

低栄養性海洋細菌 *Pseudoalteromonas* sp. MW11 の新規プラスミド解析

Analysis of novel plasmid DNA from oligotrophic marine bacterium

Pseudoalteromonas sp. MW11

小林 照幸・福井 貴史

Teruyuki KOBAYASHI and Takashi FUKUI

低栄養性細菌の解析は、未知の代謝経路の発見や生物多様性・物質循環における細菌の位置付けに関する知見を得る可能性が高いだけでなく、低コストの触媒、物質の生産、環境浄化など工業的側面からも重要である。我々はこれまでに多くの低栄養性細菌を様々な環境中から単離してきた。その中で海水から単離した *Pseudoalteromonas* sp. MW11 株については、形態・生理・生化学的な特徴を最も詳細に調べている。

本研究ではこの細菌より新規プラスミド pPAMW を見出し、その解析を行なった。pPAMW の大きさは 4,490 bp であり、4 つの ORF を見出した。ORF1 および ORF4 がプラスミド DNA の複製に関与し、ORF2 および ORF3 が転写調節に関与することが示唆された。しかし、低栄養下における代謝・増殖に直接関与する遺伝子は見出せなかった。

I. はじめに

環境中には多種多様の細菌が存在しており、有機物の分解、窒素固定、炭素固定など、物質循環と環境保全において非常に重要な役割を果たしている。低栄養性細菌は非常に低濃度の炭素源の存在下で増殖可能であり、Kuznetsov らは「1-15mg/L 以下の炭素源でも増殖可能な細菌」と定義している¹。多くの研究者が超低濃度の炭素源での増殖に着目し、実際に、様々な自然環境中から多くの低栄養性細菌が単離されてきた。しかし、遺伝学的アプローチによる研究は限られており、これらの細菌を調べる事によって新規の代謝経路の発見や生物多様性・物質循環における細菌の位置付けに関する知見を得る可能性が高い。更に、低栄養性細菌は、増殖のために僅かな栄養源しか必要としないことから低コストの触媒、物質の生産、環境浄化など工業的にも利用可能である。

連絡先：小林照幸 tkobayashi@cis.ac.jp

千葉科学大学薬学部薬学科

Department of Pharmacy, Faculty of Pharmacy, Chiba Institute of Science

(2021年9月28日受付, 2022年1月27日受理)

プラスミドは細菌の細胞内で、染色体 DNA とは別に存在する DNA であり、種々の微生物間を接合伝達によって移動可能な遺伝因子であることが知られている。様々な特徴を持つプラスミドが見つかり、自身の複製・維持に必要な遺伝子以外に宿主細胞に病原性、抗生物質耐性、物質代謝能等を付与する遺伝子を含んでいる。微生物はプラスミドを介した遺伝子の水平伝播により、様々な環境に対する能力を獲得すると考えられている^{2,3,4,5,6}。このことから、プラスミドがどのような遺伝子をもつのかという情報は環境バイオテクノロジー・医療分野においても重要であると言える。

我々はこれまでに多くの低栄養性細菌を様々な環境中から単離してきた。その中で海水から単離した *Pseudoalteromonas* sp. MW11 株については形態・生理・生化学的な特徴を最も詳細に調べている。本研究ではこの細菌が保有するプラスミド DNA の解析を行なった。

II. 実験方法

1. DNA の調製

Pseudoalteromonas sp. MW11 株は MB2216 培地 (Becton Dickinson) を用いて、好氣的条件下で 30°C、24 時間振と

う培養した。遠心分離 (15,000 g, 5 min) により集菌後、ゲノム DNA は NucleoSpin Microbial DNA (タカラバイオ) を使用し、プラスミド DNA は NucleoSpin plasmid EasyPure (タカラバイオ) を使用して精製した。

