

環境微生物間における可動性遺伝因子の動態に関する研究

新谷 政己（静岡大学学術院工学領域）

shintani.masaki@shizuoka.ac.jp

はじめに

プラスミドやトランスポゾン, integrative and conjugative element (ICE) 等は可動性遺伝因子とよばれ, 異なる微生物細胞間を, 世代を経ずに動き回ることが可能である. 可動性遺伝因子上には, 抗生物質や重金属に対する耐性遺伝子や, 物質代謝遺伝子が含まれることが多く, これらを受け取った微生物 (これらを宿主とよぶ) に新たな形質を与える. このため, 可動性遺伝因子とその伝播は, 微生物の急速な進化・適応能を促進する原動力の一つと考えられている. 近年, 複数の抗生物質に対する耐性をもつ多剤耐性菌による感染症の被害が世界的に深刻化しており, 世界保健機構も警鐘を鳴らしている. これは, ヒトや家畜に対する抗生物質の不適正な利用が原因と考えられているが, 耐性菌の出現自体には可動性遺伝因子も大きく寄与している. こうした因子の環境中における動態に関しては, 20 年以上前から研究がなされているが, 未だ不明な点が多い.

我々は, 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」可動性遺伝因子について基本機能を明らかにするとともに, 様々な環境条件下において, 可動性遺伝因子自体や, それをもつ宿主がどのような挙動を示すのかを明らかにし, その動態について研究してきた.

1. ダイオキシン類化合物分解遺伝子群をもつ可動性遺伝因子の機能とその分布の解明

東京大学生物生産工学研究センターで単離された *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 (CAR) を唯一の炭素源・窒素源・エネルギー源として生育できる細菌である. CA10 株の CAR 分解遺伝子群 (*car*) は, 約 200 kb のプラスミド pCAR1 上に存在する. 我々は pCAR1 の全塩基配列を決定し, その複製・維持・接合伝達能 (基本機能) を塩基配列情報に基づいて調べた. その結果, pCAR1 は不和合性群の IncP-7 群に属し, その複製・維持には *repA*, *oriV*, *par* 遺伝子群が必須なことが, *Pseudomonas* 属細菌間を接合伝達によって移動可能なことが明らかになった^{1,2,3}. また pCAR1 上の *car* 遺伝子群は, 染色体等, 他の複製単位に転移可能な 73 kb のトランスポゾン, Tn4676 に含まれる形で存在することも判明した^{1,3}. さらに, 別の場所から単離された複数の CAR 分解菌から pCAR1・Tn4676 様の可動性遺伝因子を見出した^{3,4}. また我々は CA10 株の他にも, ダイオキシン類化合物, polychlorinated biphenyl の分解菌 *Comamonas testosteroni* TK102 株および *Geobacillus* sp. JF8 株の全ゲノム解読を行い^{5,6}, 各分解遺伝子群が ICE やプラスミド上に存在することを示した. 従って, *car* をはじめとするダイオキシン類化合物の分解遺伝子群は, 可動性遺伝因子によって水平伝播することが推定された.

2. pCAR1 の異なる宿主どうしの動態比較

可動性遺伝因子がその宿主内で複製・維持されるには, 宿主染色体上の遺伝子産物が必要であるため, 可動性遺伝因子と, 宿主染色体上の遺伝子発現は, お互いに影響を及ぼしあうと予測される. そこで, プラスミド pCAR1 をもつ異なる *Pseudomonas* 属細菌を準備し, 各宿主の表現型の違い, トランスクリプトームの違いを比較した. その結果, プラスミドと宿主染色体の遺伝子発現は, 互いに影響を及ぼしあう, その表現型 (CAR 代謝能やプラスミドの接合伝達頻度) は宿主

