

機関番号：15401

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2008～2010

課題番号：20570221

研究課題名（和文） 細菌から出芽酵母へのドメイン間水平遺伝子伝達に働く正と負の因子

研究課題名（英文） Positive and negative factors responsible for inter-domain DNA transfer between bacteria and yeasts

研究代表者

鈴木 克周（SUZUKI KATSUNORI）

広島大学・大学院理学研究科・教授

研究者番号：50221320

研究成果の概要（和文）：アグロバクテリウムが真核生物に T-DNA を注入する現象と大腸菌が酵母にプラスミドを注入する生物界間接合現象は、原核生物が type 4 分泌系に依存して能動的に真核生物へ DNA を注入する興味深い現象である。本研究で出芽酵母が受容細胞として高い能力を発揮するのに重要な遺伝子を探索した結果、vATPase 酵素サブユニット遺伝子を中心とした遺伝子が生物界間接合能力に重要であること、DNA 修復組換え遺伝子 *RAD52*、遺伝子を抑制する遺伝子 *SRS2* 等の遺伝子が T-DNA 輸送での形質転換に重要であることを明らかにした。2つの現象の両方が低下する変異体が見られないことから、上記遺伝子は受容機構の中で共通部分とは異なり互いに特化した部位で機能しているものと考えられた。これらの現象の研究に必要なプラスミドならびに供与菌株と操作技術開発を行い、高頻度かつ容易な形質転換ならびに高精度かつ容易な加工を可能にした。

研究成果の概要（英文）：

Agrobacterial T-DNA transfer and Trans-kingdom conjugation from Gram-negative bacteria to yeasts are interesting phenomena in that bacteria actively transfer DNA horizontally to eukaryotes. This study with a yeast as a model eukaryotic recipient revealed that yeast genes mainly for vATPase subunits are important for Trans-kingdom conjugation, and that yeast genes including *RAD2* and *SRS2* are important for the agrobacteria-mediated transformation. Each of the genes is likely to function in a process which had been specialized between the two phenomena. This study also developed useful tools for accurate but easy modification on huge-size plasmids and enabled highly efficient but easy transformation.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2009年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2010年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,800,000	1,140,000	4,940,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・進化生物学

キーワード：水平遺伝子伝達・生物界間接合・T-DNA 輸送・細菌・アグロバクテリア・酵母・真核生物・接合遺伝子

1. 研究開始当初の背景

各種の真核生物ゲノムには原核生物由来と推定される DNA が見出されており、真核生物の進化への寄与とともにどのようにつづいて原核生物からもたらされたのか興味深い。真核生物に原核生物が能動的に DNA を注入する機構として、Ti プラスミドを持つ病原性アグロバクテリウムが双子葉植物細胞に感染して T-DNA を注入する現象がよく知られている。最近、この細菌がヒトや酵母への T-DNA を輸送できることが報告されている。T-DNA 輸送を行うことが知られている病原性アグロバクテリウムには病原性プラスミドとして Ti を持つものの他に Ri プラスミドを持つものもある。後者が植物以外の生物に T-DNA 輸送可能かどうか未解明であった。T-DNA 輸送に対応する現象が、大腸菌と酵母の間にもみられ生物界間接合現象とよぶ。生物界間接合ではプラスミド全体が酵母へ注入される。二つの現象共に Type 4 分泌系に依存する DNA 輸送であり、供与側の細菌での仕組みは比較的良く理解されているが、受容細胞がどのような状態でどのように受け取るのか不明な点が多い。

2. 研究の目的

報告者らは申請時に生物界間接合能力の低下した酵母変異体を分離し終えていた。本研究では、以下の点の解明を試みた。Type 4 分泌系に依存する DNA 輸送である T-DNA 輸送と生物界間接合に注目して、受容細胞側に必要な要素ならびに抑制している要素はあるのか、両者の間に違いはあるのか明らかにすることを目的としている。そのために、生物界間接合効率の低い酵母の変異が T-DNA 受容能力にも影響を与えるのか、どのような病原性アグロバクテリウムでも酵母に T-DNA 供与体となりうるのか、生物界間接合能力の高くなる変異体酵母は得られるのかを分析した。また、Ri プラスミドを持つアグロバクテリアの能力を明らかにしようとして試みた。

