

機関番号：34419

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20570027

研究課題名(和文) 水銀耐性トランスポゾン指標にした細菌の遺伝子水平伝播頻度の解析

研究課題名(英文) Estimation of the bacterial horizontal gene transfer frequency in environment from the transposition of mercury resistance transposon.

研究代表者

松井 一彰 (MATSUI KAZUAKI)

近畿大学・理工学部・講師

研究者番号：40435532

研究成果の概要(和文)：

遺伝子の水平伝播現象が細菌の進化や遺伝情報獲得に関与していることは古くから知られている。バクテリアの遺伝子水平伝播はプラスミドやトランスポゾンのような「可動性遺伝因子」を介しておこなわれるが、その伝達頻度や遺伝子の地理的な分布については不明な点も多い。

本研究では、「TnMER11」型の水銀耐性トランスポゾン指標として、トランスポゾンが世界各地の異なる細菌間で広く共有されていることを明らかにした。またトランスポゾンの定量法を検討し、土壌におけるトランスポゾンの不均一な分布を定量的に示した。これらの結果より、野外における遺伝子の水平伝播現象を具体的に示すことができた。

研究成果の概要(英文)：

Horizontal gene transfer (HGT) is known to be an important mechanism for acquiring new genetic information in bacterial evolution. Mobile genetic materials, such as plasmid and transposon, contribute to HGT events among bacteria, while their transfer frequency and geological distribution have yet to be characterized well. This study demonstrated the worldwide distribution of TnMER11 type transposons among bacteria. Further quantitative analysis showed the uneven distribution of TnMER11 type transposons in soil environments. These results indicate the occurrence of bacterial HGT in natural environment.

(1)

交付決定額

(金額単位：円)

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|--------|-----------|-----------|-----------|
| 2008年度 | 2,000,000 | 600,000 | 2,600,000 |
| 2009年度 | 1,000,000 | 300,000 | 1,300,000 |
| 2010年度 | 800,000 | 240,000 | 1,040,000 |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 総計 | 3,800,000 | 1,140,000 | 4,940,000 |

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：基礎生物学・生態・環境

キーワード：遺伝子水平伝播、水銀耐性細菌、水銀耐性トランスポゾン、遺伝子の分散

1. 研究開始当初の背景

細菌細胞においては、プラスミドやトランスポゾンといった「可動遺伝子」を介して遺伝子の水平伝播がおこる事が、古くから知られている。近年、DNAの解析技術が飛躍的に発展し、ゲノム単位での解析が行われるよう

になった結果、細菌の進化および新しい表現型の獲得には遺伝子の水平伝播が大きく寄与している事が明らかになってきた。

しかし実際の環境中において遺伝子の水平伝播がどれくらいの頻度で行われているのかについて評価した研究は少ない。その理

由として 1)膨大な数の土着細菌の中から、特定の細菌間で行われた遺伝子伝播現象を定量的に検出し、その頻度を評価する有効な手法が確立されていない事。 2)遺伝子の水平伝播が生態系の中で起こっている現象であるにも関わらず、生態系と遺伝子の水平伝播を関連づけた研究アプローチがほとんど行われていない事が挙げられる。

2. 研究の目的

野外において実際に水平伝播していると考えられる「TnMER11」型水銀耐性トランスポゾン指標遺伝子として、以下の項目を明らかにすることを目的とした。

- (1) 環境中における「TnMER11」型トランスポゾンの分布状況の解析。
- (2) 「TnMER11」型トランスポゾンを定量するための、環境サンプル中に存在する特定対象遺伝子コピー数の定量方法の検討。および実験生態系を用いた遺伝子水平伝播頻度の定量化。
- (3) 「TnMER11」上にコードされた水銀耐性遺伝子の、実際の水銀耐性能の検証。

