

平成30年6月15日現在

機関番号：12601
研究種目：基盤研究(B) (一般)
研究期間：2015～2017
課題番号：15H04549
研究課題名(和文)ベクターパーティクル：新たな遺伝子伝搬機構の解明

研究課題名(英文)Vector Particle: New mechanism of gene transfer

研究代表者
木暮 一啓 (Kogure, Kazuhiro)

東京大学・大気海洋研究所・教授

研究者番号：10161895
交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,500,000円

研究成果の概要(和文)：広宿主域な遺伝子伝達粒子(VP)の特性と遺伝子の解明を試みた。VP感染大腸菌とF-の接合実験より、4つの栄養要求性の復帰を調べた結果、VP生産遺伝子が染色体上のpro-leu遺伝子座近傍にあることを明らかにした。VP伝播遺伝子が伝搬する遺伝子を明らかにするため、至適増殖温度 10°C の好冷細菌由来のVPを大腸菌に形質導入し、その性状と遺伝子をしらべた。その結果、至適、許容温度範囲が共に 7°C 低下、 10°C で最大増殖密度を示し、好冷菌由来VPが耐塩・耐冷性を中温細菌に伝搬したことを確認した。これによりVPが異なる系統群に増殖温度特性に関する遺伝子を伝搬することを示した。現在、遺伝子配列の解明中である。

研究成果の概要(英文)：The characteristic of broad host range gene vector particle (VP) that enables gene transfer between phylogenetically distant organisms was investigated. First, the conjugation of VP infected Escherichia coli HfrC transductant to F- (leu pro his arg) resulted in VP production in only about half of the transconjugants, no generation of pro transconjugants and the conjugative frequency of leu adjacent to pro was reduced by 4-orders of magnitude of the control. Recognition sequence probably locates in the vicinity of the pro-leu loci on the chromosome, since the linkage was observed other than pro. Second, VP originated from a psychrophile whose optimum at 10°C was infected to E. coli to generate the transductant. The generated transductants showed lower optimum and permissive temperature by 7°C and highest biomass at 10°C revealing the transfer of characteristics of psychrophile to the mesophile by VP. These results indicate the possible function of VP in gene-transfer in nature.

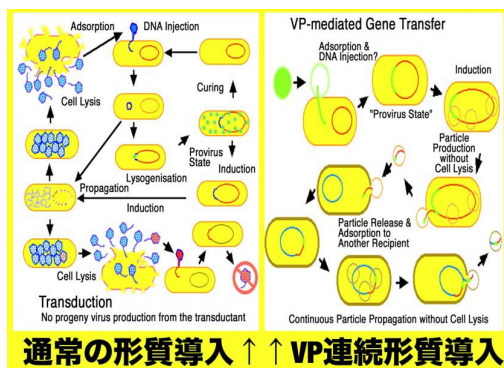
研究分野：海洋微生物学

キーワード：遺伝子伝搬 大腸菌 好冷細菌 Vector Particle 増殖温度特性 遺伝子座

1. 研究開始当初の背景

(1) 近年の急速な遺伝子解析技術の向上により、多くの生物のゲノム構造が明らかになってきた。それらを見ると、多くの遺伝子がドメイン(真正細菌、古細菌、真核生物)を越えて共有されていることが分かる。その一部は進化の初期過程で生じ、それぞれの系統群に受け継がれてきたと見られるが、同時に比較的最近伝搬されたと判断される多くの遺伝子があることがわかる。では、こうした系統的に遠い生物相互の遺伝子伝搬はどのように行われてきたのだろうか。これまで形質転換、接合、形質導入などの概念が提示されてきているが(下図左)、例えば形質転換に必須な裸のプラスミドは天然に存在せず、接合は異種の生物間では大きな困難を伴う。ウイルスを介した形質導入はかなり特異性の高いプロセスで、系統的に離れた生物間では考えにくい。つまり、従来の概念では最近の急速なゲノミクス進歩が明確にした広汎で高頻度に見られる、系統的に遠い生物間の遺伝子伝搬を十分に説明できない。

(2) 我々は、“広宿主域な遺伝子伝達粒子(Vector Particle: VP)”という粒子がそれを可能にすることを見出し、報告してきた(下図右)。ウイルスとは異なり、VPに感染した受容菌は死滅することなく新たにVPを生産するようになる。こうして生産されたVPは系統的に離れた菌に対しても感染性を示し、その際、遺伝子の一部を導入する。しかし、どのような遺伝子がVP生産を担っているのか、どのような遺伝子が実際に運ばれるのか、その感染はどのように起こるのか、ウイルスとの相違は何か、進化に対する貢献はどの程度なのか、など多くの疑問が残されたままである。



