

科学研究費助成事業(学術研究助成基金助成金) 研究成果報告書

平成25年 5月20日現在

機関番号：11301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2012

課題番号：23658268

研究課題名(和文) 細菌環境汚染物質分解能の水平伝播を規定する因子の研究

研究課題名(英文) Bacterial genetic determinants that control horizontal transfer of genes for degradation of environmental pollutants

研究代表者

津田 雅孝(TSUDA MASATAKA)

東北大学・大学院生命科学研究科・教授

研究者番号：90172022

研究成果の概要(和文)：

細菌プラスミドの種属を越えうる接合伝達能は宿主細菌に迅速な環境適応・進化をもたらすが、接合伝達宿主域の規定要因は不明である。本研究では、環境汚染物質分解能を支配する2種の自己伝達性プラスミドが同種内細菌でも限られた受容菌株にのみ接合伝達能を発揮する現象に着目し、接合伝達過程での接合対形成不全や受容菌支配で接合に直接関係しないとされてきた多面的代謝制御系が、接合伝達を可能にする受容菌宿主域を規定することを示した。

研究成果の概要(英文)：

Conjugative transfer of bacterial plasmids plays an important role in rapid adaptation and evolution of host cells. However, the factors governing the host range of transfer, *i.e.*, limited transfer to specific recipient strains within a species, remain unclear. In this study, such factors were investigated using the two plasmids encoding the traits for degradation of environmental pollutants, and the mating pair-formation in the conjugation process and a regulatory system for various metabolisms in the recipient cells were found to be involved in restricting the conjugative transfer of the plasmids.

交付決定額

(金額単位：円)

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|-------|-----------|---------|-----------|
| 交付決定額 | 3,000,000 | 900,000 | 3,900,000 |

研究分野：微生物遺伝学

科研費の分科・細目：境界農学・境界農学

キーワード：環境修復、環境細菌、プラスミド、遺伝子水平伝播、接合伝達

1. 研究開始当初の背景

環境細菌は人為起源の各種汚染物質の分解者として極めて重要であり、(i)当該汚染物質分解能を獲得した新規細菌株は比較的短時間で出現すること、(ii)この迅速な分解能獲得には種属を越えた細菌間での分解酵素遺伝子の水平伝播が大きく寄与すること、が明らかになっていった。我々も実際に、トルエンやナフタレンの分解酵素遺伝子群が多様な「分解プラスミド」上に存在し、これらプラスミドが様々な細菌種に接合伝達可能なことを示してきた。一方、プラスミドの水平伝播能は、プラスミドの「供与菌から受容菌への接合伝達能」と「受容菌での複製能」の両

機能がともに発揮されて成立するが、接合伝達されても受容菌内で複製できないプラスミドが多く見出されてきたことから、接合伝達能の宿主域は複製能のそれよりも広いと考えられてきた。一方、申請者らは、グラム陰性環境細菌 *Pseudomonas putida* 由来のトルエン分解プラスミド pDK1 は、*Pseudomonas* の特定菌株間でのみ接合伝達可能だが、接合伝達されない多くの他株でも複製能を発揮するという、逆の現象を見出した。また、上記とは別の *P. putida* 株由来で *P. putida* や大腸菌での複製能と種内並びに種間接合伝達能を備えるナフタレン分解プラスミド NAH7 の研究で、NAH7 の特定オペロン欠失誘導体は

種間接合伝達能のみを失うことを示すとともに、*P. putida* 受容菌の多様な代謝制御に関わるホスホエノールピルビン酸依存性リン酸基転移(PTS^{Ntr})系構成因子の突然変異により、上記 NAH7 誘導体の種間接合伝達能が回復するという予備的成果を得ていた。これら成果から、プラスミド接合伝達能発揮にプラスミドのみならず、今まで注目されなかった受容菌の未知遺伝子産物や基本的代謝状態が関与することが強く示唆されていた。

