

令和 3 年 5 月 20 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2018～2020

課題番号：18H02121

研究課題名（和文）細菌におけるプラスミド非感受性の分子基盤

研究課題名（英文）Molecular bases of the insensitivity of bacteria to the carriage of various plasmids

研究代表者

野尻 秀昭 (Nojiri, Hideaki)

東京大学・農学生命科学研究科・教授

研究者番号：90272468

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 13,600,000円

研究成果の概要（和文）：一部の細菌は、各種のプラスミドを保持する場合でも非保持株との競合培養で淘汰されない性質（プラスミド非感受性）を示す。本研究では、この発現に、従来、硫黄代謝系の主要転写制御因子として知られていたCysBを起点とする転写制御系の起動が重要であることを明らかにした。この代謝制御系の下流にはTCAサイクルやエネルギー代謝系が配置されており、細胞内の代謝の調節がプラスミド非感受性の鍵になることが強く示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

プラスミド非感受性は、一部の細菌だけが示す他に報告がない形質であり、その発現機構の解明はそれ自体が重要な科学的成果である。また、この現象の発現に、硫黄代謝系を中心とする代謝調節が重要である点は、プラスミドの負荷という言葉で言い表されてきた現象の実体が代謝の乱れにあったことを実験的に証明する意味で非常に意義深い。また、この機構が明らかになったことで、物質生産などに利用される汎用宿主をプラスミドベクター（さらには外来遺伝子）に対して非感受性化できる可能性も示され、産業応用等の観点からも重要である。

研究成果の概要（英文）：Pseudomonas resinovorans CA10dm4 exhibits the novel property, named “plasmid insensitivity”, by which, even when carrying various plasmids, the bacterial strain is not out-competed during competitive culture with plasmid-free strain. In this study, we clarified that the transcriptional activation of the regulon of CysB, which was conventionally known as the master transcription regulator of the sulfur metabolism in Gram-negative bacteria, is important for the expression of this novel phenotype. The TCA cycle and energy metabolism system are located downstream of this metabolic control system, strongly suggesting that the regulation of intracellular metabolism is the key to plasmid insensitivity.

研究分野：環境微生物学

キーワード：細菌 プラスミド 遺伝子 水平伝播 fitness 淘汰

1. 研究開始当初の背景

(1) 背景となる社会的背景

院内感染での死亡例の増加は世界各地で報告されており、薬剤耐性日和見病原菌の制御は喫緊の課題となっている。薬剤耐性遺伝子はプラスミド等の可動性遺伝因子にコードされることが多く、耐性菌の出現や耐性遺伝子の伝播を制御する上で、水平伝播により薬剤耐性遺伝子を得た耐性菌が環境中の細菌集団中でどう振る舞うかは非常に重要な知見となる。

また、原油成分・農薬・溶媒等の環境汚染物質の分解遺伝子は広く環境細菌で見いだされるが、分解菌ゲノムの中では染色体上ではなくプラスミド上に分解遺伝子が存在することも多い。これらの分解プラスミドを持つ分解菌を環境汚染の浄化（特に分解菌を添加するバイオオーグメンテーション）に利用するニーズは高いが、実際の汚染浄化現場で分解菌が分解力を発揮するには周囲の細菌との競合に打ち勝つ必要があり、分解菌の実環境中での挙動を決める因子について詳細な理解が求められている。

一方、我々はプラスミドを有用物質の発酵生産のための遺伝子導入のツール（ベクター）として用いている。しかし、プラスミドベクターは細胞内で不安定なことも多く、また安定でも宿主に負荷を与えることでヘテロな集団内での生存競争にマイナス影響を及ぼすことが多い。そのため、抗生物質耐性遺伝子をプラスミドベクター内に挿入し、培地には抗生物質を添加することでプラスミド保持株の優占化を図るのが一般的である。しかし、抗生物質利用は生産コストの増加に繋がるため忌避される事が多い。さらに、上述した薬剤耐性菌・耐性遺伝子の伝播の制御の観点から、ヨーロッパを中心に発酵生産分野での抗生物質利用は制限される傾向にあり、微生物利用分野では、プラスミドベクター利用の弊害がクローズアップされつつある。