3. 研究の方法

出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* BY4742 株 (*ura3 leu2*) と、この株由来の遺伝子破壊株コレクションの中からスクリーニングして見出した生物界間接合能力の低下した酵母変異体を受容菌とした。これらの酵母株に T-DNA 輸送を適用するために、T-DNA 輸送用バイナリープラスミドへ酵母人工染色体 YAC (*URA3 ARS1*) を挿入したプラスミドを作成した。供与菌アグロバクテリアは主に *Agrobacterium tumefaciens* を用いた。供与大腸菌に RK2 由来接合プラスミドと *URA3* あるいは *LEU2* を持ち酵母で自律複製でき

る可動性プラスミドを保持させて供与菌とした。供与菌と受容菌を共存培養した後に、選抜培地に播いて培養し、*Ura3*⁺あるいは *Leu2*⁺への形質転換体コロニーを検出して、遺伝子の移動を確認定量した。

この過程で必要な様々な構造の Ti ならびに Ri プラスミドと菌株を作成するために、種々の病原性アグロバクテリウム菌ならびに病原性プラスミドを加工する技術を開発した。

4. 研究成果

vATPase サブユニットタンパク質の遺伝子他の生物界間接合効率が大幅に低い変異体の T-DNA 受容効率を測定したところ、*not1* 変異体を除いては野生型株と大差なかった。*not1* 変異体は見かけ上効率が低かったが増殖に大きい影響があるため効果は明確でない。従って、T-DNA 輸送は生物界間接合と異なる受容の段階があると考えられた。

そこで、T-DNA 受容に重要な酵母遺伝子の探索を試みた。出芽酵母変異体をスクリーニングした。その結果、野生型親株に比して受容効率が 10 分の 1 以下に低下した変異体を 14 株得た。各変異体に野生型遺伝子を持つプラスミドを導入して機能回復する調べたところ、DNA 修復組換え遺伝子 *RAD52*、遺伝子を抑制する遺伝子 *SRS2* および機能の明確でない遺伝子 *SMI1* 他が重要であると判明した。これらの低下変異体の生物界間接合効率は野生型株に比べて大差ないレベルであった。生物界間接合効率が低い変異体の T-DNA 受容効率が野生型株に比べて大差ないレベルであることと合わせると、上記遺伝子は 2 つ受容機構の中で共通部分とは異なり互いに特化した部位で機能しているものと考えられた。

Ri プラスミドを持つアグロバクテリウム菌を供与菌として酵母への T-DNA 輸送を試みたところ、Ti プラスミドを持つものをアグロバクテリウム菌を用いた場合と比べて顕著に低いことがわかった。植物への感染能力はほぼ同じであるのと対照的な結果である。この差は Ri と Ti プラスミドの間で GALLS を持つか *virE1virE2* を持つかによる差に起因することが分かった。

生物界間接合効率低下変異株とは逆に、生物界間接合効率が上昇する変異体をスクリーニングしたところ、野生型株と比較して 2 2 株の変異体が 1 5 倍以上の高い効率を示した。これらの変異体にはミトコンドリア機能に必要な遺伝子の破壊株が複数含まれているという傾向が見られた。

この過程で、Ti ならびに Ri プラスミドを精密かつ容易に加工する技術、大腸菌で安定に維持して容易にアグロバクテリウム菌へ移植する技術、アグロバクテリウム菌から

ラスミドを除去する技術、アグロバクテリウム菌を見分ける技術等を開発できた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 (計 7 件)