2. 研究の目的

本研究では、*Pseudomonas* 属細菌由来で環境汚染物質分解能を担う2つのプラスミドを対象として、「接合伝達宿主体」を規定するプラスミド側と宿主(供与菌と受容菌)染色体側の双方の因子を同定し、それらの作用機構を検討することで、プラスミドの根幹的性質である「接合伝達宿主体」の本質的な解明を最終的な目的とした。このために、(i) IncP-7 群に属するトルエン分解プラスミド pDK1 の接合伝達能を規定するプラスミド側並びに宿主染色体側因子の同定、(ii) IncP-9 群に属するナフタレン分解プラスミド NAH7 の接合伝達能を規定するプラスミド側並びに宿主染色体側の各因子機能とその相互作用の解明、の実施をめざした。特に後者では、細胞の基本的代謝に関して多面的制御機能を有する PTS^{Ntr} 系との関連に注目して研究を進めることとした。さらに、解明した接合伝達能発揮規定因子とその機能・分子機構の普遍性や多様性の提示も視野に入れた研究も試みた。

3. 研究の方法

(1) *P. putida* HS1 株由来の pDK1 は、近縁種の *P. fluorescens* Pf-5 株に接合伝達での水平伝播が可能だが、HS1 株や Pf-5 株から *P. putida* の KT2440 株に接合伝達されない。しかし、pDK1 の複製措置のみを有する誘導体プラスミドは形質転換法で KT2440 株への導入と複製が可能であることから、pDK1 自体や受容菌支配因子、または供与菌側因子が相互作用を伴いつつ、pDK1 接合伝達可能受容菌域を規定すると推定された。一方、pDK1 と接合伝達装置が酷似した IncP-7 群カルバゾール分解プラスミド pCAR1 は KT2440 株間の接合伝達が可能であった。

① pDK1 と pCAR1 で同一供与菌株からの接合実験系を構築する必要があったため、Pf-5 株を供与菌とする pCAR1 の接合実験系を構築した。

② Pf-5 株から KT2440 株への pDK1 接合伝達欠損を克服できる pDK1 や KT2440 株染色体由来の突然変異を取得するために、Pf-5(pDK1)株のトランスポゾン(Tn)挿入変異ライブラリーと KT2440 株の Tn 挿入変異ライブラリーを各々3万クローンほど構築した。

前者ライブラリーを供与菌集団とし、KT2440 株を受容菌とした接合実験、そして、後者ライブラリーを受容菌集団とし Pf-5(pDK1)株を供与菌とした接合実験により、目的とした Tn 挿入突然変異の取得を試みた。

③ pCAR1 のみが保持すると予測された接合伝達装置遺伝子を含む様々な DNA 断片をクローン化した組換えプラスミドを pDK1 保有 Pf-5 株や KT2440 株に導入し、供与菌株から KT2440 株やその誘導体株への pDK1 接合伝達能の有無を検討した。

④ pDK1 全体を形質転換で KT2440 株に導入し、形質転換体から KT2440 の別誘導体株や Pf-5 株への pDK1 接合伝達能を検討した。

(2) *P. putida* と大腸菌での種内・種間接合能を備える NAH7 上には *traDEF* で構成される機能未知 *traD* オペロンが存在する。本オペロン欠失 NAH7 誘導体は、大腸菌から KT2440 株への接合のみが不能になるが、本誘導体を受け取れる KT2440 株の突然変異が取得でき、種間接合を規定する受容菌染色体因子の存在が確実視されていた。そこで、*traD* オペロン機能解析、そして、種間接合伝達欠損を補う受容菌染色体支配遺伝子産物の同定と機能解析を行った。

① *traD* オペロン構成3遺伝子の産物の細胞内局在性と他の接合関連遺伝子産物との相互作用を、生化学的に検討した。

② NAH7 の *traF* 欠失誘導体(NAH7dF)は、再現性を伴って大腸菌から KT2440 株への接合伝達不能性を示したことから、以降の研究は NAH7dF のみを使用した。KT2440 株の Tn 挿入変異ライブラリーから、NAH7dF を接合伝達で大腸菌から受け取れる変異体のスクリーニングをした。また、KT2440 株の見かけ上の PTS^{Ntr} 系欠損が実際に *pts* 遺伝子の変異に起因することを証明するために、染色体遺伝子の特異的に破壊できる遺伝学的手法を用い、KT2440 野生株の当該 *pts* 遺伝子を破壊した。また、別の PTS^{Ntr} 系構成因子遺伝子も同様手法で破壊した。これら破壊株の NAH7dF 受容能を検討した。