(2) 学術的な背景

上記の社会的背景で共通するのは、プラスミドは一般的に宿主に新規形質を与える反面、宿主に対して負荷を与え、集団内での生存競争にマイナス要因として働くという事実である。この負荷を与えるメカニズムと集団内での優占化・淘汰のメカニズムを詳細に理解することで、耐性菌の優占化抑制、分解菌の効果的利用、発酵による物質生産プロセスにおけるプラスミド利用の拡大が可能になる。特に、近年、薬剤耐性菌制御のニーズの高まりにより、集団内での生き残りやすさ（fitness と表現される）の原因を探る多くの先導的な研究が報告されているが、このプロセスはプラスミドごとに異なる可能性も示唆されており、さらなる研究の深化が望まれる。

研究代表者らも、各種の分解プラスミドや薬剤耐性プラスミドをモデルに、プラスミドが宿主に与える影響の解明や、負荷の原因と宿主の振る舞いのメカニズム解明を行ってきた。その過程で、土壌細菌 *Pseudomonas resinovorans* CA10dm4 株が様々なプラスミドを保持しても fitness が低下せず、プラスミド非保持株との競合培養を経ても保持株の割合が低下しないという現象を見いだした [図 1]。これは、CA10dm4 株が種々のプラスミドに対し“非感受性”であることを示しており、多くの細菌がプラスミド保持により fitness が低下するのは対照的である（例として、図 1 の右端に *Pseudomonas putida* KT2440 株では、competition assay で pCAR1 保持株の比率が大きく低下することを示している）。もし、CA10dm4 株の非感受性の原因を明らかにできれば、負荷を回避するメカニズムが多くのプラスミドで共通か否かを知ることができる。この情報は、各プラスミドが与える負荷の原因に一般性はあるのかへの解答でもあり、本研究で解明すべき「問い」と言える。

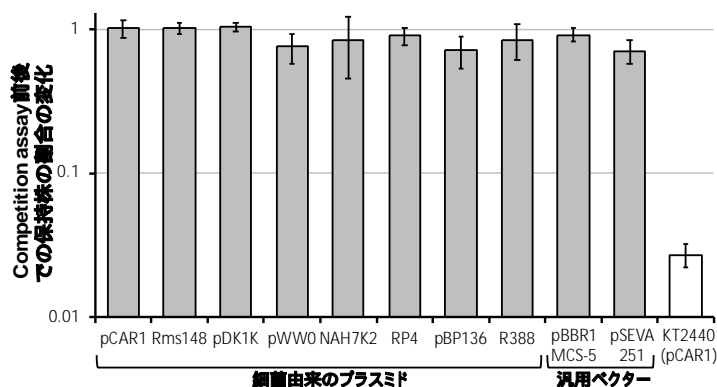


図 1. 様々なプラスミド保持時の CA10dm4 株の fitness
縦軸は「培養終了時の保持株の比率÷培養開始時の保持株の比率」を示す。その値が 1 より小さいことは、保持株が培養過程で淘汰された (fitness が低い) ことを意味する。

2. 研究の目的

本研究では、*P. resinovorans* CA10dm4 株が持つ、種々のプラスミドへの非感受性の原因を分子レベルで明らかにすることを目標とする。本研究では、遺伝子破壊株を用いた逆遺伝学的なアプローチにより、非感受性発現に重要な遺伝子発現ネットワークを明らかにする。得られる知見は、上述した 3 つの社会状況における問題を解決するための重要な基盤情報を提供するものである。

3. 研究の方法

(1) プラスミド感受的な変異株の取得と解析

プラスミドを保持する CA10dm4 株ゲノム上のランダムな位置に *gfp* 遺伝子を含むトランスポゾン (Tn) が挿入された変異株ライブラリーを作製し、重要な因子をコードする遺伝子の機能が失われたことでプラスミド非感受性を発揮できずに fitness が低下した「プラスミド感受的な」変異株の取得を試みた。この実験では、カルバゾール分解遺伝子を含む IncP-7 群プラスミド pCAR1 をモデルとして使用する。変異株の取得には、非選択条件 (カルバゾールはもちろん、抗生物質などを添加しないコハク酸を唯一の炭素源とする培地) でプラスミドを保持する CA10dm4 株を非保持株と競合培養させる系 (competition assay) を用いた。GFP 蛍光の追跡により、competition assay で Tn 変異株が減少しないか評価した。結果として選抜された Tn 変異株は、生育速度の評価、プラスミドの細胞内での安定性を調べた後に、Tn 挿入位置を決定し、RNA-Seq 解析に供した。

