

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 10 月 11 日現在

機関番号：23201

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2014～2015

課題番号：26892024

研究課題名(和文) “乗り物を持たない遺伝子”としての細胞外プラスミドの機能解明

研究課題名(英文) Potential contribution of extracellular plasmids to horizontal gene transfer

研究代表者

高橋 裕里香 (TAKAHASHI, Yurika)

富山県立大学・工学部・助教

研究者番号：30732698

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：海水と海底堆積物それぞれから細胞外DNAのみを抽出する手法を確立した。富山湾の複数地点より得られた細胞外DNAの塩基配列を解析し、細胞外DNAにはその場に細胞として存在しない生物のDNAも含まれていること、さらに海水中では細胞内DNAとの組成の差が大きく地点間の差が小さい(=流動性が高い)のに対し、海底堆積物中では細胞内DNAとの差が小さく地点間の差が大き(流動性が低い)ことを明らかにした。細胞外DNA中で既知プラスミドと同一性を示す配列は1%未満であったため、細胞外プラスミドを解析するためには、抽出された細胞外DNAから環状DNAのみを濃縮するステップが必要であることも確認された。

研究成果の概要(英文)：Using two filters to remove cells and viral particles followed by several steps of concentration and purification, we succeeded in obtaining metagenome sequences of extracellular DNA from three surface seawater and four marine sediment sampled at different sites on Toyama Bay, Japan. G+C content and oligonucleotide frequency profiles showed that the composition of extracellular DNAs from seawater were similar to the viral DNA isolated from the same sample, while those from sediments were similar to the intracellular DNA. The ratio of reads showing similarity (blastn, e-value <1e-5) with already-known plasmid (9225 sequences in RefSeq v74) were ranged from 0.2-1.0%, and had some correlation with those having similarity with bacterial sequence (3-16%). Some plasmid-derived sequences were only detected in extracellular DNA, indicating that the composition of extracellular plasmid is not the same with that of intracellular plasmid.

研究分野：環境微生物学

キーワード：細胞外DNA プラスミド 富山湾

1. 研究開始当初の背景

細菌やアーキアのような単細胞微生物が高い環境適応能力を持つ理由は、世代時間が短いこと、単細胞であるがゆえに DNA 複製時の変異が直接表現型の変化に結びつきやすいことが挙げられる。しかし近年、こうした変異の蓄積以上に、生物種を超えた遺伝情報の水平伝播が頻繁に起こっていることが細菌やアーキアの進化の大きな原動力となっていることがわかってきた [Frost et al. (2005) Nat. Rev. Microbiol. 3:722-732]。細胞分裂に伴って娘細胞に遺伝情報を受け渡す「垂直」伝達に対し、「水平」伝播は(A)ウイルスによる形質導入、(B)プラスミドや接合トランスポゾンの接合伝達、(C)細胞が直接裸の DNA を取り込む自然形質転換、の3つの様式に大きく分けられる。

これらの中でウイルス(A)は宿主の DNA 複製系・タンパク合成系を利用して自己のコピーを増やし最終的に宿主細菌を溶菌させて細胞外に出ていく「侵略者・搾取者」な側面が強い。一方プラスミド(B)は、ウイルスと同じように宿主の DNA 複製系を利用して自己のコピーを増やすが、際限なく複製をしないためのコピー数制御の機構を持ち、また抗生物質耐性遺伝子や特殊物質の代謝遺伝子といった“アクセサリー遺伝子”によってある環境条件下で宿主の生育を格段に有利にする、という点で細菌にとって比較的「友好的」な存在であると言える。トランスポゾンは染色体に組み込まれるという点でプラスミドよりも安定に保持されるが、接合トランスポゾン(自己を切り出して再環化し接合伝達を行う能力を持ったトランスポゾン)以外は他の細胞に移動することはできない。また、自然形質転換(C)において取り込まれる DNA としては染色体由来直鎖 DNA・プラスミド DNA の両方が考えられるが、直鎖 DNA は相同性組換えによって染色体に組み込まれないと維持されないのに対して、複製・保持機構を備えたプラスミド DNA は有利である。以上のことから、ウイルスやトランスポゾン等他の可動性遺伝因子と比較しても、プラスミドが細菌の新規表現型の獲得に果たす役割は大きいと言える。実際に、環境中から特殊な能力を持った細菌を単離するとその形質はプラスミド上にコードされていることが多く、工業的にもプラスミド(ベクター)が遺伝子工学技術に重要な位置を占め有用物質生産などに広く利用されていることは言うまでもない。