2. 研究の目的

本研究では以下の三つの目的を設定した。

- (1) VP粒子生産遺伝子(PPRG)の座位を、接合を用いた微生物遺伝学的方法で解明する。
- (2) VPが伝播する遺伝子の種類と配列特異性を好冷細菌由来VPを中温細菌に形質導入し、生育至適温度、許容生育温度範囲がどのように変化したかを調べ、解明する。
- (3) PPRG遺伝子の決定。

3. 研究の方法

(1) VP粒子生産遺伝子(PPRG)座位の検討 VPを生産性を有する大腸菌は、その遺伝子上のどこかにVP粒子生産遺伝子(PPRG)を持っているはずである。その座位を明らかにするには、複数の栄養要求性を保持する株に対する接合実験を行い、栄養要求性の復帰パターンから推定する方法が適当と考えられる。そこで、まず高頻度組み換え型大腸菌(HfrC)を得るため *Aquifex* sp 由来 VP (ca. 406 kb, Chiura 2004) を (HfrC; *metB* λ *Sm*^r) に感染させ、VPを生産する形質導入株 Hfrmettrans を製作した。次いで、Hfrmettrans (供与菌) と大腸菌 AB1157 (F-; *leuB proA hisG argE*, 受容菌) を接合させたところ、*hisG argE* の接合体生成頻度はVP非感染のHfrCとFを掛け合わせた対照に匹敵したが *leuB* は4桁低下し、*proA* は検出せず、さらに生じた接合体の約半数が粒子生成不能で、また *pro* 以外の *leu arg his* 標識に連鎖が観察された。HfrC接合の遺伝子導入は大腸菌連鎖地図 13'開始点から反時計回りに進行し、*proA* (5.6') *leuB* (1.7') は、*argE* (99') 以前に受容菌に転座する。

(2) VPが伝播する遺伝子特性の検討: 細菌の増殖温度特性は様々な要素で決まるものと推定される。例えば、分子反応速度は温度上昇に伴って上がるが、特定温度以上では関連高分子の変性が起こり、増殖は低下する。逆に低温での増殖を可能にするには、低温下でもその機能を発揮する酵素群、膜の柔軟性の確保などが必要と考えられる。そうした要素を解明するため、好冷細菌 *Polaribacter filamentus* ATCC700397^T (VP供与菌, 生育至適温度 10°C) を海洋細菌培地 1/2 ZoBell, 10°C で培養、生産粒子を回収・濃縮・精製し大腸菌 AB1157 に感染させたところ、受容菌致死はなく、全アミノ酸要求性を原栄養性に復帰した形質導入株 (PfEtrans, 形質導入効率: 1.02±0.51 E-5 cfu/VP) を得た。PfEtrans を 1/2 ZoBell での培養し、その許容生育温度範囲、至適生育温度、最大増殖密度を示す温度等を調べた。

4. 研究成果

(1) VP生産に関わる遺伝子(PPRG)座位の検討はHfrC大腸菌にVPを感染させ生じた形質導入株とF-大腸菌(*leu pro his arg*)による接合伝達でVP生産能が受容菌に伝達されるパターンから検討を行った。その結果、*pro* 接合体は生じず、*pro* 近傍の *leu* は接合頻度が対照に対して 1/10000 以下となり、また、生じた接合体の約半数からだけVP生産が行われた。ゆえに受容菌へのVP感染後にPPRGは受容菌染色体に組込まれることが明らかで、また *pro* 以外の標識に連鎖が観察されたことから、*proA-leuB* は *hisG* (45.0') と伝達末端 (13') 間で組換えられ PPRG は *proA-leuB* 遺伝子座近傍に組込まれたと考えられた。このことよりVP形質導入でのPPRG配列の組換えは相同組換えではなく認識配列/挿入配列の介在が想定され、染色体上の *pro-leu* 遺伝子座近傍に占座する P22 phage (*attP22* : 5.6') 付着

