

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 9 日現在

機関番号：13801

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24780087

研究課題名(和文) プラスミドが異種細菌間を接合伝達するための必須因子の同定

研究課題名(英文) Identification of essential elements for the plasmid transfer between different bacteria

研究代表者

新谷 政己 (Shintani, Masaki)

静岡大学・工学研究科・准教授

研究者番号：20572647

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、環境中における遺伝子の伝播を担うプラスミドpCAR1を用いて、異種細菌間におけるプラスミドの接合伝達を成立させる必須因子の取得を目的として行った。その結果、pCAR1上にコードされる3つの異なる核様態タンパク質(NAPs)が、異種微生物間の接合伝達における必須因子であることが示唆された。またORF145-146は、接合伝達に必須でないが、異種細菌間の伝達頻度に影響を及ぼすことが示された。また、NAP遺伝子は、他の様々な接合伝達性プラスミド上に分布していることも示した。さらに、異種微生物間の伝達を理解する上で重要な、プラスミドを一時的に受容可能な宿主の検出・分離・解析手法も確立した。

研究成果の概要(英文)：The objective of this study is to find essential elements for the conjugative transfer of plasmid between different bacteria using pCAR1. Three kinds of nucleotide-associated proteins (NAPs) encoded on pCAR1 (Pmr, Phu, and Pnd) were shown to be important elements for its replication, maintenance and transfer in different host strains. Products of ORF145 and ORF146 on pCAR1 were not essential for the transfer but they may affect the transfer frequency of the plasmid. NAP genes were shown to be distributed on various transmissible plasmids. We successfully developed a method to detect, separate, and analyze 'transient' transconjugants, which would be important for the spread of plasmids in different host strains.

研究分野：環境微生物学

キーワード：プラスミド 接合伝達 核様態タンパク質

1. 研究開始当初の背景

プラスミドの接合伝達現象は細菌の進化・適応の原動力であり、古くより研究がなされてきた。しかしその多くは、プラスミドを授受する供与菌と受容菌が同一菌株に由来する場合の接合伝達機構を対象としており、実際の環境中でより重要な、異種細菌間における接合伝達に必要な因子についてはほとんど明らかになっていない。

pCAR1 は、*Pseudomonas resinovorans* CA10 株に由来する約 200 kb の接合伝達性の環状プラスミドであり、環境中における遺伝子の水平伝播を担う重要なプラスミドの一つである (Maeda et al., 2003 J. Mol. Biol. 2003, 326:21, Shintani et al., 2006, Appl. Environ. Microbiol. 2006 72:3206, Takahashi et al., 2009, Biosci. Biotechnol. Biochem. 73:744)。以前の我々の研究で、環境試料中から、*Stenotrophomonas* 属細菌を接合完了体として得ることに成功した (Shintani et al., 2008, 30:117)。一方で、実験室内では当該菌株に伝達が認められなかったことから、pCAR1 が接合伝達するためには、*Pseudomonas* 属細菌間の接合伝達に必要な因子とは別の因子が必要な可能性が示された。また、上記 *Stenotrophomonas* 属細菌内で、pCAR1 が非常に不安定であったことから、環境中には、プラスミドを一時的に保持する宿主が存在するのではないかと考えられた。

2. 研究の目的

(1) pCAR1 を研究材料として、異種微生物間を接合伝達する際に必要な pCAR1 上および宿主染色体上の因子について同定することを目的とした。

(2) pCAR1 と他のプラスミドについて、異種微生物間の成否を左右する環境因子を同定することを目的とした。

(3) 環境中における異種微生物間の伝播現象を理解するにあたり、プラスミドを一時的に保持する宿主の検出手法を確立することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) pCAR1 の異種微生物間における必須因子の同定

pCAR1 を接合伝達によって受容できない *Stenotrophomonas* 属細菌 X277 株を用いて、pCAR1 が接合伝達可能になった変異株の取得を試みた。また、プラスミドの異種細菌間の接合伝達に必要な因子の手がかりを得るために、pCAR1 を有する異なる *Pseudomonas* 属細菌内で、pCAR1 上の遺伝子の転写量を網羅的に比較した。このうち転写量が菌株ごとに異なる遺伝子を、異種微生物間の伝達に關与する候補として選定し、遺伝子破壊株を構築して、異種微生物間における接合伝達頻度を比較した。

