

平成 30 年 6 月 15 日現在

機関番号：13801

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H05618

研究課題名(和文)複合微生物系におけるプラスミドの「真の」宿主域の解明

研究課題名(英文)The actual host range of plasmids in microbial consortia

研究代表者

新谷 政己(Shintani, Masaki)

静岡大学・工学部・准教授

研究者番号：20572647

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 18,900,000円

研究成果の概要(和文)：プラスミドは接合伝達によって様々な細菌間を移動可能な遺伝因子である。その宿主域の情報は、細菌の進化・適応機構を理解する上で重要である。本研究では、嫌気性細菌を含むモデル複合微生物系から、不和合性群(Inc)P-1群の他、PromA群やInc未知の新規自己伝達性プラスミドを取得した。またこれらのプラスミドと既存のプラスミドを用いた接合実験により、接合伝達には酸素が必須でないこと、接合伝達頻度は好気より嫌気条件下の方が低いことが示された。さらに、モデル複合微生物系におけるIncP-1群やPromA群プラスミドの宿主域は酸素濃度の違いによって変化することが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Behaviors of plasmids under aerobic and anaerobic conditions is important to understand bacterial evolution and adaptation mechanism. Exogenous plasmid capturing was performed by triparental matings, and self-transmissible plasmids were successfully obtained from model environmental samples. They included an incompatibility group (Inc) P-1 plasmid, four Inc PromA plasmids and one novel plasmid. Comparisons of conjugation frequency with the captured plasmids and IncP-7 plasmid under different concentration of oxygens showed that the oxygen were not required for conjugation. The conjugation frequency was lower under low concentration of oxygen, while the effect of oxygen changed between different hosts. Based on the mating assays of each donor of IncP-1 and Inc PromA plasmids with model microbial consortia, the host range of plasmids could change by the concentration of oxygen.

研究分野：環境微生物学

キーワード：プラスミド 宿主 嫌気性細菌 複合微生物系 接合伝達

### 1. 研究開始当初の背景

プラスミドは、微生物の生存に必須な染色体とは物理的に別個に存在するDNA分子である。プラスミドの多くは、接合伝達と呼ばれる機構によって、プラスミドをもつ細胞(供与菌)から、持たない細胞(受容菌)へと移動可能で、プラスミドを得た受容菌(接合完了体)は、プラスミドに由来する新たな形質を獲得する。プラスミドがどのような種類の細菌に接合伝達するかという宿主域の情報は、プラスミドの伝播を介した細菌の進化・適応機構を理解する上で重要である。従来、プラスミドの宿主域は供与菌と受容菌とを1種類ずつ培養・混合した接合実験によって決められてきた。しかし自然環境中の微生物の大半は未培養・難培養性であり、こうした複合微生物系に対するプラスミドの宿主域については情報が乏しい。また、こうしたプラスミドが実際に伝播していると考えられる土壌・堆肥・動物体内などの環境には、好気・嫌気的環境が併存する。研究代表者が、IncP-1, IncP-7, IncP-9群というプラスミドグループに属する接合伝達性のプラスミドについて、好気条件下で複合微生物系におけるプラスミドの宿主を調べたところ、プラスミドの宿主域は、上述のような実験室内で行った接合実験の結果と異なり、既知の宿主域よりも広い可能性が高いこと、また嫌気性細菌もプラスミドを受け取る可能性を見出した(Shintani et al., 2014 Appl. Environ. Microbiol. 80:138)。IncP-1群プラスミドについては、供与菌・受容菌とも大腸菌を用いた接合実験が行われ、嫌気条件下でもプラスミドが接合伝達することが知られている(Krøl et al., 2011 Appl. Environ. Microbiol. 77:5079)。さらに、近年の塩基配列解読技術の革新的な進歩によって、微生物のゲノム解析が急速に進むに従い、プラスミドも次々に見出されている。研究代表者は全塩基配列が解読されたプラスミドについて、その宿主や、プラスミドの基本機能(複製・維持・接合伝達)を担う遺伝子群に基づいて分類を試みた(Shintani et al., 2015, Front. Microbiol. 6:242)。その結果、多くの嫌気性細菌にもプラスミドが存在することが判明した。また、嫌気性細菌のプラスミドからも、好気性細菌由来のプラスミドの伝達を担う遺伝子群と類似の遺伝子群が見出されている(Smillie et al., 2010, Microbiol. Mol. Biol. Rev. 74:4342)。以上のことから、プラスミドは、嫌気的環境下でも嫌気性細菌に対して接合伝達すると推定される。しかし、嫌気条件下の複合微生物系におけるプラスミドの宿主域については全く分かっていなかった。

