

審査の結果の要旨

氏名 張 荟 婷

プラスミドは、染色体と異なるレプリコンとして細胞内に存在する染色体外遺伝因子で、基本的な機能に関連するコア領域に加えて、様々な機能遺伝子を搭載するアクセサリー領域からなる。一部のプラスミドは接合伝達能を持つことから、アクセサリー機能の異種細胞間での伝播に重要な役割を担う因子でもある。特に細菌においては、外界からの選択圧への適応・進化の強力な推進力となっており、薬剤耐性菌の広がりや環境汚染物質分解菌の出現などで中心的な役割を担う。

一方、受容する細菌にとっては、接合伝達は巨大な DNA を受け取ることであり、その安定的な保持のためには、伝達したプラスミドを宿主の機能発現ネットワークに速やかに取り込むことが必要になる。この過程は宿主細胞のプラスミド保持への適応過程とも言え、この理解を目指して様々な宿主機能へのプラスミドの影響が過去に調べられてきた。しかし、それらで使用されたプラスミド保持株は、接合伝達後に何度も培養を経たものであり、プラスミドへの宿主の適応が十分に進んだものである可能性が高い。この様な背景から、本研究は、接合伝達成立直後に受容菌（接合伝達完了体）が適応する過程で起こる現象を解析することを目的として実施されたもので、序論、総括と展望を合わせて 4 章で構成されている。

過去に解明されてきたプラスミドの宿主に対する影響や本研究の中で利用された解析手法について概説した第 1 章に続き、第 2 章では受容菌内での特異的 GFP 発現を指標にフローサイトメーター (FCM) で接合伝達完了体を得る手法の開発・結果について述べている。この章で採用された鍵となる技術は、プラスミドの供与菌と受容菌の混合液（接合伝達が散発的に起こっている）の中から接合伝達完了体のみを FCM で回収することである。本研究では、まず *Pseudomonas putida* KT2440 株と *gfp* 標識したプラスミド pBP136 を用いて実験系・手法の最適化を行い、接合伝達開始後 2 時間で RNA-Seq 解析に十分な接合伝達完了体を取得できることを示している。この細胞集団と、その一部を培養する過程で得られる適応過程の細胞集団から RNA を抽出し、接合伝達後のトランスクリプトーム変化を追究することに成功している。FCM での細胞回収という手法自体の遺伝子発現に対する影響が大きかったため、当初計画したサンプル全てでのトランスクリプトーム比較は困難だったものの、FCM を経たサンプル間、また FCM 後に培養したサンプル間の比較から、接合伝達直後に TCA サイクル関係の酵素遺伝子や炭素・窒素・硫黄等の一次代謝に関わる遺伝子群の転写

量が一時的に高くなることなど、接合伝達直後に起こるトランスクリプトーム変化の検出に成功している。

続く第 3 章では、一細胞ラマン散乱を比較することでプラスミドを保持する細菌を非保持株と判別できるのかを評価している。第 2 章では、GFP 蛍光を利用した FCM による接合完了体の分取は実用レベルであることを示しているが、この技術の適用にはあらかじめ接合伝達完了体で GFP が特異的に発現するシステムを導入する必要があるとあり、環境中の種々のプラスミドに自由に適用するには困難が伴う。一方、ラマン散乱を利用する系は、非標識で分析できるため、汎用性が高いと思われる。本研究では、IncP-1 群の 2 種のプラスミド (RP4, pB10) を用いて、大腸菌、*Pseudomonas* 属細菌を宿主として各組み合わせで対数増殖期、定常期の細胞を調製し、それぞれから一細胞ラマン散乱データを 30~50 ずつ取得している。得られたスペクトルからは、プラスミド保持に特徴的な散乱を明瞭に検出することは困難だったが、約半数のスペクトルデータを機械学習にかけて判別用モデルを構築し、残りのデータでその有効性を評価したところ、多くの場合でプラスミド保持細胞と非保持細胞を精度良く見分けることができる結果を得ている。この結果は、判別した細胞を、将来的に光ピンセットによって一細胞分離する系と連携させれば、一細胞トランスクリプトーム解析等の機能解析に繋げることができることを示しており、この方法論確立のための要素技術が実現可能であることを示した点で重要である。

第 4 章では、第 2 章と第 3 章の研究成果を総括し、その上で得られた知見の様々な意義を考察し、さらには今後の展望を述べている。

以上のように、申請者は本論文において「プラスミド保持細胞」を見分け、分取するための 2 つの方法を開発・評価した。特に第 2 章においては接合伝達直後の宿主細胞の適応過程の解析に応用して細胞内で起こるトランスクリプトームの詳細な変化を捉えることに成功している。この様な成果は、プラスミド保持細胞の機能発現や環境中での生き残りやすさなど、プラスミドが関係する種々の現象を考える上で、今後、重要な知見を与える研究に発展するものと期待でき、学術上応用上寄与するところが少なくない。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。