

プラスミド保持に伴う負荷を軽減化する宿主染色体因子

Host Chromosomal Factor Reducing Plasmid Fitness Cost

能登 優¹, 高瀬 識之¹, 高橋裕里香¹, 松本 貴嗣², 吉川 博文², 土金 恵子³,
細山 哲³, 藤田 信之³, 岡田 憲典¹, 山根 久和¹, 野尻 秀昭^{1*}
SUGURU NOTO, NORIYUKI TAKASE, YURIKA TAKAHASHI, TAKASHI MATSUMOTO, HIROFUMI YOSHIKAWA, KEIKO TSUCHIKANE,
AKIRA HOSOYAMA, NOBUYUKI FUJITA, KAZUNORI OKADA, HISAKAZU YAMANE and HIDEAKI NOJIRI

¹ 東京大学生物生産工学研究センター 〒113-8657 東京都文京区弥生 1-1-1

² 東京農工大学生物資源ゲノム解析センター 〒156-8502 東京都世田谷区桜丘 1-1-1

³ 独立行政法人 製品評価技術基盤機構 〒151-0066 東京都渋谷区西原 2-49-10

* TEL: 03-5841-3064 FAX: 03-5841-8030

* E-mail: anojiri@mail.ecc.u-tokyo.ac.jp

¹ Biotechnology Research Center, University of Tokyo, 1-1-1 Yayoi, Bunkyo-ku, Tokyo 113-8657, Japan

² Genome Research Center, NODAI Research Institute, Tokyo University of Agriculture,
1-1-1 Sakuragaoka, Setagaya-ku, Tokyo 156-8502, Japan

³ National Institute of Technology and Evaluation, 2-49-10 Nishihara, Shibuya-ku, Tokyo 151-0066, Japan

キーワード : pCAR1, *Pseudomonas*, プラスミドの負荷

Key words: pCAR1, *Pseudomonas*, fitness cost

(原稿受付 2012年10月23日 / 原稿受理 2012年11月20日)

1. はじめに

細菌は様々な環境に適応し、他の多くの生物が生存できない環境下でも生育することが可能である。このような細菌の適応力の原因の一つとして、可動性遺伝因子 (mobile genetic elements; MGEs) を介した新規遺伝子の獲得、即ち“遺伝子の水平伝播”が挙げられる。MGEs としては、バクテリオファージ、トランスポゾン、接合伝達性プラスミド等が知られており⁹⁾、中でもプラスミドは、細菌の細胞内で宿主染色体とは独立して自律的に複製されるレプリコンであるという点で染色体に挿入されて保持される他の MGEs とは異なっている²³⁾。

プラスミドは分子生物学におけるベクターとして組換え生物による有用物質生産に利用されたり、本来宿主が保持しない物質代謝能を与えることで各種環境汚染物質の分解を促進する事もある一方、数多くの薬剤に対する耐性を宿主に付与して院内感染の原因となる等、我々にとって有益にも害にもなり得る存在であるといえる^{6,18)}。そこで、プラスミドにコードされた形質が多様な細菌を含む集団中での程度顕在化するかを理解する事を目的として、プラスミド保持株の微生物集団中における維持・減少に関する研究が行われるようになった。

2. プラスミドが宿主に与える“負荷”

過去の研究において、プラスミドが与える形質により

宿主の生育が有利にならない環境中では、プラスミド保持が負荷となり、宿主間の競合において不利になるとの報告が数多くなされている。プラスミドのモデルとしては、ベクターとして広く利用される pBR 系、pUC 系のプラスミドなどや、R1, RP4 を始めとする各種多剤耐性プラスミド、pB10 など広宿主域を有する IncP-1 群プラスミド等がよく用いられており、これらのプラスミドを保持させた際に宿主の生育遅延が起こる事や、fitness cost が増加すること (プラスミド非保持株などとの競合培養において淘汰されやすくなること) が多く報告されている^{7,9,11)}。一方で、プラスミドを保持させたまま長期培養する事で、その様な生育遅延が回復したり、逆にプラスミド非保持株との競合培養において優占化する現象が観察されたといった研究例も多く存在する^{1-5,14,21)}。

