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

静岡大学 学術院 工学領域 化学バイオ工学系列　准教授　新　谷　政　己

はじめに

プラスミドやトランスポゾンといった可動性遺伝因子は，微生物の急速な進化・適応能を促し，その多様性を産み出す重要な因子である．特に，伝達性のプラスミドは，微生物細胞どうしの物理的な接触によって細胞間を移動して，薬剤耐性遺伝子や，環境中に残留する難分解性物質を代謝・分解する遺伝子を「運ぶ」ことができる．こうした可動性遺伝因子によって，遺伝子が微生物間を伝播する現象は知られていたが，どのような可動性遺伝因子が，どこで，どのように，どの程度伝播するのか，という具体的な情報については，不明な点が多かった．本研究では，東京大学生物生産工学研究センターの生物制御工学部門（現・環境保全工学部門）で単離された，ダイオキシン類化合物分解微生物の分解遺伝子を「運ぶ」，プラスミドやトランスポゾンの分布調査に端を発し，その様々な環境下における動態解析を行ってきた．

1．カルバゾール分解（*car*）遺伝子群の水平伝播を担う遺伝因子の基本機能の解明

Pseudomonas resinovorans CA10株は，ジベンゾ-*p*-ダイオキシンの構造類縁体，カルバゾール（以下CAR）を唯一の炭素源・窒素源・エネルギー源として生育可能な微生物である．本菌株は，CAR分解（*car*）遺伝子群と，CARの代謝中間体であるアントラニル酸分解（*ant*）遺伝子群を，およそ200 kbのプラスミド（pCAR1と命名）上に有する．我々がpCAR1の全塩基配列を決定した当時，他に相同性の高い配列情報がなく，pCAR1は新奇性の高いプラスミドであった．そこで，pCAR1の基本機能（複製・維持・接合伝達）を，塩基配列情報に基づく分子遺伝学的手法によって調べた．その結果，pCAR1は不和合性群IncP-7群に含まれること，pCAR1の複製・維持には*repA*, *oriV*, *par*遺伝子群が必須であること，*Pseudomonas*属細菌間を接合伝達可能なことが明らかになった．またpCAR1上の*car*・*ant*遺伝子群は，染色体等，他の複製単位に転移可能な，73 kbの大型のトランスポゾン，Tn*4676*に含まれる形で存在することも判明した．さらに，別の場所から単離された他のCAR分解菌からもpCAR1・Tn*4676*を見出したことから，これらの遺伝因子が*car*・*ant*遺伝子の水平伝播を担うことが推定された（表）．

表．CAR分解菌の分解遺伝子群を運ぶ可動性遺伝因子

CAR分解菌	可動性遺伝因子	特徴
Pseudomonas resinovorans CA10	pCAR1	IncP-7群に属する 複製・維持に*repAoriVparWASB*領域が必須 *Pseudomonas*属細菌間を接合伝達可能
P. resinovorans CA06		
Pseudomonas sp. K15	Tn*4676*	73-kbクラスIIタイプトランスポゾン pCAR1上，その他の宿主染色体上に存在
Pseudomonas sp. K22		
Pseudomonas sp. K23		
P. stutzeri OM1	Tn*4676*様	
Novosphingobium sp. KA1	pCAR3	2つのタイプの*car*遺伝子群をもつ

2．pCAR1のモデル環境・実環境試料中での動態解析

CA10株から見出された*car*・*ant*遺伝子群は，自然界の微生物間を，pCAR1やTn*4676*によって移動可能と考えられた．そこで，これらの因子が，実際の環境ではそのような挙動を示すのか，pCAR1とその宿主の動態解析を行った．まず，実環境を模したモデル土壌・環境水にCARを添加し，pCAR1の宿主を接種した後，宿主の生残性・CAR残存性・接合伝達性等を追跡した．その結果，土と水環境で宿主やpCAR1の挙動は大きく異なり，モデル土壌環境では接合伝達が検出されず，土の水分含量がCAR分解の成否を左右する主要な要因であった．一方，水環境では，宿主ごとに接合伝達の成否が異なり，二価の陽イオン（Mg^{2+}, Ca^{2+}）が接合伝達に必須なことを見出した．並行して，実環境由来の非滅菌試料を用いて動態解析を行ったところ，モデル環境試料での結果と同様，pCAR1の接合伝達は，土壌中では検出されず，河川水試料内でのみ検出された．また，得られた接合完了体の大半は，*Pseudomonas*属細菌であったが，異なる細菌目に属する*Stenotrophomonas*属細菌も含まれ，pCAR1が異目の細菌に接合伝達可能なことを初めて見出した．