③ PTS^{Ntr} 系構成タンパク質のうち2つに関して、それぞれ恒常的リン酸化不能や恒常的擬似リン酸化状態になる部位特異的変異株を作製し、各変異株が NAH7dF の受容が可能になるかを検討した。また、PTS^{Ntr} 系にリン酸基を転移することが可能とされていた PTS^{Fru} 系を破壊した株で NAH7dF の受容が可能になるかを検討した。

④ KT2440 株の PTS^{Ntr} 系欠損が、NAH7 自体や別の IncP-9 群トルエン分解プラスミド pWW0、そして、極めて広宿主域性を備える IncP-1 プラスミド RP4 の大腸菌から接合に与える影響を短時間の接合により検討した。

4. 研究成果

(1) pDK1 の接合伝達宿主域を規定する因子の解析

① pDK1 は Pf-5 株から KT2440 株へ接合伝達されないが、Pf-5 株から KT2440 株への pCAR1 接合伝達は未知であった。そのため、pDK1 の KT2440 株への接合伝達不能性に関する供与菌や受容菌の染色体支配因子、プラスミド支配因子については全くわかっていなかった、本研究で、pCAR1 の Pf-5 株から KT2440 株への接合伝達能が認められたことから、Pf-5 株から KT2440 株への pDK1 接合伝達不能性は、pDK1 または KT2440 株に起因すると示唆された。

② pDK1 及び KT2440 株染色体を対象にして、Tn 挿入破壊による pDK1 接合伝達宿主域規定因子の同定を試みた。供与菌 Pf-5(pDK1) 株の Tn 変異株ライブラリーと KT2440 株との接合、供与菌 Pf-5(pDK1) 株と KT2440 株の Tn 変異株ライブラリーを受容菌とした接合で、プラスミドが受容菌に伝達された接合体取得を試みたが、pDK1 及び KT2440 株の目的変異体は得られなかった。

③ Pf-5 株から KT2440 株への pDK1 の接合伝達不能性に関して、pCAR1 がコードする「Activator」が pDK1 にコードされていない可能性を検討した。pDK1 と pCAR1 の接合伝達装置遺伝子群の比較から、pDK1 に存在せず pCAR1 にのみ存在する遺伝子領域を 3 カ所見だし、これら遺伝子領域をそれぞれ pDK1 の接合伝達の際に供与菌 Pf-5 株または受容菌 KT2440 株内で供給し、接合伝達能発揮への関与を検討した。しかし対象遺伝子領域はいずれも接合伝達能発揮に効果がなかった。

④ pDK1 の全長を有する誘導体プラスミドは KT2440 株へ形質転換での導入とその中で安定的維持が可能なが判明した。そして、形質転換体から誘導体プラスミドは Pf-5 株への接合伝達能と KT2440 株への接合伝達不能性を示した。このことから pDK1 の KT2440 株への接合伝達不能性に関して、pDK1 の接合伝達装置に起因することが判明し、接合伝達過程でも接合時特異的 DNA 複製(Dtr)段階よりも接合対形成段階に起因することが強く示唆された。

(2) NAH7 の接合伝達宿主域を規定する受容菌染色体支配因子の解析

① FLAG タグを賦与した TraD, TraE, TraF 産物の KT2440 株での発現、その後の Western blotting と FLAG 抗体での産物検出により、各産物は細胞質分画、ペリプラズム分画、膜分画での存在が判明した。細菌ツーハイブリッド法で TraE は Dtr 系の Relaxase や Coupling protein と相互作用することが判明した。