(2) 異種微生物間の接合伝達の成否を左右する環境条件の探索

固体上・液体内、温度や pH、接合時間など、異なる環境条件下で、同種および異種微生物間の接合実験を行い、その頻度を比較した。このとき pCAR1 の他、pBP136 および NAH7 をモデルプラスミドとし、供与菌としてゲノム配列既知の *Pseudomonas putida* KT2440 株を、また受容菌には、同種の KT2440 株の他、別の研究でゲノム配列を解読した *P. resinovorans* CA10dm4 株を受容菌として用いた。

(3) 環境中でプラスミドを一時的に受容可能な微生物の検出手法の確立

先述した *Stenotrophomonas* 属細菌のように、プラスミドを極めて不安定ながら一時的に保持可能な細菌が環境中に存在するのではないかと考え、接合完了体を培養せずに、検出・分取・解析する手法の構築を試みた。各プラスミド上に緑色蛍光タンパク質 (GFP) をコードする遺伝子を挿入し、接合完了体でのみ発現するシステムを導入した。その後、緑色蛍光を示す接合完了体を、フローサイトメーターとセルソーター (FACS) によって一細胞ずつ検出・分取した。分取した接合完了体細胞から、直接全ゲノム DNA を増幅後、プラスミドの有無を PCR によって確認し、16S rRNA 遺伝子配列を解読することで、宿主の属種を同定した。モデルプラスミドとして pCAR1、pBP136 と NAH7 を用い、好気条件下における土壌由来の細菌画分を対象として調べた。

4. 研究成果

(1) pCAR1 の異種微生物間における必須因子の同定

異種微生物間の接合伝達に必要な因子を同定するのに、プラスミドと、そのプラスミドが直接伝達しない受容菌として、pCAR1 と *Stenotrophomonas* 属細菌を想定していたが、pCAR1 を有する *Stenotrophomonas* 属細菌の復元に至らなかった。そこで、予定を変更して、pCAR1 を有する 3 種の *Pseudomonas* 属細菌について、増殖曲線の異なるポイントにおける pCAR1 上の全遺伝子の転写量変化を比較した。その結果、pCAR1 上の ORF145-146 と、3 種の核様態タンパク質をコードする遺伝子 (*pmr*, *phu* および *pnd*) が、異なる宿主内における転写量の変動が大きい遺伝子候補として選定された (**発表論文にて報告**)。特に、核様態タンパク質をコードする遺伝子については、*pmr* と、他の 2 つ (*phu* と *pnd*) のうち 1 つを欠損する二重破壊株で、KT2440 株から KT2440 株の伝達は認められた一方、KT2440 株から CA10dm4 株への伝達が検出限界以下に低下する現象を見出した (図 1)。