(2) 硫黄代謝系に関わる転写ネットワークの解明

Pseudomonas 属細菌の硫黄代謝系マスター転写因子遺伝子 *cysB* を破壊し、硫黄添加・飢餓の両条件での RNA-Seq 解析を行うことで、CysB 制御下にある遺伝子 (CysB レギュロン) を同定した。また、CysB 制御下にあることが示された転写制御因子の単独・二重・三重破壊株を同様に作成して、competition assay により fitness を評価した。

重要と判断された転写制御遺伝子については、過去の TSS-Seq 解析結果と 5'-RACE 法により転写開始点 (TSS) を決定した。さらに、そのプロモーター領域を決定するため、遺伝子上流部分の配列にレポーター遺伝子を融合させたレポータープラスミドを作成し、各種宿主を用いて種々の条件下でレポーター解析を実施した。さらに、当該プロモーター領域をラベルした DNA 断片と、結合する可能性がある転写制御因子を大腸菌で発現・生成したものをを用いてゲルシフトアッセイを行い、当該領域への転写制御因子の結合能を *in vitro* で評価した。また、重要な転写制御因子については、遺伝子破壊株を用いた RNA-Seq 解析を行って、下流に存在する遺伝子の機能を調べた。

4. 研究成果

(1) プラスミド感受的な変異株の取得と原因解明

pCAR1 を保持する CA10dm4 株に Tn 挿入を行い、Tn 挿入に伴って GFP 蛍光を発する変異株ライブラリーを作成した。これを一株ずつプラスミド非保持株と混合し、competition assay に供することで、fitness が減少した変異株をスクリーニングする実験系を構築した。なお、competition assay においては、プラスミド非感受性を保つ変異株では GFP 蛍光は高い値で維持されるが、fitness が減少した変異株では検出される GFP 蛍光が減少する。これを指標に、3,200 の変異株をスクリーニングした結果、二株の fitness が減少した変異株 (#2, #4 株) を取得することに成功した。この二株では、非感受性が減少して pCAR1 感受的になったと考えられた。なお、Tn の挿入が単独培養時の生育速度やプラスミド自体の宿主細胞内での安定性 (プラスミド保持株を単独培養した時に非保持株が現れる頻度) に影響しないことは確認した。

Tn 挿入位置の解析から、#2 株では染色体上に存在するプロファージ領域内の機能未知遺伝子の内部に、#4 株では染色体上のセンサータンパク質をコードする遺伝子の内部に Tn が挿入されていた。なお、両変異株から pCAR1 を脱落させた株に pCAR1 以外のプラスミド (IncP-1 群の薬剤耐性プラスミド RP4, IncP-9 群のナフタレン分解プラスミド NAH7K2) を保持させ competition assay に供することで、プラスミドの種類によらず fitness が低下して、プラスミド保持に感受的になることを確認した。この結果を受けて、#2 株と #4 株を「プラスミド感受的」な変異株と結論付けた。

次に、変異株がプラスミド感受性を示した原因を転写レベルから探索するために、野生型株と両変異株を RNA-Seq 解析に供した。その結果、変異により転写変動する遺伝子がそれぞれ検出されたが、野生型株と比較して転写抑制された遺伝子の中に、両変異株で共通して検出される遺伝子が多かった [図 2]。なお、この共通して検出された 62 個の中には、硫黄代謝に関与する遺伝子群 (*cys*, *tau*, *ssu* 等の operon) や、互いに高い相同性 (塩基配列レベルで 78% 以上、アミノ酸配列レベルで 65% 以上) を示す三つの転写制御因子 PCA10_30000, 40590, 40680 が含まれていた。この結果は、異なる遺伝子が破壊された両変異株が、類似の機構によりプラスミド感受性を示した可能性を強く示唆していた。この類似の機構を解明することで、プラスミド非感受性に重要なシグナル経路を同定できる可能性が高いと考え、以降は共通して転写抑制された 62 遺伝子に注目した。

