

## 審査の結果の要旨

氏名 作田 郁子

細菌間を移動して新規形質を付与するプラスミドの接合伝達の実応用を見据えると、プラスミドの挙動を決定する環境因子の影響評価およびその作用原理の理解が極めて重要な課題となる。本論文は、環境因子のうち他の細菌との共存と培地成分が接合伝達に及ぼす影響に着目し、プラスミドの挙動決定に寄与する新規因子の同定およびその作用機序の解明を目指したもので、第 1 章の序論、第 6 章の総括と展望を含め、6 章からなる。

第 1 章で過去の当該領域の研究動向についてまとめた後、第 2 章では、種々の細菌が共存する実環境条件の最小単位として、一つの供与菌の周囲に二種の受容菌が存在するモデル環境下での接合実験系 (1:2 接合実験系) を構築し、プラスミドの挙動評価を行っている。4 種のモデルプラスミド(pCAR1、NAH7、pB10、R388) と 2 種のモデル宿主 (*Pseudomonas putida* KT2440 と *Pseudomonas resinovorans* CA10dm4) を用いた実験の結果、多くの場合に 1:2 接合条件下で同種の菌への伝達が優先される傾向が見られること、その度合いはプラスミドや宿主の組み合わせにより大きく影響を受けることを明らかにしている。中でも NAH7 は 1:2 接合時には *P. putida* から *P. putida* へ優先して伝達し、*P. resinovorans* へほとんど伝達しないという顕著な受容菌の選択性があることを見いだしている。この現象は同種間での菌体凝集や培養上清中に分泌される因子には起因しないことも明らかにし、既存の機構では説明できない新規な受容菌認識機構の存在を示唆している。

第 2 章の発見を受けて、第 3・4 章で NAH7 の受容菌選択性について作用因子の探索を行っている。第 3 章では宿主由来の因子探索として、受容菌 *P. putida* 染色体上に「*P. putida* への伝達を優先させる」因子の存在を仮定し、*P. putida* ゲノムの BAC ライブラリーを用いたスクリーニングから、上記現象に関与する 10 箇所ゲノム上の領域を同定している。この領域には、接合伝達における二価カチオン要求性への関与が示唆されていた外膜タンパク質 OprH がコードされていたことから、以降の解析ではこのタンパク質に絞って解析を行っている。*oprH* 破壊株では NAH7 の受容菌選択性の低下が確認され、また、NAH7 の形成

する性線毛先端に存在するタンパク質 MpfD が *P. putida* の OprH と相互作用した一方で、*P. resinovorans* の OprH とは相互作用しなかったことから、OprH と性線毛間の結合親和性の違いが受容菌選択性に反映されている可能性を示している。さらに、*P. putida* の膜タンパク質画分中に、MpfD との相互作用が推測される OprH 以外のタンパク質の存在も見い出している。

第 4 章では、プラスミド由来の因子探索を目的とし、NAH7 上にランダムに Tn5 を導入した 260 株の遺伝子破壊ライブラリーのスクリーニングおよび NAH7 の大規模遺伝子破壊株の挙動評価を行い、ナフタレン分解遺伝子群を含むトランスポゾン Tn4655 領域が関与している可能性を明らかにしている。

第 5 章では、由来・機能・不和合性群が異なる 5 種のプラスミドについて接合伝達時の二価カチオン ( $\text{Ca}^{2+}$  および  $\text{Mg}^{2+}$ ) 要求性を評価し、いずれも二価カチオン要求性を示すこと、中でも IncP-7 群プラスミド pCAR1 は顕著な要求性を示すことを明らかにしている。供与菌を *Pseudomonas fluorescens*、受容菌を *P. putida* とした場合のトランスクリプトーム解析から宿主染色体上にコードされる OprH を作用因子候補として選抜し、破壊株を用いた解析から OprH の二価カチオン要求性への関与を明らかにしている。

第 6 章では、上記の結果を受けた総合討論を行うとともに、今後の展望についてまとめられている。

以上、本論文は、細菌間の接合伝達に関連して、これまで未解明であった受容菌の認識機構や、細菌集団中での宿主域決定機構解明への足がかりとなる基礎的な知見を明らかにしたものであり、今後、複合微生物系を扱う分野におけるプラスミドの挙動制御などへの応用にも多大な貢献を与える可能性を持つものである。この意味で、本論文は学術上、応用上の観点で貢献するところが少なくない。よって審査員一同は、本論文が博士（農学）の学位論文として価値あるものとして認めた。