

プラスミドゲノミクス～全塩基配列解読済のプラスミドデータベースの整備～

Genomics of Plasmids

新谷 政己^{1,2*}, 金原 和秀¹

MASAKI SHINTANI^{1,2*} and KAZUhide KIMBARA¹

¹ 静岡大学大学院総合科学技術研究科工学専攻 〒432-8561 静岡県浜松市中区城北 3-5-1

² 静岡大学創造科学技術大学院バイオサイエンス専攻 〒432-8561 静岡県浜松市中区城北 3-5-1

* TEL & FAX: 053-478-1181

* E-mail: shintani.masaki@shizuoka.ac.jp

¹ Department of Engineering, Graduate School of Integrated Science and Technology

² Department of Bioscience, Graduate School of Science and Technology, Shizuoka University,
Hamamatsu, Shizuoka 432-8561, Japan

キーワード：プラスミド, 宿主, データベース

Key words: plasmid, host, database

(原稿受付 2015年3月16日/原稿受理 2015年3月22日)

1. はじめに

プラスミドは微生物細胞内で、染色体 DNA とは物理的に別個に存在する環状または線状の複製単位 (レプリコン) である。また、プラスミドは種々の微生物間を接合伝達によって移動可能な遺伝因子である。プラスミドは、自身の複製・維持・伝達のために必要な遺伝子の他に、プラスミドを有する宿主細胞に病原性、抗生物質耐性能、物質代謝能等を付与できる。従って微生物は、プラスミドを介した遺伝子の水平伝播によって、新たな能力を獲得し、様々な環境に対する急速な進化・適応をもつと考えられている^{1,7,8,11,20}。以上のことから、プラスミドがどのような遺伝子をもつのか、どのような種類の微生物を宿主にできるのか、という情報が、環境バイオテクノロジー・医療分野において重要であることは、過去の本学会誌でも述べてきた²⁹。

近年の塩基配列解読技術の革新によって、微生物のゲノム配列の解読が急速に進むのに伴い、新たなプラスミドが見出され、その塩基配列が登録されてきた。2014年8月の時点で米国国立生物工学情報センター (NCBI) のデータベースには、様々な種類のバクテリア、アーキア、真核微生物から見出された4602のプラスミドの全塩基配列が登録されている。これらには、基本機能 (複製・維持・接合伝達) について詳細に研究されてきたプラスミドと、そうでないものが混在している。我々は、今後ますます増加すると予想される全塩基配列の解読されたプラスミドについて、単純な塩基配列のみならず、その宿主や性質ごとに分類し、研究者が新たに見出したプラスミドや、プラスミド上の遺伝子が、どのようなプラスミドグループに属し、また水平伝播されるのかに

ついて、簡便に推定できるように、データベースの整備を進めている。本論文では、まだ途上ではあるがその一端について紹介したい。なお、本データベースと、その解析データの一部については、筆者らの最近の総説にも発表している¹⁸。

2. 塩基配列が登録されたプラスミドとその宿主

プラスミドの特徴と、宿主の系統分類学上の関係は、プラスミドが微生物間をどのように伝播しているのか、を理解する上で重要である。これまでに塩基配列が解読されたプラスミドの大半 (4418) はバクテリアのものであり、続いてアーキア (137)、真核微生物 (47) と続く。バクテリアの分類については、*Proteobacteria* 門、*Firmicutes* 門、*Spirochaetes* 門、*Actinobacteria* 門、*Cyanobacteria* 門および *Bacteroidetes* 門が上位の宿主を占め、これら6門で、これまでに全塩基配列を得られているプラスミドの宿主の90%以上を占めていた (Fig. 1)。ただし、この結果は、必ずしもこれらの門がプラスミドの宿主として主要であることを意味しない。例えば、多くの動植物に感染する病原菌を含む *Enterobacteriales* 科 (927 プラスミド) や *Pseudomonadales* 科 (183 プラスミド) (以上 *Proteobacteria* 門)、あるいは *Staphylococcus* 属 (220 プラスミド、*Firmicutes* 門)、*Borrelia* 属 (416 プラスミド、*Spirochaetes* 門) 由来のプラスミドが圧倒的に多かった。同様に植物との共生細菌由来のプラスミド (*Proteobacteria* 門 *Rhizobiales* 科) も多く (143 プラスミド)、登録されたプラスミドについては、研究分野によって偏りが大きいことが示唆された。従って、あるプラスミドが、どのような微生物