しかしながら、現在に至るまで、上記の様な実験において“負荷を軽減した直接的な原因因子は何か”という問いについては見解が不足していると言わざるを得ない。すなわち、薬剤耐性遺伝子など特定の遺伝子の機能を失わせる事で宿主の生育負荷が軽減されたという報告^{3,5,11,17)} や、宿主内での安定性などプラスミドの性質の一面のみに注目した報告^{8,21)} は存在するものの、「プラスミド保持菌が、菌体集団中で生残するために重要な原因因子」を特定した研究は未だ行われていない。そこで本研究では、そのような原因因子を具体的に特定する事、また更に原因因子の機能解析まで行う事を目標としている。

3. カルバゾール分解プラスミド pCAR1

筆者らの研究室では、土壌、活性汚泥、河川水などの環境から含窒素多環芳香族化合物カルバゾールの資化菌を複数単離し、環境汚染物質分解菌のモデルとして解析を行ってきた。その中の1つである *Pseudomonas resinovorans* CA10 株は1993年に都市下水処理場の活性汚泥より単離され¹⁶⁾ 詳細な解析が行われてきた株であり¹⁵⁾、2001年にはカルバゾール分解を担う遺伝子クラスターはCA10由来のプラスミド pCAR1 上に存在することが明らかになった。pCAR1 の全塩基配列は決定済みであり、複製・分配・接合伝達能といったプラスミドの基本的な機能を司る遺伝子群や、pCAR1 が自己伝達能を有し、IncP-7 不和合性群に属する事などが明らかになっている^{13,19,22)}。なお、pCAR1 の宿主域として現在までに *Pseudomonas* 属細菌と *Stenotrophomonas* 属細菌に保持される事が確認されている²⁰⁾。

4. pCAR1 が *Pseudomonas* 属細菌に与える負荷

本研究ではまず、pCAR1 が3種の *Pseudomonas* 属細菌 (*P. putida* KT2440 株, *P. aeruginosa* PAO1 株, *P. fluorescens* Pf0-1 株) に与える負荷を定量した。

各々の宿主について、pCAR1 保持株・非保持株を等量混合し、コハク酸を唯一の炭素源とする液体培地 (SUC 培地) で24時間ごとに植継ぎを繰り返しながら、合計144時間の競合培養に供した (competition assay)。競合培養開始0時間後、48時間後、96時間後、144時間後に各培養液の一部を段階希釈し、LBプレートに塗布する事で全菌体数を計数すると共に、プラスミド保持菌数をコロニーハイブリダイゼーションにより検出・計数し、プラスミド保持株の比率変化を観測した。コロニーハイブリダイゼーションでは、pCAR1 上に存在し複製開始タンパク質をコードする *repA* を含む領域に対

して設計したプローブを用いた。Fitness の定量化は、「各経時点におけるプラスミド保持菌数」を「培養開始直後のプラスミド保持菌数」で除した値である competitive index (CI) を算出することで行った。

その結果、培養開始144時間後の CI は KT2440 株で 0.0010 ± 0.0007 、PAO1 株で 0.043 ± 0.007 、Pf0-1 株で 0.19 ± 0.03 であり、pCAR1 保持菌が集団中で淘汰されること、及びその度合いは宿主によって異なる事が明らかになった。

5. 試験管内進化実験

pCAR1 保持に伴う負荷の詳細な原因を探るという観点から、「pCAR1 を保持するにも関わらず、生育負荷を示さない様な自然変異が蓄積した株」の取得を目標とし、pCAR1 保持による負荷が最も顕著であった *P. putida* KT2440 株をモデル宿主に用い以下の実験を行った。

まずプラスミド保持株・非保持株を用いた competition assay を行った後、集団中で生残したプラスミド保持株のみを選抜し、新たに用意したプラスミド非保持株との competition assay に再度供する過程を計5 cycle 繰り返す事で、プラスミド保持株を約350世代長期継代培養した。また、各 cycle の0時間後と144時間後で全菌体数及びプラスミド保持菌数を計数し、CI を算出した (図1)。

なお、本実験では各サイクル毎にプラスミド保持株・非保持株の混合培養液からプラスミド保持株のみ選抜する過程が存在する為、アントラニル酸 (AN) 添加時のみカナマイシン (Km) 耐性遺伝子を発現する様な遺伝子カセットを pCAR1 上の遺伝子である ORF98, ORF99 の間に組み込み、新たにプラスミドを作製した (図2)。これにより、薬剤耐性遺伝子の恒常的な発現による競合培養時の生育負荷への影響を押さえ、必要なときに菌体集団中からプラスミド保持株のみ効率良く選抜すること

