

令和 2 年 5 月 20 日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K07200

研究課題名(和文)原核-真核生物間相互作用と2者をつなぐDNA輸送装置の解析

研究課題名(英文)Analysis of prokaryote-eukaryote interaction and the DNA transfer system connecting between those two organisms

研究代表者

守口 和基 (Moriguchi, Kazuki)

広島大学・理学研究科・講師

研究者番号：30294523

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：生物界間接合では、供与大腸菌に水平伝播促進因子と阻害因子の双方が存在するが、促進因子の方が多く、その大部分は接合そのものに関連するものではなく、受容酵母との相互作用に関連すると推測され、親和性の重要度が高いといえる。また、バクテリア間接合では、受容大腸菌側から受容促進/阻害両因子とも単離されず、進化は収斂しているものと考えられる。一方、供与側大腸菌においては、酵母に対して、より阻害的に進化する潜在能力が高いが、バクテリアに対しては少なくとも受容促進因子も受容阻害因子も存在し、どちらの方向にも進化し得る潜在能力を有することがわかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ゲノム解析の進展に伴い、原核生物だけではなく真核生物においても水平伝播による遺伝子の獲得例の報告が急速に蓄積してきている。本研究で報告したように、大腸菌と酵母の培養液を混合するだけで簡便に検出可能なレベルで水平伝播が生じるということは、四型分泌系が、真核生物の水平伝播による遺伝子獲得の有力な動力源の一つであることを示唆している。また、供与大腸菌の接合変異株の特定・解析は、簡便な遺伝子導入技術の開発や、薬剤耐性遺伝子の拡散防止技術の開発に貢献する。

研究成果の概要(英文)：In trans-kingdom conjugation (TKC), there are more TKC promoting factors than inhibitors in donor *Escherichia coli* although both exist. It is predicted that most of the promoting factors are not for the conjugation mechanism but for the interaction between donor *E. coli* and recipient *Saccharomyces cerevisiae*, suggesting the latter are more influential. In the case of bacterial conjugation, neither promoting factor nor inhibitor were isolated from recipient *E. coli*, suggesting the evolution of such influential factors are convergent. From the viewpoint of donor *E. coli*, it seems to have higher potential ability to evolve repressively on TKC, on the other hand, at least it seems to have potential abilities in both promotion and repression of bacterial conjugation.

研究分野：ゲノム生物学

キーワード：遺伝子の水平伝播作用 応用微生物 ゲノム 生物界間接合 四型分泌系(T4SS) プラスミド 原核 真核生物間相互

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

真核生物において原核生物から水平伝達によって獲得した遺伝子は、進化の過程において初期の単細胞生物の時代に獲得したものであり、その後の時代に獲得したものはほとんど無いと考えられてきた。しかし近年のゲノム情報の急速な蓄積とデータ解析技術の進歩により、原核生物から真核生物への遺伝子の水平伝達が進化の過程で絶え間なく生じてきたことが明らかになりつつある。次なる疑問として着目されるようになってきたのは、「どのようなメカニズム」で水平伝達が行われたのかという点であり、更に申請者が着目しているのは、「どのくらいの頻度」で移行してきた結果がゲノム上に反映されているのかという点である。

申請者は、バクテリアの持つ四型分泌系(T4SS)は真核生物への水平伝達の有力な動力源の1つであると考えてきた。この仮説の検証の為に、これまでに RP4 プラスミド T4SS による大腸菌から出芽酵母へのプラスミド伝達(生物界間接合:TKC)をモデル系として、「どのようなメカニズム」で「どのくらいの頻度」生じるものであるのか、解析を行ってきた。出芽酵母のゲノム網羅的解析を行なった結果、移行効率に影響を与える変異は細胞表面のコンポーネントに変化を与えると考えられるものが多く、反対に核移行や DNA 修復に関係する変異は含まれていなかった。また、生物界間接合効率上昇変異体にはバクテリア間の接合効率に匹敵するものがあることがわかった。これらの原因遺伝子の中には自然界に多型として存在するものがあり、出芽酵母の中には「遺伝子を受け取りやすい集団」が存在することも明らかになった。更に最近、広宿主域型可動化プラスミドの中に、これまで知られてきたようなバクテリア間の水平伝達だけでなく、VirB/D4 システムによってアグロバクテリアから植物細胞へ、RP4 プラスミド T4SS によって大腸菌から酵母へ、自らを移動させることができるものがあることを見出した(pCir ベクター)。

