2版

様　式　Ｃ－１９、Ｆ－１９－１、Ｚ－１９　（共通）

科研費 KAKENHI

科学研究費助成事業　　研究成果報告書

平成 ３０ 年　 ６ 月　 ５ 日現在

機関番号：１２６０１

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2017

課題番号：１５Ｋ１４６８６

研究課題名（和文）複数の受容菌候補がいる条件下での遺伝子水平伝播様式の解明

研究課題名（英文）Conjugation manner of natural plasmids to plural recipient candidates

研究代表者

野尻　秀昭（NOJIRI, Hideaki）

東京大学・生物生産工学研究センター・教授

研究者番号：９０２７２４６８

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費）　　3,000,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、供与菌1種に対し2種の受容菌が存在する接合を行い、受容菌の共存がプラスミドの接合伝達に及ぼす影響の評価および作用因子の探索を目的とした。4種のプラスミドについて、2種のPseudomonas属細菌を宿主とした接合実験を行った結果、受容菌の共存により同種の菌への伝達が優先される場合があることを明らかにした。さらに、本現象の作用因子探索をBACライブラリースクリーニングおよびトランスポゾン変異導入法を用いて行い、受容菌染色体およびプラスミド上の作用因子の存在を明らかにした。

研究成果の概要（英文）：To reveal the mechanisms determining plasmid behavior in nature, we assessed the transferability of plasmids from one donor strain to either of two recipient candidates as the most simplified example of conjugation in consortia. Two different Pseudomonas strains were used as model hosts and pCAR1, NAH7, pB10, and R388 were used as model plasmids. Plasmids were generally transferred more frequently to the same species than to different. The coexistence of other recipients enhanced such tendency to be transferred to the same species more frequently, while pCAR1 transfer was less affected.
To clarify the factor(s) affecting such phenomena, we constructed a screening method with BAC library of recipient chromosomal genome. It was suggested that there were some regions which accelerate plasmid recruitment from the same species. We also constructed the screening method of transposon inserted library of NAH7 in order to search the factor encoded on plasmid, and obtained 8 candidates.

研究分野：環境微生物学

キーワード：細菌　遺伝子水平伝播　接合伝達　微生物群集

１．研究開始当初の背景

遺伝子の水平伝播の頻度や受容できる菌の範囲（受容菌域）の解明を目的に、各種プラスミドの接合伝達能力が古くから評価されてきた。その際には、プラスミドを持つ細菌（供与菌）と受け取る細菌（受容菌）を混合し、フィルター上や菌懸濁液の状態で静置した後に薬剤耐性等を指標に頻度や受容菌域が調べられた。これらの実験の多くで供与菌と受容菌は 1 種ずつ（1:1 と表記する）混合されてきたが、自然環境下では細菌は多種多様な細菌と一緒に生息しており多数の受容菌が共存する状況が一般的である。すなわち、従来の 1:1 の実験デザインにより、接合伝達能が歪められて評価されてきた可能性が否定できないが、この点に着目した研究はほとんど行われて来なかった。一方、研究代表者らは不和合性群 IncP-7 群の pCAR1 を持つ供与菌（1 種）と 10 種の受容菌候補（うち 7 種には 1:1 の接合実験で伝達可能）を混合したモデル環境水を用いた実験で、7 種のうちで *Pseudomonas resinovorans* のみへの接合伝達が検出されることを見いだした［Shintani et al., *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **80**, 485-497 (2008)］。また、pCAR1 と NAH7 (IncP-9 群) のいずれかを有する *Pseudomonas putida* を供与菌、*P. putida* と *P. resinovorans* のいずれか 1 種（1:1）、または 2 種混合菌群（1:2 と表記）を受容菌とした代表者らの菌懸濁液を用いた接合実験で、pCAR1 は 1:1 でも 1:2 でも両菌株に同様の頻度で接合伝達したのに対し（図 1 左）、NAH7 は 1:2 の条件では *P. resinovorans* への接合伝達頻度が著しく低下することが明らかになった（図１右）。そこで、1:2 の接合実験において“NAH7 が特定の受容菌を選り好みする現象”の原因を解明することが、様々な細菌が存在する環境中での各種プラスミドの振る舞いの“真の姿”の理解のための端緒となると考えた。

