

平成22年 3月31日現在

研究種目：基盤研究 (C)
 研究期間：2007 ～ 2009
 課題番号：19580089
 研究課題名 (和文) 細菌コロニーバイオフィルム中で特異的に起こる新規な遺伝子水平伝播現象の解析
 研究課題名 (英文) Study on a novel phenomenon of horizontal gene transfer in bacterial colony biofilms
 研究代表者 前田 純夫 (MAEDA SUMIO)
 奈良女子大学・生活環境学部・准教授
 研究者番号：90335472

研究成果の概要 (和文)：本研究では、申請者が最近発見した大腸菌コロニーバイオフィルム中での非接合性・非ウイルス性の新規な遺伝子水平伝播現象の詳細と普遍性を明らかにすることを目的とした。その結果、この遺伝子水平伝播が新規な形質転換の一種であること、この機構に関わる大腸菌遺伝子群が数十個存在すること、この現象が食品成分を栄養源とした培養でも起こること、また大腸菌-枯草菌間でも起こること、などを発見した。

研究成果の概要 (英文)：This study aimed at revealing the detail and the generality of nonconjugative, nonviral horizontal gene transfer in colony biofilms of *Escherichia coli*. We found that this horizontal gene transfer is a novel kind of transformation, that there are several dozens of genes which are involved in this gene transfer in *E. coli*, and that this gene transfer occurs on the culture on food-based media as well as between *E. coli* and *Bacillus subtilis*.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,300,000	690,000	2,990,000
2008年度	700,000	210,000	910,000
2009年度	700,000	210,000	910,000
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農芸化学・応用微生物学

キーワード：微生物生態学、遺伝子水平伝播、バイオフィルム、大腸菌、形質転換、枯草菌

1. 研究開始当初の背景

細菌細胞間の遺伝子水平伝播は、薬剤耐性菌の蔓延や、新たな病原菌の出現、等の社会的問題に深く関与する点から、その解析が必要とされている。また、基礎微生物学的にも細菌細胞の環境適応機構や新規な形質獲得機構の解明、あるいは、より長期スケールでの

生物進化の観点から注目されている。

細菌の遺伝子水平伝播の分子機構については、接合・形質導入・形質転換の3つが教科書的代表例としてよく知られている。しかし近年の諸研究により、それら3つ以外の遺伝子水平伝播機構が存在する可能性や、既知の誘導条件とは大きく異なった条件下での形質

転換能の発現、などが報告されつつある。

一方、これまでの微生物学では、液体培地中での浮遊細胞を対象とする研究が主流であったが、近年、固体培地上に付着したバイオフィーム細胞が、浮遊細胞とは異なる特異な諸性質を示すことが明らかとなってきた。それら諸性質の解明と機構解析が世界的な研究トピックとなりつつある。

2. 研究の目的

第一の目的は、大腸菌における本遺伝子水平伝播現象のメカニズムを明らかにすることである。このメカニズムを、遺伝子伝播が発生する条件や因子のより詳細な解析や、大腸菌の全遺伝子発現解析や変異株ライブラリを用いた関与遺伝子の網羅的同定、等により、明らかにする。

第二の目的は、本現象の普遍性を明らかにすることである。具体的には、この現象が大腸菌以外の細菌でも起こりうるか？、また酵母等の真核微生物と細菌との間でも起こりうるか？などを探る。またこの遺伝子水平伝播の実験室外環境中での発生可能性を検証するため、環境中でありうる栄養源として食物成分を用いても遺伝子転移が発生するか？も検討する。

3. 研究の方法

(1) 大腸菌における本遺伝子水平伝播現象のメカニズム解析

大腸菌における本遺伝子水平伝播現象のメカニズムを解析するため、主に以下の3つの解析を行った。

①DNAチップを用いた遺伝子発現変化の解析：本現象がほとんど起こらない液体培養時と起こりやすいコロニーバイオフィーム培養時との間の全遺伝子発現の変化をDNAチップで解析した。

