

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 31 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2012～2015

課題番号：24620006

研究課題名(和文) 宇宙環境(微小重力)が細菌間の遺伝子伝播に与える影響に関する研究

研究課題名(英文) Transformation frequency of bacteria under simulated microgravity

研究代表者

一條 知昭 (ICHIJO, TOMOAKI)

大阪大学・薬学研究科(研究院)・助教

研究者番号：20513899

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、微小重力シミュレーション装置を用いて、環境中において遺伝子伝播に大きく寄与している可能性が考えられる「形質転換」に着目して、微小重力が細菌間の遺伝子伝播に与える影響の評価を進めた。供試菌には大腸菌、および環境中の自然形質転換能を有する細菌を用い、外来遺伝子には環状化プラスミドを用いた。通常重力下、微小重力下での形質転換頻度を比較したところ、微小重力による影響は小さく、宇宙居住環境における形質転換の起こりやすさは地球上と同程度である可能性が示された。それゆえ、私たちの宇宙居住環境においても、地上と同様に病原遺伝子などの伝播に気をつける必要がある。

研究成果の概要(英文)：We compared the transformation frequencies of *E. coli* and natural competent bacteria under normal gravity and under low-shear modeled microgravity (LSMMG) generated by a high-aspect rotating vessel (HARV). Our results demonstrated that bacterial transformation is not hampered by LSMMG, and the potential risk of bacterial gene transfer during space flight is comparable to that on Earth. Therefore, we should arrest the spread of harmful genes such as toxin-producing and antibiotic resistance genes in crewed space habitats, as well as on the Earth.

研究分野：分子微生物生態学

キーワード：宇宙生命科学 細菌間遺伝子伝播 環境微生物学

1. 研究開始当初の背景

NASA (米国航空宇宙局) や ESA (欧州宇宙機関) では宇宙探査に向けたロードマップが示され、人類の長期宇宙滞在はこれまで以上に現実的なものとなっている。すでに宇宙での長期滞在は Mir や国際宇宙ステーション (ISS: International Space Station) 内で開始され、これまでの宇宙実験により、宇宙居住環境ではヒトの免疫能が低下すること、一部の細菌の病原性が上昇することが報告されている。したがって、宇宙居住においては、地上での生活以上に衛生微生物学的な安全の確保が重要となる。

細菌は、遺伝子の突然変異や外来遺伝子の取り込みにより、新規形質の獲得による環境適応や進化を進めている。外来遺伝子の取り込み機構として、細菌間での遺伝子の直接交換 (接合)、細胞外遺伝子の取り込み (形質転換)、ファージを介した遺伝子の取り込み (形質導入) を有している。これまでのゲノム解析の結果から、病原細菌の出現にはこのような遺伝子伝播が深く関与していることが明らかとなっている。すなわち、宇宙居住空間で細菌の遺伝子伝播頻度が上昇する場合、病原遺伝子や抗生物質耐性遺伝子などが、予測を越えて伝播する可能性が生じ、バイオハザードの要因となりうる。

微小重力が細菌に与える影響については、米国を中心に、遺伝子発現の変化をマイクロアレイで解析した研究が行われている。また宇宙環境下で培養した病原細菌の生残性・病原性の変化についても研究が始められつつある。一方、宇宙環境が細菌間の遺伝子伝播に与える影響については、欧州諸国において、「接合」に着目した研究が積極的に進められている。申請者らは、環境中において遺伝子伝播に大きく寄与している可能性が考えられる「形質転換」に着目して研究を進める。

2. 研究の目的

細菌の進化や環境適応には、外来遺伝子の取り込みが大きく関与している。宇宙環境において細菌間の遺伝子伝播頻度が上昇する場合、病原遺伝子や抗生物質耐性遺伝子が予測を超えて伝播する可能性が生じ、バイオハザードの要因となる。本研究では、微小重力シミュレーション装置を用いて、微小重力下における細菌の遺伝子伝播頻度や伝播の範囲、伝播に影響を及ぼす因子について、考究する。本研究の成果は、宇宙居住において、病原細菌出現のリスクを考察する上で重要であり、また、宇宙環境における生命の環境適応や進化を考察する際に必須の知見となるものであり、基礎科学としての意義も大きい。