2. 塩基配列の解析

精製したプラスミド DNA を制限酵素 XhoI および HindIII で切断し、生じた約 4 kbp の DNA 断片を pBluescriptII SK(+) に繋いだ。pBluescriptII SK(+) の塩基配列中に含まれる、T3 プライマー領域 (ATTAACCTCACTAAAGGGAA) および T7 プライマー領域 (TAATACGACTCACTATAGGG) にプライマーを設計し、KOD-plus-neo (東洋紡) を使って約 4 kbp の DNA 断片を増幅した。更に、この増幅断片を鋳型とし、T3 プライマーおよび T7 プライマーを用いて塩基配列の決定を行なった。得られたプラスミド DNA の塩基配列の情報を元にプライマーウォーキングを行い、プラスミド DNA 全体の塩基配列を決定した。

3. 機能解析

プラスミド DNA の塩基配列を元に Nucleotide BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) を利用して相同性の高い DNA 配列を調べた。オープンリーディングフレーム (ORF) は ORFfinder (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/orffinder/>) を利用して推定した。ORFfinder によって推定された遺伝子は、Protein BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) を利用してアミノ酸配列の相同性が高いタンパク質を調べ、InterPro (<http://www.ebi.ac.uk/interpro/>) を利用してドメイン構造を解析し、タンパク質の機能を推定した。

III. 結果と考察

Pseudoalteromonas sp. MW11 株は海水から新たに単離した細菌であり、そのゲノム解析は行われていない。*Pseudoalteromonas* sp. MW11 株の様々な代謝機構を解析するためにはゲノム解析が必須であるためゲノム DNA の抽出を行なった。その結果、ゲノム DNA と比較すると明らかに小さい DNA 断片が見られた。この DNA 断片は *Pseudoalteromonas* sp. MW11 株が保有するプラスミド DNA であると考えられた。大腸菌用のプラスミド抽出試薬を利用して *Pseudoalteromonas* sp. MW11 株からプラスミド DNA を精製し、制限酵素処理を行なった結果、約 5 kbp の環状 DNA であることが分かった。これらの特徴から精製された DNA は *Pseudoalteromonas* sp. MW11 株のプラスミド DNA であることが明らかとなり、pPAMW とした。図 1 に pPAMW の全塩基配列を示した。全体の大きさは 4,490 bp であり、GC 含量は 39% であった。Nucleotide BLAST の結果、megablast では相同性の高い配列は見つからなかった。以前の報告において

