与している。IMC は VirB8、VirB6 および VirB3 から構成され、中でも VirB8 および VirB6 は輸送チャネルを塞ぐように位置しており基質の輸送時に重要な役割を果たすと考えられている。接合伝達時には MPF 構造体と relaxase-ssDNA 複合体を共役させる働きをする coupling protein である VirD4 は、relaxase および VirB10 と結合することが知られている [Cascales *et al.*, 2005]。また、ATPase である VirD4、VirB11 および VirB4 は性線毛の伸長や DNA の輸送のエネルギーを生み出している (Fig. 1-5) [Cabezón *et al.*, 2015]。

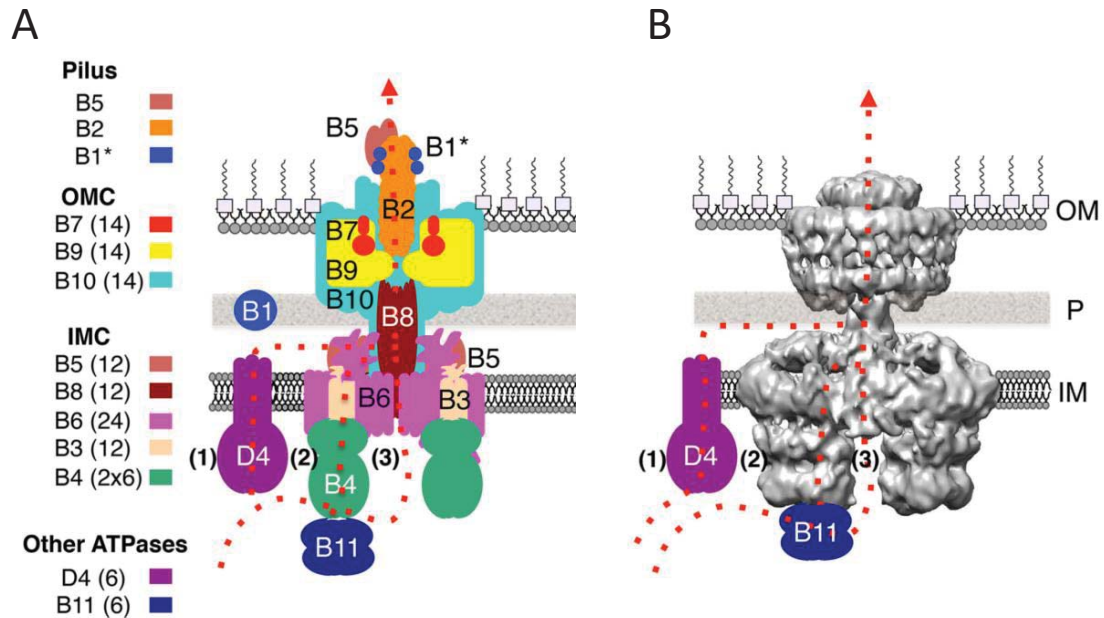


Fig. 1-4. IV型分泌装置 (T4SS) の構造 [Christie, 2016のFig. 2より一部改変して引用]
P-typeのT4SSの複合体構造を示す。模式的に、各構成要素の名称および機能については、*A. tumefaciens*のVirB/VirD4システムを元に示している。(A) VirB/VirD4システムは性線毛 (pilus)、outer membrane complex (OMC)、inner membrane complex (IMC)、coupling protein、ATPaseから構成される。各構成因子の括弧内の数字は重合数を示している。性線毛はVirB2および先端に存在するVirB5から構成され、トランスグリコシラーゼであるVirB1は性線毛の形成に必要とされている。OMCはVirB7、VirB9およびVirB10から構成され、IMCはVirB5、VirB8、VirB6、VirB3およびVirB4から構成される。(B) ネガティブ染色法を用いたプラスミドR388のVirB3からVirB10までの複合体の電子顕微鏡マップを示す。IMはinner membrane、Pはperiplasm、OMはouter membraneを示している。現在考えられている三通りのT-DNA輸送の推定経路を赤色点線で示している。

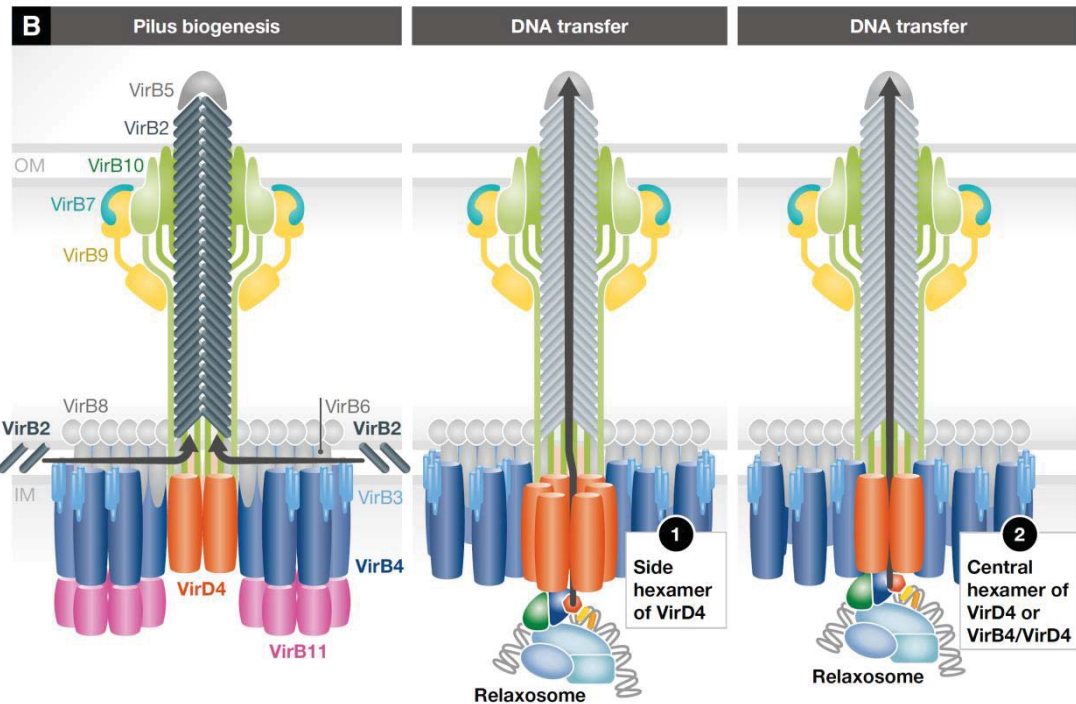


Fig. 1-5. 性線毛の伸長およびDNA輸送の仕組み [Waksman, 2019のFig. 5Bより引用]

性線毛の伸長時とDNA輸送時のT4SS構造を示す。性線毛の伸長時には、VirB11がVirB4と結合することで性線毛構成タンパク質であるVirB2がVirB4によって輸送され性線毛が形成される。DNA輸送時には、①VirD4の6量体とあrelaxase-ssDNA複合体 (relaxosome) がVirB4の横に結合して輸送される仕組み、あるいは、②outer membrane complexへとつながる構造体の中心に位置するVirB4/VirD4にrelaxosomeが結合して輸送される仕組みの二通りの仮説が提唱されている。

1-3. プラスミドの受容細胞認識機構

プラスミドの接合伝達開始のシグナルや受容細胞の認識機構については、*A. tumefaciens* から植物細胞への T-DNA の組み込みに関して、これまでに複数の報告がある。植物組織に傷がついた際に放出されるアセトシリンゴンなどのフェノール化合物がシグナル物質となり、*A. tumefaciens* は引き寄せられ、植物細胞に付着する。*A. tumefaciens* が植物細胞を付着する際には、*A. tumefaciens* 染色体ゲノム上にコードされている ChvA、ChvB、PscA、Att タンパク質が接着を補助する役割を持つと考えられている。さらに、シグナル物質に Ti プラスミド上の二成分制御系である VirA-VirG が応答し、T4SS を構成する *vir* 遺伝子群の転写誘導が引き起こされる。一方で、植物細胞は *vir* 遺伝子群の活性化を抑制する因子も保持しており、そのシグナル物質としてサリチル酸や 2-hydroxy-4,7-dimethoxybenzoxazin-3-one (MDIBOA) などが報告されている [Zhang *et al.*, 2000; Yuan *et al.*, 2007]。また、植物細胞表層に存在するレセプターについては、vitronectin や rhicadhesin 様のタンパク質がレセプターとして機能していると推測されている [Wagner and Matthysse, 1992; Swart *et al.*, 1994; Tzfira and Citovsky, 2002]。

一方で、細菌間のプラスミドの接合伝達における受容菌の認識について、その詳細な機構は明らかになっていない。過去の報告では、接合伝達に関与している受容菌の因子について、リポ多糖 (LPS) や outer-membrane protein A (OmpA) などの細胞外膜成分が F プラスミドや IncI 群プラスミドの形成する接合対 (プラスミドの伝達時に T4SS を介して形成される供与菌-受容菌の complex) の安定性に寄与していると推測されていた [Manoil and Rosenbusch, 1982]。さらに、LPS 生合成に関与する遺伝子が欠失した受容菌は IncF や IncI プラスミドを液体接合条件下でほとんど受け取れなくなる現象が知られており、これは性線毛の先端に存在するタンパク質が受容菌外膜上の LPS と特異的に結合することによって接合対を安定化していることに起因すると考えられている [Anthony *et al.*, 1999; Ishiwa and Komano, 2004]。*Pseudomonas aeruginosa* において LPS 生合成遺伝子を欠損させると ICE である PAPI-1 の伝達が生じなくなることも知られており、これは PAPI-1 と性線毛構成タンパク質である PilV2 の相互作用に菌すると推測されており、PAPI-1 を取得した菌株では LPS 生産が低下し、新たな PAPI-1 の取得頻度が低下することも報告されている [Hong *et al.*, 2017]。さらに、近年大腸菌を宿主としたプラスミド pKM101 (IncN) の伝達において、プラスミド上にコードされるタンパク質 Pep が、供与菌外膜構成タンパク質と相互作用し、特に液体中でのプラスミドの伝達に寄与している可能性が報告された [González-Rivera *et al.*, 2019]。この Pep は、供与菌-受容菌間の相互作用に寄与していると推測されている。接合伝達時の DNA 輸送機構についての詳細な分子メカニズムが明らかにされてきた一方で、受容菌認識イベントについての知見は作用因子の同定および機能の推定にとどまるものが多く、まだまだ乏しいのが現状であると言える。

1-4. プラスミドの分類

プラスミドには、接合伝達に必要な機能遺伝子が全て備わっている自己伝達性 (self-transmissible) プラスミド、および自己伝達性プラスミドの接合伝達機構を利用してはじめて移動可能となる可動性 (mobilizable) プラスミドとが存在する [Smillie *et al.*, 2010]。また、プラスミドが複製可能な微生物の種類幅を宿主域 (replication host range) と呼び、異なる門や綱に属する細菌内でも複製される広宿主域 (broad-host range) プラスミドと、同一の属、種および類縁の株間のみで複製される狭宿主域 (narrow-host range) プラスミドとに分類される [del Solar *et al.*, 1998; Jain and Srivastava, 2013]。それらプラスミドについて、現在広く用いられている分類法としては、不和合性を用いたものと接合伝達の遺伝子を用いた分類法の二つが存在する。

同一の細菌細胞内に二種類のプラスミドが同時に存在する時、複製分配の機構が同一もしくは類似しているプラスミド同士は、同一宿主内で多世代にわたって安定的に共存することができないことが知られている [Pinto *et al.*, 2012]。この性質をプラスミドの「不和合性 (incompatibility)」と呼び、二種類のプラスミドは同一の不和合性群 (incompatibility group; Inc) に属するという。グラム陰性細菌については、腸内細菌を宿主とした 26 種 (IncA~IncZ) および土壌や海洋等に生息する *Pseudomonas* 属細菌を中心とした 14 種 (IncP-1~IncP-14) の不和合性群が知られており、それらは一部重複している [新谷ら, 2013]。一方、グラム陽性細菌については 18 種の不和合性群が存在することが知られている [Taylor *et al.*, 2004]。

また、シーケンス技術の進歩に伴い、不和合性群によるプラスミドの分類には属さないプラスミドが数多く発見されたことを受け、2010 年に Smillie らによって自己伝達性プラスミドについて不和合性による分類とは別に、接合伝達の MOB および MPF の相同性に基づく分類が行われた。MOB family は relaxase のアミノ酸配列の相同性を元に MOB_F、MOB_H、MOB_Q、MOB_C、MOB_P、MOB_V の六つのグループ [Garcillán-Barcia and de la Cruz, 2009; Smillie *et al.*, 2010]、MPF family は T4SS を構成する VirB4 の配列相同性に基づいて MPF_I、MPF_G、MPF_T、MPF_F の四つのグループ [Smillie *et al.*, 2010; Guglielmini *et al.*, 2014] に分けられる。これらの分類法を組み合わせる事で、より多くの接合伝達性プラスミドを分類することが可能になった (Table 1-1) [Yano *et al.*, 2019]。

また、形成する性線毛についても、腸内細菌の Inc 群について、rigid pili を形成するもの (IncM、IncN、IncP、IncW)、thick flexible pili を形成するもの (IncC、IncD、IncF、IncH、IncJ、IncT、IncV、IncX)、thin flexible pili を形成するもの (IncI、IncB、IncK) に分けられることが報告されている [Bradley, 1980]。

Table 1-1. プラスミドの分類 [Yano *et al.*, 2019のTable 1より一部改変して引用]

Incompatibility ^a	Representative plasmid (original host) ^b	Accession number ^c	RIP ^d	MOB ^e	MPF ^e	Host range ^f
Inc groups						
A/C ₁ (=IncA)	RA1 (<i>Aeromonas hydrophila</i>)	NC_012885	RepA	MOB _H	MPF _F	<i>Gammaproteobacteria</i>
A/C ₂ (=IncC)	pRMH760 (<i>Klebsiella pneumoniae</i>)	KF976462	RepA	MOB _H	MPF _F	<i>Gammaproteobacteria</i>
IncB/O	R3521 (<i>Escherichia coli</i>)	GU256641	RepA	MOB _P	MPF _I	<i>Escherichia</i>
IncD	R711b (<i>Providencia</i>)	NA	NA	NA	NA	<i>Escherichia, Salmonella, Proteus</i>
IncFI	F (<i>Escherichia coli</i>)	AP001918	RepE (for RepFIA replicon)	MOB _F	MPF _F	<i>Enterobacteriaceae, Yersiniaceae</i>
IncFII	R1 (<i>Salmonella enterica</i>)	KY749247	RepA	MOB _F	MPF _F	<i>Escherichia, Salmonella</i>
IncG/U (=IncP-6)	Rms149 (<i>Pseudomonas aeruginosa</i>)	AJ877225	RepA	MOB _P	-	<i>Proteobacteria</i>
IncH	RA3 (<i>Aeromonas hydrophila</i>)	DQ401103	RepHI1A, RepHI1B	MOB _H	MPF _F	<i>Enterobacteriaceae, Yersiniaceae, Erwiniaceae</i>
	R27 (<i>Salmonella typhi</i>)	AF250878				
IncI	R64 (<i>Salmonella enterica</i>)	AP005147	RepZ	MOB _P	MPF _I	<i>Escherichia, Salmonella, Shigella</i>
IncJ	R391 (<i>Providencia rettgeri</i>)	AY090559	-	MOB _H	MPF _F	NA
IncK	R387 (<i>Shigella flexneri</i>)	NCTC50022	-	MOB _P	MPF _I	NA
IncL	R471 (<i>Serratia marcescens</i>)	KM406489	RepA	MOB _P	MPF _I	<i>Proteobacteria</i>
	pKOI-34 (<i>Klebsiella oxytoca</i>)	AB715422				
IncM	R69 (<i>Salmonella enterica</i>)	KM406488	RepA	MOB _P	MPF _I	<i>Proteobacteria</i>
IncN	pEL60 (<i>Erwinia amylovora</i>)	NC_005246	RepA	MOB _F	MPF _T	<i>Escherichia, Klebsiella, Salmonella</i>
	N3 (<i>Escherichia coli</i>)	NC_015599				
IncP (=IncP-1)	RK2 (<i>Pseudomonas aeruginosa</i>)	BN000925	TrfA	MOB _P	MPF _T	<i>Proteobacteria</i>
IncQ	RSF1010 (<i>Escherichia coli</i>)	M28829	RepABC	MOB _Q	-	<i>Proteobacteria</i>
IncR	pKP1780 (<i>Klebsiella pneumoniae</i>)	JX424614	RepB	-	-	<i>Klebsiella</i>
IncS (=IncHI2)	R478 (<i>Serratia marcescens</i>)	BX664015	RepHIA	MOB _H	MPF _F	<i>Serratia</i>
IncT	Rts1 (<i>Proteus vulgaris</i>)	AP004237	-	MOB _H	MPF _F	<i>Proteus, Citrobacter</i>
IncV	R753 (<i>Escherichia coli</i>)	NCTC50521 (planned)	NA	NA	NA	<i>Proteus</i>
IncW	R388 (<i>Escherichia coli</i>)	NC_028464	RepA	MOB _F	MPF _T	<i>Salmonella, Escherichia, Providencia</i>
IncX	R6K (<i>Escherichia coli</i>)	NCTC50005	π	MOB _P	MPF _T	<i>Enterobacteriaceae</i>
IncY	P1 (<i>Escherichia virus</i>)	AF234172 (phage P1 mod749::IS5 c1-100)	RepA	-	-	<i>Enterobacteriaceae</i>
	pMCR-1-P3 (<i>Escherichia coli</i>)	KX880944	-	-	-	-
IncZ	pEI545 (<i>Klebsiella pneumoniae</i>)	M93064 (partial)	RepA	NA	NA	<i>Klebsiella</i>
	pMRAD02 (<i>Methylobacterium radiotolerans</i>)	NC_010509	RepA	MOB _P	MPF _T	<i>Proteobacteria</i>
IncP-9	pIPO2 (§unknown)	AJ297913	-	-	-	-
	pSN0729-62 (§unknown)	AP018705	-	-	-	-
	pM3 (<i>Pseudomonas putida</i>)	AF078924 (partial)	Rep	MOB _F	MPF _T	<i>Pseudomonas, Escherichia</i>
	NAH7 (<i>Pseudomonas putida</i>)	NC_007926	-	-	-	-
Representative cloning vectors						
Not assigned	pUC18/19, pET, pBluescript	L09136	pMB1 copy-up type, pMB1 type, pMB1 copy-up type	-	-	<i>Escherichia</i>
Not assigned	pACYC148	X06403	p15A type	-	-	<i>Escherichia</i>
Not assigned	pBBR1MCS (<i>Bordetella bronchiseptica</i>)	NC_025015	pBBR1 Rep	MOB _V	-	<i>Proteobacteria</i>
Not assigned	pSC101 (<i>Salmonella enterica</i>)	NC_002056	RepA	MOB _Q	-	<i>Salmonella, Escherichia</i>
Not assigned	pABC1 (<i>Rhizobium etli</i>)	KY031728	p42b RepC	-	-	<i>Rhizobiales</i>
Not assigned	pME6041 (<i>Pseudomonas</i> sp.)	AF118812	pVS1 RepA	-	-	<i>Proteobacteria</i>

^a Several Inc. groups are identical; e.g. IncG= IncU.

^b Representative plasmids are listed based on Lawley *et al.*, 2004.

^c Accession numbers in National Center for Biotechnology Information (NCBI) GenBank and RefSeq (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Seqin/acc.html>) and Wellcome Sanger Institute (prefix "NCTC" <https://www.sanger.ac.uk/resources/downloads/plasmids>).

^d Names of replication initiation protein (RIP). "NA" indicates that the nucleotide sequences of the plasmid are not available.

^e Classification of MOB classes and MPF types is based on Smillie *et al.*, 2010 and Guglielmini *et al.*, 2014. "-" indicates that the genes involved in conjugation have not been detected, whereas "NA" indicates that the nucleotide sequences of the plasmid are not available.

^f Plasmid host range determined based on genome sequencing projects (hosts in which a plasmid has been found) and/or filter mating assays.

^g Original hosts are unknown because exogenous plasmid capturing was used.

1-5. 接合伝達を制御する因子

プラスミドの接合伝達の詳細な分子メカニズムが明らかになるにつれて、その接合伝達を制御する因子についても様々な研究がなされてきた。接合伝達に作用する因子として、様々な遺伝因子や外的因子が存在することが知られている。本項では接合伝達に影響を及ぼす因子として (1) 宿主由来の遺伝因子、(2) プラスミド由来の遺伝因子、および (3) 外的因子について、既知の例を示す。

(1) 宿主由来の遺伝因子

狭宿主域プラスミドである F プラスミド上の接合伝達関連遺伝子群は、供与菌宿主染色体由来の転写制御因子による制御を受けることが知られている (Fig. 1-6)。例えば、*tra* オペロン上流の P_Y プロモーターは、宿主由来の転写制御因子 ArcA およびプラスミド上の転写制御因子 TraJ により正に制御されている。*traJ* の P_J プロモーターは、宿主由来の cyclic AMP receptor protein (Crp) や leucine-responsive regulatory protein (Lrp) といった宿主の栄養状態に応答する因子、核様体タンパク質 H-NS 等により制御されていることが知られている [Wong *et al.*, 2012]。

また、受容菌宿主の有する外来遺伝子に対する防御応答機構がプラスミドの接合伝達に作用していることも知られている。宿主は外来遺伝子の侵入に対する機構として、DNA 分解酵素である制限修飾系 (restriction endonuclease) およびメチル化により DNA を分解から保護するメチル基転移酵素 (methyltransferase) を有しており、これらがプラスミドの伝播を制御し、宿主とプラスミドの相性に影響することが知られている [Vasu and Nagaraja, 2013; Roberts *et al.*, 2015]。また、外来遺伝子に対する獲得免疫機構である clustered regularly interspaced short palindromic repeat (CRISPR) および隣接する CRISPR-associated 遺伝子群 (*cas*) による CRISPR/Cas システムもプラスミドの伝播に作用し、F プラスミドの接合伝達は type-I CRISPR/Cas システムによる制御を受けることが知られている。[Westra *et al.*, 2013; Richter *et al.*, 2014]。この他にも、ssDNA の侵入により宿主の SOS 応答が誘導される例も知られている [Petrova *et al.*, 2009; Baharoglu *et al.*, 2010]。

Pseudomonas putida において窒素源の取り込みに関わるリン酸基転移系 (PTSNtr) 構成遺伝子である *ptsO* が受容菌内でプラスミド NAH7 [Dunn and Gunsalus, 1973; Sota *et al.*, 2006] の *E. coli* からの接合伝達の阻害に関与していることも示唆されている [Inoue *et al.*, 2013]。さらに、腸球菌の *Enterococcus faecalis* では、受容菌が培養液中に産生するペプチドフェロモンがプラスミド pCF10 上にコードされた凝集物質の発現を誘導し、供与菌と受容菌で安定な凝集塊を形成することで接合伝達頻度を向上させるといった機構が存在する [Mori *et al.*, 1988; Dunny, 2007; Bhatti *et al.*, 2015]。

上述のような宿主由来の作用因子が多数報告されている一方で、大腸菌間での IncW・IncF 群プラスミドの接合伝達において、遺伝子破壊株ライブラリーを受容菌として用いた網羅的な接合伝達実験の結果、接合伝達に必要な不可欠な受容菌因子は存在しないと結論付けている報告もある [Pérez-Mendoza and de la Cruz, 2009]。

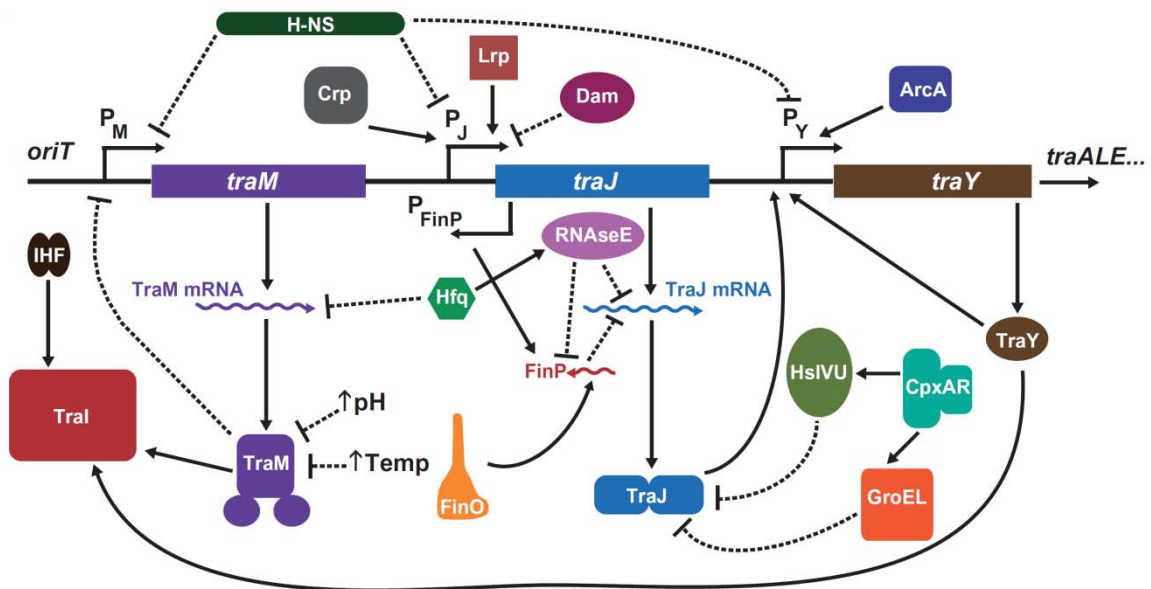


Fig. 1-6. Fプラスミドの接合伝達制御因子 [Wong et al., 2012のFig. 1Aより引用]

Fプラスミドの*tra*オペロン制御の概要を示す。正の制御は実線矢印で示し、負の制御は点線で示している。*tra*オペロン上流の P_Y プロモーターは、宿主由来の転写制御因子ArcAおよびプラスミド上の転写制御因子TraJにより正に制御され、*traJ*の P_J プロモーターはcyclic AMP receptor protein (Crp) やleucine-responsive regulatory protein (Lrp)、核様体タンパク質などにより制御されている。プラスミド由来のRNAシャペロンFinOおよび*traJ* mRNAのanti-sense RNAであるFinPによる*traJ*の翻訳抑制機構なども存在する。

(2) プラスミド由来の遺伝因子

広宿主域プラスミドについては、Fプラスミドとは異なり、宿主由来の遺伝因子の影響は受けないと考えられており、プラスミド RP4 (IncP) において複製・分配・接合伝達の遺伝子はプラスミド由来の KorA、KorB、KorC、TrbA によって制御されている [Frost and Koraimann, 2010]。また、プラスミド R388 においても同様の機構が存在し、プラスミド上の転写制御因子による制御が行われていることが明らかになっている (Fig. 1-7) [Fernández-López and de la Cruz, 2014]。

また、プラスミド間で作用する機構として、Fプラスミド保持株への他のプラスミドの侵入を防ぐ entry/surface exclusion システムや、二種のプラスミドが宿主内で共存する際に互いの接合伝達を制御する fertility inhibition システム (Fig. 1-8) なども存在している [Frost and Koraimann, 2010; Wong *et al.*, 2012]。

さらに、トキシンアンチトキシン (toxin-antitoxin: TA) システムが二種のプラスミドの共存に影響を及ぼす例も知られている。TA システムは近接した遺伝子座から共発現するトキシンおよびアンチトキシンからなるシステムであり、通常アンチトキシンの発現あるいは機能を制御している。しかし、ストレス等に応答してアンチトキシンが減少すると、トキシンが増殖阻害や細胞死を引き起こす (post-segregational killing: PSK)。プラスミド上にコードされた TA システムが、この機構により同じ不和合性群に属する他のプラスミドの安定な保持を阻害する機構の存在が知られている (Fig. 1-9) [Van Melderen and Saavedra De Bast, 2009]。

(3) 外的因子 (非生物的因子)

プラスミドの伝達を制御することを目的として、接合伝達に作用する外的因子 (非生物的因子) の探索も行われている。性線毛の細菌への接着を阻害する pilus blockers として chlorpromazine [Mándi and Molnár, 1981] や Zn^{2+} [Ou, 1973] などが知られている。バクテリオファージ [Lin *et al.*, 2011] も性線毛の接着阻害に寄与することが知られており、これらは、conjugation inhibitors (COINs) と呼ばれている。COINs は細菌の生育自体に影響を及ぼすものやプラスミド特異性が高いものが多く報告されてきたが、細菌の生育やプラスミドの安定性には影響を及ぼさない COINs として 2-hexadecynoic acid およびその誘導体が IncF、IncW、IncH 群プラスミドの接合伝達を阻害することも明らかになっている [Getino *et al.*, 2015, 2016]。

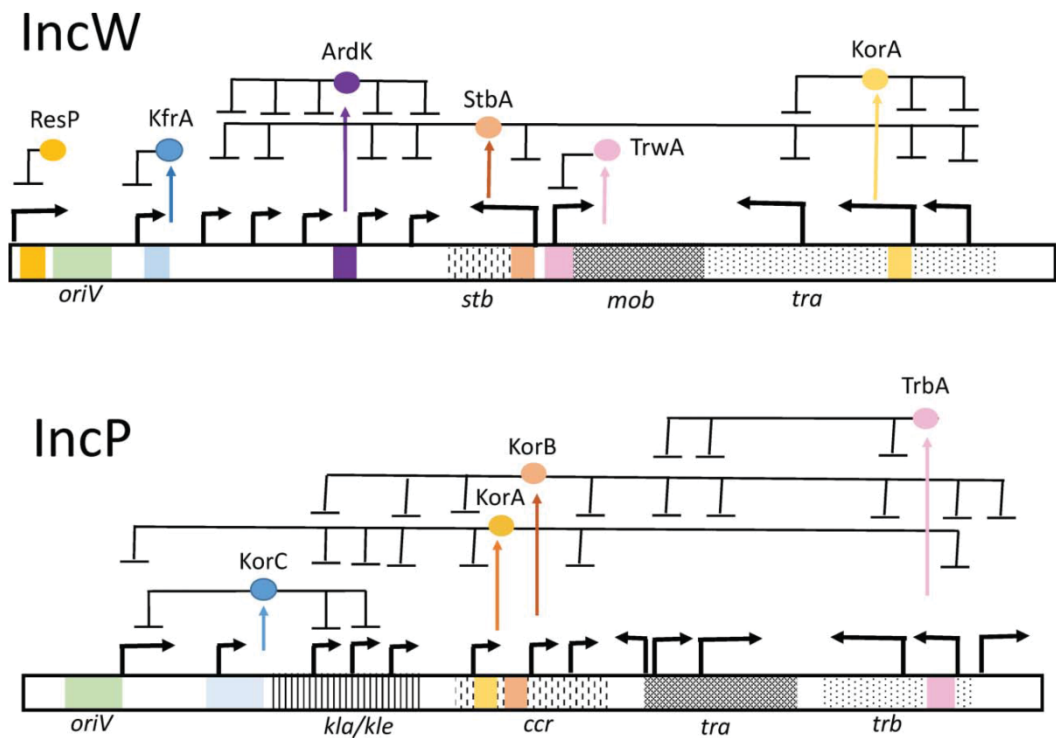


Fig. 1-7. IncWおよびIncP群プラスミド上の遺伝子の転写制御 [Fernandez-Lopez and de la Cruz, 2014のFig. 1より引用]

IncWおよびIncP群プラスミド上の遺伝子の転写制御因子を示す。四角内の各色付された部分に各転写制御因子がコードされている。黒矢印はプラスミドゲノム上のプロモーターの位置を示している。プラスミド骨格を形成している主要な遺伝子を斜体で示している。IncW群プラスミドの*oriV*はプラスミドの複製起点、*stb*は*stbABC*からなるstability operonを、*mob*および*tra*は接合伝達関連遺伝子群を示している。IncP群プラスミドの*oriV*はプラスミドの複製起点、*kla/kle*および*ccr*は*kil-kor*レギュロンを、*tra*および*trb*は接合伝達関連遺伝子群を示している。

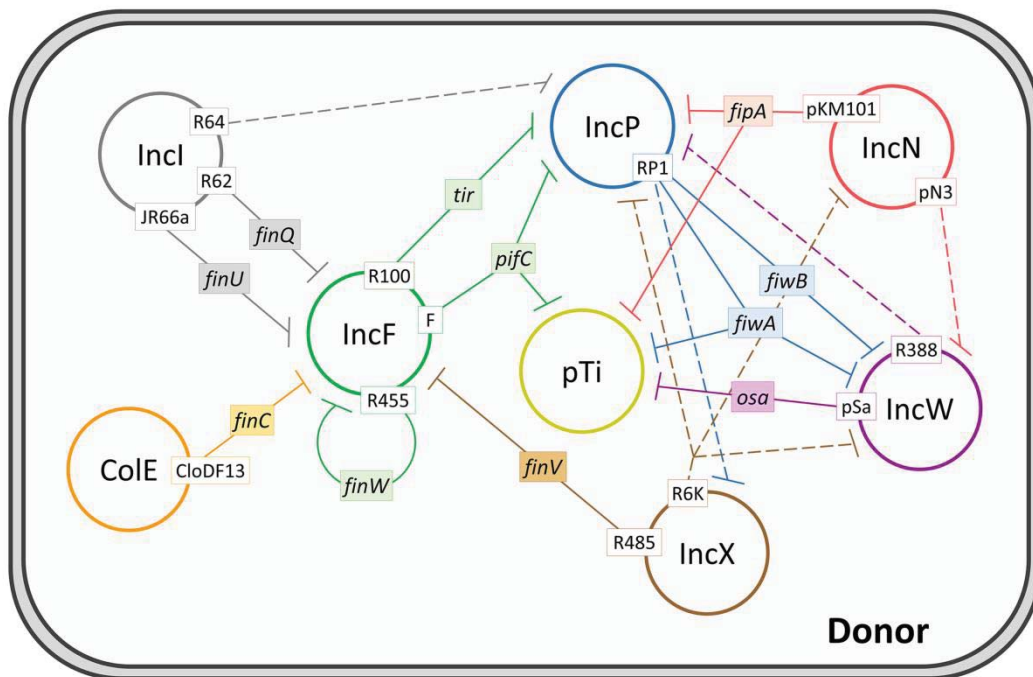


Fig. 1-8. プラスミド間のfertility inhibitionネットワーク [Getino *et al.*, 2018のFig. 3より引用]
 プラスミドの不和合性群を円の中に示している。実線は白い四角に示すプラスミドについて、線上に示す因子を介したfertility inhibitionシステムが存在することを表している。点線は白い四角に示すプラスミドについて、未知因子によるfertility inhibitionシステムが存在することを表している。

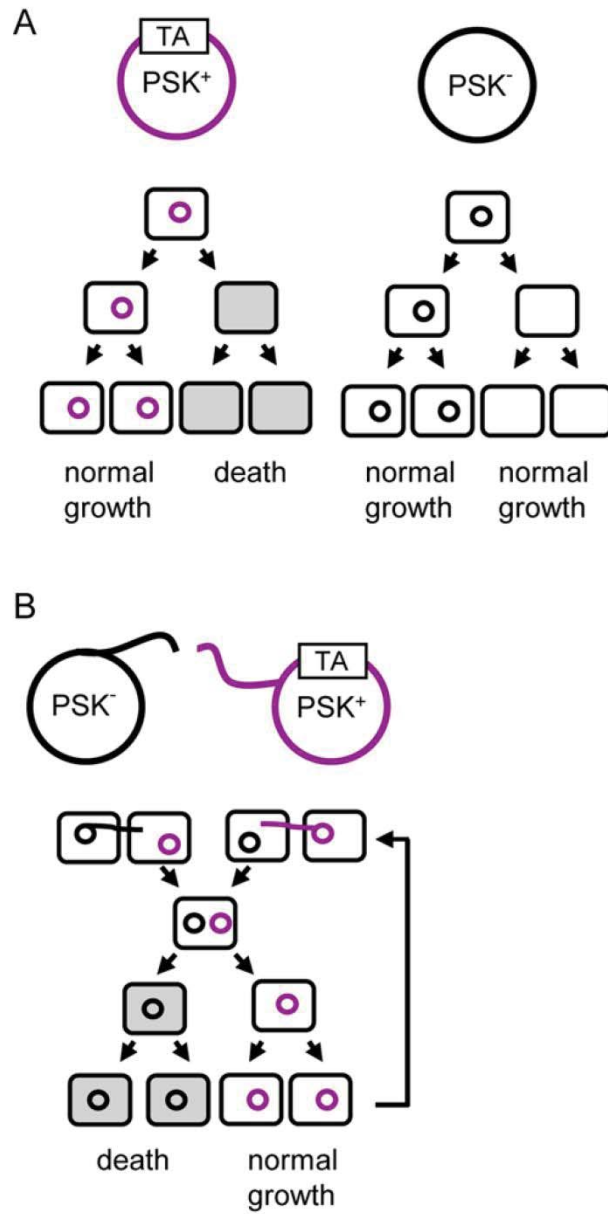


Fig. 1-9. プラスミド上のTAシステムによるpost-segregational killing (PSK) 機構 [Van Melderen and Saavedra De Bast, 2009のFig. 1より引用]

(A) 細胞分裂の際にプラスミドが安定に維持されずに脱落した菌株が出現すると、不安定な antitoxinは分解されるのに対して、安定なtoxinのみが菌体中に残る。細胞内に残ったtoxinは増殖を阻害し、場合によっては細胞死を引き起こす (post-segregational killing) ことが知られている。(B) 同じ不和合性群に属する二種のプラスミドが同一の細胞内に共存したのち、細胞分裂により生じたTAシステムを持たないプラスミドのみが保持された細胞では、PSK機構により細胞死が生じる。

1-6. 本研究の目的と内容

プラスミドの寄与する生物の進化・適応機構の理解やプラスミドの接合伝達の実応用技術の開発を見据えると、多様な環境条件下でのプラスミドの振る舞いを理解・制御するための知見が重要となる。