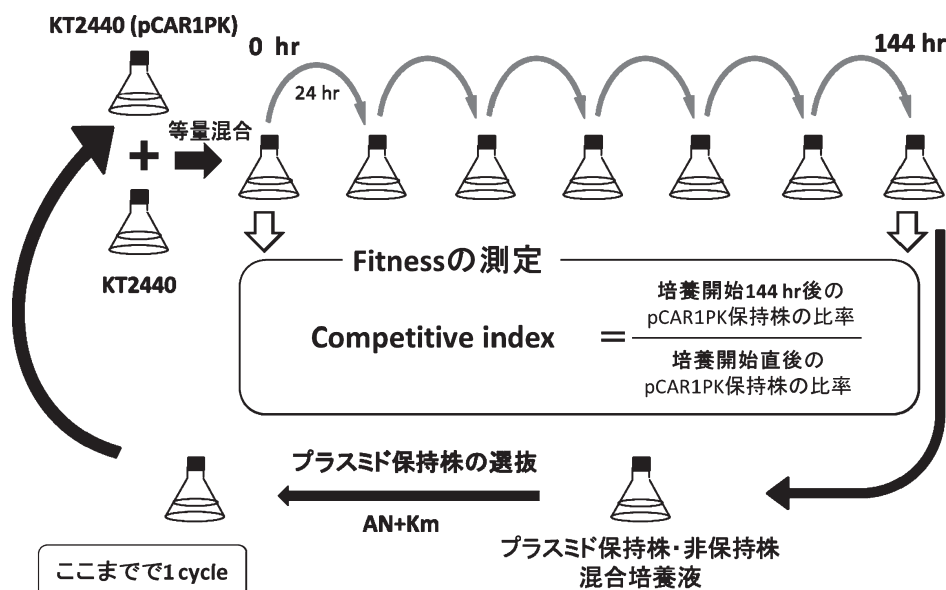


図1. 試験管内進化実験の流れ。

上図の過程を1 cycle として、KT2440 (pCAR1PK) 株を計5 cycle, 約350世代長期培養に供した。

が可能となった。この選抜用プラスミドを pCAR1PK と名付けた。

各 cycle 毎に CI を算出した結果、興味深いことに cycle を経る毎にプラスミド保持株の fitness が向上して

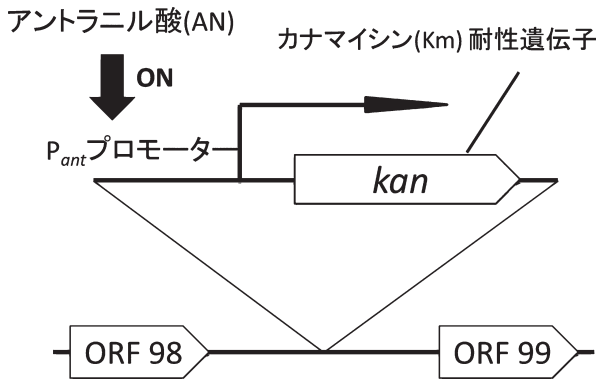


図2. 選抜用プラスミド pCAR1PK 作製の為に pCAR1 上に挿入された遺伝子カセット。
pCAR1 上の遺伝子である ORF98, ORF99 間に上図のような遺伝子カセットを挿入した。なお、遺伝子カセットの挿入により fitness に影響が無い事は確認済みである。

いく事が明らかとなった。5 cycle 終了時にはプラスミド保持株が逆に集団中で優占化するという現象が観察された (図3)。そこで、5 cycle 終了時の混合培養液からプラスミド保持株を単離し、その内の2株を各々 *P. putida* a501, *P. putida* a502 (以下 a501, a502 と呼ぶ) と命名し、以降詳細に解析する事にした。

また、同様の実験を再度独立して行った結果、やはり cycle を経る毎に fitness の向上が観察され、5 cycle 終了時には集団中で 80.8% まで (CI は 1.56 ± 0.28) 優占化した。そこで1回目の実験同様の作業により、*P. putida* b501, *P. putida* b502 (以下 b501, b502 と呼ぶ) を単離した。しかし、CI が急上昇するタイミングや5 cycle 終了時の集団中での比率など、1回目の実験とは異なる点も見られた為、a501, a502 の2株と b501, b502 の2株では異なる変異が蓄積した可能性も考えられた。

