今日の話題

細菌プラスミドの宿主適応と進化 実験進化からプラスミド進化の仕組みを探る

細菌プラスミドは、複製起点と細胞内コピー数を一定に保つ機能を有する染色体外DNA分子の総称で、本質的には、細胞同士の接触か形質転換により細菌集団内に拡散する寄生体である。プラスミドは、その複製や接合伝達、分離後細胞死 (post-segregational killing) などの機能が解明されるとともに、遺伝子工学のツールへと利用されてきた。海外では現在、抗生物質耐性拡散の主要因子であるプラスミドに再び注目が集まっており、その性質の進化生態学的視点による解明が期待されている。

抗生物質が恒常的に流入する病院の下水処理施設や農薬が定期的に供給されている農地のような環境では、抗生物質耐性や農薬分解を支配するプラスミドをもつ菌が数多く存在する。このような環境でなくとも、広範にプラスミドは存在し、菌に必要とされたときに現れることから、プラスミドは形質遺伝子のリザーバー (reservoir) と呼ばれている。なぜプラスミドは自身に対する正の選択が一見働かない環境にも存続できるのだろうか。この疑問に対し、まずは数理モデルを用いてプラスミドの動態を説明する試みがあり⁽¹⁾、つづいて実験進化法を用いた研究から「宿主がプラスミドに適応する」説⁽²⁾が提唱された。ただ、実験進化法を用いた過去の研究では、適応の分子機構が解明できない点や利用可能なプラスミドの種類の限定性で問題があった。現在ではさまざまなプラスミドの環境中の実態が判明し、分子遺伝学的手法を適応できる細菌の種類が増え、シーケンシング技術も格段に進歩した。このような背景のもと、筆

者らアイダホ大学グループは、「長期にわたる抗生物質や農薬のようなプラスミド保持に対する正の選択が、選択圧消失後の宿主とプラスミドの関係に影響を与える」という仮説を、耐性プラスミドを用いた実験進化で実証し、さらに、適応の機構を推定することができた。本稿ではその成果の一部を紹介する。

プラスミドの存続性 (plasmid persistence) とは、「プラスミド保持に対する選択圧がない環境における、細菌集団内でのプラスミドコピー数の持続性」である。プラスミドの存続性は、1) 細胞分裂に伴い細胞がプラスミドを失う頻度 (ロス率)、2) プラスミドをもたない細胞にプラスミドが伝達される頻度、3) プラスミドをもつ宿主ともたない宿主の成長速度の差 (フィットネス・コスト) で決まり⁽³⁾ (図1)、各パラメータは統計学的手法で推定することができる⁽⁴⁾。理論上、プラスミドは、娘細胞への分配に失敗しても、水平伝達が頻繁に起きるなら集団から失われない。広範囲の細菌種で複製できる広宿主域性プラスミドの存続性は宿主によって異なる⁽⁴⁾。ここでは、プラスミドが最初存続しにくかった集団内で存続できるようになることを宿主への適応と呼ぶ。プラスミド保持に対する長期にわたる正の選択によって、宿主への適応は起こるだろうか。これを検証するため、筆者らは、広宿主域性IncP-Iグループで自己伝達性プラスミドのpB10⁽⁵⁾とpBP136⁽⁶⁾を使用し、これら耐性プラスミドをもつ細菌をバッチ培養し、定常期になった培養液の一部を新しい培地に移すことを繰り返す進化実験を行った。

図1 ■ プラスミドの存続性を決める3つのパラメータ

1. 細胞分裂に伴うプラスミド・ロスの頻度（垂直伝達の頻度と置き換え可能）；2. 水平伝達の頻度；3. プラスミドをもつ細胞と持たない細胞の成長速度の差（フィットネス・コスト）。複製、分配、分離後細胞死の効率は「1」のパラメータに影響を与える。すべての遺伝子は「3」のパラメータに影響を与える。

*Pseudomonas putida*にpB10を保持させ、定期的な人為的接合伝達でpB10を先祖宿主に戻しながら継代培養を繰り返すと、先祖宿主集団内での存続性が向上した進化型プラスミドが得られた⁽⁷⁾。それは複製開始タンパク質遺伝子（*trfA*）に点変異をもつものだったが、本変異の意義は不明である。一方、*Stenotrophomonas maltophilia*にpB10を保持させ、同様の方法で継代培養を繰り返すと、接合にかかわる膜タンパク質遺伝子（*trbC*）に点変異をもつ進化型プラスミドが得られた⁽⁸⁾。この変異は、伝達頻度の増加とフィットネス・コストの低下の両方に関与すると推定された。

*Shewanella oneidensis*にpBP136または伝達関連遺伝子群を欠損させたミニpBP136を保持させると、*trfA*に変異をもつ進化型プラスミドが得られた⁽⁹⁾。この場合の*trfA*変異はpB10のときとは異なる部位に存在し、さらに集団レベルでは変異に多型が認められた。*trfA*は翻訳フレーム内部に翻訳開始部位が2つあり、複製開始タンパク質TrfA1と、そのC末端部分に相当するTrfA2をコードする⁽¹⁰⁾。変異は、*trfA1*の5'末端領域のフレームシフト変異とフレーム内の欠失および点変異に大別でき、いずれもTrfA2のアミノ酸配列には影響を与えなかった⁽⁹⁾。一方、伝達能を有するpBP136を進化させた場合は、*trfA1*のフレームシフト変異のみが検出された。その後の解析で、野生型TrfA1はTrfA2に比べ、