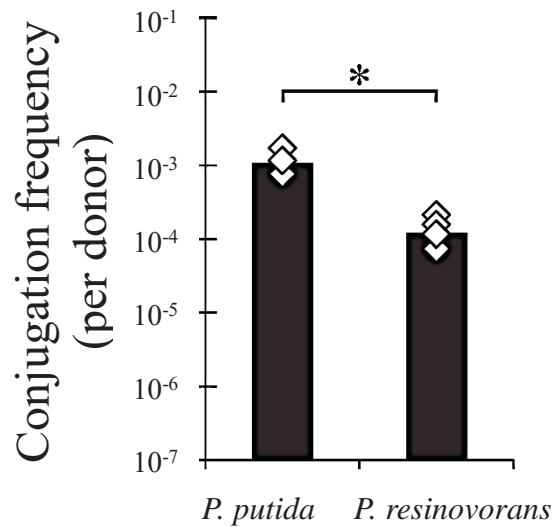
1-5 に記したプラスミドの接合伝達を制御する生物的・非生物的因子に加えて、プラスミドの挙動に影響を及ぼす環境要件としては、これまでに温度や pH、栄養源、塩ストレス、湿度などの影響が報告されてきた [Verma *et al.*, 2002; Beuls *et al.*, 2012, Viljanen and Boratynski, 1991; van Elsas *et al.*, 2000; Aminov, 2011]。また、所属研究室においても、菌密度や液体中あるいは固体培地上といった接合状態の違いがプラスミドの接合伝達頻度に影響を与えること [Yanagida *et al.*, 2016; 補章 1] などが明らかにされていた。

上述のようなプラスミドの接合伝達への作用が示唆される多様な環境要件について、従来の研究においてその詳細な作用機序に踏み込む解析は、実験系が複雑になるために行われてこなかった。しかし、プラスミドの実環境中での挙動理解・制御を目指した基盤情報の拡充には、環境要件の作用する原因因子を明らかにする実験系の構築および因子の作用機序の解析が必要であると考えられた。そこで本研究では、環境要件がプラスミドの接合伝達に影響を及ぼす作用機序の解明を目指した。様々な環境要件の中でも、本研究では特に細菌の共存および培地成分に着目した。

近年の多様な環境下でのメタゲノム解析からも示唆されるように、環境中では複数種の菌が共存しており、単一の細菌種のみからなる自然環境は存在しない。さらに、環境中では種を超えた多様な相互作用により微生物共生系のネットワークが構築されていることも示唆されており、細菌集団中でのプラスミドの挙動理解が重要となる。先行研究において、細菌集団中の接合伝達における一つの供与菌の周囲に複数種の受容菌候補がいる条件の最小単位となるモデル環境として、一つの供与菌に対し二種の受容菌株候補がいる場合を想定した接合実験が行われた。供与菌としては *P. putida* SM1443 株 [Chistensen *et al.*, 1998] のプラスミド保持株が、受容菌としては *P. putida* KT2440 株 [Nelson *et al.*, 2002] および *Pseudomonas resinovorans* CA10dm4 株 [Shintani *et al.*, 2006] が混合して用いられた。モデルプラスミドとしては、pCAR1 (IncP-7) [Ouchiyama *et al.*, 1993; Nojiri *et al.*, 2001; Maeda *et al.*, 2003] および NAH7 が用いられた。その結果、プラスミド pCAR1 は二種の受容菌候補が同時に存在する条件下でそれぞれの受容菌へ同程度の頻度で接合伝達したのに対し、NAH7 は *P. resinovorans* への接合伝達が見られず *P. putida* のみへ接合伝達するという現象が見られていた (Fig. 1-10) [新谷ら, 2012]。

また、プラスミドの接合伝達に影響を及ぼす培地成分として、先行研究において、環境試料中での含窒素芳香族化合物カルバゾール分解プラスミド pCAR1 の挙動評価および成分分析が行われ、接合伝達体が出現しなかった試料 (リン酸系バッファー系) と比較して出現した河川水や湖沼水では Cl^- 、 SO_4^{2-} 、 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} および Fe^{2+} が存在するという結果が得られて

pCAR1 → *P. putida* and *P. resinovorans*



NAH7 → *P. putida* and *P. resinovorans*

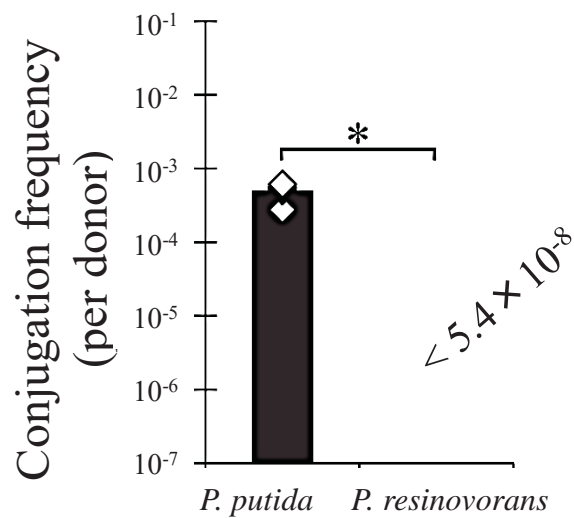


Fig. 1-10. 二種の受容菌の存在下でのプラスミドの接合伝達頻度 [新谷ら, 2012のFig. 1より一部改変して引用]

P. putida SM1443株を供与菌とし、*P. putida* KT2440株および*P. resinovorans* CA10dm4株を受容菌としたプラスミドpCAR1とNAH7の接合伝達頻度を示す。1/2LB培地を用い、3時間の接合条件で行った。◇は5連それぞれの値を示し、*は有意差 ($P < 0.05$)を示す。

いた。さらに、リン酸系バッファーに Ca^{2+} および Mg^{2+} を添加したモデル環境下で接合伝達体が出現したことから、pCAR1 の接合伝達にはこれらの二価カチオンが必須であることが示唆されていた [Shintani *et al.*, 2008a]

本研究ではこれらの現象に着目し、現象の一般性の評価と原因因子の同定を目的とした。第 2 章では複数の受容菌候補の存在下でのプラスミドの挙動評価について、現象の詳細な理解を目指し、異なる不和合性に属する四種のプラスミド pCAR1、NAH7、pB10 (IncP-1 β) [Schlüter *et al.*, 2003]、R388 および上述の二種の宿主 (*P. putida* および *P. resinovorans*) を用いて、受容菌が一種の接合 (1:1 接合) および受容菌が二種の接合 (1:2 接合) 条件下における各プラスミドの挙動を比較し、複数種の受容菌候補が存在する場合のプラスミドの受容菌選択性について評価を行った。さらに、菌体凝集の影響や培養上清中の作用因子の存在の有無についても検証を行った。以降は、第 2 章で明らかにしたプラスミドの受容菌選択性について、NAH7 が *P. putida* を供与菌とした 1:2 液体接合条件下で *P. resinovorans* へほとんど接合伝達しない現象に着目して、更なる解析を行った。

第 3 章では、複数の受容菌候補の存在下での受容菌選択に寄与する宿主由来の因子の探索を目的として、BAC ライブラリーを用いた網羅的な因子探索を行った。また、作用が示唆された外膜タンパク質 outer membrane protein H1 (OprH) について、タンパク質間相互作用解析から作用原理の推定を行った。さらに、性線毛との相互作用評価から、受容菌選択のターゲットとなる外膜構成因子の探索も行った。

第 4 章では受容菌選択に寄与するプラスミド由来の因子の探索を目的として、トランスポゾン (Tn5) 挿入遺伝子破壊株ライブラリーを用いたスクリーニングを行った。また、NAH7 と同じ IncP-9 群に属するプラスミド pWW0 の挙動評価を行った。

さらに、第 5 章では、プラスミドの接合伝達に影響を及ぼす培地成分について、プラスミド pCAR1 の接合伝達における二価カチオン要求性に着目し、様々なプラスミドにおける二価カチオン要求性の評価、およびトランスクリプトーム解析からの作用因子の同定・関与の実証を行った。

第2章

複数種の受容菌候補の存在がプラスミドの接合伝達に 及ぼす影響の評価

2-1. 緒言

本章では、複数の受容菌候補の存在下でプラスミドが受容菌を選択する現象の一般性の評価を目的とし、用いるプラスミドや宿主の種類および実験条件がこの現象に与える影響を評価した。異なる Inc 群に属する4種類のプラスミド pCAR1 (IncP-7)、NAH7 (IncP-9 ζ)、pB10 (IncP-1 β) および R388 (IncW) をプラスミドのモデルとして、*P. putida* KT2440 もしくは *P. resinovorans* CA10dm4 を宿主のモデルとして用いた。また、プラスミドは液体中と固体表面上では挙動が異なることが知られている [Ehlers and Bouwer, 1999; Yanagida *et al.*, 2016] ため、4種類のプラスミドについて液体中および、固体培地上でのフィルター接合実験を行い、挙動の比較を行った。

また、接合伝達に影響を与える要因の一つとして菌体凝集が知られており、菌体凝集に必要な IV 型線毛を破壊した株において接合伝達頻度が低下するという報告もある [Reniero *et al.*, 1992; La Rosa *et al.*, 2016]。そこで、接合液中での菌体凝集の様子を共焦点顕微鏡で観察し、菌体凝集が 1:2 接合に及ぼす影響を評価した。さらに、腸球菌において受容菌が培養液中に産生するペプチドフェロモンが接合伝達頻度を向上させる機構が知られている [Mori *et al.*, 1988; Clewell, 2007; Dunny 2007]。このため、受容菌 *P. putida* が培養液中に産生する物質が *P. resinovorans* への接合伝達に影響を与える可能性についても検討した。

2-2. 材料と方法

2-2-1. 使用した菌株およびプラスミド

本章で使用した菌株およびプラスミドを Table 2-1 に示す。菌株およびプラスミドの保持の確認はそれぞれの菌株およびプラスミドに特異的な遺伝子配列を PCR で増幅することで行った。本章で使用したプライマーを Table 2-2 に示す。

2-2-2. 使用した培地および培養条件

本章で使用した LB 培地 [Sambrook and Russell, 2001] および CF buffer [Shintani *et al.*, 2005a] の組成を Table 2-3 および Table 2-4 に、培地に添加した試薬およびその終濃度を Table 2-5 に示す。固体平板培地 (プレート) を作製する際には細菌培養用の精製寒天末 (ナカライテスクジャパン) を終濃度 1.6% (w/v) となるように添加した。以降、LB 培地に試薬を添加した培地を LB+(試薬の略称) と表記する。培養温度は特に明記しない限り、大腸菌については 37°C、その他の菌株については 30°C で行った。試験管による振盪培養は 300 stroke/min、三角フラスコによる培養は 120 rpm で行った。

2-2-3. コロニーハイブリダイゼーション

詳細な手順は補章 3「S3-9. コロニーハイブリダイゼーション」に示し、ここでは概要のみを記述する。供与菌として *P. putida* SM1443(pCAR1::*rfp*)、受容菌として *P. putida* KT2440RGdr および *P. resinovorans* CA10dm4RGgfp を用いた 1:2 接合実験について、GFP 蛍光の有無による 2 種の受容菌の区別の妥当性の確認を行った。接合伝達体検出プレート上に生育したコロニーの GFP 蛍光の有無をダークリーダーによって確認した後、コロニーをナイロンメンブレンに転写し、*P. putida*、*P. resinovorans*、プラスミド pCAR1 検出用の DIG 標識をしたプローブを用いてハイブリダイゼーションによる検出を行った。それぞれ特異的な *P. putida* 染色体上の *parI*、*P. resinovorans* 染色体上の PCA10_13490、プラスミド pCAR1 上の *repA* の配列をプローブ配列として使用した。Table 2-2 に示すプライマーセットで増幅した DNA 断片を TA クローニングにより pT7blue-T-vector に挿入し、増幅配列上に変異が導入されていないことを確認した後、制限酵素処理により取得した DNA 断片をゲルから切り出してプローブ調製のテンプレートとして用いた。切り出した断片を DIG 標識することでプローブを調製した。

2-2-4. 接合実験 (液体接合)

詳細な実験操作は補章 3「S3-10. 接合実験 (液体接合)」に示し、ここでは概要のみを示す。染色体上に *lacI^R* 遺伝子の導入された *P. putida* SM1443 プラスミド保持株もしくは *P. resinovorans* CA10L プラスミド保持株を供与菌とし、*P. putida* KT2440RGdr および *P. resinovorans* CA10dm4RGgfp を受容菌とした接合実験を行った。プラスミドは Km 耐性遺伝

Table 2-1. 本章で使用した菌株およびプラスミド

Bacterial strain or plasmid	Relevant characteristic(s) ^a	Source or reference
Bacterial strains		
<i>Escherichia coli</i>		
DH5 α	<i>F</i> ⁻ ϕ 80d <i>lacZ</i> Δ M15 Δ (<i>lacZ</i> YA-argF)U169 <i>endA1 recA1 hsdR17</i> (τ_K^- m κ^+) <i>deoR thi-1 supE44</i> λ^- <i>gyrA96 relA1</i>	Toyobo
<i>Pseudomonas putida</i>		
KT2440RGdr	Derivative strain of KT2440, spontaneous Rif ^r , with <i>Gm'</i> and <i>DsRed</i> gene inserted into the chromosome	新谷ら、2012
SM1443	Derivative strain of KT2440 with <i>lacI^q</i> cassette inserted into the chromosome	Christensen <i>et al.</i> , 1998
SM1443(NAH7K2)	SM1443 harboring NAH7K2, Km ^r	Yanagida <i>et al.</i> , 2016; 補章 1
SM1443(pB10:: <i>rfp</i>)	SM1443 harboring pB10:: <i>rfp</i> , Km ^r	De Gelder <i>et al.</i> , 2005
SM1443(pCAR1:: <i>rfp</i>)	SM1443 harboring pCAR1:: <i>rfp</i> , Km ^r	Shintani <i>et al.</i> , 2008b
SM1443(R388:: <i>rfp</i>)	SM1443 harboring R388:: <i>rfp</i> , Km ^r	Yanagida <i>et al.</i> , 2016; 補章 1
<i>Pseudomonas resinovorans</i>		
CA10dm4RG	Derivative strain of CA10dm4, spontaneous Rif ^r , with <i>Gm'</i> gene inserted into the chromosome	Shintani <i>et al.</i> , 2005b
CA10dm4RGgfp	Derivative strain of CA10dm4, spontaneous Rif ^r , with <i>Gm'</i> gene and <i>gfp</i> gene inserted into the chromosome	新谷ら、2012
CA10L	Derivative strain of CA10dm4 with <i>lacI^q</i> and <i>Tc'</i> gene inserted into the chromosome	Shintani <i>et al.</i> , 2010
CA10L(NAH7K2)	CA10L harboring NAH7K2, Km ^r	Sakuda <i>et al.</i> , 2018b; This study
CA10L(pB10:: <i>rfp</i>)	CA10L harboring pB10:: <i>rfp</i> , Km ^r	Sakuda <i>et al.</i> , 2018b; This study
CA10L(pCAR1:: <i>rfp</i>)	CA10L harboring pCAR1:: <i>rfp</i> , Km ^r	Shintani <i>et al.</i> , 2010
CA10L(R388:: <i>rfp</i>)	CA10L harboring R388:: <i>rfp</i> , Km ^r	Sakuda <i>et al.</i> , 2018b; This study

Table 2-1 の続き 本章で使用した菌株およびプラスミド

Bacterial strain or plasmid	Relevant characteristic(s) ^a	Source or reference
Plasmid		
NAH7K2	Naphthalene-degradative plasmid, IncP-9 group, with <i>Km^r</i> gene cassette, <i>Km^r</i>	Ono <i>et al.</i> , 2007
pB10:: <i>rfp</i>	Antibiotic resistance plasmid, IncP-1 group, with <i>Km^r</i> gene and <i>rfp</i> cassette, <i>Km^r</i>	De Gelder <i>et al.</i> , 2005
pCAR1:: <i>rfp</i>	Carbazole-degradative plasmid, IncP-7, with <i>Km^r</i> gene and <i>rfp</i> cassette, <i>Km^r</i>	Shintani <i>et al.</i> , 2008b
pT7Blue T-vector	<i>lacZ</i> , <i>Ap^r</i>	Novagen
R388:: <i>rfp</i>	Antibiotic resistance plasmid, IncW group, with <i>Km^r</i> gene and <i>rfp</i> cassette, <i>Km^r</i>	Yanagida <i>et al.</i> , 2016; 補章 1

^a *Ap^r*, *Tc^r*, *Km^r*, *Gm^r*, *Rif^r* はそれぞれ ampicillin (100 µg/mL)、tetracycline (12.5 µg/mL)、kanamycin (50 µg/mL)、gentamicin (30 µg/mL)、rifampicin (25 µg/mL) への耐性を持つことを示す。

Table 2-2. 本章で使用したプライマー

Primer name	Sequence	Source or reference
pCAR1 保持の確認; <i>repA</i> 増幅		
probe08-F	TTGGGATTTACGGGACTGCT	Shintani <i>et al.</i> , 2008a
probe08-R	TCGGATGCCTATCAACGATT	Shintani <i>et al.</i> , 2008a
NAH7 保持の確認; <i>rep</i> 増幅		
NAH7rep-F	AAGAGCTGGTCACGAAGCAT	Takahashi <i>et al.</i> , 2015
NAH7rep-R	ATCGACACCATCCAACGATT	Takahashi <i>et al.</i> , 2015
pB10 保持の確認; <i>trfA</i> 増幅		
trfA(pBP136)-F	CGGTACTTCTCCCACACGAA	柳田, 2015
trfA(pBP136)-R	CGAGTTCAACGAGCACGAAT	柳田, 2015
R388 保持の確認; <i>repA</i> 増幅		
repA(R388)-F	GCTGGCTTAGTCGGCTACAT	柳田, 2015
repA(R388)-R	GCCTCGGGATAGACAATCAA	柳田, 2015
<i>P. putida</i> の確認; <i>parI</i> 増幅		
PP3700-FNdeI	CATATGTCCCCATTAGCCGCTGC	Miyakoshi <i>et al.</i> , 2007
PP3700-RXbaI	TCTAGACTATAGACGCAGATCAAC	Miyakoshi <i>et al.</i> , 2007
<i>P. resinovorans</i> の確認; PCA10_13490 増幅		
PCA10_13490-F	GCCTACAAGTTCACCGACCA	This study, Sakuda <i>et al.</i> , 2018b
PCA10_13490-R	GTCCTTGTACTTGCGGTCCA	This study, Sakuda <i>et al.</i> , 2018b

Table 2-3. LB 培地の組成

LB medium	
Bacto tryptone	10 g
Yeast extract	5 g
NaCl	10 g
	per liter

Table 2-4. CF buffer の組成

CF buffer	
Na ₂ HPO ₄	2.2 g
KH ₂ PO ₄	0.8 g
NH ₄ NO ₃	3.0 g
	per liter

Table 2-5. 本章で培地に添加した抗生物質

添加物	略称	終濃度	ストック濃度	溶媒
Ampicillin	Ap	100 µg/mL	100 mg/mL	H ₂ O
Gentamicin	Gm	30 µg/mL	30 mg/mL	H ₂ O
Kanamycin	Km	50 µg/mL	50 mg/mL	H ₂ O
Rifampicin	Rif	25 µg/mL	25 mg/mL	MeOH
Tetracycline	Tc	12.5 µg/mL	25 mg/mL	50% EtOH

子の挿入された pCAR1::*rfp*、NAH7K2、pB10::*rfp*、R388::*rfp* の 4 種類を用いた。本章で使用した 4 種類のプラスミドの特徴を Table 2-6 に示す。各プラスミドについて 1:1 接合および 1:2 接合実験を行い、プラスミドの挙動の比較を行った。接合実験系の概要を Fig. 2-1 に示す。菌体濁度を、供与菌は OD₆₀₀ = 0.2、受容菌は OD₆₀₀ = 2.0 となるようにそれぞれ調整した。それらを 200 μL ずつ混合して 30°C で 3 h 静置培養した後、培養液を 10⁰~10⁶倍希釈し選択培地に 10 μL ずつをスポット、もしくは 100 μL をスプレッドした。選択培地は、供与菌検出のために LB+(Km) プレート、受容菌検出のために LB+(Gm、Rif) プレートを、接合伝達体検出のために LB+(Km、Gm、Rif) プレートをを用いた。生育したコロニー数から colony forming unit (CFU) /mL を算出し、接合伝達体数を供与菌数で割ることで接合伝達頻度を算出した。

また、受容菌の共存がプラスミドの接合伝達へ及ぼす影響評価の指標として、kin index (KI) 値を次のように定義した。

$$KI = r_{1:2}/r_{1:1},$$

$r_{1:2}$ = “1:2 接合時の 異種 への接合伝達頻度/1:2 接合時の 同種 への接合伝達頻度”

$r_{1:1}$ = “1:1 接合時の 異種 への接合伝達頻度/1:1 接合時の 同種 への接合伝達頻度”

KI はプラスミドの接合伝達が受容菌の共存の影響を受けない場合には KI = 1 となる。それに対し、1:2 接合時に受容菌の共存により 異種 へ伝達しやすくなる場合には KI > 1 となり、同種 へ伝達しやすくなる場合には KI < 1 となる。

2-2-5. *P. resinovorans* CA10L(NAH7K2)、*P. resinovorans* CA10L(pB10::*rfp*) および *P. resinovorans* CA10L(R388::*rfp*)の作製

P. resinovorans を供与菌とした接合実験を行うにあたり、*P. resinovorans* CA10L(NAH7K2)、*P. resinovorans* CA10L(pB10::*rfp*)および *P. resinovorans* CA10L(R388::*rfp*)を作製した。各保持プラスミド上に Km 耐性遺伝子の挿入されている *P. putida* SM1443(NAH7K2)、*P. putida* SM1443(pB10::*rfp*)および *P. putida* SM1443(R388::*rfp*)を供与菌、Rif 自然耐性および Gm 耐性遺伝子を染色体上に有する *P. resinovorans* CA10dm4RG を受容菌とした接合時間 3 h の液体接合を行い、Km 耐性、Gm 耐性および Rif 耐性を保持した接合伝達体を取得した。次に、上述の接合により取得した *P. resinovorans* CA10dm4RG(NAH7K2)、*P. resinovorans* CA10dm4RG(pB10::*rfp*)および *P. resinovorans* CA10dm4RG(R388::*rfp*)を供与菌とし、染色体上に Tc 耐性遺伝子および *lacP* 遺伝子の挿入された *P. resinovorans* CA10L を受容菌とした 3 h の液体接合を行った。各プラスミド上には Km 耐性遺伝子が、*P. resinovorans* CA10L 染色体上には Tc 耐性遺伝子が導入されているため、接合伝達体は Km 耐性および Tc 耐性を持つことを利用して、抗生物質による選抜により接合伝達体を取得した。取得した株をそれぞれ *P. resinovorans* CA10L(NAH7K2)、*P. resinovorans* CA10L(pB10::*rfp*)および *P. resinovorans* CA10L(R388::*rfp*)とした。

Table 2-6. 本研究で使用した4種類のプラスミド

	pCARI	NAH7	pB10	R388
Size (bp)	200,231	82,232	64,508	33,913
Inc group	IncP-7	IncP-9 ζ	IncP-1 β	IncW
MOB class ^a	MOB _H	MOB _F	MOB _P	MOB _F
T4SS type ^b	MPF _F	MPF _T	MPF _T	MPF _T
Original host	<i>P. resinovorans</i> CA10	<i>P. putida</i> G7	Unidentified bacteria in a waste-water treatment plant	<i>E. coli</i>
Notes	Carbazole-degradative plasmid	Naphthalene-degradative plasmid	Antibiotic-resistance plasmid	Antibiotic-resistance plasmid
Reference	Nojiri <i>et al.</i> , 2001; Maeda <i>et al.</i> , 2003	Sota <i>et al.</i> , 2006	Schlüter <i>et al.</i> , 2003	Fernández-López <i>et al.</i> , 2006
Derivatives used in this study (Km ^r)	pCAR1:: <i>rfp</i> [Shintani <i>et al.</i> , 2008b]	NAH7K2 [Ono <i>et al.</i> , 2007]	pB10:: <i>rfp</i> [De Gelder <i>et al.</i> , 2005]	R388:: <i>rfp</i> [Yanagida <i>et al.</i> , 2016]

^{a, b} MOB class、T4SS type の分類は Garcillán-Barcía ら、Smillie らの総説 [Garcillán-Barcía *et al.*, 2009; Smillie *et al.*, 2010] に基づく。

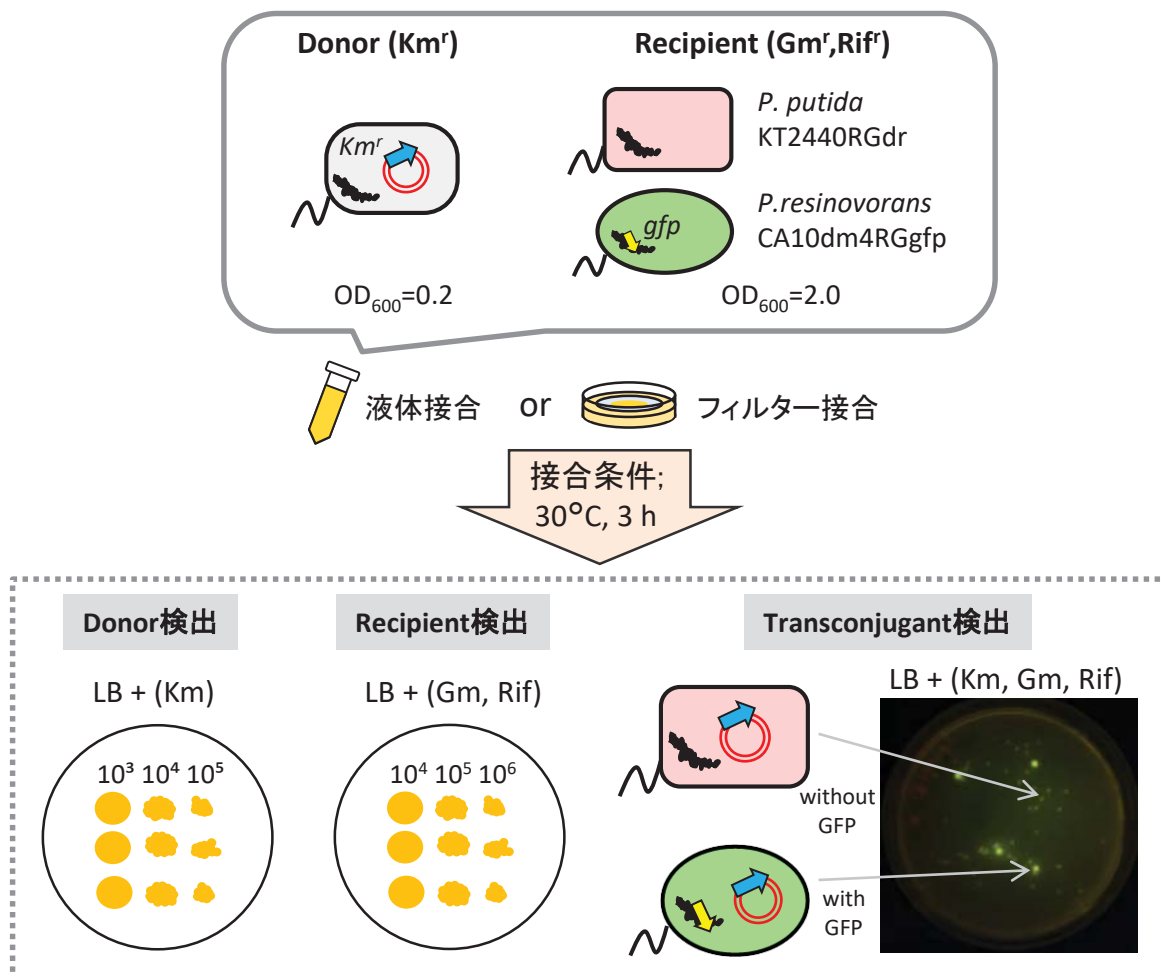


Fig. 2-1. 1:2接合実験系の概要

プラスミド上に挿入された抗生物質耐性遺伝子カセットおよび受容菌の抗生物質耐性を利用して株の選抜を行い、選択培地上に生育したコロニー数から菌数を計数する方法を用いた。2種の接合伝達体は接合伝達体検出プレート上に生育したコロニーのGFP蛍光の有無によって菌株を区別した。

2-2-6. 接合実験 (フィルター接合)

詳細な手順は補章3「S3-11. 接合実験 (フィルター接合)」に示し、ここでは概要のみ記述する。用いた菌株および接合液の調製、各菌株の検出は「2-2-4. 接合実験 (液体接合)」と同様に行った。液体接合と異なる操作を以下に示す。調製した 400 μL の混合液について、菌体を Glass Microanalysis Filter Holders (Millipore) および Filtering Flasks (Millipore) を用いて Isopore™ Membrane Filters (0.2 μm GTBP, Millipore) 上に濾別、捕集し、LB プレート上で 30°C で 3 h 静置した。その後フィルター上の菌体を 400 μL の CF buffer に懸濁し、菌体を回収した。

2-2-7. 菌体凝集観察

接合液を 4',6'-diamidino-2-phenylindole (DAPI) (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) で RT、30 min 染色したサンプル 5 μL をスライドガラス上にのせて観察に供した。観察には共焦点レーザー顕微鏡 (LSM 700 with Airyscan, ZEISS) を用い明視野での観察および DAPI 蛍光、GFP 蛍光の観察を行った。DAPI および GFP の検出の際、レーザーはそれぞれ波長 405 nm、5 mW および波長 555 nm、10 mW を用い、フィルターはそれぞれ SP 555、LP 560 を用いた。各サンプルについて 3 視野以上での観察を行った。解析にはソフトウェア ZEN (ZEISS Efficient Navigation, ZEISS) を用いた。また、菌体凝集のコントロールとして、所属研究室において明らかになっていた *P. putida* の菌体凝集が生じる培養条件を採用し、コハク酸を唯一の炭素源とする培地中で 4 h 振盪培養した *P. putida* KT2440RGdr を観察した。

2-2-8. 培養上清添加接合実験

操作の概要を Fig. 2-2 に示す。*P. putida* SM1443(NAH7K2)を供与菌、*P. resinovorans* CA10dm4RGgfp を受容菌とし、「2-2-4. 接合実験 (液体接合)」と同様の手順で接合実験に供する菌体を調製した。調製した混合液を 13,000 rpm、RT で 1 min 遠心し菌体を回収した。*P. resinovorans* CA10dm4RGgfp の培養液、*P. putida* KT2440RGdr の培養液、*P. putida* SM1443(NAH7K2)および *P. putida* KT2440RGdr を 3 h 接合させた後の接合液の 3 種類の培養上清 400 μL を 0.22 μm 孔径のフィルターでろ過滅菌し、先に調製した菌体に添加した。ピペティングにより上清に菌体を懸濁し、30°C で 3 h 静置培養した。培養後選択培地に生育したコロニー数から CFU/mL を算出後、接合伝達頻度 {接合伝達体数 (CFU/mL) / 供与菌数 (CFU/mL)} を算出した。

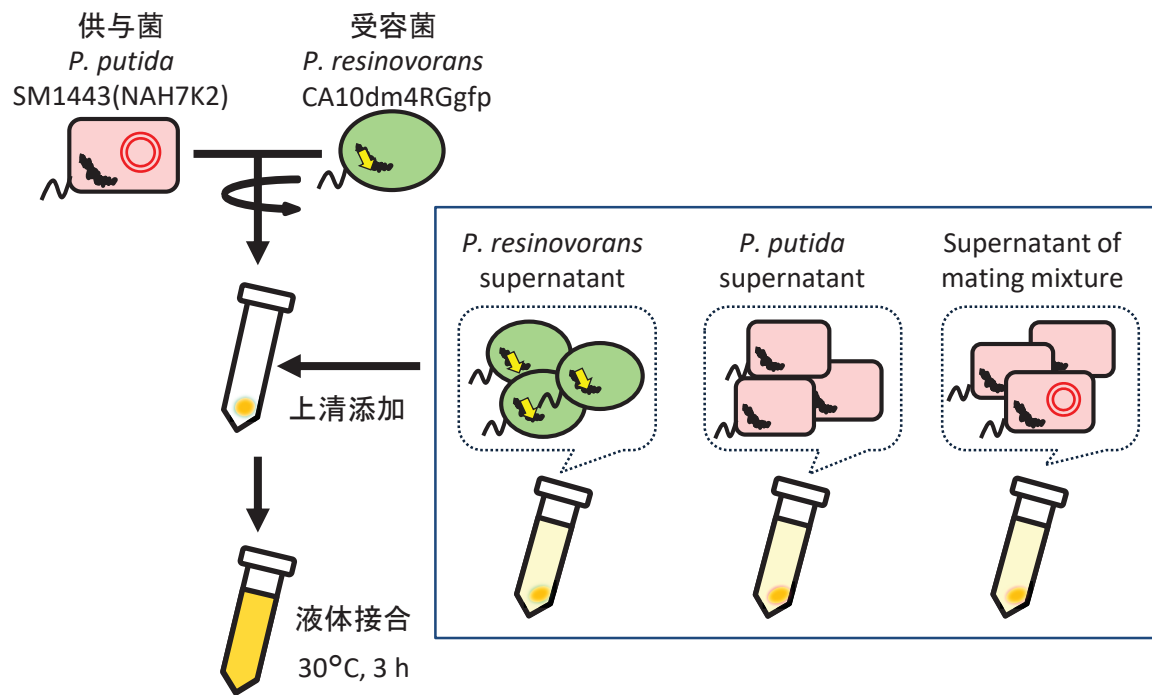


Fig. 2-2. 培養上清を添加した接合実験方法

供与菌として*P. putida* SM1443(NAH7K2)を、受容菌として*P. resinovorans* CA10dm4RGgfpを使用し、培養上清中での接合実験を行った。供与菌および受容菌細胞を遠心により集菌した後、0.22 μm孔径のフィルターでろ過した菌体培養液上清を添加して、30°Cで3 hの液体接合を行った。

2-3. 結果 [修士論文より改変・引用]

2-3-1. 1:2 接合実験系の遺伝子レベルでの評価

接合伝達体の検出の際、1:1 接合時は抗生物質を添加した選択培地を用いるのに対し、1:2 接合においては GFP 蛍光の有無により 2 種の受容菌を区別する (Fig. 2-1)。本実験系における GFP 蛍光の有無による 2 種の受容菌の区別が確からしいことの確認を目的として、コロニーハイブリダイゼーションにより遺伝子レベルで本実験系が適切であることの確認を行った。

本実験は、プラスミド pCAR1 について行った。供与菌として pCAR1::rfp を保持した *P. putida* SM1443、受容菌として *P. putida* KT2440RGdr および *P. resinovorans* CA10dm4RGgfp を使用した 1:2 接合実験を行った。接合伝達体検出プレートに生育したコロニーの GFP 蛍光の有無をダークリーダーによって確認した後、*P. putida*、*P. resinovorans* およびプラスミド pCAR1 検出用のプローブを用いてコロニーハイブリダイゼーションによる検出を行った。

pCAR1 の結果を Fig. 2-3 に示す。pCAR1 検出用のプローブを用いた検出結果より、接合伝達体検出プレート上に生育したコロニーは全てプラスミドを保持していることが確認された。また、コロニーの GFP 蛍光と *P. putida* 検出用のプローブを用いた検出結果より、GFP 蛍光の見られないものが全て *P. putida* であることが確認され、GFP 蛍光と *P. resinovorans* 検出用のプローブを用いた検出結果より、GFP 蛍光の見られるコロニーが全て *P. resinovorans* であることが確認された。以上の結果から、1:2 接合実験系における GFP 蛍光の有無を用いた 2 種の受容菌の区別に問題がないことを確認した。

2-3-2. *P. putida* を供与菌とした液体接合実験

P. putida を供与菌とした液体接合実験の結果を Fig. 2-4 に示す。pCAR1 は 1:1 接合条件下では *P. putida* へ 1.8×10^{-2} 、*P. resinovorans* へは 2.8×10^{-3} の頻度で接合伝達した。また、1:2 接合条件下では、*P. putida* へ 1.1×10^{-3} 、*P. resinovorans* へは 5.5×10^{-4} の頻度で接合伝達した。いずれの接合条件下でもプラスミド pCAR1 は *P. putida* への伝達頻度の方が *P. resinovorans* への伝達頻度と比較して高い傾向が見られた。

NAH7 についても、1:1 接合条件下では *P. putida* へ 3.8×10^{-3} 、*P. resinovorans* へは 2.7×10^{-4} の頻度で接合伝達し、*P. putida* への接合伝達頻度の方がやや高い傾向が見られた。また、1:2 接合条件下では、*P. putida* へ 8.2×10^{-4} の頻度で接合伝達したのに対し、*P. resinovorans* への伝達頻度は 4.4×10^{-8} であり、ほぼ接合伝達しなかった。すなわち、1:1 接合条件下では *P. resinovorans* への接合能を持つにもかかわらず、受容菌の共存下で *P. putida* へ優先して接合伝達し、*P. resinovorans* への接合伝達頻度が顕著に低くなる現象が見られた。

P. putida への伝達頻度の方が *P. resinovorans* への伝達頻度よりも高い傾向は他の 2 種類のプラスミドでも同様であり、pB10 は 1:1 接合条件下では *P. putida* へ 8.4×10^{-3} 、*P. resinovorans* へは 6.7×10^{-3} の頻度で接合伝達し、1:2 接合条件下では *P. putida* へ 2.9×10^{-3} 、*P. resinovorans*

