

論文の内容の要旨

応用生命工学専攻

平成 24 年度博士課程進学

氏 名 李 昇昱

指導教員名 野尻 秀昭

論文題目

バイオフィーム中での環境細菌の振る舞いにおけるプラスミド機能の解明

第 1 章 序論

これまでプラスミドは宿主に抗生物質耐性能や難分解性物質分解能などの形質を単に付与するだけの因子であると考えられてきたが、実際には、宿主染色体の遺伝子発現様式を直接的・間接的に変化させることで宿主形質を本質的に変容させる因子であることが明らかになりつつある。あわせて、プラスミド上の遺伝子の一部も宿主ごとに発現様式が変化するため、プラスミド側から付与される機能も宿主ごとに変化する。すなわち接合伝達性プラスミドは宿主の生き残りや進化に従来の理解以上に複雑に関与することから、プラスミドが宿主に与える影響を詳細に理解することは、環境細菌におけるゲノム進化機構の解明に必須である。

バイオフィームは固体表面に接着した微生物が形成する高次構造体であり、人工環境、自然環境を問わず、固体表面と水が接するほぼ全ての場所に存在する。バイオフィームは、水質浄化への寄与など我々の生活に役立つ場合もあれば、金属腐食・食品汚染・医療器具汚損・齲蝕などの厄介な問題の原因となる場合も多い。環境中のバイオフィームには多種多様な微生物が棲息し、相互作用して共同体を形成している。その結果、バイオフィーム中の微生物は、個々の微生物機能の単なる足し算を越えた新たな機能を獲得し、柔軟性に富んだ多細胞生物体ともみなせる特徴を有するようになる。

以上より、実環境中でのプラスミドと宿主の挙動を理解するためには、プラスミドがバイオフィーム中の宿主細菌の振る舞いに与える影響を理解することが重要であるが、過去の報告例は極めて限られていた。そこで本研究では、IncP-7 群カルバゾール分解プラスミド pCAR1 と *Pseudomonas* 属の宿主細菌 3 種 (*P. putida* KT2440, *P. aeruginosa* PAO1, *P. fluorescens* Pf0-1)

を用いて、pCAR1の保持が宿主のバイオフィーム形成に与える影響を評価すると共に、pCAR1上にコードされる核様体タンパク質 (nucleoid-associated proteins; NAPs) がバイオフィーム形成に与える影響を調べた。さらに、pCAR1 保持株と非保持株を混合して培養することで、バイオフィーム内でのプラスミド保持株と非保持株の挙動を解析した。

第2章 pCAR1が宿主のバイオフィーム形成に与える影響の解析

上記3株について、pCAR1 保持株と非保持株が形成するバイオフィームを共焦点レーザー顕微鏡で観察した。PAO1 株と Pf0-1 株では顕著な変化は認められなかったが、KT2440 株ではマッシュルーム状の構造であったバイオフィームが pCAR1 の保持に伴いフラットな構造に変化した。合わせて、KT2440株ではpCAR1 保持に伴い個々の細胞が繊維状 (filamentous) に変化したものが多く認められた (図1)。このことは、pCAR1 保持に伴うバイオフィーム形成様式への影響が宿主ごとに異なることを示唆している。また、この現象は pCAR1 (IncP-7) 特異的で、異なる種類のプラスミド[NAH7 (IncP-1 群), RP4 (IncP-9 群)]では観察されなかった。pCAR1 上には宿主染色体の転写様式を変化させる因子として3種の NAPs (Pmr, Phu, Pnd) がコードされているため、各遺伝子の単独・二重破壊株が形成するバイオフィームも観察した。その結果、*pmr* と *pnd*, および *pmr* と *phu* の2組の二重破壊株で繊維状化の亢進が観察され (図1)、KT2440(pCAR1)株におけるバイオフィーム形態の変化に複数種の NAPs が複合的に関与している事が示された。