環境中の細菌群集においてプラスミド上にコードされた形質が発露するためには、(a)プラスミドが適切に保持され(b)プラスミド上の遺伝子が発現するだけでなく、(c)プラスミドを保持する細菌が他の菌に淘汰されないことも必要である。プラスミドを保持すると菌株の生育が悪くなり適度な選択圧(抗生物質等)を与えないとプラスミド脱落株が優占化してしまう場合が多いことは経験的

には知られていたが、プラスミドが宿主に与える負荷の実体については数例しか報告がなかった。また、実環境中ではプラスミドは接合伝達によって複数の宿主間を行き来しているが、染色体遺伝子構成が異なると負荷の大きさ・内容が異なる可能性については検討されていなかった。そこで申請者は、プラスミドが宿主細菌に与える影響の解析と宿主間比較、及び宿主がプラスミドに与える影響の解析と宿主間比較を行い、プラスミドと宿主の相互作用の内容・大きさは、宿主の種類によって異なることを示した。これは細菌の機能進化や生き残りにプラスミドの果たす役割を考察する上で重要な基盤情報となる成果である。

ところで最近、Kaneko と Itaya によって λ ファージによって溶菌した大腸菌において、菌が保持していたプラスミドだけは、直接枯草菌を形質転換できるほど高品質なまま溶液中で安定に存在できることが示された [Kaneko & Itaya (2010) J. Biochem. 147:819-822]。これは、細胞外に放出された核酸は染色体であろうとプラスミドであろうと細胞が持っていた分解酵素によって分解する、という従来予想を裏切る結果である。細胞外 DNA については 1980 年代から報告が見られ、これまでに河川や海水、土壌などの様々な環境における存在量・分子量・半減期が測定され、高分子核酸 (DNA, RNA) は細胞外で従来考えられた以上に安定に存在できることはこれまでも知られていた [Stewart & Carlson (1986) Annu. Rev. Microbiol. 40:211-231]。しかし、その安定性はタンパク質の外殻(ウイルス)や細胞由来の膜(visicle)、粘土粒子との吸着によって、分解を免れているためであると考えられてきた。Kaneko と Itaya の結果は、プラスミドはこれまでに知られていない機構で細胞外での安定性を高める機構を有する可能性を示唆している。細胞外 DNA については、ある種の細菌は能動的に細胞外に核酸 (DNA, RNA) を輸送していること、遺伝情報の保持以外にもリン源や窒素源としての役割があることや、バイオフィーム形成の際の足場となること、等の報告もなされており、機能的な細胞外核酸 (functional extra-cellular nucleic acids) という概念は新たな研究分野になりつつある [Kaneko & Itaya (2010) Nucl. Acid. Mol. Biol. 25:39-53; Dell'Anno & Danovaro (2005) Science, 309:2179]。しかし、これらの研究においては、細胞外 DNA を専らウイルスとそれ以外の裸の DNA と二分して捉え、細胞外 DNA 中でプラスミドがどれだけの割合を占めるのかについては全く着目されてこなかった。また、プラスミド研究においても、プラスミドの機能が発揮されるのは細胞内であり、細胞なしにはプラスミドは存在できないと当たり前のように考えていた。細胞外にどれだけのプラスミド DNA が存在してい

るのかを知ることは、プラスミドを介した遺伝子の水平伝播、細菌の新規形質獲得を考える上で不可欠であると考えられる。

2. 研究の目的

本研究では、環境サンプルから細胞外プラスミド DNA を分離する手法を検討し、実環境中にどのような種類の細胞外プラスミド DNA がどのくらいの量存在しているのかを明らかにすることで、プラスミドを介した遺伝子の水平伝播に細胞外プラスミドがどの程度寄与しているのか解析することを目的とする。