を宿主としうるのかを推定する際にも、偏りが生じる可能性が高い（各門におけるプラスミドの詳細については、前述の筆者らの総説¹⁷⁾を参照して頂ければ幸いです）。

プラスミドの DNA としての性質（塩基長と GC 含量）

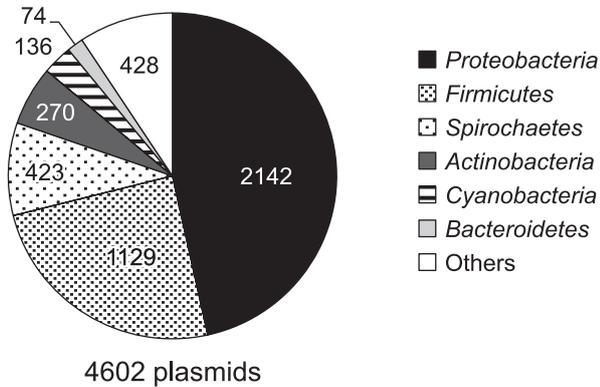


Fig. 1. The phylogenetic distribution of full-sequenced plasmids.

には、宿主の種類や染色体 DNA との関係があると推定される。まず、代表的な 6 門のプラスミドの塩基長について、中央値とそのばらつきを比較した。その結果、*Firmicutes* 門と *Bacteroidetes* 門における中央値が、他の 4 門と比べてやや小さかった (Fig. 2A)。また、*Spirochaetes* 門については、そのばらつきが小さかった (Fig. 2A) が、これは、先述したように本門の 423 プラスミドのうち、416 が *Borrelia* 属細菌由来の非常によく似たプラスミドが多く登録されているためと推定された。一方、GC 含量については、各門のプラスミドごとのばらつきが大きく、中央値も異なることが示され、特に *Spirochaetes* 門が低く (27.7%)、*Actinobacteria* 門が高かった (64.5%) (Fig. 2B)。既に西田が報告しているように、大半のプラスミドの GC 含量は、その宿主の染色体の GC 含量よりも低く、かつその違いは 10% 以内に留まる¹⁶⁾。従って、プラスミドの GC 含量と、染色体の GC 含量に、ある程度の比例関係があるために、*Actinobacteria* 門（染色体の平均 GC 含量 64.1%）に由来するプラスミドの GC 含量が高く、*Spirochaetes* 門（染色体の GC 含量 39.7%）に由来するプラスミドの