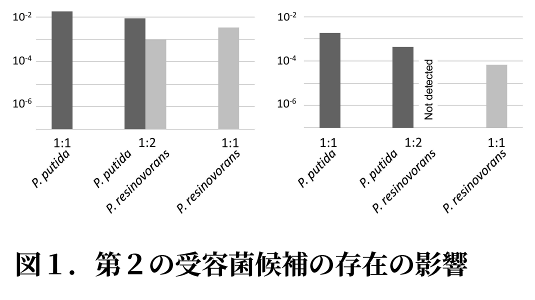

図１．第２の受容菌候補の存在の影響

２．研究の目的

上記の現象の一般性を評価すると共に、その機構を解明する観点で、下記の二つの点について解明することとした。

(1) 図１右の現象は、ナフタレン分解プラスミドNAH7で明らかになっていたものであるが、この現象が他のプラスミドでも共通なものなのか、接合の方法（液体中での懸濁状態での接合か、フィルター上での接合か）による影響はあるのかを評価する。

(2) 1:1 と 1:2 の接合伝達実験で受容菌選択性に顕著な違いが認められる原因を、この現象のメカニズムを解明することで明らかにする。

３．研究の方法

(1) <u>現象の一般性の評価</u>

異なる Inc 群に属する 4 種のプラスミド、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）を用いて、図 1 に示した実験系と同様な系で受容菌候補の数の違いによる接合伝達頻度の変化を調べ、NAH7 で認められた 1:2 の接合条件下での挙動が他のプラスミドでも共通であるかを調べた。

また、接合の方法がプラスミドの挙動に及ぼす影響を評価するため、上と同様な実験を液体中での懸濁状態での接合（液体接合）および固体培地上での接合（フィルター接合）として行い、プラスミドの接合伝達頻度を比較した。

さらに、供与菌と受容菌の菌懸濁液の顕微鏡観察による菌体の凝集体生成の有無の評価、および、受容菌 *P. putida* の培養上清を供与菌 *P. putida* と受容菌 *P. resinovorans* の 1:1 の菌懸濁液に添加した接合実験による、共存する受容菌が培地中に放出する物質が及ぼす影響の評価も行った。

(2) <u>プラスミドの挙動決定因子の探索</u>

因子探索のモデルプラスミドとして NAH7 を、供与菌として *P. putida*、受容菌として *P. putida* および *P. resinovorans* を混合して用いた 1:2 の液体接合実験系を採用した。

①受容菌 *P. putida* 由来の因子探索

受容菌 *P. putida* 染色体ゲノムの BAC ライブラリーを受容菌 *P. resinovorans* 染色体上に導入し、BAC ライブラリーの導入により 1:2 の接合条件下でNAH7の受容が可能となった株の取得を行った。

②プラスミド NAH7 由来の因子探索

NAH7 上に Tn5 を用いてランダムにトランスポゾン（Tn）変異を導入し、Tn 変異の導入により遺伝子が破壊され 1:2 の接合条件下で *P. resinovorans* への接合伝達頻度が上昇したプラスミドの取得を行った。

４．研究成果

(1) <u>現象の一般性の評価</u>

供与菌として *P. putida* あるいは *P. resinovorans* を用いた液体接合実験を行ったところ、4 種のプラスミドはいずれも、1:1 の接合伝達そのものは供与菌と同種の受容菌へ起こりやすい傾向が見られた。さらに、NAH7、pB10、R388 については、「異種の受容菌への接合伝達頻度」を「同種の受容菌への接合伝達頻度」で除した値（選択指数）が、1:2 接合時には大きく低下した。すなわち、

同種の受容菌候補が共存することで、異種への接合伝達頻度が低下する傾向が見られた。また、同様の傾向はフィルター接合時にも見られた。中でも、*P. putida* を供与菌とした際の、液体接合時の NAH7 およびフィルター接合時の R388 において、選択指数は同種の受容菌候補の共存により極めて大きく低下することが明らかとなった。

その一方で、pCAR1 の接合伝達の挙動は、同種の受容菌候補の存在の有無に依らず大きく変化しなかったことから、pCAR1 の接合伝達への受容菌候補の共存の影響は小さいことが明らかとなった（図 2）。

これらの結果から、先行研究で示された "NAH7 が特定の受容菌を選り好みする現象" は、同種の受容菌の共存が何らかのメカニズムで異種への接合伝達に作用している現象であると考えられ、他のプラスミドにも共通した傾向が見られる場合があることが示唆された。また、宿主-プラスミドの組み合わせや接合の方法の違いにより、2 種の受容菌候補の共存の及ぼす影響は異なることが示唆された。