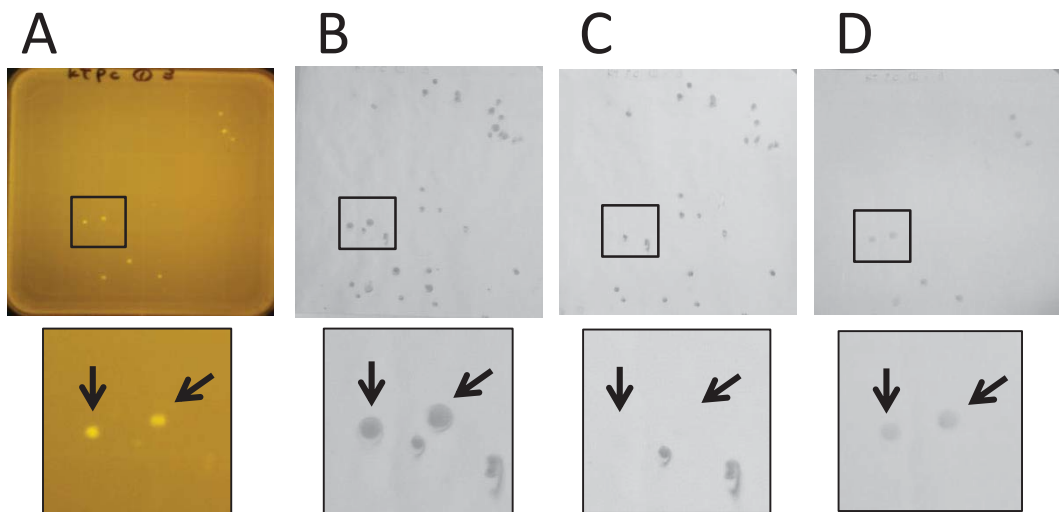


Fig. 2-3. コロニーハイブリダイゼーションによる1:2接合実験系の評価 [Sakuda *et al.*, 2018b, Fig. S2] 供与菌として *P. putida* SM1443(pCAR1::*rfp*)、受容菌として *P. putida* KT2440RGdr および *P. resinovorans* CA10dm4RGgfp を用いた1:2液体接合実験を行い、接合伝達体検出プレート上のコロニーのGFP蛍光をダークリーダーDR46B Transilluminator (Clare Chemical Research) によって確認した後 (A)、メンブレンに転写したコロニーについて、プラスミドpCAR1 (B)、*P. putida* (C) および *P. resinovorans* (D) 検出用のプローブを用いてコロニーハイブリダイゼーションを行った結果を示す。pCAR1の*repA*、*P. putida*の*parI*および*P. resinovorans*のPCA10_13490の遺伝子をPCRで増幅しDIGラベルしたDNA断片をプローブとして使用した。図上部にプレートおよびメンブレン全体を、下部に枠内を拡大したものを示し、GFP蛍光の見られるコロニーの位置を下部に矢印で示す。

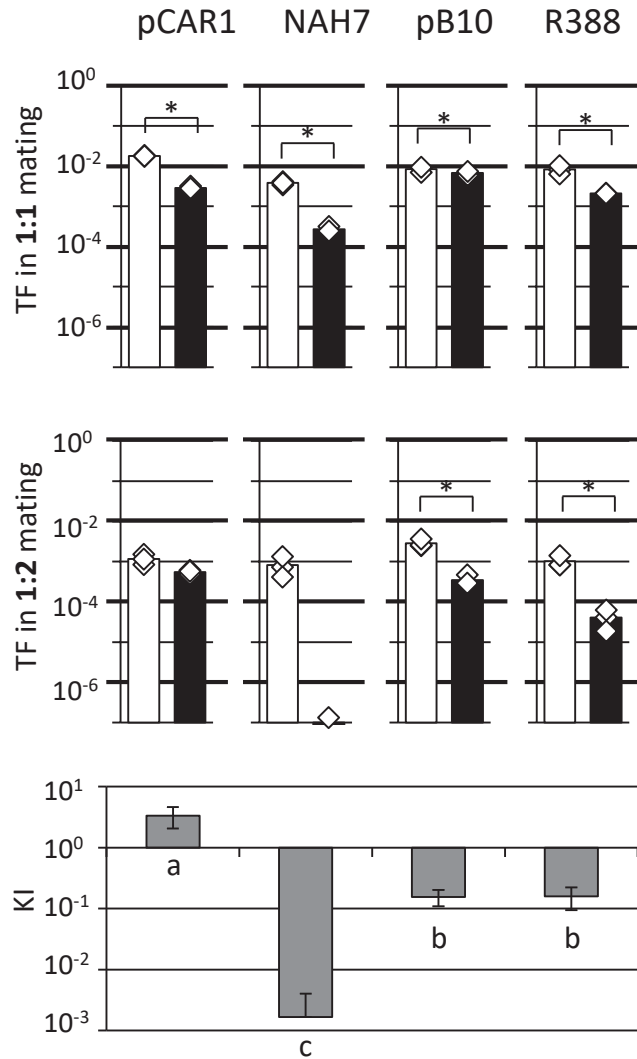


Fig. 2-4. *P. putida*を供与菌として用いた液体接合実験 [Sakuda *et al.*, 2018b, Fig. 1A]
 供与菌として*P. putida* SM1443プラスミド保持株を、受容菌として*P. putida* KT2440RGdrおよび*P. resinovorans* CA10dm4RGgfpを使用した1:1液体接合（上段）および1:2液体接合（中段）における各プラスミドの接合伝達頻度（transfer frequency; TF）を示す。接合条件は30°Cで3 hとした。供与菌の保持プラスミドをグラフ上部に示し、縦軸が接合伝達頻度を示す。3連で行った相加平均をバーで示し、各値を◇で示す。白色のバーが*P. putida*への接合伝達頻度を、黒色のバーが*P. resinovorans*への接合伝達頻度を示す。2種の受容菌への伝達頻度に有意差が見られる場合を*で示す（ $P < 0.05$ ）（ $n = 3$ ）。また、TFから算出されるkin index (KI)を下段に示す。図中のa、bおよびcは、多群間有意差検定において、異なるアルファベットで示す群の間に有意差があることを示す（Kruskal-Wallis test, $P < 0.05$; Conover-Iman test $P < 0.05$, $n = 3$ ）。

へ 3.5×10^{-4} の頻度で接合伝達した。R388 についても、1:1 接合条件下で *P. putida* へ 8.2×10^{-3} 、*P. resinovorans* へ 2.1×10^{-3} の頻度で接合伝達し、1:2 接合条件下では *P. putida* へ 1.0×10^{-3} 、*P. resinovorans* へ 4.1×10^{-5} の頻度で接合伝達した。

これら 4 種類のプラスミドの接合伝達について、1:2 接合条件下における受容菌共存の影響を評価するため、各プラスミドの KI を算出すると、pCAR1、NAH7、pB10 および R388 についてそれぞれ、 3.4×10^{-0} 、 1.7×10^{-3} 、 1.6×10^{-1} および 1.6×10^{-1} であった。これら KI から、pCAR1 の異種への接合伝達は同種の受容菌が共存する影響を受けにくいのに対し、他の 3 種類のプラスミドは受容菌の共存時に *P. putida* への接合伝達が優先され、*P. resinovorans* へ接合伝達しにくくなる傾向があることが明らかになった。さらに興味深いことに、中でもプラスミド NAH7 はその傾向が特に顕著であった。

2-3-3. *P. resinovorans* を供与菌とした液体接合実験

2-3-2 において、*P. putida* を供与菌として使用した場合に、*P. putida* への接合伝達頻度の方が *P. resinovorans* への伝達頻度と比較して高い傾向が見られた。この現象について、複数の受容菌が同時に存在する場合にプラスミドが、受容菌「*P. putida*」へ優先して接合伝達しやすい現象であるのか、あるいは「供与菌と同種の菌」へ接合伝達しやすい現象であるのかに興味を持たれた。そこで、供与菌を *P. resinovorans* とした接合実験を行った。2-3-2 と同様に *P. putida* KT2440RGdr および *P. resinovorans* CA10dm4RGgfp を受容菌とした 1:1 接合および 1:2 接合条件下での接合伝達頻度および KI を、4 種類のプラスミドについて算出した。

結果を Fig. 2-5 に示す。pCAR1 は *P. resinovorans* を供与菌とした場合に、1:1 接合条件下でいずれの受容菌へも接合伝達しにくい現象が見られた。また 1:2 接合条件下でもこの傾向は同様であり、いずれの菌を受容菌として用いた場合にも低い頻度でしか接合伝達しなかった。

NAH7 は、1:1 接合条件下では *P. putida* へ 3.4×10^{-4} 、*P. resinovorans* へは 3.4×10^{-3} の頻度で接合伝達した。1:2 接合条件下では、*P. putida* へ 3.7×10^{-6} 、*P. resinovorans* へ 1.9×10^{-4} の頻度で接合伝達し、1:1 接合および 1:2 接合条件下で供与菌と同種の *P. resinovorans* への接合伝達頻度の方が高くなる傾向が見られた。また、KI = 1.6×10^{-1} であり、受容菌の共存によりやや同種へ接合伝達しやすい傾向が見られた。同様の傾向は pB10 でも見られ、1:1 接合条件下では *P. putida* へ 5.7×10^{-3} 、*P. resinovorans* へ 1.5×10^{-2} の頻度で、1:2 接合条件下では *P. putida* へ 5.9×10^{-4} 、*P. resinovorans* へは 7.2×10^{-3} の頻度で接合伝達した。いずれの条件下でも *P. resinovorans* への伝達頻度の方が高く、受容菌共存の影響の程度は KI = 2.3×10^{-1} であった。

また R388 は、*P. putida* へ 6.9×10^{-4} 、*P. resinovorans* へは 1.5×10^{-2} の頻度で接合伝達し、1:2 接合条件下では *P. putida* へ 4.1×10^{-5} 、*P. resinovorans* へ 1.7×10^{-3} の頻度で接合伝達した。いずれの条件下でも *P. resinovorans* への伝達頻度の方が高い傾向は NAH7 および pB10 と同

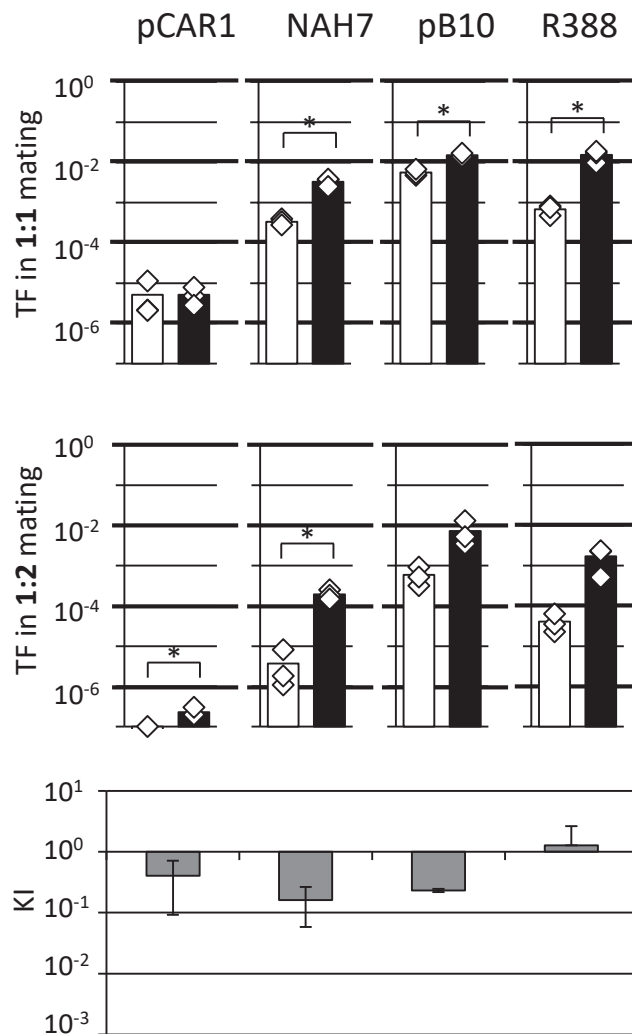


Fig. 2-5. *P. resinovorans*を供与菌として用いた液体接合実験 [Sakuda *et al.*, 2018b, Fig. 1B]
 供与菌として*P. resinovorans* CA10Lプラスミド保持株を、受容菌として*P. putida* KT2440RGdrおよび*P. resinovorans* CA10dm4RGgfpを使用した1:1液体接合 (上段) および1:2液体接合 (中段) における各プラスミドの接合伝達頻度 (transfer frequency; TF) を示す。接合条件は30°Cで3 hとした。供与菌の保持プラスミドをグラフ上部に示し、縦軸が接合伝達頻度を示す。3連で行った相加平均をバーで示し、各値を◇で示す。白色のバーが*P. putida*への接合伝達頻度を、黒色のバーが*P. resinovorans*への接合伝達頻度を示す。2種の受容菌への伝達頻度に有意差が見られる場合を*で示す ($P < 0.05$) ($n = 3$)。また、TFから算出されるkin index (KI) を下段に示す。

様であるが、 $KI = 1.3 \times 10^{-0}$ であり受容菌共存の影響の受けやすさは NAH 7 や pB10 と比較して小さかった。

これらの *P. resinovorans* を供与菌として用いた接合実験結果から、プラスミドは 1:1 接合、1:2 接合時にともに *P. resinovorans* への伝達頻度の方が高くなる傾向が 3 種のプラスミドで共通して見られた。2-3-2 の *P. putida* を供与菌として用いた結果と併せると、プラスミドは 1:1 接合および 1:2 接合時に「供与菌と同種の受容菌」へ伝達しやすい傾向があることが明らかになった。また、*P. resinovorans* を供与菌として用いた場合の受容菌共存の影響の受けやすさの程度はいずれのプラスミドについても *P. putida* を供与菌とした場合と比較して小さい傾向が見られた。

2-3-4. 接合時間が 1:2 接合伝達に与える影響の評価

2-3-2 および 2-3-3 において、2 種の受容菌間で接合伝達頻度に差が生じる原因として、接合時間が長く菌体の増殖速度の違いが反映されている可能性、あるいは、接合時間が短く接合伝達が十分に生じていないことに起因する可能性が考えられた。そこで、接合時間を 3 h のみではなく、1 h に短縮した、もしくは、16 h に延長した実験を行った。接合時間を 1 h とした場合については、3 連の実験操作を行う時間の影響が大きいと判断されたため、1 連の実験を 3 回行うことで再現性を確認した。その他の実験は全て 3 連で行った。結果を Fig. 2-7 に示す。

接合時間を 1 h とした場合と 3 h とした場合を比較すると、いずれのプラスミドについても接合時間を 1 h とした場合にも、3 h の場合と同程度の頻度でそれぞれの受容菌に接合伝達した。また、接合時間を 16 h にした場合には、3 h の場合と比較してプラスミドの 2 種の受容菌への伝達頻度の割合などに大きな変化はないものの、接合伝達頻度の低下する場合があることが確認された。この接合時間を 16 h とした場合の伝達頻度の低下の原因として、接合時間の延長に伴い接合伝達体の増殖速度の違いといった他の要因が作用した可能性が考えられた。また、接合時間を 1 h とした場合には 1 連の操作となり、実験操作における誤差が大きくなることが懸念された。以上の結果から、3 h が 1:2 接合時のプラスミドの挙動評価に適した接合時間であると判断し、今後の実験に採用することとした。

2-3-5. *P. putida* を供与菌とした固体培地上での接合実験

液体中と固体培地上ではプラスミドの挙動は異なることが知られている [Ehlers and Bouwer, 1999]。また、自然界において微生物の多くはバイオフィームを形成しており、バイオフィーム中ではプラスミドの接合伝達頻度が上昇するという知見もある [van Elsas and Bailey, 2002]。これらの現象において固体培地上やバイオフィーム状態でプラスミドの挙動を変化させる原因としては、菌体の運動性の低下や菌密度の上昇に伴う栄養源の不足、酸素濃度の違いなどが考えられている [Stalder and Top, 2016]。2-3-2 および 2-3-3 の液体接合におけるプラスミドの挙動に上述のような因子が作用している場合、固体培地上ではプラス

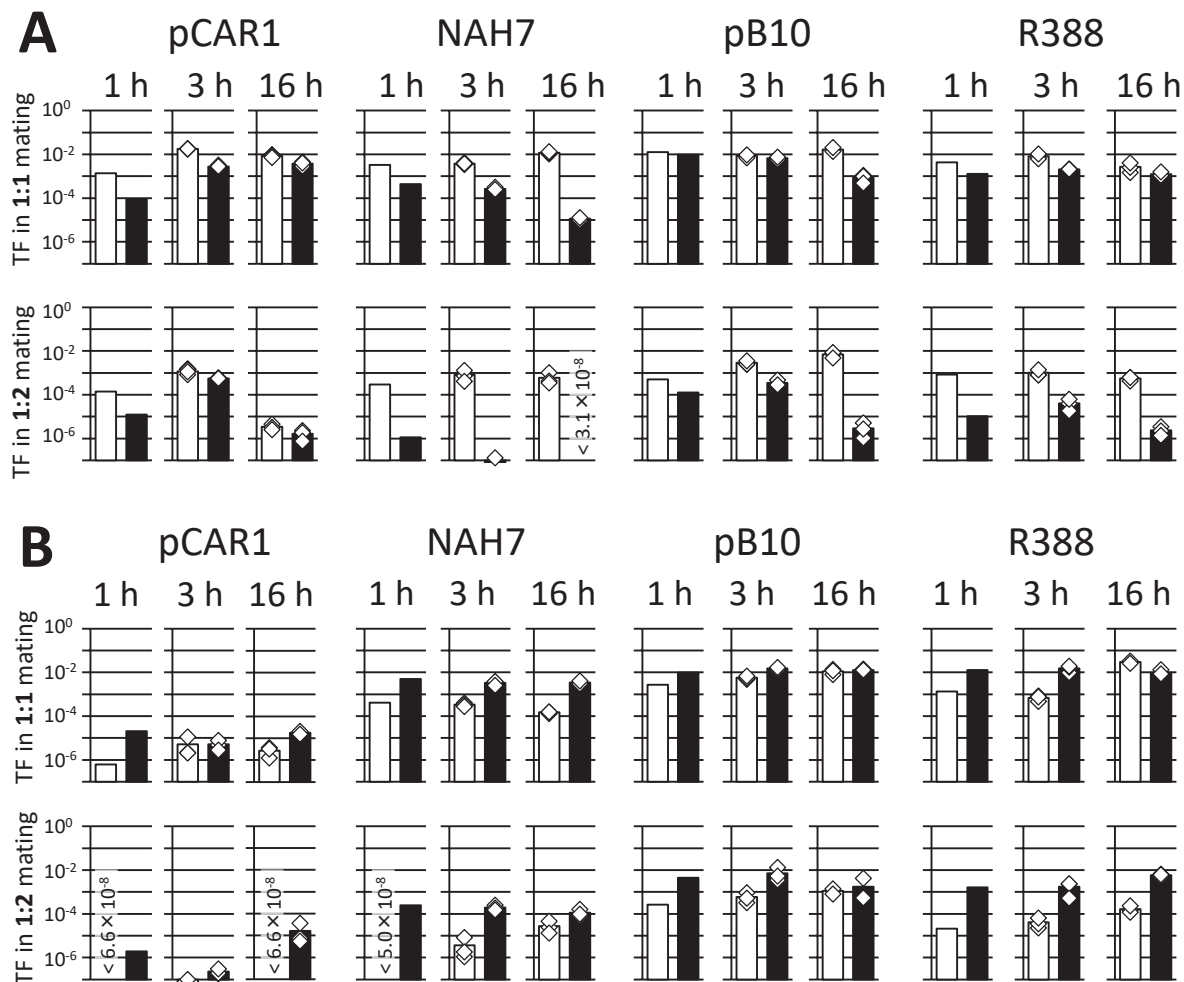


Fig. 2-6. 接合時間を変えた場合の液体接合実験[Sakuda et al., 2018b, Fig. S1]

供与菌として *P. putida* SM1443 プラスミド保持株 (A) あるいは *P. resinovorans* CA10L プラスミド保持株 (B) を、受容菌として *P. putida* KT2440RGdr および *P. resinovorans* CA10dm4RGgfp を使用した 1:1 液体接合 (上段) および 1:2 液体接合 (下段) における各プラスミドの接合伝達頻度 (transfer frequency; TF) を示す。接合条件は 30°C で接合時間は 1 h、3 h もしくは 16 h とした。供与菌の保持プラスミドおよび接合時間をグラフ上部に示し、縦軸が接合伝達頻度を示す。3 連で行った相加平均をバーで示し、各値を◇で示す。白色のバーが *P. putida* への接合伝達頻度を、黒色のバーが *P. resinovorans* への接合伝達頻度を示す。

ミドの挙動が変化することが考えられた。そこで、固体培地上でのフィルター接合実験を行い液体接合時との挙動の比較を行った。*P. putida* を供与菌として使用した接合実験結果を Fig. 2-7 に示す。

いずれのプラスミドについても、液体接合時と同様に、フィルター接合時にも 1:1 接合および 1:2 接合条件下で *P. putida* への伝達頻度の方が高い傾向が見られた。

また、pCAR1 は 1:1 接合条件下では *P. putida* へ 9.2×10^{-3} 、*P. resinovorans* へは 2.7×10^{-4} の頻度で、1:2 接合条件下では *P. putida* へ 4.0×10^{-3} 、*P. resinovorans* へは 4.0×10^{-5} の頻度で接合伝達し、液体接合時よりも *P. putida* への伝達頻度と *P. resinovorans* への伝達頻度の差が大きかった。NAH7、pB10 および R388 については、フィルター接合時には液体接合時と比較して高頻度で接合伝達する傾向が見られた。NAH7 は 1:1 接合条件下では *P. putida* へ 3.3×10^{-2} 、*P. resinovorans* へは 1.6×10^{-2} の頻度で接合伝達した。1:2 接合条件下では *P. putida* へ 3.2×10^{-3} 、*P. resinovorans* へは 1.1×10^{-4} の頻度で接合伝達し、 $KI = 7.9 \times 10^{-2}$ であった。pB10 は、1:1 接合条件下では *P. putida* へ 7.4×10^{-2} 、*P. resinovorans* へは 3.1×10^{-2} の頻度で伝達し、1:2 接合条件下では *P. putida* へ 7.9×10^{-2} 、*P. resinovorans* へは 2.1×10^{-4} の頻度で接合伝達し、 $KI = 5.5 \times 10^{-3}$ であった。

また、R388 は 1:1 接合条件下で *P. putida* へ 3.7×10^{-2} 、*P. resinovorans* へは 1.7×10^{-2} の頻度で接合伝達した。1:2 接合条件下では、*P. putida* へ 8.0×10^{-5} の頻度で接合伝達したのに対し、*P. resinovorans* への接合伝達体を得られず、接合伝達頻度は検出限界以下であった。

以上の結果より、2-3-2 で見られた *P. putida* を供与菌とした液体接合時に *P. putida* へ接合伝達しやすい現象はフィルター接合においても同様に確認された。また、受容菌の共存が同種への伝達のしやすさに及ぼす程度は、液体接合時とは異なり、R388 が最も大きく、pB10、NAH7、pCAR1 の順であった。

2-3-6. *P. resinovorans* を供与菌とした固体培地上での接合実験

次に、*P. resinovorans* を供与菌とした固体培地上でのフィルター接合実験を行った。結果を Fig. 2-8 に示す。いずれのプラスミドも、*P. resinovorans* を供与菌とした液体接合時 (Fig. 2-5) と比較して、顕著な接合伝達頻度の上昇が確認された。また、NAH7 の 1:1 接合時を除くほぼ全ての条件下で *P. resinovorans* への伝達頻度の方が高かった。

液体接合時は検出限界付近の低い接合伝達頻度であった pCAR1 はフィルター接合条件下では高頻度で接合伝達し、1:1 接合条件下では *P. putida* へ 8.0×10^{-3} 、*P. resinovorans* へは 4.6×10^{-2} の頻度で、1:2 接合条件下では *P. putida* へ 6.6×10^{-4} 、*P. resinovorans* へは 7.6×10^{-3} の頻度で接合伝達した。

NAH7 は 1:1 接合条件下では *P. putida* へ 7.7×10^{-1} 、*P. resinovorans* へは 3.5×10^{-1} の頻度で、1:2 接合条件下では *P. putida* へ 3.4×10^{-3} 、*P. resinovorans* へは 1.7×10^{-1} の頻度で接合伝達した。 $KI = 8.4 \times 10^{-3}$ であり、液体接合時よりも受容菌共存の影響を受けやすい傾向が見られた。R388 についても同様に受容菌共存の影響をフィルター接合条件下で受けやすい傾向が

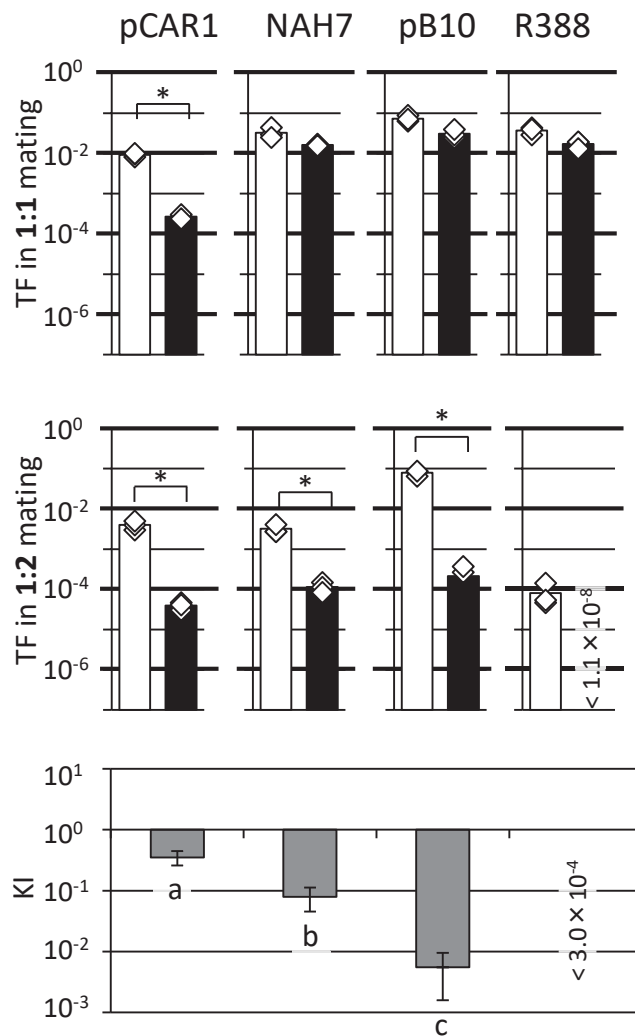


Fig. 2-7. *P. putida*を供与菌として用いたフィルター接合実験 [Sakuda *et al.*, 2018b, Fig. 2A]
 供与菌として *P. putida* SM1443 プラスミド保持株を、受容菌として *P. putida* KT2440RGdr および *P. resinovorans* CA10dm4RGgfp を使用した 1:1 フィルター接合 (上段) および 1:2 フィルター接合 (中段) における各プラスミドの接合伝達頻度 (transfer frequency; TF) を示す。接合条件は 30°C で 3 h とした。供与菌の保持プラスミドをグラフ上部に示し、縦軸が接合伝達頻度を示す。3 連で行った相加平均をバーで示し、各値を◇で示す。白色のバーが *P. putida* への接合伝達頻度を、黒色のバーが *P. resinovorans* への接合伝達頻度を示す。2 種の受容菌への伝達頻度に有意差が見られる場合を*で示す ($P < 0.05$) ($n = 3$)。また、TF から算出される kin index (KI) を下段に示す。図中の a、b および c は、多群間有意差検定において、異なるアルファベットで示す群の間に有意差があることを示す (Kruskal-Wallis test, $P < 0.05$; Conover-Iman test $P < 0.05$, $n = 3$)。

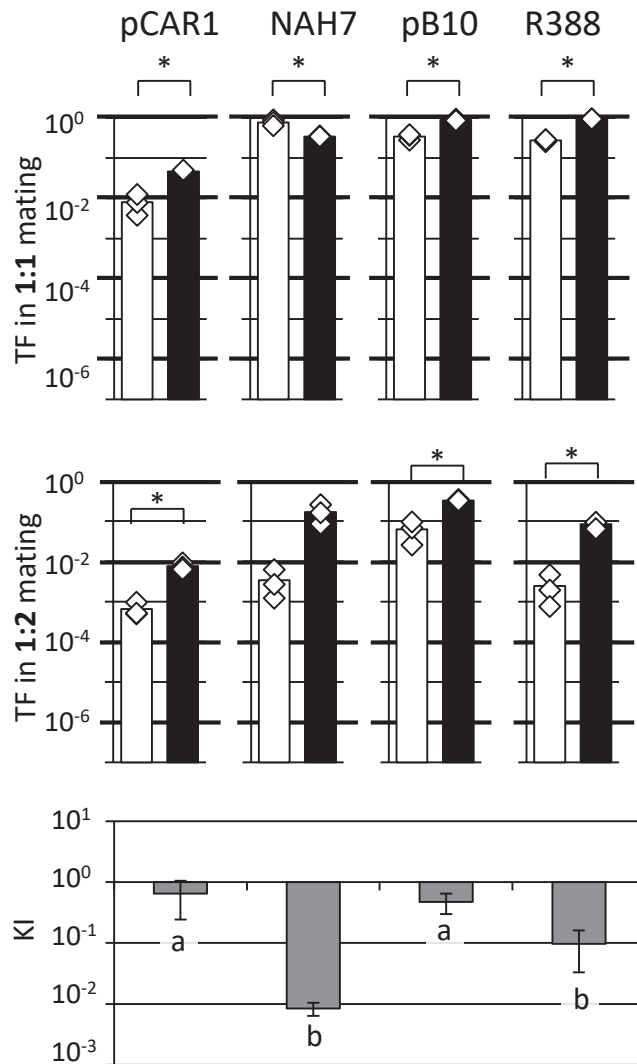


Fig. 2-8. *P. resinovorans*を供与菌として用いたフィルター接合実験 [Sakuda *et al.*, 2018b, Fig. 2B]
 供与菌として *P. resinovorans* CA10Lプラスミド保持株を、受容菌として *P. putida* KT2440RGdrおよび *P. resinovorans* CA10dm4RGgfpを使用した1:1フィルター接合 (上段) および1:2フィルター接合 (中段) における各プラスミドの接合伝達頻度 (transfer frequency; TF) を示す。接合条件は30°Cで3 hとした。供与菌の保持プラスミドをグラフ上部に示し、縦軸が接合伝達頻度を示す。3連で行った相加平均をバーで示し、各値を◇で示す。白色のバーが *P. putida*への接合伝達頻度を、黒色のバーが *P. resinovorans*への接合伝達頻度を示す。2種の受容菌への伝達頻度に有意差が見られる場合を*で示す ($P < 0.05$) ($n = 3$)。また、TFから算出されるkin index (KI) を下段に示す。図中のaおよびbは、多群間有意差検定において、異なるアルファベットで示す群の間に有意差があることを示す (Kruskal-Wallis test, $P < 0.05$; Conover-Iman test $P < 0.05$, $n = 3$)。

見られ、*P. putida* へ 2.8×10^{-1} 、*P. resinovorans* へ 9.4×10^{-1} の頻度で、1:2 接合条件下では *P. putida* へ 2.4×10^{-3} 、*P. resinovorans* へ 8.3×10^{-2} の頻度で接合伝達し、 $KI=9.7 \times 10^{-2}$ であった。

pB10 は、1:1 接合条件下では *P. putida* へ 3.5×10^{-1} 、*P. resinovorans* へは 9.0×10^{-1} の頻度で、1:2 接合条件下では *P. putida* へ 6.2×10^{-2} 、*P. resinovorans* へは 3.3×10^{-1} の頻度で接合伝達し、 $KI=4.7 \times 10^{-1}$ であり、伝達頻度の上昇は見られたものの、受容菌共存の影響の受けやすさの程度は液体およびフィルターいずれの接合時にも同程度であった。

また、*P. resinovorans* を供与菌としたフィルター接合時の受容菌の共存の及ぼす影響については、NAH7 および R388 が、pB10 および pCAR1 と比較して、受容菌の共存下でより同種への接合伝達が優先される傾向が高いことが明らかになった。

2-3-7. 菌体凝集が接合伝達に及ぼす影響の評価

これまでに明らかにした、同種間でより高い頻度で接合伝達する現象および、NAH7 の液体接合あるいは R388 のフィルター接合条件下での *P. putida* からの伝達において見られた顕著な受容菌選択性について、要因の推定および探索を試みた。

接合伝達において菌体接触は重要な要素であり、その菌体接触頻度を上昇させる要素の一つに菌体凝集がある。乳酸菌において菌体凝集が接合頻度を増加させることや、腸球菌では菌体凝集に必要な pili を破壊した株において接合頻度が低下することが知られている [Reniero *et al.*, 1992; La Rosa *et al.*, 2016]。そこで、上述のような同種間の高頻度での伝達や受容菌選択性が接合液中での菌体凝集に起因する可能性を考え、接合液中の同種間での菌体凝集の有無を共焦点顕微鏡により観察した。

液体接合条件下での、接合液中での菌体凝集の様子を観察した。受容菌として *P. putida* KT2440RGdr、*P. resinovorans* CA10dm4RGgfp を用いるこの接合実験系では、接合伝達体はそれぞれ *P. putida* KT2440RGdr プラスミド保持株、*P. resinovorans* CA10dm4RGgfp プラスミド保持株となり、受容菌 *P. resinovorans* CA10dm4RGgfp 株および接合伝達体 *P. resinovorans* CA10dm4RGgfp プラスミド保持株の細胞が GFP 蛍光を有する。全ての菌体を DAPI で染色した後に、共焦点顕微鏡の観察に供し、GFP 蛍光・DAPI 蛍光の検出および明視野での観察を行った。

明視野および DAPI 染色の結果から DAPI による全菌体の染色が確認できた。DAPI 蛍光および GFP 蛍光の結果を重ねた 1:2 接合液の観察結果を Fig. 2-9 に示す。菌体凝集のコントロールとして用いた、コハク酸を唯一の炭素源とする培地中で 4 h 培養した *P. putida* KT2440RGdr の菌体凝集と比較して、*P. putida* あるいは *P. resinovorans* を供与菌とした接合液中で、供与菌がいずれのプラスミドを保持した場合でも、1:2 接合液中で凝集塊を形成している様子は見られなかった。また、同種間で優先して菌体凝集しているような蛍光の偏りや、プラスミドや宿主の違いによる菌体凝集の差異は確認されなかった。

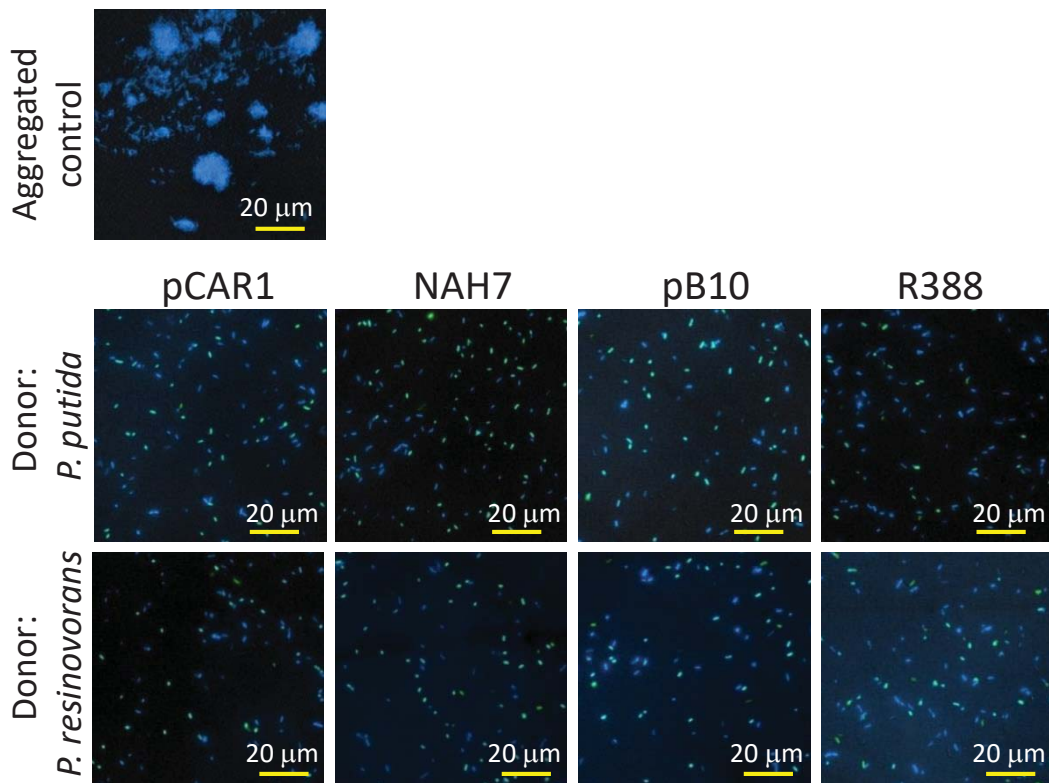


Fig. 2-9. 1:2接合液中での菌体凝集の観察 [Sakuda *et al.*, 2018b, Fig. 3]
 供与菌として *P. putida* SM1443プラスミド保持株もしくは *P. resinovorans* CA10L
 プラスミド保持株を、受容菌として *P. putida* KT2440RGdrおよび *P. resinovorans*
 CA10dm4RGgfpを使用した1:2液体接合液各2 μLを共焦点顕微鏡(BX53; Olympus)
 を用いて観察した。細胞は4',6'-diamidino-2-phenylindole (DAPI) を用いて青色に
 染色し、観察画像はDP2-BSW software (Olympus) を用いて解析した。GFP蛍光
 およびDAPI蛍光を重ねた結果を示す。なお、菌体凝集のコントロール
 (Aggregated control) として、コハク酸を唯一の炭素源とし、30°Cで4 h培養した
P. putida KT2440RGdrを使用した。(Scale bar: 20 μm)