Pseudoalteromonas sp. MW11 株は *Pseudoalteromonas carrageenovora* の近縁種もしくは新種である可能性が高いことを示したが⁷⁾、*P. carrageenovora* においても相同性の高い配列は見つからず、類似した塩基配列の報告がない新規のプラスミド DNA であることが分かった。

```

1: ATGACGAATAATAGCAACCGAGTACCCATTGAGCAAGCTTTAGCGGGTTTGAAGAAACCCCTCGGTATAA
ACACCAAGTTTCGAGCGCTTAGAGTCTGTAGACTCTAAGACGGCGAGATAAGCATCTAATATCAGCGAT
ACAGTACGTGAATCAAGCGCTTACCGCTTAAAGTACTTGAAGCTTCAATCAAAAGTGTGTTAGGTTTTATG
GTGCAGAGCCACATTAAGGCGAAGCGGCATCTAAAAGACATAGAACTTGTTCATGTTATCGCACTAGAA
TTCCCAACAGCTCAAGTATTGAAGTCGAGCAAGGCAAGGCAATTTTTCGTGGCTTATGCAATGTGCA
TCGGTTTGGAGTGCCTGTTGTGTGCAGCAAGATAAAGAGCGCAAGCGAATGGAATGCGAGTCCGCTTAA
ACCAAGCGTCTGAGCTTGGCTTAAAGCCCACTAGTGACATTTACAGCACTCATACCGCAGGATGATCAAT
TGATGCTTGTCTAATAAATGCGGAAGCGTTGGCTTCAATTTGGCGGAAGCTCAATCGCTAATTTGAA
AAGAGCGGAGCGCTCAAGGTAATATAAGGGCGTTGAGGTTGCTTACGGGGGAATGTTGGCATCCACAT
TTCCTAATTTGTTTTCTAAGGACAGTATTTAGGGGACACTGAACCGCTACTTGAAGTGGCAAGCGGT
TTGTGTTGCTGGATTGGATAAGCTAACGAGTATGTTGGATATTCAGGACCGCAGCAAGCGCGTGA
TATATCTGTAATTTGGCTCTGATGGTACTTGAAGGCTGACGGTCAAAAGTTAGCTGGATGCTG
CGATGAATTAACCAAGGCAATTAACCAAGCGCTACCGGGCAGTTGAGCCGCGGATGTTGCTGAT
CATTCTGAACCAACAGCATGAAGAAGTAAAAATACAGTGGCTATTCTGTTTTATGCCGAGCTATG
AAGGTGATCAGCATTAATGTTGGCTGCTTACGAAAGTGTGTTGAGCTGAGCTGAAAAACGATG
AAGAGCTATTGGCGAGTAAAGCAAGCAAAATATTATGTCATTAAGTGTCTTGAATGCTACTACT
AATCAAGAAATAAACACAGGAGTATTTTATGATTAGCCGAAACAGGCGGAGGAGGATGTCAGATAC
CTGTATAATGTAATCATAAGCATAAAGGGTGCAGTAAATGGGATGTTGCTATATTTATAGCGAAT
TTATGGCTAGCAGAGGCAACCCAGTTAAACATGTTTAAATGTTAGATATACAAAAACAGCTGTAAC
CCATGTAACAGTGGTTTTAACAGATTAACACTGTCACAAACACTGTAATTAGGTTTTCAATGAGCG
AAAAAAGTACACACACTGTCGGTAAATACATTTCTGACTGAGGAAAGAAAAAATTAAGTCAGCTGA
GTGTGGGAATTAAGCGGTATCTCGCTACTATTTCGGATATGAAAAAGGTTGAGGTTGCCAGCTCT
AAAGATTGCTTGGCTATGCCGATTTAAAAACAAGCGCTAACGATATTTAGCTGTGGTGTGCTT
TTGAGTTTACAAAGAGCGAAAGCAAAAGATATTCTAGAGATGATTAATCACTTATCAAGGCGTATTA
TTCATTTTCCGTTAAGTGCAGCTAAAAATTTAGTTAACGATGCAATGTCAGATGTCAGAGCAGCA
CATGCCAAACATTTGGATGAAATTAAGATATAGATGACTAGTGTATATTTTTAAGTAATGAAGATA
CGCAAAAAATAACAAAGGATTAATCTAGGTTATGAGGATGATTAATGCTAATGATGATTTACTGGTTT
CTGTCTAATGTTTTAGGCCCTCAATTTAGGCTTAGTCACGAAATTAAGGAGCAAAAGTAAAAACAG
ATCAACCATTAACAGGTCACATTTTAGTCTGGTTAAGTCAATCAAAAGGAGCAGGATGTCACATTTAG
GCGCTTGGCGCTGAGGCCACACTCCAAACAAACCTTCTCCTAATAGTAAATGGCCGCAACCGCAAGCG