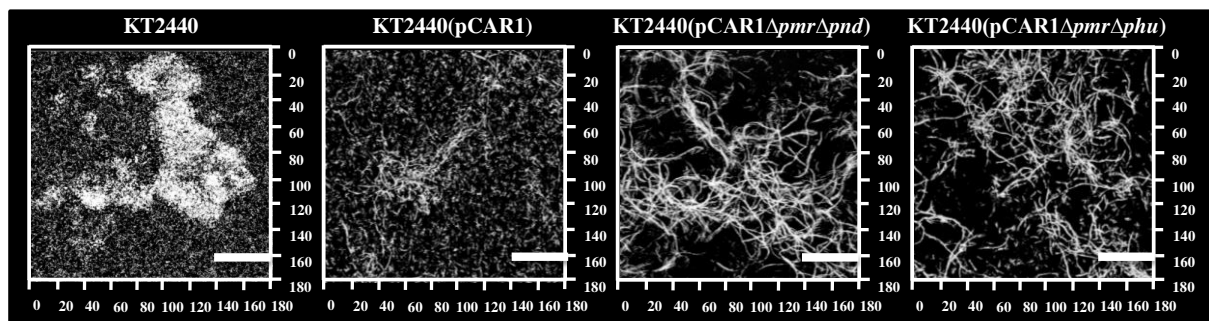


図1. *P. putida* KT2440, KT2440(pCAR1), KT2440(pCAR1 Δ *pmr* Δ *pnd*), KT2440(pCAR1 Δ *pmr* Δ *phu*)株のバイオフィームの観察像。各株をシャーレを上で静置培養、培養開始後12時間のバイオフィーム共焦点顕微鏡を用いて観察した。180 x 180 μ m (xy) の範囲を示す。図中のスケールバーは40 μ m を示す。

上記の pCAR1 を保持する KT2440 株がバイオフィーム形成時に繊維状化する原因を探るため、pCAR1 の保持や NAPs 遺伝子の破壊がバイオフィーム形成時のトランスクリプトームに及ぼす影響を、高密度タイリングアレイを用いて網羅的に調べた。まず、バイオフィーム状態と浮遊状態 (Shintani *et al.*, 2010) で pCAR1 を保持した際に転写変動した遺伝子を比較し、81 個 (誘導 52 個、抑制 29 個) のバイオフィーム状態で特異的に転写変動した遺伝子を選抜した (図2A)。*pmr* と *pnd*, *pmr* と *phu* の2組の二重破壊株と KT2440 株を比較し、*pmr* と *pnd*

株で 1,137 個 (誘導 1,115 個、抑制 22 個), *pmr* と *phu* 株で 1,454 個 (誘導 1,452 個、抑制 2 個)が選抜され, これらを図 2A で選抜された遺伝子と比較することにより繊維状化の原因になる, 32 個の共通に誘導される遺伝子を選抜した (図 2B, 共通に抑制された遺伝子は選抜されず). また, *pmr* と *pnd*, *pmr* と *phu* の 2 種の二重破壊株と KT2440(pCAR1)株を比較し, *pmr* と *pnd* 株で 380 個 (誘導 372 個、抑制 8 個), *pmr* と *phu* 株で 758 個 (誘導 1753 個、抑制 5 個)が選抜され, これらを図 2A で選抜された遺伝子と比較することにより繊維状化を亢進する可能性がある, 2 個の共通に誘導される遺伝子を選抜した (図 2C, 共通に抑制された遺伝子は選抜されず). これらの 2 個の遺伝子は図 2B で選抜された 32 個の遺伝子の中に含まれていた. そこで, 繊維状化の原因遺伝子, あるいは繊維状化を亢進する可能性がある 32 個の候補遺伝子について着目した.

選抜された 32 個の候補遺伝子を高発現させた際の KT2440 株及び KT2440(pCAR1)株のバイオフィルムを共焦点レーザー顕微鏡で観察した. その結果, KT2440 株を用いた過剰発現株では PP_2193 (TonB-dependent siderophore receptor) を高発現させた株で菌体が伸びる現象が観察された (図 3). また, KT2440(pCAR1) 株を用いた過剰発現株では PP_0308 (membrane dipeptidase) および PP_0309 (hypothetical protein) を高発現させた株で繊維状化の亢進が観察された (図 3). PP_2193 は細胞が鉄欠乏に陥った際に転写が誘導されると考えられる遺伝子であり, 菌体が繊維状化へと変化することに伴って細胞中の鉄

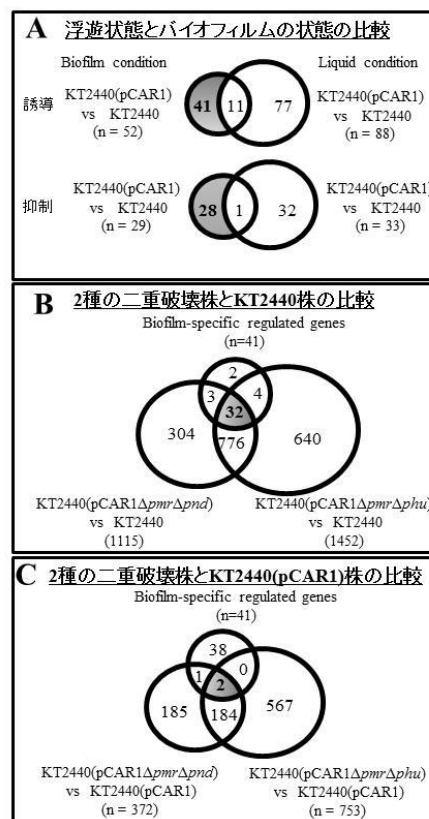


図 2. 繊維状化の原因遺伝子, あるいは繊維状化を亢進する可能性がある候補遺伝子の選抜.