2-3-8. 培養上清が接合伝達に及ぼす影響の評価

これまでの知見から、ペプチドフェロモンによる接合伝達の制御や [Mori *et al.*, 1988; Clewell, 2007; Dunny 2007]、培養液中に添加した 2-hexadecynoic acid による接合伝達の阻害 [Getino *et al.*, 2015, 2016] といった培養液中の物質が接合伝達に作用することが知られている。また、プラスミド pCF10 において、宿主染色体由来のペプチドフェロモンとプラスミド上にコードされるペプチドフェロモンの存在比で接合伝達が制御されることなども知られている [Dunny, 2007]。プラスミド NAH7 が *P. putida* を供与菌とした 1:2 液体接合時に *P. resinovorans* へほとんど接合伝達しなくなる現象 (Fig. 2-4) に着目し、受容菌 *P. putida* が *P. resinovorans* への接合伝達を阻害するような因子を産生する機構が存在する可能性を考えた。*P. putida* プラスミド非保持株の産生する培養液中の因子が作用していれば、NAH7 は *P. putida* の培養上清の存在する 1:1 接合条件下で *P. resinovorans* へ接合伝達しないことが予想される。また、*P. putida* - *P. putida* 間の接合伝達時の培養液が *P. resinovorans* への接合伝達時に作用している可能性も考え、3 h の液体接合後の接合液の上清を添加した実験も行った。

P. putida SM1443(NAH7K2)を供与菌、*P. resinovorans* CA10dm4RGgfp を受容菌とした 1:1 液体接合に対して培養上清を添加した接合実験を行った。結果を Fig. 2-10 に示す。受容菌 *P. putida* の培養上清を添加した場合でも、予想に反し、受容菌 *P. resinovorans* の培養上清を添加した場合と同程度の接合伝達が見られた。また、供与菌 *P. putida* と受容菌 *P. putida* を 3 h 接合させた接合液の上清を添加した場合にも、*P. resinovorans* の培養上清を添加した場合と同程度の接合伝達頻度であった。

いずれの培養上清を加えた場合も *P. resinovorans* へ同程度の頻度で接合伝達が見られたことから、培養上清中の物質は NAH7 の *P. putida* から *P. resinovorans* への接合伝達に作用しないことが示唆された。

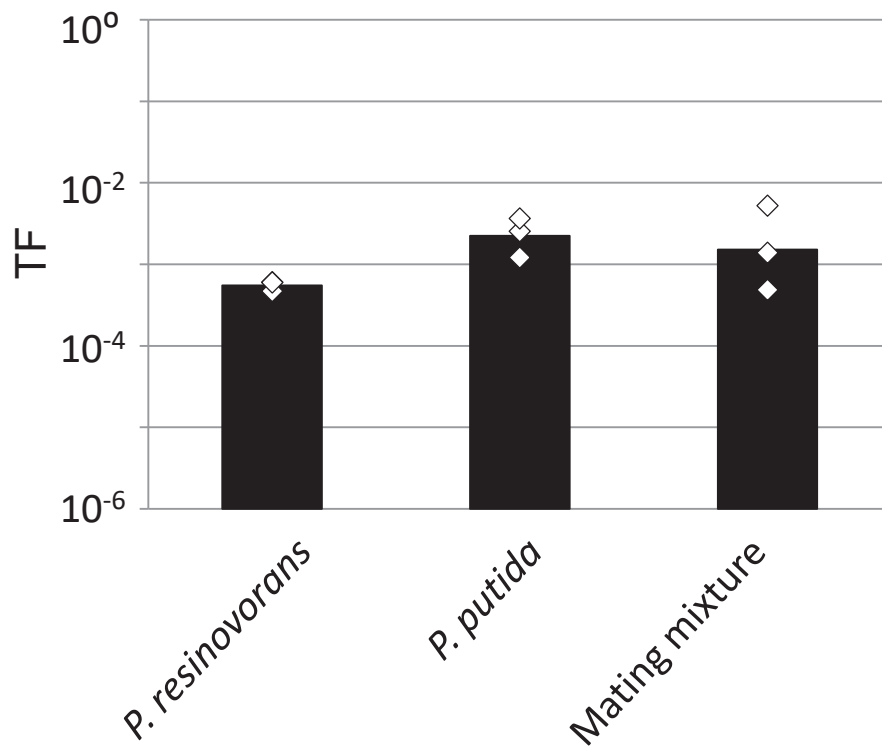


Fig. 2-10. 培養上清が1:2接合伝達に及ぼす影響の評価 [Sakuda *et al.*, 2018, Fig. 4] 供与菌として *P. resinovorans* SM1443(NAH7K2) を、受容菌として *P. resinovorans* CA10dm4RGgfp を使用した培養上清中での接合実験において算出した接合伝達頻度 (transfer frequency; TF) を示す。接合条件は30°Cで3 hとした。縦軸がTFを示し、添加した培養上清をグラフ下部に示す。3連の相加平均をバーで示し、各値を◇で示す。

2-4. 考察 [修士論文より改変・引用]

2-4-1. 1:2 接合実験系の評価

本章では、複数の受容菌候補が同時に存在する場合のプラスミドの接合伝達を評価する実験系を確立した。GFP 蛍光の有無を用いた 2 種の受容菌の区別が確からしいことをコロニーハイブリダイゼーションにより確認した。また、接合時間を 1 h、3 h あるいは 16 h とした条件下で接合実験を行うことで評価に適切な接合時間の検討を行った。16 h では接合時間の延長に伴い増殖速度の違いなどが影響する可能性が考えられた。また、1 h ではプラスミドの挙動は 3 h の場合と同様であったものの、実験操作が 1 連となり、操作における誤差が大きくなることが懸念された。よって、実験操作を 3 連で行い他の因子の関与を少なくすることのできる 3 h が 1:2 接合時のプラスミドの挙動を評価する本研究に妥当であると判断した。

2-4-2. 同種の受容菌へ接合伝達しやすい原因

本章では、4 種類の異なる Inc 群に属するプラスミドについて、液体中および固体培地上での 1:1 接合、1:2 接合条件下での挙動評価を行った。その結果、供与菌と同種の受容菌への接合伝達頻度の方が高い傾向が見られた。中でも興味深いことに、*P. putida* を供与菌とした NAH7 の液体接合 (Fig. 2-4) および R388 のフィルター接合 (Fig. 2-7) において、受容菌の共存がプラスミドの挙動に及ぼす影響が大きく、異種への伝達頻度が顕著に低くなる傾向が見られた。

プラスミドの接合伝達頻度について、異種への伝達頻度よりも同種への伝達頻度の方が高い現象は、1:1 接合実験系が採用されている過去の研究においても報告されている。例えば、*P. putida* mt-2 から単離されたトルエン分解プラスミド pWW0 (IncP-9β) は、供与菌と受容菌の組合せによりその接合伝達頻度が受容菌あたり検出限界以下から 1 近くまで変化するという報告があり、*P. putida* から *P. putida* への接合伝達頻度は 10^{-1} 程度であるのに対し、*P. putida* から *Pseudomonas acidovorans* や *Pseudomonas solanacearum* へは 10^{-8} 以下の頻度まで低下することが知られている [Ramos-Gonzalez *et al.*, 1991]。このような供与菌 - 受容菌の組み合わせにより伝達頻度が異なる原因としては、宿主の制限修飾系や TA システムによる一本鎖 DNA を分解する機構やプラスミドの安定性を低下させる機構の存在が知られている [Anthony *et al.*, 1999; Ishiwa and Komano, 2003; Van Melderen and Saavedra De Bast, 2009]。本研究における 1:1 接合および 1:2 接合時に同種への伝達頻度が高い原因として、これらの因子が作用している可能性が考えられる。

また、接合対の安定性の違いが関与している可能性も考えられる。LPS 生合成に関与する遺伝子が欠失した受容菌は液体接合条件下で IncF 群や IncI 群プラスミドをほとんど受け取れなくなることが知られており [Anthony *et al.*, 1999]、これは供与菌の性線毛の先端に存在する adhesin が受容菌の LPS と特異的に結合することによって接合対を安定化しているこ

とに起因すると考えられている [Anthony *et al.*, 1999; Ishiwa and Komano, 2003]。すなわち、LPS の欠失によって供与菌と受容菌が安定した接合対を形成できないために接合伝達が可能となるという機構である。本研究において、接合対の安定性が菌間で異なり、同種間でもより安定で強固な接合対を形成しているのであれば、同種間での接合伝達頻度が高くなる可能性が考えられる。

本章では、菌体凝集の影響についても検討した。接合液中の同種間の菌体凝集の程度が異種間の菌体凝集の程度よりも大きい場合、同種間の細胞の接触頻度およびプラスミドの接合伝達頻度が高くなる可能性が考えられた。そこで、1:2 接合液の共焦点顕微鏡による菌体凝集の観察を行ったが、いずれのプラスミドおよびいずれの供与菌を用いた場合でも接合液中の菌体凝集は同程度であり、さらに、同種間での菌体凝集の偏り等は確認できなかった。これらの結果から、同種間での接合伝達頻度が高くなるのは同種間で巨大な凝集塊 (“major”-aggregation) を形成することに由来するものではないと推測された。しかし本研究における共焦点顕微鏡による観察では、2,3 細胞の接着 (“minor”-aggregation) までは観察が困難であり評価できていないため、数細胞間の接触頻度に差が存在している可能性は否定できないと考えている。

2-4-3. 液体およびフィルター接合時の接合伝達頻度の違い

プラスミド RP4 (IncP-1 α) において、バイオフィルム中およびフィルター接合時に接合伝達頻度が上昇することが知られている [Ehlers and Bouwer, 1999]。また、pWW0 (IncP-9 β) は固体培地上のほうが液体接合時よりも 18 倍接合伝達頻度が高く [Bradley and Williams, 1982]、MPF を構成するタンパク質の遺伝子の相同性から IncP-9 群であると推測されているナフタレン分解プラスミド pCg1 についても、固体培地上の方が 10 - 100 倍の接合伝達頻度を示すという報告がされている [Park *et al.*, 2003]。固体培地上における菌体接触距離の短縮および接合対の安定性の向上がこれらの伝達頻度上昇に寄与していると考えられている。

本研究において、*P. putida* を供与菌とした場合と *P. resinovorans* を供与菌とした場合を比較すると、ともにフィルター接合時に液体接合時よりも伝達頻度が高くなる傾向が見られ、特に *P. resinovorans* を供与菌とした場合には顕著な伝達頻度の上昇が確認された (Fig. 2-5、Fig. 2-8)。前述の通り、固体培地上で伝達頻度が上昇する現象は知られているものの、その詳細な原理理解は行われておらず、液体あるいはフィルター条件下での細菌の運動性や接合対の安定性の定量的な比較評価による機構解明が期待される。

2-4-4. プラスミドごとの挙動を特徴付ける要因

プラスミドごとの挙動の違いについて、プラスミドの relaxase の配列・構造を指標とした MOB の分類において、NAH7 および R388 はともに MOB_F に属し、pB10 は MOB_P、pCAR1 は MOB_H に属していることに着目した (Table 2-6)。Relaxase は接合伝達開始領域 (*oriT*) 内に nick を入れ、接合伝達時の DNA 開裂反応を触媒する酵素であり、次のように作用する。

nick の入った DNA の 5'末端は、relaxase の N 末端ドメインのチロシン残基と結合し、relaxase-ssDNA 複合体 (relaxosome) を形成後、受容菌へと伝達される。受容菌に伝達された ssDNA は relaxase によって再環化され、複合体から relaxase は離脱する。再環化された一本鎖 DNA は受容菌内の複製装置によって環状二本鎖 DNA に再合成され輸送が完了する (Fig. 1-2) [Garcillán-Barcia *et al.*, 2009]。NAH7 および R388 の属する MOB_F は C 末端に helicase ドメインを、N 末端の relaxase ドメインに 2 つのチロシン残基を有し、“3H motif” と呼ばれる構造を持つ。また、pB10 の属する MOB_P はチロシン残基を 1 つしか持たないものの、MOB_F と同じ “3H motif” 構造を持つことから MOB_F に似た作用機構を有していると推測されている。それに対し、pCAR1 の分類される MOB_H は MOB_F とは構造の異なる “3H alternative motif” を有し、加えて “HD hydrolase motif” を有しており、他の MOB とは構造および作用機構が大きく異なっていると考えられている [Francia *et al.*, 2004; Garcillán-Barcia and de la Cruz, 2009; de la Cruz *et al.*, 2010]。pCAR1 は他の 3 種と比較していずれの条件下でも受容菌共存の影響を受けにくい傾向が見られたことから、これら MOB の違いが 1:2 接合条件下でのプラスミドの接合伝達に影響を与えている可能性も考えられる。

また、性線毛の違いが作用している可能性も考えられる。性線毛は MPF の分類ごとに構造が異なり、短い rigid pili を形成するもの (IncM、IncN、IncP、IncW)、長い thick flexible pili を形成するもの (IncC、IncD、IncF、IncH、IncJ、IncT、IncV、IncX)、長い thin flexible pili を形成するもの (IncI、IncB、IncK) に分けられる [Bradley *et al.*, 1980]。MPF_T に属する NAH7、pB10、R388 は短い性線毛を形成し、MPF_F に属する pCAR1 は長い性線毛を形成すると推測されており (Table 2-6)、この違いが 1:2 接合条件下で接合対の安定性や受容菌認識に関与し、プラスミドの挙動の違いを生み出している可能性も考えられる。プラスミドの接合伝達開始のシグナルや受容菌の認識機構は未だ明らかになっておらず、今後性線毛の受容菌細胞認識への寄与が明らかになることが期待される。

接合伝達にはクオラムセンシングが関与する場合があることも知られている。*Agrobacterium tumefaciens* の Ti プラスミドは供与菌の放出する acyl homoserine lactones (AHL) を感知し接合伝達する [González and Keshavan, 2006; Zhang *et al.*, 1993]。大腸菌の放出する autoinducer 2 (AI-2) が膜タンパク質をコードする遺伝子 *ompA* を発現誘導することで F プラスミドの接合伝達を促進しているという知見もある [DeLisa *et al.*, 2001]。プラスミド NAH7 や R388 で特異的に見られた 2 種の受容菌候補の共存時に異種間の接合伝達が抑制される現象について、培養液中に何らかのシグナル因子が放出されている可能性が考えられた。この可能性について *P. putida* プラスミド非保持株が培養上清中に NAH7 の *P. resinovorans* への接合伝達を阻害する因子を産生していると仮定し、*P. putida* プラスミド非保持株および接合液の上清を添加した接合実験を行った結果、*P. putida* プラスミド非保持株の培養上清存在下で NAH7 の接合伝達頻度に変化は見られなかった (Fig. 2-10)。このことから、NAH7 の接合伝達における受容菌選択性に培養上清中の因子の作用する可能性は低いと推測された。

さらに、NAH7は *P. putida* KT2440 から *E.coli*、*E.coli* から *P. putida* KT2440 に接合伝達可能であるが、NAH7 上の *traDEF* を破壊すると *E.coli* から *P. putida* KT2440 への接合伝達のみが成立しなくなるという報告もある [Miyazaki *et al.*, 2008]。この報告から、供与菌と受容菌が同一の菌株の場合と、異なる菌株の場合とでは、プラスミド上の接合伝達に必要な遺伝子が異なることが示唆される。本研究で明らかにした受容菌の選択性においても、供与菌と受容菌の組合せにより異なる接合伝達機構が利用されていることに起因する可能性も考えられる。

2-4-5. プラスミド・宿主の生存戦略

伝達頻度を液体中や固体培地上といった環境条件に応じて変えることは、宿主が環境に適応するための手段の一つであると考えられる。本研究で使用した2種の宿主について、*P. resinovorans* は液体中よりも固体培地上での接合に適した株であり、*P. putida* は環境条件が変化しても比較的安定して接合できる株であると考えられる。一般にプラスミドの保持は宿主に新規形質を付与する一方で非選択条件下では宿主にとって負荷となりうるということが知られている。*P. putida* を宿主とした場合、pCAR1 の保持は負荷となり、プラスミド非保持株との競合培養時にプラスミド保持株が淘汰される株であることが報告されている [Takahashi *et al.*, 2015]。それに対し *P. resinovorans* においてはプラスミド保持が負荷になりにくく、*P. resinovorans* は選択圧のないプラスミド非保持株との競合培養時にも安定にプラスミドを保持できる株であることが明らかになっている [河野、未発表]。これらから宿主の生存戦略を考えると、*P. resinovorans* は適した環境で接合伝達によりプラスミドを獲得後、安定にプラスミドを保持・継代するという生存戦略を持つ株であるということが出来る。それに対し、*P. putida* はプラスミドの保持が負荷になり得るものの、多様な環境中で一定の伝達頻度を維持することで、プラスミドの安定な保持を可能にしていると考えられる。

2-4-6. 本来の宿主 (original host) からの接合伝達

pCAR1 は *P. resinovorans* を供与菌とした液体接合時に接合伝達頻度が 10^{-6} 程度と低くなる現象が見られた (Fig. 2-5)。異なる宿主間で pCAR1 上の遺伝子の転写プロファイルと比較したタイリングアレイにおいて、*P. resinovorans* 内では pCAR1 上の全 ORF のうち 92%が転写されているのに対し、他の *Pseudomonas* 属細菌中では 90%以下となっており、プラスミド上の遺伝子の転写が宿主により変化していることが示唆されている [Shintani *et al.*, 2011]。pCAR1 は *P. resinovorans* CA10 より単離されたプラスミドであり、*P. resinovorans* CA10dm4 は pCAR1 の本来の宿主 (original host) である。プラスミド保持により宿主染色体の転写プロファイルが変動することも知られており [Takahashi *et al.*, 2015]、*P. resinovorans* 中で染色体由来の因子が pCAR1 の接合伝達関連因子の転写制御に関与することで、*P. resinovorans* から他の宿主に接合伝達しにくくしている可能性も考えられる。その一方で、*P. putida* mt-2 か

ら単離された pWW0 のように、original host から高頻度で接合伝達できるプラスミドも存在する [Ramos-Gonzalez *et al.*, 1991]。Original host 内での宿主染色体およびプラスミド由来の因子による特異的な接合伝達の制御機構が存在している可能性は興味深く、宿主・プラスミドの進化や生存戦略を考える上で重要な足掛かりになることが期待される。

なお、本章の内容は以下の原著論文で発表した。

Sakuda A, Suzuki-Minakuchi C, Okada K, Nojiri H. (2018) Conjugative selectivity of plasmids is affected by coexisting recipient candidates. *mSphere* **3**: e00490- 18

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

本章の内容は、学術雑誌論文として出版する計画があるため公表できない。

なお、本章の内容は5年以内に出版予定である。

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

本章の内容は、学術雑誌論文として出版する計画があるため公表できない。

なお、本章の内容は5年以内に出版予定である。

第 5 章

二価カチオンがプラスミドの接合伝達に及ぼす影響の評価

5-1. 緒言

過去の報告において、環境試料中でのカルバゾール分解プラスミド pCAR1 の挙動評価および環境試料の成分分析が行われ、pCAR1 の接合伝達に Ca^{2+} および Mg^{2+} の二価カチオンが必須であることが示唆されていた [Shintani *et al.*, 2008b]。本章では、このカチオン要求性について、異なる不和合性群に属する 5 種のプラスミドや複数種の *Pseudomonas* 属細菌を宿主として用いた場合の挙動評価から現象の一般性評価を行った。また、カチオン存在下、非存在下でのトランスクリプトーム比較から選抜された因子について、カチオン応答性への寄与の実証を試みた。

5-2. 材料と方法

5-2-1. 使用した菌株およびプラスミド

本章で新たに使用した菌株およびプラスミドを Table 5-1 に示す。培地、培養条件および培地への抗生物質の添加は第 2 章と同様の条件を用いた。

5-2-2. 接合実験

詳細な実験操作は補章 3「S3-10. 接合実験 (液体接合)」に示し、ここでは概要のみを示す。洗菌および菌体濁度の調整には CF buffer を用い、菌体濁度を、供与菌は $OD_{600} = 0.2$ 、受容菌は $OD_{600} = 2.0$ となるように菌液を調製した。二価カチオンの添加にはそれぞれ、 Ca^{2+} 添加には $CaCl_2$ 溶液を、 Mg^{2+} 添加には $MgSO_4$ 溶液を用いた。供与菌・受容菌液を 200 μ L ずつ混合し、二価カチオンを目的の濃度 (0.4、4、40、あるいは 400 μ M) となるように添加して、30°C で 24 h 静置培養した後、接合液を生育したコロニー数から CFU/mL を算出し、接合伝達体数を供与菌数で割ることで接合伝達頻度を算出した。

5-2-3. 菌体凝集観察

菌液あるいは接合液を 4',6'-diamidino-2-phenylindole (DAPI) (50 μ g/mL) で RT、30 min 染色したサンプル 5 μ L をスライドガラス上にのせて観察に供した。観察には共焦点レーザー顕微鏡 (LSM 700 with Airyscan, ZEISS) を用い明視野での観察および DAPI 蛍光の観察を行った。DAPI の検出の際レーザーは波長 405 nm、5 mW を用い、フィルターは SP 555 を用いた。各サンプルについて 3 視野以上での観察を行った。解析にはソフトウェア ZEN (ZEISS Efficient Navigation, ZEISS) を用いた。菌体凝集のコントロールとして、所属研究室において明らかになっていた *P. putida* の菌体凝集が生じる培養条件を採用し、コハク酸を唯一の炭素源とする培地中で 4 h 振盪培養した *P. putida* KT2440RG を観察した。

5-2-4. 菌体増殖およびプラスミドの安定性評価

接合実験時の菌体増殖については、供与菌 *P. fluorescens* Pf0-1L(pCAR1::rfp)、受容菌 *P. putida* KT2440RG、および接合伝達体 *P. putida* KT2440RG(pCAR1::rfp) について、CF buffer に Ca^{2+} および Mg^{2+} を 400 μ M 添加・非添加の条件下で、30°C で 24 h 静置培養した。培養前後の菌液を 10^0 ~ 10^6 倍希釈して選択培地に 10 μ L ずつスポットした。固体培地上に生育したコロニー数から CFU/mL を算出し、比較した。

プラスミドの安定性評価は、供与菌 *P. fluorescens* Pf0-1L(pCAR1::rfp) および接合伝達体 *P. putida* KT2440RG(pCAR1::rfp) について、CF buffer に Ca^{2+} および Mg^{2+} を 400 μ M 添加・非添加の条件下で、30°C で 24 h 静置培養し、培養前後それぞれについて選択培地上に生育したコロニー数を非選択培地上に生育したコロニー数で割ることで、プラスミド保持株の割合を算出した。

Table 5-1. 本章で使用した菌株およびプラスミド

Bacterial strain or plasmid	Relevant characteristic(s) ^a	Source or reference
Bacterial strains		
<i>E. coli</i>		
JM109	F' [<i>traD36 proAB lac^R lacZΔM15</i>] <i>recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17</i> ($\text{r}_K^- \text{m}_K^-$) <i>e14</i> (<i>mcrA</i>) <i>supE44 relA1 Δ(lac-proAB)</i>	RBC Bioscience
<i>Pseudomonas chlororaphis</i> subsp. <i>chlororaphis</i>		
JCM 2778L(pCAR1:: <i>rfp</i>)	Derivative strain of JCM 2778 ^T with <i>lac^R</i> gene into chromosome bearing pCAR1:: <i>rfp</i>	Shintani <i>et al.</i> , 2010
JCM 2778RG	Derivative strain of JCM 2778 ^T (previous name was IAM 1511 ^T), spontaneously Rif ^r , with <i>Gm^r</i> gene inserted into chromosome	Shintani <i>et al.</i> , 2005b
<i>Pseudomonas fluorescens</i>		
Pf-5G	Pf-5:: <i>mini-Tn7-TGm</i> ; <i>Gm^r</i>	Yano <i>et al.</i> , 2010
Pf-5S(pDK1K)	Spontaneous Streptomycin resistant mutant of Pf-5 (Pf-5S) harboring pDK1K	Yano <i>et al.</i> , 2010
Pf0-1L	Derivative strain of Pf0-1 with <i>lac^R</i> gene into chromosome	Shintani <i>et al.</i> , 2010
Pf0-1L(pCAR1:: <i>rfp</i>)	Pf0-1L harboring pCAR1:: <i>rfp</i>	Shintani <i>et al.</i> , 2010
Pf0-1L(pCAR1pmrHis:: <i>Gm^r</i>)	Pf0-1L harboring pCAR1pmrHis:: <i>Gm^r</i>	This study
Pf0-1RG	Derivative strain of Pf0-1, spontaneously Rif ^r , with <i>Gm^r</i> gene inserted into chromosome	Shintani <i>et al.</i> , 2005b
<i>P. putida</i>		
JCM 13063RG	Derivative strain of JCM 13063 ^T (previous name was IAM 1236 ^T), spontaneously Rif ^r , with <i>Gm^r</i> gene into chromosome	Shintani <i>et al.</i> , 2005b
KT2440Δ <i>oprH</i>	Derivative strain of KT2440, Tn5 was inserted into 1,360,499 nt of chromosome	EEZ-CSIC
KT2440Δ <i>oprH</i> (pBBRoprH)	KT2440Δ <i>oprH</i> harboring pBBRoprH	This study
KT2440KR	Derivative strain of KT2440, spontaneously Rif ^r , with <i>Km^r</i> gene into chromosome	Suzuki-Minakuchi <i>et al.</i> , 2015
KT2440(pCAR1pmrHis:: <i>Gm^r</i>)	KT2440 harboring pCAR1pmrHis with <i>Gm^r</i> gene cassette and FRT sites	Yun <i>et al.</i> , 2010
KT2440R	Derivative strain of KT2440, spontaneously Rif ^r	This study
KT2440RG	Derivative strain of KT2440, spontaneously Rif ^r , with <i>Gm^r</i> gene into chromosome	Shintani <i>et al.</i> , 2005b
<i>P. resinovorans</i>		
CA10dm4RG	Derivative strain of CA10dm4 spontaneously Rif ^r , with <i>Gm^r</i> gene inserted into chromosome	Shintani <i>et al.</i> , 2005b
Plasmids		
pBBRoprH	pBBR1MCS-3, <i>oprH</i> (PP_1185, 1360133-1360738 nt of KT2440) at the <i>SalI</i> site of the vector under the <i>lac</i> promoter by Gibson assembly system (<i>SalI</i> site was not available any more)	This study

^a Tc^r, Km^r, Gm^r, Rif^rはそれぞれ tetracycline (12.5 μg/mL), kanamycin (50 μg/mL), gentamicin (30 μg/mL), rifampicin (25 μg/mL) への耐性を持つことを示す。

5-2-5. タイリングアレイによるトランスクリプトーム解析 [共同研究者新谷政己博士、高橋裕里香博士、松井一泰博士による実験]

供与菌 *P. fluorescens* Pf0-1L(pCAR1::rfp) - 受容菌 *P. putida* KT2440RG の組み合わせについて、二価カチオン添加による転写変動から作用因子を探索するため、トランスクリプトーム解析が行われた。供与菌単独、受容菌単独、供与菌 + 受容菌 の3サンプルについて、それぞれ二価カチオン非添加および二価カチオン添加 (400 mM) の条件下で 30°C で 24 時間静置培養した菌体から RNA が抽出された。

実験操作および解析は Takahashi らの方法と同様に行われた [Takahashi *et al.*, 2015]。RNA は Nucleospin RNA II (Macherey-Nagel) を用いて抽出され、RQ1 RNase-free DNase (Promega) による DNaseI 処理後に、Nucleospin RNA binding column (Macherey-Nagel) を用いて精製された。精製 RNA から合成した cDNA を断片化・ビオチンラベルしたものをを用いてハイブリカクテルが調製された。DNA チップには、*P. fluorescens* Pf0-1、*P. putida* KT2440、および pCAR1 について設計されたものが用いられた。

各 ORF 領域内のプローブのシグナル値の中央値がその ORF の代表値とされた。得られたシグナル値のうち、64 未満のシグナル値に関しては再現性が低いことが所属研究室における報告で明らかになっており [Miyakoshi *et al.*, 2009; Shintani *et al.*, 2010; Takahashi *et al.*, 2015]、64 未満の値の変動が選抜に影響しないようすべて 64 に変換された。解析の際は、2 連のサンプル間の比較を 4 通りの組み合わせで行い、4 つの組み合わせ全てで 2 倍以上転写変動したものが選抜された。タイリングアレイ解析に供したサンプル、および比較したアレイデータをそれぞれ Table 5-2、Table 5-3 に示す。

Table 5-2. タイリングアレイ解析に供したサンプル

No.	使用サンプル	図中表記	cation	図中表記
I.	供与菌単独	PF	-	CM(cation minus)
II.	供与菌単独	PF	+	CP (cation plus)
III.	受容菌単独	KT	-	CM
IV.	受容菌単独	KT	+	CP
V.	供与菌 + 受容菌	PF + KT	-	CM
VI.	供与菌 + 受容菌	PF + KT	+	CP

Table 5-3. 比較したアレイデータおよび選抜される遺伝子

比較サンプル	DNA チップ	選抜される遺伝子
I vs II	pCAR1	二価カチオン添加により単独培養時に転写変動した遺伝子
V vs VI	pCAR1	二価カチオン添加により受容菌との混合時に転写変動した遺伝子
I vs II	<i>P. fluorescens</i> Pf0-1	二価カチオン添加により単独培養時に転写変動した遺伝子
V vs VI	<i>P. fluorescens</i> Pf0-1	二価カチオン添加により受容菌との混合時に転写変動した遺伝子
III vs IV	<i>P. putida</i> KT2440	二価カチオン添加により単独培養時に転写変動した遺伝子
V vs VI	<i>P. putida</i> KT2440	二価カチオン添加により供与菌との混合時に転写変動した遺伝子

5-2-6. *P. fluorescens* Pf0-1L(pCAR1pmrHis::Gm^r)の作製

P. putida KT2440(pCAR1pmrHis::Gm^r) [Gm^r] を供与菌、*P. fluorescens* Pf0-1L [Tc^r]を受容菌として接合させ、接合伝達体 *P. fluorescens* Pf0-1L(pCAR1pmrHis::Gm^r) [Gm^r、Tc^r] を取得することで作製した。

5-2-7. *P. putida* KT2440 Δ *oprH*(pBBRoprH)の作製

P. putida KT2440 Δ *oprH* をプラスミド pBBRoprH で形質転換することで作製した。形質転換にはエレクトロポレーション法を用いた。

5-3. 結果

5-3-1. 様々なプラスミドにおける二価カチオン要求性の評価

異なる 4 種のプラスミドについて、二価カチオン添加の有無によるプラスミドの接合伝達頻度を比較した。R388 については二価カチオン添加による接合伝達頻度の変化に有意な差は見られなかったものの (Fig. 5-1D、その他の 3 種のプラスミドについて、二価カチオンの添加時に接合伝達頻度が上昇する傾向が見られた (Fig. 5-1A-C)。中でも、プラスミド pCAR1 において二価カチオン非添加時には 3.8×10^{-5} であった接合伝達頻度が二価カチオン添加により 8.4×10^{-4} まで上昇し、顕著な二価カチオン要求性が見られた (Fig. 5-1A)。

次に、pCAR1 と同じ IncP-7 群に属するプラスミド pDK1 を用いて二価カチオン要求性の評価を行った。pDK1 は *P. putida* で安定に保持されないため [Yano *et al.*, 2010]、*P. fluorescens* を宿主として用いた。その結果、pDK1K においても二価カチオン非添加時には 6.8×10^{-8} であった接合伝達頻度が二価カチオン添加により 6.1×10^{-6} まで上昇し、顕著な二価カチオン要求性が見られた (Fig. 5-1E)。

以上の結果から、二価カチオン要求性は複数のプラスミドにおいて見られるが、その程度は IncP-7 群プラスミドにおいてより顕著であることが明らかになった。以降の解析では、pCAR1 を用いることとした。

5-3-2. 様々な供与菌-受容菌の組み合わせにおける二価カチオン要求性の評価 [共同研究者新谷政己博士、松井一泰博士による実験結果]

先の二価カチオン要求性現象について、一般性の評価を目的として、様々な *Pseudomonas* 属細菌を宿主とした pCAR1 の挙動評価が共同研究者によって行われた。4 種の供与菌宿主 (*P. putida* SM1443、*P. resinovorans* CA10L、*P. fluorescens* Pf0-1L、および *P. chlororaphis* subsp. *chlororaphis* JCM 2778L) および 5 種の受容菌 (*P. putida* KT2440RG、*P. resinovorans* CA10dm4RG、*P. fluorescens* Pf0-1RG、*P. putida* JCM 13063RG および *P. chlororaphis* subsp. *chlororaphis* JCM 2778RG) について、二価カチオン要求性の有無の検証が行われた。なお、いずれの供与菌-受容菌の組み合わせにおいても pCAR1 は接合伝達能を有することは確認済である。二価カチオンは $0.4 \mu\text{M}$ 、 $4 \mu\text{M}$ 、 $40 \mu\text{M}$ 、あるいは $400 \mu\text{M}$ の濃度で添加した。

Fig. 5-2 に示すように、*P. putida* SM1443 を供与菌宿主とした場合、*P. putida* KT2440RG、*P. resinovorans* CA10dm4RG、*P. fluorescens* Pf0-1RG への伝達において二価カチオンの濃度依存的な伝達頻度の上昇が見られたのに対し (Fig. 5-2A-C)、*P. putida* JCM 13063RG および *P. chlororaphis* subsp. *chlororaphis* JCM 2778RG への伝達においては二価カチオン要求性は見られなかった (Fig. 5-2D, E)。

他にも、*P. resinovorans* CA10L から *P. putida* KT2440RG、*P. resinovorans* CA10dm4RG、*P. fluorescens* Pf0-1RG へ、および *P. fluorescens* Pf0-1L から *P. putida* KT2440RG、*P. resinovorans* CA10dm4RG への伝達において、二価カチオン要求性が確認された (Fig. 5-3A-C, F, G)。一

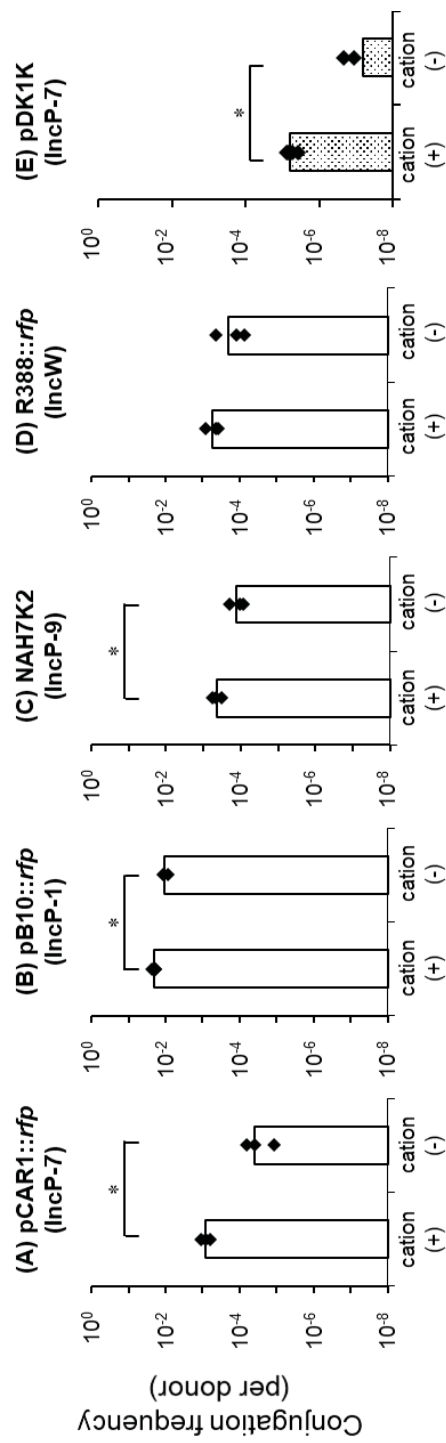


Fig. 5-1. 二価カチオン添加・非添加の条件下での接合伝達頻度 [Sakuda *et al.*, 2018a, Fig. 1, modified] (A)~(E) 供与菌として *P. putida* SMI443 プラスミド保持株を、受容菌として *P. putida* KT2440RG 株を用いた接合伝達頻度および、(E) 供与菌として *P. fluorescens* Pf-5S プラスミド保持株を、受容菌として *P. fluorescens* Pf-5G 株を用いた接合伝達頻度を示す。接合条件は 30°C で 24 h とし、二価カチオン (Ca^{2+} , Mg^{2+}) の添加濃度は $400\ \mu\text{M}$ とした。供与菌の保持プラスミドをグラフ上部に示し、縦軸が接合伝達頻度を示す。3連 (A-D) または 5連 (E) で行った相対平均をバーで示し、各値を ◆ で示す。二価カチオン添加・非添加時の伝達頻度に有意差が見られる場合を * で示す ($P < 0.05$) ($n = 3$ for pCAR1::rfp, pBP10::rfp, NAH7K2, and R388::rfp and $n = 5$ for pDK1K).