GTACCCAAATAAAATTAAGGCGAGAACCCGAGCGCAGCAAGCGCTCCACTGCAACAGCTTTTTAGGTTT
ATAATGACTATTATGTAACCTTTTTAGTACTGATAATTCACCTATCTGTGGTATTTTTCTAAGTGC
CCCTATATGAAGGAGGAGCACTTTAAACCCGCGCTATAGATATATAGATACAGATAGAAATCTTAAAC
CACACTATATAGACATAACAGCCCTTAAACCTTATAGATAATTAACCTTATAGGTAGATGATTTAA
CCCACTAGGCTCTTCCGCTATCTCGAATAATATTTCCATTTGATGAGCTAATGCTTAGGGGTTTT
CATGCTGCAGAAAAGTAAAAAGCAAACTGTAATACTAATTAACAAAGCGCAATTTTACATCGCTAAA
TAGAATGGTATCAATGAAACATTTGGTTTTATTAACCTAATTAAGGAGGACAGCAATGTTCAAAAT
AAGAATAAAGTTAAAGATAGTTTGGTGTGACATCACACTGAGTTATCGAAGCTGATGCTTAGTTCAA
GGTTAAATTTAATTTGAACATAACAGTTTTTTGAGAGCTAAACCTCTTTTTAGGGAAGGAAAAACAG
GAAGGAAATGACAATCCCTTTATGATGCGCTAGGTAATCATCTTGTGTTGACCTAGAGGCGCATCA
ATCAATTTCTTTTGTGATTAATGAGTTACTTTACAGCTGATGATGTTGAAATTTGGCCGCTAGTTG
AAGATTAATCAACAGCATGTAATTTGGTTGTTGATGCTGATGTTTGAATTTGGCCGCTAGTTG
GCTATTTCTTTTCAATTTTCAAGTGTTTAGATTTCAATTTTACTTTCTGTGCTAATTTGTGACT
GTTGGTATCCCGAGCGCTGCATAATTTGATTTTACTATAAACTCCGTTCAAATTTATCGCTTGGCG
TGCTCATAAATACCCATCAAGCAATAAAAAAGTCTTCCATTTTCTGTTGATGATGTTGCTTTCCGTA
TGCTTAAAGGCTAAGCGCTGAGGCTGCTGTTGTTTTCAATCCAGCGCTCAAGGTTGCTCGCTAA
CCTGTAATAAATGATGCACTTCTTCTATCTATGACCTTGTGGTTTTACAAACCGCTCTTCTTAAATGC
CCATGTAAGTCACTATAAAGCGCTCTTGAACGTTGTTAAACATCATCTATCATGCGGTGATGATAAAC
CGTTATGTACCGGAATCAATCATAAATAATATAAATGATTTATTTAGCGTAAAAAGCAAAAGCGCTTAT
ATGAACAATCAAAAAATACGGGTATGCAAGTGAAGAGCAGCTGACAGCTGGCCAAAGTCAAGGCGAAG
TAGCAAAAGGAAACAAATTTCTCGCGCTTATTTATCACAATTTGAAATGGCAATTCGCAAGTTGACCGAT
TGAAATCGTTGACTGCTGACTATTACGAAGATTTGGGGTTGTTTTCAACTGATAAAGTAACTACAAA
GAAAAATGCAAAAGCGGTTATGGAAGCGCTCAAAAAAAGCTTGCATGTTGATGCTGAGTTAGTTAAGTGG
TTGATTTATCAGAGTTACTTCAAGTGGCGATTTAATGGCGCACTGAAATGCTGATACTGAATTTGA
ACAAATTAAGAGGAGGAAGGATTTCAATTTTCCGATGGCGCGAAGAAATCGCTTATGAAAAACCAAGGTGAT
TTATGCTTACTGAGTTTTTCTAAGTGTGCGCTGGCGAATTTACTTCAAGTGGGTTTTAGATTCATAG
AAGAAAAATGCCCAAGGTTATTTGCTGATGTCGCGCTGCACTACTTCAAGTGAATTTCAAAATTTGTTGC
TTCCGCTATTCGCTGCTGAGTCCAGAGATGACCGTGAATATGTAAGTTTTCAAAAGCGGTTGACGCT
GAGCTCAAAATATTATGCTAGTAAAGCATTTTGAATAATGGGCTTTTGTATGCTGTTAGCGCTGATAGC
GTTAATGTTATGAAAGTATAGTAAAAAGCAGTATGCTAGAACGAAAAAAGCCGCTGTTGAAAGCGG
GGTTTTCTTATTCGAATCACTTGGAGTCTAGTTTTAGCGGCTTCTCGAAGCAAAAGGCGTTTTATGCAACA
AACTACACAGCAAGCGGCTTACCGGAGGCTTATTGC: 4490
    
```