この結果より、pCAR1 上の核様態タンパク質が、本プラスミドの異種微生物間の伝達に必要な因子と示唆された。また、上の二重破

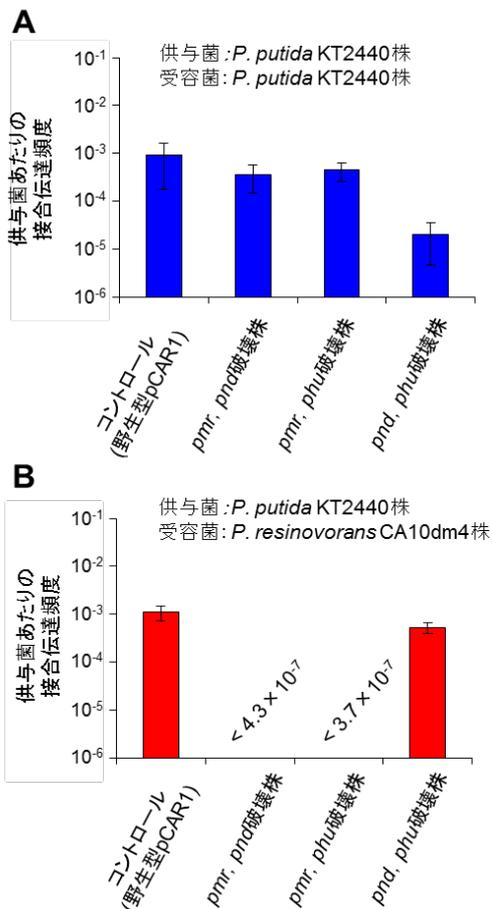


図1. 核様態タンパク質をコードする遺伝子破壊株における異種微生物間の伝達頻度

壊株では、宿主の継代培養をするにつれ、プラスミド上の遺伝子構造に変化が認められたり、プラスミドを欠損したりする現象も見出した。従って、プラスミド上にコードされる核様態タンパク質は、pCAR1の複製・維持にも寄与する因子であることが示された。本現象に関して、それぞれ欠損した遺伝子についての相補実験を行ったところ、伝達頻度の回復には至らなかったが、複製・維持能に関しては回復が認められた。いずれにしても、核様態タンパク質がpCAR1の基本機能にとって重要な因子であることが初めて示された。また、pCAR1上のORF145およびORF146については、これらを欠損したプラスミドの接合伝達頻度が低下することから、異種微生物間の伝達に関与する可能性が考えられた(以上発表論文にて報告)。

以上のことを踏まえ、他のプラスミド上にもどの程度核様態タンパク質をコードする遺伝子が分布しているのかを調べるため、全塩基配列が決定された4602のプラスミドについてデータベースを構築し、それらの中で、核様態タンパク質をもつプラスミドを選抜し、特徴を比較した。その結果、核様態タンパク質をコードする遺伝子は、よりサイズの大きなプラスミドに存在し、かつ接合伝達性のプラスミド上に有意に偏って分布するこ

とが示唆された。この結果からも、異種微生物間の伝播・安定な維持に、核様態タンパク質が重要であることが支持された(以上発表論文にて報告)。

(2) 異種微生物間の接合伝達の成否を左右する環境条件の探索

pCAR1と、pBP136およびNAH7について、固体上・液体内、温度やpH、接合時間など、異なる環境条件下で、同種および異種微生物間の接合実験を行った。このとき、2種類の受容菌を平板培地上で区別可能にするために、KT2440株とCA10dm4株の染色体上に、それぞれGFP遺伝子と赤色蛍光タンパク質DsRedの遺伝子を挿入した菌株を作製した。その後、接合伝達頻度を比較したところ、プラスミドごとに環境因子から受ける影響が異なることが示唆された。また、上記3種のプラスミドについて、KT2440株(野生株)と、派生するPpY101株について、宿主がプラスミドから受ける影響を、プラスミドを持つ菌株と、プラスミドを持たない菌株との競合試験によって比較した。その結果、KT2440株は3種のプラスミドいずれについても、プラスミドを持たない菌株の方が優占化したのに対し、PpY101株については、プラスミドを持つ菌株の方が優占化した。また、先行する研究で2価のカチオン(Ca^{2+} , Mg^{2+})がpCAR1の接合伝達に必須な因子として示されたが、これらのカチオンの及ぼす影響が、供与菌と受容菌の組み合わせによって変わることを見出した(一部を発表論文にて報告)。

