

審査の結果の要旨

氏名 ヴァシレヴァ デリアナ ペテヴァ

可動性遺伝子の一つであるプラスミドは、細菌の環境適応や進化に重要な役割を果たしている。特に近年、薬剤耐性遺伝子の運び屋として薬剤耐性菌の出現に関与したり、特殊な代謝を行うための酵素遺伝子を周囲に運ぶ因子として環境汚染物質分解菌の出現の鍵因子となったりすることが示され、プラスミド保持菌がどのように外来遺伝子を受け入れ、細胞システムへプラスミドを取り込んで細菌機能（表現型）を変化させるのかに興味を持たれている。中でも、プラスミドが細菌の染色体とどのような相互作用を形成して細胞機能を変化させるのかについては、相互作用メカニズムの実体や鍵因子の同定なども含めて研究成果が蓄積しつつある。本論文は、申請者の共同研究者らが以前に行ったカルバゾール分解 IncP-7 群プラスミド pCAR1 が宿主である *Pseudomonas putida* KT2440 株のトランスクリプトーム・表現型に与える影響の解析に引き続き、同じ系を用いて翻訳レベルと翻訳後修飾レベルで宿主にプラスミドが与える影響を調べたものである。また、上記の転写レベルでの影響を引き起こす鍵因子である H-NS ファミリータンパク質の機能のうち、多量体形成のメカニズムの解析も行っている。

過去の pCAR1 と KT2440 株を用いた背景となる研究と、プロテオーム解析・アシル化修飾の網羅的解析（アシローム解析）を概説した 1 章に続き、2 章では KT2440 株のプロテオーム、アシローム（中でも、中央代謝に関連深いアセチローム、スクシニローム）に pCAR1 が及ぼす影響について調べている。標識リジンを用いた SILAC 法（stable isotope labeling by amino acids in cell culture 法）でサンプル間のタンパク質量を定量するため、2 つのリジン生合成遺伝子を欠損した KT2440L 株を作成し、これに pCAR1 を保持させてプロテオーム解析を行っている。その結果、1,600 弱のタンパク質の検出に成功し、その約 10% が pCAR1 保持によってタンパク質量が変動していた（7 個が 2 倍以上増加、151 個が 2 分の 1 以下に減少）。この中で、TCA 回路や解糖系と言った中央代謝系、シグナル伝達、運動に係わるタンパク質が減少していたことは、以前の表現型の解析でそれら機能が減少していたことと合致しており、実験結果の確からしさを示すものである。また、アシローム解析では、383 個のタンパク質中の 937 個のユニークなアセチル化部位、150 個のタンパク質中の 331 個のユニークなスクシニル化部位を発見しているが、アシル化が翻訳装置や糖・アミノ酸代謝系を構成するタンパク質に見いだされたことは非常に興味深い。また、KT2440 染色体と pCAR1 由来の H-NS ファミリータンパク質（それぞれ TurA/TurB と Pmr）がアセチル化とスクシニル化を受けていることを発見しており、

核様体タンパク質の機能がアシル化で制御されている可能性を見いだしている。

第3章では、タンパク質のアセチル化に注目し、アセチル化したタンパク質を脱アセチル化する deacetylase (KDAC) の破壊が各種の物質の炭素源、窒素源、硫黄源としての資化性に及ぼす影響を Biolog 社の Phenotype MicroArrays を用いて調べている。なお、KT2440 株染色体には KDAC ホモログは3つ存在するため、それらの3遺伝子を全て破壊した株 (KT2440D 株) を作成し、実験に供している。その結果、pCAR1 非保持株では顕著な生育差は見いだされなかったが、pCAR1 保持株では KDAC の破壊は多くの物質の資化性に影響を与えることを見いだしている。

第4章では、TurB の N 末端の多量体化ドメイン (二つの二量体化サイトから構成される) のうち、terminal dimerization site の大腸菌での発現系の構築と精製、結晶化を行っている。予備的な X 線回折データの取得を行い、2.8Å の反射データを得ることに成功している。

第5章では2章から4章までの研究成果をまとめ明らかになった情報の意義について考察すると共に、今後の展開を述べている。

以上のように、本論文はプラスミドが宿主のプロテオームに与える影響の詳細を網羅的に解析すると共に、アセチル化・スクシニル化の程度にプラスミド保持が及ぼす影響をはじめて明らかにしたものである。また、本論文は、これらの影響の発現に重要な H-NS ファミリータンパク質の二量体化機構の解明の手がかりになる結晶の取得を達成しており、今後の解析の道を開いた成果をあげていると判断できる。このような成果は、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。