



Title	水圏環境中における細菌の遺伝子水平伝播頻度の個体レベルでの解析
Author(s)	丸山, 史人
Citation	大阪大学, 2005, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/45676
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

氏名 まるやまふみと人
 博士の専攻分野の名称 博士(薬学)
 学位記番号 第19434号
 学位授与年月日 平成17年3月25日
 学位授与の要件 学位規則第4条第1項該当
 薬学研究科生命情報環境科学専攻
 学位論文名 水圏環境中における細菌の遺伝子水平伝播頻度の個体レベルでの解析
 論文審査委員 (主査)
 教授 那須正夫
 (副査)
 教授 前田正知 教授 田中慶一 教授 土井健史

論文内容の要旨

細菌の遺伝的多様化には、遺伝子の水平伝播が大きく寄与している。このような異種間での遺伝子伝播が、細菌の生態学的特徴や病原性の変化につながっている。これらの事実は、病原細菌の抗生物質耐性遺伝子や毒素遺伝子の獲得機構を解明する上で、遺伝子伝播を考慮することが重要であることを示している。すなわち、自然環境中における遺伝子伝播の頻度や、伝播の起こる範囲、影響を与える因子を正確に捉えることが必要となる。

これまで得られている遺伝子伝播に関する知見は、自然環境とは異なる実験室での最適化された系や、遺伝子解析により得られた結果から導かれている。また、環境中において遺伝子伝播がどの程度起きているのかを明らかにするためにモデル系を用いた研究がなされている。しかし環境中に生息する細菌の多くは酵素活性等の生理活性を保持しているにもかかわらず、従来の培養法では検出困難な状態にあるため、培養に依存した手法では遺伝子伝播を過小評価していると考えられる。近年、高精度に遺伝子伝播を捉るために、培養に依存せず、蛍光タンパク質遺伝子の発現を利用する手法が用いられつつある。しかしながら遺伝子の発現は細菌の生理状態やプロモーター配列に依存するため、蛍光タンパク質遺伝子を用いた場合においても、環境における遺伝子伝播を過小評価している可能性がある。また標的とする遺伝子が蛍光タンパク質に限定されるため、毒素遺伝子や抗生物質耐性遺伝子など、伝播することができずに知られている種々の遺伝子を対象とすることはできない。これらの伝播頻度を過小評価してしまう課題を解決し、任意の遺伝子を対象にできることが、環境中における遺伝子伝播を正確に捉えるうえで重要である。すなわち細胞内に外来遺伝子を取り込んだ細菌を、遺伝子の発現に依存せず、遺伝子配列を標的として細胞単位で検出する必要がある。

環境中の細菌間の遺伝子伝播を研究するにあたり、このように細胞内に取込まれた遺伝子の配列そのものを捉える重要性があるものの、方法論的な制約のためにDNAレベルでの伝播頻度は明らかとなっていない。本研究では、この課題を克服するために種々の遺伝子增幅法や蛍光シグナル增幅法からrolling circle amplification法を選択し、細胞内での遺伝子増幅法(in situ RCA)の検討を行った。標準菌株で特異性を確認し、河川水に添加した現存量の少ない特定細菌の検出を可能とした。

一般的な自然環境は、実験室で用いている培地と比べて貧栄養な状態にある。そこで貧栄養条件下に曝された細菌の外来遺伝子の獲得能を明らかにするために、塩化カルシウム溶液に大腸菌を添加したモデル系を作製し、約150日間に渡って細胞外DNAの取り込み能のモニタリングを行った。in situ RCA法を用いて伝播頻度を求め、培養にもと

づいた従来法と比較したところ、*in situ* RCA 法により得られた DNA を取り込む細菌数は、従来の選択培養法により求めた値と比べ最大 10^6 倍多いことがわかった。さらにコロニーを形成しない細菌の多くが DNA 取込み能を保持していることがわかった。また DNA を取り込み可能な細菌の割合は、貧栄養条件下に曝されることにより増加することが明らかとなった。これらの結果により、一般的に貧栄養な条件下にある自然環境において、形質転換による遺伝子伝播はより高い頻度で起きていると考えられる。