3. 研究の方法

(1) 大腸菌を宿主とした検討

微小重力シミュレーション装置 (high-aspect rotating vessel [HARV system]) を用い

て、擬似微小重力下におけるプラスミド DNA の大腸菌への取り込みを評価した。プラスミド DNA には *gfpuv* 遺伝子、アンピシリン耐性遺伝子がコードされている pGFPuv (Clontech, Mountain View, CA, USA) を、大腸菌には HB101 株を用いた。なお、大腸菌 HB101 は形質転換能を高めるための前処理を施している。

プラスミドと大腸菌を混合した後に HARV system にセットし、25 rpm で回転することにより、擬似微小重力下での反応を行った。なお、コントロールとして通常重力下での反応も同時に行った。4°C で反応を続け、0 から 5 日目まで 1 日おきに試料を採取し、それぞれの日における形質転換頻度を測定した。

形質転換頻度は、アンピシリンをマーカーとした選択培地による培養法、*gfpuv* 遺伝子の発現にもとづいた、顕微鏡法により算出した。

(2) 自然形質転換能を有する細菌を宿主とした検討

自然形質転換能を有する細菌を用い、微小重力の形質転換に与える影響を評価した。宿主には自然環境に存在する細菌を用いた。まず初めに *gfpuv* 遺伝子を有する広宿主域プラスミド pBBR122-*gfp* を新たに作成した。このプラスミドはカナマイシンに耐性遺伝子、*gfpuv* 遺伝子をコードする。

独自に作成したプラスミドを外来遺伝子とし、前処理を施していない池の水と混合し、HARV system で反応させた。なお、培養温度は室温 (約 20°C) とし、形質転換頻度の測定は、カナマイシンをマーカーとした選択培地による培養法、*gfpuv* 遺伝子の発現にもとづいた、顕微鏡法により算出した。

4. 研究成果

(1) 大腸菌を宿主とした検討

アンピシリンを添加した LB 寒天培地、および抗生物質を含まない LB 寒天培地上に形成したコロニー数を図 1 に示した。

微小重力下で培養した試料では、反応 1 日目以降はすべてにおいて通常重力下より培養可能な大腸菌数は増加している ($p < 0.05$)。通常重力下では 4°C で培養することにより、生理活性が低下し、培養可能な大腸菌数は低下した一方、微小重力下では多少の増減はあるものの、ほぼ一定の数を維持していた。

定量限界値以上の形質転換体が微小重力下では 2~4 日目において得られた一方、通常重力では 4 日目に定量限界をわずかに下回った (図 1)。しかしながら、形質転換頻度は微小重力下、通常重力下ともにほぼ同じ値を示した ($p > 0.05$; 表 1)。形質転換頻度は、両条件とも 2 日目より 3 日目の方が高い値となっている。*gfpuv* の発現でも形質転換頻度の測定を試みたが、緑色蛍光を発する大腸菌数がほとんどなく、定量的な結果を得ることはできなかった (10,000 細胞につき 5 以下)。すなわち、選択培地により測定した形質転換

頻度より、微小重力は大腸菌の形質転換へは大きな影響を与えないことが示唆された。

しかしながら、本検討においては前処理により形質転換能を高めた細菌を使用していることから、形質転換が容易に起こり、差が観察できなかった可能性がある。そこで、次に自然形質転換能を有する細菌をホストとした検討を行った。

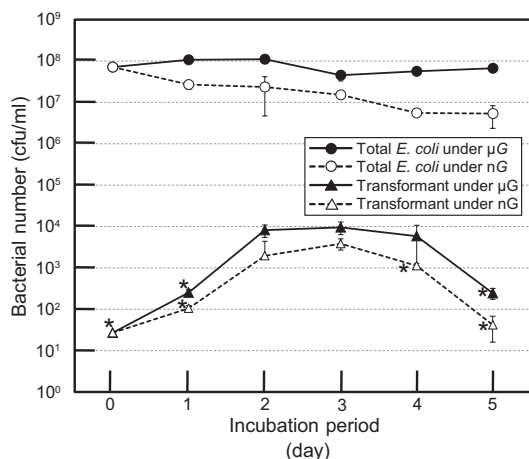


図1. 通常重力下および微小重力下で反応した時の大腸菌 HB101 数及び形質転換体数 (n = 4)

μG : 微小重力、nG: 通常重力

*定量限界以下 (定量限界: 1.2×10^3 cfu/ml)