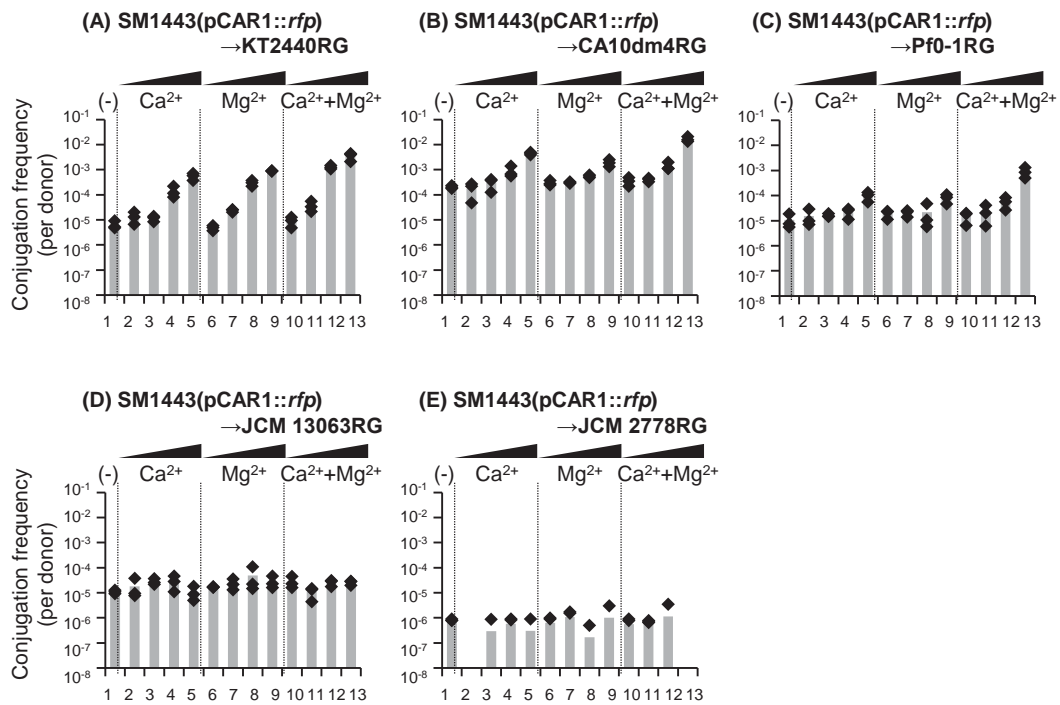


Fig. 5-2. pCAR1::rfpの二価カチオン添加・非添加時の接合伝達頻度 [Sakuda *et al.*, 2018a, Fig. 2, modified]
 供与菌として *P. putida* SM1443(pCAR1::rfp) 株を、受容菌として *P. putida* KT2440RG (A), *P. resinovorans* CA10dm4RG (B), *P. fluorescens* Pf0-1RG (C), *P. putida* JCM 13063RG (D), *P. chlororaphis* subsp. *chlororaphis* JCM 2778RG (E) をそれぞれ用いた。二価カチオンの添加濃度は Ca²⁺ (#2-5)、Mg²⁺ (#6-9)、Ca²⁺ および Mg²⁺ (#10-13) をそれぞれ 0 μM (#1)、0.4 μM (#2, 6, 10)、4 μM (#3, 7, 11)、40 μM (#4, 8, 12)、400 μM (#5, 9, 13) の濃度で添加した。縦軸が接合伝達頻度 (transconjugant/donor) を示す。3連で行った相加平均をバーで示し、各値を◆で示す。

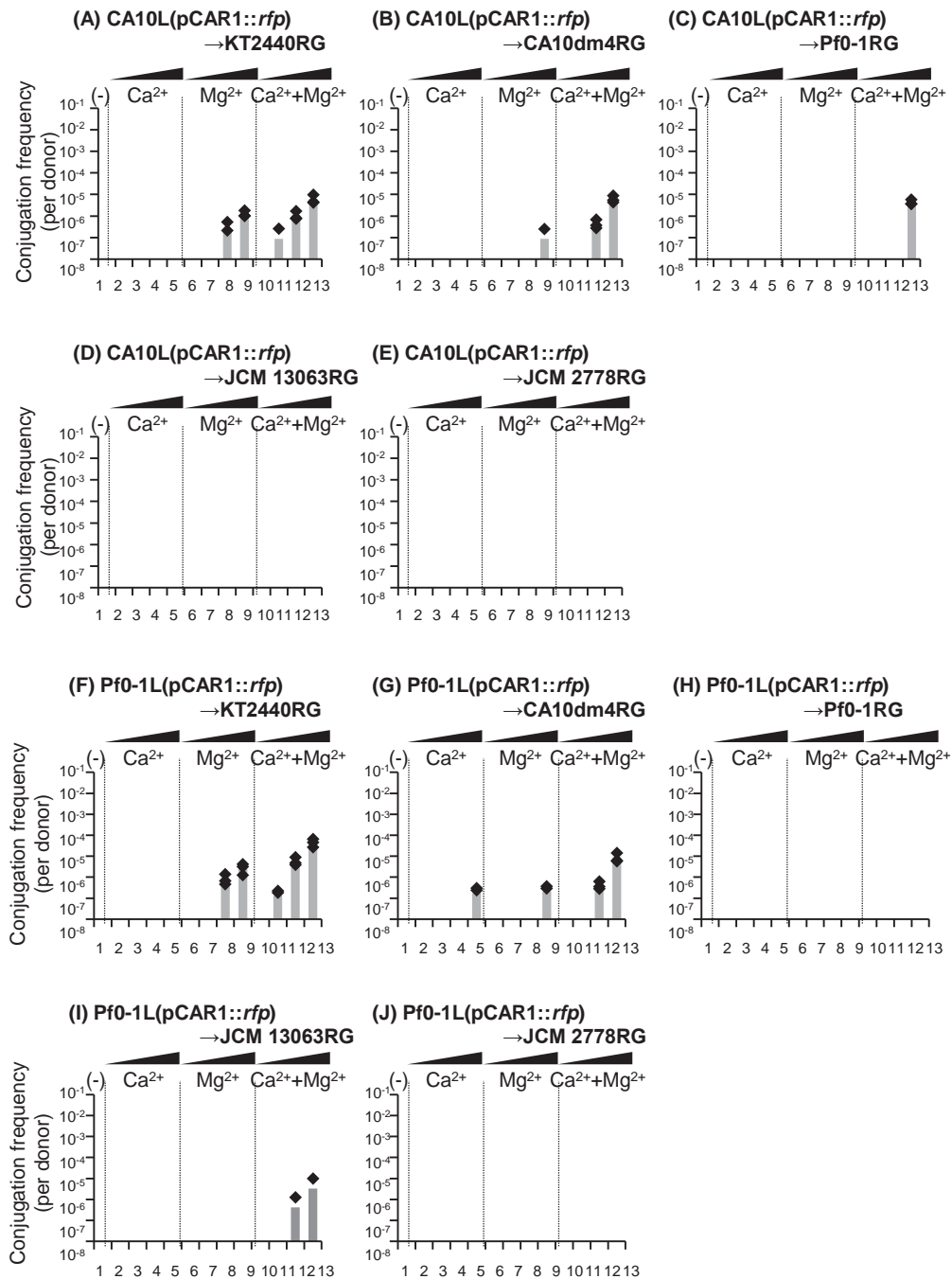


Fig. 5-3. pCAR1::rfpの二価カチオン添加・非添加時の接合伝達頻度 [Sakuda et al., 2018a, Fig. S1, modified]
 供与菌として *P. resinovorans* CA10L(pCAR1::rfp) (A-E), *P. fluorescens* Pf0-1L(pCAR1::rfp) (F-J), *P. chlororaphis* subsp. *chlororaphis* JCM 2778L(pCAR1::rfp) (K-O) を用いた。受容菌として *P. putida* KT2440RG (A, F, K), *P. resinovorans* CA10dm4RG (B, G, L), *P. fluorescens* Pf0-1RG (C, H, M), *P. putida* JCM 13063RG (D, I, N), *P. chlororaphis* subsp. *chlororaphis* JCM 2778RG (E, J, O) をそれぞれ用いた。二価カチオンの添加濃度は Ca²⁺ (#2-5)、Mg²⁺ (#6-9)、Ca²⁺ および Mg²⁺ (#10-13) をそれぞれ 0 μM (#1)、0.4 μM (#2, 6, 10)、4 μM (#3, 7, 11)、40 μM (#4, 8, 12)、400 μM (#5, 9, 13) の濃度で添加した。縦軸が接合伝達頻度 (transconjugant/donor) を示す。3連で行った相加平均をバーで示し、各値を◆で示す。

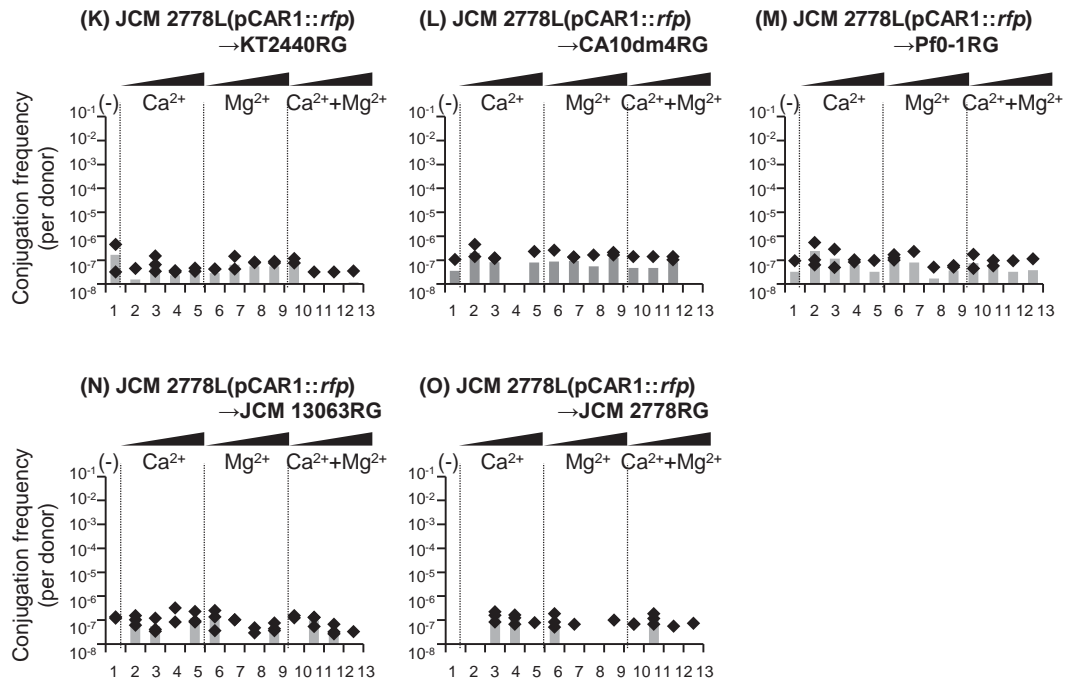


Fig. 5-3の続き pCAR1::rfpの二価カチオン添加・非添加時の接合伝達頻度 [Sakuda *et al.*, 2018a, Fig. S1, modified]

供与菌として *P. resinovorans* CA10L(pCAR1::rfp) (A-E), *P. fluorescens* Pf0-1L(pCAR1::rfp) (F-J), *P. chlororaphis* subsp. *chlororaphis* JCM 2778L(pCAR1::rfp) (K-O) を用いた。受容菌として *P. putida* KT2440RG (A, F, K), *P. resinovorans* CA10dm4RG (B, G, L), *P. fluorescens* Pf0-1RG (C, H, M), *P. putida* JCM 13063RG (D, I, N), *P. chlororaphis* subsp. *chlororaphis* JCM 2778RG (E, J, O) をそれぞれ用いた。二価カチオンの添加濃度は Ca²⁺ (#2-5)、Mg²⁺ (#6-9)、Ca²⁺ および Mg²⁺ (#10-13) をそれぞれ 0 μM (#1)、0.4 μM (#2, 6, 10)、4 μM (#3, 7, 11)、400 μM (#4, 8, 12)、400 μM (#5, 9, 13) の濃度で添加した。縦軸が接合伝達頻度 (transconjugant/donor) を示す。3連で行った相加平均をバーで示し、各値を◆で示す。

方で、伝達頻度が検出限界以下となる供与菌-受容菌の組み合わせもあり (Fig. 5-3D, E, H, J)、また、*P. chlororaphis* subsp. *chlororaphis* JCM 2778L からの伝達においては、いずれの受容菌へも伝達頻度は低く、二価カチオンの要求性は見られなかった (Fig. 5-3K-O)。

以上の結果から、供与菌-受容菌の組み合わせによって二価カチオン要求性の程度は異なることが明らかになり、中でも、供与菌宿主として *P. resinovorans* CA10L、*P. fluorescens* Pf0-1L を用いた場合、受容菌として *P. putida* KT2440RG、*P. resinovorans* CA10dm4RG を用いた場合に顕著な二価カチオン要求性が見られることが明らかになった (Fig. 5-3A, B, F, G)。

5-3-3. 二価カチオンが菌体凝集に及ぼす影響の評価

接合伝達において菌体接触は重要な要素であり、その菌体接触頻度を上昇させる要素の一つに菌体凝集がある。二価カチオンが細菌の菌体接触に影響を及ぼすという報告もあることから [Dunne, 2002; Kerchova and Elimelech, 2008; Dass *et al.*, 2009; dasT *et al.*, 2014]、接合伝達における二価カチオン要求性が、二価カチオン添加による菌体凝集に起因する可能性を考え、二価カチオンの有無による接合液中の菌体凝集の有無を共焦点顕微鏡により観察した。5-3-2.において顕著な二価カチオン要求性が見られた供与菌 *P. fluorescens* Pf0-1L(pCAR1::*rfp*) - 受容菌 *P. putida* KT2440RG の組み合わせを採用し、供与菌・受容菌それぞれの単独培養液、および接合液について、二価カチオン添加・非添加の条件下での菌体凝集の様子を観察した。DAPI で染色した後に、共焦点顕微鏡の観察に供した。二価カチオンは Ca^{2+} および Mg^{2+} を $400 \mu\text{M}$ ずつ添加した。

観察結果を Fig. 5-4 に示す。菌体凝集のコントロールである、コハク酸を唯一の炭素源とする培地中で 4 h 培養した *P. putida* KT2440RG の菌体凝集と比較して、二価カチオン添加・非添加によらず、単独培養液および接合液中で菌体が凝集塊を形成している様子は見られなかった。以上の結果から、二価カチオンは菌体凝集に影響を及ぼしていないと結論づけた。

5-3-4. 二価カチオンが菌体増殖およびプラスミドの安定性に及ぼす影響の評価

二価カチオンの添加が、菌体の増殖速度やプラスミドの安定性に影響を及ぼす場合、選択培地上に生育したコロニー数から算出される接合伝達頻度は変化する可能性が懸念された。そこで、二価カチオンの添加が菌体増殖およびプラスミドの安定性に及ぼす影響の評価を行った。

供与菌 *P. fluorescens* Pf0-1L(pCAR1::*rfp*) - 受容菌 *P. putida* KT2440RG の組み合わせについて、供与菌、受容菌、接合伝達体それぞれの菌体増殖への二価カチオン ($400 \mu\text{M} \text{Ca}^{2+}$; $400 \mu\text{M} \text{Mg}^{2+}$) の影響評価を行った結果、いずれの菌についても、二価カチオン添加・非添加によらず菌体数に有意な差は見られなかった (Fig. 5-5A)。このことから、二価カチオン添加の菌体の増殖への影響はほぼないと判断された。

また、供与菌 *P. fluorescens* Pf0-1L(pCAR1::*rfp*) および接合伝達体 *P. putida* KT2440RG(pCAR1::*rfp*) のプラスミドの安定性に二価カチオンが及ぼす影響の評価を行った

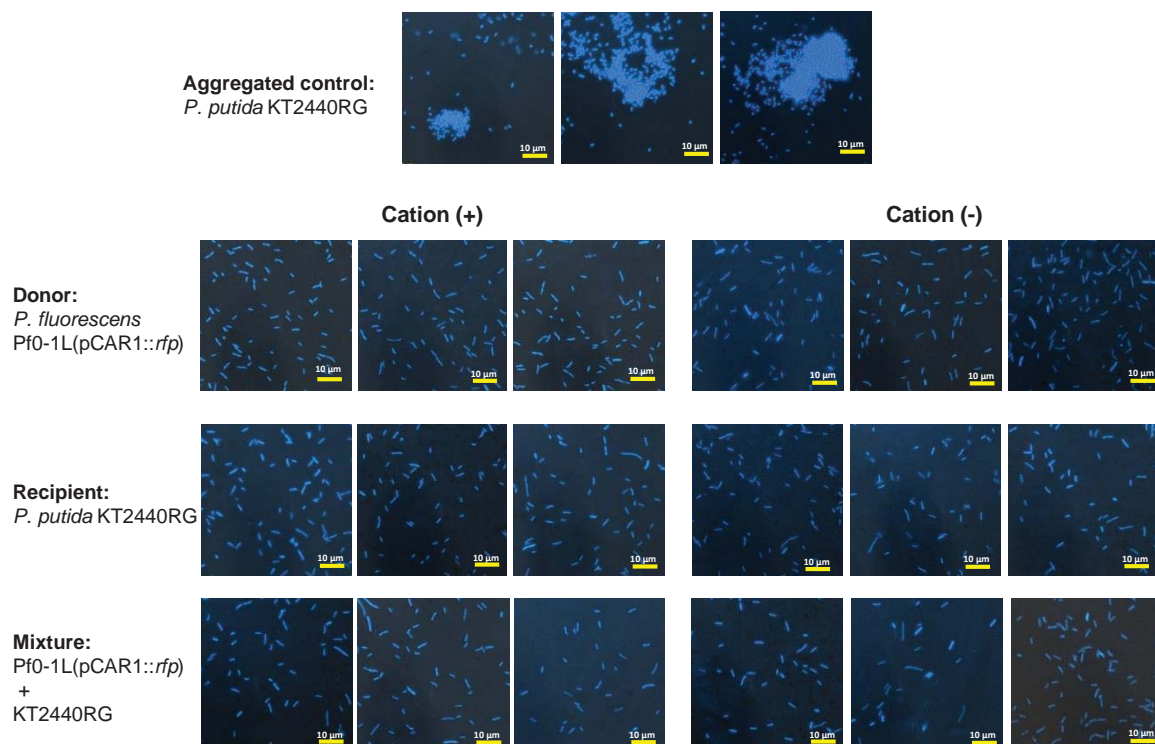


Fig. 5-4. カチオン添加・非添加時の菌体凝集観察 [Sakuda *et al.*, 2018a, Fig. S2]

供与菌として *P. fluorescens* Pf0-1L(pCAR1::rfp) を、受容菌として *P. putida* KT2440RG を用いた接合条件下で、二価カチオンの有無が菌体凝集に及ぼす影響を評価した。接合条件は 30 °C で 24 h とし、二価カチオン (Ca^{2+} , Mg^{2+}) の添加濃度は 400 μM とした接合液各 2 mL を共焦点顕微鏡 (BX53; Olympus) を用いて観察した。細胞は 4',6'-diamidino-2-phenylindole (DAPI) を用いて青色に染色し、観察画像は DP2-BSW software (Olympus) を用いて解析した。GFP 蛍光および DAPI 蛍光を重ねた結果を示す。なお、菌体凝集のコントロール (Aggregated control) として、コハク酸を唯一の炭素源とし、30 °C で 4 h 培養した *P. putida* KT2440RG 株を使用した。(Scale bar: 10 μm)

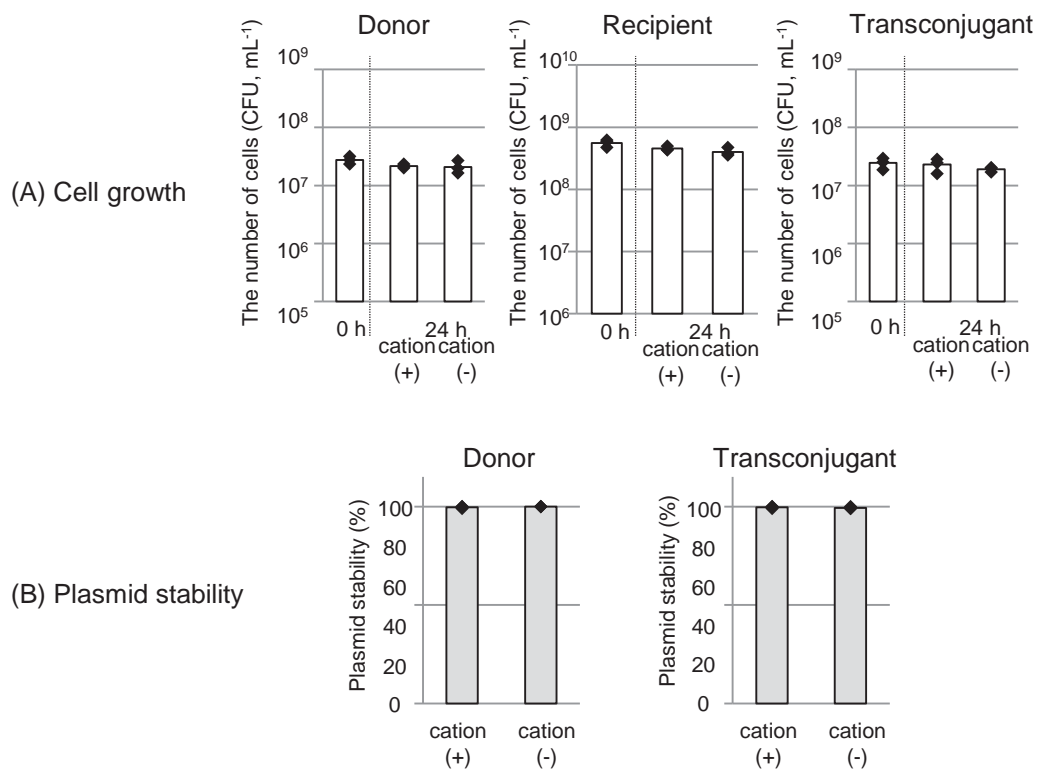


Fig. 5-5. 二価カチオンが菌体増殖とプラスミドの安定性に及ぼす影響 [Sakuda *et al.*, 2018a, Fig. S3, modified]

供与菌として *P. fluorescens* Pf0-1L(pCAR1::*rfp*) を、受容菌として *P. putida* KT2440RG を用いた接合条件下で、二価カチオンの有無が菌体増殖 (A) とプラスミドの安定性 (B) に及ぼす影響を評価した。プラスミドの安定性は選択培地上に生育したコロニー数を非選択培地上に生育したコロニー数で割ることで算出した。3連で行った相加平均をバーで示し、各値を◆で示す。

結果、接合実験と同様の栄養条件下で 24 h 培養後の供与菌および接合伝達体のプラスミド保持率を比較したところ、いずれも約 100%の保持率であり、プラスミドの安定性への二価カチオン添加・非添加の影響は見られなかった (Fig. 5-5B)

5-3-5. タイリングアレイ解析による二価カチオン要求性に寄与する因子探索 [共同研究者新谷政己博士、高橋裕里香博士による実験結果]

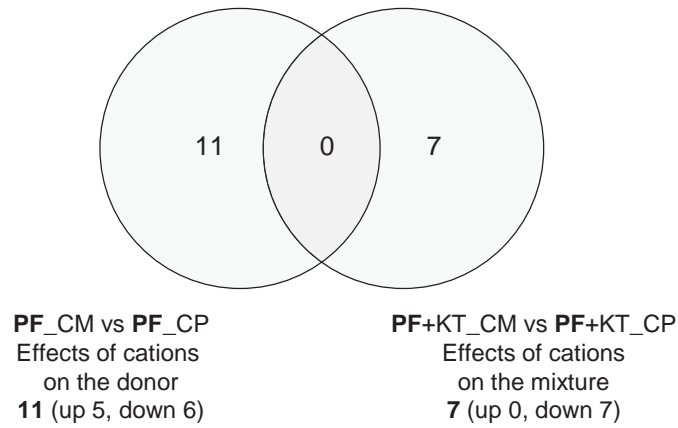
二価カチオン要求性に寄与する因子探索を目的として、二価カチオン添加により転写変動する遺伝子の探索が、タイリングアレイ解析により行われた。

pCAR1 上で有意に転写変動した遺伝子は、供与菌の単独培養時および受容菌との混合時のいずれの条件においても選抜されなかった。供与菌染色体上の遺伝子については、供与菌単独培養条件下で 11 個 (そのうち、二価カチオン添加により転写誘導されたものが 5 個、転写抑制されたものが 6 個)、受容菌との混合液中では 7 個 (いずれも転写抑制されていた) の遺伝子が転写変動した遺伝子として選抜された (Fig. 5-6A)。単独培養時と受容菌との混合時に重複して転写変動した遺伝子は存在しなかった。

また、受容菌染色体上では 123 個 (そのうち、転写誘導されたものが 31 個、転写抑制されたものが 92 個)、受容菌との混合液中では 126 個 (そのうち、転写誘導されたものが 2 個、転写抑制されたものが 124 個) の遺伝子の転写変動が見られた (Fig. 5-6B)。二価カチオン添加により転写変動した受容菌染色体上の遺伝子のうち、単独培養時と受容菌との混合時に重複して転写変動した遺伝子は 31 個存在した。転写変動した全遺伝子のリストは補章 2 に示した。また、全てのアレイデータは National Center for Biotechnology Information (NCBI) (GEO; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>) accession no. GSE97565 に登録済である。

上述のタイリングアレイ解析は *P. fluorescens* を供与菌宿主、*P. putida* を受容菌とした組み合わせで行われたが、5-3-2.において様々な宿主における二価カチオン要求性の評価が行われた際に、*P. putida* を供与菌宿主、*P. fluorescens* を受容菌とした場合にも二価カチオン要求性が見られていた (Fig. 5-2C)。供与菌と受容菌を入れ替えた場合にも二価カチオン要求性が見られることから、複数の宿主間で共通した二価カチオンの作用機構の存在を仮定すると、*P. fluorescens* と *P. putida* にオルソログの存在する遺伝子が二価カチオン要求性に関与する可能性が高いと考えた。そこで、先の転写変動した遺伝子のうち、二種の宿主にオルソログの存在する遺伝子に着目したところ、受容菌 *P. putida* KT2440 染色体上の OprH をコードする PP_1185 が受容菌単独および供与菌との混合時に共通して転写変動する遺伝子として選抜され (TableS2-3, S2-4)、そのオルソログである *P. fluorescens* Pf0-1 の Pfl01_4241 は受容菌との混合時に転写変動していた (TableS2-2)。二種の宿主にオルソログが存在し、二価カチオン応答的に転写変動する遺伝子として選抜されたものは *oprH* のみであった。そこで、次に OprH の二価カチオン要求性への寄与の検証を試みた。

(A) Pf0-1L(pCAR1::*rfp*) chromosome



(B) KT2440RG chromosome

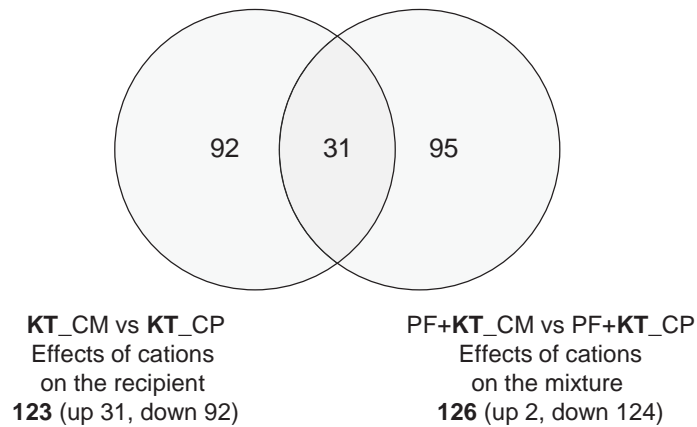


Fig. 5-6. 二価カチオン添加により転写変動した遺伝子数 [Sakuda *et al.*, 2018a, Fig. 3, modified]

供与菌 *P. fluorescens* Pf0-1L(pCAR1::*rfp*) 株染色体上 (a)、あるいは受容菌 *P. putida* KT2440RG 染色体上 (b) で、二価カチオン (Ca^{2+} , Mg^{2+} , いずれも $400 \mu\text{M}$) の添加により転写変動した遺伝子数を示す。カチオンの有無は、‘CP’ (cation plus) あるいは ‘CM’ (cation minus) で示した。

5-3-6. OprH の二価カチオン要求性への寄与の検証

pCAR1 の接合伝達における二価カチオン要求性への OprH の寄与を検証するため、供与菌として、*P. fluorescens* Pf0-1L(pCAR1pmrHis::Gm^r) [Tc^r, Gm^r] を、受容菌として *P. putida* KT2440KR [Km^r, Rif^r] もしくは *P. putida* KT2440ΔoprH [Km^r] (*oprH* 破壊株) を用いて、接合伝達時の二価カチオン要求性の有無を評価した。

結果を Fig 5-6 に示す。*P. putida* KT2440KR を受容菌として用いた場合には、二価カチオン非添加時には 3.4×10^{-7} であった伝達頻度が 3.8×10^{-4} まで上昇し、二価カチオン要求性が見られた。それに対し、*P. putida* KT2440ΔoprH を受容菌とした場合には、二価カチオン非添加時の伝達頻度 (5.4×10^{-7}) と、二価カチオンの添加時の伝達頻度 (8.3×10^{-7}) の間に有意な差は見られず、二価カチオンの要求性が見られなくなった。次に、pBBRoprH ベクターを用いて *P. putida* KT2440ΔoprH に OprH を相補した *P. putida* KT2440ΔoprH(pBBRoprH) を受容菌として用いた接合実験を行った。その結果、二価カチオン添加により接合伝達頻度は 3.8×10^{-7} から 4.6×10^{-6} に上昇し、部分的ではあるが二価カチオン要求性の回復が見られた。

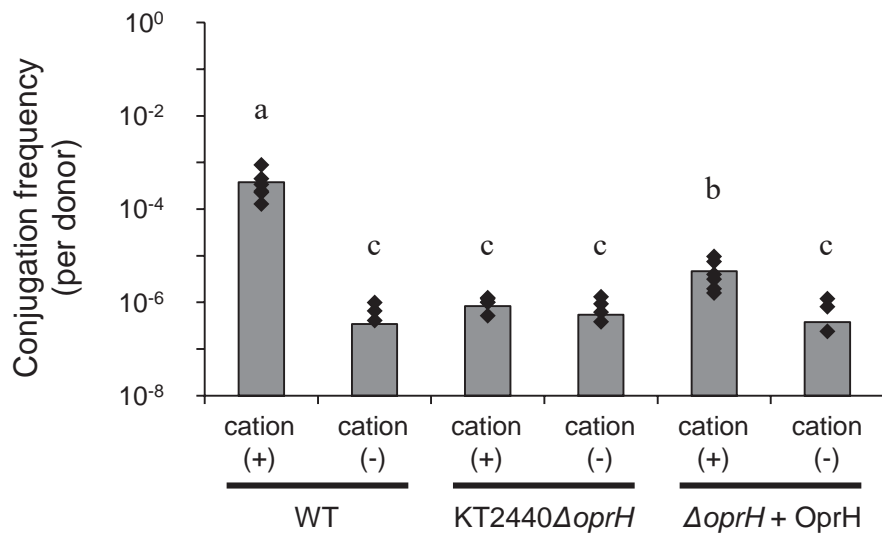


Fig. 5-7. OprHが二価カチオン要求性に及ぼす影響の評価 [Sakuda *et al.*, 2018a, Fig. 4]
 供与菌として*P. fluorescens* Pf0-1L(pCAR1pmrHis::Gm)株を、受容菌として*P. putida* KT2440KR株を用いた接合伝達頻度を示す。接合条件は30°Cで24 hとし、二価カチオン (Ca²⁺, Mg²⁺) の添加濃度は400 μMとした。6連で行った相加平均をバーで示し、各値を◆で示す。図中のa、bおよびcは、多群間有意差検定において、異なるアルファベットで示す群の間に有意差があることを示す (Kruskal-Wallis test, $P < 0.05$; Steel-Dwass test $p < 0.05$, $n = 6$)。

5-4. 考察

本項の内容は、学術雑誌論文として出版する計画があるため公表できない。本項の内容は5年以内に出版予定である。

なお、本章の内容については以下の原著論文で発表した。

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

第6章

総括と展望

本章の内容は、学術雑誌論文として出版する計画があるため公表できない。

なお、本章の内容は5年以内に出版予定である。

補章 1

菌密度がプラスミドの接合伝達に及ぼす影響の評価

S1-1. 緒言

先行研究において、菌密度および接合状態（液体中あるいはフィルター上）の違いがプラスミドの接合伝達頻度に影響を及ぼす現象が示唆されていた。本章では、本現象への接合時間および受容菌数の影響について評価した。

S1-2. 材料と方法

S1-2-1. 使用した菌株およびプラスミド

本章で新たに使用した菌株およびプラスミドを Table S1-1 に示す。培地、培養条件および培地への抗生物質の添加は第 2 章と同様の条件を用いた。

S1-2-2. *P. putida* SM1443(R388::*rfp*)および *P. putida* SM1443(NAH7K2)の作製 [共同研究者新谷政己博士により作製]

Shintani らの方法 [Shintani *et al.*, 2008a] と同様に、 $P_{A1/04/03}::rfp$ 遺伝子カセットを有するプラスミド pSM1833 [Haagensen *et al.*, 2002] を *E. coli* S17-1 λ pir から *E. coli* HB101(R388)に伝達させることで R388::*rfp* が作製され、*P. resinovorans* CA10dm4RG への接合伝達体 *P. resinovorans* CA10dm4RG(R388::*rfp*)が得られた。接合伝達により当該プラスミドの *P. putida* SM1443 への接合伝達体を得ることで目的の *P. putida* SM1443(R388::*rfp*)が作製された。遺伝子の挿入位置はプライマー rfp-R (5'-CAGCCAATCCCTGGGTGAGTTTCACCAGTT-3') を用いて配列を確認することで決定され、プラスミド R388 [DDBJ/EMBL/GenBank Accession No. BR000038] の 19,965 番目の塩基 (ORF23 (hypothetical protein) と ORF24 (hypothetical protein) の間) への挿入が確認されている。また、*P. putida* SM1443(NAH7K2)についても同様に、*E. coli* MVK2 [Miyazaki *et al.*, 2008] から *P. putida* SM1443 への接合伝達体を取得することで作製された。

S1-2-3. 接合実験

詳細な実験操作は補章 3「S3-10. 接合実験 (液体接合)」および「S3-10. 接合実験 (フィルター接合)」に示し、ここでは概要のみを記述する。菌体濁度を供与菌は $OD_{600} = 2 \times 10^1 - 2 \times 10^4$ 、受容菌は $OD_{600} = 2 \times 10^0 - 2 \times 10^{-3}$ となるようにそれぞれ菌液を調製し、供与菌 : 受容菌 = 1:10 の比率となる組み合わせで接合実験に供した。供与菌と受容菌それぞれ 200 μ L ずつを混合し 30°C で 1.5 h あるいは 3 h、液体中 (液体接合) あるいはフィルター上 (フィルター接合) で静置培養した後、 $10^0 \sim 10^6$ 倍希釈した培養液を選択培地に 10 μ L ずつスポットした。接合伝達頻度の算出には、従来と同様の [接合伝達頻度 = 接合伝達体数 / 供与菌数] (以降、接合伝達頻度_Dと表記) および、受容菌数を考慮した [接合伝達頻度 = 接合伝達体数 / (供与菌数 * 受容菌数)] (以降、接合伝達頻度_{DR}と表記) を採用した。

Table S1-1. 本章で新たに使用した菌株およびプラスミド

Bacterial strain or plasmid	Relevant characteristic(s) ^a	Source or reference
Bacterial strains		
<i>E. coli</i> BM21 (F ⁺ tet)	F ⁺ [<i>tra</i> 436 <i>proAB</i> + <i>lacP</i> <i>lacZ</i> AM15 <i>pro</i> + <i>TnJ0</i>], Tc ^r	Pasteur Institute
<i>E. coli</i> MVK2	<i>E. coli</i> MV1190 harboring NAH7K2, Km ^r	Miyazaki <i>et al.</i> , 2008
<i>E. coli</i> QC774	F ⁻ Δ <i>lac</i> 4169 <i>rpsL</i> Φ (<i>sodA-lacZ</i>)49 Φ (<i>sodB-kam</i>)1- Δ 2), Cm ^r , Km ^r	NBRP
<i>E. coli</i> S17-1 λ <i>pir</i> (pSM1833)	<i>E. coli</i> S17-1 λ <i>pir</i> harboring pSM1833, Km ^r	This study
<i>P. putida</i> SM1443(NAH7K2)	<i>P. putida</i> SM1443 harboring NAH7K2, Km ^r	Yanagida <i>et al.</i> , 2016; This study
<i>P. putida</i> SM1443(R388:: <i>rfp</i>)	<i>P. putida</i> SM1443 harboring R388:: <i>rfp</i> , Km ^r	Yanagida <i>et al.</i> , 2016; This study
Plasmids		
pSM1833	pUTKm with P _{A1-04/03} :: <i>rfp</i> cassette	Haagensen <i>et al.</i> , 2002
R388:: <i>rfp</i>	Antibiotic resistance plasmid, IncW group, with Km ^r gene and <i>rfp</i> cassette	Yanagida <i>et al.</i> , 2016; This study

^a Tc^r, Km^r, Cm^r はそれぞれ tetracycline (12.5 μ g/mL)、kanamycin (50 μ g/mL)、chloramphenicol (30 μ g/mL) への耐性を持つことを示す。

S1-3. 結果

S1-3-1. 菌密度が接合伝達頻度 D に及ぼす影響の評価 [共同研究者柳田晃輔氏による実験結果]

pCAR1、pB10、R388、NAH7 の 4 種のプラスミドについて、菌密度が異なる条件下での接合伝達頻度 D を Fig. S1-1 に示す。液体接合時には、pCAR1 および pB10 について、#2; 受容菌 $OD_{600} = 2 \times 10^0$ の場合に最も接合伝達頻度 D が高く、より菌密度が高い場合 (#1; 受容菌 $OD_{600} = 2 \times 10^1$) には、接合伝達頻度 D が低くなる現象が見られた (Fig. S1-1A)。また、菌密度の低い場合 (#4; 受容菌 $OD_{600} = 2 \times 10^{-2}$ 、#5; 受容菌 $OD_{600} = 2 \times 10^{-3}$) に、R388 は#5 の条件下で、NAH7 は#4 および#5 の条件下で接合伝達頻度 D が検出限界以下になる現象が見られた (Fig. S1-1A)。

また、フィルター上での接合時には、pB10、R388、NAH7 の 3 種のプラスミドは 10^{-1} 程度の高頻度で伝達し、菌密度の差による接合伝達頻度 D の違いはほとんど見られなかった (Fig. S1-1B)。一方で、pCAR1 については菌密度の低下に伴い、接合伝達頻度 D が 100 倍以上低下する傾向が見られた (Fig. S1-1B)。

同菌密度条件下で液体接合・フィルター接合時の各プラスミドの接合伝達頻度 D を比較すると、pB10、R388、NAH7 の 3 種については、低菌密度条件下 (#4、#5) においてフィルター接合の方が接合伝達頻度 D が高いのに対し、pCAR1 は低菌密度条件下 (#4、#5) では液体接合の方が接合伝達頻度 D が高かった (Fig. S1-1AB, #4-5)。