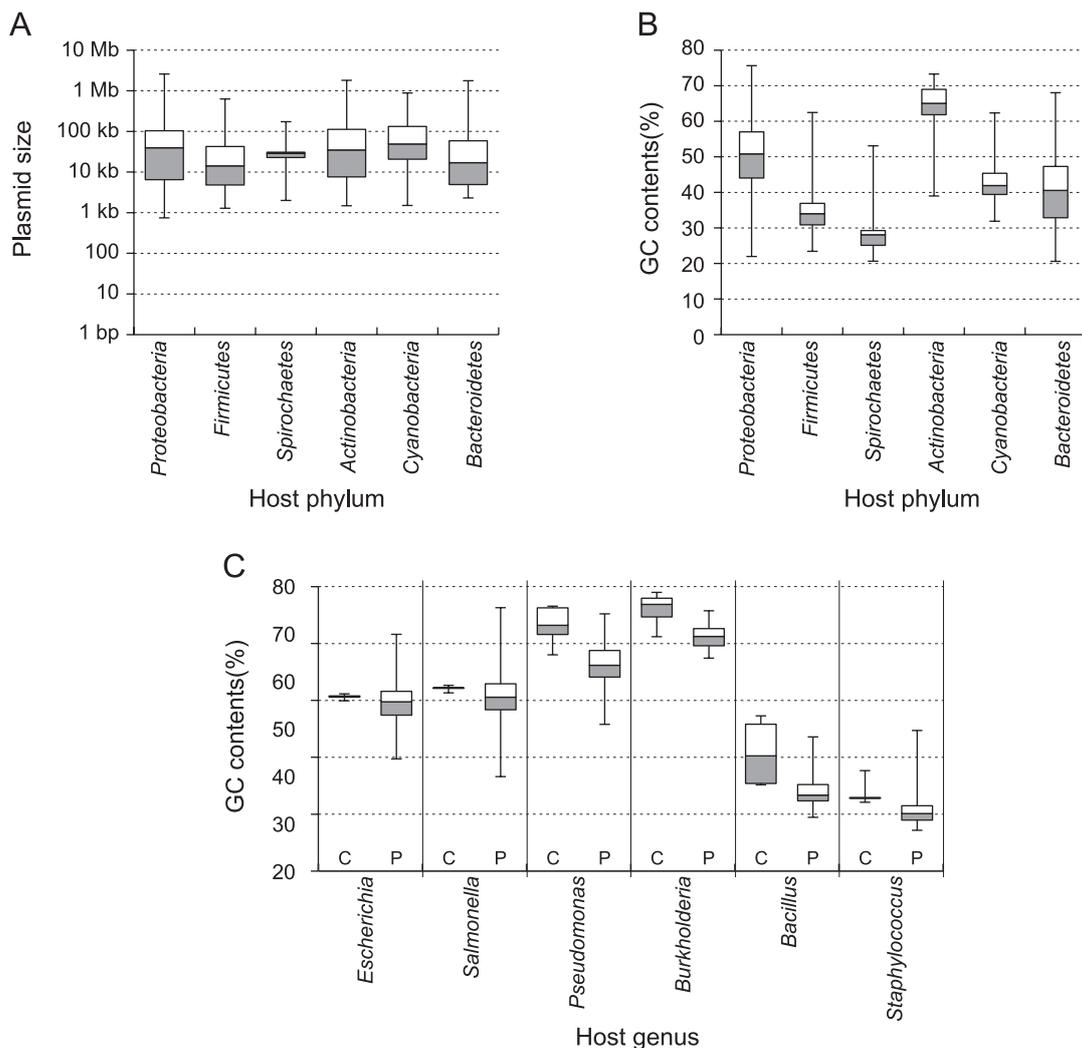


Fig. 2. Boxplots of plasmids' sizes (A) and GC contents in major phyla (B). Comparisons of GC contents of host chromosome "C" and plasmid "P" in host genera (C). Data are presented as median (horizontal solid line), 25th to 75th percentiles (box), maximum and minimum (error bars).

GC 含量が低いことが示唆された。プラスミドの GC 含量が染色体に比べて低いのは、A や T よりも、G や C を維持するのにかかるエネルギーが高いため、生存に必須でないプラスミドを維持するには、少しでもコストを下げる必要があるためではないかと推定されている¹⁷⁾。一方、プラスミド自体が宿主内で複製・維持されるには、宿主の機能にある程度依存するため、プラスミド・染色体ともに GC 含量が同程度であるほうが望ましいと予想される¹⁷⁾。従って、プラスミドの GC 含量は、宿主染色体の GC 含量へと近づく方向へと進化すると考えられている^{14,17)}。これらのことから、プラスミドの GC 含量は、その宿主域を推定する際に重要であるばかりでなく、宿主（あるいは類縁の種）の進化の過程で、いつプラスミドを獲得したのかを推定するにも重要と言える。Fig. 2C に各プラスミドの宿主に類縁の菌株の染色体とプラスミド自体の GC 含量との違いを比較した結果を示す。例えば、*Proteobacteria* 門内の *Escherichia* 属や *Salmonella* 属細菌については、2014 年 8 月現在、それぞれ 63 株、46 株の染色体の完全長 DNA 配列が解読されており、また、各属に由来するプラスミドは 310、160 の塩基配列が登録されている（ただしプラスミドの宿主全ての染色体 DNA 配列が解読されているわけではない）。それらの染色体・プラスミドそれぞれの GC 含量を比較したところ、双方の中央値はプラスミドの方が低く、またばらつきが大きかった (Fig. 2C)。これは、他の *Pseudomonas* 属、*Burkholderia* 属、*Bacillus* 属、および *Staphylococcus* 属細菌に関しても同様であった (Fig. 2C)。これらのうち、宿主染色体と大きく異なる GC 含量を示すプラスミドは、比較的最近、これらの属を宿主とした可能性がある。実験的な裏づけが必要ではあるが、より多くのプラスミドと宿主染色体について、データベースの整備が進めば、染色体とプラスミドの GC 含量の違いから、その宿主や進化の過程がある程度推測が可能になるかもしれない。

