

[別紙 2]

論文審査の結果の要旨

申請者氏名 高橋 裕里香

プラスミドなどの可動性遺伝因子は新規遺伝子の獲得のためのツールとして、宿主の環境適応・進化に大きな役割を担う。プラスミドに関しては、それらの抗生物質耐性能や新規代謝能をコードする遺伝子の解析にとどまらず、複製・分配・接合伝達といったプラスミドの維持や伝播を司る遺伝子の解析、それに基づく分類、有用なベクターの開発など、膨大な知見が蓄積している。しかし、こうした先行研究では、プラスミドの機能は様々な宿主内で同様であると盲目的に考えがちで、宿主の違いや周囲の環境で変化する細胞内環境の違いを考慮しないことがほとんどであった。さらに、その細胞内環境もプラスミド自体の存在で変化するかと予想される。プラスミドを保持することが“負荷”になる場合があることは古くから経験的に知られているが、プラスミドによって宿主細胞内に起こる変化の実体は未だ解明な部分が多い。そのような背景のもと、本博士論文研究は、IncP-7 群カルバゾール分解プラスミド pCAR1 とゲノム既知の *Pseudomonas* 属宿主 3 種 (*P. putida* KT2440 株, *P. aeruginosa* PAO1 株, *P. fluorescens* Pf0-1 株) をモデルとして、プラスミドが宿主細胞内で機能する様式を整理し、それが異なる宿主・異なるプラスミドでどこまで共通なのか明らかにすることを目的としている。

本論文は 6 章から構成される。序論としてプラスミドが宿主に与える影響に関わる研究の現状を述べた第 1 章に引き続き、第 2 章では、pCAR1 を保持した際に呼吸量に変化する培養条件を Phenotype MicroArray (Biolog 社) を用いて網羅的に探索した結果を述べている。C 源、N 源、P 源、S 源を変化させた際に pCAR1 保持株と非保持株で呼吸量に差が見られた培養条件の数は KT2440 株 > PAO1 株 > Pf0-1 株の順であり、そのほとんどの条件で pCAR1 を保持すると呼吸量が低下していた。異なる宿主間での共通性や、類似の構造が認められた化合物の細胞膜透過性を文献情報から検討し、KT2440 株と PAO1 株では中心代謝経路の活性が低下していると考察した。さらに宿主によって内容は異なるものの、pCAR1 を保持すると浸透圧耐性や pH 耐性も低下していることを示した。

第 3 章では、まず pCAR1 を保持した際に転写変動する宿主染色体上の遺伝子をトランスクリプトーム解析によって選抜した。転写変動する遺伝子の数は KT2440 株 > PAO1 株 > Pf0-1 株の順であり、第 2 章の解析で pCAR1 の保持により呼吸量が低下した培養条件の数の傾向、及び各宿主において pCAR1 保持株と非保持株とを混合培養した際に pCAR1 保持株が淘汰される速度の傾向 (高瀬識之 2012 年東京大学修士論文) と一致しており、pCAR1 を保持する際の負荷が KT2440 株 > PAO1 株 > Pf0-1 株の順に大きいこと明らかにした。転

写変動した ORF を、3 宿主間での保存性、推定される機能、転写プロファイルパターン、によって分類し、転写変動の内容は KT2440 株と PAO1 株の組み合わせで類似していること、3 宿主で保存された ORF でも KT2440 株のみで転写変動している ORF が多いことを示した。さらに第 3 章では pCAR1 上の核様体タンパク質である Pmr の遺伝子を破壊した株のトランスクリプトームを解析し、pCAR1 を保持した際の転写変動の約半数は Pmr を介する変化であること、転写プロファイルで分類したグループごとに Pmr の関与の割合は異なること、Pmr の働きの一つとして定常期に入る際の転写の切り替えが不完全になるのを抑える効果があることを明らかにした。

第 4 章では、pCAR1 のトランスクリプトームの 3 宿主間での比較を行い、KT2440 株では他の株に比べて転写される転写ユニットの数が多く転写される時期も長い傾向があることを見出し、上でも述べた pCAR1 を保持する際の負荷が他の株より大きい原因の一つとなっている可能性を提示した。また、pCAR1 上の 3 種類の NAPs は転写のピークが宿主によって異なっていることも見出し、pCAR1 由来の NAPs の量的な差が宿主由来の NAPs の質的・量的な違いと相乗的に機能して宿主ごとに固有の形質を出現させる可能性を示した。

第 5 章では、pCAR1 と異なる不和合性群に属するプラスミド 2 種を保持する KT2440 株を用いて、pCAR1 を保持した際の転写変動は他のプラスミドでも見られるのかを検討した。転写変動した ORF の数は薬剤耐性プラスミド RP4 やナフタレン分解プラスミド NAH7 の方が多いこと、また pCAR1 保持株では誘導される遺伝子が多いのに対し、RP4、NAH7 保持株では抑制される遺伝子が多いことを明らかにした。また転写変動した ORF の内容は pCAR1 保持株では機能既知のものが多いのに対し、RP4、NAH7 では機能未知のものが多く pCAR1 保持株と共通に転写変動したものは極めて少ないことを示した。

以上本研究は、これまで茫漠と語られてきた“プラスミドの負荷”の実体を明らかにしたものであり、これに基づいて宿主機能の変化の分子メカニズムを詳細に解析することで、細菌の機能進化や生き残りに重要なプラスミドの働きを正しく理解する基盤情報を提供するものである。よって審査委員一同は、本論文が博士（農学）の学位論文として価値あるものと認めた。