### 2. 研究の目的

本研究では、好気環境のみならず、これまであまり考慮されてこなかった、嫌気的な環境で生じるプラスミドの接合伝達現象も対象として、複合微生物系におけるプラスミドの「真の」宿主域を解明することを目的とする。

### 3. 研究の方法

#### (1) 微好気・嫌気条件下で接合伝達可能なプ

#### ラスミドの探索

嫌気条件下で接合伝達可能なプラスミドを、既知プラスミドの中から探すとともに、実際の嫌気環境を含む複合微生物系から新たに探索した。

#### (2) 微好気・嫌気条件下におけるプラスミドの接合伝達現象の検出・分離法の確立

(1)と並行して、先行実験で嫌気性細菌に伝達することが示唆された IncP-1 群プラスミド pBP136 を用い、嫌気条件下での接合伝達現象を検出する手法を確立した。その後、本研究で得られた嫌気条件下で伝達可能なプラスミドについて、培養可能な既知の好気性または嫌気性細菌と接合させ、顕微鏡下で観察して、どの細菌を宿主にできるか検証した。

#### (3) 微好気・嫌気条件下における既存のプラスミドの宿主域の解明

IncP-1 群プラスミドを、嫌気的環境を含むモデル複合微生物系内の細菌に好気・嫌気条件の双方で接合伝達させ、フローサイトメリーとセルソーター(FACS)によって、接合完了体細胞を分取した。その後、得られた接合完了体の 16S rRNA 遺伝子配列を決定し、プラスミドがモデル複合微生物系内のどのような細菌種に伝達可能かを決定した。

#### (4) 新たに見出した接合伝達性プラスミドの宿主域の解明

(1)で取得した新たなプラスミドについて(2)と同様に、既知の好気性・嫌気性細菌に対して接合伝達するかどうか調べるとともに、(3)の手法を用いてモデル複合微生物系に対する宿主域を決定した。

### 4. 研究成果

研究代表者の先行研究では、プラスミドが接合伝達した細胞を検出するのに、緑色蛍光タンパク質 GFP を利用してきた。GFP をコードする遺伝子を、Lac リプレッサーの制御下にあるプロモーターとともにプラスミド上に組込むことで、供与菌内ではその発現が抑制されるが、プラスミドが受容菌に伝達して脱抑制すると蛍光を示す。しかし、GFP が蛍光を示すには酸素を必要とする。当初は嫌気条件下でも蛍光を示すタンパク質の利用を試みたが、蛍光強度が宿主ごとに大きく異なることが判明した。そこで、GFP は嫌気条件下でもタンパク質として発現し、酸素は蛍光を示す発色団の形成の最終段階にのみ必要なことを利用し、嫌気条件の接合実験の後に、短時間酸素に曝露することで、GFP の蛍光を検出することとした。

なお、実験計画では蛍光タンパク質の他に、fluorescence *in situ* hybridization (FISH) 法を応用してプラスミドを検出する手法については、高確度での検出が難しかったため、本課題を基課題とする「国際共同研究強化」の課題としてその手法の改良を試みることにした。

既知の接合伝達性のプラスミドとして、IncP-1 群プラスミド pBP136::gfp と、IncP-7 群プラスミド pCAR1::gfp を用い、好気・嫌気条件で生育可能な受容菌三種に対し、接合伝達実験を行った。供与菌としては、絶対好気性細菌 (*Pseudomonas putida*) と、通性嫌気性細菌 (*Pseudomonas stutzeri*) を用いた。その結果、双方のプラスミドについても、好気・嫌気条件下で接合完了体が得られ、接合伝達自体には酸素が必須でないことが示された。また、プラスミドの接合伝達頻度(ここでは接合完了体の数を供与菌の数で割った数値を示した)は、好気条件下よりも微好気・嫌気条件下の方が  $10^{-1} \sim 10^{-3}$  倍低かった(図 1)。また、pBP136::gfp の接合伝達のしやすさは、供与菌と受容菌の組み合わせや、好気・嫌気条件によって異なった(図 1, *P. putida* を供与菌とした場合、好気条件下では *Pantoea agglomerans*, *Pseudomonas stutzeri*, *Buttiauxella agrestis* の順番で頻度が高かったが、嫌気条件では、*Pseudomonas stutzeri*, *Pantoea agglomerans*, *Buttiauxella agrestis* の順番)。従って、好気・微好気条件で、プラスミドの宿主域が変化することが示唆された。