3. 塩基配列が登録されたプラスミドの分類

プラスミドは、その不和合性 (incompatibility, Inc) や、接合伝達性 (self-transmissible, mobilizable) を指標として分類されてきた^{3,9,10,13,19,20,22-24)}。特に、同一の細胞内におけるプラスミドの不和合性は、プラスミドを分類する上で重要な性質であり、これまでに大腸菌を宿主とした場合 (IncA~IncZ)、主に *Pseudomonas* 属細菌を宿主とした場合 (IncP-1~IncP-14)、およびグラム陽性球菌を宿主とした (Inc1~18) が提唱されている (昨年の本学会誌に掲載された筆者らの総説²⁵⁾ も参照)。最近では、あるプラスミドがどの Inc 群に属するかを決める際、不和合性試験よりも、各群の複製開始タンパク質 (Rep) をコードする遺伝子の塩基配列・アミノ酸配列を基に分類する方法が一般的である。実際、物質代謝遺伝子を搭載する主要なプラスミドを含む Inc 群、IncP-1, P-7, P-9 群を検出するために、Rep 遺伝子の配列に基づいて縮重プライマーを作製し、検出に成功したという報告もなされている⁶⁾。筆者らは、既存の Inc 群の Rep のアミノ酸配列クエリとし、全塩基配列が明らかになった 4602 のプラスミドに対して Local BLAST (TBLASTN) 解析を行った。その結果、1037 が上記 3 つの Inc 群のいずれかに属すると推定された。各宿主についてさらに詳しく調べると、IncA-IncZ (IncA, B, F, G/U, H, I, K, L/M, N, P, Q, R, S, T, W, X, Z) に属すると推定されるプラスミドの大半 (402/423) が *Enterobacteriales* 科由来であった (Fig. 3)。一方、IncP-1~P-14 (P-1, P-2, P-3, P-4, P-6, P-7, P-9) に属すると推定されるプラスミドは、*Pseudomonadales* 科の他に、*Burkholderiales* 科や *Enterobacteriales* 科由来であった (Fig. 3)。また、Inc1~18 (Inc1, 4, 7, 8, 9, 10, 11, 13, 14, 18) に属すると推定されたプラスミドは、*Lactobacilliales* 科および *Bacillales* 科に由来するプラスミドが主要であった (Fig. 3)²⁵⁾。