3. 研究の方法

(1) 世界各地の土壌サンプルから、土壌中に存在する芽胞形成水銀耐性細菌を分離した。分離した菌の水銀耐性能を評価後、細菌より全 DNA を抽出し、トランスポゾンの IR 配列を対象とした PCR によって、

「TnMER11」型トランスポゾンの有無を検証した。トランスポゾンの増幅が見られた場合は、RFLP 解析によってトランスポゾンの分類をおこなった。

(2) 環境中より DNA を抽出し、トランスポゾンを定量する方法について検討をおこなった。

①土壌環境からの DNA の抽出：市販の DNA 抽出キットを用いて一定量の土壌から全 DNA の抽出をおこなった。使用する土壌によって抽出された DNA 量にばらつきが生じるため、抽出した DNA 濃度を調整後、定量 PCR 実験中に含まれる DNA 量を定量した。

②水環境からの DNA の抽出：水中に含まれる DNA を濾過によってフィルター上に回収し、DNA の抽出・精製をおこなった。

③定量 PCR 法の検討：「TnMER11」型トランスポゾンの構成遺伝子である *merA* (1,896bp) を対象に定量 PCR 法を検討した。*merA* 上の、定量に適した塩基配列領域の検討についても同時に実施した。また *merB1* やその他ウイルス DNA についても同様の検討をおこない、環境サンプルを用いた定量を実施した。

④実験生態系を用いた遺伝子水平伝播頻度の定量化：淀川河川土壌を用いた実験生態系を作製した。水銀をはじめとする各種選

択圧の有無が、遺伝子の伝播頻度に及ぼす影響について経時的に評価した。

(3) 「TnMER11」型トランスポゾンは有機水銀分解遺伝子 *merB* を 1~3 種類持つことが DNA 塩基配列より知られている。しかしこれら *merB* の実際の機能については不明である。そこで各 *merB* 遺伝子の機能について検証をおこなった。

4. 研究成果

(1) 環境中における「TnMER11」型トランスポゾンの分布状況の解析。

国内外 38 箇所の土壌サンプルを調べたところ、14 箇所より「TnMER11」型トランスポゾンを持つ芽胞形成水銀耐性細菌が見つかった。16SrDNA の塩基配列を基にした分類から、同型のトランスポゾンが異なる菌種間で共有されていることがわかり、遺伝子の水平伝播現象が確認された。

トランスポゾンは計 5 種類が見つかり、このうちの 1 種類はこれまでに論文報告がされていない種類であった。またこれまで報告例がなかった南半球の土壌からも、「TnMER11」型トランスポゾンが発見された。

(2) 環境サンプル中に含まれる特定遺伝子コピー数の定量方法の検討。

①土壌環境からの DNA 抽出法について

Phenol 抽出を元にした抽出法、市販の抽出キットを用いた抽出法など、既存の複数の抽出法を元にして、回収量と純度を基準に本研究に適した方法を比較検討した。検討した内では市販の抽出キットを使用した場合が回収量、純度ともに最も適正であった。結果については学会発表①で報告した。

②水環境からの DNA の抽出法について

吸着性物質でコートしたメンブレンフィルターを用いて、水中の懸濁物質を濾過回収し、DNA を抽出・精製した。フィルターをコートする方法については既存の方法を比較検討した。方法の詳細および実例については雑誌論文②に発表し、学会発表③、④でも報告した。

③定量 PCR 法の検討

merA (1,896bp) 上に 4 つの領域を設定し、各領域を対象としたプライマー・プローブセットを比較することで、定量に最適な 1 領域を決定した。また *merB1* (657bp) についても同様の検討をおこない、定量に使用する領域を決定した。次に淀川河川敷 6 箇所から土壌を採取して、土壌 1 g あたりに含まれる *merA* のコピー数の定量をおこなった。得られた *merA* のコピー数は 3.0×10^4 - 3.0×10^5 で、約 1m ほどの近接する土壌間でもコピー数に 5 倍以上の差が見られる場合があった。このことから土壌においては水銀耐性細菌が不均一に分布している様子がうかがえた。結果については学会発表①