3. 研究の方法

本研究計画の成否は細胞外プラスミドを正確に分離できるかどうかにかかっていると言っても過言ではないと考えており、1 年目は分離法の検討・検証に充てるつもりであった。

環境サンプルとしては、まずは海底堆積物を対象とした。この理由は、水圏は陸上の土壌圏に比べて DNA 抽出が容易であり、海底堆積物中の DNA 量 (乾燥重量 1 g あたり 1 ng-31 μ g) は海水・河川水中に比べて 1000 ~ 10,000 倍多く、半減期 (6-10 日) も他の環境に比べて長いことが報告されている [Maruyama *et al.* (2005) *J. Environ. Biotechnol.* **4**:131-137] ためである。海底堆積物から細胞外 DNA を分離・抽出する方法については、1990 年代後半 ~ 2000 年代前半にかけて検討・改良が加えられている。現在報告されている方法の中では 2005 年の Corinaldesi らの報告 [Corinaldesi *et al.* (2005) *Appl. Environ. Microbiol.*, **71**:46-50] が、操作中の細胞の破裂・溶菌によって放出された DNA の混入がないことが示されている点、及び操作途中でフィルター除去した菌体より細胞内 DNA も同時に得ることができる点、から優れた方法であると考えていた。この論文は方法の記述も詳しく、以降の論文にも多く引用されているため、本研究の重要な基盤情報になると期待された。ただし、細胞外 DNA 中のプラスミド DNA に着目した方法ではないため、エキソヌクレアーゼ (ATP-Dependent DNase) 処理によって直鎖状 DNA・一本鎖 DNA を分解して環状二本鎖 DNA を残す方法を検討する必要があった。これは環境サンプル由来 DNA からプラスミド DNA のみを得る方法として、複数の論文で採用されていた [Schluter (2008) *J. Biotechnol.*, **136**: 65-76; Li *et al.* (2012) *Clin. Microbiol. Infect.*, **18**:5-7]。

4. 研究成果

(1) 海底堆積物からの細胞外 DNA 抽出方法の確立
従来の方法 [Corinaldesi *et al.* (2005) *Appl.*

Environ. Microbiol., **71**:46-50] では、海底堆積物に 0.1% SDS を含むリン酸ナトリウム緩衝液を加えて懸濁し、500 \times g の遠心分離で鉱物粒子を除去した後、10,000 \times g の遠心分離と 0.2 μ m フィルターで細胞を捕集し (捕集物より細胞内 DNA を抽出) 0.02 μ m フィルターでウイルスを除去して、ろ液より CTAB 沈殿と Phe/ChI 抽出で細胞外 DNA を抽出している。しかし、我々が、海洋性細菌である *Roseobacter litoralis* Och 149 株の菌体 (5×10^{10} cells 相当) から海底堆積物に対する操作と同じ手順で細胞外 DNA を粗抽出したところ、SDS を加えなかった際の収量が 466 ~ 506 ng (n=2) であったのに対して、0.1% SDS を加えた際には 6080 ~ 6540 ng (n=2) に増加したことから SDS によって細胞溶菌が引き起こされていることが判明した。これにより従来の方法では、一部の細胞内 DNA を細胞外 DNA として抽出している可能性が示唆された。SDS を含まないリン酸ナトリウム緩衝液を用いて富山湾内より採取した海底堆積物より抽出を行ったところ、1g (湿重量) あたり、細胞内 DNA は 45 (\pm 18) ng (n=3)、細胞外 DNA は 55 (\pm 15) ng (n=3) が得られた。