表1. 通常重力下および微小重力下で反応した時の大腸菌 HB101 の形質転換頻度 (n = 4)

	0 day	1 day
Modeled microgravity	-	-
Normal gravity	-	-

	2 day	3 day	4 day	5 day
Modeled microgravity	$0.78 \pm 0.36^*$	2.2 ± 0.67	1.0 ± 0.82	-
Normal gravity	0.75 ± 0.11	2.5 ± 0.60	-	-

-: 定量限界以下

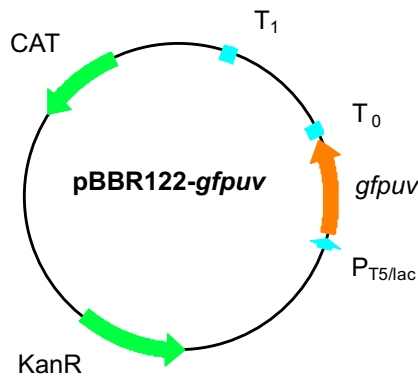
単位: 10^4

(2) 自然形質転換能をもつ細菌をホストとした検討

先の検討では、大腸菌の形質転換能を前処理により高めたことが、通常重力と微小重力下において形質転換頻度に差が出なかった要因となった可能性が考えられた。そこで、次に自然形質転換能を有する細菌をホストとした検討を行った。論文をもとに *Bacillus subtilis* および *P. stutzeri* を候補細菌としたが、予備検討の結果、良好な結果を得ることができず、自然環境中に存在する自然形質転換能を有する細菌を実際の検討に用いることとした。

まず初めに (1) の検討で用いた pGFPuv は大腸菌をホストとすることから、新たに広

宿主域プラスミド pBBR122 に *gfpuv* 遺伝子を組み込んだプラスミド pBBR122-*gfpuv* を作成した (図2)。作成したプラスミドは、大腸菌 JM109 株および *P. stutzeri* に形質転換させることにより、カナマイシン耐性を示し、また *gfpuv* 由来の緑色蛍光を発することを確認した。



- Derived from pBBR122
- Broad-host plasmid
- Coding gene: KanR, CAT, *gfpuv*

図2. 新たに作成した pBBR122-*gfpuv*

新たに作成したプラスミドを外来遺伝子とし、池の水に添加した系において、通常重力および擬似微小重力下で形質転換実験を行った。(1) では 4°C で反応を進めたが、池の水温に近い約 20°C を反応温度として選択した。なお、この池には 5×10^6 cells/ml の細菌が存在し、予備検討により、自然形質転換能を有する細菌が存在することを確認した。

反応1日後にカナマイシンを添加したLB寒天培地上に形成したコロニー(形質転換体)数を測定したところ、通常重力では 1.7×10^2 cfu/ml、微小重力下では 4.6×10^2 cfu/ml と形成したコロニー数に差が見られず、形質転換にあたっては、先の検討と同様に微小重力の影響は少ない可能性が考えられた。

(1)、(2)を通じて、形質転換には微小重力の影響は小さい可能性が示された。宇宙居住環境における形質転換の起こりやすさは地球上と同程度である可能性が示された。それゆえ、私たちの宇宙居住環境においても、地上と同様に病原遺伝子などが伝播しないように気をつける必要がある。

また、バイオフィームは遺伝子伝播の場として考えられるおり、宇宙居住環境においてバイオフィーム形成が影響を受けるならば、それに伴ってそこで生じる細菌間遺伝子伝播も2次的な影響を受ける可能性がある。宇宙居住において病原細菌出現のリスクを考察するうえでは、今後はより複合的な視点からの検討することも必要になると考えている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕（計1件）

T. Ichijo, J. Park, H. Hieda, N. Yamaguchi, M. Nasu.

Transformation frequency of *Escherichia coli* HB101 under low-shear modeled microgravity.

Biol. Sci. Space., 29: 19-23 (2015)

DOI: 10.2187/bss.29.19

〔学会発表〕（計0件）

〔図書〕（計0件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計0件）

○取得状況（計0件）

6. 研究組織

(1)研究代表者

一條 知昭 (ICHIJO, Tomoaki)

大阪大学・大学院薬学研究科・助教

研究者番号：20513899

(2)研究分担者

山口 進康 (YAMAGUCHI, Nobuyasu)

大阪大学・大学院薬学研究科・准教授

研究者番号：20252702