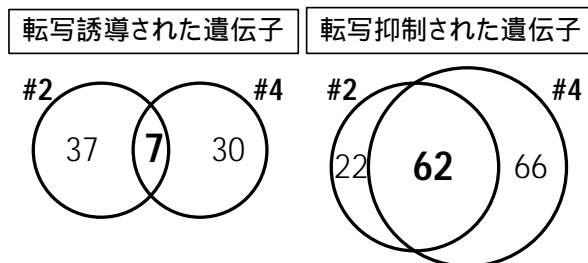


図 2. 二株の変異株で転写変動した遺伝子の包含関係

(2) プラスミド非感受性の発揮に必要な転写制御ネットワークの解明

Pseudomonas 属細菌を含むグラム陰性細菌では、主要転写制御因子 CysB が硫黄代謝系の転写制御を担うのが一般的である。つまり硫黄代謝に関連する遺伝子群が転写抑制されたプラスミド感受的な両変異株では、CysB の転写制御様式が変化している可能性が考えられた。そこで CysB の機能解析の一環として、下流の遺伝子群 (CysB レギュロン) の同定を行った。なお、硫黄飢餓条件で CysB の転写活性化能は劇的に上昇し、CysB レギュロンの強力な転写誘導がなされるのが一般的である事実を踏まえ、野生型株において硫黄飢餓条件で転写誘導され、かつ *cysB* 破壊株で転写抑制される遺伝子を RNA-Seq 解析により探索した。この解析により、染色体上の 88 遺伝子を CysB レギュロンとして同定することができた。興味深いことに、感受的に変化した両 Tn 変異株で共通して転写抑制されていた 62 個の遺伝子のうち、58 個は CysB レギュロンに属していた [図 3] 先述の硫黄代謝系の各オペロンや三つの転写制御因子 (PCA10_30000, 40590, 40680) も、図 3 の 58 遺伝子の中に含まれていた。また、RNA-Seq 解析の結果を詳細に見返すと、残りの CysB レギュロン (30 遺伝子) の大部分も両変異株で転写抑制される傾向にあった。 *cysB* の転写量は野生型株と両変異株で同程度であることを踏まえた上で、両変異株では CysB の転写活性化能の低下が生じたと結論付けた。

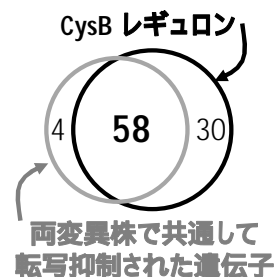


図 3. CysB レギュロンの役割

次に、CysB 制御下にある三つの転写制御因子のプラスミド非感受性への関与を検証するために、各遺伝子の破壊株 (単独・二重・三重) を作製しプラスミド保持時の fitness への影響を評価した。その結果、PCA10_40680 を破壊した場合にのみ pCAR1 を含む様々なプラスミドの保持に伴う fitness の低下が確認された。従って、三つの因子の中でも PCA10_40680 遺伝子産物がプラスミド非感受性発揮に主要な役割を担うと結論付け、転写制御ネットワークにおけるこの因子の上流 / 下流の機構解明に取り組んだ。

過去に研究代表者らのグループで、CA10dm4(pCAR1)株を用いた TSS-Seq 解析により pCAR1 上の転写開始点 (TSS) の網羅的決定が行われていた。その際に取得済の染色体上のマッピングデータを解析し、PCA10_30000, 40590 それぞれの TSS とその上流のプロモーター (-10/-35 box) を決定した。さらに -35 box 付近に大腸菌で提唱された CysB の結合領域 (30~40 bp の AT-rich な配列) が見出されたため、これら二因子は CysB の直接の制御下にあることが示唆された。一方で PCA10_40680 の上流については、TSS-Seq 解析結果と 5'-RACE 法で TSS を決定し、レポーター解析によりプロモーターも決定した。プロモーター領域の配列から、PCA10_40680 遺伝子は σ^{54} 制御と考えられたが、この領域には CysB の結合領域は見出されず、間接的な制御が示唆された。三つの転写制御因子のホモログ (*P. aeruginosa* PAO1 株の SfnR1 と SfnR2) に関する報告を踏まえると、PCA10_40680 の転写は PCA10_30000, 40590 に制御されると共に、PCA10_40680 自身にも制御される可能性が示唆された。そこで、PCA10_40680 のプロモーター領域と各精製タンパク質の結合能をゲルシフトアッセイにより評価した。その結果、いずれのタンパク質にも結合能が確認され、CysB の直接の制御下に PCA10_30000, 40590 が、さらにそれらの下流に PCA10_40680 が存在し、かつ PCA10_40680 は自身の制御も担うという階層構造が明らかになった [図 4]。なお、PCA10_30000, 40590, 40680 は他の *Pseudomonas* 属細菌で硫黄代謝に関与する転写制御因子 SfnR と非常に相関性が高いため、それぞれを *spiR1*, *spiR2*, *spiR3* (SfnR-like regulator related to plasmid-insensitivity) と命名した。