さらに、単離した自然変異株の fitness が実際に向上しているかを確認するために、各自然変異株と *P. putida* KT2440 株間で competition assay を行ったところ、競合培養開始 144 hr 後における a501, a502, b501, b502 各株の CI はそれぞれ 2.30 ± 0.33 , 1.82 ± 0.09 , 1.97 ± 0.65 , 1.56 ± 0.34 となり、これら自然変異株4株はやはり単菌としても fitness が向上している事が明らかになった。

上記の結果を受け、進化実験の“親株”と“自然変異株”間の比較、また自然変異株 a501, a502, b501, b502 間の比較により、pCAR1 保持に伴う負荷の原因因子の特定が可能になると判断された。

6. 自然変異株が保持するプラスミドの解析

自然変異株においてプラスミドの負荷が軽減された原因として、プラスミドの一部領域の欠失により、プラスミド自体のサイズが大幅に減少した事が考えられた。そこで、pCAR1 上の4つの領域 (*antR*, *carF*, *trhN*, ORF146) に対して設計されたプライマーセットを用いて PCR を行い、増幅断片の有無を確認した。その結果、自然変異株4株全てにおいて *carF* を含む一部領域について欠失している事が明らかになった。pCAR1 上のカルバゾール分解遺伝子群である *car* 遺伝子群は ISPre1 に挟まれており、*P. putida* KT2440 (pCAR1) 株を SUC 培地で培養した結果、相同性組み換えによって *car* 遺伝子群のみが脱落した pCAR1Δ1 が出現した事が当研究室で過去報告されている。そこで、1回目の試験管内進化実験の3 cycle 後、4 cycle 後、5 cycle 後混合培養液から6株ずつ単離し、それら計18株について、IS 配列に挟まれた領域の有無を PCR で確認した結果、3 cycle 以降 *car* 遺伝子群を脱落していた事が明らかになった。この結果は、*car* 遺伝子群の脱落が fitness の向上に寄与した可能性を示唆しており、その影響を定量するため、当研究室で以前単離された、*car* 遺伝子群欠失 *P. putida* KT2440 (pCAR1Δ1) 株を用い、KT2440 株との competition assay に供した。その結果、CI は 0.0052 ± 0.0015 となり、KT2440 (pCAR1PK) 株と比べ fitness の大幅な向上は確認されず、自然変異株である a501 株 (同 2.30 ± 0.33) などの値を大きく下回った。このため、*car* 遺伝子群は fitness 向上に影響する因子では無い事が示唆された。

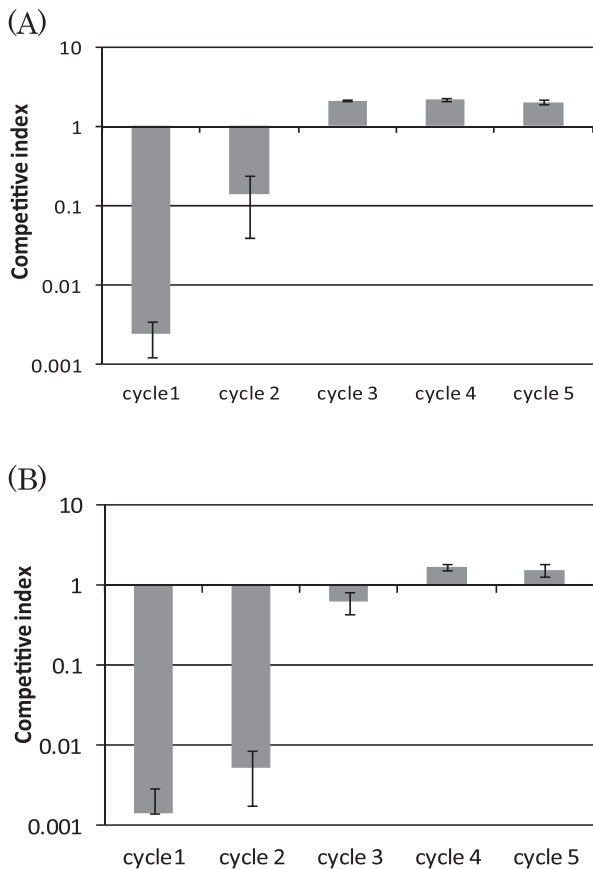


図3. KT2440 (pCAR1PK) 株の長期培養に伴う淘汰されやすさの変化。

(A) 自然変異の蓄積に伴う淘汰されやすさの変化。Y 軸の値は各サイクル毎の 144 hr 後の competitive index をエラーバー (標準偏差) と共に示した。検出は3連以上で行った。(B) (A) と同様の実験を再度行った結果。

