

一細胞レベルの解析によるプラスミドの土壌細菌集団中における真の宿主域の決定

True host ranges of plasmids determined by a single cell analysis in soil microbial community.

○新谷 政己^{1,2}, 松井 一泰², 井上 潤一¹, 野尻 秀昭², 大熊 盛也¹ (¹理研・BRC-JCM, ²東大・生物工学セ)

○Masaki Shintani^{1,2}, Kazuhiro Matsui², Jun-ichi Inoue¹, Hideaki Nojiri², Moriya Ohkuma¹ (¹Riken, BRC-JCM, ²Univ Tokyo, BRC)

【目的】プラスミドは様々な細菌間を接合伝達によって移動する遺伝因子である。プラスミドが宿主とできる細菌の種類(=宿主域)については、古くより重要な性質として調べられており、細菌の門・綱を越えて接合伝達可能な「広宿主域」プラスミドと、同一の属・種細菌間のみを接合伝達可能な「狭宿主域」プラスミドとに大別されてきた。しかしこれらの宿主域は、培養法に依存した接合実験によって決定されたため、未培養・難培養性細菌を多数含む実環境中の宿主域を必ずしも正確に反映していない可能性が高い。本研究では、供与菌と土壌細菌集団とを混合し、培養を介さずに一細胞レベルで接合伝達体を検出・分離することで、プラスミドの真の宿主域の解明を目指した。

【方法】「広宿主域」プラスミドのグループとして知られる不和合性(Inc)P-1 群に属する pBP136 と、「狭宿主域」プラスミドグループとして知られる IncP-7 群に属する pCAR1 を解析対象とし、GFP を接合伝達体でのみ発現するシステムを導入した。その後、*Pseudomonas putida* KT2440 派生株を供与菌として土壌細菌集団と混合し、出現した接合伝達体を、緑色蛍光を指標にしたフローサイトメトリーによって一細胞ずつ検出・分離した。分離後の接合伝達体一細胞を、①培養せずに Phi29 ポリメラーゼによって直接全ゲノムを増幅後遺伝子解析、②培養後にゲノムを抽出して遺伝子解析(対照実験)、を行った。遺伝子解析は、各プラスミド上の複数の領域を PCR で増幅することでプラスミドの有無を確認し、別箇に 16S rRNA 遺伝子を増幅して、その一部の塩基配列を決定することで接合伝達体の属種の同定を行った。

【結果】pBP136 については、①②双方から *Proteobacteria* 門に属する様々な接合伝達体を得られたが、①の手法からは *Bacteroidetes* 門、*Firmicutes* 門に属する細菌も得られた。一方、pCAR1 は γ -*Proteobacteria* 綱の *Pseudomonas* 属細菌を宿主とすることが従来知られており、①②双方の手法から得られた多くの接合伝達体も *Pseudomonas* 属細菌であった。興味深いことに①の手法から β -*Proteobacteria* 綱に属する *Defltia* 属細菌と推定される宿主を得ることに成功した。以前の研究で pCAR1 や類似のプラスミドが β -*Proteobacteria* 綱の細菌を宿主とできなかったことを考慮する^{1,2)}と、このような接合伝達体は、従来の手法では得られない可能性が高い。本研究の結果は、土壌由来の細菌集団内におけるプラスミドの接合伝達現象を一細胞レベルで解析することによって、いわゆる「狭宿主域」プラスミドが、綱の異なる細菌に接合伝達しうる可能性を示す初めての例と考えている。

(1) Shintani et al., 2006, Appl. Environ. Microbiol. 72:3206, (2) Yano et al., 2010. J. Bacteriol. 192:4337.