(2) 海水からの細胞外 DNA 抽出方法の確立
富山湾内の海面から採取した海水 (表層水) から 0.2 μ m フィルターで細胞を捕集し (捕集物より細胞内 DNA を抽出) 0.02 μ m フィルターでウイルス粒子を除去して、エタノール沈殿、透析、シリカカラム精製によって細胞外 DNA を精製した。海水 1 L あたりの収量は、細胞内 DNA が 60 ~ 183 ng (n=2)、細胞外 DNA が 2 ~ 9 ng (n=4) であった。同じ地点の海底堆積物では 1g (湿重量) あたり、細胞内 DNA は 45 (\pm 18) ng (n=3)、細胞外 DNA は 55 (\pm 15) ng (n=3) 得られたことと比較すると、細胞内 DNA に対する細胞外 DNA 量の割合は海底堆積物よりも海水のほうが小さいことが示唆された。コントロールとして、海洋性細菌 *Roseobacter litoralis* Och 149 株の菌体 (10^{11} cells 相当) を同じ海水に添加して同様に抽出したところ、細胞外 DNA の収量は 30.9 ng 未満であったことから、細胞内 DNA のほとんどは抽出中に細胞内にとどまっておき、細胞外に漏れ出していないことが確かめられた。

(3) 海底堆積物と海水より抽出された細胞外 DNA のシーケンス

当初の計画では細胞外 DNA から環状 DNA のみを濃縮してシーケンスを行う予定であったが、そもそも細胞外 DNA 中でプラスミド由来の配列がどれだけの割合を占めるのかという情報が必要であると考え、計画を変更し、細胞外 DNA 全体のシーケンスデータを取得し、同じサンプルより分離した細胞内 DNA との比較を行った。全配列データを用いて、GC 含量

の分布、ゲノムシグネチャ（n連続塩基配列の出現頻度）および配列の多様度を解析し、さらに、16S rRNA 部分配列による菌叢比較も行った。細胞外 DNA にはその場に細胞として存在しない生物の DNA も含まれており、さらに、海水中では細胞内 DNA との組成の差が大きく地点間の差が小さい（＝流動性が高い）のに対し、海底堆積物中では細胞内 DNA との差が小さく地点間の差が大きい（流動性が低い）ことが明らかになった。細胞外 DNA 中で既知プラスミドと相同性を示す配列は 1% 未満であったため、細胞外プラスミドを解析するためには、抽出された細胞外 DNA から環状 DNA のみを濃縮するステップが必要であることも確認された。別に進めた検討実験において、29 ポリメラーゼを用いて環状 DNA を優先的に増幅させることに成功していることから、今後両手法を組み合わせることで細胞外プラスミド DNA の解析を行う予定である。

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 0 件)

〔学会発表〕(計 5 件)

1. 高橋裕里香、中野椋太、宮西謙弥、梶俊郎、西田洋巳、遺伝子水平伝播への細胞外プラスミドの寄与の可能性、日本農芸化学会 2016 年度大会シンポジウム、2016 年 3 月 30 日、札幌コンベンションセンター（北海道・札幌）

2. 宮西謙弥、中野椋太、磯貝泰弘、梶俊郎、西田洋巳、高橋裕里香、富山湾海水中の微生物相・遺伝子多様性の評価のための細胞内 DNA 抽出方法の確立、日本農芸化学会 2016 年度大会、2016 年 3 月 28 日、札幌コンベンションセンター（北海道・札幌）

3. 中野椋太、宮西謙弥、磯貝泰弘、梶俊郎、西田洋巳、高橋裕里香、富山湾海底堆積物中の微生物相・遺伝子多様性の評価のための細胞内 DNA 抽出方法の確立、日本農芸化学会 2016 年度大会、2016 年 3 月 28 日、札幌コンベンションセンター（北海道・札幌）

4. 高橋裕里香、細胞外プラスミド研究の展望、第 2 回東京大学・富山県立大学生物工学セミナー、2015 年 11 月 25 日、東京大学弥生キャンパス（東京・文京区）

5. 中野椋太、宮西謙弥、山内健太、高橋裕里香、梶俊郎、西田洋巳、富山湾底泥中の細胞外プラスミドの分離、第 9 回日本ゲノム微生物学会年会、2015 年 3 月 8 日、神戸大学六甲キャンパス（兵庫県・神戸）

〔その他〕

ホームページ等

<http://researchmap.jp/yurikatakahashi>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

高橋 裕里香 (TAKAHASHI, Yurika)

富山県立大学・工学部生物工学科・助教

研究者番号：30732698