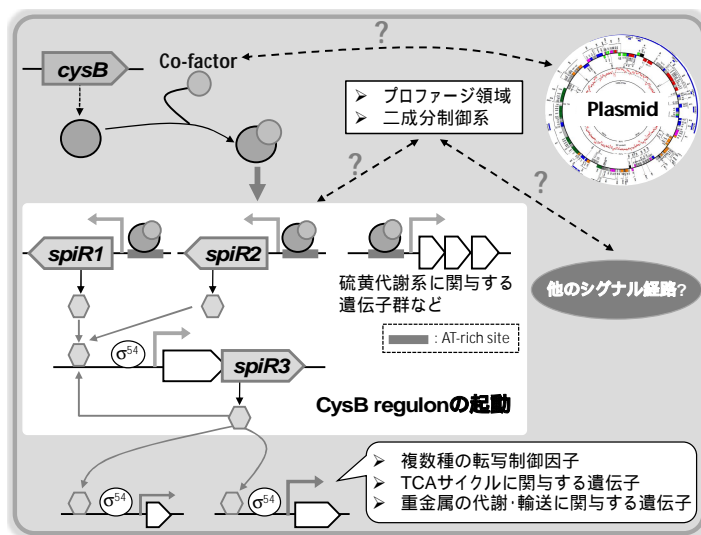


図 4. プラスミド非感受性に重要な転写制御ネットワーク

最後に、*spiR3* 破壊株を用いた RNA-Seq 解析により、その下流に複数の別の転写制御因子、TCA サイクルや重金属の排出・代謝に関与する遺伝子群を同定した。

(3) まとめ

本研究により、プラスミドに非感受性となるためには、図 4 にまとめた CysB を起点とする転写制御系が起動することが重要であることが示された。この代謝制御系の下流には TCA サイクルやエネルギー代謝のシステムが配置されており、細胞内の代謝の調節がプラスミド非感受性

の鍵になる可能性がある。プラスミドの負荷の原因としてプラスミドと宿主の組み合わせに特異的な因子の存在も知られているが、本研究の成果は、プラスミドの負荷の少なくとも一部は、代謝の乱れと言った種々のプラスミドと宿主の組み合わせに共通な現象である可能性を示している可能性がある。さらなる解析が必要ではあるが、各種のプラスミドが細胞内に侵入することによって起こる代謝の乱れを、CA10dm4 株は今回明らかにした CysB レギュロンを起動させることで調整できるのかも知れない。この調整力（の高さ）が、CA10dm4 株だけがプラスミド非感受性を示す原因なのかも知れない。この「調整」の過程を調べるのが重要と思われる。

また、上記考察が真なら、このような代謝の乱れの調整力を大腸菌などの汎用宿主に導入することで、プラスミドやベクターに対し、宿主を非感受性化できるかも知れない。今後、このような観点の技術開発が重要であろう。

本研究では、Tn 変異の結果取得された二つの因子の役割、CysB 活性化の機構、RNA-Seq 解析で示された関与が疑われる未解明の因子の関与など、プラスミド非感受性に関係する未解明の因子・現象の存在も示された [図 4] 今後、このような因子の働きや役割を解明することが、非感受性メカニズムの全貌解明や、より効率的な宿主創成の鍵になると予想される。

近年、CysB が硫黄代謝に限らず細菌細胞の他の現象の制御にも関わるグローバルレギュレーターであるとの仮説も提唱されている。本研究で、一見、硫黄代謝と関係ないプラスミド非感受性に CysB が関係していることが示されたことも、この仮説を支持する可能性がある。今後、CysB が果たす役割という観点でも、非感受性と硫黄代謝の関係性を詳細に評価していく必要がある。大腸菌の CysB は細胞内の硫黄代謝経路に含まれる小分子が co-factor となって転写誘導能が活性化されることが知られている。CA10dm4 株を含む *Pseudomonas* 属細菌での co-factor は不明だが、この co-factor の同定も今後重要なブレイクスルーとなる可能性がある。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Kawano Hibiki, Suzuki-Minakuchi Chiho, Sugiyama Daisuke, Watanabe Natsuki, Takahashi Yurika, Okada Kazunori, Nojiri Hideaki	4. 巻 11
2. 論文標題 A Novel Small RNA on the Pseudomonas putida KT2440 Chromosome Is Involved in the Fitness Cost Imposed by IncP-1 Plasmid RP4	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Frontiers in Microbiology	6. 最初と最後の頁 1328
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fmicb.2020.01328	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計16件（うち招待講演 4件/うち国際学会 5件）