7. 原因因子はプラスミド上に存在するか、 宿主染色体上に存在するか

Fitness 向上の原因因子がプラスミド上と宿主染色体上のどちらに存在するかを調べるため、親株 KT2440 (pCAR1PK) と上記 4 種の自然変異株の間でプラスミ

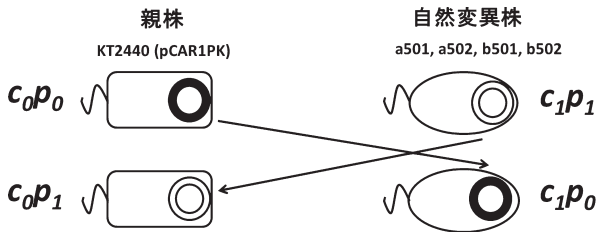


図 4. 親株・自然変異株間での宿主とプラスミドの入れ替え株作製の概略。

図中の C は宿主染色体を、P はプラスミドを表す。また 0 は親株由来、1 は進化株由来であることを表す。

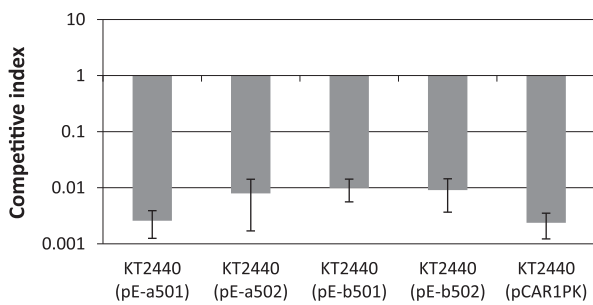


図 5. c_0p_1 株の淘汰されやすさ。

a501, a502, b501, b502 株それぞれについて c_0p_1 株を作製し、KT2440 株との competition assay に供した結果を示す。なお、図中の pE-a501 は a501 株由来のプラスミドを表す。開始 144 hr 後の competitive index をエラーバーと共に示した。検出は 3 連以上で行った。KT2440 (pCAR1PK) 株 (c_0p_0) の結果と共に示した。

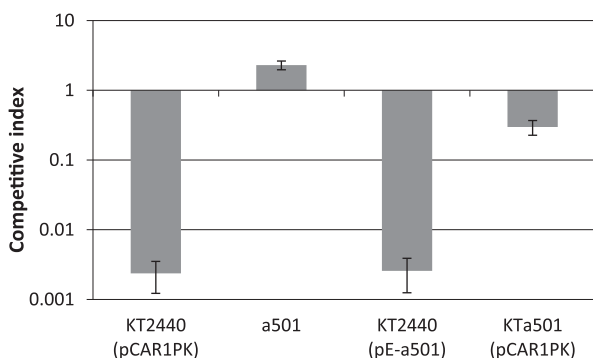


図 6. a501 株における c_0p_0 , c_1p_1 , c_0p_1 , c_1p_0 株の淘汰されやすさの比較。

a501 株に関して作製した c_1p_0 株について、KT2440 株との competition assay に供した結果を示す。なお、図中の KTa501 は a501 株由来の宿主を表す。開始 144 hr 後の competitive index をエラーバーと共に示した。検出は 3 連以上で行った。KT2440 (pCAR1PK) 株 (c_0p_0)、a501 株 (c_1p_1)、KT2440 (pE-a501) 株 (c_0p_1) の結果と共に示した。

ド・宿主を入れ替えた株を作製し、各々について KT2440 株と competition assay を行い fitness を定量化することにした。簡略の為、自然変異株由来の宿主染色体とプラスミドをそれぞれ c_1 と p_1 、親株由来の宿主染色体とプラスミドをそれぞれ c_0 と p_0 と表記する (図 4)。

まず、自然変異株 4 株について c_0p_1 を作製し、fitness を測定した。その結果、competition assay 開始 144 時間後に CI は各々 0.01 程度若しくはそれ以下となった (図 5)。一方、a501 株について c_1p_0 を作製し、fitness を測定したところ、CI は 0.30 ± 0.07 となった (図 6)。他の自然変異株 3 株についての c_1p_0 は現在作製中であるものの、a501 株に関する結果より、宿主染色体上に存在する遺伝因子がプラスミド保持株の fitness 向上に大きく寄与することが示唆された。