ごとに変わることが明らかになった²⁷. ゲノム配列が既知の3種の菌株 (*P. putida*, *P. aeruginosa*, *P. fluorescens*) について、pCAR1 をもつ場合と、もたない場合のトランスクリプトームを、タイリングアレイを用いて比較した (図1). その結果、宿主がプラスミドをもつ際に、発現量を変化させる宿主染色体上の遺伝子数やその種類は、宿主ごとに異なっていた^{8,9}. 興味深いことに、用いた3種類の宿主に共通して鉄獲得に関連する遺伝子の転写量が増大し、一過的な鉄欠乏を生じることが判明した. これは、pCAR1 上にコードされる、鉄原子を含む CAR 分解酵素が構成的に発現していることが原因の一つであった⁸. また、*P. putida* と *P. fluorescens* の2株でプロフェージと推定される領域上の遺伝子の発現量が増大していることや、*P. putida* では排出ポンプの発現が強力に活性化し、高濃度の抗生物質にも耐性を示すことも判明した^{8,9}. 一方、pCAR1 上の遺伝子については、核様態タンパク質 (nucleotide associated proteins, NAPs) をコードする遺伝子の発現が、異なる宿主で転写量が大きく変わっていた¹⁰. さらに pCAR1 上には、NAPs 遺伝子が3つ存在し、これらのタンパク質が、宿主内における pCAR1 の安定な維持のために重要な因子である

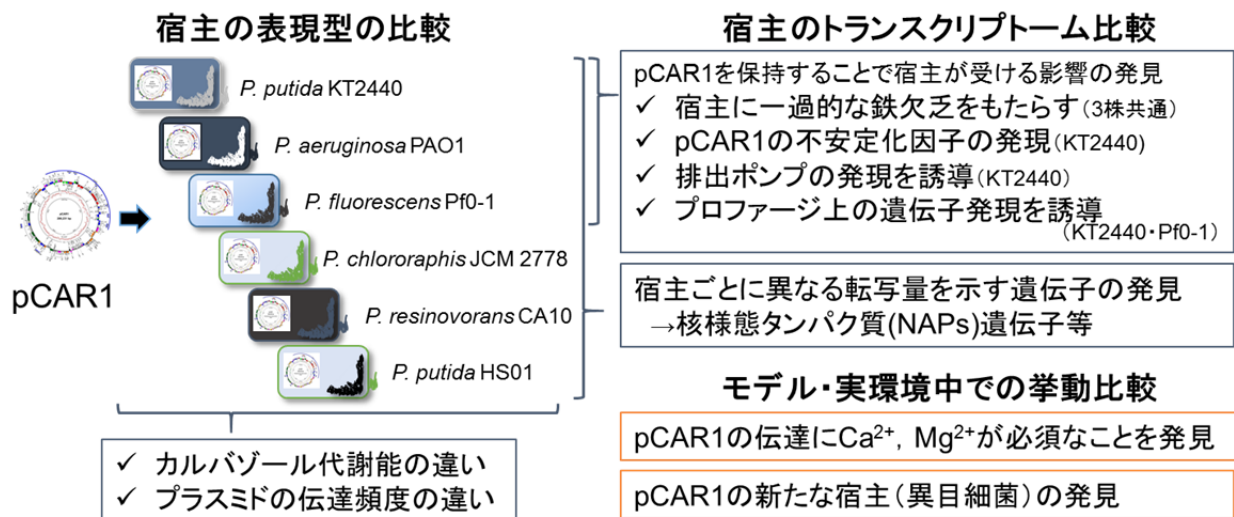


図1. pCAR1の異なる環境条件における挙動の比較解析

ことも判明した¹¹.

3. pCAR1 のモデル環境・実環境試料中での動態解析

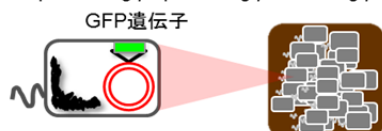
car 遺伝子群は、pCAR1 や Tn4676 によって水平伝播していることが示唆されたため、実際の環境における pCAR1 とその宿主の動態解析を試みた (図1). 変化する環境条件を減らし、再現性を得やすくするために、実環境を模した滅菌土壌・環境水に CAR を添加したモデル環境試料を調製し、pCAR1 の宿主と、その他の細菌を接種後、各菌株の生残性・CAR 残存性・pCAR1 の接合伝達性を時系列ごとに追跡した. その結果、宿主の種類によって CAR の分解性や pCAR1 の挙動は大きく異なること、土壌と水環境においても挙動が異なることが判明した^{12,13}. 特に、モデル土壌環境では接合伝達を検出されず、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¹². 一方、水環境では、二価の陽イオン (Ca²⁺, Mg²⁺) が接合伝達に必要なことを見出した¹². また、実際の環境由来の非滅菌試料を用いて、同様に動態解析を行ったところ、モデル環境試料での結果と比較的によく一致し、特に pCAR1 の接合伝達は、土壌中では検出されず、河川水試料でのみ検出できた. 得られた接合完了体の大半は *Pseudomonas* 属細菌であったが、興味深いことに、異なる細菌目に属する *Stenotrophomonas* 属細菌も含まれていた¹⁴.

