

論文の内容の要旨

応用生命工学 専攻

平成 22 年度博士課程 進学

氏 名 松井 一泰

指導教員名 野尻 秀昭

論文題目 プラスミドの接合伝達に関与する新規因子の探索

第 1 章 序論

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

当研究室では、原油中の含窒素芳香族化合物カルバゾール(CAR) 分解菌 *Pseudomonas resinovorans* CA10 株が有する CAR 分解プラスミド pCAR1 の研究を行ってきた。これまでに、その全塩基配列を決定するとともに、IncP-7 群に属すること、主に *Pseudomonas* 属

細菌を宿主とする接合伝達性プラスミドであることが示されてきた。また、モデル環境中での挙動解析の結果、接合伝達体の出現には Ca^{2+} と Mg^{2+} が必須なことが示された。同時に、供与菌・受容菌一種類ずつの接合実験と、複数の細菌が混在する環境下での接合実験では、接合伝達頻度や、その成否（受容菌域）すら変化してしまうことが明らかになった。以上の背景から、本研究では、プラスミドの接合伝達の成否を決める環境因子とその作用機構を明らかにするために、pCAR1 の接合伝達に関与する新規因子の探索を試みた。

第 2 章 pCAR1 の実環境中における宿主域の解析

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

そこで、fluorescence activated cell sorting (FACS) を用いた接合伝達体の検出・分取系の構築を行った。密度勾配遠心により実環境サンプル中から細菌よりも密度の大きい鉱物等の粒子を除去し、細菌画分とした。環境細菌と供与菌との液体接合実験後の細菌画分を FACS にて測定し、ゲート内に検出された粒子を分取した。6 回の試行により、湖沼水、土壌サンプルからそれぞれ合計で約 10^3 , 約 10^6 個の蛍光を示す粒子を分取した。培養せずに 1 細胞を解析することは研究開始当初困難であったため、蛍光を示す粒子を FACS で多数分取後、プレートに塗布し、生育した菌株の遺伝子解析を行った。その結果、200 株以上の菌株が生育し、解析が終了した 25 株中、接合伝達体は 11 株であった。RFLP 解析から、*Pseudomonas* 属細菌とは異なる属種の細菌が含まれることが示唆された。そこで 16S

rRNA の塩基配列を解読したところ、*Bacteroidetes* の *Flectobacillus* 属細菌、*Flexibacter* 属細菌、 α -*Proteobacteria* の *Brevundimonas* 属細菌、 β -*Proteobacteria* の *Delftia* 属細菌、*Cupriavidus* 属細菌と高い相同性を示した。IncP-7 群プラスミドは主に γ -*Proteobacteria* の *Pseudomonas* 属細菌を宿主とすると考えられてきたが、本研究により γ -*Proteobacteria* 以外にも接合伝達する可能性が示唆された。

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

過去に行われた pCAR1 のモデル環境中での挙動解析の結果、pCAR1 の接合伝達には環境中に Ca^{2+} もしくは Mg^{2+} が存在する必要があることが示された。そこで、環境中の Ca^{2+} と Mg^{2+} の有無が他のプラスミドの接合伝達にも影響を与えるか調べた。pCAR1 (IncP-7, MOB_{H11}, MPF_F) の他に、対照として pB10 (IncP-1 β , MOB_{P11}, MPF_T)、R388 (IncW, MOB_{F11}, MPF_T)を用いて接合実験を行った。その結果、pCAR1 は Ca^{2+} と Mg^{2+} を各 400 μM ずつ添加した培地と比較して、無添加培地中では接合伝達頻度（接合伝達体の CFU/供与菌の CFU）が 1.2×10^4 から検出限界以下 (3.5×10^7) へと顕著に減少したのに対し、pB10, R388 では、接合伝達頻度への顕著な影響は見られなかった。このことから、pCAR1 は環境中の Ca^{2+} と Mg^{2+} の有無によって接合伝達頻度に影響を受けやすいプラスミドであることが明らかになった。

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

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

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

①pCAR1 上の遺伝子の転写変動

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

ことで、 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 添加時には 24 個、非添加時には 17 個の pCAR1 上の遺伝子が転写変動しており、このうち 13 個の遺伝子が共通していた。

② 供与菌染色体上の遺伝子の転写変動

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

③ 受容菌染色体上の遺伝子の転写変動

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

第 5 章 NAPs 破壊が pCAR1 の接合伝達に及ぼす影響の評価

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

コントロールとして用いた NAPs を破壊していない pCAR1*pmrHis* ($9.1 \times 10^4 \sim 1.1 \times 10^3$) と比較して、pCAR1 Δ *phu* (2.0×10^5) において接合伝達頻度が 1/10 程に低下したものの、他の単独破壊株では大きな変化は見られなかった。これに対し、NAPs を二重破壊した pCAR1 Δ *phu* Δ *pmr*、及び pCAR1 Δ *pmr* Δ *pnd* の接合伝達頻度は検出限界以下（それぞれ $<4.0 \times 10^{-7}$ 、 $<4.1 \times 10^{-7}$ ）と大きく減少した。また、この接合伝達頻度の減少は、pCAR1 上に *pmr* を相補しても回復しなかった（それぞれ $<6.7 \times 10^{-7}$ 、 $<2.2 \times 10^{-6}$ ）。コハク酸培養時の NAPs 遺伝子単独破壊株、二重破壊株のトランスクリプトーム解析では、pCAR1 上の多くの接合関連遺伝子の転写量が pCAR1 Δ *pmr*、pCAR1 Δ *phu* Δ *pmr*、pCAR1 Δ *pmr* Δ *pnd* のいずれの場合においても増加しており、各破壊株における接合伝達頻度の評価とは合致しないものであった。今後は、相補した *pmr* の転写量の確認を行うとともに、接合条件下でのトランスクリプトーム解析を行う必要があると考えられる。

第 6 章 総括と展望

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