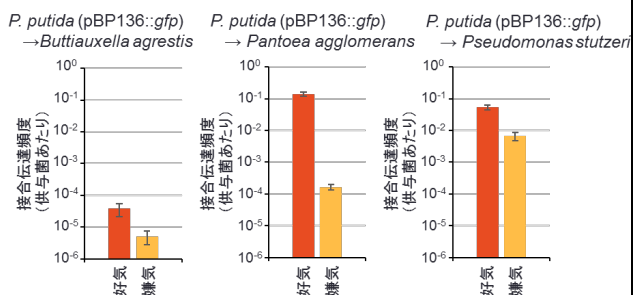


図1. 好気・嫌気条件におけるpBP136::gfpの接合伝達頻度(供与菌あたり)

また、本研究では、モデル複合微生物系として、静岡大学浜松キャンパス内の土、比較的安定な菌叢をもつ、上昇流嫌気性汚泥床(UASB)内でメタン発酵を担うグラニューール、および抗生物質を与えていない牛糞から微生物画分を抽出した試料を用いた。これらのうち、グラニューールと牛糞由来の試料については、全DNAを抽出後、16S rRNA 遺伝子の部分配列に基づく菌叢解析を行った。また、当該試料からの新規接合伝達性プラスミドの取得は、既存の可動性プラスミドと受容菌を利用した三親接合を利用を行った。その結果、各試料内から、自己接合伝達性プラスミドをもつと推定される受容菌を300株以上得ることに成功した。これらのうち、6種類(pSN1104-11, pSN1104-34, pSN1104-59, pSN0729-62, pSN0729-70, pSN1216-29)については全塩基配列を解読した。各プラスミドの複製開始を担うと推定されるタンパク質のアミノ酸配列を、既知の他のプラスミド由来の当該タンパク質のアミノ酸配列と比較して、系統樹を描いたところ、pSN1104-59はIncP-1群に属するプラスミドであった。一方、pSN1104-11, pSN1104-34, pSN0729-62, およびpSN0729-70はIncP-1群と

異なる広宿主域プラスミドのグループ、PromA群に属することが示され、pSN1216-29については不和合性群未知の新規性の高いプラスミドであることが示唆された(図2)。

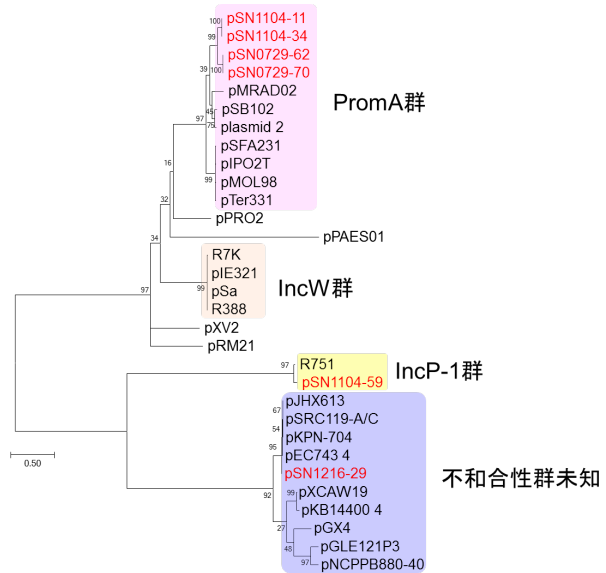


図2. モデル複合微生物系より得られた自己伝達性プラスミドと、既知プラスミドの複製を担うタンパク質のアミノ酸配列の類似度に基づく系統樹。Maximum likelihood法、数値はbootstrap法における%を示す。

また、現在までに、pBP136::gfp や pCAR1::gfp と同様の接合実験を行い、pSN1104-11 や pSN1216-29 についても、好気・嫌気条件の双方で接合伝達すること、嫌気条件の方がその接合伝達頻度が低くなることも示された。

