The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	Implications of Starvation and Parental Growth on Dynamic of Conjugative Plasmid among Pseudomonas Strains
Author(s)	Jorquera, Tapia Milko Alberto
Citation	大阪大学, 2006, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/46520
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	Jorquera Tapia Milko Alberto（ジョルケラ タピア ミルコ アルベルト）
博士の専攻分野の名称	博　士（薬　学）
学　位　記　番　号	第　２０２６３　号
学位授与年月日	平成 18 年 3 月 24 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	Implications of Starvation and Parental Growth on Dynamic of Conjugative Plasmid Among *Pseudomonas* Strains **（細菌間のプラスミド接合伝達における生理状態および根圏由来有機物の影響）**
論　文　審　査　委　員	（主査） 教　授　那須　正夫 （副査） 教　授　八木　清仁　　教　授　前田　正知　　教　授　田中　慶一

論　文　内　容　の　要　旨

細菌は遺伝子の水平伝播により新たな形質を獲得し、環境に適応する。したがって、自然環境中における遺伝子伝播の頻度や伝播に影響を与える要因の解明は、遺伝子操作微生物の野外利用が生態系に与える影響や、抗生物質耐性菌の蔓延様式を考察する上で重要である。遺伝子伝播の機構には、細菌が接触し遺伝子を直接授受する接合、細胞外の遺伝子が菌体内に取り込まれる形質転換、ファージを介して遺伝子が伝達される形質導入の３つが知られている。これらの中で接合は、物理化学的、生物学的に異なる様々な条件下で高い頻度で起こることが多く報告されており、環境中での主要な遺伝子伝播機構であると考えられる。

これまでに、接合によるプラスミドの伝達頻度は、細菌の属種や生理状態、細菌の密度、栄養分の濃度、温度や pH の影響を受けることが知られている。また、プラスミド伝達は貧栄養環境下では、細菌の増殖とは無関係に起こることがわかっている。自然環境中では多くの細菌が生理活性の低い状態にあり、貧栄養下で飢餓状態にある細菌の接合頻度に影響を与える因子を明らかにすることが、環境中における遺伝子水平伝播を研究するうえで重要である。

自然環境中には、プラスミド伝達を促進する Hot spot が存在し、土壌中では植物の根圏が主要な Hot spot として知られている。植物の根に存在するアミノ酸や有機酸は細菌の栄養分となり、*Pseudomonas* 属菌など根圏に多く存在する細菌の増殖に深くかかわっている。本研究では、このような植物の根から放出される有機物が、根圏において細菌の生理状態や遺伝子伝達に及ぼす影響を明らかにするために、まず緑色蛍光タンパク質（GFP）遺伝子を導入したプラスミドを作製し、蛍光 in situ ハイブリダイゼーション（FISH）法および Direct viable counting（DVC）法を併用することにより、個々の細菌について蛍光顕微鏡下でプラスミド伝達を検出するための手法（DVC-FISH-GFP 法）を作成した。次に作成した本手法を用いて、植物の根に存在するアミノ酸や有機酸が細菌の増殖やプラスミド伝達に及ぼす影響を明らかにした。

DVC-FISH-GFP 法は、蛍光顕微鏡下で発する蛍光の色の違いから、プラスミド供与菌、プラスミド受容菌およびプラスミドを獲得した接合伝達体を個別に観察する方法である。本方法により、プラスミド供与菌はプラスミド上の GFP 遺伝子により緑色蛍光を、プラスミド受容菌は蛍光 in situ ハイブリダイゼーション法により赤色蛍光を、接合伝達体は緑色蛍光と赤色蛍光の両方を発する。DVC 法を用いることにより、個々の細菌が分裂増殖することなく、

菌体内に検出に十分な量のリボソーム RNA と GFP を蓄積する。選択培地法では培地上にコロニーを形成しない生理状態にある接合伝達体の検出は困難であるが、DVC-FISH-GFP 法ではそれらの接合伝達体も検出できる。すなわち、細菌が増殖しにくい貧栄養条件下における細菌間のプラスミド伝達の有無を確認可能になり、従来の選択培地法に比べて、高精度に伝達頻度を測定できるようになった。