2. 研究の目的

上記背景から申請者は、a)自己伝達性プラスミドは、自らの接合伝達用 T4SS と宿主となったバクテリアとが親和性を示すような真核生物が存在すれば、高頻度に移ることができる。b)広宿主域型可動化プラスミドは、宿主となったバクテリアが真核生物に寄生/共生するために利用する T4SS を保持するのであれば、バクテリアの宿主である真核生物へ高頻度に移ることができる。といったプラスミド DNA のダイナミックな流通モデルを提案し、モデルの検証のため、(I)供与バクテリア-受容真核生物間親和性が水平伝達へ与える影響。(II)バクテリア間を動き回るプラスミドの真核生物への伝達機構。(III)T4SS の持つ真核生物への DNA 輸送能の特異性と可塑性。の 3 つをテーマに、T4SS による DNA 流通モデルの検証と、真核生物のゲノム改変技術へと統合することを目的とした。

3. 研究の方法

本研究での実施項目を次に示す。A) 大腸菌-出芽酵母のモデル生物界間接合系を用いた高/低接合効率大腸菌変異株スクリーニング系の開発と Keio コレクションを使ったスクリーニング。B) 有用供与大腸菌株の作製と適用範囲の検証。C) VirB/D4 システムによる pCir ベクターの移行およびジーンターゲット効率の検証。D) カウンターセレクション系の検討とモデル植物を使ったゲノム改変植物体の作製。E) T4SS 発現カセットの作製と pCir ベクター移行能の検証。である。A)~E)は「研究の目的」欄の(I)~(III)のテーマに対応しており、(I)は「着実に取り組みれば必ず新たな知見が得られ、かつ応用への転換が即座に可能」なものであり、上記 A), B) に相当する。(II)は「現象として興味深いだけでなく応用面でのインパクトが大きく、難度が高いながらもこれまで少しずつ前進してきた」ものである。本研究では C), D)のステップを実施予定であった。(III)は「(I)と(II)に目処がついた場合に組み組み、T4SS の本質および将来の応用への潜在性を探る」ものであり、E)が相当する。着実な成果を出すために優先度を (I) (II) > (III)とした。

このうち(II)に関しては、研究初年度(H28)に先行研究で作成済みのターゲット用 pCir ベクター、標的とするマーカー遺伝子を挿入したタバコ BY-2 細胞を用いて C)を実施したが、ターゲット効率は VirB/D4 システムによる pCir ベクターの移行で検出できる限界以下であることが判明したため、リスク回避のため、次年度以降は(I)に注力することとした。以下に (I)の実施方法の詳細を述べる。

- (1) 大腸菌ゲノム網羅的ノックアウトライブラリー (Keio コレクション) 3884 株に対し、生物界間接合用ヘルパープラスミドおよび TKC ベクターを接合により導入し、TKC ドナーライブラリーを作成。
- (2) 並行してスクリーニングに適した生物界間接合の反応条件を、ライブラリーの親株 BW25113 を供与菌、出芽酵母 BY4742 を受容菌として至適化。
- (3) 作成した供与大腸菌ライブラリーを用いて供与能力上昇変異株をゲノム網羅的にスクリーニング。
- (4) 絞り込まれた上昇変異株候補からいくつかを選び、詳細な解析。
- (5) 同様に供与能力低下株をスクリーニング(継続中)。
- (6) (1)の実施時に副産データとして大腸菌間の接合伝播における受容側変異株の情報が得られるため、スクリーニングを実施。
- (7) (6)の受容能力低下変異株について更に詳細な解析。

4. 研究成果

- (1) **生物界間接合は大腸菌と出芽酵母の培養液を直接混合するだけで生じ、ハイスルーブットな遺伝子導入法として有望である。**

先行課題（課題番号：25660007）より，大腸菌株間で供与能力が異なることを明らかにしていたが，BW25113 株を供与菌とした生物界間接合効率は，大腸菌間の接合効率に比べ尚劣るものの高い効率を示し，100 μ l の反応液（50 μ l の供与菌，受容菌培養液を直接混合したもの）あたり 10^2 程度の，10 倍濃縮した供与菌を用いた場合は 10^3 程度の，形質転換体が得られることがわかった。この結果は先行研究で調べた他の K-12 株由来の派生株よりも高く，酵母への遺伝子導入用の供与菌株として非常に有用であることがわかった。

