

審査の結果の要旨

論文提出者氏名 小金澤 優太

小金澤優太氏の博士論文「耐性遺伝子の除去に抗した薬剤に対する適応」(英文題目: **Physiological Adaptation to Antibiotic Exposure against Resistance Gene Deletion**) は、抗生物質クロラムフェニコールに対する耐性遺伝子を保持する大腸菌をモデルとして、本来であれば生存に必須となる薬剤耐性遺伝子を抗生物質投与環境下で欠失させても一部の細胞が適応できること、すなわち遺伝的摂動に対しても細胞が適応しうることを明らかにしたものである。

小金澤氏の博士論文は 4 章から構成されている。

序章では研究背景、特に遺伝学において遺伝子の機能や役割が遺伝子型と表現型の対応関係の解明を通じて理解されてきたこと、一方でそのような対応関係は、遺伝子型に変化が起きて十分に時間が経過した後の安定表現型を対象に調べられてきたことについて述べられている。さらに、このような研究背景を踏まえつつ、同一の環境下において同一の遺伝子型変化を生じた細胞がどの程度速やかにその表現型を変化させるのか、そして表現型の変化過程や終状態がどの程度均一なのかという「遺伝子型変化が表現型変化へと波及する過程・ダイナミクスの理解」が限られている点について多くの参考文献を引用し適切に指摘している。

この博士論文のメインである第 2 章では、序章で述べられた研究背景を受け、薬剤耐性遺伝子の除去に対する大腸菌の応答についての 1 細胞解析の結果が述べられている。小金澤氏はまず、遺伝子の欠失を青色光照射により任意のタイミングで引き起こせる PA-Cre システムと呼ばれる光遺伝学技術と、遺伝子型変化後の細胞動態を 1 細胞レベルで長期間直接観察できる 1 細胞計測システムを組み合わせた新たな実験系を導入している。この新たな実験系を用いて得た重要な結果として、本来であれば成長を維持するのに必須と考えられる耐性遺伝子を薬剤投与環境下で欠失させると、耐性遺伝子を失ったにも関わらず、約 40%の細胞が 5~10 世代かけて成長を回復できることを明らかにしている。一方で、同じ遺伝子欠失を薬剤投与よりも十分前に起こしておき、その後、先と同じ濃度の薬剤を投与すると成長回復する細胞が現れないことも明らかにしている。つまり遺伝子型変異のタイミングによって、同じ濃度の薬剤に対しても適応可能性が変化すること、さらに遺伝子型と表現型の対応関係が同じ環境でも異なりうることを明らかにしている。

小金澤氏はさらにこの解析を推し進め、遺伝子欠失のタイミングと薬剤投与のタイミングの時間間隔条件を変化させた一連の 1 細胞計測実験を行い、遺伝子欠失のタイミングから 3 時間以内に薬剤が投与された場合、適応細胞の割合はほとんど変化しない一方、6 時間では大幅に割合が減少し、さらに 10 時間以上経過して薬剤を投与すると、適応細胞が生じないことを明らかにしている。また薬剤投与時の耐性タンパク質の発現量解析から、薬剤投与時にわずかでも耐性タンパク質が細胞質に残存していれば、細胞に適応能を賦与できる可能性を示唆している。

耐性遺伝子の除去に抗して成長を回復する背景で起こる細胞内の状態変化の詳細を明らかにするために小金澤氏は、リボソームの大サブユニット、小サブユニットを構成するタ

ンパク質 (RplS, RpsB) を蛍光タンパク質で標識した細胞株を構築するとともに、この株を用いて先と同様の耐性遺伝子除去実験を行なっている。その結果、耐性遺伝子の欠失に伴い、細胞内のリボソームの大サブユニット、小サブユニットの量比が一旦崩れるものの、成長率の回復とともに量比も回復することを明らかにし、観察された適応とリボソームの恒常性との関連について議論している。

第3章では、このような遺伝子型摂動に対する適応現象の解析をさらに大規模に展開するにあたって必要となる、効率的な大腸菌ゲノム組み換え技術の開発について述べられている。これまで、大腸菌のゲノム上に意図した遺伝子を導入したり、逆に特定遺伝子を欠失させたりする技術では、意図した配列変化に加えて、数 10 bp のスカー配列が残存してしまう、もしくはスカー配列を残さない方法では、ゲノム上の目的位置によって組み換え効率が低くなるといった問題があった。この問題に対し小金澤氏は、蛍光タンパク質の遺伝子を中間導入遺伝子断片に加えることで、目的配列を持つコロニーの選択効率を飛躍的に向上させることに成功している。例えば、従来法ではわずか 4% の効率でしか標的細胞株を選択できないような遺伝子導入であっても、その効率を 89% にまで向上させられることを実際に明らかにするなど、優れた遺伝子組み換え手法の開発に成功している。

最後の第4章では、これらの結果を受けた議論とともに、今後の研究展開が述べられている。

以上のように、小金澤氏の博士論文では、光遺伝学と 1 細胞計測を組み合わせたユニークな実験系の確立が述べられているとともに、それを用いることで初めて明らかになった「遺伝子型の摂動に対する適応」という新たな生命現象の発見についても述べられており、その内容は高く評価できる。また、この博士論文に記載されている研究は、梅谷実樹、佐藤守俊、若本祐一各氏との共同研究に基づくものであるが、実験の計画から実行、得られたデータの解析、評価まで全て小金澤氏が主導して行なったものと認定できる。

よって本論文は博士（学術）の学位請求論文として合格と認められる。