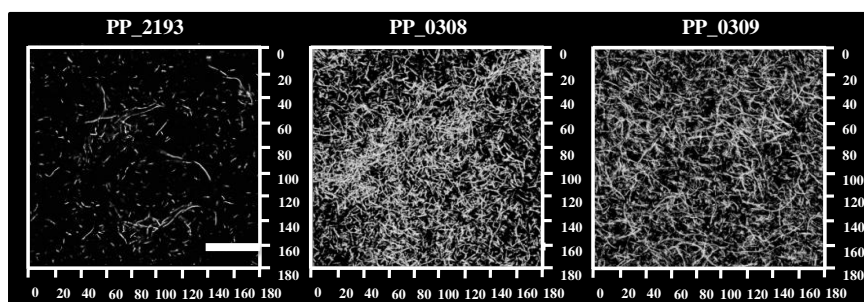


図 3. KT2440 株や KT2440(pCAR1)株のバイオフィルム形成に対する PP_2193, PP_0308, PP_0309 の過剰発現の影響像. 各株をシャーレを上で静置培養, 培養開始後 12 時間のバイオフィルム共焦点顕微鏡を用いて観察した. 180 x 180 μm (xy) の範囲を示す. 図中のスケールバーは 40 μm を示す.

欠乏が起きる可能性が示唆された. 一方, PP_0308 や PP_0309 については詳細な生理機能は不明である. 以上より, KT2440 株の pCAR1 保持に伴う繊維状化には, 複数の遺伝子が協調的に関与する可能性が示唆された.

第3章 pCAR1 保持株・非保持株が共存した際のバイオフィルムの解析

次に、3種の *Pseudomonas* 属細菌の pCAR1 保持株・非保持株を混合した際に形成されるバイオフィルムの観察を行った。各株にそれぞれ緑色蛍光タンパク質 (GFP) と赤色蛍光タンパク質 (mCherry) を挿入した株を作製し、15通りの組み合わせについて、蛍光タンパク質を入れ換えたものも含めて合計 30通りの組み合わせを観察した。その結果、PAO1株を他の株と混合培養すると pCAR1 保持・非保持に関わらずバイオフィルム中で PAO1株が優占化すること、同種間で pCAR1 保持・非保持株を混合培養すると一方の優占化は見られず、各株それぞれがバイオフィルムを形成し、混ざらない状態で棲み分けることが明らかとなった。過去の研究では、上記3株について浮遊状態で pCAR1 保持株と非保持株の競合培養を行った際に pCAR1 保持株の比率が減少することが明らかとなっている (Takahashi *et al.*, 2014)。そこで、フローサイトメトリーや共焦点レーザー顕微鏡を用いて、バイオフィルム状態と浮遊状態における上記3株の pCAR1 保持株・非保持株の割合を定量した。その結果、バイオフィルム状態では pCAR1 保持株と非保持株がほぼ同じ比率を示し、両菌株が生き残ってそれぞれ独立に存在しているのに対して、浮遊状態では pCAR1 保持株の比率が顕著に減少していくことが明らかになった。これらの傾向から、バイオフィルム状態では浮遊状態とは異なり、立体構造を持つため基質に対する濃度勾配が発生し、これらの影響でバイオフィルムの基部にあるプラスミド保持菌の活動が低いため、プラスミド保持株が淘汰されずそれぞれ独立に存在し生き残ると推測された。

第4章 総括と展望

本研究では宿主のモデルとして *P. putida* KT2440, *P. aeruginosa* PAO1, *P. fluorescens* Pf0-1株を、プラスミドのモデルとしてカルバゾール分解プラスミド pCAR1 を用い、pCAR1 保持株・非保持株を浮遊状態とは異なるバイオフィルムという集団中で単独及び混合培養することで pCAR1 保持株の挙動解析を行った。単独培養では、KT2440株特異的に pCAR1 保持株が形成するバイオフィルムはフラットになり、繊維状化した菌体が多く認められた。また、その原因となる3つの遺伝子 (PP_0308, PP_0309, PP_2193) を高密度タイリングアレイ解析により取得することができた。さらに混合培養においては、浮遊状態よりバイオフィルム状態の方が、プラスミドが宿主に与える負荷が軽減されることが明らかになった。

プラスミドが接合伝達により様々な細菌間を移動することを考慮すれば、細胞同士が密接して存在するバイオフィルムは細菌間の遺伝子交換の場として捉えることができる。今後は混合培養時のバイオフィルム中におけるプラスミドの接合伝達現象などを解析することで、バイオフィルム内の細胞同士が密接した状態で、細菌ゲノムやプラスミドが進化を遂げる機構の全貌解明が期待される。