3．pCAR1の異なる宿主内における挙動解析

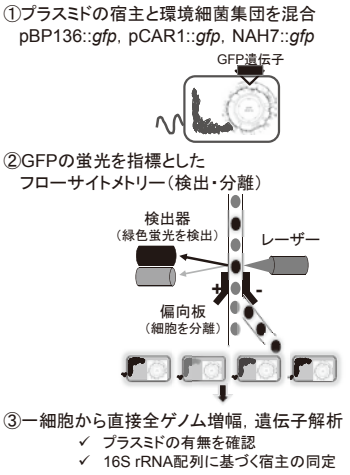
プラスミドが種々の微生物を宿主とする際には，プラスミド上・宿主染色体上の双方の遺伝子発現が，互いに影響を受け，宿主の挙動が変化すると予測された．そこで，pCAR1の異なる宿主内における挙動の比較を試みた．まずpCAR1をもつ*Pseudomonas*属に属する各宿主の表現型の違いを比較した．その結果，pCAR1をもつ*P. fluorescens* Pf0-1株では，CAR代謝時に，必要な染色体上の酵素遺伝子群の転写が誘導されず，CAR代謝の一部が途中で停止して，効率的な分解ができないことを見出した．また本宿主は，CAR存在下で培養すると（おそらく代謝の停止に伴う毒性物質の蓄積を防ぐために），pCAR1・染色体上のDNA領域の組換えを生じた菌株が出現しやすくなった．
次にゲノム配列既知の宿主*Pseudomonas*属細菌３株（*P. putida* KT2440, *P. aeruginosa* PAO1, *P. fluorescens* Pf0-1株）について，高密度マイクロアレイを用いたトランスクリプトーム比較を行った．その結果，宿主ごとに転写変動する遺伝子数は異なったものの，3株に共通して鉄獲得に関連する遺伝子の転写量が増大しており，実際に一過的な鉄欠乏を生じることが判明した．またpCAR1をもつKT2440株では，排出ポンプの発現が強く活性化し，高濃度の抗生物質に耐性を示すことも判明した．一方，pCAR1上の遺伝子は，宿主ごとに転写量の異なる遺伝子が見出され，特に核様態タンパク質（nucleotide associated proteins, 以下NAPs）をコードする遺伝子は，pCAR1が安定に維持されるのに重要な因子であることも判明した．

4．　一細胞解析手法の確立とプラスミドの宿主域の解明

２の結果から，実験室内で，培養可能な細菌を用いて行った接合実験と，未培養・難培養性細菌を多数含む環境試料を用いた接合実験とでは，結果として接合完了体の種類（＝宿主域）が変わる可能性が考えられた．そこで，pCAR1に加え，過去の研究でより広範な種類の細菌に接合伝達可能なpBP136とNAH7をモデルプラスミドとして用い，それぞれを有する供与菌と，未培養・難培養性細菌を含む，土壌試料より抽出した微生物画分を受容菌群として混合した．その後，接合完了体細胞を，培養せずに一細胞ずつ検出・分離・解析し，各プラスミドの宿主域の決定を試みた．一細胞レベルの解析手法としては，プラスミドを受け取ることでGFPが発現するシステムを利用し，蛍光を示す細胞をセルソーターで一細胞ずつ検出・分離した後，各細胞から直接全ゲノムを増幅して遺伝子解析を行った．その結果，培養行程を経ない手法によって，3種類のプラスミドいずれについても，従来は得られなかった細菌門（pBP136）や細菌網（pCAR1およびNAH7）に属する宿主を得ることに成功した（図１）．

5.　プラスミドデータベースの整備

近年，微生物のゲノム解読が急速に進むにつれ，塩基配列解読済みのプラスミドの数も急増している．一方で，各プラスミドの分類や，どの宿主にどのようなプラスミドが存在しているのか，といったデータベースの整備は不十分であった．そこで，複製開始タンパク質のアミノ酸配列に基づく分類と，接合伝達を担う一連のタンパク質群のアミノ酸配列に基づく分類とを組み合わせて，公的データベースに登録済みの，約5000のプラスミドの配列に対して適用し，全プラスミドの再分類を行った．また，宿主の系統分類学的な関係と，プラスミドの特徴（サイズ，GC含量，接合伝達性の有無）とを比較して整理した．実際に，我々が塩基配列を決定したダイオキシン類化合物分解菌がもつ，新たなプラスミドについて，本データベースを利用して調べたところ，類似のプラスミドを持つ宿主グループが明らかになった．従って，本データベースによって，今後見出される新規プラスミドの分類が容易になると予想される．また，特定の遺伝子を有するプラスミドの選別時にも有効で，実際に本データベースを活用し，上述したNAPs遺伝子のプラスミド上の分布を調べたところ，伝達性を有し，サイズの大きいプラスミドほど，複数のNAPs遺伝子を有することが判明した（図２）．