いくつかの宿主で成長阻害を引き起こす性質があること、フレーム内変異はTrfA1の毒性の低下をもたらし、かつプラスミド・コピー数の増加にも関与することが判明した。したがって、フレーム内変異はフィットネス・コストの低下とロス率の低下の両方に関与し、フレームシフト変異はフィットネス・コストの低下のみに関与すると推定された。以上の結果から、プラスミドは宿主に適応するが、適応機構は様々であるという知見が得られた。

ミニpBP136の進化実験の各時点で冷凍保存した集団を調べると、100世代目時点から1,000世代目時点までのほぼすべての時点で、各集団に複数の*trfA*遺伝子変異型が存在した⁽¹¹⁾。進化実験前期ではフレームシフト変異、後期ではフレーム内変異をもつプラスミドが優占していたが、これら2タイプの進化型プラスミド間で宿主の成長速度の差は検出できなかった。このように、適応的な突然変異をもつアリル間で競争が起き、特定の（適応的な）アリルが集団内に固定されにくい現象は、クローン干渉（clonal interference）⁽¹²⁾と呼ばれ、性をもたない生物集団の進化で観察されるが、プラスミド進化でも該当することが判明した。

広宿主域性プラスミドは、「広範囲の宿主に効率良く伝達される」性質（promiscuous nature）をもつとされる。宿主適応に伴うこの性質の変化を調べるため、ミニpBP136と伝達性pBP136を用いて、祖先型プラスミドと*S. oneidensis*に適応したそれぞれの進化型プラスミドが、ほかの宿主（*E. coli*, *P. putida*, *P. aeruginosa*, *Sphingobium japonicum*, *Cupriavidus pinatubonensis*）でも複製できるか解析した。進化型プラスミドは*P. aeruginosa*でのみ複製できなかった一方で、複製できる宿主における進化型プラスミドの存続性は祖先型と同様かそれよりも高かった。また、ミニpBP136の細胞内コピー数と形質転換効率は進化型よりも祖先型プラスミドのほうが高かった⁽¹⁰⁾。さらに、伝達性pBP136の伝達頻度は、進化型プラスミドのほうが低かった。すなわち、ある特定宿主への適応により、プラスミドが存続性の獲得と同時に「広範囲の宿主に効率良く伝達する」性質を失う形質のトレード・オフが起きることが判明した。

今回、「プラスミド保持に対する長期にわたる正の選択が、選択圧消失後の宿主とプラスミドの関係に影響を与える」例を紹介した。データベースにあるIncP-1プラスミドには*trfA*の5'末端に変異をもつ例が希でない

ことから、筆者らは、実験進化で得た知見に基づき、自然界での *trfA* の多型性の意義を説明できたと考えている。ところで、液体培地でも接合伝達自体は起きるにもかかわらず、筆者らの一連の実験進化においては、定期的な人為的接合でプラスミドを新しい宿主に移す作業をしない限り、プラスミド伝達機能の低下または消失は観察できても、伝達機能が上昇する進化は観察できなかった。伝達機能の実験進化は基礎と応用の両面から見て面白い課題と筆者は考えている。伝達機能の進化には、1) 異種間移動がプラスミドの存続に有利になる環境、2) 宿主の成長速度が遅い環境、3) 多様な適応変異を包含できるとされる空間構造（バイオフィームや固形培地など）の存在が関与するのではと推測しており、これらの点を今後検証したいと考えている。

謝辞：本稿を執筆するにあたり、東北大学の津田雅孝教授と高エネルギー加速器研究機構の佐藤優花里博士から助言をいただきました。

- 1) F. M. Stewart & B. R. Levin : *Genetics*, **87**, 209 (1977).
- 2) J. E. Bouma & R. E. Lenski : *Nature*, **335**, 351 (1988).
- 3) F. R. Slater *et al.* : *FEMS Microbiol. Ecol.*, **66**, 3 (2008).
- 4) L. De Gelder *et al.* : *Microbiology*, **153**, 452 (2007).
- 5) A. Schlüter *et al.* : *Microbiology*, **149**, 3139 (2003).

- 6) K. Kamachi *et al.* : *Microbiology*, **152**, 3477 (2006).
- 7) L. De Gelder *et al.* : *Genetics*, **178**, 2179 (2008).
- 8) H. Heuer *et al.* : *FEMS Microbiol. Ecol.*, **59**, 738 (2007).
- 9) M. Sota, H. Yano *et al.* : *ISME J.*, **4**, 1568 (2010).
- 10) H. Yano *et al.* : *J. Bacteriol.*, **194**, 1533 (2012).
- 11) J. M. Hughes *et al.* : *MBio.*, **3**, e00077 (2012).
- 12) J. A. de Visser & D. E. Rozen : *Genetics*, **172**, 2093 (2006).

(矢野大和, 東京大学大学院新領域創成科学研究科)

プロフィール

矢野 大和 (Hirokazu YANO)

<略歴> 2002年東北大学農学部応用動物科学科卒業/2008年同大学大学院生命科学研究科修了(博士(生命科学))/同年 University of Idaho, Institute of Bioinformatics and Evolutionary Studies, Postdoctoral fellow/2012年東京大学大学院新領域創成科学研究科特任研究員/2013年同研究科特任助教<興味をもっていること> Microbial Population Biology, Toxin-antitoxin系の発現制御, 原核生物におけるエピジェネティクス, 動くDNAの機能を利用した生物育種または生物工学<趣味> ルアー・フィッシング