この違いについて、pCAR1 は長くしなやかな性線毛を形成する MPF_F family に属し、他の 3 種は短く固い性線毛を形成する MPF_T family に属していることに着目し、挙動の違いが MPF family の違いに由来する可能性が考えられた。そこで pCAR1 と同じ MPF_F family に属する pDK1 および F プラスミドの接合伝達における菌密度の影響が評価されたが、いずれも pCAR1 とは異なる傾向を示した (Fig. S1-2)。pDK1 は液体・フィルター接合時いずれも菌密度変化の影響を受け (Fig. S1-2A)、F プラスミドは液体接合時に菌密度の低下に伴い接合伝達頻度 D が低下し、フィルター接合時は菌密度変化の影響をほとんど受けなかった (Fig. S1-2B)。

S1-3-2. 接合時間が接合伝達頻度 D に及ぼす影響の評価

上述の実験結果のうち、菌密度依存的な接合伝達頻度 D の差が検出されなかった条件について、接合時間が長く接合伝達イベントが飽和したために、接合伝達頻度 D の差が正確に検出できていない可能性が懸念された。そこで、pCAR1 の液体接合および pB10 のフィルター接合について、3 h から 1.5 h に接合時間を短くした接合実験を行った。なお、実験操作に要する時間を考慮した場合の最短の接合時間として 1.5 h を採用し、1 連の実験を複数回繰り返すことで再現性を確認した。

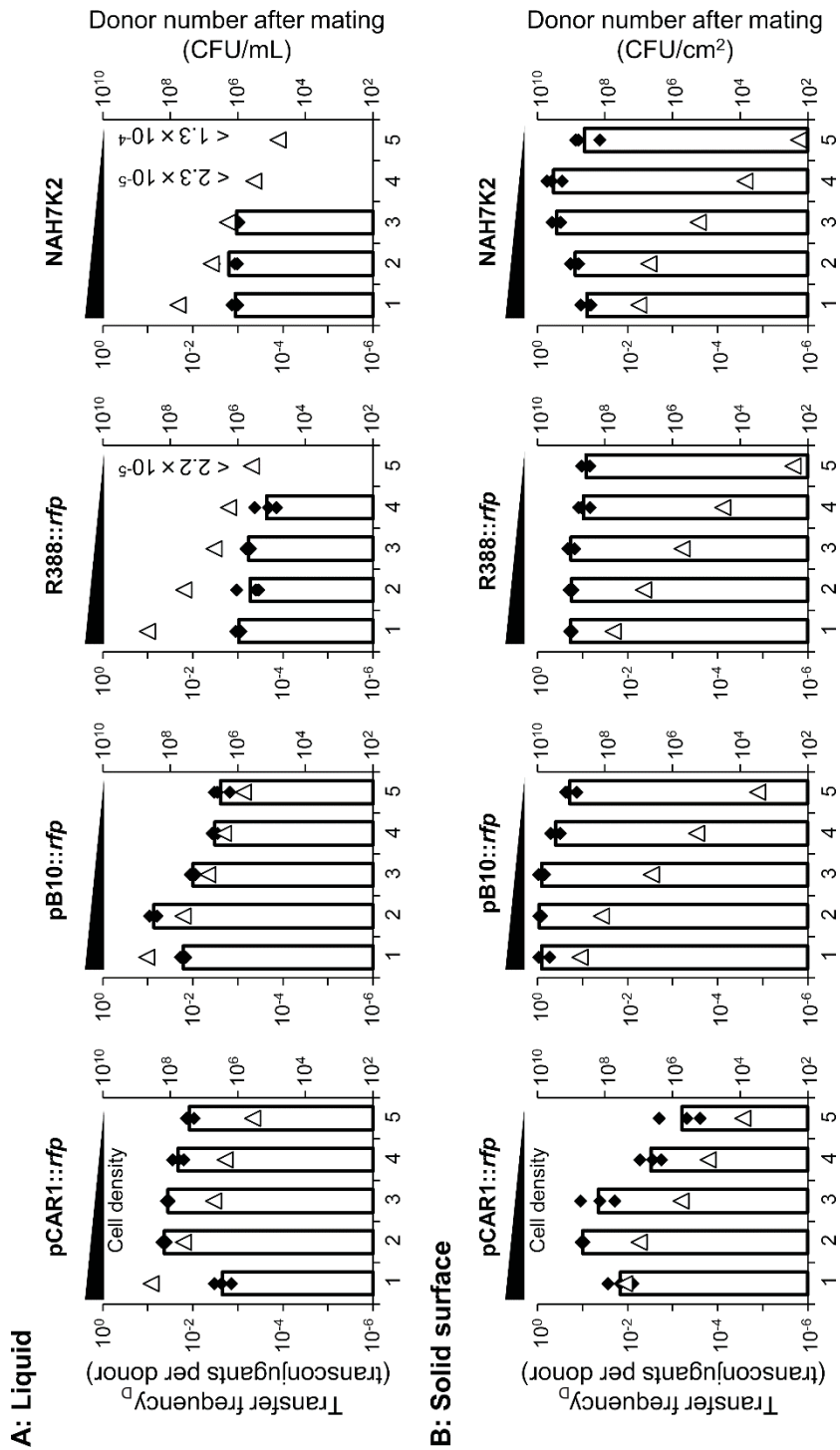
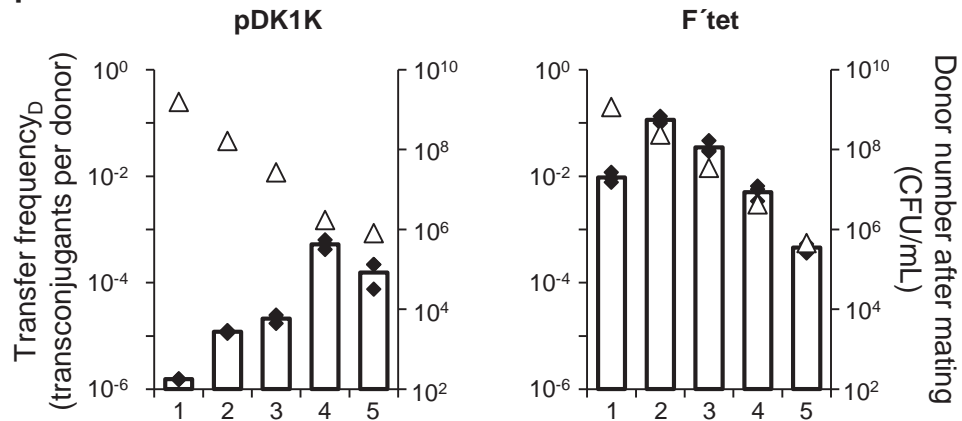


Fig. S1-1. 異なる菌密度条件下での接合伝達頻度_Dの比較 [Yanagida et al., 2016, Fig. 1, modified] 供与菌として *P. putida* SM1443 プラスミド保持株を、受容菌として *P. putida* KT2440RG を使用した液体条件下 (A) あるいはフィルム上 (B) の接合実験における各プラスミドの接合伝達頻度_Dを示す。LB 液体培地を用いて、OD₆₀₀ の値を [供与菌 : 受容菌] = $[2 \times 10^0 : 2 \times 10^1]$ (1), $[2 \times 10^{-1} : 2 \times 10^1]$ (2), $[2 \times 10^{-2} : 2 \times 10^1]$ (3), $[2 \times 10^{-3} : 2 \times 10^{-1}]$ (4), $[2 \times 10^{-4} : 2 \times 10^{-3}]$ (5) とし、30°C で 3 h の接合実験を行った。供与菌の保持プラスミドをグラフ上部に示し、縦軸が接合伝達頻度_Dを示す。3連で行った相対平均をバーで示し、各値を ◆ で示す。△ が伝達頻度算出時の供与菌数を示す。

A: Liquid



B: Solid surface

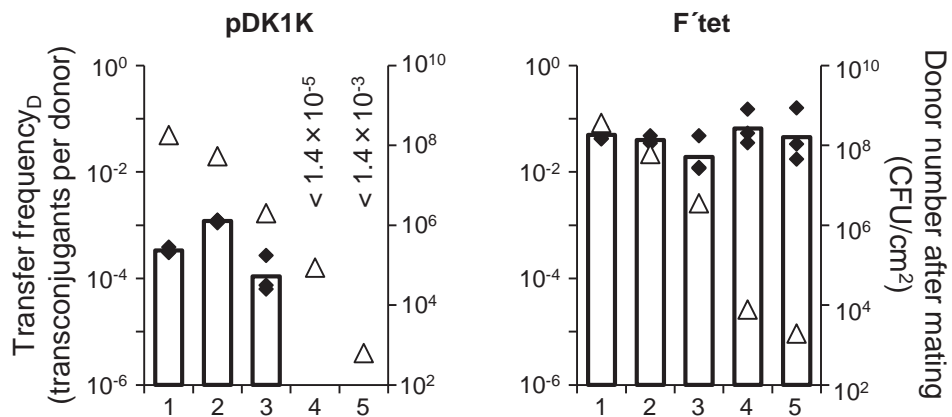


Fig. S1-2. 異なる菌密度条件下での接合伝達頻度_Dの比較 [Yanagida *et al.*, 2016, Fig. S1, modified] 供与菌として *P. fluorescens* Pf-5S(DK1K)を、受容菌として *P. fluorescens* Pf-5Gを使用、あるいは供与菌として *E. coli* BM21(F'tet)を、受容菌として *E. coli* QC774を使用した、液体条件下 (A) あるいはフィルター上 (B) での接合実験における各プラスミドの接合伝達頻度_Dを示す。LB液体培地を用いて、OD₆₀₀ の値を [供与菌 : 受容菌] = [2 × 10⁰: 2 × 10¹] (1), [2 × 10⁻¹: 2 × 10⁰] (2), [2 × 10⁻²: 2 × 10⁻¹] (3), [2 × 10⁻³: 2 × 10⁻²] (4), [2 × 10⁻⁴: 2 × 10⁻³] (5) とし、30°Cで3 h (pDK1K) あるいは37°Cで1 h (F'tet) の接合実験を行った。供与菌の保持プラスミドをグラフ上部に示し、縦軸が接合伝達頻度_Dを示す。3連で行った相加平均をバーで示し、各値を◆で示す。△が伝達頻度算出時の供与菌数を示す。

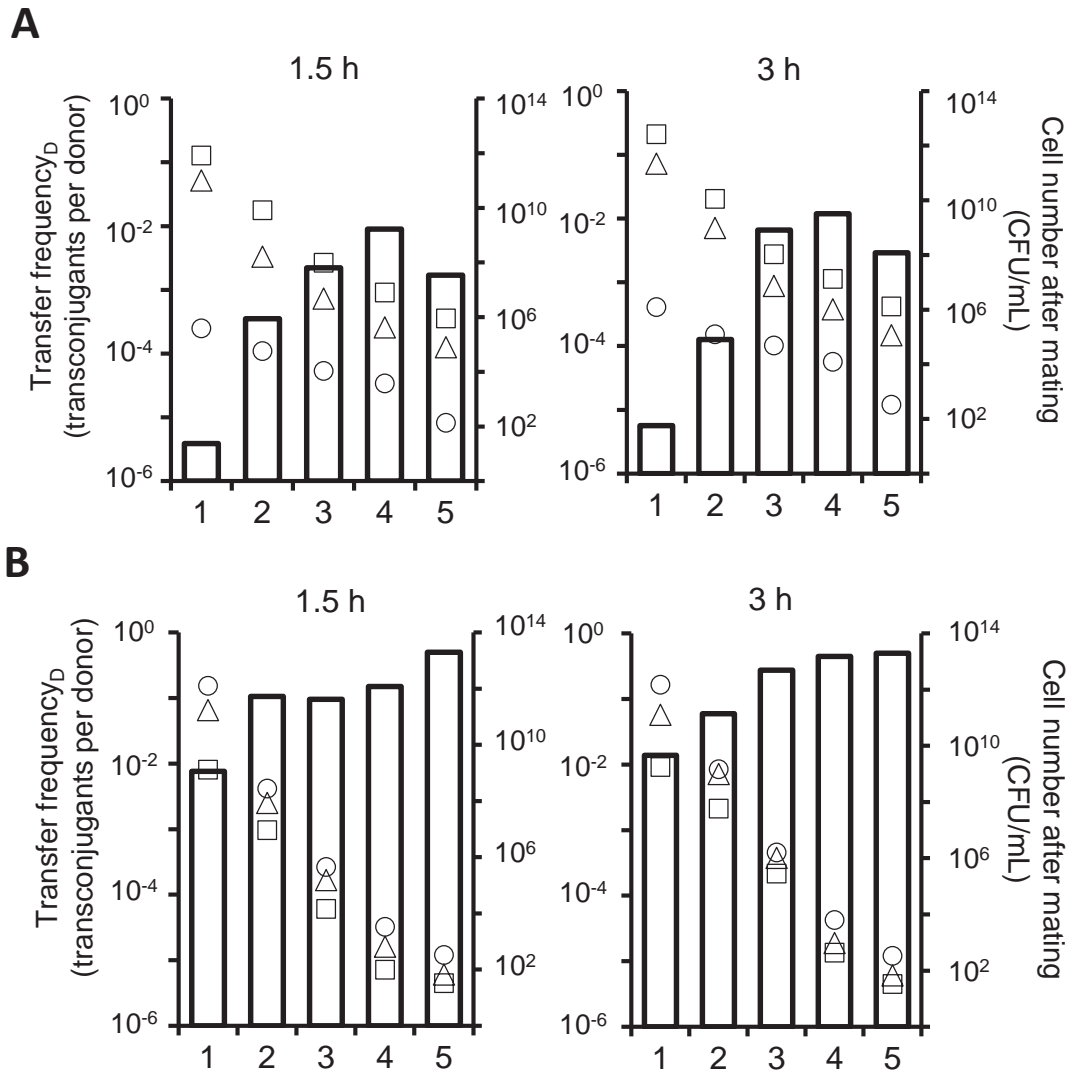


Fig. S1-3. 異なる菌密度条件下での接合伝達頻度_Dに接合時間が及ぼす影響の評価
 供与菌として*P. putida* SM1443(pCAR1::*rfp*) (A) あるいは*P. putida* SM1443(pB10::*rfp*) (B)を、
 受容菌として*P. putida* KT2440RGを使用した液体 (A) あるいはフィルター (B) 接合条件
 下での接合実験における各プラスミドの接合伝達頻度_Dを示す。接合伝達頻度_Dは
 transconjugants/donorで算出した。OD₆₀₀の値を[供与菌：受容菌]=[2 × 10⁰: 2 × 10¹] (1),
 [2 × 10⁻¹: 2 × 10⁰] (2), [2 × 10⁻²: 2 × 10⁻¹] (3), [2 × 10⁻³: 2 × 10⁻²] (4), [2 × 10⁻⁴: 2 × 10⁻³]
 (5) とし、30 °Cで1.5 hあるいは3 hの接合実験を行い、接合時間をグラフ上部に示す。縦
 軸が接合伝達頻度_Dを示す。△が伝達頻度算出時の供与菌数、□が受容菌数、○が接合
 伝達体数を示す。

結果を Fig. S1-3 に示す。pCAR1 (Fig. S1-3A) および pB10 (Fig. S1-3B) のいずれのプラスミドについても、接合時間が 1.5 h の場合と 3 h の場合を比較して顕著な接合伝達頻度 D の違いは見られず、S1-3-1 で見られた現象への接合時間の影響は確認できなかった。

S1-3-3. 受容菌数を考慮した接合伝達頻度 D_R の算出

本研究においては、供与菌数：受容菌数の比を 1:10 に固定した接合実験系を用い、接合伝達頻度 D の算出にはこれまで供与菌数のみが反映される方法 [接合伝達体数 / 供与菌数] を採用していた。S1-3-1 で見られた接合伝達頻度 D の違いについて、受容菌数を反映させることでよりその差を大きくし比較できる可能性が考えられたため、Król らの方法を参照し、受容菌数を反映した接合伝達頻度 D_R を [接合伝達体数 / (供与菌数 * 受容菌数)] で算出した議論を検討した [Król *et al.*, 2003]。

供与菌数のみから頻度算出をしていた場合には $10^{-6} \sim 10^0$ の範囲であった接合伝達頻度 D に対し、接合伝達頻度 D_R は $10^{-18} \sim 10^{-3}$ の値として算出され、菌密度低下に伴い接合伝達頻度 D_R は大きくなる傾向が見られた (Fig. S1-4AB)。しかし、供与菌数：受容菌数比を固定した本実験系において、この菌密度変化と接合伝達頻度 D_R の関係性は、S1-3-1 および S1-3-2 における菌密度変化と接合伝達頻度 D の関係性と同様であると考えられたため、本研究においては、従来の供与菌数から算出した接合伝達頻度 D のみによる議論を採用することとした。

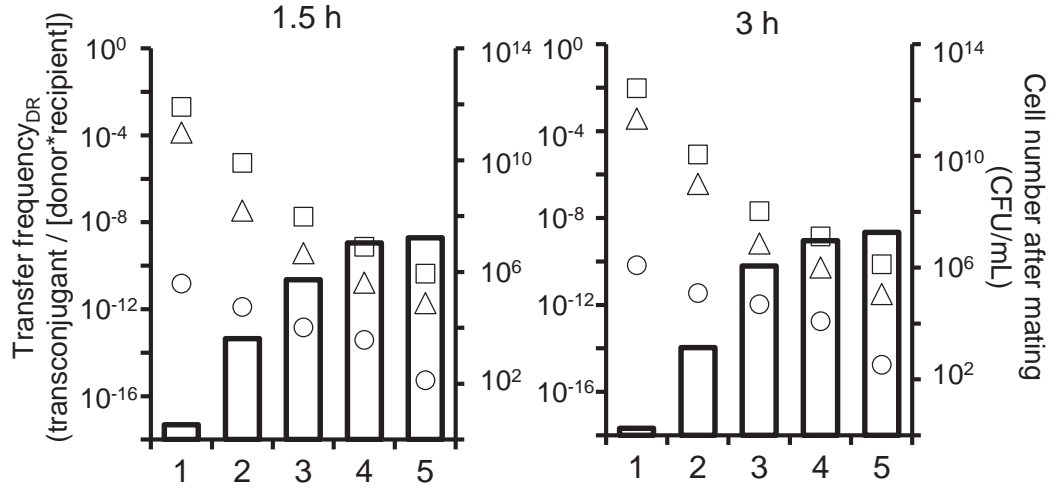
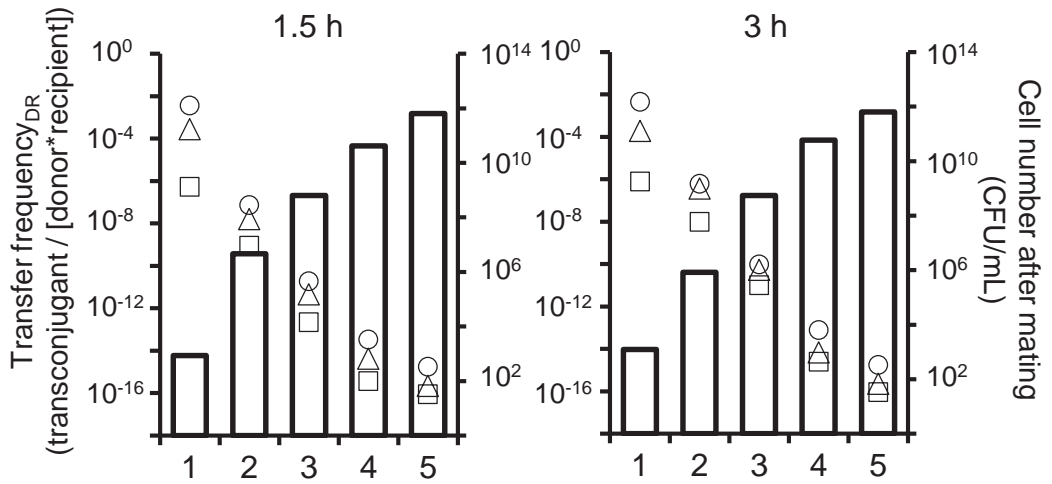
A**B**

Fig. S1-4. 受容菌数を反映した接合伝達頻度_{DR}

供与菌として *P. putida* SM1443(pCAR1::rfp) (A) あるいは *P. putida* SM1443(pB10::rfp) (B) を、受容菌として *P. putida* KT2440RG を使用した液体 (A) あるいはフィルター (B) 接合条件下での接合実験における各プラスミドの接合伝達頻度_{DR} を示す。接合伝達頻度_{DR} は transconjugants/[donor*recipient] で算出した。OD₆₀₀ の値を [供与菌 : 受容菌] = [2 × 10⁰ : 2 × 10¹] (1), [2 × 10⁻¹ : 2 × 10⁰] (2), [2 × 10⁻² : 2 × 10⁻¹] (3), [2 × 10⁻³ : 2 × 10⁻²] (4), [2 × 10⁻⁴ : 2 × 10⁻³] (5) とし、30 °C で 1.5 h あるいは 3 h の接合実験を行い、接合時間をグラフ上部に示す。縦軸が接合伝達頻度_{DR} を示す。△ が伝達頻度算出時の供与菌数、□ が受容菌数、○ が接合伝達体数を示す。

S1-4. 考察

S1-4-1. 菌密度変化が接合伝達頻度 D に及ぼす影響

共同研究者によって行われた、菌密度および接合状態の違い（液体中あるいはフィルター上）と、プラスミドの接合伝達頻度 D の関係を評価した実験の結果、菌密度あるいは接合状態依存的な挙動変化が確認された。興味深いことに、pCAR1の接合伝達頻度 D はフィルター接合時に菌密度変化の影響を受けやすいのに対し、R388、NAH7の接合伝達頻度 D は液体接合時に菌密度変化の影響を受けやすく、またpB10についてはいずれの環境下でも比較的安定して菌密度の影響を受けずに接合伝達する傾向が見られた（Fig. S1-1）。この原因として性線毛を形成するMPF familyの違いに起因する可能性を検討したが、pCAR1と同じMPF_F familyに属するpDK1およびFプラスミドにおいて、pCAR1とは異なる挙動が見られたことから（Fig. S1-2）、菌密度依存性には他の要因が関与していると考えられた。過去の報告では、大腸菌を宿主とした接合実験から、性線毛の違いが液体中とフィルター上での接合伝達頻度の違いを決定する主要な要因であると言われていたが [Bradley *et al.*, 1980]、本報告から宿主・プラスミドの種類によって、その接合状態と接合伝達頻度の相性は異なる場合があることが示唆された。

本研究から、菌密度および接合状態の違いはプラスミドの挙動を大きく変化させる事実が明らかになった。このことから、従来の限られた条件下での実験ではプラスミドの挙動の一部を評価しているに過ぎず、実環境中では環境因子がプラスミドの挙動に大きく影響を及ぼしていることが推測される。また、プラスミドごとに菌密度および接合状態の違いの及ぼす影響が異なったことから、プラスミドが多様な生存戦略を有することが示唆される。

S1-4-2. 接合時間が接合伝達頻度 D に及ぼす影響

接合伝達頻度 D の差を、接合時間を短くした接合実験を行うことで検出することを目的とし、接合時間が1.5 hの場合と3 hの場合の接合伝達頻度 D を比較したが、接合伝達頻度 D の違いは見られなかったことから（Fig. S1-3）、本研究で採用した実験系を用いて短時間の接合イベントにおける菌密度依存的な接合伝達頻度 D の差を検出することは困難であると考えられた。

大腸菌のプラスミドR1-16の接合伝達体が供与菌と受容菌の混合後3 minで生じる例も報告されており [Gruber *et al.*, 2016]、プラスミドの接合伝達イベントはさらに短い時間の間に生じていることが推測される。より詳細なプラスミドの挙動評価（接合伝達イベントのみを切り取る）には、接合初期からの経時的な接合伝達イベントを検出する技術開発が必要であると考えられる。フローサイトメトリーを活用した培養を介さずに接合伝達体を検出する方法や、マイクロデバイスを利用した一細胞レベルで接合伝達イベントを検出する方法などの開発・適用が期待される。

S1-4-3. 受容菌数が接合伝達頻度に及ぼす影響

本研究では、受容菌数を反映した接合伝達頻度 R_D を算出し、従来の供与菌数のみを用いて算出した接合伝達頻度 D との比較を行った。受容菌数を反映することで、算出される接合伝達頻度 R_D に値の幅が生じ、より広範囲での伝達頻度の比較が可能となった。しかし、本研究においては、供与菌数：受容菌数の比を 1:10 に固定した（すなわち、供与菌数から受容菌数が決定する）実験系を採用しており、広範囲での頻度比較および受容菌数の考慮は不要であると判断した。

供与菌および受容菌数を反映した接合伝達頻度 R_D は、供与菌数と受容菌数が独立に変化するような接合実験系においては、各菌株の影響を考慮し、広範囲で頻度の差を比較する上で非常に有用であると考えられる。技術開発に伴い、複合微生物系を扱う接合実験が可能になりつつあることから、より複雑な環境下での正確なプラスミドの挙動評価系が求められ、実験系に合わせた適切な伝達頻度算出法が重要になると考える。

なお、本章の内容については以下の原著論文で発表した。

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.

補章 2

二価カチオン添加により転写変動した遺伝子のリスト

Table S2-1. 二価カチオン添加により単独培養時に転写変動した供与菌染色体上の遺伝子

Table S2-2. 二価カチオン添加により受容菌との混合時に転写変動した供与菌染色体上の遺伝子

Table S2-3. 二価カチオン添加により単独培養時に転写変動した受容菌染色体上の遺伝子

Table S2-4. 二価カチオン添加により供与菌との混合時に転写変動した受容菌染色体上の遺伝子

Table S2-1. 二価カチオン添加により単独培養時に転写変動した供与菌染色体上の遺伝子 [Sakuda *et al.*, 2018a, TableS4-1, modified]

Name	Gene	Product	Start	End	Strand	COG	^a Donor [PF]				^b Fold change between PF_CP and PF_CM					
							CM1		CP1		CP1 vs CP2		CP1 vs CP2		CP2 vs CP2	
							CM1	CM2	CP1	CP2	CM1	CM2	CM1	CM2		
Pf01_0193	hypothetical protein	234178	234360	+	S	155	106	615	311	4.0	5.8	2.0	2.9			
Pf01_0750	hypothetical protein	882544	883215	-	S	699	225	91	76	-7.7	-2.5	-9.1	-2.9			
Pf01_0751	Iron-sulfur cluster binding protein	883215	884669	-	C	728	256	81	83	-9.0	-3.2	-8.8	-3.1			
Pf01_0752	hypothetical protein	884666	885490	-	C	867	305	93	113	-9.4	-3.3	-7.7	-2.7			
Pf01_0753	L-lactate permease	885641	887335	-	C	1247	420	77	87	-16.2	-5.4	-14.4	-4.9			
Pf01_0877	sulfate adenylyltransferase subunit 2	1023859	1024776	+	E	155	175	467	403	3.0	2.7	2.6	2.3			
Pf01_1545	<i>fljL</i> flagellar basal body-associated protein FljL	1734056	1734559	+	N	432	375	172	152	-2.5	-2.2	-2.8	-2.5			
Pf01_2346	transcriptional regulator	2706796	2707443	-	K	64	64	211	207	3.3	3.3	3.2	3.2			
Pf01_2404	hemerythrin HHE cation binding protein	2764258	2764734	+	-	64	64	304	134	4.8	4.8	2.1	2.1			
Pf01_2596	hypothetical protein	2974774	2975763	-	-	317	456	113	64	-2.8	-4.0	-5.0	-7.1			
Pf01_4819	general secretion pathway protein H	5439071	5439487	-	N	64	69	214	152	3.3	3.1	2.4	2.2			

^a 供与菌と受容菌はそれぞれ'PF'、'KT'と示し、二価カチオンの有無はそれぞれ'CP' (cation plus)、'CM' (cation minus) で示している。CPとCMの後の数字は'replicate 1'、'replicate 2'を示す。

^b 二価カチオン添加により転写が増加 (>2.0) あるいは減少 (<-2.0) したものについて、それぞれ赤色、青色の数字で示している。

Table S2-2. 二価カチオン添加により受容菌との混合時に転写変動した供与菌染色体上の遺伝子 [Sakuda et al., 2018a, TableS4-2, modified]

Name	Gene	Product	Start	End	Strand	COG	^a Mixture [PF+KT]						^b Fold change between PF+KT_CP and PF+KT_CM							
							CM1		CM2		CP1		CP2		CP1 vs CP2 vs CP2 vs		CP1 vs CP2 vs CP2 vs		CP1 vs CP2 vs CP2 vs	
							CM1	CM2	CM1	CM2	CP1	CP2	CM1	CM2	CM1	CM2	CM1	CM2	CM1	CM2
Pf01_0348		hypothetical protein	393610	394047	-	-	205	147	64	64	64	64	-3.2	-2.3	-3.2	-2.3				
Pf01_0712		flavin reductase-like protein	842027	842536	-	R	713	364	178	132	132	132	-4.0	-2.0	-5.4	-2.8				
Pf01_0775	<i>tpiA</i>	triosephosphate isomerase	910161	910916	+	G	474	265	74	129	129	129	-6.4	-3.6	-3.7	-2.0				
Pf01_2110		hypothetical protein	2398016	2398222	+	-	218	132	64	64	64	64	-3.4	-2.1	-3.4	-2.1				
Pf01_4241		outer membrane protein H1	4783358	4783963	-	-	926	679	292	318	318	318	-3.2	-2.3	-2.9	-2.1				
Pf01_5423		hypothetical protein	6088604	6088942	+	-	165	423	64	64	74	74	-2.6	-6.6	-2.2	-5.7				
Pf01_5737		F0F1 ATP synthase subunit I	6429127	6429534	-	C	164	146	64	64	65	65	-2.6	-2.3	-2.5	-2.3				

^a 供与菌と受容菌はそれぞれ 'PF'、'KT' と示し、二価カチオンの有無はそれぞれ 'CP' (cation plus)、'CM' (cation minus) で示している。CP と CM の後の数字は 'replicate 1'、'replicate 2' を示す。

^b 二価カチオン添加により転写が増加 (>2.0) あるいは減少 (<2.0) したものについて、それぞれ赤色、青色の数字で示している。

Table S2-3. 二価力チオソニ添加により単独培養時に転写変動した受容菌染色体上の遺伝子 [Sakuda et al., 2018a, TableS4-3, modified]

Name	Gene	Product	Start	End	Strand	COG	^a Recipient [KT]						^b Fold change between KT CP and KT CM							
							CMI		CP1		CP2		CPI vs CMI		CP2 vs CMI		CPI vs CP2		CP2 vs CM2	
							CMI	CP2	CP1	CP2	CMI	CP2	CMI	CP2	CMI	CP2	CMI	CP2	CMI	CP2
PP_0056		oxidoreductase, GMC family	64943	66595	+	E	652	1943	236	137	-2.8	-8.2	-4.8	-14.2						
PP_0169		dioxygenase, TauD/TidA family	221228	222127	+	Q	1275	1482	198	312	-6.4	-7.5	-4.1	-4.8						
PP_0170		ABC transporter, periplasmic binding protein	222145	223164	+	P	711	673	74	90	-9.5	-9.0	-7.9	-7.4						
PP_0171		ABC transporter, ATP-binding protein	223171	224034	+	P	448	455	64	64	-7.0	-7.1	-7.0	-7.1						
PP_0172		ABC transporter, permease protein	224049	224912	+	P	209	207	64	64	-3.3	-3.2	-3.3	-3.2						
PP_0220		ABC transporter, ATP-binding protein	272657	273766	-	P	576	485	64	64	-9.0	-7.6	-9.0	-7.6						
PP_0221		ABC transporter, periplasmic binding protein, putative	273768	274568	-	P	619	481	64	64	-9.7	-7.5	-9.7	-7.5						
PP_0222		monooxygenase, DszA family	274561	275946	-	C	889	722	64	64	-13.9	-11.3	-13.9	-11.3						
PP_0223		monooxygenase, DszC family	275946	277166	-	I	985	1025	72	64	-13.7	-14.2	-15.4	-16.0						
PP_0224		monooxygenase, DszC family	277263	278504	-	I	1014	1415	64	93	-15.8	-22.1	-10.9	-15.2						
PP_0231	<i>tauC</i>	taurine ABC transporter, permease protein	285497	286336	-	P	832	868	371	264	-2.2	-2.3	-3.2	-3.3						
PP_0232	<i>tauB</i>	taurine ABC transporter, ATP-binding protein	286333	287121	-	P	794	859	270	347	-2.9	-3.2	-2.3	-2.5						
PP_0237	<i>ssuA</i>	sulfonate ABC transporter, periplasmic sulfonate-binding protein SsuA	291618	292583	+	P	1580	2137	243	182	-6.5	-8.8	-8.7	-11.7						
PP_0238	<i>ssuD</i>	organosulfonate monooxygenase	292643	293791	+	C	1248	1520	192	112	-6.5	-7.9	-11.1	-13.5						
PP_0239	<i>ssuC</i>	sulfonate ABC transporter, permease protein SsuC	293802	294599	+	P	981	1069	141	64	-7.0	-7.6	-15.3	-16.7						
PP_0240	<i>ssuB</i>	sulfonate ABC transporter, ATP-binding subunit SsuB	294596	295408	+	P	979	996	242	103	-4.0	-4.1	-9.5	-9.7						
PP_0241	<i>ssuF</i>	organosulfonate utilization protein SsuF	295436	295651	+	H	331	426	113	64	-2.9	-3.8	-5.2	-6.7						
PP_0354		CBS domain protein	430375	432312	-	T	632	363	1792	1769	2.8	4.9	2.8	4.9						
PP_0374		hypothetical protein	454297	454455	+	-	152	326	64	64	-2.4	-5.1	-2.4	-5.1						
PP_0751	<i>mgo-1</i>	malate:quinone oxidoreductase	868077	869585	-	R	789	510	1982	2262	2.5	3.9	2.9	4.4						
PP_0943	<i>fagA</i>	fagA protein	1088756	1089148	+	-	340	198	1223	1142	3.6	6.2	3.4	5.8						
PP_0944	<i>fumC-1</i>	fumarate hydratase, class II	1089138	1090517	+	C	366	143	1029	1320	2.8	7.2	3.6	9.2						
PP_0945		conserved hypothetical protein	1090545	1091006	+	-	642	236	1719	2232	2.7	7.3	3.5	9.5						
PP_0946	<i>sodA</i>	superoxide dismutase (Mn)	1090987	1091619	+	P	101	64	314	296	3.1	4.9	2.9	4.6						
PP_1089		hypothetical protein	1248253	1248735	-	-	196	343	87	64	-2.2	-3.9	-3.1	-5.4						
PP_1110		serine O-acetyltransferase, putative	1269764	1270315	+	E	64	64	349	475	5.4	5.4	7.4	7.4						
PP_1111		synthetase, putative	1270312	1271100	+	R	64	64	490	713	7.7	7.7	11.1	11.1						
PP_1112		conserved hypothetical protein	1271097	1272308	+	G	64	64	715	947	11.2	11.2	14.8	14.8						
PP_1113		pyridoxal-phosphate dependent enzyme family protein	1272305	1273207	+	E	65	78	522	497	8.0	6.7	7.6	6.3						
PP_1172		hypothetical protein	1346975	1347190	+	-	289	383	112	69	-2.6	-3.4	-4.2	-5.6						
PP_1185	<i>oprH</i>	outer membrane protein H1	1360133	1360738	+	M	4900	4864	1256	1004	-3.9	-3.9	-4.9	-4.8						
PP_1186	<i>phoP</i>	transcriptional regulatory protein PhoP	1360935	1361612	+	T	2304	2203	472	436	-4.9	-4.7	-5.3	-5.1						
PP_1187	<i>phoQ</i>	sensor protein PhoQ	1361609	1362955	+	T	173	197	64	64	-2.7	-3.1	-2.7	-3.1						
PP_1267		conserved hypothetical protein	1449212	1449679	-	-	1434	1237	317	465	-4.5	-3.9	-3.1	-2.7						
PP_1357		conserved hypothetical protein	1546543	1547670	+	-	285	928	87	110	-3.3	-10.7	-2.6	-8.4						
PP_1387	<i>tigR</i>	transcriptional regulator TigR	1582808	1583440	+	K	191	202	64	71	-3.0	-3.2	-2.7	-2.8						
PP_1533		excisionase, putative	1739169	1739411	-	-	197	199	64	64	-3.1	-3.1	-3.1	-3.1						
PP_1535		methyltransferase, putative	1739819	1740283	-	-	210	212	73	85	-2.9	-2.9	-2.5	-2.5						
PP_1538		conserved hypothetical protein	1741156	1741908	-	-	183	237	69	64	-2.7	-3.4	-2.8	-3.7						
PP_1540		conserved hypothetical protein	1742872	1743096	-	-	316	361	111	121	-2.9	-3.3	-2.6	-3.0						

Table S2-3の続き 二価力チオン添加により単独培養時に転写変動した受容菌染色体上の遺伝子 [Sakuda et al., 2018a, TableS4-3, modified]