1. S. Yamamoto, K. Suzuki (2012, in press) Development of a reinforced Ti- eviction plasmid useful for construction of Ti plasmid-free *Agrobacterium* strains. *J. Microbiol. Meth.* 査読有
2. K. Kiyokawa, S. Yamamoto, Y. Sato, N. Momota, K. Tanaka, K. Moriguchi and K. Suzuki (2012, accepted for publication) Yeast transformation mediated by *Agrobacterium* strains harboring an Ri plasmid: comparative study between *GALLS* of an Ri plasmid and *virE* of a Ti plasmid. *Genes Cells* 査読有
3. M. Mizuta, E. Satoh, C. Katoh, K. Tanaka, K. Moriguchi, K. Suzuki (2011) Screening for yeast mutants defective in recipient ability for transkingdom conjugation with *Escherichia coli* revealed importance of vacuolar ATPase activity in the horizontal DNA transfer phenomenon. *Microbiol Res.* (doi:10.1016/j.micres.2011.10.001.) 1-6 査読有
4. K. Kiyokawa, S. Yamamoto, K. Sakuma, K. Tanaka, K. Moriguchi, and K. Suzuki (2009) Construction of disarmed Ti plasmids transferable between *Escherichia coli* and *Agrobacterium* species. *Appl. Environ. Microbiol.* 75:1845-1851. 査読有
5. Yamamoto, S., Kiyokawa, K., Tanaka, K., Moriguchi, K., Suzuki, K. (2009) Novel toxin-antitoxin system composed of serine protease and AAA-ATPase homologues determines the high stability and incompatibility of the tumor-inducing plasmid pTiC58. *J. Bacteriol.* 191: 4656-4666. 査読有
6. J. Bautista-Zapanta, H. H. Arafat, K. Tanaka, H. Sawada, K. Suzuki (2009) Variation of 16S-23S internally transcribed spacer sequence and intervening sequence in rDNA among the three major *Agrobacterium* species. *Microbiol. Res.* 164:604-612. 査読有
7. K. Tanaka, H. H. Arafat, H. Urbanczyk, S. Yamamoto, K. Moriguchi, H. Sawada, and K. Suzuki (2009) Ability of *Agrobacterium tumefaciens* and *A. rhizogenes* strains, inability of *A. vitis* and *A. rubi* strains to adapt to salt-insufficient environment, and taxonomic significance of a simple salt requirement test in the pathogenic *Agrobacterium* species. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 55:35-41. 査読有

〔学会発表〕 (計 16 件)

1. K. Kiyokawa, S. Yamamoto, K. Tanaka, K.

- Moriguchi, K. Suzuki (2011.10.29) Yeast transformation mediated by *Agrobacterium* strains harboring an Ri plasmid. 32nd International Crown Gall Conference (Hilton Garden Inn, Middleton, Wisconsin, USA)
2. S. Yamamoto, K. Kiyokawa, K. Tanaka, K. Moriguchi, K. Suzuki (2011.10.29) Stability enhancing genes of Ti plasmids and its application. 32nd International Crown Gall Conference (Hilton Garden Inn, Middleton, Wisconsin, USA).
3. 清川一矢, 山本真司, 佐藤由香里, 田中克幸, 守口和基, 鈴木克周 (2011.5.14-15) Ri プラスミドをもつアグロバクテリア株の出芽酵母に対する低形質転換能の解析. 日本植物学会中国四国支部香川大会 (香川大学)
4. S. Yamamoto, K. Tanaka, H. H. Arafat, J. Bautista-Zapanta, H. Urbanczyk, K. Suzuki, (2010.8.1) Diversity among strains in *Agrobacterium* species. ISBDS2010 International Symposium of Biodiversity Sciences "Genome, Evolution and Environment (名古屋市 ルブラ王山)
5. 山本 真司, 清川 一矢, 田中 克幸, 守口和基, 鈴木 克周 (2010.3.30) Ti プラスミド pTiC58 上に見出された新しいタイプのトキシン-アンチトキシンシステム *ietAS* の研究. 農芸化学会大会 (東京大学)
6. 清川一矢, 山本真司, 佐藤由香里, 百田直人, 田中克幸, 守口和基, 鈴木克周 (2009.12.9-12) Ti プラスミド *virE* と Ri プラスミド *GALLS* の比較: 出芽酵母に対する形質転換能. 日本分子生物学会年会 (パシフィコ横浜)
7. 守口和基, 枝廣憲孝 池ヶ谷洋佑 白木田中克幸, 倉田のり, 鈴木克周 (2009.12.9-12) IV型分泌系を応用した新規遺伝子導入法の確立 日本分子生物学会年会 (パシフィコ横浜)
8. 枝廣 憲孝, 守口和基, 池ヶ谷 洋佑, 藤原 慎哉, 田中 克幸, 鈴木 克周 (2009.5.16-17) 大腸菌から出芽酵母への生物界間接合を利用した高効率かつ安定な新規遺伝子導入法の検討 日本植物学会中国四国支部大会 (高知大学)
9. 佐藤 由香里, 清川 一矢, 山本 真司, 百田 直人, 高松 詩穂理, 田中 克幸, 守口和基, 鈴木 克周 (2009.5.16-17) T-DNA 輸送システムによる出芽酵母の形質転換に関与する遺伝子の網羅的スクリーニング法の確立. 日本植物学会中国四国支部大会(高知大学)
10. 清川一矢, 山本真司, 佐藤由香里, 百田直人, 田中克幸, 守口和基, 鈴木克周 (2009.5.16-17) Ti プラスミド *virE* と Ri プラスミド *GALLS* の比較: 出芽酵母に対する形質転換能. 日本植物学会中国四国支部大会 (高知大学)