図 1. pPAMW の全塩基配列

図 2 に pPAMW で見つかった ORF を示した。Minimal ORF length を 300 ヌクレオチド、Genetic code を Bacterial, archaeal and plant plastid、ORF start codon を "ATG" and alternative initiation codons に設定し ORFfinder を利用して解析した結果、4 つの ORF が検出された。ORF1-3 は同じ向きでコードされており、ORF4 は相補鎖に逆向きでコードされていた。ORF1 の長さは 1344 ヌクレオチド (start:1, stop:1344)、447 アミノ酸、ORF2 の長さは 585 ヌクレオチド (start:1452, stop:2036)、194 アミノ酸、ORF3 の長さは 759 ヌクレオチド (start:3546, stop:4304)、252 アミノ酸、ORF4 の長さは 498 ヌクレオチド (start:3447, stop:2950)、165 アミノ酸であった。ORF 解析の結果から 2037-2949 ヌクレオチドの間に複製起点が存在していると考えられるが、この領域には一般的な複製起点に見られる共通配列は見出されなかった。このことから、pPAMW の複製起点は未知の配列から構成されると考えられた。

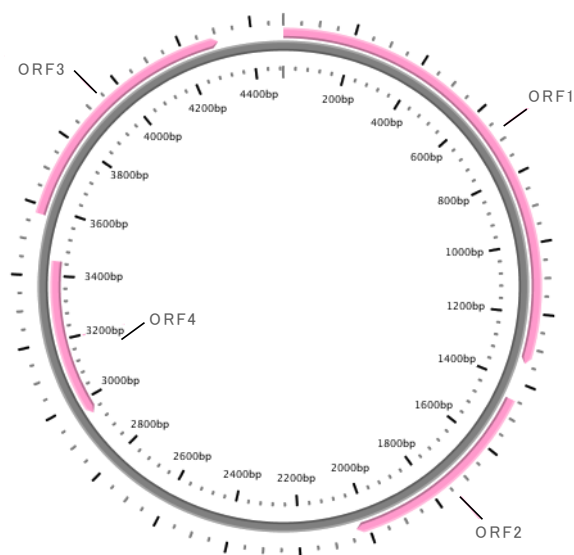


図 2. pPAMW の ORF

ORF のアミノ酸配列を元に Protein BLAST および InterPro による解析を行った。ORF1~4 のいずれにおいても最も相溶性が高かったタンパク質は、海水のメタゲノムプロジェクトにより見出された同一の *Pseudoalteromonas* 属に由来するタンパク質であり、その機能に関する詳細な情報は報告されていなかった (GenBank Accession No. NRA81808.1~NRA81811.1)。

ORF1 は多種の細菌の protein rep と高い相溶性を示したが、機能が調べられているタンパク質で最も類似性が高かったのは *Photorhabdus heterorhabditis* の保有するプラスミド DNA 上にコードされる、ローリングサーキュラー複製

の開始タンパク質⁹⁾ (protein rep) であり、62.79% の相溶性が見られた。InterPro での解析では特徴的なドメイン構造は見つからなかったが、以上の結果から、ORF1 はプラスミド DNA の複製開始に関わるタンパク質であると推定された。

ORF2 は多くのヘリックスターンヘリックス転写調節タンパク質と高い類似性を示し、機能解析されているタンパク質の中では *Bacillus subtilis* の転写調節タンパク質⁹⁾ と高い類似性を示し、相溶性は 29.36% であった。InterPro での解析においてもヘリックスターンヘリックスドメインが見出され、その機能は DNA との結合であることが予測されたことから、ORF2 は転写調節に関わるタンパク質であると推定された。