② KT2440 株の PTS^{Ntr}系を構成する PtsO と

PtsP の各欠損株は大腸菌からの NAH7dF 接合を可能にすることを、KT2440 株の各遺伝子再破壊株を用いて証明し、PTS^{Ntr}系の残りの PtsN を破壊した株でも同様の表現型を示した。一方、PtsO 破壊株に野生型 *ptsO* 遺伝子を供給した株では、NAH7dF を受け取れなくなり、KT2440 株 PtsO 機能発揮は NAH7dF の接合伝達を阻害することが判明した。他方、KT2440 株の Tn 挿入変異ライブラリーの中から、PTS^{Ntr}系以外の欠損で NAH7dF を受容可能な変異株のスクリーニングをしたが、目的受容菌変異株は取得できなかった。



図. PTS^{Ntr}系でのリン酸基リレー
PEP: Phosphoenolpyruvate, Pyr: Pyruvate

③ PtsO は PTS^{Ntr}系のリン酸基リレー系で PtsP からリン酸基を受け取り、さらに PtsN へとリン酸基を転移する(図)。また、PtsO と PtsN は PTS^{Fru}系からのリン酸基受け取りが可能である。まず、PTS^{Fru}系破壊 KT2440 誘導体株は NAH7dF の受容菌となりえず、本 PTS^{Fru}系の接合への非関与が強く示唆された。一方、KT2440 株の PtsO と PtsN のいずれかが恒常的リン酸化不能や恒常的擬似リン酸化状態になった部位特異的変異株では NAH7dF を大腸菌から受容できず、従って、受容菌内でリン酸化された PtsO が未知タンパク質のリン酸化を制御することで、当該種間接合が阻害されると強く示唆された。広範な細菌属に存在する PTS^{Ntr}系は、様々な代謝を制御することは知られていたものの、接合伝達という遺伝子水平伝播に関与することを本研究により初めて示した。

④ 上記研究では、接合を 12 時間以上としてきた。そこで接合を 2 時間に短縮し、大腸菌から、KT2440 株並びその *ptsO* 変異株への NAH7 と pWW0, RP4 の接合頻度を比較した。後者変異株を用いたときの NAH7 と pWW0 伝達頻度は、野生型株を用いた時に比べて 10 倍オーダーレベルで低下していた。この低下は RP4 使用時には認められなかった。従って、受容菌 PTS^{Ntr}系は野生型 NAH7 や他 IncP-9 プラスミドの大腸菌から *P. putida* への種間接合伝達も負に制御していること、そして、この負の制御レベルは NAH7 の場合、*traF* 機能不在時に極めて大きいこと、が判明した。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 7 件) 全て査読有り

- ① H. Yano, H. Genka, Y. Ohtsubo, Y. Nagata, E. M. Top, and M. Tsuda: Cointegrate-resolution of toluene-catabolic transposon Tn4651: determination of crossover site and the segment required for full resolution activity. *Plasmid* 69: 24-35 (2013)

- ② M. Miyakoshi, M. Shintani, K. Inoue, T. Terabayashi, F. Sai, M. Ohkuma, H. Nojiri, Y. Nagata, and M. Tsuda: ParI, an orphan ParA family protein from *Pseudomonas putida* KT2440-specific genomic island, interferes with the partition system of IncP-7 plasmids. *Environ. Microbiol.* 14: 2946-2959 (2012)
- ③ Y. Ohtsubo, F. Maruyama, H. Mitsui, Y. Nagata, and M. Tsuda: Complete genome sequence of *Acidovorax* sp. KKS102, a polychlorinated biphenyl-degrading strain. *J. Bacteriol.* 194: 6970-6971 (2012)
- ④ Y. Ohtsubo, Y. Ishibashi, H. Naganawa, S. Hirokawa, S. Atobe, Y. Nagata, and M. Tsuda: Conjugal transfer of polychlorinated biphenyl/biphenyl degradation genes in *Acidovorax* sp. KKS102 located on integrative and conjugative element. *J. Bacteriol.* 184: 4237-4248 (2012)
- ⑤ Y. Nagata, S. Natsui, R. Endo, Y. Ohtsubo, N. Ichikawa, A. Ankai, A. Oguchi, S. Fukui, N. Fujita, and M. Tsuda: Genomic organization and genomic structural rearrangements of *Sphingobium japonicum* UT26, an archetypal gamma-hexachlorocyclohexane-degrading bacterium. *Enzyme Microb. Technol.* 49: 499-508 (2011)
- ⑥ M. Tabata, R. Endo, M. Ito, Y. Ohtsubo, A. Kumar, M. Tsuda, and Y. Nagata: The *lin* genes for gamma-hexachlorocyclohexane degradation in *Sphingomonas* sp. MM-1 proved to be dispersed across multiple plasmids. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 75: 466-472 (2011)