本手法で得られた接合完了体の推定属

プラスミド	接合完了体の属する種	接合完了体 従来法	接合完了体 本手法
pBP136::*gfp*	*Ensifer*	1	0
	Kaistia	2	1
	Rhizobium	3	0
	Novosphingobium	1	0
	Achromobacter	129	15
	Cupriavidus	2	0
	Acidovorax	1	5
	Delftia	0	5
	Variovorax	1	1
	Duganella	0	1
	Herbaspirillum	4	6
	Buttiauxella	35	1
	Enterobacter	1	0
	Erwinia	1	0
	Pantoea	0	1
	Raoultella	2	0
	Pseudomonas	4	3
	Stenotrophomonas	24	3
	Propionibacterium	**0**	**1**
	Chitinophaga	**0**	**1**
	Streptococcus	**0**	**1**
pCAR1::*gfp*	***Delftia***	**0**	**2**
	Pseudomonas	105	48
	Stenotrophomonas	**0**	**1**
NAH7::*gfp*	***Delftia***	**0**	**1**
	Pseudomonas	90	16

太字：本手法でプラスミドの宿主として新たに得られた接合完了体

図１．一細胞解析に基づくプラスミドの宿主域の決定

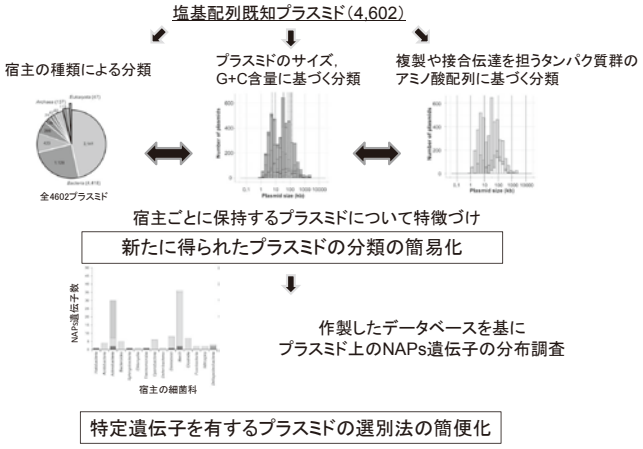


図２．プラスミドデータベースの整備と利用

おわりに

本研究では，プラスミドを中心とした，可動性遺伝因子の異なる環境・宿主内における動態解析を行い，環境細菌間における可動性遺伝因子の挙動を左右する，重要な環境因子・宿主因子・プラスミド上の因子を発見してきた．また，既知のプラスミドであっても，従来知られていたよりも広範囲の細菌間を移動し，遺伝子の授受を行っていることが示された．現在は，本研究で用いた手法やデータベースを活用して，好気環境から，微好気・嫌気環境へと対象を広げて，新たなプラスミドを探索するとともに，その挙動について研究を行っている．

謝　辞　本研究は，東京大学生物生産工学研究センター・環境保全工学部門（旧生物制御工学部門），理化学研究所バイオリソースセンター・微生物材料開発室と，静岡大学工学部化学バイオ工学科にて行われたものです．本研究に携わる機会を与えて頂き，ご指導を賜りました東京大学名誉教授 大森俊雄先生，同名誉教授 山根久和先生（現・帝京大学理工学部教授）に心から感謝申し上げます．特に，学生の頃から今日に至るまで，公私にわたり，いつも親身にご指導ご鞭撻を賜りました，東京大学生物生産工学研究センター教授 野尻秀昭先生に深く感謝申し上げます．また，理化学研究所で本研究を継続・発展させる機会をお与え頂き，貴重なご助言を賜りました，微生物材料開発室室長・大熊盛也先生に深く感謝申し上げます．静岡大学に異動後，日頃より温かいお言葉とご助言を頂戴しました，同教授，金原和秀先生に厚く御礼申し上げます．また，共同研究者として，貴重なご意見・ご助言を賜りました，東京大学生物生産工学研究センター准教授 岡田憲典先生，同助教 水口千穂先生，産業技術総合研究所 羽部浩先生，東北大学大学院生命科学研究科教授 津田雅孝先生，同准教授 永田裕二先生，同助教 大坪嘉行先生，富山県立大学教授 西田洋巳先生，同助教 高橋裕里香先生，宮崎大学農学部准教授 井上謙吾先生，秋田県立大学助教 宮腰昌利先生に厚く御礼申し上げます．お名前を挙げつくせませんが，本研究にご尽力頂きました東京大学生物生産工学研究センター環境保全工学部門と，静岡大学大学院総合科学技術研究科工学専攻化学バイオ工学コース金原・新谷研究室の修了生，在学生，研究補助員の方々に感謝申し上げます．
最後になりましたが，本奨励賞にご推薦下さいました日本農芸化学会中部支部長・堀尾文彦先生（名古屋大学大学院生命農学研究科教授）に厚く御礼申し上げます．