(3) 環境中でプラスミドを一時的に受容可能な微生物の検出手法の確立

FACSと全ゲノムDNA増幅法を組み合わせることで、接合完了体を培養せずに、細胞レベルで解析する手法の確立に成功した(図2)。

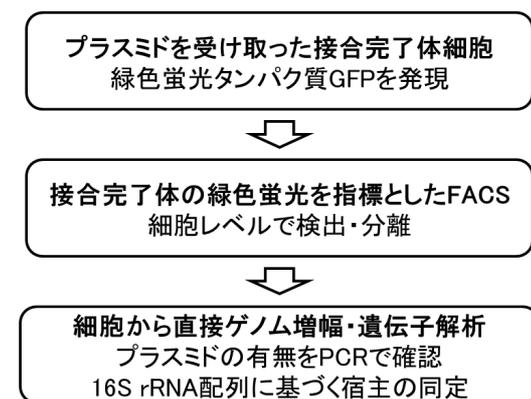


図2. プラスミドを一時的に受容可能な接合完了体を検出・分離・解析する手法。

本手法を用いて、各プラスミドの接合完了体について解析を行ったところ、pBP136は、既知の宿主(Proteobacteria門)以外に、Actinobacteria門、Bacteroidetes門、Firmicutes門の細菌に伝達すること、NAH7

および pCAR1 は, *Pseudomonas* 属と *Stenotrophomonas* 属 (*Gammaproteobacteria* 綱)細菌の他,細菌綱レベルで異なる *Delftia* 属 (*Betaproteobacteria* 綱)の細菌に伝達することを新たに明らかにした. いずれも従来の培養法に依存した手法では得られなかった接合完了体であり, 環境中には, プラスミドを一時的に受容可能な宿主が存在することが示唆された. 特に, pCAR1 を受け取った *Delftia* 属細菌について, 16S rRNA 遺伝子をプローブとした fluorescence in situ hybridization (FISH) 法と, プラスミド全体をプローブとした FISH 法を組み合わせることで, 細胞レベルの接合完了体の検出にも成功し, *Delftia* 属細菌が本プラスミドを一時的に受容可能な宿主であることが, 視覚的にも確かめられた (**以上発表論文にて報告**).

以上, 本研究の成果により, プラスミド上にコードされる核様態タンパク質が, 異種微生物間の接合伝達の成否に重要な因子であること, また, プラスミド自体の基本機能にも重要であることを世界で初めて示した. また, 本タンパク質は, 他の接合伝達性プラスミドの多くに分布していることも明らかにした. さらに, pCAR1 の異種微生物間の接合伝達の成否を左右する環境因子として, カチオンの重要性が改めて認識された. 本研究期間内に, 異種微生物間の接合伝達における宿主染色体上の必須因子の同定には至らなかったが, 同種の *P. putida* の同一株に由来する KT2440 株と PpY101 株内で, プラスミドが宿主に及ぼす影響に違いが認められたことから, 今後, これらの 2 株のゲノム配列の解読を行い, 比較することで, 宿主染色体上の因子の同定も可能と推定される. また, 本成果で確立した, 接合完了体の培養を介さない検出法については, 複合微生物系におけるプラスミドの宿主域解明にも発展させて研究を続けている.

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 8 件)

新谷政己, 水口(鈴木)千穂, 野尻秀昭, 「Nucleoid-associated proteins encoded on plasmids: Occurrence and mode of function.」, 『Plasmid』誌, 査読有, 印刷中, DOI: 10.1016/j.plasmid.2015.04.008.

新谷政己, 金原和秀. 「プラスミドゲノムクス~全塩基配列解読済みのプラスミドデータベースの整備~」, 『環境バイオテクノロジー学会誌』誌, 査読有, 2015, 14(2):1-6.

新谷政己, サンチェス・ゾイ, 金原和秀, 「Genomics of microbial plasmids: classification and identification based on replication and transfer systems and host taxonomy.」, 『Frontiers in Microbiology』誌, 査読有, 2015, 6:242, DOI:

10.3389/fmicb.2015.00242.

