

審査の結果の要旨

氏名 李昇昱

これまでプラスミドは宿主に抗生物質耐性能や難分解性物質分解能などの形質を単に付与するだけの因子であると考えられてきたが、実際には、宿主染色体の遺伝子発現様式を直接的・間接的に変化させることで宿主形質を本質的に変容させる因子であることが明らかになりつつある。一方、バイオフィームは固体表面に接着した微生物が形成する高次構造体であり、人工環境、自然環境を問わず、固体表面と水が接するほぼ全ての場所に存在する。環境中のバイオフィームには多種多様な微生物が棲息し、相互作用して共同体を形成しており、バイオフィーム中の微生物は、個々の微生物機能の単なる足し算を越えた新たな機能を獲得し、柔軟性に富んだ多細胞生物体ともみなせる特徴を有するようになる。実環境中でのプラスミドと宿主の挙動を理解するためには、プラスミドがバイオフィーム中の宿主細菌の振舞いに与える影響を理解することが重要であるが、過去の報告例は極めて限られていた。

このような背景に基づき、本博士研究は IncP-7 群カルバゾール分解プラスミド pCAR1 と *Pseudomonas* 属の宿主細菌 3 種 (*P. putida* KT2440, *P. aeruginosa* PAO1, *P. fluorescens* Pf0-1) を用いて、pCAR1 の保持が宿主のバイオフィーム形成に与える影響を評価すると共に、pCAR1 上にコードされる核様体タンパク質 (nucleoid-associated proteins; NAPs) がバイオフィーム形成に与える影響を調べたものである。さらに、pCAR1 保持株と非保持株を混合して培養することで、バイオフィーム内でのプラスミド保持株と非保持株の挙動の解析も行っている。

本論文は 4 章から成り、第 1 章では序論としてプラスミドが宿主のバイオフィーム形成に与える影響に関わる研究の現状を述べている。

第 2 章では pCAR1 が宿主のバイオフィーム形成に与える影響について議論している。PAO1 株と Pf0-1 株では pCAR1 保持に伴う目立った変化は見られなかったのに対し、KT2440 株では pCAR1 保持に伴いバイオフィームがフラットに変化し細胞も繊維状に変化した。pCAR1 上には宿主染色体の転写制御ネットワークを変え得る因子として 3 つの NAPs 遺伝子が存在しているため、これら NAPs 遺伝子の単独破壊株及び二重破壊株が形成するバイオフィームの形状を観察したところ、単独破壊株で KT2440(pCAR1)株との差は見られなかったものの、*pmr* と *phu*、*pmr* と *pnd* の二つの二重破壊株ではバイオフィームの繊維状化が劇的に亢進することが明らかとなった。この繊維状化の原因を探るため、NAPs 遺伝子の破壊がトランスクリプトームに及ぼす影響を、高密度タイリングアレイを用いて網羅的に調べた。

その結果、繊維状化の原因となる、あるいは繊維状化を亢進する可能性がある 32 個の候補遺伝子を見出し、候補遺伝子について高発現株を作製し、バイオフィームへ及ぼす影響を共焦点レーザー顕微鏡にて評価した。その結果、KT2440 株を用いた過剰発現株では PP_2193 (TonB-dependent siderophore receptor) を高発現させた株で菌体が伸びる現象が観察された。また、KT2440(pCAR1) 株を用いた過剰発現株では PP_0308 (membrane dipeptidase) や PP_0309 (hypothetical protein) を高発現させた株で繊維状化の亢進が観察された。PP_2193 は鉄欠乏の時に転写されると考える遺伝子であり、“菌体が繊維状化する”という変化を受ける際に細胞中で鉄欠乏が起きる可能性が示唆された。以上より、KT2440 株の pCAR1 保持に伴う繊維状化には、NAPs が協調的に関与すると共に、下流の複数の遺伝子が関与する現象であることを見いだしている。

第 3 章では pCAR1 保持株・非保持株が共存した際のバイオフィームと当該菌株の振る舞いについて議論している。蛍光標識した各菌株を混合し、それらが作るバイオフィームを観察することで以下の興味深い知見を得ている。まず、PAO1 株を他の株と混合培養すると pCAR1 保持・非保持に関わらずバイオフィーム中で PAO1 株が優占化すること、同種間で pCAR1 保持・非保持株を混合培養すると一方の優占化は見られず、各株それぞれがバイオフィームを形成し、混ざらない状態で棲み分けることが明らかとなった。また、バイオフィーム状態と浮遊状態における同種間で共焦点レーザー顕微鏡とフローサイトメトリーを用いて pCAR1 保持株・非保持株の割合を定量した結果、バイオフィーム状態では pCAR1 保持株と非保持株がほぼ同じ比率を示し、両菌株が生き残ってそれぞれ独立に存在しているのに対して、浮遊状態では pCAR1 保持株の比率が顕著に減少していくことが明らかになった。これらの傾向から、バイオフィーム状態では浮遊状態とは異なり、立体構造を持つため基質に対する濃度勾配が発生し、これらの影響でバイオフィームの基部にあるプラスミド保持菌の活動が低いため、プラスミド保持株が淘汰されずそれぞれ独立に存在し生き残ると推測された。

これらの結果に続く第 4 章で、本博士論文研究を総括し、今後の研究方向や将来当該分野に与える影響について考察を加えている。

以上本研究は、バイオフィーム環境中でプラスミドが宿主の振る舞いに与える影響について新奇現象の発見とその原因の解明を行うと共に、それら知見をバイオフィーム中でのプラスミド宿主の生き残りの現象解明に応用したもので、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。