8. pCAR1 保持に伴う負荷を軽減する遺伝因子の特定

pCAR1 保持に伴う負荷の具体的な遺伝因子の探索の為に、親株 c_0p_0 と自然変異株 c_1p_1 株の全ゲノム配列情報を取得し、比較した。全ゲノムシーケンスには HiSeq1000 (Illumina) を用い、paired-end 法で獲得断片の両末端 100 bp の配列を決定した。得られた配列データを用い、DDBJ/EMBL/GenBank 上に登録されている *P. putida* KT2440 (NC_002947.3, 6,181,863 bp) と pCAR1 (AB474758.1, 200231 bp) の塩基配列情報をリファレンス配列として、(i) BWA によるマッピング (ii) MAQ によるマッピング (iii) velvet を用いたアセンブル処理の後、得られたコンティグを用いて MUMmer3 によってマッピングという 3 種の方法でリシーケンスを行った。その結果、3 種のマッピング方法全てにおいて自然変異株 4 株のいずれかに存在し親株には存在しない変異として、16 ヶ所の SNPs 及び 2 ヶ所のフレームシフトが検出された。また、これらは全て宿主染色体上の変異であり、fitness 向上因子が宿主染色体上に存在するというこれまでの実験結果に合致するものであった。それらの変異の中でも、*mexT* 遺伝子内の変異は自然変異株 4 株全てに存在しており、目的の原因因子である可能性が高いと考えられた。*P. putida* KT2440 株の *mexT* がコードする MexT は 304 アミノ酸からなるタンパク質で、*P. aeruginosa* PAO1 株の MexT とアミノ酸レベルで 84% の相同性を示す。PAO1 株の MexT は転写調節因子群である LysR ファミリータンパク質の 1 種であり¹²⁾、代表的な働きとして RND 型多剤排出トランスポーターをコードする *mexEF-oprN* の転写誘導を行う事が知られている¹⁰⁾。それに加え、*mexEF-oprN* とは独立して複数の遺伝子の転写制御を行う事も知られている²⁴⁾。

今後は *mexT* を始め、同定された各遺伝子における変異を親株に人工的に導入した株を作製し、その株を用いて fitness が向上するかを確認する事で、原因因子の具体的な特定を行っていく予定である。また、原因因子が特定された場合、モデルプラスミドやモデル宿主を変えて実験を行うことにより、“プラスミドの負荷を軽減する因子”に関する一般性を観察していく事を予定している。