好気・嫌気条件下における pBP136::gfp の供与菌 (*Pseudomonas putida*) とモデル複合微生物系との接合実験後、接合完了体を FACS で選択培地にソーティング後、現れたコロニーより全DNAを抽出し、16S rRNA 遺伝子配列を解読した。また、FACS で接合完了体細胞を 10000 - 25000 細胞ほど収集した後、DNAを抽出し、16S rRNA 遺伝子配列を解読した。コロニーを形成した接合完了体については、PCR でプラスミドをもつことを確認してから、その 16S rRNA 遺伝子配列を解読し、微生物の種類を同定した。その結果、嫌気条件で行った接合実験からは、好気条件下では得られなかった *Citrobacter* 属と *Klebsiella* 属の接合完了体を得られた。また好気条件下における接合完了体 20000 細胞をソーティングし、その菌叢解析を行ったところ、接合を行う培地の種類によって、接合完了体の種類が変化することも判明した。現在嫌気条件で収集した接合完了体細胞の菌叢解析について進めているとともに、pSN1104-11::gfp についても同様の実験を進めている。

以上から、プラスミドの宿主域は酸素濃度の違いによって変化することが示唆された。これはプラスミドの伝播経路を考える際に、その環境の酸素濃度についても考慮する必要があることを示している。特に、土壌や水圏など我々の身近

な環境は、同じ場所の試料であっても、地表からの深さ、あるいは水深等によって、酸素濃度が異なるため、プラスミドの動態も変化することが予想される。また、本研究で微好気・嫌気環境を含むモデル複合微生物系から得られた新規接合伝達性プラスミドは、広宿主域であることも判明した。引き続きこれらの宿主域の調査を行うことで、自然界におけるプラスミドの伝播経路の一端が明らかになると期待される。また、薬剤耐性遺伝子の伝播が各国で深刻な問題を引き起こしているが、本現象にもプラスミドの接合伝達機構が深く関与しており、本成果はこうした分野の研究者にも重要な知見を与えると思われる。

#### 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計4件)いずれも査読有, (\*)は責任著者を示す。

- (1) Sakuda A, Suzuki-Minakuchi C, Matsui K, Takahashi Y, Okada K, Yamane H, Shintani M\*, Nojiri H\*. 2018. "Divalent cations increase the conjugation efficiency of the incompatibility P-7 group plasmid pCAR1 among different *Pseudomonas* hosts", *Microbiology*, 164(1):20-27, doi: 10.1099/mic.0.000583.
- (2) Nakazawa S, Haramiishi A, Fukuda K, Kanayama Y, Watanabe T, Yuki M, Ohkuma M, Takeda K, Kimbara K, Shintani M. \* 2017. "Different transferability of incompatibility (Inc) P-7 plasmid pCAR1 and IncP-1 plasmid pBP136 in stirring liquid conditions", *PLoS One*, 12(10): e0186248, doi: 10.1371/journal.pone.0186248 and 10.1371/journal.pone.0191393.
- (3) Shintani M. \* 2017. "The behavior of mobile genetic elements (MGEs) in different environments", *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 81(5): 854-562, doi: 10.1080/09168451.2016.1270743.
- (4) Yanagida K, Sakuda A, Suzuki-Minakuchi C, Shintani M, Matsui K, Okada K, Nojiri H. 2016. "Comparisons of the transferability of plasmids pCAR1, pB10, R388, and NAH7 among *Pseudomonas putida* at different cell densities", *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 80(5): 1020-1023, doi: 10.1080/09168451.2015.1127131.

〔学会発表〕(計18件)

- (1) 前島由明, 仲田裕貴, 森内良太, 道羅英夫, 井上謙吾, 金原和秀, 新谷政己, 「新規宿主・ベクター系の構築を目指した自己伝達性プラスミドの取得と機能解析」, 日本農芸化学会 2018 年度大会, 2018 年。
- (2) 柳谷洸輔, 越智健太郎, 仲田裕貴, 井上謙吾, 水口千穂, 野尻秀昭, 大熊盛也, 金原和秀, 新谷政己, 「好気・微好気・嫌気条件下におけるプラスミドの接合伝達性と宿主域の解析」, 日本農芸化学会 2018 年度大会, 2018 年。
- (3) 越智健太郎, 柳谷洸輔, 井上謙吾, 水口千穂, 野尻秀昭, 大熊盛也, 金原和秀, 新谷政己, 「好気・微好気・嫌気条件下におけるプラスミドの