ところで、2014 年 4 月の世界保健機関 (WHO) の報告書にもあるとおり、これまで有効とされた抗生物質が

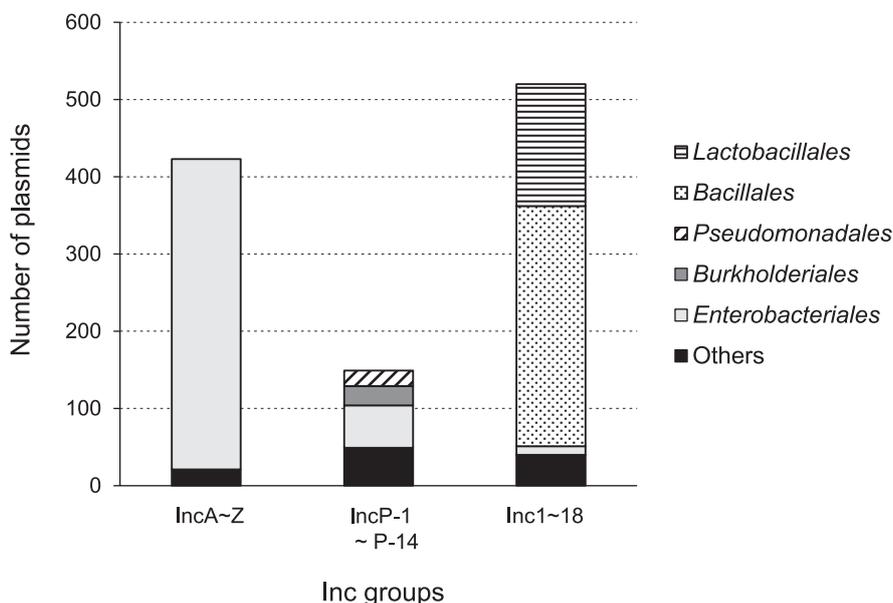


Fig. 3. Distribution of plasmids among bacterial families classified into Inc groups.

世界各地で効かなくなっている。こうした多剤耐性菌の蔓延にもプラスミドが寄与していると考えられており、各菌株がどのようなプラスミドを保持するのかを迅速に知る必要がある。そのため、*Acinetobacter* 属由来のプラスミドは、Inc 群とは別に、Rep をコードする遺伝子配列に基づき、GR1 から GR19 までに分類され、各々のプラスミドを区別して検出するためのプライマー配列も提案されている²⁾。同様の理由で、病原菌として知られる *Staphylococcus* や *Enterococcus* 属細菌由来のプラスミドについても、Rep の塩基配列を基に、26 のファミリーに分類され、PCR で簡便に判別可能なプライマー配列も提案されている^{4,5,12,15)}。

以上の分類手法を含めると、塩基配列が解読されたプラスミドのうち、40%にあたる 1845 のプラスミドについて分類がなされているが、次のような問題も生じる。多くのプラスミドは複数の複製機構をもつため、どの Inc 群、あるいは Rep ファミリーに属するのかを一意に決められない。また、こうした Inc や Rep については、腸内細菌由来のプラスミドに情報が偏っているため、由来の異なるプラスミドの分類は難しい。一方、近年、スペインの de la Cruz 博士のグループらによって、プラスミドの接合伝達性に基づく分類手法が提唱され、上記の問題をある程度緩和している^{9,10,19)}。プラスミドは、微生物間の移動に必要な機能遺伝子が全て備わっている自己伝達性のプラスミドと、自己伝達性プラスミドの接合伝達に伴って移動可能な可動性プラスミドとに分けられるが、双方のプラスミドとも、DNA の複製・移動を担うタンパク質 (MOB: mobilization) をコードする遺伝子および接合伝達の開始点 (*oriT*) を有する。この MOB に関しては、プラスミドの宿主を問わず、接合伝達能を有するプラスミドが共通して保持するため、多くの種類のプラスミドについての分類が可能である。また、MOB 遺伝子を 1 つ以上もつプラスミドはほとんどない。ただし、MOB に基づく分類は、接合伝達能をもたないプラスミドに対しては適用できない。自己伝達性プラスミドは、MOB 遺伝子の他に、細胞間の接触を促進するタンパク質 (MPF: mating pair formation)、IV 型のカップリングタンパク質 (T4CP)、ATPase (VirB4) をもつ¹⁹⁾。これらのタンパク質をコードする遺伝子群の有無によって、そのプラスミドが自己伝達性 (MOB, MPF, T4CP, VirB4 全て有する) か、可動性 (上記のうち少なくとも MOB を有する) かどうかを推定できる。既に報告されていることであるが、これまでに塩基配列が解読されたプラスミドのサイズ分布は、4-8 kb と 32 kb 付近にピークをもつ二峰性を示す (Fig. 4)。可動性プラスミドは、前半のピーク、後半のピーク双方に分布しているが、自己伝達性プラスミドは、自己伝達に必要な遺伝子数が多く、サイズが大きくなるため後半のピークにのみ分布する (Fig. 4)。全 4602 のプラスミドのうち、自己伝達性と推定されるプラスミドが 485 (10.5%)、可動性と推定されるプラスミドが 824 (17.9%) と、全体の 28.4% が「動き得る」プラスミドと予想された (Fig. 5A)。こうしたプラスミドの宿主ごとの分布は、自己伝達性プラスミドは *Proteobacteria* 門にほとんどが分布し、可動性プラスミドについては、上位 6 門いづれから見出された (Fig. 5B)。グラム陽性