文 献

- 1) Bouma, J.E. and R.E. Lenski. 1988. Evolution of a bacteria/plasmid association. *Nature* 335: 351–352.
- 2) Changey, F., M. Devers-Lamrani, N. Rouard, and F. Martin-Laurent. 2011. *In vitro* evolution of an atrazine-degrading population under cyanuric acid selection pressure: Evidence for the selective loss of a 47 kb region on the plasmid ADP1 containing the *atzA*, *B* and *C* genes. *Gene*. 490: 18–25.
- 3) Dahlberg, C. and L. Chao. 2003. Amelioration of the cost of conjugative plasmid carriage in *Escherichia coli* K12. *Genetics* 165: 1641–1649. Thomas, C.M. 2000. Preface. In *The horizontal gene pool* (Thomas, C.M. ed.), pp. xi–xv, Harwood Academic.
- 4) De Gelder, L, J.J. Williams, J.M. Ponciano, M. Sota, and E.M. Top. 2008. Adaptive plasmid evolution results in host-range expansion of a broad-host-range plasmid. *Genetics* 178: 2179–2190.
- 5) Dionisio, F., I.C. Conceição, A.C.R. Marques, L. Fernandes, and I. Gordo. 2005. The evolution of a conjugative plasmid and its ability to increase bacterial fitness. *Biol. Lett.* 1: 250–252.
- 6) Frost, L.S., R. Leplae, A.O. Summers, and A. Toussaint. 2005. Mobile genetic elements: the agents of open source evolution. *Nat. Rev. Microbiol.* 3(9): 722–732.
- 7) Heuer, H., R.E. Fox, and E.M. Top. 2007. Frequent conjugative transfer accelerates adaptation of a broad host range plasmid to an unfavorable *Pseudomonas putida* host. *FEMS Microbiol. Ecol.* 59: 738–748.
- 8) Hughes, J.M., et al. 2012. The role of clonal interference in the evolutionary dynamics of plasmid-host adaptation. *mBio* 3(4): e00077-12. doi: 10.1128.
- 9) Humphrey, et al. 2012. Fitness of *Escherichia coli* strains carrying expressed and partially silent IncN and IncP1 plasmids. *BMC Microbiology* 12: 53.
- 10) Köhler, T., S.F. Epp, L.K. Curty, and J.C. Pechere. 1999. Characterization of MexT, the regulator of the *MexE-MexF-OprN* multidrug efflux system of *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* 181: 6300–6305.
- 11) Lee, S.W. and G. Edlin. 1985. Expression of tetracycline resistance in pBR322 derivatives reduces the reproductive fitness of plasmid-containing *Escherichia coli*. *Gene* 39: 173–180.
- 12) Maddocks, S.E. and P.C. Oyston. 2008. Structure and function of the LysR-type transcriptional regulator (LTTR) family proteins. *Microbiology*. 154(12): 3609–3623.
- 13) Maeda, K., H. Nojiri, M. Shintani, T. Yoshida, H. Habe, and T. Omori. 2003. Complete nucleotide sequence of carbazole/dioxin-degrading plasmid pCAR1 in *Pseudomonas resinovorans* strain CA10 indicates its mosaicity and the presence of large catabolic transposon Tn4676. *J. Mol. Biol.* 326(1): 21–33.
- 14) McDermott, P.J., P. Gowland, and P.C. Gowland. 1993. Adaptation of *Escherichia coli* growth rates to the presence of pBR322. *Letters in applied Microbiology* 17: 139–143.
- 15) Nojiri, H. 2012. Structural and Molecular Genetic Analyses of the Bacterial Carbazole Degradation system. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 76(1): 1–18.
- 16) Ouchiyama, N., Y. Zhang, T. Omori, and T. Kodama. 1993. Biodegradation of carbazole by *Pseudomonas* spp. CA06 and CA10. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 57(3): 455–460.
- 17) Lenski, R.E., S.C. Simpson, and T.T. Nguyen. 1994. Genetic analysis of a plasmid-encoded, host genotype-specific enhancement of bacterial fitness. *J. Bacteriol.* 176(11): 3140.
- 18) Levy, S.B. and B. Marshall. 2004. Antibacterial resistance worldwide: cause, challenges and responses. *Nat. Med.* 10: S12 Publishers, Amsterdam.
- 19) Shintani, M., H. Yano, H. Habe, T. Omori, H. Yamane, M. Tsuda, and H. Nojiri. 2006. Characterization of the replication, maintenance, and transfer features of the IncP-7 plasmid pCAR1, which carries genes involved in carbazole and dioxin degradation. *Appl. Environ. Microbiol.* 72(5): 3206–3216.
- 20) Shintani, M., N. Fukushima, M. Tezuka, H. Yamane, and H. Nojiri. 2008. Conjugative transfer of the IncP-7 carbazole degradative plasmid, pCAR1, in river water samples. *Biotechnol. Lett.* 30(1): 117–122.
- 21) Sota M, et al. 2010. Shifts in the host range of a promiscuous plasmid through parallel evolution of its replication initiation protein. *ISME J.* 4: 1568–1580.
- 22) Takahashi, Y., M. Shintani, L. Li, H. Yamane, and H. Nojiri. 2009b. Carbazole-degradative IncP-7 plasmid pCAR1.2 is structurally unstable in *Pseudomonas fluorescens* Pf0-1, which accumulates catechol, the intermediate of the carbazole degradation pathway. *Appl. Environ. Microbiol.* 75(12): 3920–3929.
- 23) Thomas, C.M. 2000. Preface. In *The horizontal gene pool* (Thomas, C.M. ed), pp. xi–xv, Harwood Academic Publishers, Amsterdam.
- 24) Tian, Z.X., E. Fargier, M. Mac Aogáin, C. Adams, Y.P. Wang, and F. O’Gara. 2009. Transcriptome profiling defines a novel regulon modulated by the LysR-type transcriptional regulator MexT in *Pseudomonas aeruginosa*. *Nucleic Acids Res.* 37(22): 7546–7559.