水口(鈴木)千穂, 廣谷龍輔, 新谷政己, 武田俊春, 武田俊春, 高橋裕里香, 松井一泰, デリアナ・ヴァシレヴァ, 尹忠誅, 岡田憲典, 山根久和, 野尻秀昭, 「Effects of three different nucleoid-associated proteins encoded on the IncP-7 plasmid pCAR1 on the host *Pseudomonas putida* KT2440.」, 『Applied and Environmental Microbiology』誌, 査読有, 2015, 81(8): 2869-2880, DOI:10.1128/AEM.00023-15

高橋裕里香*, 新谷政己*, 高瀬識之, 加増由佳, 河村富士夫, 原啓文, 西田洋巳, 岡田憲典, 山根久和, 野尻秀昭, (contributed equally to this work), 「Modulation of primary cell function of host *Pseudomonas* bacteria by the conjugative plasmid pCAR1.」, 『Environmental Microbiology』誌, 査読有, 2015, 17(1):134-155. DOI:10.1111/1462-2920.12515

新谷政己, 松井一泰, 井上潤一, 細山哲, 黄地祥子, 山副敦司, 野尻秀昭, 金原和秀, 大熊盛也, 「Single-cell analyses revealed transfer ranges of IncP-1, IncP-7, and IncP-9 plasmids in a soil bacterial community.」, 『Applied and Environmental Microbiology』誌, 査読有, 2014, 80(1): 138-145, DOI:10.1128/AEM.02571-13

新谷政己, 松井一泰, 金原和秀, 野尻秀昭, 「環境中におけるプラスミドの挙動解析」, 『環境バイオテクノロジー学会誌』, 査読有, 2013, 13(2): 125-134

新谷政己, 李美英, 松井一泰, 大熊盛也, 岡田憲典, 野尻秀昭, 「異なる栄養条件下におけるプラスミドの接合伝達頻度の比較解析」, 『環境バイオテクノロジー学会誌』, 査読有, 2012, 12(2): 163-167

[学会発表](計 17 件)

片岡大亮, 飯田健義, 大熊盛也, 金原和秀, 新谷政己, 「接合伝達性プラスミドのモデル環境下における挙動解析」, 日本農芸化学会 2015 年度大会, 2015 年 3 月 26-29 日, 岡山大学(岡山県岡山市)

柳田晃輔, 松井一泰, 新谷政己, 水口(鈴木)千穂, 岡田憲典, 野尻秀昭, 「宿主の状態がプラスミドの接合伝達に及ぼす影響の解析」, 日本農芸化学会 2015 年度大会, 2015 年 3 月 26-29 日, 岡山大学(岡山県岡山市)

新谷政己, 「一細胞解析手法によるプラスミドの宿主域解明の試み」, 第 9 回日本ゲノム微生物学会, 2015 年 3 月 6-8 日, 神戸大学(兵庫県, 神戸市)【招待講演】

新谷政己, 「Behaviors of IncP-1 plasmids

in various environments」 Thailand-Japan Joint Symposium, 2015年3月5日, カセサート大学(タイ王国, バンコク市)【招待講演】

新谷政己, 「Transfers of degradative plasmids in various environments」, Interdisciplinary Symposium on Environmental Microbiology for Sustainable Society, 2015年2月5-6日, 名古屋工業大学(愛知県, 名古屋市)【招待講演】

新谷政己, 「Behaviors of plasmids in various environments」, 第3回浜松科学技術研究振興会ミニシンポジウム "Research Frontiers in Environmental Microbiology-Behaviors and Diversity-", 2014年10月25日, 静岡大学(静岡県, 浜松市)【招待講演】

飯田健義, 竹本裕史, 山村杏子, 片岡大亮, 金原和秀, 新谷政己, 「モデル環境下における接合伝達性プラスミドの挙動解析」, 環境微生物系学会合同大会2014 2014年10月21-24日, アクトシティ浜松コンgresセンター(静岡県浜松市)