Name	Gene	Product	Start	End	Strand	COG	^a Recipient [KT]						^{b,c} Fold change between KT CP and KT CM							
							CM1		CM2		CPI		CP2		CPI vs CM1		CP2 vs CM1		CP2 vs CM2	
							CM1	CM2	CM1	CM2	CPI	CP2	CM1	CM2	CM1	CM2	CM1	CM2	CM1	CM2
PP_1541		methyltransferase, putative	1743287	1744207	-	L	210	234	72	64	-2.9	-3.2	-3.3	-3.7						
PP_1542		hypothetical protein	1744274	1744870	-	-	319	395	136	130	-2.4	-2.9	-2.5	-3.0						
PP_1543		hypothetical protein	1745211	1745756	-	-	179	235	67	71	-2.7	-3.5	-2.5	-3.3						
PP_1545		hypothetical protein	1746543	1747001	-	-	307	378	91	122	-3.4	-4.1	-2.5	-3.1						
PP_1546		hypothetical protein	1746998	1747267	-	-	250	231	64	64	-3.9	-3.6	-3.9	-3.6						
PP_1548		conserved hypothetical protein	1748226	1748663	-	P	173	189	86	78	-2.0	-2.2	-2.2	-2.4						
PP_1567		phage major capsid protein, HK97 family	1760849	1762093	+	-	137	220	65	68	-2.1	-3.4	-2.0	-3.3						
PP_1573		major tail protein, putative	1764089	1764823	+	-	155	211	66	64	-2.3	-3.2	-2.4	-3.3						
PP_1586		killer protein, putative	1777862	1778140	-	R	686	510	251	246	-2.7	-2.0	-2.8	-2.1						
PP_1635		DNA-binding response regulator	1832008	1832658	+	T	182	455	2427	2227	3.6	5.3	3.3	4.9						
PP_1691		conserved hypothetical protein	1883439	1883663	-	-	1125	2758	275	335	-4.1	-10.0	-3.4	-8.2						
PP_1742		conserved hypothetical protein	1942524	1942835	+	S	4223	3668	9952	8643	2.4	2.7	2.0	2.4						
PP_2135		hypothetical protein	2436589	2436705	-	-	474	1254	216	192	-2.2	-5.8	-2.5	-6.5						
PP_2177		transcriptional regulator, putative	2482550	2483104	+	K	174	184	64	77	-2.7	-2.9	-2.3	-2.4						
PP_2387		hypothetical protein	2725570	2726652	-	-	736	552	1629	2070	2.2	3.0	2.8	3.8						
PP_2388		transporter, LysE family	2726692	2727318	-	E	1014	783	2341	3182	2.3	3.0	3.1	4.1						
PP_2438		conserved hypothetical protein	2785601	2786665	-	P	153	217	64	64	-2.4	-3.4	-2.4	-3.4						
PP_2451		<i>endA-I</i> endonuclease I	2798042	2798734	-	L	1342	898	183	364	-7.4	-4.9	-3.7	-2.5						
PP_2500		conserved hypothetical protein	2846947	2847240	+	-	1191	1239	419	442	-2.8	-3.0	-2.7	-2.8						
PP_2541		transcriptional factor-related protein	2885321	2885875	-	-	677	469	171	225	-4.0	-2.7	-3.0	-2.1						
PP_2581		hypothetical protein	2948115	2948462	-	-	321	515	113	90	-2.8	-4.6	-3.6	-5.7						
PP_2598		hypothetical protein	2969337	2969684	+	-	215	434	64	92	-3.3	-6.8	-2.3	-4.7						
PP_2627		conserved hypothetical protein	3003417	3007037	+	S	151	134	64	64	-2.4	-2.1	-2.4	-2.1						
PP_2629		hypothetical protein	3009133	3009903	+	-	601	766	205	242	-2.9	-3.7	-2.5	-3.2						
PP_2630		hypothetical protein	3009908	3010762	+	-	632	620	120	224	-5.3	-5.6	-2.8	-3.0						
PP_2631		hypothetical protein	3010759	3010944	-	-	963	776	233	323	-4.1	-3.3	-3.0	-2.4						
PP_2645		<i>mgdB</i> magnesium-translocating P-type ATPase	3030691	3033453	+	P	158	224	64	71	-2.5	-3.5	-2.2	-2.4						
PP_2656		phosphate ABC transporter, periplasmic phosphate-binding protein	3043339	3044385	+	P	151	454	64	64	-2.4	-7.1	-2.3	-7.0						
PP_2662		conserved hypothetical protein	3048838	3050025	+	M	1441	2049	94	110	-15.3	-21.8	-13.1	-18.6						
PP_2762		conserved hypothetical protein	3146627	3147865	-	I	192	161	64	64	-3.0	-2.5	-3.0	-2.5						
PP_2764		<i>msuE</i> NADH-dependent FMN reductase MsuE	3148204	3148764	+	R	364	233	64	64	-5.7	-3.6	-5.7	-3.6						
PP_2765		sulfonate monooxygenase MsuD, putative	3148791	3149882	+	C	245	161	64	64	-3.8	-2.5	-3.8	-2.5						
PP_2773		hypothetical protein	3157511	3157669	-	-	1108	1262	404	520	-2.7	-3.1	-2.1	-2.4						
PP_2887		catalase, putative	3284809	3285861	-	P	64	64	353	243	5.5	5.5	3.8	3.8						
PP_2900		hypothetical protein	3297215	3297589	-	-	423	248	1293	1549	3.1	5.2	3.7	6.2						
PP_2909		conserved hypothetical protein	3307791	3308768	+	-	1544	981	256	435	-6.0	-3.8	-3.6	-2.3						
PP_2910		conserved hypothetical protein	3308883	3310133	+	R	708	509	174	234	-4.1	-2.9	-3.0	-2.2						
PP_2968		membrane protein, putative	3370638	3371771	-	R	151	231	65	64	-2.3	-3.5	-2.4	-3.6						
PP_2969		conserved hypothetical protein	3371782	3372069	-	S	3371782	3372069	64	85	-3.9	-5.7	-2.9	-4.2						
PP_2970		hypothetical protein	3372188	3372547	+	-	529	593	78	165	-6.8	-7.6	-3.2	-3.6						
PP_2986		oxidoreductase, putative	3384364	3385413	-	M	155	190	64	71	-2.4	-3.0	-2.2	-2.7						
PP_3016		lipopolysaccharide core biosynthesis protein, putative	3404647	3405480	+	-	384	1169	172	81	-2.2	-6.8	-4.7	-14.4						
PP_3023		amino acid efflux protein, putative	3409505	3409939	+	E	64	74	157	153	2.4	2.1	2.4	2.1						
PP_3068		hypothetical protein	3450778	3450969	+	-	282	298	114	127	-2.5	-2.6	-2.2	-2.4						
PP_3088		conserved hypothetical protein	3476877	3477962	-	S	64	64	129	166	2.0	2.0	2.6	2.6						
PP_3093		conserved hypothetical protein	3486664	3488007	-	S	96	122	290	376	3.0	2.4	3.9	3.1						

Table S2-3の続き 二価カチオン添加により単独培養時に転写変動した受容菌染色体上の遺伝子 [Sakuda et al., 2018a, TableS4-3, modified]

Name	Gene	Product	Start	End	Strand	COG	^a Recipient [KT]				^b Fold change between KT_CP and KT_CM			
							CM1	CM2	CP1	CP2	CP1 vs CM1	CP2 vs CM1	CP1 vs CM2	CP2 vs CM2
PP_3094		hypothetical protein	3488004	3488726	-	S	76	89	285	292	3.7	3.2	3.8	3.3
PP_3095		chaperone-associated ATPase, putative	3488751	3491387	-	O	113	126	283	308	2.5	2.2	2.7	2.4
PP_3111		hypothetical protein	3522156	3522260	+	-	299	286	69	86	-4.3	-4.2	-3.5	-3.3
PP_3229		periplasmic aliphatic sulfonate-binding protein, putative	3665090	3666046	+	P	229	232	100	105	-2.3	-2.3	-2.2	-2.2
PP_3491		enolpyruvate hydratase/isomerase family protein	3960710	3961783	+	I	582	938	148	284	-3.9	-6.3	-2.0	-3.3
PP_3529		monooxygenase, putative	4000316	4001680	+	C	968	1148	445	365	-2.2	-2.6	-2.7	-3.1
PP_3543		iron-sulfur cluster-binding protein	4014642	4016045	+	C	132	228	64	64	-2.1	-3.6	-2.1	-3.6
PP_3661		membrane protein, putative	4157987	4159048	+	S	71	76	170	205	2.4	2.2	2.9	2.7
PP_3731		transcriptional regulator, TetR family	4257690	4258334	-	K	205	175	64	81	-3.2	-2.7	-2.5	-2.2
PP_3771		hypothetical protein	4298934	4299320	-	-	304	194	71	93	-4.3	-2.7	-3.3	-2.1
PP_3773		hypothetical protein	4300276	4300641	-	-	388	315	87	120	-4.4	-3.6	-3.2	-2.6
PP_3796		L-ornithine N5-oxygenase	4325521	4326855	+	Q	469	172	1121	1593	2.4	6.5	3.4	9.2
PP_3801		cation ABC transporter, periplasmic cation-binding protein, putative	4329654	4330556	+	P	100	83	217	267	2.2	2.6	2.7	3.2
PP_3820		group II intron-encoding maturase	4347212	4348633	-	L	610	723	180	258	-3.4	-4.0	-2.4	-2.8
PP_3824		hypothetical protein	4351822	4352202	-	-	245	715	64	106	-3.8	-11.2	-2.3	-6.8
PP_3912		DNA-cytosine methyltransferase	4420249	4421910	+	L	162	143	64	64	-2.5	-2.2	-2.5	-2.2
PP_3917		hypothetical protein	4425740	4426078	+	-	164	177	64	77	-2.6	-2.8	-2.1	-2.3
PP_4064	<i>hvd</i>	isovaleryl-CoA dehydrogenase	4588022	4589296	+	I	1201	1054	252	399	-4.8	-4.2	-3.0	-2.6
PP_4065		3-methylcrotonyl-CoA carboxylase, beta subunit, putative	4589316	4590923	+	I	456	456	127	175	-3.6	-3.6	-2.6	-2.6
PP_4096		conserved hypothetical protein	4631657	4632391	+	O	294	1012	69	64	-4.2	-14.6	-4.6	-15.8
PP_4217	<i>fpvA</i>	outer membrane ferrityoverdine receptor	4765348	4767786	+	P	79	66	180	483	2.3	2.7	6.1	7.3
PP_4222		syfP protein, putative	4793995	4794978	-	Q	82	74	173	249	2.1	2.3	3.0	3.4
PP_4223		diaminobutyrate-2-oxoglutarate transaminase	4795084	4796442	-	E	154	115	317	521	2.1	2.8	3.4	4.5
PP_4381		flagellar hook-associated protein FlgK	4973560	4975602	-	N	602	590	1383	1264	2.3	2.3	2.1	2.1
PP_4438		ISPpu14, transposase Orf2	5033560	5033895	+	L	137	186	64	64	-2.1	-2.9	-2.1	-2.9
PP_4441		ISPpu14, transposase Orf1	5036191	5036511	+	L	188	223	90	69	-2.1	-2.5	-2.7	-3.2
PP_4527		membrane protein, putative	5142855	5143781	-	-	251	248	103	121	-2.4	-2.4	-2.1	-2.1
PP_4666	<i>mmsB</i>	3-hydroxyisobutyrate dehydrogenase	5291960	5292847	-	I	1767	1742	656	605	-2.7	-2.7	-2.9	-2.9
PP_4667	<i>mmsA-2</i>	methylmalonate semialdehyde dehydrogenase	5292858	5294384	-	C	3113	3601	1198	951	-2.6	-3.0	-3.3	-3.8
PP_4781		sensor histidine kinase	5442789	5444777	-	T	150	155	64	70	-2.3	-2.4	-2.1	-2.2
PP_4789		metal ion transporter, putative	5450620	5451459	+	P	432	447	1404	984	3.2	3.1	2.3	2.2
PP_4975		long-chain acyl-CoA thioester hydrolase family protein	5667288	5667689	-	I	514	401	1146	1270	2.2	2.9	2.5	3.2
PP_5117		hydrolase, alpha/beta fold family	5838622	5839614	+	R	209	237	482	479	2.3	2.0	2.3	2.0
PP_5139	<i>cadA-2</i>	cadmium translocating P-type ATPase	5863889	5866141	-	P	564	474	137	216	-4.1	-3.5	-2.6	-2.2
PP_5271	<i>hnp</i>	leucine-responsive regulatory protein	6020796	6021284	+	K	185	149	64	64	-2.9	-2.3	-2.9	-2.3
PP_5397		ISPpu14, transposase Orf2	6154528	6154863	-	L	216	160	64	64	-3.4	-2.5	-3.4	-2.5
PP_5398		ISPpu14, transposase Orf1	6154860	6155180	-	L	178	151	64	66	-2.8	-2.4	-2.7	-2.3

^a 供与菌と受容菌はそれぞれ 'PF'、'KT' と示す。二価カチオンの有無はそれぞれ 'CP' (cation plus)、'CM' (cation minus) で示している。CP と CM の後の数字は 'replicate 1'、'replicate 2' を示す。

^b 二価カチオン添加により転写が増加 (>2.0) あるいは減少 (<-2.0) したものについて、それぞれ赤色、青色の数字で示す。

^c 単独培養時に混同して転写変動した遺伝子のハイライトで示す。

Table S2-4. 二価カチオン添加により供与菌との混合時に転写変動した受容菌染色体上の遺伝子 [Sakuda et al., 2018a, Tables4-4, modified]

Name	Gene	Product	Start	End	Strand	COG	^a Mixture [PF+KT]						^{b, c} Fold change											
							CMI			CP2			CPI vs CMI			CP2 vs CMI			CPI vs CP2			PF+KT vs CP2		
							CM1	CM2	CP1	CP2	CMI	CP1	CP2	CMI	CP1	CP2	CMI	CP1	CP2	CMI	CP1	CP2	CMI	CP1
PP_0135		conserved hypothetical protein	143386	143547	+	-	319	658	108	134	3.0	-6.1	-2.4	-4.9										
PP_0169		dioxygenase, Taud/TfdA family	221228	222127	+	Q	887	482	189	203	-4.7	-2.6	-4.4	-2.4										
PP_0170		ABC transporter, periplasmic binding protein	222145	223164	+	P	289	332	104	77	-2.8	-3.2	-3.7	-4.3										
PP_0173		transcriptional factor-related protein	225030	225659	-	-	1177	329	64	87	-18.4	-5.1	-13.5	-3.8										
PP_0220		ABC transporter, ATP-binding protein	272657	273766	-	P	166	878	64	64	-2.6	-13.7	-2.6	-13.7										
PP_0221		ABC transporter, periplasmic binding protein, putative	273768	274568	-	P	149	835	64	64	-2.3	-13.1	-2.3	-13.1										
PP_0222		monooxygenase, DszA family	274561	275946	-	C	280	1003	64	64	-4.4	-15.7	-4.4	-15.7										
PP_0223		monooxygenase, DszC family	275946	277166	-	I	357	1009	68	70	-5.3	-14.9	-5.1	-14.3										
PP_0224		monooxygenase, DszC family	277263	278504	-	I	556	782	64	67	-8.7	-12.2	-8.3	-11.7										
PP_0237	<i>ssuA</i>	sulfonate ABC transporter, periplasmic sulfonate-binding protein SsuA	291618	292583	+	P	1112	906	194	105	-5.7	-4.7	-10.6	-8.6										
PP_0238	<i>ssuD</i>	organosulfonate monooxygenase	292643	293791	+	C	493	855	182	99	-2.7	-4.7	-5.0	-8.6										
PP_0239	<i>ssuC</i>	sulfonate ABC transporter, permease protein SsuC	293802	294599	+	P	379	872	128	64	-3.0	-6.8	-5.9	-13.6										
PP_0258		LysM domain protein	313385	313825	+	S	222	195	75	96	-3.0	-2.6	-2.3	-2.0										
PP_0268	<i>oprQ</i>	outer membrane protein OprE3	324713	326032	+	-	251	280	64	112	-3.9	-4.4	-2.2	-2.5										
PP_0319		conserved hypothetical protein	383036	383338	+	S	402	215	64	64	-6.3	-3.4	-6.3	-3.4										
PP_0382		carbon-nitrogen hydrolase family protein	462604	463398	-	R	196	201	81	96	-2.4	-2.5	-2.0	-2.1										
PP_0383		tryptophan 2-monooxygenase, putative	463413	465095	-	E	315	362	101	98	-3.1	-3.6	-3.2	-3.7										
PP_0392	<i>folB</i>	dihydropyrimidin aldolase	477395	477751	+	H	248	225	92	111	-2.7	-2.4	-2.2	-2.0										
PP_0432		N-acetyl-gamma-glutamyl-phosphate reductase, putative	518610	519644	+	E	233	212	64	100	-3.6	-3.3	-2.3	-2.1										
PP_0600	<i>rpsT</i>	ribosomal protein S20	707068	707346	-	J	405	519	73	167	-5.5	-7.1	-2.4	-3.1										
PP_0611	<i>pilE</i>	type IV pili biogenesis protein PilE	716887	717276	+	N	242	157	64	74	-3.8	-2.4	-3.3	-2.1										
PP_0635		group II intron-encoding maturase	741898	743319	+	L	400	156	64	64	-6.2	-2.4	-6.2	-2.4										
PP_0760		conserved hypothetical protein	875305	875889	-	S	369	140	64	64	-5.8	-2.2	-5.8	-2.2										
PP_0768		response regulator/TPR domain protein	886965	888572	+	K	201	172	80	84	-2.5	-2.1	-2.4	-2.1										
PP_0809	<i>dsbB</i>	disulfide oxidoreductase	949157	949663	+	O	660	276	64	123	-10.3	-4.3	-5.4	-2.2										
PP_0817		aminotransferase, class I	955357	956565	+	E	676	360	3029	1377	4.5	8.4	2.0	3.8										
PP_0819		conserved hypothetical protein	957968	958351	+	R	355	193	64	87	-5.5	-3.0	-4.1	-2.2										
PP_0883		porin, putative	1023765	1025144	-	-	215	131	64	64	-3.4	-2.0	-3.4	-2.0										
PP_0959	<i>ttg2B</i>	toluene tolerance ABC efflux transporter, permease	1100618	1101418	+	Q	275	290	67	131	-4.1	-4.3	-2.1	-2.2										
PP_0969		transcriptional regulator, GntR family	1109333	1109983	+	K	328	231	64	64	-5.1	-3.6	-5.1	-3.6										
PP_1059		amino acid permease	1209390	1210808	+	E	178	156	64	64	-2.8	-2.4	-2.8	-2.4										
PP_1076	<i>glpF</i>	glycerol uptake facilitator protein	1235335	1236186	-	G	451	308	64	79	-7.0	-4.8	-5.7	-3.9										
PP_1185	<i>oprH</i>	outer membrane protein HI	1360133	1360738	+	M	5061	5187	384	243	-13.2	-13.5	-20.8	-21.3										
PP_1186	<i>phoP</i>	transcriptional regulatory protein PhoP	1360935	1361612	+	T	1952	2662	310	197	-6.3	-8.6	-9.9	-13.5										
PP_1187	<i>phoQ</i>	sensor protein PhoQ	1361609	1362955	+	T	146	154	64	64	-2.3	-2.4	-2.3	-2.4										
PP_1249		lipoprotein, putative	1425405	1425596	+	-	349	293	64	113	-5.5	-4.6	-3.1	-2.6										
PP_1252		group II intron-encoding maturase	1429961	1431382	+	L	319	172	75	64	-4.3	-2.3	-5.0	-2.7										
PP_1267		conserved hypothetical protein	1449212	1449679	-	-	775	818	312	238	-2.5	-2.6	-3.3	-3.4										

Table S2-4の続き 二価力チオオン添加により供与菌との混合時に転写変動した受容菌染色体上の遺伝子 [Sakuda et al., 2018a, TableS4-4, modified]

Name	Gene	Product	Start	End	Strand	COG	^a Mixture [PF+KT]						^{b,c} Fold change between PF+KT					
							CP1	CP2	CMI	CM2	CPI	CP2	CPI vs CMI	CP2 vs CMI	CP1 vs CP2	CP2 vs CP1		
PP_1512		hypothetical protein	1716573	1717193	-	-	429	297	76	136	5.7	-3.9	-3.2	-2.2				
PP_1540		conserved hypothetical protein	1742872	1743096	-	-	257	207	64	64	-4.0	-3.2	-4.0	-3.2				
PP_1542		hypothetical protein	1744274	1744870	-	-	222	185	71	64	-3.1	-2.6	-3.5	-2.9				
PP_1545		hypothetical protein	1746543	1747001	-	-	244	173	64	64	-3.8	-2.7	-3.8	-2.7				
PP_1596	<i>cdsA</i>	phosphatidate cytidyltransferase	1789279	1790094	+	I	159	161	64	64	-2.5	-2.5	-2.5	-2.5				
PP_1597	<i>dxr</i>	1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate reductoisomerase	1790067	1791281	+	I	163	145	64	64	-2.6	-2.3	-2.6	-2.3				
PP_1624		group II intron-encoding maturase	1820234	1821655	+	L	617	378	169	104	-3.7	-2.2	-5.9	-3.6				
PP_1672	<i>cobO</i>	cob(I)alamin adenosyltransferase	1867275	1867886	+	H	234	232	76	103	-3.1	-3.1	-2.3	-2.3				
PP_1691		conserved hypothetical protein	1883439	1883663	-	-	3203	1451	428	585	-7.5	-3.4	-5.5	-2.5				
PP_1782	<i>rmlC</i>	dTDP-4-dehydrothamnose 3,5-epimerase	1996036	1996584	-	M	129	141	64	64	-2.0	-2.2	-2.0	-2.2				
PP_1822		conserved hypothetical protein	2048897	2049268	-	O	170	158	64	74	-2.7	-2.5	-2.3	-2.1				
PP_1833		conserved hypothetical protein	2057909	2058211	-	-	282	263	64	64	-4.4	-4.1	-4.4	-4.1				
PP_1846		group II intron-encoding maturase	2069624	2071045	+	L	591	294	73	82	-8.1	-4.0	-7.2	-3.6				
PP_1969		molybdenum cofactor biosynthesis protein A, putative	2230781	2231794	+	H	243	237	64	64	-3.8	-3.7	-3.8	-3.7				
PP_1970		lipoprotein, putative	2231861	2232466	+	-	381	336	111	130	-3.4	-3.0	-2.9	-2.6				
PP_1997		folypolyglutamate synthetase	2264938	2266248	+	H	149	190	69	66	-2.1	-2.7	-2.3	-2.9				
PP_2081	<i>folC</i>	conserved hypothetical protein	2372157	2372975	-	S	197	193	432	429	2.2	2.2	2.2	2.2				
PP_2183		formate dehydrogenase, gamma subunit, putative	2488543	2489025	-	C	189	197	87	73	-2.2	-2.3	-2.6	-2.7				
PP_2224		conserved hypothetical protein	2532753	2532965	+	-	449	437	64	107	-7.0	-6.8	-4.2	-4.1				
PP_2319		conserved hypothetical protein	2648647	2648967	+	-	254	270	64	77	-4.0	-4.2	-3.3	-3.5				
PP_2347		DNA-binding response regulator	2676992	2677660	+	T	205	182	69	71	-3.0	-2.7	-2.9	-2.6				
PP_2422		carboxymuconolactone decarboxylase family protein	2769778	2770131	-	S	404	417	196	180	-2.1	-2.1	-2.2	-2.3				
PP_2451	<i>endA-I</i>	endonuclease I	2798042	2798734	-	L	417	615	108	140	-3.9	-5.7	-3.0	-4.4				
PP_2541		transcriptional factor-related protein	2885321	2885875	-	-	368	521	64	78	-5.8	-8.1	-4.7	-6.7				
PP_2598		hypothetical protein	2969337	2969684	+	-	306	162	64	64	-4.8	-2.5	-4.8	-2.5				
PP_2629		hypothetical protein	3009133	3009903	+	-	453	241	97	78	-4.7	-2.5	-5.8	-3.1				
PP_2630		hypothetical protein	3009908	3010762	+	-	372	300	74	64	-5.1	-4.1	-5.8	-4.7				
PP_2631		hypothetical protein	3010759	3010944	+	-	541	334	76	93	-7.1	-4.4	-5.8	-3.6				
PP_2639		dihydrodipicolinate synthase, putative	3023316	3024182	+	E	257	193	91	87	-2.8	-2.1	-3.0	-2.2				
PP_2662		conserved hypothetical protein	3048838	3050025	+	M	1148	1793	116	113	-9.9	-15.5	-10.2	-15.9				
PP_2664		sensory box histidine kinase/response regulator	3051229	3053196	+	T	206	297	102	76	-2.0	-2.9	-2.7	-3.9				
PP_2673		pentapeptide repeat family protein	3060837	3061496	-	S	579	816	157	148	-3.7	-5.2	-3.9	-5.5				
PP_2675		cytochrome c-type protein	3063713	3064174	+	C	1577	2429	684	681	-2.3	-3.6	-2.3	-3.6				
PP_2676		periplasmic binding protein, putative	3064129	3065055	+	E	1288	1916	455	477	-2.8	-4.2	-2.7	-4.0				
PP_2677		hypothetical protein	3065058	3065825	+	-	428	807	105	151	-4.1	-7.7	-2.8	-5.4				
PP_2678		hydrolase, putative	3065864	3066787	+	R	559	986	183	255	-3.0	-5.4	-2.2	-3.9				
PP_2680		aldehyde dehydrogenase family protein	3068909	3070429	+	C	2403	3282	944	1108	-2.5	-3.5	-2.2	-3.0				
PP_2937		integrase, putative	3340857	3341276	-	-	399	428	93	141	-4.3	-4.6	-2.8	-3.0				
PP_2970		hypothetical protein	3372188	3372547	+	-	283	323	64	122	-4.4	-5.0	-2.3	-2.6				
PP_3068		hypothetical protein	3450778	3450969	+	-	273	152	69	64	-3.9	-2.2	-4.3	-2.4				

Table S2-4の続き 二価カチオン添加により供与菌との混合時に転写変動した受容菌染色体上の遺伝子 [Sakuda et al., 2018a, TableS4-4, modified]

Name	Gene	Product	Start	End	Strand	COG	^a Mixture [PF+KT]				^{b, c} Fold change between PF+KT CP and PF+KT CM			
							CM1	CM2	CPI	CP2	CPI vs CM1	CPI vs CM2	CP2 vs CM1	CP2 vs CM2
PP_3123		CoA-transferase, subunit B, putative	3534054	3534710	+	I	190	345	87	84	-2.2	-4.0	-2.3	-4.1
PP_3172		group II intron-encoding maturase	3594018	3595439	-	L	637	294	70	64	-9.1	-4.2	-9.9	-4.6
PP_3348		GGDEF domain protein	3784803	3785948	+	T	239	170	64	64	-3.7	-2.7	-3.7	-2.7
PP_3359		hydroxymannamic acid degradation regulator, putative	3799094	3799564	+	K	129	160	64	64	-2.0	-2.5	-2.0	-2.5
PP_3373		bacterial surface antigen family protein	3817015	3819378	+	M	193	271	64	66	-3.0	-4.2	-2.9	-4.1
PP_3433	<i>hpd</i>	4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase	3889639	3890715	-	E	377	297	138	117	-2.7	-2.2	-3.2	-2.5
PP_3455		multidrug efflux RND membrane fusion protein	3915029	3916204	+	M	140	131	64	64	-2.2	-2.0	-2.2	-2.0
PP_3491		enoloy-coenzyme A hydratase/isomerase family protein	3960710	3961783	+	I	939	614	145	116	-6.5	-4.2	-8.1	-5.3
PP_3492	<i>acdA</i>	acyl-CoA dehydrogenase	3961800	3962951	+	I	241	139	67	64	-3.6	-2.1	-3.8	-2.2
PP_3530		conserved hypothetical protein	4001814	4002650	+	R	378	324	141	80	-2.7	-2.3	-4.7	-4.1
PP_3604		hypothetical protein	4096402	4096734	-	-	309	200	100	76	-3.1	-2.0	-4.1	-2.6
PP_3625		transporter, LysE family	4121990	4122631	-	E	233	176	64	71	-3.6	-2.8	-3.3	-2.5
PP_3730		DNA-binding response regulator	4256900	4257616	-	T	314	386	80	85	-3.9	-4.8	-3.7	-4.5
PP_3820		group II intron-encoding maturase	4347212	4348633	-	L	942	753	199	222	-4.7	-3.8	-4.2	-3.4
PP_3823		cytochrome c-type protein	4351094	4351747	-	C	957	381	125	167	-7.7	-3.1	-5.7	-2.3
PP_3868		group II intron-encoding maturase	4391591	4393012	-	L	499	282	81	94	-6.2	-3.5	-5.3	-3.0
PP_4064	<i>ivd</i>	isovaleryl-CoA dehydrogenase	4588022	4589296	+	I	562	508	124	80	-4.5	-4.1	-7.0	-6.4
PP_4065		3-methylcrotonyl-CoA carboxylase, beta subunit, putative	4589316	4590923	+	I	245	216	64	64	-3.8	-3.4	-3.8	-3.4
PP_4184	<i>braZ</i>	branched-chain amino acid transport system III carrier protein	4726067	4727380	-	E	746	695	68	211	-10.9	-10.2	-3.5	-3.3
PP_4255	<i>ccoN-2</i>	cytochrome c oxidase, cbb3-type, subunit I	4839634	4841076	+	O	759	857	266	354	-2.9	-3.2	-2.1	-2.4
PP_4257	<i>ccoQ-2</i>	cytochrome c oxidase, cbb3-type, CcoQ subunit	4841690	4841881	+	O	408	409	140	188	-2.9	-2.9	-2.2	-2.2
PP_4284		transporter, putative	4874812	4876161	+	R	494	178	65	64	-7.7	-2.8	-7.7	-2.8
PP_4285		transhyretin family protein	4876598	4876951	-	R	451	279	84	86	-5.3	-3.3	-5.2	-3.2
PP_4306		conserved hypothetical protein	4897586	4898542	-	R	214	183	64	66	-3.3	-2.9	-3.3	-2.8
PP_4311		D-amino acid dehydrogenase, small subunit, putative	4902932	4904125	-	E	276	134	64	64	-4.3	-2.1	-4.3	-2.1
PP_4323	<i>cmE</i>	cytochrome c-type biogenesis protein CcmE	4914694	4915149	-	O	509	547	193	222	-2.6	-2.8	-2.3	-2.5
PP_4326	<i>cmB</i>	heme ABC export system, permease protein CcmB	4916133	4916801	-	O	276	221	78	103	-3.5	-2.8	-2.7	-2.1
PP_4401	<i>bkdAI</i>	2-oxoisovalerate dehydrogenase, alpha subunit	4992042	4993274	+	C	817	1166	359	84	-2.3	-3.2	-9.7	-13.8
PP_4402	<i>bkdA2</i>	2-oxoisovalerate dehydrogenase, beta subunit	4993315	4994334	+	C	501	881	213	99	-2.3	-4.1	-5.1	-8.9
PP_4403	<i>bkdB</i>	2-oxoisovalerate dehydrogenase, lipoaamide acyltransferase component	4994335	4995606	+	C	298	435	64	97	-4.7	-6.8	-3.1	-4.5
PP_4471	<i>mgE</i>	magnesium transporter	5077311	5078753	-	P	154	145	70	64	-2.2	-2.1	-2.4	-2.3
PP_4495		aromatic amino acid transporter	5109285	5110703	-	E	177	157	64	64	-2.8	-2.4	-2.8	-2.4
PP_4621	<i>hmgA</i>	homogentisate 1,2-dioxygenase	5243178	5244479	-	Q	539	466	180	112	-3.0	-2.6	-4.8	-4.2
PP_4706		conserved hypothetical protein	5351017	5351319	+	S	394	159	64	64	-6.2	-2.5	-6.2	-2.5
PP_4712	<i>infB</i>	translation initiation factor IF-2	5356218	5358758	-	J	950	898	233	352	-4.1	-3.9	-2.7	-2.6
PP_4715	<i>tpiA</i>	triosephosphate isomerase	5361602	5362357	-	G	431	584	86	180	-5.0	-6.8	-2.4	-3.2
PP_4733	<i>snpB</i>	SsrA-binding protein	5381896	5382378	+	O	257	253	64	72	-4.0	-4.0	-3.6	-3.5
PP_4922	<i>thiC</i>	thiamin biosynthesis protein ThiC	5594193	5596073	-	H	198	132	64	64	-3.1	-2.1	-3.1	-2.1

Table S2-4-4の続き 二価カチオン添加により供与菌との混合時に転写変動した受容菌染色体上の遺伝子 [Sakuda et al., 2018a, TableS4-4, modified]

Name	Gene	Product	Start	End	Strand	COG	^a Mixture [PF+KT]			^{b, c} Fold change					
							CM1	CM2	CPI	CP1 vs CMI	CP2 vs CMI	CP1 vs CP2	CP1 vs CP2 vs CMI	CP1 vs CP2 vs CMI	CP2 vs CMI
PP_4922	<i>thiC</i>	thiamin biosynthesis protein ThiC	5594193	5596073	-	H	198	132	64	64	-3.1	-2.1	-3.1	-2.1	
PP_4972		conserved hypothetical protein	5664451	5664837	-	S	446	171	69	70	-6.4	-2.5	-6.3	-2.4	
PP_5085	<i>maeB</i>	malic enzyme	5808011	5809279	-	C	2014	1558	578	670	-3.5	-2.7	-3.0	-2.3	
PP_5157		conserved domain protein	5883408	5883896	+	E	370	141	64	64	-5.8	-2.2	-5.8	-2.2	
PP_5189		conserved hypothetical protein	5918993	5919298	+	-	1474	2033	219	522	-6.7	-9.3	-2.8	-3.9	
PP_5204		hypothetical protein	5935599	5935895	-	-	239	246	64	74	-3.7	-3.8	-3.2	-3.3	
PP_5207		ABC transporter, ATP-binding protein/permease protein, putative	5937431	5940151	+	V	159	155	64	64	-2.5	-2.4	-2.5	-2.4	
PP_5218		DedA family protein	5953221	5953865	+	S	168	131	64	64	-2.6	-2.1	-2.6	-2.1	
PP_5257		oxidoreductase, FAD-binding	6000993	6002279	-	E	130	166	64	64	-2.0	-2.6	-2.0	-2.6	
PP_5258		aldehyde dehydrogenase family protein	6002437	6003927	-	C	221	271	81	90	-2.7	-3.3	-2.5	-3.0	
PP_5270	<i>dadA-2</i>	D-amino acid dehydrogenase, small subunit	6019335	6020639	-	E	516	573	249	168	-2.1	-2.3	-3.1	-3.4	

^a 供与菌と受容菌はそれぞれ 'PF'、'KT' と示し、二価カチオンの有無はそれぞれ 'CP' (cation plus)、'CM' (cation minus) で示している。CP と CM の後の数字は 'replicate 1'、'replicate 2' を示す。

^b 二価カチオン添加により転写が増加 (>2.0) あるいは減少 (<2.0) したものについて、それぞれ赤色、青色の数字で示している。
^c 単独培養時と混合時に共通して転写変動した遺伝子を水色のハイライトで示している。

補章 3

詳細な実験操作

本章の内容は、学術雑誌論文として出版する計画があるため公表できない。

なお、本章の内容は 5 年以内に出版予定である。

参考文献

- Alexeyev, MF., Shokolenko, IN. (1995) Mini-Tn10 transposon derivatives for insertion mutagenesis and gene delivery into the chromosome of Gram-negative bacteria. *Gene* **160**: 59-62.
- Almagro Armenteros, JJ., Tsirigos, KD., Sønderby, CK., Petersen, TN., Winther, O., Brunak, S., von Heijne, G., Nielsen, H. (2019) SignalP 5.0 improves signal peptide predictions using deep neural networks. *Nat Biotechnol* **37**: 420-423.
- Aly, KA., Baron, C. (2007) The VirB5 protein localizes to the T-pilus tips in *Agrobacterium tumefaciens*. *Microbiology* **153**: 3766-3775.
- Amabile-Cuevas, CF., Chicurel, ME. (1992) Bacterial plasmids and gene flux. *Cell* **70**: 189-199
- Aminov, RI. (2011) Horizontal gene exchange in environmental microbiota. *Front Microbiol* **2**: 158.
- Anthony, KG., Klimke, WA., Manchak, J., Frost, LS. (1999) Comparison of proteins involved in pilus synthesis and mating pair stabilization from the related plasmids F and R100-1: insights into the mechanism of conjugation. *J Bacteriol* **181**: 5149-5159.
- Aravind, L., Koonin, EV. (1998) The HD domain defines a new superfamily of metal-dependent phosphohydrolases. *Trends Biochem Sci* **23**: 469-472.
- Backert, S., Fronzes, R., Waksman, G. (2008) VirB2 and VirB5 proteins: specialized adhesins in bacterial type-IV secretion systems? *Trends Microbiol* **16**: 409-413.
- Baharoglu, Z., Bikard, D., Mazel, D. (2010) Conjugative DNA transfer induces the bacterial SOS response and promotes antibiotic resistance development through integron activation. *PLoS genetics*, **6**: e1001165.
- Bell, A., Hancock, RE. (1989) Outer membrane protein H1 of *Pseudomonas aeruginosa*: purification of the protein and cloning and nucleotide sequence of the gene. *J Bacteriol* **171**: 3211-3217.
- Beuls, E., Modrie, P., Deserranno, C., Mahillon, J. (2012) High-salt stress conditions increase the pAW63 transfer frequency in *Bacillus thuringiensis*. *Appl Environ Microbiol* **78**: 7128–7131.
- Bhatty, M., Cruz, MR., Frank, KL., Gomez, JA., Andrade, F., Garsin, DA., Dunny, GM., Kaplan, HB., Christie, PJ. (2015). *Enterococcus faecalis* pCF10-encoded surface proteins PrgA, PrgB (aggregation substance) and PrgC contribute to plasmid transfer, biofilm formation and virulence. *Molecular Microbiology* **95**: 660-677.
- Boer, R., Russi, S., Guasch, A., Lucas, M., Blanco, AG., Pérez-Luque, R., Coll, M., de la Cruz, F. (2006) Unveiling the molecular mechanism of a conjugative relaxase: The structure of TrwC complexed with a 27-mer DNA comprising the recognition hairpin and the cleavage site. *J Mol Biol* **358**: 857-869.
- Bradley, DE. (1980) Morphological and serological relationships of conjugative pili. *Plasmid* **4**: 155-169.
- Bradley, DE., Williams, PA. (1982) The TOL plasmid is naturally derepressed for transfer. *J Gen Microbiol* **128**: 3019-3024.