上記結果は，BW25113 株およびその変異株ライブラリーを使ってハイスルーブットなスクリーニングが可能なことを示しているため，上記反応系を用いてスクリーニングを実施することとした。

- (2) **生物界間接合効率上昇供与変異体は，遺伝子導入用供与菌株として有望である。**

2 段階スクリーニングの結果，14 個の変異株が 4 倍以上の上昇株として得られた。その中の上位 3 株に絞り込み，詳細な解析を行うこととした。これらの 3 変異株は，親株 BW25113 に比べ 8-10 倍の高い生物界間接合効率を示した。また，大腸菌間における接合効率の上昇も同様に観察された。このことからこれらの変異株は，供与菌-受容菌間の親和性が上昇したのではなく，供与菌の供与能力そのものが高まっていると推測される。酵母，古細菌，珪藻など，これまで生物界間接合が報告されたいずれの受容生物に対しても遺伝子導入用菌株として応用可能であると考えられる。これら 3 菌株で *traJ* プロモーター活性を調べた限りでは，特に転写活性の上昇は観察されず，RP4-T4SS 関連の遺伝子発現そのものが上昇している訳ではないことが示唆された。

今後は上位 10 位程度までの上昇株についても解析し，高供与能株の育種による特許化を検討していく予定である。

- (3) **生物界間接合効率低下供与変異体は，供与大腸菌-受容酵母間の親和性が低下したものが多数を占める。**

5 段階スクリーニングの結果，81 株変異株が 1/16 以下の接合効率低下株として得られた。この中の 12 株は，大腸菌間の接合効率の低下も同様に観察されたが，69 株は限定的な低下（多くが 1/2 程度）に留まったことから，これらの原因遺伝子が，生物界間接合時に大腸菌 出芽酵母間の相互作用に促進的に機能することが示唆された。

- (4) **IncP 型プラスミド接合は受容菌側の的大腸菌に拒否権はない**

5 段階スクリーニングの結果，見かけ上接合体数が減少する変異株もみられたが，いずれも受容大腸菌株の著しい成長遅延や死細胞率の高さに起因するもので，接合効率そのものが低下した変異株は得られなかった。また，スクリーニング過程において接合体の選抜に用いた抗生剤の一つ，クロラムフェニコールに対して特異的に接合体数が低下する一群の変異体を得られた。これらの変異体の中で特に低下の著しかった *ihfA*，*ihfB*，*pncA*，*acrB*，*ubiH*，*dnaK* 変異体について液相と固相の双方で接合効率を詳細に調べたところ，固相での効率が液相より 2 桁程度高い傾向を示したものの，両相の実験系で野生型のコントロールと比較して顕著な効率低下が観察されたことから，供与菌との接合管形成までのステップに異常の生じる変異体ではなく，プラスミド受容後のクロラムフェニコールに対する耐性の確立過程において異常の生じた変異体であることが示唆された。

これらの結果から，大腸菌は IncP 型プラスミドの接合において，プラスミドの受容を拒絶することはできないことがわかった。その一方で，接合により受容した遺伝子の機能的な発現を阻害することは可能であり，薬剤耐性遺伝子の拡散防止法開発に新たなアプローチを提示

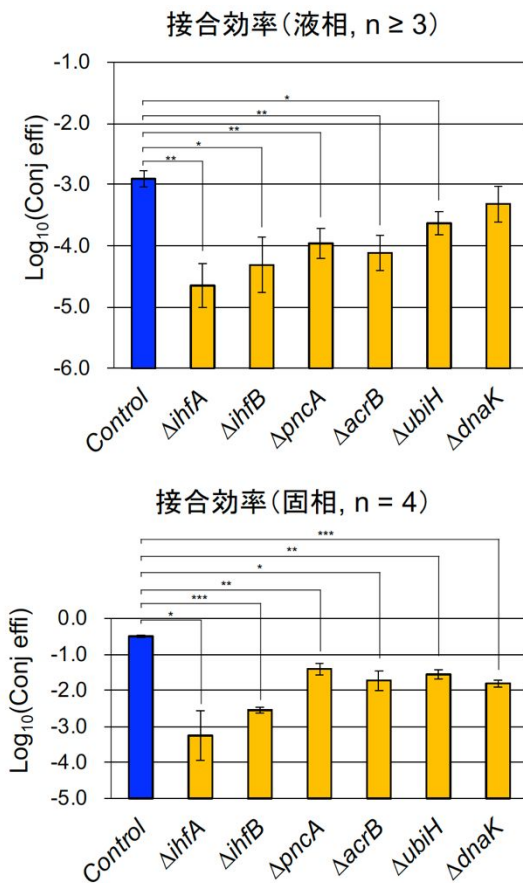


図1

示することができた。後述の通りこれらの成果は特許として出願し，論文にまとめ報告し

た。

(5) **まとめ**

本課題研究において、植物細胞を受容細胞とした場合は、従来より踏み込んだデータを得ることはできなかった。現在、バクテリアを供与菌、動物培養細胞を受容細胞として pCirc ベクターの水平伝播現象を観察するために共同研究を計画中である。