②遺伝子欠失変異株ライブラリを用いた解析：大腸菌の全遺伝子（生存必須遺伝子は除く）のライブラリ（Keio collection: Baba, T. *Molecular Systems Biol.* 2006, msb4100050-E1-E11）を用いて、本現象に関与する遺伝子の網羅的探索を行った。この網羅的探索に当たっては、第一段階として、約4千菌株の多量解析を可能とするため、独自のハイスループット実験系を構築し、その後、第二段階として、関与候補遺伝子変異株に対して通常のコロニーバイオフィーム実験系で詳細な本実験を行った。

③発生条件の探索と遺伝子水平伝播メカニズムの解析：本遺伝子伝播現象が発生しやすい条件・しにくい条件を、コロニーバイオフィーム培養の諸条件を変化させて解析した。またその際に影響の大きかった因子に関し

てさらに詳細な解析を試みた。また本現象の分子機構的実体を明らかにするため、DNase等の効果を解析した。また実験室外環境中でありうる栄養源の代表として、食物成分を用いた培養でも遺伝子水平伝播が起こりうるかを調べた。

(2) 他細菌・酵母コロニーバイオフィーム中での遺伝子水平伝播発生の検証

①大腸菌-枯草菌・また大腸菌-酵母コロニーバイオフィーム中での遺伝子水平伝播実験系の確立：大腸菌以外の細菌として枯草菌・また真核微生物として酵母を用いて同様の遺伝子水平伝播実験を行うため、その準備段階として実験条件検討を行い、各々に最適なアッセイ系の確立を試みた。

②大腸菌-枯草菌および大腸菌-酵母コロニーバイオフィーム実験系を用いた遺伝子水平伝播発生の検証：上記で確立した実験系を用いて、大腸菌以外の細菌での本現象の発生可能性を調べた。また実験室外環境中でありうる栄養源の代表として、食物成分を用いた培養でも遺伝子水平伝播が起こりうるかを調べた。

4. 研究成果

(1) 大腸菌における本遺伝子水平伝播現象のメカニズム解析

①DNAチップを用いた遺伝子発現変化の解析：本現象がほとんど起こらない液体培養時と起こりやすいコロニーバイオフィーム培養時との間の全遺伝子発現の変化をDNAチップで解析した結果、いくつかの機能遺伝子群がコロニーバイオフィームで特徴的な発現をすることを見出した。

②遺伝子欠失変異株ライブラリを用いた解析：大腸菌Keio collectionの約4千菌株の多量解析を可能とする、独自のハイスループット遺伝子水平伝播アッセイ実験系を構築することに成功した。この実験系を用いて大腸菌の遺伝子水平伝播に関与する候補遺伝子の網羅的スクリーニング解析を行った。その結果、遺伝子伝播に促進的に働くと推定される候補遺伝子および抑制的に働くと推定される候補遺伝子をそれぞれ数十ヶ選出することに成功した。

③発生条件の探索と遺伝子水平伝播メカニズムの解析：本遺伝子伝播現象が発生しやすくなる諸条件を探索し、菌株・プラスミド・培養条件など、いくつかの促進条件を見出すことに成功した。またこれらの結果を基に、この現象の発生頻度に大きく影響する因子として、新たな細菌フェロモン様因子および遺伝子水平伝播を促進するDNA配列の存在を発見した。さらにDNase等を用いた機構解

析実験の結果、この遺伝子水平伝播は、本質的には細胞外DNAを取り込む形質転換の一種であるが、共培養細胞からのDNA供給を必須とする新規な様式の形質転換であることを証明した。我々は、この現象を「細胞間形質転換 (cell-to-cell transformation)」と命名した。また本現象の普遍性を検証する実験の一つとして、実験室外環境を考慮した食品成分や天然水成分上での培養実験や凍結融解実験を行い、そうした条件下でも遺伝子伝播が発生することを確認した。

(2) 他細菌・酵母コロニーバイオフィーム中での遺伝子水平伝播発生の検証

①大腸菌-枯草菌・また大腸菌-酵母コロニーバイオフィーム中での遺伝子水平伝播実験系の確立：大腸菌以外の細菌として枯草菌・また真核微生物として酵母を用いて同様の遺伝子水平伝播実験を行うため、その準備段階として実験条件検討を行い、各々に最適なアッセイ系を確立した。