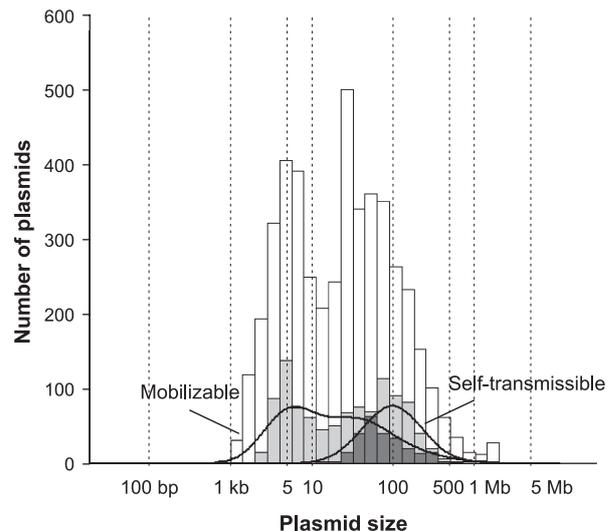


Fig. 4. Distribution of self-transmissible (dark gray) and mobilizable (light gray) plasmids according to Plasmid size.

のバクテリアなど一部の微生物間のプラスミドの授受については、必要な因子についてよくわかっていないため、今後、自己伝達性プラスミドの分布についても変化する可能性がある。

4. プラスミドデータベースの利用と今後の課題

宿主の種類およびプラスミドの性質に基づく分類を行ったプラスミドのデータベースは、様々な利用が可能である。例えば、注目しているタンパク質がどのようなプラスミドにコードされているのかを調べる際に有効と考えられる。筆者らは、これまでにプラスミドの異なる宿主内における複製・維持・接合伝達能に深く寄与すると考えられる核様態タンパク質について研究を行ってきた。こうした核様態タンパク質をコードする遺伝子が、どのようなプラスミドにどれくらい分布しているのかについて、こうしたプラスミドデータベースを活用して調べてきた²¹⁾。その結果、接合伝達性のプラスミドの多くが、こうした核様態タンパク質をコードする遺伝子をもつことが明らかになった²¹⁾。また、IncA/C (=IncP-3) 群に分類されるプラスミドは、全て核様態タンパク質 HU を共通して有することが示された (Shintani et al., 投稿中)。この他にも、例えば分解遺伝子群や抗生物質耐性遺伝子がどのようなプラスミドによって「運ばれるのか」ということも、整備されたプラスミドのデータベースを用いることで容易に推定できる可能性がある。今後は、日々増大する登録数と、また新たに明らかにされたプラスミドの複製・伝達に関する情報に対して迅速に対応していくことが必要である。また、本データベースは、プラスミドのみの情報に留まっており、宿主の染色体の全塩基配列情報が登録された菌株も多いが、それらの情報は反映していない。今後は、染色体の塩基配列情報を利用できる菌株については、別個データベースを作製することで、プラスミドと宿主の関係を考慮した解析が可能であろう。