1. 発表者名 河野響, 水口千穂, 岡田憲典, 野尻秀昭
2. 発表標題 環境細菌にプラスミド非感受性を与える転写制御ネットワークの解明
3. 学会等名 第20回東京大学生命科学シンポジウム
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 高島綾, 河野響, 上田朋美, 中村泰輔, 水口千穂, 岡田憲典, 野尻秀昭
2. 発表標題 カルバゾール分解プラスミドpCAR1由来のTAシステムは他のプラスミドの安定化に寄与する
3. 学会等名 日本農芸化学会関東支部2020年度大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 高島綾, Zhang Huiting, 河野響, 水口千穂, 岡田憲典, 野尻秀昭
2. 発表標題 プラスミド獲得直後の宿主はどのような細胞内応答を示すのか？
3. 学会等名 第15回日本ゲノム微生物学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 河野響, 水口千穂, 岡田憲典, 野尻秀昭
2. 発表標題 硫黄代謝を司る転写制御因子 CysB がプラスミド非感受性の鍵因子である
3. 学会等名 日本農芸化学会2021年度大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 水口千穂, 野尻秀昭
2. 発表標題 細菌は接合伝達で獲得したプラスミドにどのように「順応」するのか?
3. 学会等名 日本農芸化学会2021年度大会 (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Hibiki Kawano, Tomomi Ueda, Chiho Suzuki-Minakuchi, Kazunori Okada, Hideaki Nojiri
2. 発表標題 Pseudomonas resinovorans CA10dm4 shows the novel trait "plasmid-insensitivity".
3. 学会等名 ASM Microbe 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Hideaki Nojiri
2. 発表標題 Pseudomonas resinovorans CA10dm4 shows insensitivity to various plasmids: Its role in the host genome evolution.
3. 学会等名 International Congress of the Malaysian Society for Microbiology 2019 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Hideaki Nojiri
2. 発表標題 Pseudomonas resinovorans CA10dm4 shows insensitivity to various plasmids: Its role in the host genome evolution
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会公募ワークショップ「遺伝子の水平伝播からゲノム進化を考える」(招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 河野 響、水口 千穂、岡田 憲典、野尻 秀昭
2. 発表標題 細菌にプラスミドへの非感受性を与える転写制御ネットワークの解明
3. 学会等名 日本農芸化学会2020年度大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 河野 響, 上田 朋美, 水口 千穂, 岡田 憲典, 野尻 秀昭
2. 発表標題 どのような遺伝因子が " プラスミド非感受性 " の発揮を可能にするのか?
3. 学会等名 環境バイオテクノロジー学会2018年度大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Tomomi Ueda, Hibiki Kawano, Chiho Suzuki-Minakuchi, Kazunori Okada, Hideaki Nojiri
2. 発表標題 The possibility of the development of a novel host-vector system with bacteria showing " insensitivity " to plasmids
3. 学会等名 Plasmid Biology 2018 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Hibiki Kawano, Tomomi Ueda, Chiho Suzuki-Minakuchi, Kazunori Okada, Hideaki Nojiri
2. 発表標題 Pseudomonas resinovorans CA10dm4 is insensitive to plasmids
3. 学会等名 Plasmid Biology 2018 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Hideaki Nojiri
2. 発表標題 Insensitivity to plasmids in some bacteria and its ecological role
3. 学会等名 Plasmid Biology 2018 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 上田朋美, 河野響, 水口千穂, 岡田憲典, 野尻秀昭
2. 発表標題 プラスミドの保持に「非感受性」を示す宿主を利用した新規宿主ベクター系開発の可能性
3. 学会等名 第70回日本生物工学会大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 河野響, 上田朋美, 水口千穂, 岡田憲典, 野尻秀昭
2. 発表標題 どのような遺伝因子がプラスミド非感受性の発揮に関与しているのか?
3. 学会等名 日本農芸化学会2019年度大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 上田 朋美, 河野 響, 水口 千穂, 岡田 憲典, 野尻 秀昭
2. 発表標題 細菌が示すプラスミド”非感受性”を利用した新規宿主ベクター系開発の可能性
3. 学会等名 日本農芸化学会2019年度大会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関		
中国	西安交通大学	山東大学	