一方で、酵母を受容細胞とした RP4-T4SS 研究の場合、想定した項目を実施し、副次データと併せると、

テーマ(Ⅰ)に関しては、成果(1)-(3)より、生物界間接合では、水平伝播促進因子と阻害因子の双方が存在するが、促進因子の方が多く、その大部分は接合そのものに関連するものではなく、受容酵母との相互作用に関連すると推測され、親和性の重要度が高いといえる。

テーマ(Ⅲ)に関しては、成果(2)-(4)と我々のこれまでの報告より、生物界間接合では、受容酵母側には受容促進因子も受容阻害因子も多数含まれ、いずれの方向にも進化する潜在性をもつが、バクテリア間接合では、受容大腸菌側から双方の因子とも分離されず、進化は収斂しているものと考えられる。一方、供与側大腸菌においては、酵母に対してより阻害的に進化する潜在性が高いが、バクテリアに対しては、今後の更なる解析が必要なものの、少なくとも受容促進因子も受容阻害因子も存在し、どちらの方向にも進化する潜在能力を有することがわかった。

これらの知見を基に、現在は遺伝子導入法としての更なる改良と、T4SS による遺伝子の拡散防御法への応用に取り組んでいる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

- (1) Kazuki Moriguchi, Fatin Iffah Rasyiqah Mohamad Zoolkefli, Masanobu Abe, Kazuya Kiyokawa, Shinji Yamamoto, Katsunori Suzuki, Targeting Antibiotic Resistance Genes Is a Better Approach to Block Acquisition of Antibiotic Resistance Than Blocking Conjugal Transfer by Recipient Cells: A Genome-Wide Screening in *Escherichia coli*, *Frontiers in Microbiology*, 査読有、Volume 10、2020、Article 2939、DOI: 10.3389/fmicb.2019.02939

〔学会発表〕(計 5 件)

守口 和基, 他、接合伝播による抗生物質耐性遺伝子の拡散を防止するには: 大腸菌を使ったゲノム網羅的探索、第 42 回日本分子生物学会年会、2019 年 12 月 4 日、マリンメッセ福岡 (福岡)

Fatin Iffah Rasyiqah Mohamad Zoolkefli, Kazuki Moriguchi, 他、Genome-wide Screening and Characterization of *Escherichia coli* Chromosomal Gene(s) Responsible for the Successful Horizontal Gene Transfer to *Saccharomyces cerevisiae*, 第 41 回日本分子生物学会年会、2018 年 11 月 30 日、パシフィコ横浜 (横浜)

守口 和基, 他、バクテリア側から見た接合伝達とは? 大腸菌接合伝達受容変異体のゲノム網羅的解析、2017 年度生命科学系学会合同年次大会 (ConBio2017)、2017 年 12 月 8 日、神戸ポートアイランド (神戸)

守口 和基, 他、アグロバクテリアが運ぶ DNA は T-DNA だけなのか? -バクテリアの接合システムから見えてきたもの-、第 9 回 中国地域育種談話会、2017 年 11 月 25 日、広島大学 (東広島) 招待講演

守口 和基, 他、培養液を混合するだけ: 生物界間接合を利用した迅速・簡便な出芽酵母形質転換法の確立、第 39 回日本分子生物学会年会、2016 年 12 月 1 日、パシフィコ横浜 (横浜)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 1 件)

名称: 細菌におけるクロラムフェニコール耐性の確立を阻害するためのキットおよび方法

発明者: 守口和基、鈴木克周、清川一矢

権利者: 国立大学法人広島大学

種類: 特許

番号: 特願2019-117496号

出願年月日: 2019年6月25日

国内外の別: 国内

〔その他〕

ホームページ等

<http://home.hiroshima-u.ac.jp/koutiku/>

6 . 研究組織

(1)研究代表者

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：3 0 2 9 4 5 2 3

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。