- Cabezón, E., Ripoll-Rozada, J., Peña, A., de la Cruz, F., Arechaga, I. (2015) Towards an integrated model of bacterial conjugation. *FEMS Microbiol Rev* **39**: 81-95.
- Cascales, E., Atmakuri, K., Liu, Z., Binns, AN., Christie, PJ. (2005) *Agrobacterium tumefaciens* oncogenic suppressors inhibit T-DNA and VirE2 protein substrate binding to the VirD4 coupling protein. *Molecular Microbiology* **58**: 565-579.
- Chandran Darbari, V., Waksman, G. (2015) Structural Biology of Bacterial Type IV Secretion Systems. *Annual Review of Biochemistry* **84**: 603-629.
- Christensen, BB., Sternberg, C., Andersen, JB., Eberl, L., Moller, S., Givskov, M., Molin, S. (1998) Establishment of new genetic traits in a microbial biofilm community. *Appl Environ Microbiol* **64**: 2247-2255.
- Christie, PJ. (2004) Bacterial type IV secretion: the *Agrobacterium* VirB/D4 and related conjugation systems. *Biochim Biophys Acta* **1694**: 219-234.
- Christie, PJ. (2016) The Mosaic Type IV Secretion Systems. *EcoSal Plus* **7**
- Christie, PJ., Whitaker, N., González-Rivera, C. (2014) Mechanism and structure of the bacterial type IV secretion systems. *Biochim Biophys Acta* **1843**: 1578-1591.
- Clewell, DB. (2007) Properties of *Enterococcus faecalis* plasmid pAD1, a member of a widely disseminated family of pheromone-responding, conjugative, virulence elements encoding cytolysin, *Plasmid* **58**: 205-227.
- Dass, CL., Walsh, MF., Seo, S., Shiratsuchi, H., Craig, DH., Basson, MD. (2009) Irrigant divalent cation concentrations influence bacterial adhesion. *J Surg Res* **156**: 57-63.
- Das, T., Sehar, S., Koop, L., Wong, YK., Ahmed, S., Siddiqui, KS., Manefield, M. (2014) Influence of calcium in extracellular DNA mediated bacterial aggregation and biofilm formation. *PLoS One* **9**: e91935.
- de la Cruz, F., Frost, LS., Meyer, RJ., Zechner, EL. (2010) Conjugative DNA metabolism in Gram-negative bacteria. *FEMS Microbiology Rev* **34**: 18-40.
- Datsenko, KA., Wanner, BL. (2000) One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *Proc Natl Acad Sci USA* **97**: 6640-6645.
- Datta, N., Hedges, RW. (1972) Trimethoprim Resistance Conferred by W Plasmids in *Enterobacteriaceae*. *J Gen Microbiol* **72**: 349-355.
- de Gelder, L., Vandecasteele, FP., Brown, CJ., Forney, LJ., Top, EM. (2005) Plasmid donor affects host range of promiscuous IncP-1beta plasmid pB10 in an activated-sludge microbial community. *Appl Environ Microbiol* **71**: 5309-5317.
- DeLisa, MP., Valdes, JJ ., Bentley, WE. (2001) Quorum signaling via AI-2 communicates the "Metabolic Burden" associated with heterologous protein production in *Escherichia coli*. *Biotechnol Bioeng* **75**: 439-450.
- Del Solar, G., Giraldo, R., Ruiz-Echevarria, MJ., Espinosa, M., Diaz-Orejas, R. (1998) Replication and control of circular bacterial plasmids. *Microbiol Mol Biol Rev* **62**: 434-464.

- Dennis, JJ., Zylstra, GJ. (1998) Plasposons: modular self-cloning minitransposon derivatives for rapid genetic analysis of gram-negative bacterial genomes. *Appl Environ Microbiol* **64**: 2710-2715.
- Domingues, S., Nielsen, KM. (2017) Membrane vesicles and horizontal gene transfer in prokaryotes. *Curr Opin Microbiol* **38**: 16-21
- Draper, O., César, CE., Machón, C., de la Cruz, F., Llosa, M. (2005) Site-specific recombinase and integrase activities of a conjugative relaxase in recipient cells. *Proc Natl Acad Sci USA* **102**: 16385-16390.
- Dubey, GP., Ben-Yehuda, S. (2011) Intercellular nanotubes mediate bacterial communication. *Cell* **144**: 590-600.
- Dunn, NW., Gunsalus, IC. (1973) Transmissible plasmid coding early enzymes of naphthalene oxidation in *Pseudomonas putida*. *J Bacteriol* **114**: 974-979.
- Dunny, GM. (2007) The peptide pheromone-inducible conjugation system of *Enterococcus faecalis* plasmid pCF10: cell-cell signaling, gene transfer, complexity and evolution. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* **362**: 1185-1193.
- Edrington, TC., Kintz, E., Goldberg, JB., Tamm, LK. (2011) Structural basis for the interaction of lipopolysaccharide with outer membrane protein H (OprH) from *Pseudomonas aeruginosa*. *J Biol Chem* **286**: 39211-39223.
- Ehlers, LJ., Bouwer, EJ. (1999) RP4 plasmid transfer among species of *Pseudomonas* in a biofilm reactor. *Water Sci Technol* **39**: 163-171.
- Fernandez-Lopez, R., de la Cruz, F. (2015) Rebooting the genome: The role of negative feedback in horizontal gene transfer. *Mob Genet Elements* **4**: 1-6.
- Fernández-López, R., Garcillán-Barcia, PM., Revilla, C., Lázaro, M., Vielva, L., de la Cruz, F. (2006) Dynamics of the IncW genetic backbone imply general trends in conjugative plasmid evolution. *FEMS Microbiol Rev* **30**: 942-966.
- Francia, MV., Varsaki, A., Garcillán-Barcia, MP., Latorre, A., Drainas, C., de la Cruz, F. (2004) A classification scheme for mobilization regions of bacterial plasmids. *FEMS Microbiol Rev* **28**: 79-100.
- Frost, LS., Leplae, R., Summers, AO., Toussaint, A. (2005) Mobile genetic elements: the agents of open source evolution. *Nat Rev Microbiol* **3**: 722-732.
- Frost, LS., Koraimann, G. (2010) Regulation of bacterial conjugation: balancing opportunity with adversity. *Future Microbiol* **5**: 1057-1071.
- Garcillán-Barcia, MP., Francia, MV., de la Cruz, F. (2009) The diversity of conjugative relaxases and its application in plasmid classification. *FEMS Microbiol Rev* **33**: 657-687.
- Getino, M., Sanabria-Ríos, DJ., Fernández-López, R., Campos-Gómez, J., Sánchez-López, JM., Fernández, A., Carballeira, NM., de la Cruz, F. (2015) Synthetic Fatty Acids Prevent Plasmid-Mediated Horizontal Gene Transfer. *Mbio* **6**: e01032-15
- Getino M, Fernández-López R, Palencia-Gándara C, Campos-Gómez J, Sánchez-López JM, Martínez M, Fernández A, de la Cruz F. (2016) Tanzawaic acids, a chemically novel set of bacterial conjugation inhibitors. *PLoS One* **11**: e0148098.

- Getino, M., de la Cruz, F. (2017) Natural and artificial strategies to control the conjugative transmission of plasmids. *Microbiol Spectrum* **6**: MTBP-0015-2016.
- González, J.E., Keshavan, N.D. (2006) Messing with bacterial quorum sensing. *Microbiol Mol Biol Rev* **70**: 859-875.
- Gonzalez-Perez, B., Lucas, M., Cooke, L.A., Vyle, J.S., de la Cruz, F., Moncalian, G. (2007) Analysis of DNA processing reactions in bacterial conjugation by using suicide oligonucleotides. *Embo Journal* **26**: 3847-3857.
- Gonzalez-Rivera, C., Khara, P., Awad, D., Patel, R., Li, Y.G., Bogisch, M., Christie, P.J. (2019) Two pKM101-encoded proteins, the pilus-tip protein TraC and Pep, assemble on the *Escherichia coli* cell surface as adhesins required for efficient conjugative DNA transfer. *Mol Microbiol* **111**: 96-117.
- Grohmann, E., Christie, P.J., Waksman, G., Backert, S. (2018) Type IV secretion in Gram-negative and Gram-positive bacteria. *Molecular Microbiology* **107**: 455-471.
- Gruber, C.J., Lang, S., Rajendra, V.K., Nuk, M., Raffl, S., Schildbach, J.F., Zechner, E.L. (2016) Conjugative DNA transfer is enhanced by plasmid R1 partitioning proteins. *Front Mol Biosci* **3**: 32.
- Guglielmini, J., Néron, B., Abby, S.S., Garcillán-Barcia, M.P., de la Cruz, F., Rocha, E.P. (2014) Key components of the eight classes of type IV secretion systems involved in bacterial conjugation or protein secretion. *Nucleic Acids Res* **42**: 5715-5727.
- Haagensen, J.A.J., Hansen, S.K., Johansen, T., Molin, S. (2002) In situ detection of horizontal transfer of mobile genetic elements. *FEMS Microbiol Ecol* **42**: 261-268.
- Halary, S., Leigh, J.W., Cheaib, B., Lopez, P., Bapteste, E. (2010) Network analyses structure genetic diversity in independent genetic worlds. *Proc Natl Acad Sci USA* **107**: 127-132.
- Hoang, T.T., Karkhoff-Schweizer, R.R., Kutchma, A.J., Schweizer, H.P. (1998) A broad-host-range Flp-FRT recombination system for site-specific excision of chromosomally-located DNA sequences: application for isolation of unmarked *Pseudomonas aeruginosa* mutants. *Gene* **212**: 77-86.
- Hong, T.P., Carter, M.Q., Struffi, P., Casonato, S., hao, Y., lam, J.S., Lory, S., Jousson, O. (2017) Conjugative type IVb pilus recognizes lipopolysaccharide of recipient cells to initiate PAPI-1 pathogenicity island transfer in *Pseudomonas aeruginosa*. *BMC Microbiol* **17**: 31.
- Inoue, K., Miyazaki, R., Ohtsubo, Y., Nagata, Y., Tsuda, M. (2013) Inhibitory effect of *Pseudomonas putida* nitrogen-related phosphotransferase system on conjugative transfer of IncP-9 plasmid from *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol Lett* **345**: 102-109.
- Ishiwa, A., Komano, T. (2003) Thin pilus PilV adhesins of plasmid R64 recognize specific structures of the lipopolysaccharide molecules of recipient cells. *J Bacteriol* **185**: 5192-5199.
- Ishiwa, A., Komano, T. (2004) PilV adhesins of plasmid R64 thin pili specifically bind to the lipopolysaccharides of recipient cells. *J Mol Biol* **343**: 615-625.
- Ize, B., Viarre, V., Voulhoux, R. (2014) Cell Fractionation. pp 185-191. In: Filloux, A., Ramos, J.L. (eds), *Pseudomonas Methods and Protocols*. Methods in Molecular Biology (Methods and Protocols), vol 1149. *Humana Press*, New York, NY
- Jain, A., Srivastava, P. (2013) Broad host range plasmids. *FEMS Microbiol Lett* **348**: 87-96.

- Kerchove, AJ., Elimelech, M. (2008) Calcium and magnesium cations enhance the adhesion of motile and nonmotile *Pseudomonas aeruginosa* on alginate films. *Langmuir* **24**: 3392-3399.
- Kishida, K., Inoue, K., Ohtsubo, Y., Nagata, Y., Tsuda, M. (2016) Host range of the conjugative transfer system of IncP-9 naphthalene-catabolic plasmid NAH7 and characterization of its *oriT* region and relaxase. *Appl Environ Microbiol* **83**: e02359-16.
- Kishida, K., Nonoyama, S., Lukas, T., Kawahara, S., Kudo, K., Nagata, Y., Ohtsubo, Y., Tsuda, M. (2019) Conjugative transfer of IncP-9 catabolic plasmids requires a previously uncharacterized gene, *mpfK*, whose homologs are conserved in various MPF_T-type plasmids. *Appl Environ Microbiol* **85**: e01850-19.
- Kolling, GL., Matthews, KR. (1999) Export of virulence genes and shiga toxin by membrane vesicles of *Escherichia coli* O157: H7. *Appl Environ Microbiol* **65**: 1843-1848.
- Komano, T., Yoshida, T., Narahara, K., Furuya, N. (2000) The transfer region of IncI1 plasmid R64: similarities between R64 *tra* and *Legionella icm/dot* genes. *Molecular Microbiology* **35**: 1348-1359.
- Komatsu, M., Komatsu, K., Koiwai, H., Yamada, Y., Kozono, I., Izumikawa, M., Hashimoto, J., Takagi, M., Omura, S., Shin-ya, K., Cane, DE., Ikeda, H. (2013) Engineered *Streptomyces avermitilis* host for heterologous expression of biosynthetic gene cluster for secondary metabolites. *ACS Synth Biol* **2**: 384-396.
- Koressaar, T., Remm, M. (2007) Enhancements and modifications of primer design program Primer3. *Bioinformatics* **23**: 1289-1291.
- Kovach, ME., Elzer, PH., Hill DS., Robertson, GT., Farris, MA., Roop, RM., Peterson, KM. (1995) Four new derivatives of the broad-host-range cloning vector pBBR1MCS, carrying different antibiotic-resistance cassettes. *Gene* **166**: 175-176
- Król, JE., Wojtowicz, AJ., Rogers, LM., Heuer, H., Smalla, K., Krone, SM., Top EM. (2013) Invasion of *E. coli* biofilms by antibiotic resistance plasmids. *Plasmid* **70**:110-119.
- Kucharska, I., Liang, B., Ursini, N., Tamm, LK. (2016) Molecular Interactions of lipopolysaccharide with an outer membrane protein from *Pseudomonas aeruginosa* probed by solution NMR. *Biochemistry* **55**: 5061-5072.
- Kwok, T., Zabler, D., Urman, S., Rohde, M., Hartig, R., Wessler, S., Misselwitz, R., Berger, J., Sewald, N., König, W., Backert, S. (2007) *Helicobacter* exploits integrin for type IV secretion and kinase activation. *Nature* **449**: 862-866.
- Lacroix, B., Citovsky, V. (2016) Transfer of DNA from Bacteria to Eukaryotes. *mBio* **7**: e00863-16
- Lang, AS., Zhaxybayeva, O., Beatty, JT. (2012) Gene transfer agents: phage-like elements of genetic exchange. *Nat Rev Microbiol* **10**: 472-482.
- La Rosa, SL., Montealegre, MC., Singh, KV., Murray, BE. (2016) *Enterococcus faecalis* Ebp Pili are important for cell-cell aggregation and intraspecies gene transfer. *Microbiol Read Engl* **162**: 798-802.
- Lawley, TD., Klimke, WA., Gubbins, MJ., Frost, LS. (2003) F factor conjugation is a true type IV secretion system. *FEMS Microbiol Lett* **224**: 1-15.

- Lin, A., Jimenez, J., Derr, J., Vera, P., Manapat, ML., Esvelt, KM., Villanueva, L., Liu, DR., Chen, IA. (2011) Inhibition of bacterial conjugation by phage M13 and its protein g3p: quantitative analysis and model. *PLoS One* **6**: e19991.
- Low, HH., Gubellini, F., Rivera-Calzada, AF., Braun, N., Connery, S., Dujeancourt, A., Lu, F., Redzej, A., Fronzes, R., Orlova, EV., Waksman, G. (2014) Structure of a type IV secretion system. *Nature* **508**: 550-553.
- Macfarlane, EL., Kwasnicka, A., Ochs, MM., Hancock, RE. (1999) PhoP-PhoQ homologues in *Pseudomonas aeruginosa* regulate expression of the outer-membrane protein OprH and polymyxin B resistance. *Mol Microbiol* **34**: 305-316.
- Maeda, K., Nojiri, H., Shintani, M., Yoshida, T., Habe, H., Omori, T. (2003) Complete nucleotide sequence of carbazole/dioxin-degrading plasmid pCAR1 in *Pseudomonas resinovorans* strain CA10 indicates its mosaicity and the presence of large catabolic transposon Tn4676. *J Mol Biol* **326**: 21-33.
- Mándi, Y., Molnár, J. (1981) Effect of chlorpromazine on conjugal plasmid transfer and sex pili. *Acta Microbiol Acad Sci Hung* **28**: 205-210.
- Manoil, C., Rosenbusch, JP. (1982) Conjugation-deficient mutants of *Escherichia coli* distinguish classes of functions of the outer membrane OmpA protein. *Mol Gen Genet* **187**: 148-156.
- Matson, SW., Ragonese, H. (2005) The F-plasmid TraI protein contains three functional domains required for conjugative DNA strand transfer. *J Bacteriol* **187**: 697-706.
- Miyakoshi, M., Shintani, M., Terabayashi, T., Kai, S., Yamane, H., Nojiri, H. (2007) Transcriptome analysis of *Pseudomonas putida* KT2440 harboring the completely sequenced IncP-7 plasmid pCAR1. *J Bacteriol* **189**: 6849-6860.
- Miyakoshi, M., Nishida, H., Shintani, M., Yamane, H., Nojiri, H. (2009) High-resolution mapping of plasmid transcriptomes in different host bacteria. *BMC Genomics* **10**: 12
- Miyazaki, R., Ohtsubo, Y., Nagata, Y., Tsuda, M. (2008) Characterization of the *traD* operon of naphthalene-catabolic plasmid NAH7: a host-range modifier in conjugative transfer. *J Bacteriol* **190**: 6281-6289.
- Monzingo, AF., Ozburn, A., Xia, S., Meyer, RJ., Robertus, JD. (2007) The structure of the minimal relaxase domain of MobA at 2.1 Å resolution. *J Mol Biol* **366**: 165-178.
- Mori, M., Sakagami, Y., Ishii, Y., Isogai, A., Kitada, C., Fujino, M., Adsit, JC., Dunny, GM., Suzuki, A. (1988) Structure of cCF10., a peptide sex pheromone which induces conjugative transfer of the *Streptococcus faecalis* tetracycline resistance plasmid., pCF10. *J Biol Chem* **263**: 14574-14578.
- Nelson, KE., Weinel, C., Paulsen, IT., other authors (2002) Complete genome sequence and comparative analysis of the metabolically versatile *Pseudomonas putida* KT2440. *Environ Microbiol* **4**: 799-808.
- Nicas, TL., Hancock, RE. (1980) Outer membrane protein H1 of *Pseudomonas aeruginosa*: involvement in adaptive and mutational resistance to ethylenediaminetetraacetate, polymyxin B, and gentamicin. *J Bacteriol* **143**: 872-878.
- Nicas, TL., Hancock, RE. (1983) Alteration of susceptibility to EDTA, polymyxin B and gentamicin in *Pseudomonas aeruginosa* by divalent cation regulation of outer membrane protein H1. *J Gen Microbiol* **129**: 509-517.

- Nojiri, H., Sekiguchi, H., Maeda, K., Urata, M., Nakai, S., Yoshida, T., Habe, H., Omori, T. (2001) Genetic characterization and evolutionary implications of *car* gene cluster in the carbazole degrader *Pseudomonas* sp. strain CA10. *J Bacteriol* **183**: 3663-3679.
- Norman, A., Hansen, LH., Sørensen, SJ., (2009) Conjugative plasmids: vessels of the communal gene pool. *Philos Trans R Soc Lond Ser B* **364**: 2275-2289.
- Ou JT. (1973) Inhibition of formation of *Escherichia coli* mating pairs by fl and MS2 bacteriophages as determined with a Coulter counter. *J Bacteriol* **114**: 1108-1115.
- Ouchiya, N., Zhang, Y., Omori, T., Kodama, T. (1993) Biodegradation of carbazole by *Pseudomonas* spp. CA06 and CA10. *Biosci Biotechnol Biochem* **57**: 455-460.
- Ono, A., Miyazaki, R., Sota, M., Ohtsubo, Y., Nagata, Y., Tsuda, M. (2007) Isolation and characterization of naphthalene catabolic genes and plasmids from oil-contaminated soil by using two cultivation-independent approaches. *Appl Microbiol Biotechnol* **74**: 501-510.
- Park, W., Jeon, CO., Hohnstock-Ashe, AM., Winans, SC., Zylstra, GJ., Madsen, EL. (2003) Identification and characterization of the conjugal transfer region of the pCg1 plasmid from naphthalene-degrading *Pseudomonas putida* Cg1. *Appl Environ Microbiol* **69**: 3263-3271.
- Pérez-Mendoza, D., de la Cruz, F. (2009) *Escherichia coli* genes affecting recipient ability in plasmid conjugation: are there any? *BMC Genomics* **10**: 71
- Petrova, V., Chitteni-Pattu, S., Drees, JC., Inman, RB., Cox, MM. (2009) An SOS inhibitor that binds to free RecA protein: the PsiB protein. *Mol Cell* **36**: 121-130.
- Pinto, UM., Pappas, KM., Winans, SC. (2012) The ABCs of plasmid replication and segregation. *Nat Rev Microbiol* **10**: 755-765.
- Ramos-Gonzalez, MI., Duque, E., Ramos, JL. (1991) Conjugational transfer of recombinant DNA in cultures and in soils: host range of *Pseudomonas putida* TOL plasmids. *Appl Environ Microbiol* **57**: 3020-3027.
- Reniero, R., Cocconcelli, P., Bottazzi, V., Morelli, L. (1992) High frequency of conjugation in *Lactobacillus* mediated by an aggregation-promoting factor. *J Gen Microbiol* **138**: 763-768.
- Richter, C., Dy, RL., McKenzie, RE., Watson, BN., Taylor, C., Chang, JT., McNeil, MB., Staals, RH., Fineran, PC. (2014) Type I-F CRISPR-Cas resistance against virulent phages results in abortive infection and provides population-level immunity. *Nucleic Acids Res* **42**: 8516-8526.
- Roberts, RJ., Vincze, T., Posfai, J., Macelis, D. (2015) REBASE-a database for DNA restriction and modification: enzymes, genes and genomes. *Nucleic Acids Research*, **43**: D298-D299.
- Sakuda, A., Suzuki-Minakuchi, C., Matsui, K., Takahashi, Y., Okada, K., Yamane, H., Shintani, M., Nojiri, H. (2018a) Divalent cations increase the conjugation efficiency of the incompatibility P-7 group plasmid pCAR1 among different *Pseudomonas* hosts. *Microbiology* **164**: 20-27.
- Sakuda, A., Suzuki-Minakuchi, C., Okada, K., Nojiri, H. (2018b) Conjugative selectivity of plasmids is affected by coexisting recipient candidates. *mSphere* **3**: e00490- 18.
- Sambrook, J., Russell, DW, (2001) Molecular cloning: a laboratory manual., 3rd ed. Cold Spring Harbour Laboratory. *Cold Spring Harbour*, NY.

- Schäfer, A., Tauch, A., Jäger, W., Kalinowski, J., Thierbach, G., Pühler, A. (1994) Small mobilizable multi-purpose cloning vectors derived from the *Escherichia coli* plasmids pK18 and pK19: selection of defined deletions in the chromosome of *Corynebacterium glutamicum*. *Gene* **145**: 69-73.
- Schlüter, A., Heuer, H., Szczepanowski, R., Forney, L.J., Thomas, C.M., Pühler, A., Top, E.M. (2003) The 64,508 bp IncP-1 β antibiotic multiresistance plasmid pB10 isolated from a wastewater treatment plant provides evidence for recombination between members of different branches of the IncP-1 β group. *Microbiology* **149**: 3139-3153.
- Segal, G., Feldman, M., Zusman, T. (2005) The Icm/Dot type-IV secretion systems of *Legionella pneumophila* and *Coxiella burnetii*. *FEMS Microbiol Rev* **29**: 65-81.
- Shintani, M., Yoshida, T., Habe, H., Omori, T., Nojiri, H. (2005a) Large plasmid pCAR2 and class II transposon Tn4676 are functional mobile genetic elements to distribute the carbazole/dioxin-degradative *car* gene cluster in different bacteria. *Appl Microbiol Biotechnol* **67**: 370-382.
- Shintani, M., Habe, H., Tsuda, M., Omori, T., Yamane, H., Nojiri, H. (2005b) Recipient range of IncP-7 conjugative plasmid pCAR2 from *Pseudomonas putida* HS01 is broader than from other *Pseudomonas* strains. *Biotechnol Lett* **27**: 1847-1853.
- Shintani, M., Yano, H., Habe, H., Omori, T., Yamane, H., Tsuda, M., Nojiri, H. (2006) Characterization of the replication, maintenance, and transfer features of the IncP-7 plasmid pCAR1, which carries genes involved in carbazole and dioxin degradation. *Appl Environ Microbiol* **72**: 3206-3216.
- Shintani, M., Matsui, K., Takemura, T., Yamane, H., Nojiri, H. (2008a) Behavior of the IncP-7 carbazole-degradative plasmid pCAR1 in artificial environmental samples. *Appl Microbiol Biotechnol* **80**: 485-497.
- Shintani, M., Fukushima, N., Tezuka, M., Yamane, H., Nojiri, H. (2008b) Conjugative transfer of the IncP-7 carbazole degradative plasmid, pCAR1, in river water samples. *Biotechnol Lett* **30**: 117-122.
- Shintani, M., Yamane, H., Nojiri, H. (2010) Behavior of various hosts of the IncP-7 carbazole-degradative plasmid pCAR1 in artificial microcosms. *Biosci Biotechnol Biochem* **74**: 343-349.
- Shintani, M., Tokumaru, H., Takahashi, Y., Miyakoshi, M., Yamane, H., Nishida, H., Nojiri, H. (2011) Alterations of RNA maps of IncP-7 plasmid pCAR1 in various *Pseudomonas* bacteria. *Plasmid* **66**: 85-92.
- Simon, R., Priefer, U., Pühler, A. (1983) A broad host range mobilization system for in vivo genetic engineering: transposon mutagenesis in gram negative bacteria. *Biotechnol* **1**: 784-791.
- Smillie, C., Garcillan-Barcia, M.P., Francia, M.V., Rocha, E.P., de la Cruz, F. (2010) Mobility of plasmids. *Microbiol Mol Biol Rev* **74**: 434-452.
- Solioz, M., Yen, H.C., Marris, B. (1975) Release and uptake of gene transfer agent by *Rhodopseudomonas capsulata*. *J Bacteriol* **123**: 651-657.
- Sota, M., Yano, H., Ono, A., Miyazaki, R., Ishii, H., Genka, H., Top, E.M., Tsuda, M. (2006). Genomic and functional analysis of the IncP-9 naphthalene-catabolic plasmid NAH7 and its transposon Tn4655 suggests catabolic gene spread by a tyrosine recombinase. *J Bacteriol* **188**: 4057-4067.
- Springael, D., Top, E.M. (2004) Horizontal gene transfer and microbial adaptation to xenobiotics: new types of mobile genetic elements and lessons from ecological studies. *Trends Microbiol* **12**: 53-58.

- Stalder, T., Top, EM. (2016) Plasmid transfer in biofilms: a perspective on limitations and opportunities. *npj Biofilms and Microbiomes* **2**: 16022
- Suzuki-Minakuchi, C., Hirotani, R., Shintani, M., Takeda, T., Takahashi, Y., Matsui, K., Vasileva, D., Yun, CS., Okada, K., Yamane, H., Nojiri, H. (2015) Effects of three different nucleoid-associated proteins encoded on IncP-7 plasmid pCAR1 on host *Pseudomonas putida* KT2440. *Appl Environ Microbiol* **81**: 2869-2980.
- Swart, S., Lugtenberg, B., Smit, G., Kijne, JW. (1994) Rhicadhesin-mediated attachment and virulence of an *Agrobacterium tumefaciens* *chvB* mutant can be restored by growth in a highly osmotic medium. *J Bacteriol* **176**: 3816-3819.
- Takahashi, Y., Shintani, M., Takase, N., Kazo, Y., Kawamura, F., Hara, H., Nishida, H., Okada, K., Yamane, H., Nojiri, H. (2015) Modulation of primary cell function of host *Pseudomonas* bacteria by the conjugative plasmid pCAR1. *Environ Microbiol* **17**: 134-155.
- Taylor, DE., Gibreel, A., Lawley, TD., Tracz, DM. (2004) Antibiotic resistance plasmids. pp 473-491. In Phillips, G., Funnell, B. (eds.), Plasmid Biology. *ASM Press*, Washington, DC., USA.
- Thomas, CM. (2000) Paradigms of plasmid organization. *Mol Microbiol* **37**: 485-491.
- Tielker, D., Hacker, S., Loris, R., Strathmann, M., Wingender, J., Wilhelm, S., Rosenau, F., Jaeger, KE. (2005) *Pseudomonas aeruginosa* lectin LecB is located in the outer membrane and is involved in biofilm formation. *Microbiology* **151**: 1313-1323.
- Tsuda, M., Iino, T. (1988) Identification and characterization of Tn4653, a transposon covering the toluene transposon Tn4651 on TOL plasmid pWW0. *Mol Gen Genet* **213**: 72-77.
- Tsuda, M., Ohtsubo, Y., Yano, H. (2014) Mobile catabolic genetic elements in pseudomonads. pp 83-103. In Nojiri, H., Tsuda, M., Fukuda, M., Kamagata, Y. (eds.), Biodegradative Bacteria: How Bacteria Degrade, Survive, Adapt, and Evolve. *Springer*, Tokyo
- Treangen, TJ., Rocha, EPC. (2011) Horizontal transfer, not duplication, drives the expansion of protein families in prokaryotes. *PLoS Genetic* **7**: e1001284
- Tzfira, T., Citovsky, V. (2002) Partners-in-infection: host proteins involved in the transformation of plant cells by *Agrobacterium*. *Trends Cell Biol* **12**: 121-129.
- Untergrasser, A., Cutcutache, I., Koressaar, T. Ye, J., Faircloth, BC., Remm, M. (2012) Rozen SGPrimer3 - new capabilities and interfaces. *Nucleic Acids Res* **40**: e115
- van Elsas, JD., Bailey, MJ. (2002) The ecology of transfer of mobile genetic elements. *FEMS Microbiol Ecol* **42**: 187-197.
- van Elsas, JD., Fry, J., Hirsch, P., Molin, S. (2000) Ecology of plasmid transfer and spread. pp. 175-206. In Thomas CM (ed). The Horizontal Gene Pool. *Harwood Academic Publishers*, Amsterdam
- Van Melderen, L., Saavedra De Bast, M. (2009). Bacterial toxin-antitoxin systems: more than selfish entities? *PLoS genet* **5**: e1000437
- Vasu, K., Nagaraja, V. (2013) Diverse functions of restriction-modification systems in addition to cellular defense. *Microbiol Mol Biol Rev* **77**: 53-72.

- Verma T, Ramteke PW, Garg SK (2002) Effect of ecological factors on conjugal transfer of chromium-resistant plasmid in *Escherichia coli* isolated from tannery effluent. *Appl Biochem Biotechnol* **102**: 5-20.
- Viljanen, P., Boratynski, J. (1991) The susceptibility of conjugative resistance transfer in Gram-negative bacteria to physicochemical and biochemical agents. *FEMS Microbiol Lett* **88**: 43-54.
- Wagner, VT., Matthyse, AG. (1992) Involvement of a vitronectinlike protein in attachment of *Agrobacterium tumefaciens* to carrot suspension culture cells. *J Bacteriol* **174**: 5999-6003.
- Waksman, G. (2019) From conjugation to T4S systems in Gram-negative bacteria: a mechanistic biology perspective. *EMBO reports* **20**: e47012
- Westra, ER., Semenova, E., Datsenko, KA., Jackson, RN., Wiedenheft, B., Severinov, K., Brouns, SJ. (2013) Type I-E CRISPR-cas systems discriminate target from non-target DNA through base pairing-independent PAM recognition. *PLoS Genet* **9**: e1003742.
- Williams, JJ., Hergenrother, PJ. (2008) Exposing plasmids as the Achilles' heel of drug-resistant bacteria. *Curr Opin Chem Biol* **12**: 389-399.
- Wong, JJ., Lu, J., Glover, JN. (2012) Relaxosome function and conjugation regulation in F-like plasmids - a structural biology perspective. *Mol Microbiol* **85**: 602-617.
- 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. *Biosci Biotechnol Biochem* **80**: 1020-1023.
- Yang, W. (2011) Nucleases: diversity of structure, function and mechanism. *Q Rev Biophys* **44**: 1-93.
- Yano H, Miyakoshi M, Ohshima K, Tabata M, Nagata Y, Hattori M, Tsuda M. (2010) Complete nucleotide sequence of TOL plasmid pDK1 provides evidence for evolutionary history of IncP-7 catabolic plasmids. *J Bacteriol* **192**: 4337-4347.
- Yano, H., Shintani, M., Tomita, M., Suzuki, H., Oshima, T. (2019) Reconsidering plasmid maintenance factors for computational plasmid design. *Comput Struct Biotechnol J* **17**: 70-81.
- Yeo, HJ., Yuan, Q., Beck, MR., Baron, C., Waksman, G. (2003) Structural and functional characterization of the VirB5 protein from the type IV secretion system encoded by the conjugative plasmid pKM101. *Proc Natl Acad Sci USA* **100**: 15947-15952.
- Yuan, ZC., Edlind, MP., Liu, P., Saenkham, P., Banta, LM., Wise, AA., Ronzone, E., Binns, AN., Kerr, K., Nester, EW. (2007) The plant signal salicylic acid shuts down expression of the *vir* regulon and activates quorum-quenching genes in *Agrobacterium*. *Proc Natl Acad Sci USA* **104**: 11790-11795.
- Yun, CS., Suzuki, C., Naito, K., Takeda, T., Takahashi, Y. et al. (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.
- Zhang, J., Boone, L., Kocz, R., Zhang, C., Binns, AN., Lynn, DG. (2000) At the maize/*Agrobacterium* interface: natural factors limiting host transformation. *Chem Biol* **7**: 611-621.
- Zhang, L., Murphy, PJ., Kerr, A., Tate, ME. (1993) *Agrobacterium* conjugation and gene regulation by *N*-acyl-L-homoserine lactones. *Nature* **362**: 446-448.

Zhang, Y., Buchholz, F., Muyrers, JP., Stewart, AF. (1998) A new logic for DNA engineering using recombination in *Escherichia coli*. *Nat Genet* **20**: 123-128.

新谷 政己、李 美英、松井 一泰、大熊 盛也、岡田 憲典、野尻 秀昭 (2012) 異なる栄養条件下におけるプラスミドの接合伝達頻度の比較解析 Comparisons of conjugation frequency in different environmental conditions. *J Environ Biotechnol* **12**: 163-167.

新谷 政己., 松井 一泰., 金原 和秀., 野尻 秀昭 (2013) 環境中におけるプラスミドの挙動解析 Comparisons of Conjugation Frequency in Different Environmental Conditions. *J Environ Biotechnol* **13**: 125-134.

久保 彩 (2019) 転写制御因子 MexT を介したプラスミド保持に伴う宿主の生育負荷誘導機構 東京大学大学院博士論文

作田 郁子 (2017) 複数の受容菌存在下で接合伝達の成立に影響を及ぼす因子の探索 東京大学大学院修士論文

東京大学医科学研究所制癌研究部編 (1993) 新 細胞工学実験プロトコール 秀潤社

松原 謙一 (1976) プラスミド 講談社サイエンティフィック

柳田 晃輔 (2015) 宿主の状態がプラスミドの接合伝達に及ぼす影響の解析 東京大学大学院修士論文

謝辞

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

素晴らしい研究環境とテーマを与えて下さり、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申し上げます。温かく見守り、貴重な助言を下されると同時に、楽しく研究をすることの大切さを教えてくださいました同研究室准教授、岡田憲典先生に深く感謝申し上げます。また、日頃より近くで励まし、研究についてはもちろん様々な相談に親身に付き合ってくださいました同研究室助教、水口千穂先生に心より感謝申し上げます。

接合伝達研究について基礎からご教示くださり、親身にご助言を下さいました静岡大学大学院総合科学技術研究科准教授、新谷政己先生に深く感謝申し上げます。BAC ライブラリーの調製に御協力下さいました、産業技術総合研究所創薬基盤研究部門最先端バイオ技術探求グループ長、新家一男博士、バイオ産業情報化コンソーシアム研究員、橋本絢子博士、小曽根郁子博士に感謝申し上げます。また、*attB* ベクターを譲渡下さいました北里大学微生物制御工学研究室教授、池田治生先生、同研究室講師、小松護先生に御礼申し上げます。BAC クローンのシーケンス解析に際しご尽力下さいました、静岡大学グリーン科学技術研究所研究支援室准教授、道羅英夫先生、同技術職員、森内良太博士に御礼申し上げます。菌株やプラスミドの分譲だけでなく、いつも貴重なご助言をくださいました、東北大学大学院生命科学研究科教授、津田雅孝先生、同研究室修了生、現テキサス大学の岸田康平博士に厚く御礼申し上げます。二価カチオンのトランスクリプトーム解析および折に触れてご助言をくださいました富山県立大学助教、高橋裕里香先生に感謝申し上げます。また、*oprH* の破壊株を分譲くださいました EEZ (Estación Experimental del Zaidín) -CSIC の Dr. Juan L. Ramos および Dr. Estrella Duque に御礼申し上げます。

菌体凝集観察に際し、共焦点顕微鏡の使用法をご教示下さいました東京大学大学院農学生命科学研究科生物制御化学研究室助教、中村英光先生、同研究室、姜凱博士に御礼申し上げます。膜タンパク質調製に際し、ご助言をくださいました、東京大学大学院農学生命科学研究科酵素学研究室助教、荒川孝俊先生に御礼申し上げます。また、質量分析の際にご助言をいただきました、東京大学生物生産工学研究センター細胞機能工学研究室准教授、古園さおり先生に御礼申し上げます。

研究室配属当初から実験操作の基礎を丁寧に教えて下さり、親身にご助言を下さい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修了生、館はる香氏に深く感謝申し上げます。また、接合伝達研究についてアドバイスをいただきました同研究室修了生、松井一泰博士、李美英氏、柳田晃輔氏、および同研究室、張蒼婷氏、藤川郁氏に感謝申し上げます。また、ITC や ÄKTA の操作方法等についてご教示下さいました同研究室、蔡弼丞氏に感謝申し上げます。その他にも、いつも親身にアドバイスを下さったデリアナ・ヴァシレヴァ博士をはじめとする研究室の先輩方、そして河野響氏、富田啓介氏をはじめとする優秀な後輩のみんなに支えられて、楽しい研究室生活を送ることができました。心から感謝申し上げます。

学部生の頃から一緒に切磋琢磨しあいながら、修士を卒業してからも励まし、心の支えとなってくださった研究室同期の高比良早紀氏、茂手木敦史氏、渋谷大地氏、藤原薫氏に厚く御礼申し上げます。何より、一緒に6年間頑張ったフェリペ・ベハラノ氏に深く感謝申し上げます。最高の同期たちと出会えて、一緒に研究ができて幸せでした。

最後になりますが、本研究を進めるにあたり、常に温かく見守り、支えて下さった家族、友人に感謝して、本論文の結びとさせていただきます。

2020年2月