[学会発表] (計 17 件)

- ① 高橋裕里香, 3人, 津田雅孝, 野尻秀昭: プラスミド保持細菌のプラスミドに対する応答の比較. 日本農芸化学会2013年大会. 仙台, 2013年3月24-27日
- ② 岸田康平, 井上慧, 宮崎亮, 大坪嘉行, 永田裕二, 津田雅孝: IncP-9群プラスミド NAH7 の接合伝達開始配列の解析. 第7回日本ゲノム微生物学会年会. 長浜, 2013年3月8-10日
- ③ M. Tabata, S. Ohhata, Y. Ohtsubo, Y. Nagata, and M. Tsuda: Multiple plasmids of γ -hexachlorocyclohexane-degrading bacterium *Sphingomonas* sp. MM-1. International Plasmid Biology Conference 2012. Santander, Spain, September 11-16, 2012
- ④ K. Inoue, R. Miyazaki, Y. Ohtsubo, Y. Nagata, and M. Tsuda: Relationship between intergeneric conjugative transfer of plasmid NAH7 and nitrogen-related phosphotransferase system. International

Plasmid Biology Conference 2012. Santander, Spain, September 11-16, 2012

- ⑤ 津田雅孝: 環境汚染物質分解能を担うプラスミドの水平伝達. 日本農芸化学会2012年大会. 京都, 2012年3月22-26日
- ⑥ 井上慧, 宮崎亮, 大坪嘉行, 永田裕二, 津田雅孝: ナフタレン分解プラスミドNAH7の接合伝達関連遺伝子群のsingle cellレベルでの発現解析. 日本農芸化学会2012年大会. 京都 2012年3月22-26日
- ⑦ 瀬谷学人, 井上慧, 大坪嘉行, 永田裕二, 津田雅孝: IncP-7群プラスミドの接合伝達宿主域を規定する因子の探索. 日本農芸化学会2012年大会. 京都, 2012年3月22-26日
- ⑧ K. Inoue, R. Miyazaki, Y. Ohtsubo, Y. Nagata, and M. Tsuda: Nitrogen-related phosphotransferase system of *Pseudomonas putida* KT2440 exerts negative effect on conjugative acquisition of naphthalene-catabolic plasmid NAH7. International Union of Microbiological Societies 2011 Congress. Sapporo, September 6-10, 2011
- ⑨ M. Tabata, S. Ohhata, Y. Ohtsubo, Y. Nagata, and M. Tsuda: Structural analysis of plasmids for gamma-hexachlorocyclohexane degradation in *Sphingomonas* sp. MM-1. International Union of Microbiological Societies 2011 Congress. Sapporo, September 6-10, 2011
- ⑩ 井上慧, 大坪嘉行, 永田裕二, 津田雅孝: ナフタレン分解プラスミドNAH7の接合伝達制御に関与する受容菌のリン酸基転移系. ゲノム微生物学会ワークショップ. 仙台, 2011年8月20-21日

[図書] (計 1 件) 査読有り

- ① M. Tsuda, Y. Ohtsubo, and H. Yano: Mobile catabolic genetic elements in pseudomonads. *In: Nojiri, H., M. Tsuda, M. Fukuda, and Y. Kamagata (eds), Biodegradative Bacteria.* Springer Verlag, Tokyo (in press)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

津田 雅孝 (TSUDA MASATAKA)
 東北大学・大学院生命科学研究科・教授
 研究者番号: 90172022

(2) 研究分担者

永田 裕二 (NAGATA YUJI)
 東北大学・大学院生命科学研究科・准教授
 研究者番号: 30237531