4. 培養法に依存しない手法によるプラスミドの宿主域の解明

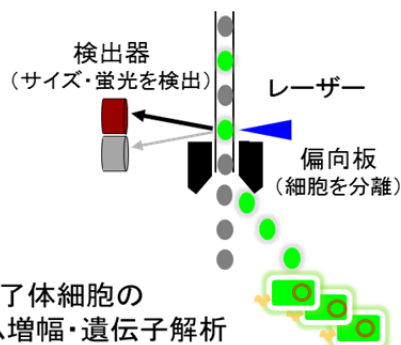
可動性遺伝因子が、どのような種類の微生物を宿主とするのか、という宿主域の情報は、その挙動を理解する上で重要である。しかし従来の研究の多くは、培養可能な微生物を用いて実験室内で行った接合実験の結果に基づいており、実環境中には、未培養・難培養性微生物が多数生息することを考慮すると、既存の宿主域の情報は限定的であると考えられた。そこでプラスミドの接合完了体細胞を、培養せずに一細胞ずつ検出・分離・解析することで、これまで得られなかった微生物も含めた宿主域の決定を試みた。接合完了体の検出は、プラスミドの伝達後にのみ発現する緑色蛍光タンパク質 GFP の蛍光を指標に行い、セルソーターで一細胞ずつ検出・分離した後、各細胞の全ゲノムを増幅して遺伝子解析を行った。プラスミドは、pCAR1 と、より広い宿主域をもつとされる pBP136 と NAH7 を用いた。その結果、従来知られるよりも、広範の門や網に

① プラスミドをもつ供与菌と環境由来の細菌集団を混合

プラスミド: pBP136::gfp, pCAR1::gfp, NAH7::gfp



② 接合完了体の緑色蛍光を指標にセルソーターにて検出・分離



③ 接合完了体細胞の全ゲノム増幅・遺伝子解析 プラスミドの有無をPCRで確認 16S rRNA配列の解読・宿主の同定

取得した接合完了体の種類(属レベル)

プラスミドの種類	接合完了体の属する種	接合完了体数	
		培養法	本研究の手法
pBP136::gfp	<i>Ensifer</i>	1	0
	<i>Kaistia</i>	2	1
	<i>Rhizobium</i>	3	0
	<i>Novosphingobium</i>	1	0
	<i>Achromobacter</i>	129	15
	<i>Cupriavidus</i>	2	0
	<i>Acidovorax</i>	1	5
	<i>Delftia</i>	0	5
	<i>Variovorax</i>	1	1
	<i>Duganella</i>	0	1
	<i>Herbaspirillum</i>	4	6
	<i>Buttiauxella</i>	35	1
	<i>Enterobacter</i>	1	0
	<i>Erwinia</i>	1	0
	<i>Pantoea</i>	0	1
pCAR1::gfp	<i>Raouitella</i>	2	0
	<i>Pseudomonas</i>	4	3
	<i>Stenotrophomonas</i>	24	3
	<i>Propionibacterium</i>	0	1
	<i>Chitinophaga</i>	0	1
NAH7::gfp	<i>Streptococcus</i>	0	1
	<i>Delftia</i>	0	2
NAH7::gfp	<i>Pseudomonas</i>	105	48
	<i>Stenotrophomonas</i>	0	1
NAH7::gfp	<i>Delftia</i>	0	1
	<i>Pseudomonas</i>	90	16