部位領域(1.7~5.6')内に遺伝子座位をもつと考えられた。

(2) VPが伝播する遺伝子の種類と配列特性の検討に、*P. filamentus* (生育至適温度 10°C, 最大増殖密度 5E+8 cells/mL)由来のVPを大腸菌に感染させた結果、受容菌の致死はないとともに、全ての栄養要求性が原栄養性に復帰した形質導入株(PfEtrans)を得た。PfEtransは海洋細菌培地で0~37°Cの範囲で増殖し、至適は30°C、さらに10°Cで最大増殖密度~2E+9 cells/mLを示した。この、同条件では受容大腸菌は生育できないことから好冷細菌由来VPが耐塩・耐冷性を伝搬させたこと、そして受容菌の生育を増進したことが明らかになった。こうした増殖の違いを引き起こす遺伝子を明確化するために、*P. filamentus*、大腸菌 AB1157、および PfEtrans の比較ゲノム解析を行った。その結果、ストレス応答の代謝関連遺伝子と浸透圧調節遺伝子の増強が確認された。これらの結果により、好冷細菌由来VPが中温性細菌の耐塩・耐冷性獲得と許容温度範囲および至適温度の低温側への移動を招くこと、VPが機能遺伝子群を微生物群集へ伝播しうることが明らかになった。これは天然環境中でもVPが同様の機能を持つことを示唆する。

比較ゲノムの結果の一部を下の表に示す。

Strain	<i>P. filamentus</i>	<i>E. coli</i> AB1157	PfEtrans
Size, bp	4,281,931	4,631,317	4,665,732
GC content, mol %	31.4	50.8	50.8
Subsystem	349	591	592
Coding sequences	3,992	4,477	4,521
RNAs	51	107	107
Subsystem Feature Counts			
Cofactors, Vitamins, Prosthetic Groups, Pigments	196	290	290
Cell Wall and Capsule	109	272	272
Virulence, Disease and Defense	54	115	129
Potassium metabolism	14	28	28
Photosynthesis	6	0	0
Miscellaneous	32	64	67

(3)PPRG 遺伝子の決定は、VP 形質導入株と受容菌の塩基配列比較を現在実施中である。一般に両者の遺伝子の大部分は共通しており、その中から PPRG 遺伝子を同定していくのは予想以上に困難であった。現在、その同定のために、詳細な解析を進めているところである。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計2件)

Wong S-K, Park S, Lee J-S, Lee KC, Ogura Y, Hayashi T, Chiura HX, Yoshikawa S, Yamasaki K. *Algibacter aquaticus* sp. nov., a slightly alkaliphilic marine flavobacterium isolated from the coastal surface water of Aburatsubo Inlet. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 査読有. 67 巻、2017. 2199-2204.

DOI: 10.1099/ijsem.0.001924

Yamada, Yosuke, Hideki Fukuda, Yuya Tada, Kazuhiro Kogure and Toshi Nagata. *Bacterial*

enhancement of gel particle coagulation in seawater. *Aquatic Microbial Ecology*, 査読有. 77 巻、2016、11-22 DOI:10.3354/ame01784

[学会発表](計6件)

Chiura, HX. Gene transfer mediator between organisms, which have been overlooked. Symposium for "Research information exchange" in the National Marine Biodiversity Institute of Korea. April 25, 2017

Kogure, K. Metatranscriptomic analyses of microbial populations in Tohoku area. Symposium for "Research information exchange" in the National Marine Biodiversity Institute of Korea. April 25, 2017

Chiura, HX., Kumagai, Y., Yoshizawa, S., Kogure, K. Overlooked gene transfer mediator between organisms. 9th Asian Symposium on Microbial Ecology. April 27, 2017.

千浦博. 水圏で見過ごされてきた広宿主域な情報伝達媒体の様相. 国立遺伝学研究所研究集会: 生物種間における遺伝情報の水平移動. 2017.

千浦博. 見過ごされてきた生物間情報伝達媒体. 第3回環境微生物系合同大会. 2017年

千浦博、鈴木誠治. 極海洋から分離された *Polaribacter* が生産する広宿主域遺伝子伝達粒子. 生命科学系合同年次大会. 2017

[図書](計0件)

[産業財産権]

○出願状況(計0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

○取得状況(計 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
取得年月日:
国内外の別:

[その他]
ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

木暮 一啓 (Kogure, Kazuhiro)

東京大学大気海洋研究所 教授

研究者番号：10161895

(2)研究分担者

吉澤 晋 (Yoshizawa, Susumu)

東京大学大気海洋研究所 准教授

研究者番号：00553108

(4)研究協力者

千浦 博 (Chiura, X Hiroshi)

東京大学大気海洋研究所 特任研究員

研究者番号：00103698