②大腸菌-枯草菌および大腸菌-酵母コロニーバイオフィーム実験系を用いた遺伝子水平伝播発生の検証：上記実験系を用いた実験の結果、少なくとも大腸菌-枯草菌系では両方向に遺伝子水平伝播が起こることを見出し、コロニーバイオフィーム中での遺伝子水平伝播が大腸菌以外の細菌を含めた系でも起こりうることを証明した。一方、大腸菌-酵母の系では、試した限りの実験条件下では遺伝子水平伝播は検出できなかったが、今後さらなる検討の余地があると考えられた。

以上の成果には、「細胞間形質転換」機構の発見、新規フェロモン様因子・遺伝子水平伝播促進 DNA 配列の存在示唆、この細胞間形質転換に関与する遺伝子群の同定、大腸菌-枯草菌コロニーバイオフィーム中での遺伝子水平伝播の発生確認、などの国内外でも初めての新発見が多数含まれており、その学問的な寄与は大きい。そのいくつかはすでに論文および学会発表済みであり(下欄)、さらに複数の論文を投稿準備中である。これらの結果は、新規フェロモン様因子の示唆など、さらなる新発見に繋がる萌芽的成果を複数含んでおり、発展研究の継続が望まれる。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 3 件)

①Tsuyako Ando, Sumio Maeda (ほか3名、5番目), Horizontal transfer of non-conjugative plasmid in colony biofilm of *Escherichia coli* on food-based media., *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 査読有、

25巻、2009年、1865-1869

②Yuko Ishimoto, Shiho Kato, Sumio Maeda, Freeze-thaw-induced lateral transfer of non-conjugative plasmids by in situ transformation in *Escherichia coli* in natural waters and food extracts., *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 査読有、24巻、2008年、2731-2735

③前田純夫、バイオフィーム状微生物の遺伝子転移に関する研究、*IFO Research Communications*, 査読有、21 巻、2007 年、71-81

[学会発表] (計 8 件)

①松田彩子、前田純夫 (ほか10名、12番目)、大腸菌のcell-to-cell transformationに抑制的に関与する遺伝子の網羅的スクリーニング、第32回日本分子生物学会、2009年12月12日、パシフィコ横浜

②黒野尚美、前田純夫 (ほか6名、8番目)、大腸菌のcell-to-cell transformationに必須あるいは促進的に関与する遺伝子の網羅的スクリーニング、第32回日本分子生物学会、2009年12月12日、パシフィコ横浜

③祖父江里奈、前田純夫 (ほか3名、5番目)、大腸菌コロニーバイオフィーム中での非接合性プラスミド水平伝播に対する特定プラスミド配列の影響、第31回日本分子生物学会・第81回日本生化学会合同大会、2008年12月12日、神戸ポートアイランド

④越中屋里香、前田純夫 (ほか3名、5番目)、大腸菌間の非接合性プラスミド水平伝播機構の解析、第31回日本分子生物学会・第81回日本生化学会合同大会、2008年12月12日、神戸ポートアイランド

⑤Rina Sobue, Sumio Maeda (ほか4名、6番目), Horizontal plasmid transfer in a bacterial colony biofilm., IUMS Congress 2008, XII. International Congress of Bacteriology and Applied Microbiology, 2008年8月9日、Istanbul Convention Center, Istanbul, Turkey

⑥Rika Etchuuya, Sumio Maeda (ほか4名、6番目), Horizontal transfer of nonconjugative plasmids in a colony biofilm of *E. coli*., IUMS Congress 2008, XII. International Congress of Bacteriology and Applied Microbiology, 2008年8月9日、Istanbul Convention Center, Istanbul, Turkey

⑦祖父江里奈、前田純夫 (ほか4名、6番目)、細菌コロニーバイオフィームにおけるプラスミド水平伝播の解析、第30回日本分子生物学会・第80回日本生化学会合同大会、2007年12月11日、パシフィコ横浜

⑧越中屋里香、前田純夫（ほか4名、6番目）、大腸菌コロニーバイオフィルムにおける非接合性プラスミド水平伝播機構の解析、第30回日本分子生物学会・第80回日本生化学会合同大会、2007年12月11日、パシフィコ横浜

〔図書〕（計0件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計0件）

○取得状況（計0件）

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.nara-wu.ac.jp/life/food/foodsafe/maeda/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

前田 純夫 (MAEDA SUMIO)

奈良女子大学・生活環境学部・准教授

研究者番号：90335472

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし