

Title	産生機構の異なる細胞外細菌DNAの遺伝子伝播への寄与
Author(s)	鷓山, 知
Citation	大阪大学, 2006, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/46546">https://hdl.handle.net/11094/46546</a>
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、 <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉</a> 大阪大学の博士論文について <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">〈/a〉</a> をご参照ください。

***Osaka University Knowledge Archive : OUKA***

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

Osaka University

氏名	鵜山 とも知
博士の専攻分野の名称	博士 (薬学)
学位記番号	第 20256 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	産生機構の異なる細胞外細菌 DNA の遺伝子伝播への寄与
論文審査委員	(主査) 教授 那須 正夫 (副査) 教授 前田 正知 教授 高木 達也 教授 土井 健史

#### 論文内容の要旨

遺伝子の水平伝播は、細菌の遺伝的多様化を推進し、形質の効率の良い獲得を可能にする。このような細菌の遺伝子水平伝播における遺伝子媒体の一つとして、細胞外 DNA がある。細胞外 DNA とは、細胞外に存在する裸の DNA のことであり、様々な環境中に存在していることが報告されている。比較的多量に存在すること、細菌に取り込まれ遺伝的に保持され得ることから、細胞外 DNA は環境中における遺伝子プールとして存在している可能性が示唆されている。しかし、環境中において、細胞外 DNA の形質転換能に対する知見がほとんど得られていないため、細胞外 DNA の細菌における遺伝子伝播への寄与は、その量や長さのみをもとに推測されている。

そこで、本研究では、環境中に多く存在し、高い形質転換能をもつと考えられる細菌由来の細胞外 DNA の形質転換能について検討した。細菌からの DNA の放出過程における分解、損傷による DNA の形態の変化は、その後の細胞外での分解、他の生物による取り込み、吸着などのプロセスに大きく影響する。したがって、細胞外 DNA を遺伝子プールとして考える上で、まず DNA が細菌から分解や損傷を受けずに放出されるかどうか知る必要がある。その主要な産生機構である、1) 原生動物による捕食、2) ファージによる溶菌、3) 増殖に伴う放出により、産生される細胞外 DNA について、形質転換能に影響を及ぼすと考えられる量と分解の程度を検討した。さらに、放出後の消長及び、会合物質の影響を明らかにすることで、環境中の細胞外 DNA の形質転換能について考察した。

まず、単純なモデル系を用いて、これらの産生機構により放出された大腸菌の DNA の分解の程度を検討した。その結果、活発に増殖している大腸菌細胞の約一割が自己溶菌し、その際には、ほとんど分解されることなくクロモソームおよびプラスミドの DNA が細胞外に放出された。また、増殖中の自己溶菌と同様、 $\lambda$ gt11、 $\phi$ X174、あるいは T4 ファージによって溶菌した大腸菌から DNA はほとんど分解を受けずに細胞外に放出された。一方、原生動物である従属栄養微小鞭毛虫 (HNF) によって捕食された大腸菌の DNA は、ほとんどが形質転換不可能な長さに分解されて放出された。このことから、原生動物による捕食に比べ、ファージによる溶菌および、増殖中の自己溶菌は、形質転換可能な細菌由来の細胞外 DNA の産生への寄与が大きいと考えられる。ただし、小さいプラスミド DNA はいずれの機構においても、形質転換可能な形で放出されることから、環境中ではクロモソーム DNA や大きいプラスミドの DNA より、小さいプラスミド DNA の方が、遺伝子プールとなりやすいと考えられる。この知見から、由来となる DNA の大きさ、形態とともに、生息する生物の種および量を考慮することで、種々の環境中において産生される細胞外 DNA の形質転換能を推測可能であると考えられる。

実際に、この知見をもとに、細菌から放出された DNA の消長を、河川水を用いたマイクロゾムにより検討した。環境中では、産生された細胞外 DNA は、分解、他の生物による取り込み、懸濁粒子への吸着など様々なプロセスを経ることにより、形質転換能が変化すると考えられる。細菌からの DNA の放出に、原生動物の捕食、ファージによる溶菌が関わる場合を比較するために、原生動物の捕食が存在する系と存在しない系を作製し、プラスミド pGFPuv をもつ大腸菌を添加した。そして、この二種類の系における細胞外 DNA の細菌からの DNA の放出、分解、残存について詳細に解析した。その結果、河川などの水圏環境中では、放出された DNA の大部分は急速に分解されるが、その一部は懸濁粒子などに付着することによって遺伝子プールとなる可能性が示された。さらに、いずれの系においても、DNA が放出されてから数日後、ほぼ同量のクロモソーム DNA およびプラスミド DNA が残存していたことから、このような細胞外 DNA が比較的速やかに分解される環境中では、細菌から放出される DNA は、放出される量にかかわらず、ある一定量のみが残存し、遺伝子プールとなる可能性が示唆された。

さらに、本研究では、細菌から放出される DNA に会合している物質の、形質転換に対する影響について、大腸菌を用いて検討した。原生動物による捕食、あるいは増殖中の自己溶菌によって細菌から放出された DNA を未精製の状態で用いた場合、大腸菌の形質転換効率が著しく低かった。このことから、放出された DNA に会合している物質、あるいは細胞外で DNA に会合する物質が存在し、これらの物質が会合することにより DNA の形質転換能が低下した可能性が示された。したがって、環境中に存在する細胞外 DNA には会合物質が存在する可能性が高いことから、環境中において大腸菌の形質転換が起こる可能性が低いことが考えられる。また、自然形質転換可能な細菌種では、このような菌体由来の DNA 会合物質により形質転換が阻害されないことから、環境中において形質転換される細菌のほとんどが自然形質転換能をもつ細菌種であると考えられる。

本研究により、細菌由来の細胞外 DNA 産生について基礎的知見を得た。そして、この知見をもとに、遺伝子伝播の媒体である細胞外 DNA を効率よく広範囲に拡散しうる可能性のある流水系において、放出された DNA が遺伝子プールとなる可能性を示した。そして、DNA 会合物質による形質転換への影響から、環境中で形質転換される細菌種について重要な知見を得ることが出来た。本研究で得られた知見から、遺伝子プールとなる細胞外 DNA の産生、消長にかかわる環境因子について議論することが出来ると考えられる。

#### 論文審査の結果の要旨

自然環境中には、細菌由来の裸の DNA が溶存態あるいは種々の物質に付着した状態で存在する。細菌はこのような細胞外 DNA を取り込み、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。細胞外 DNA を介した遺伝子の獲得（形質転換）は、細胞同士の接触を必要とする接合やファージによる形質導入とは異なり、系統的に離れた細菌間における遺伝子伝播を可能とする。したがって本過程は、自然環境中における細菌の遺伝子伝播・形質獲得を考えるうえで重要である。

本研究は、自然環境中における細菌由来の細胞外 DNA の遺伝子伝播への寄与を明らかにすることを目的とし、産生機構の異なる細胞外 DNA の性状の違いおよび DNA 会合物質の遺伝子伝播への影響について検討したものである。その結果、自己溶菌およびファージ感染においてクロモソームおよびプラスミドは、ほとんど分解を受けない状態で細胞外に放出されるのに対し、原生動物による捕食の場合には、大型プラスミドやクロモソームは分解されたのち細胞外に放出されることを明らかにした。これは、自己溶菌およびファージ感染による溶菌が、遺伝子伝播に関わる細胞外 DNA の産生に寄与していることを示すものである。また河川水を用いたマイクロゾム実験により、細胞外に放出された DNA の一部のみが、遺伝子プールとして環境中で残存する可能性を示した。さらにプラスミド DNA は菌体由来の物質が会合した状態で放出されること、および会合物質はプラスミドによる形質転換の頻度を低下させ、形質転換可能な細菌種を制限することを明らかにした。

本研究は、溶菌に伴い放出される細菌 DNA の性状・遺伝子伝播への寄与を明らかにした先駆的な研究であり、その成果は自然環境中における遺伝子の流れおよび細菌の環境適応・多様化機構の解明など、微生物学の進歩に大きく貢献することから、博士（薬学）に値するものと判断する。