DVC-FISH-GFP 法の有用性を確認したうえで、本手法を用いて、植物の根から放出されるアミノ酸や有機酸が細菌の増殖やプラスミド伝達に及ぼす影響を調べた。実験には栄養分を制限した M9 培地にグルコースや各種アミノ酸、有機酸を添加した培地を用い、選択培地法および DVC-FISH-GFP 法を用いて、細菌数の変化とプラスミド伝達の頻度を測定した。また増殖期および飢餓状態のプラスミド供与菌、受容菌を用いて、根圏由来の有機物が生理状態の異なる細菌に与える影響を調べた。

M9 培地のみでは「増殖期のプラスミド供与菌と受容菌」、「増殖期の供与菌と飢餓状態の受容菌」、「飢餓状態の供与菌と受容菌」のいずれの系においても、プラスミドの伝達が起こり、特に増殖期の供与菌を用いた場合に伝達頻度が高くなった。

M9 培地にグルコースやアミノ酸、有機酸を添加した培地を用いた場合、「増殖期のプラスミド供与菌と受容菌」の系では、グルタミンとセリンの存在下では、グルコースに比べて供与菌および受容菌の増殖が遅いが、接合伝達体の数はグルコースよりも多かった。接合伝達体はプラスミド上にコードされた遺伝子により、グルタミンやセリンをより効率的に利用できるものと考えられる。一方、「飢餓状態の供与菌と受容菌」の系では、有機酸がグルコースやアミノ酸に比べて受容菌の栄養源になりやすいことがわかった。特にリンゴ酸やピルビン酸の添加により接合伝達体数が増加し、これらの有機酸はプラスミド伝達を促進すると考えられた。シュウ酸は供与菌、受容菌のいずれの増殖も抑制したが、飢餓状態の受容菌は増殖期の受容菌に比べて、シュウ酸によりプラスミド受容能が上昇することがわかった。

今回の研究で得られた結果は、供与菌や受容菌の生理状態、また存在する有機物の種類によって、細菌の増殖やプラスミドの伝達頻度が大きく変化することを示したものであり、これらの違いが根圏における供与菌や受容菌の分布、プラスミド伝達の頻度を決定しているものと考えられる。

論文審査の結果の要旨

遺伝子伝播は、細菌の新たな機能獲得に大きく寄与していることが知られている。例えば、新たな抗生物質耐性菌が出現した場合、その耐性遺伝子は速やかに他の細菌に伝播し、わずかな期間で耐性菌が広い地域に拡がる。また細菌が毒素産生遺伝子を新たに獲得することにより、病原性を示すことが知られている。したがって、細菌の遺伝子伝播に関わる因子を解析することは、環境中における遺伝子伝播の頻度・場を明らかにし、細菌が新たな形質を獲得することによる生態系・ヒトの健康への影響を考えるうえでの重要な知見を与える。

本研究は、細菌の遺伝子伝播様式のひとつである接合に着目し、栄養条件が遺伝子伝播に与える影響を評価したものである。貧栄養環境下において、細菌は通常の培養法では検出しにくくなるため、従来の方法では接合頻度を過小評価する。そこでまず、培養に依存することなく、接合による遺伝子の伝播を個体レベルで高精度に検出するための手法（DVC-FISH-GFP 法）を検討した。次に本手法を用いて、遺伝子伝播が頻繁に起こる環境（Hot spot）の一つである根圏に存在するアミノ酸や有機酸が、細菌の増殖やプラスミド伝達頻度に与える影響を評価した。自然環境中では細菌の生理状態が大きく異なり、有機物の多い環境下で盛んに増殖する一方、貧栄養環境下では多くの細菌が飢餓状態にある。そこで研究にあたっては、増殖期および飢餓状態のプラスミド供与菌、受容菌を用いた網羅的な測定を行った。研究の結果、供与菌や受容菌の生理状態、また存在する有機物の種類によって、細菌の増殖やプラスミドの伝達頻度が大きく変化し、これらの違いが根圏における供与菌や受容菌の分布、プラスミド伝達の頻度を決定しているものと推測された。

本研究は、細菌間のプラスミド伝達に影響を与える環境要因および細菌の生理状態を明らかにしたものであり、その成果は細菌間の遺伝子伝播がヒトや環境に対して与える影響を考察するうえで大きな知見となることから、博士（薬学）の学位に値するものと判断する。