でも報告した。

実験生態系を用いた遺伝子水平伝播頻度の定量化実験においては、設定した条件下では、定量される遺伝子のコピー数に有意な差が見られなかった。今後の結果を基に実験条件を再設定することが、目的達成への近道であると予想される。

(3) 「TnMER11」型トランスポゾンの構成遺伝子である3つの有機水銀分解遺伝子 *merB1*、*merB2*、*merB3* の異なる有機水銀に対する基質特異性と分解特性を調べた。*merB1* と *merB3* はメチル水銀をはじめとする複数の有機水銀に対する高い分解特性を示すことがわかった。一方で、*merB2* はメチル水銀をはじめとする有機水銀分解能を示さなかった。結果については雑誌論文①と学会発表②で報告した。研究結果(1)に記した、今回新たに見つかった「TnMER11」型トランスポゾンは *merB2* を保持していない。今後の詳細な解析から、「TnMER11」型トランスポゾンの進化が明らかになることが考えられる。

(6) 今回の研究を通じて「TnMER11」型トランスポゾンが世界各地に分散している状況が把握できた。また同型のトランスポゾンが、地理的に離れた異なる細菌間で共有されており、遺伝子の水平伝播を確認することが出来た。また「TnMER11」型トランスポゾンを定量するための実験方法についても確立することができた。

これらのことから、「TnMER11」型トランスポゾンは国内外に広く分布しており、かつ自然界で実際に水平伝播している可動遺伝子として、環境中の遺伝子伝播現象を調べるマーカーとして有用であることがわかった。また「TnMER11」型トランスポゾンの転移頻度の検証にも、今回確立した定量方法が利用できると思われる。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計2件)

- ① Chien, M. F., M. Narita, K. H. Lin, K. Matsui, C. C. Huang, and G. Endo. (2010) Organomercurials removal by heterogeneous *merB* genes harboring bacterial strains. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 110: 94-98. 査読有り
- ② Honjo, M. N., T. Minamoto, K. Matsui, K. Uchii, H. Yamanaka, A. A. Suzuki, Y. Kohmatsu, T. Iida, and Z. Kawabata. (2010) Quantification of cyprinid herpesvirus 3 in environmental water by using an external standard virus.

Applied and Environmental Microbiology 76: 161-168. 査読有り

[学会発表] (計4件)

- ① 吉浪賢史、成田勝、遠藤銀朗、松井一彰 「水銀還元酵素遺伝子 (*merA*) を指標にした土壌の水銀耐性細菌数評価の試み」第26回日本微生物生態学会 つくば、つくば大学、2010年11月25日、講演番号P-193.
- ② 成田勝、簡梅芳、松井一彰、黄介辰、遠藤銀朗 「Capacity and specificity of organomercurials detoxification by heterogeneous *merB* genes expressed in recombinant *Escherichia coli*」第24回日本微生物生態学会 札幌、北海道大学、2008年11月26日、講演番号07-121.
- ③ 松井一彰、本庄三恵、川端善一郎、内井喜美子 「大腸菌における遺伝子水平伝播経路を指標にした淡水環境特性の評価」第24回日本微生物生態学会 札幌、北海道大学、2008年11月26日、講演番号04-068.
- ④ 本庄三恵、源利文、松井一彰、内井喜美子、山中裕樹、鈴木新、神松幸弘、飯田貴次、川端善一郎 「環境水中に存在するコイヘルペスウィルスの定量」日本陸水学会第73回大会、札幌、北海道大学、2008年10月11日、1B18.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

松井 一彰 (MATSUI KAZUAKI)
近畿大学・理工学部・講師
研究者番号：40435532

(4) 研究協力者

遠藤 銀朗 (ENDO GINRO)
東北学院大学・工学部・教授
研究者番号：80194033