下水処理場の放流水を用いたモデル系にプラスミドを添加し、21 日間にわたってその消長および自然形質転換への寄与をモニタリングした。また抗生物質を添加した系と炭素源としてグルコースを添加した系も作製した。細胞外および細胞内に取り込まれたプラスミド量について、定量的 PCR および *in situ* RCA 法等を用いてモニタリングを行った。

すべての系において供与プラスミドは急速に分解するものの、一部は残存していた。この数と *in situ* RCA 法で検出された細菌数で大きな差があったことから、残存したプラスミドのほとんどが粒子物質への吸着することで遺伝子プールになっていると考えられる。蛍光タンパク質を発現する細菌は、系によって検出可能な期間が異なっているが *in situ* RCA 法を用いて、蛍光タンパク質遺伝子を持つ細菌を検出したところ、いずれの系においてもこの遺伝子を保持する細菌を長期間にわたって検出可能であった。*in situ* RCA 法によって求めた遺伝子伝播頻度は、蛍光タンパク質を発現している細菌数から求めた頻度に比べて最大で 30 倍高く、培養や遺伝子の発現に依存しないことで、より高精度に遺伝子伝播を捉えることができた。すなわち遺伝子伝播を正確に評価するにあたっては、DNA 配列そのものを標的として検出することが重要であるといえる。これらの知見は、形質転換による遺伝子伝播はこれまで考えられてきた以上に頻繁におきており、環境中における細菌の迅速な生態学的特徴や病原性の変化に影響を与える可能性がある。バイオフィルム、セディメント、土壤等は遺伝子伝播において重要な場と考えられており、このような場における遺伝子伝播の頻度や伝播に影響を与える因子を遺伝子配列に基づき研究を進めていくことで、環境における遺伝子の動態を明らかにしていくことができると考えられる。

論文審査の結果の要旨

微生物が新たな環境に適応する上で、遺伝子の水平伝播は大きな役割を果たしている。また遺伝子伝播は微生物の進化・多様化の一端を担っている。細菌は核膜をもたないこと、またプラスミドをレプリコンとすることから、細胞内に取り込んだ外来遺伝子をクロモソームの一部あるいはプラスミドとして保持することができる。したがって細菌の新たな形質獲得において、遺伝子の取り込みは重要な過程である。これまで遺伝子伝播を捉るために、抗生物質耐性や栄養要求性等を指標とした選択培養法が用いられてきた。また培養に依存しない方法として蛍光蛋白質遺伝子の発現を指標とした方法も用いられてきている。しかしながら、選択培地上でコロニーを形成できること、あるいは蛍光蛋白質が合成されることが前提となっており、いずれの場合においても、菌体内への遺伝子取り込みを過小評価していた。

本研究は、任意の遺伝子の伝播を、培養・発現にとらわれることなく追跡できる手法を検討し、さらに水圈における遺伝子の取り込み頻度を求めたものである。その結果、標的とする遺伝子配列を有する細菌を個体レベルで検出できる *in situ* RCA 法を確立することで、DNA レベルで遺伝子の伝播を捉えることを可能とした。本手法を用い、貧栄養下での大腸菌のプラスミド DNA (蛍光蛋白質遺伝子、抗生物質耐性遺伝子をコード) 取り込み能を調べたところ、遺伝子を獲得した細菌数は、選択培養で得られた菌数の 1,000 倍以上、また蛍光蛋白質発現から得られた菌数の 10 倍以上であった。つぎに河川水を用いたモデル系にプラスミド DNA を添加したところ、蛍光蛋白質の発現から求めた頻度に比べ、6 倍以上高い頻度で遺伝子が取り込まれることがわかった。

本論文は、独自に開発した新手法により、自然環境中における遺伝子伝達の頻度を明らかにした先駆的な研究であり、その成果は細菌の形質獲得機構の解明、遺伝子組換え体の野外利用における環境影響評価など、微生物学の幅広い分野の進歩に大きく貢献することから、博士（薬学）の学位に値するものと判断する。