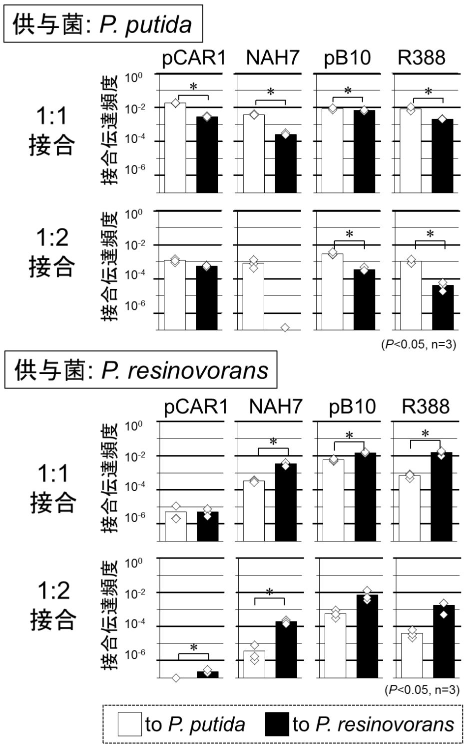

図2．1:1 と 1:2 の液体接合での接合頻度

接合時の供与菌と受容菌による凝集体生成がプラスミドの接合伝達頻度を上昇させる例が知られていることから、上述の現象が凝集体生成のしやすさに起因する可能性を考えた。そこで、顕微鏡観察による液体接合時の供与菌と受容菌の菌体懸濁液中の凝集体生成の有無の評価を行った。その結果、プラスミドや供与菌宿主の種類に依らず、菌体懸濁液中での凝集体の生成は見られなかったことから、供与菌と受容菌による凝集体の生成は上述の現象に関与しないことが示唆された。

また、同種の受容菌が生成し培地に放出する何らかの物質が異種の受容菌への接合伝達に作用する可能性を考え、供与菌として *P. putida* を用い受容菌として *P. resinovorans* を用いた 1:1 の接合時の NAH7 の挙動に、共存する受容菌 *P. putida* の培養上清が及ぼす影響を調べた。その結果、培養上清を添加した場合でも NAH7 の接合伝達挙動は変化しなかったことから、共存する同種の受容菌が培地に放出する物質は異種の受容菌への接合伝達頻度の低下に関与しないことを明らかにした。

(2) <u>プラスミドの挙動決定因子の探索</u>

同種の受容菌の共存が異種の受容菌への接合伝達に影響を及ぼす現象の原理理解を目指し、プラスミド NAH7 が *P. putida* を供与菌とした場合に 1:2 の液体接合条件下で *P. resinovorans* へほとんど接合伝達しなくなる現象（図２上）のメカニズムの解明を試みた。本現象には宿主・プラスミド由来のいずれかあるいは両方の因子の関与が考えられ、それら双方の因子探索を試みた。

① 受容菌 *P. putida* 由来の因子探索

宿主由来の作用因子として、受容菌 *P. putida* 由来の "同種への接合伝達を優先させる" 因子の存在を仮定した。そこで、*P. putida* 染色体上ゲノムの BAC ライブラリーを受容菌 *P. resinovorans* 染色体上に導入しスクリーニングを行うことで、当該因子を獲得し 1:2 の接合条件下で NAH7 の接合伝達頻度が有意に上昇する株の取得を試みた。その結果、1:2 の接合条件下で NAH7 の接合伝達頻度が上昇した 15 株を取得し、それらの染色体上に導入された BAC クローンのシーケンス解析から、異種の受容菌候補（*P. resinovorans*）への接合伝達頻度を上昇させる領域として、*P. putida* 染色体上の少なくとも 10 箇所の領域（50〜150 kb の DNA 断片を含む）に存在する遺伝子が関与することを明らかにした。また、BAC ライブラリーへの Tn 変異導入を用いたスクリーニング法の構築も修了しているので、今後は作用を明らかにした *P. putida* 染色体上の 10 箇所の領域について、作用遺伝子の同定を行う予定である。

