

[別紙 2]

論文審査の結果の要旨

申請者氏名 松井 一泰

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可動性遺伝因子である。プラスミドは、薬剤耐性能や病原性など様々な形質の原因遺伝子を伝播することで細菌の急速な進化・適応の原動力となるため、古くから研究がなされてきた。それによれば、プラスミドの接合伝達は、宿主の置かれた環境の何らかの因子（温度・栄養条件など）に応答して開始されるとされている。プラスミドの接合伝達頻度は、プラスミドの種類や、供与菌と受容菌の組合せ、接合時の環境条件などによって著しく変化する。しかし、環境条件により接合伝達頻度が変化する現象の大半で、その変化の理由は不明であり、接合伝達の成否を決める環境因子とその作用機構について知見は不足していると言っている。そこで本研究では、プラスミドの接合伝達の成否を決める環境因子とその作用機構を明らかにするために、IncP-7 群カルバゾール分解プラスミド pCAR1 の接合伝達に関与する新規因子の探索を試みている。

第 1 章で過去の知見をまとめた後に、第 2 章では、従来の寒天培地を用いた接合伝達体の検出方法の他に、fluorescence activated cell sorting (FACS) を用いた培養を介さない接合伝達体の検出方法を導入し、IncP-7 群プラスミド pCAR1 の実環境中における“真の”宿主域の解析を試みた。環境細菌と供与菌 (*Pseudomonas putida* KT2440 株) との液体接合実験後の細菌画分を FACS にて測定し、ゲート内に検出された粒子を分取した。培養せずに 1 細胞を解析することは研究開始当初困難であったため、蛍光を示す粒子を FACS で多数分取後、プレートに塗布し、生育した菌株の遺伝子解析を行った。解析が終了した 25 株中、接合伝達体は 11 株であり、16S rRNA の塩基配列を解読したところ、*Bacteroidetes* 門の *Flectobacillus* 属細菌、*Flexibacter* 属細菌、 α -*Proteobacteria* 綱の *Brevundimonas* 属細菌、 β -*Proteobacteria* 綱の *Delftia* 属細菌、*Cupriavidus* 属細菌と高い相同性を示した。IncP-7 群プラスミドは主に γ -*Proteobacteria* 綱の *Pseudomonas* 属細菌を宿主とするとされてきたが、本研究により γ -*Proteobacteria* 綱以外にも接合伝達する可能性が示唆された。

過去に行われた pCAR1 のモデル環境中での挙動解析の結果、pCAR1 の接合伝達には環境中に Ca^{2+} もしくは Mg^{2+} が存在する必要性があることが示されていた。第 3 章では、環境中の Ca^{2+} と Mg^{2+} の有無が他のプラスミドの接合伝達にも影響を与えるか調べた。pCAR1 に加えて、対照として pB10, R388 を用いて接合実験を行った。その結果、pCAR1 は Ca^{2+} と Mg^{2+} を各 400 μM ずつ添加した培地と比較して、無添加培地中では接合伝達頻度（接合伝達体の CFU/供与菌の CFU）が 1.2×10^{-4} から検出限界以下 (3.5×10^{-7}) へと顕著に減少したのに対し、pB10, R388 では接合伝達頻度への影響は見られなかった。このことから、pCAR1 は Ca^{2+} と Mg^{2+} の有無によって接合伝達頻度に影響を受けやすい

プラスミドであることが明らかになった。次に、4種類のゲノム既知の供与菌と5種類のゲノム既知の受容菌を用い、 Ca^{2+} と Mg^{2+} の濃度を変化させ、各濃度における接合伝達頻度を測定した。その結果、多くの組み合わせで Ca^{2+} と Mg^{2+} の濃度依存的な接合伝達頻度の上昇が観察された一方で、*P. chlororaphis* を供与菌と受容菌のいずれかとして用いた場合や *P. putida* IAM1236RG 株を受容菌として用いた場合に、接合伝達頻度は低く Ca^{2+} と Mg^{2+} の影響も見られないことが明らかになった。このことから、同一のプラスミドであっても、供与菌や受容菌によって、 Ca^{2+} と Mg^{2+} の影響に違いがあることが示された。

第4章では環境中の Ca^{2+} と Mg^{2+} の有無が pCAR1 の接合伝達に与える影響を網羅的に解析する為に、*P. fluorescens* Pf0-1L(pCAR1::rfp) 株を供与菌、KT2440 株を受容菌として接合実験を行い、 Ca^{2+} 及び Mg^{2+} 添加・非添加、供与菌及び受容菌単独・混合時における染色体とプラスミドのトランスクリプトームデータを取得した。pCAR1 の場合、供与菌単独では、 Ca^{2+} と Mg^{2+} の有無によって転写変動した遺伝子 (fold change ≥ 2) は選抜されなかったが、受容菌と混合した際には Ca^{2+} と Mg^{2+} 添加により ORF145a と ORF145 の2個の遺伝子が3倍以上転写誘導された。これらの遺伝子の機能は明らかになっていないが、ORF145 は pCAR1 の接合伝達に関連することは知られている。また、受容菌と混合することで、 Ca^{2+} と Mg^{2+} 添加時には24個、非添加時には17個の pCAR1 上の遺伝子が転写変動しており、このうち13個の遺伝子が共通していた。この中にはカルバゾール代謝 (*car*) 遺伝子群の転写誘導因子である *antR* が含まれているが、*car* 遺伝子群は宿主に負荷を与えることから、競合する細菌がいる場合に負荷を軽減していることが示唆された。供与菌染色体においては、受容菌混合時に Ca^{2+} と Mg^{2+} 添加により25個の遺伝子が転写誘導され、36個の遺伝子が転写抑制された。この中にはカチオントランスポーターが含まれており、接合伝達に必要なカチオンの取り込みに関連している可能性が示唆された。受容菌染色体では、受容菌単独では Ca^{2+} と Mg^{2+} の有無によって転写変動した受容菌染色体上の遺伝子は530個、供与菌混合時には122個であり、このうち共通して31個が転写誘導され、3個が転写抑制されていた。共通して転写誘導された遺伝子のうち、無機イオンの輸送に関わる遺伝子が6個含まれていた。

第5章では、pCAR1 上にコードされている3種類の核様体タンパク質 (NAPs) をコードする遺伝子 *phu*, *pmr*, *pnd* を単独、あるいは複数破壊した際の接合伝達頻度や接合関連遺伝子の転写変動を調べた。野生型と比較して、 Δphu において接合伝達頻度が1/10程に低下したものの、他の単独破壊株では大きな変化は見られなかった。これに対し、NAPs を二重破壊した $\Delta phu\Delta pmr$, 及び $\Delta pmr\Delta pnd$ の接合伝達頻度は検出限界以下と大きく減少した。また、この接合伝達頻度の減少は、pCAR1 上に *pmr* を相補しても回復しなかった。他のプラスミドにおいて H-NS はプラスミドの接合伝達を抑制しており、H-NS を破壊することで接合伝達頻度が上昇することが知られているが、pCAR1 上にコードされた H-NS 様因子である *pmr* は接合伝達において他の H-NS とは異なる役割を担っていることが示唆された。

本研究では、環境因子や遺伝因子がプラスミドの接合伝達にどのような影響を与えるかを定量的に解析した。pCAR1 の接合伝達関連遺伝子の発現制御機構は全く解明されていないが、本研究で得られた結果から、接合伝達制御機構の解明への糸口が得られた。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。