11. 藤原慎哉, 池ヶ谷洋佑, 影居聡子, 守口和基, 田中克幸, 鈴木克周 (2008.12.9-12) 生物界間接合-その分子メカニズムの解析と遺伝子導入系としての応用 (II) .日本分子生物学会年会 (神戸ポートアイランド).
12. 田中克幸, 清川一矢, 山本桃子, 寺田良介, 山本真司, 守口和基, 澤田宏之, 鈴木克周 (2008.12.9-12) 植物病原菌 *Agrobacterium* biovar 2 (*Rhizobium rhizogenes*)の染色体バックグラウンドの違いによる植物形質転換能の比較. 第31回日本分子生物学会年会 (神戸ポートアイランド).
13. S. Yamamoto, K Kiyokawa, K Tanaka, K Moriguchi, K Suzuki (2008.11.22-23) Novel toxin -antitoxin genes on pTiC58 determine the stability and high incompatibility of the plasmid. Annual Crown Gall Conference (University of Michigan, USA)
14. K Kiyokawa, S Yamamoto, K Tanaka, K Moriguchi, K Suzuki (2008.11.22-23) Construction of disarmed Ti plasmids transferable between *Escherichia coli* and *Agrobacterium*. Annual Crown Gall Conference (University of Michigan, USA)
15. 山本桃子, 田中克幸, 清川一矢, 山本真司, 守口和基, 澤田宏之, 鈴木克周 (2008.5.17-18) *Agrobacterium rhizogenes* (biovar 2)の染色体側バックグラウンドに基づいた植物形質転換能の比較. 第65回日本植物学会中国四国支部大会 (広島大学).
16. 山本真司, 田中克幸, 守口和基, 鈴木克周, (2008.5.17-18) pTiC58 の不和合性・安定性増大遺伝子. 第65回日本植物学会中国四国支部大会 (広島大学)

[図書] (計 1 件)

1. K. Suzuki, K. Tanaka, S. Yamamoto, K. Kiyokawa, K. Moriguchi, K. Yoshida (2009) Ti and Ri plasmids. In: Microbial Megaplasmids. E. Schwartz (ed.) in Microbiology Monograph series. Springer Verlag, Heidelberg, pp.133-147.

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 件)

1. 名称 : プラスミド除去用組み換えプラスミドおよびその利用
発明者 : 山本真司, 鈴木克周
権利者 : 国立大学法人広島大学
種類 : 特許願
番号 : 2011-155056
出願年月日 : 平成23年7月13日
国内外の別 : 国内

6. 研究組織

(1) 研究代表者

鈴木 克周 (SUZUKI KATSUNORI)
広島大学・大学院理学研究科・教授
研究者番号 : 50221320

(2) 研究分担者 なし

(3) 連携研究者

守口 和基 (MORIGUCHI KAZUKI)
広島大学・大学院理学研究科・講師
研究者番号 : 30294523
(H20 : 研究分担者)

(4) 研究協力者

田中 克幸 (TANAKA KATSUYUKI)
株式会社建設環境研究所
研究者番号 : 10363045
(H20 : 研究分担者,
H21 : 連携研究者)