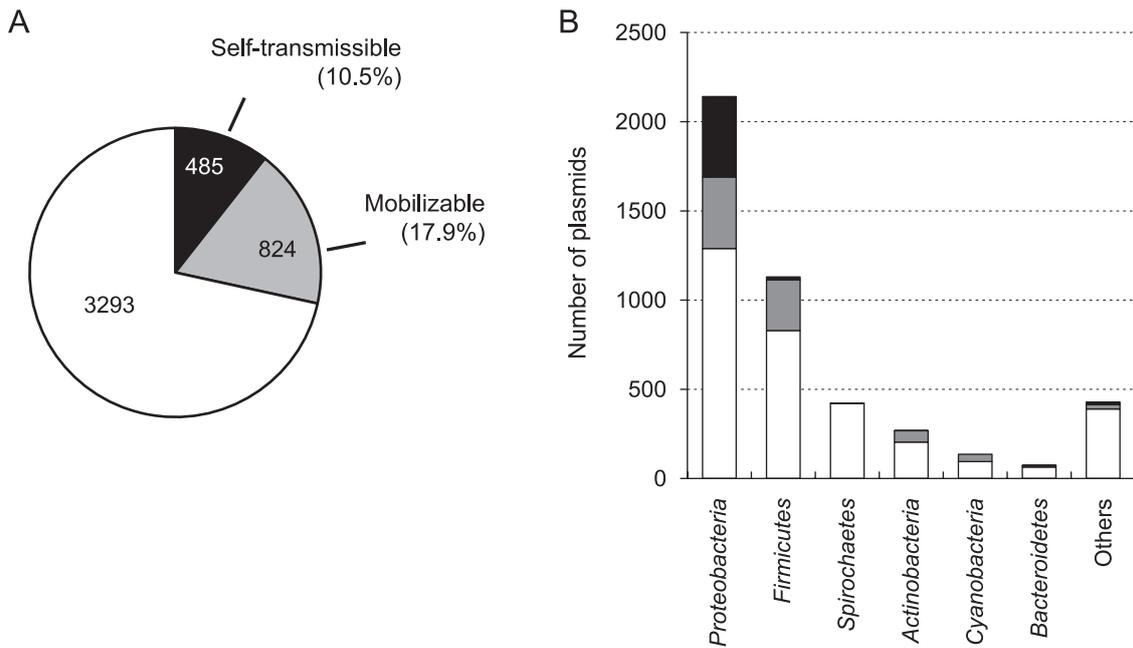


Fig. 5. Ratios of putative self-transmissible plasmids (black), putative mobilizable plasmids (gray), and others (white) (A) and those in each phylum (B).