接合伝達性と宿主域の解析」, 日本農芸化学会 中部支部第 180 回例会, 2017 年。

(4) 柳谷洸輔, 井上謙吾, 野尻秀昭, 大熊盛也, 金原和秀, 新谷政己, 「微好気・嫌気条件下におけるプラスミドの接合伝達性と宿主域の解析」, 環境微生物系学会合同大会 2017, 2017 年。

(5) Shintani M, Nour EH, Elsayed T, Blau K, Bziuk N, Jechalke S, Sproer C, Bunk B, Overmann J, Smalla K, "Behaviors of plasmids in soil microcosms", 6th International Symposium on Biosorption and Biodegradation/Bioremediation (招待講演), 2017 年。

(6) Shintani M. "Transferability of plasmids in various environmental conditions", 奈良先端科学技術大学院大学セミナー(招待講演), 2017 年。

(7) レー・ティー・タントゥー, 片岡大亮, 道羅英夫, 金原和秀, 新谷政己, 「プラスミドを持つ宿主の fitness(適応度)を増加させる原因因子の同定」, 日本農芸化学会 2017 年度大会, 2017 年。

(8) Shintani M, "Transferability of plasmids in various environmental conditions", Thailand-Japan Collaboration Symposium on Environmental Microbiology and Applications (招待講演), 2017 年。

(9) Shintani M, "Behaviors of plasmids and their hosts in different environments", Wissenschaftliches Kolloquium, Julius Kühn-Institut (招待講演), 2016 年。

(10) 仲田裕貴, 金原和秀, 新谷政己, 「異なる環境試料からの新規自己」, 第 68 回日本生物工学会, 2016 年。

(11) 柳谷洸輔, 片岡大亮, 金原和秀, 大熊盛也, 新谷政己, 「微好気・嫌気環境下におけるプラスミドの宿主域の解析」, 日本農芸化学会 177 回中部支部例会, 2016 年。

(12) 片岡大亮, 道羅英夫, 金原和秀, 新谷政己, 「*Pseudomonas putida* PpY101 has factor(s) relieving 'burden' on the host cells by carriage of plasmid」, *Plasmid Biology* 2016, 2016 年。

(13) 新谷政己, 「環境細菌間における可動性遺伝因子の挙動に関する研究」, 日本農芸化学会 第 176 回中部支部例会(招待講演), 2016 年。

(14) 片岡大亮, レー・ティー・タントゥー, 道羅英夫, 金原和秀, 新谷政己, 「プラスミドが宿主に及ぼす『負担』を軽減する原因因子の同定」, 環境バイオテクノロジー学会 2016 年度大会, 2016 年。

(15) 仲田裕貴, 福田洸平, 金原和秀, 新谷政己, 「様々な環境試料中からの新規自己伝達性プラスミドの取得」, 日本農芸化学会 2016 年度大会, 2016 年。

(16) 片岡大亮, 鈴木智大, 道羅英夫, 金原和秀, 新谷政己, 「プラスミドが宿主に与える影響の比較」, 日本農芸化学会 2016 年度大会, 2016 年。

(17) 片岡大亮, 道羅英夫, 鈴木智大, 金原和秀, 新谷政己, 「異なるプラスミドが宿主に与え

るコストの評価」, 第 30 回日本微生物生態学会大会, 2015 年.

(18) 片岡大亮, 金原和秀, 新谷政己, 「様々なプラスミドが宿主に与えるコストの評価」, 環境バイオテクノロジー学会 2015 年度大会, 2015 年.

(図書) (計 1 件)

(1) 新谷政己, 「第 8 章 非リンパ球・非モデル生物細胞への適用に関する Q&A」, 『Q98 土壤細菌や昆虫体内の腸内細菌の解析とソーティングについて教えてください』, 実験医学別冊『ラボ必携 フローサイトメトリー Q&A 正しいデータを出すための 100 箇条』, 戸村道夫 / 編, 羊土社, 2017 年, pp. 298-300.

(その他)

受賞等

・公益社団法人日本農芸化学会 農芸化学奨励賞 (2016 年度)

・公益財団法人農学会 第 15 回日本農学進歩賞 (平成 28 年度)

ホームページ等

<http://kimbara-shintani.eng.shizuoka.ac.jp/tmshint/>

<https://orcid.org/0000-0002-6505-9850>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

新谷 政己 (Shintani, Masaki)

静岡大学・工学部・准教授

研究者番号: 20572647