赤字は本研究で新たに得られたプラスミドの宿主の属

図2. 培養法に依存しないプラスミドの宿主域の解析手法

属する細菌細胞を宿主として得ることに成功した¹⁵ (図2)。

5. 公的データベース上に登録された全塩基配列解読済プラスミドの再分類

ここ数年の新たなシーケンサーの登場とともに、微生物のゲノム解読が急速に進むにつれ、塩基配列が解読されたプラスミドが次々に公的なデータベースに登録されている。一方、それぞれのプラスミドが、どのような微生物から見出され、他のプラスミドとどの程度共通点があるのか、あるいはないのか、といった比較はあまりなされてこなかった。そこで、多くのプラスミドの複製に必須な、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、約 4600 のプラスミドの配列 (2014 年時点) に対して適用し、全プラスミドの再分類を行った。それに合わせて、プラスミドの宿主の種類ごとに、プラスミドの特徴 (サイズ, GC 含量, 接合伝達性の有無) を示し、その違いを比較して整理した¹⁶。この結果、遺伝子操作系を導入する際、利用可能なプラスミド候補の検索がしやすくなり、新たに見出したプラスミドについても、類似のプラスミドの検索がしやすくなった。

さらに、pCAR1 上で見出された NAPs 遺伝子が、他のプラスミドにどの程度分布しているのかを検索し、各プラスミドの性質を比較したところ、サイズの大きいプラスミドほど、また、伝達能をもつと推定されるプラスミドほど、複数の NAPs 遺伝子をもつ傾向が高いことが判明した¹⁷。

おわりに

本研究では、微生物の形質を大きく変えうる可動性遺伝因子が、様々な環境・宿主内でどのような挙動を示すのかを異なる視点から調べ、その動態に大きく影響する、重要な環境由来の因子や宿主因子、また可動性遺伝因子自体がもつ因子について発見してきた。こうした知見は、可動性遺伝因子の環境中における挙動を予測するのに重要であるとともに、これらの因子を介した抗生物質耐性菌の蔓延を防ぐ手法にもつながると期待される。現在は、本研究で確立した手法や、再分類したデータベースを利用して、好気環境のみならず、微好気・嫌気環境に生息する微生物からの新たな可動性遺伝因子の取得や、それらの動態解析を行っている。

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。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）、同教授 野尻秀昭先生、理化学研究所 微生物材料開発室室長・大熊盛也先生、静岡大学大学院工学領域 教授、金原和秀先生に心から厚く感謝申し上げます。ご支援を賜りました諸先生方、研究員、卒業生、在学生、共同研究者の方々に深く感謝申し上げます。最後に本賞にご推薦いただきました、公益社団法人日本農芸化学会会長・植田和光先生に厚く御礼申し上げます。

引用文献

1. Shintani *et al.*, 2006. *Appl. Environ. Microbiol.*, 72:3206-3216.
2. Shintani *et al.*, 2005. *Biotechnol. Lett.*, 27:1847-1853.
3. Shintani *et al.*, 2005. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 67:370-382.
4. Shintani *et al.*, 2003. *Biotechnol. Lett.*, 25:1255-1261.
5. Fukuda *et al.*, 2014. *Genome Announc.*, 2: doi:10.1128/genomeA.00865-14.
6. Shintani *et al.*, 2014. *Genome Announc.*, 2: doi:10.1128/genomeA.01213-13.
7. Takahashi *et al.*, 2009. *Appl. Environ. Microbiol.* 75:3920-3929.
8. Shintani *et al.*, 2010. *Environ. Microbiol.*, 12:1413-1426.
9. Takahashi & Shintani *et al.*, 2015. *Environ. Microbiol.*, 17:134-155.
10. Shintani *et al.*, 2011. *Plasmid*, 66:85-92.
11. Suzuki-Minakuchi *et al.*, 2015. *Appl. Environ. Microbiol.*, 81:2869-2880.
12. Shintani *et al.*, 2008. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 80:485-497.
13. Shintani *et al.*, 2010. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 74:343-349.
14. Shintani *et al.*, 2008. *Biotechnol. Lett.*, 30: 117-122.
15. Shintani *et al.*, 2014. *Appl. Environ. Microbiol.*, 80:138-145.
16. Shintani *et al.*, 2015. *Front. Microbiol.*, 6:242.
17. Shintani *et al.*, 2015. *Plasmid*, 80:32-44.