謝 辞

本総説におけるプラスミドデータベースの整備は JSPS 科研費 2480087 の助成を受けて行った。

文 献

- Aminov, R.I. 2011. Horizontal gene exchange in environmental microbiota. *Front. Microbiol.* 2: 158.
- Bertini, A., L. Poirel, P.D. Mugnier, L. Villa, P. Nordmann, and A. Carattoli. 2010. Characterization and PCR-based replicon typing of resistance plasmids in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 54: 4168–4177.
- Carattoli, A. 2009. Resistance plasmid families in *Enterobacteriaceae*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 53: 2227–2238.
- Carattoli, A., A. Bertini, L. Villa, V. Falbo, K.L. Hopkins, and E.J. Threlfall. 2005. Identification of plasmids by PCR-based replicon typing. *J. Microbiol. Methods.* 63: 219–228.
- Clewell, D.B. 2007. Properties of *Enterococcus faecalis* plasmid pAD1, a member of a widely disseminated family of pheromone-responding, conjugative, virulence elements encoding cytotoxin. *Plasmid.* 58: 205–227.
- Dealtry, S., P.N. Holmsgaard, V. Dunon, S. Jechalke, G.C. Ding, E. Krogerrecklenfort, H. Heuer, L.H. Hansen, D. Springael, S. Zuhlke, S.J. Sorensen, and K. Smalla. 2014. Shifts in abundance and diversity of mobile genetic elements after the introduction of diverse pesticides into an on-farm biopurification system over the course of a year. *Appl. Environ. Microbiol.* 80: 4012–4020.
- Frost, L.S., R. Leplae, A. Summers, and A. Toussaint. 2005. Mobile genetic elements: the agents of open source evolution. *Nat. Rev. Microbiol.* 3: 722–732.
- Frost, L.S. and G. Koraimann. 2010. Regulation of bacterial conjugation: balancing opportunity with adversity. *Future Microbiol.* 5: 1057–1071.
- Garcillán-Barcia, M.P., A. Alvarado, and F. de la Cruz. 2011. Identification of bacterial plasmids based on mobility and plasmid population biology. *FEMS Microbiol. Rev.* 35: 936–956.
- Garcillán-Barcia, M.P., M.V. Francia, and F. de la Cruz. 2009. The diversity of conjugative relaxases and its application in plasmid classification. *FEMS Microbiol. Rev.* 33: 657–687.
- Guglielmini, J., L. Quintais, M.P. Garcillán-Barcia, F. De La Cruz, and E.P. Rocha. 2011. The repertoire of ICE in prokaryotes underscores the unity, diversity, and ubiquity of conjugation. *PLoS Genet.* 7: e1002222.
- Jensen, L.B., L. Garcia-Migura, A.J. Valenzuela, M. Løhr, H. Hasman, and F.M. Aarestrup. 2010. A classification system for plasmids from enterococci and other Gram-positive bacteria. *J. Microbiol. Methods.* 80: 25–43.
- Lawley, T., B.M. Wilkins, and L.S. Frost. 2004. Bacterial conjugation in Gram-negative bacteria, pp. 203–226. In G. Phillips and B. Funnell (eds.), *Plasmid Biology*, Washington, DC: ASM Press.
- Lawrence, J.G. and H. Ochman. 1998. Molecular archaeology of the *Escherichia coli* genome. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 95: 9413–9417.
- Lozano, C., L. García-Migura, C. Aspiroz, M. Zarazaga, C. Torres, and F.M. Aarestrup. 2012. Expansion of a plasmid classification system for Gram-positive bacteria and determination of the diversity of plasmids in *Staphylococcus aureus* strains of human, animal, and food origins. *Appl. Environ. Microbiol.* 78: 5948–5955.
- Nishida, H. 2012. Comparative analyses of base compositions, DNA sizes, and dinucleotide frequency profiles in archaeal and bacterial chromosomes and plasmids. *Int. J. Evol. Biol.* 2012: 342482.
- Rocha, E.P. and A. Danchin. 2002. Base composition bias might result from competition for metabolic resources. *Trends Genet.* 18: 291–294.
- Shintani, M., Z. Sanchez, and K. Kimbara. 2015. Genomics of microbial plasmids: classification and identification based on replication and transfer systems and host taxonomy. *Front. Microbiol.*, doi: 10.3389/fmicb.2015.00242.
- Smillie, C., M.P. Garcillán-Barcia, M.V. Francia, E.P. Rocha, and F. de la Cruz. 2010. Mobility of plasmids. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 74: 434–452.
- Sota, M. and E. Top. 2008. Horizontal gene transfer mediated by plasmids, pp. 111–181. In G. Lipps (ed.), *Plasmids: Current Research and Future Trends* Caister Academic Press: Horizon

- Scientific Press.
- 21) Takeda, T., C.S. Yun, M. Shintani, H. Yamane, and H. Nojiri. 2011. Distribution of genes encoding nucleoid-associated protein homologs in plasmids. *Int. J. Evol. Biol.* 2011: 685015.
 - 22) Taylor, D.E., A. Gibreel, T.D. Lawley, and D.M. Tracz. 2004. Antibiotic resistance plasmids, pp. 473–491. In G. Phillips and B. Funnell (eds.), *Plasmid Biology*, Washington, DC: ASM Press.
 - 23) Thomas, C.M. and A.S. Haines. 2004. Plasmids of the genus *Pseudomonas*, pp. 197–231. In J.L. Ramos (ed.), *Pseudomonas*. New York, USA: Plenum Publishing Corporation.
 - 24) Udo, E.E. and W.B. Grubb. 1991. A new incompatibility group plasmid in *Staphylococcus aureus*. *FEMS Microbiol. Lett.* 62: 33–36.
 - 25) 新谷政己, 松井一泰, 金原和秀, 野尻秀昭. 2013. 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*. 13: 125–134.