柳田晃輔, 松井一泰, 新谷政己, 水口(鈴木)千穂, 岡田憲典, 野尻秀昭, プラスミドの接合伝達に影響を与える環境要因の探索 環境微生物系学会合同大会2014, 2014年10月21-24日, アクトシティ浜松コンgresセンター(静岡県浜松市)

新谷政己, 「可動性遺伝因子を介した微生物のコミュニケーション」, 第66回日本生物工学会大会, 2014年9月9-11日, 札幌コンベンションセンター, (北海道, 札幌市)【招待講演】

飯田健義, 竹本裕史, 山村杏子, 片岡大亮, 金原和秀, 新谷政己, 「モデル環境下における接合伝達性プラスミドの挙動解析」第66回日本生物工学会大会, 2014年9月9-11日, 札幌コンベンションセンター, (北海道, 札幌市)

新谷政己, 「環境微生物の一細胞レベルの単離と解析」, 日本農芸化学会2014年度大会2014年3月27-30日, 明治大学(神奈川県川崎市)【招待講演】

松井一泰, 廣谷龍輔, 武田俊春, 尹忠銖, 新谷政己, 岡田憲典, 野尻秀昭, 「プラスミド pCAR1 にコードされる核様体タンパク質が接合伝達に与える影響の解明」, 日本農芸化学会2014年度大会, 2014年3月27-30日, 明治大学(神奈川県川崎市)

李美英, 高橋裕里香, 松井一泰, 新谷政己, 岡田憲典, 野尻秀昭, 「プラスミド NAH7 の受

容の可否に影響を及ぼす受容菌 *Pseudomonas resinovorans* ゲノム上の遺伝子の解析」, 日本農芸化学会2014年度大会, 2014年3月27-30日, 明治大学(神奈川県川崎市)

柳田晃輔, 松井一泰, 新谷政己, 岡田憲典, 野尻秀昭, 「環境条件が IncP-7 群プラスミド pCAR1 の接合伝達頻度・宿主域に及ぼす影響の解明」, 日本農芸化学会2014年度大会 2014年3月27-30日, 明治大学(神奈川県川崎市)

新谷政己, 「遺伝因子を介した微生物のコミュニケーション」, 第44回中部化学関係学協会支部連合秋季大会 2013年11月2-3日, 静岡大学(静岡県浜松市)【招待講演】

新谷政己, 徳丸裕樹, 金原和秀, 野尻秀昭 「IncP-7群プラスミド pCAR1 の接合伝達に關与する ORF145 および ORF146 の機能解析」, 日本農芸化学会2013年度大会, 2013年3月24-27日, 東北大学(宮城県仙台市)

新谷政己, 「複合微生物系におけるプラスミド・トランスポソンの挙動解析」. 第1回先端科学合同セミナー, 2013年3月7日, 琵琶湖コンファレンスセンター(滋賀県, 彦根市)

〔図書〕(計 2件)

新谷政己, 高橋裕里香, 野尻秀昭, 「Conjugative elements: Host chromosome function modifiers」, 『Biodegradative Bacteria』, 査読有, 2014, 129-152, DOI:10.1007/978-4-431-54520-0_7

新谷政己, 野尻秀昭, 「Mobile genetic elements (MGEs) carrying catabolic genes」, 『Management of Microbial Resources in the Environment』, 査読有, 2013, 167-214, DOI:10.1007/978-94-007-5931-2_8

〔その他〕

受賞等

・NPO 法人環境バイオテクノロジー学会 奨励賞(2013年度)
・日本農芸化学会2012年度大会トピックス賞

ホームページ等

金原・新谷研究室

<http://163.43.139.71/~tmshint/>

6. 研究組織

研究代表者

新谷 政己 (SHINTANI, Masaki)

静岡大学 工学研究科 准教授

研究者番号: 20572647