② プラスミド NAH7 由来の因子探索

受容菌の共存が接合伝達に及ぼす影響の程度はプラスミドごとに異なっていたことから、プラスミド上にも関与因子が存在することが推定される。そこで、NAH7 上への Tn 変異導入により受容菌の選択性が低下した株の取得を試みた。プラスミド上のランダムな位置に Tn 変異が導入されたライブラリーから、(i) *P. resinovorans* への接合伝達頻度自体が上昇した、(ii) *P. putida* への接合伝達頻度との比が上昇した、という 2 つの基準のいずれかもしくは両方を満たす Tn 変異導入プラスミドを受容菌の選択性が低下したものと

して選抜した。その結果、1 次スクリーニングにより選択性の減少度合いが様々な 27 種の候補遺伝子を取得し、さらに検出限界を下げた（より感度を上げた）2 次スクリーニングを行い、最終的に 8 種の候補遺伝子を取得した。現在、シーケンス解析を行い、Tn 変異導入により破壊された取得遺伝子の同定を行っており、今後は破壊された遺伝子からメカニズムの推定および実証を行う予定である。

５．主な発表論文等

〔雑誌論文〕（計　1　件）

① Kosuke Yanagida, Ayako Sakuda, Chiho Suzuki-Minakuchi, Masaki Shintani, Kazuhiro Matsui, Kazunori Okada, Hideaki Nojiri. 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 (2016). 査読あり DOI: 10.1080/09168451.2015.1127131.

〔学会発表〕（計　9　件）

① 作田 郁子、水口 千穂、松井 一泰、高橋 裕里香、岡田 憲典、山根 久和、新谷 政己、野尻 秀昭. IncP-7 群プラスミドの接合伝達成立における二価カチオンの作用機序の解析. 日本農芸化学会 2018 年度大会. 2018 年

② Ayako Sakuda, Chiho Suzuki-Minakuchi, Kazunori Okada, Hideaki Nojiri. Recipient selectivity in conjugation using multiple recipient candidates. ASM Microbe 2017. 2017.

③ 作田 郁子、水口 千穂、小曽根 郁子、橋本 絢子、小松 護、新家 一男、池田 治生、森内 良太、道羅 英夫、新谷 政己、岡田 憲典、野尻 秀昭. 細菌集団中でのプラスミドの受容菌選択に影響を与える因子の探索. 環境微生物系合同大会 2017. 2017 年

④ 作田 郁子、水口 千穂、小曽根 郁子、橋本 絢子、小松 護、新家 一男、池田 治生、森内 良太、道羅 英夫、新谷 政己、岡田 憲典、野尻 秀昭. 細菌集団におけるプラスミドの受容菌選り好み機構の発見と解析. 日本農芸化学会 2017 年度大会. 2017 年

⑤ 作田 郁子、水口 千穂、小曾根 郁子、橋本 詢子、新家 一男、池田 治生、岡田 憲典、野尻 秀昭. 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. 日本農芸化学会 2016 年度大会. 2016 年

⑥ 作田 郁子、水口 千穂、小曾根 郁子、橋本 詢子、小松 護、新家 一男、池田 治生、岡田 憲典、野尻 秀昭. 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. 第 16 回東京大学生命科学シンポジウム. 2016 年

⑦ 作田 郁子、水口 千穂、小曾根 郁子、橋本 詢子、小松 護、新家 一男、池田 治生、岡田 憲典、野尻 秀昭. 接合伝達性プラスミドの複数の受容菌存在下における受容菌選択機構の解明. 環境バイオテクノロジー学会 2016 年度大会. 2016 年

⑧ Ayako Sakuda, Chiho Suzuki-Minakuchi, Junko Hashimoto, Ikuko Kozone, Mamoru Komatsu, Kazuo Shin-ya, Haruo Ikeda, Kazunori Okada, Hideaki Nojiri. Coexistence of multiple recipient candidates affects the host range of conjugation. Plasmid Biology 2016. 2016.

⑨ 作田 郁子、水口 千穂、小曾根 郁子、橋本 詢子、小松 護、新家 一男、池田 治生、岡田 憲典、野尻 秀昭. 複数の受容菌が存在するとき、プラスミドはどの菌を選ぶのか？　第 15 回微生物研究会. 2016 年.

６．研究組織

(1)研究代表者

野尻　秀昭（NOJIRI, Hideaki）

東京大学・生物生産工学研究センター・教授

研究者番号：９０２７２４６８