ORF3 は ORF2 と同じく多くのヘリックスターンヘリックス転写調節タンパク質と高い類似性を示し、InterPro での解析においても同じ結果が得られた。これらの結果から、ORF3 の機能は ORF2 と同じく転写調節に関わるタンパク質であると推定された。

ORF4 と高い類似性が見られたタンパク質は殆どが他の *Pseudoalteromonas* 属の細菌のものであり、DUF3653 domain-containing protein もしくは hypothetical protein であった。DUF3653 domain-containing protein は Xer 組換え機構に関与するタンパク質であり、一部のプラスミド DNA は、コンカテマーの分解に Xer 機構を利用することが知られている¹⁰⁾。InterPro による解析では機能の推定は出来なかったが、ORF4 は ORF1 と同様にプラスミド DNA の複製に関与していると推定された。

Pseudoalteromonas sp. MW11 株は、低栄養性海洋細菌である。この細菌の低栄養性を示す代謝機構はまだ明らかとなっていない。プラスミド DNA には物質代謝能等を付与する遺伝子を含んでいる場合があり、MW11 株で見つかったプラスミド DNA に低栄養性に関連する遺伝子が存在する可能性が期待された。しかし、本研究結果からプラスミド DNA に含まれる遺伝子はプラスミド DNA の複製と転写調節に関与するタンパク質であり直接低栄養性に関与するタンパク質ではなかった。*Pseudoalteromonas* sp. MW11 株が低栄養性を示す要因となる代謝機構を解明するため、今後はゲノム解析を行う予定である。

IV. 結論

本研究により低栄養性海洋細菌 *Pseudomonas* sp. MW11 株より新規プラスミド pPAMW を見出し、その塩基配列を明らかにした。大きさは 4,490 bp であり、その中に 4 つの ORF を見出した。ORF1 および ORF4 がプラスミド DNA の複製に関与し、ORF2 および ORF3 が転写調節に関与することが示唆された。低栄養下における代謝・増殖に直接関与する遺伝子は見出せなかった。

参考文献

- 1) Porter K G, Feig Y S : The use of DAPI for identifying and counting aquatic microflora. *Limnol Oceanogr*, 25, 943–948, 1980.
- 2) Kuznetsov S I, Dubinina G A, Lapteva N A : Biology of oligotrophic bacteria. *Annu Rev Microbiol*, 33, 377–387, 1979.
- 3) Aminov R I : Horizontal gene exchange in environmental microbiota. *Front Microbiol*, 2, 158, 2011
- 4) Frost L S, Leplae R, Summers A, Toussaint A : Mobile genetic elements: the agents of open source evolution. *Nat Rev Microbiol*, 3, 722–732, 2005.
- 5) Frost L S, Koraimann G : Regulation of bacterial conjugation: balancing opportunity with adversity. *Future Microbiol*, 5, 1057–1071, 2010.
- 6) Guglielmini J, Quintais L, Garcillán-Barcia M P, De La Cruz F, Rocha E P : The repertoire of ICE in prokaryotes underscores the unity, diversity, and ubiquity of conjugation. *PLoS Genet*, 7, e1002222, 2011.
- 7) 中山美月, 福井貴史, 小林照幸 : 海水から単離した低栄養性細菌の同定. *千葉科学大学紀要*, 13, 47-51, 2020.
- 8) Marsin S, Forterre P : A rolling circle replication initiator protein with a nucleotidyl-transferase activity encoded by the plasmid pGT5 from the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus abyssi*. *Mol Microbiol*, 27, 1183-1192, 1998.
- 9) Fisher S H, Wray L V Jr : *Bacillus subtilis* 168 contains two differentially regulated genes encoding L-asparaginase. *J Bacteriol*, 184, 2148-2154, 2002.
- 10) Midonet C, Miele S, Paly E, Guerois R, Barre F X : The TLCPhi satellite phage harbors a Xer recombination activation factor. *Proc Natl Acad Sci USA*, 116, 18391-18396, 2019.