

## 論文審査の要旨

博士の専攻分野の名称	博 士 ( 理 学 )	氏名	大 嶺 悠 太
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1・2 項該当		
論文題目			
Functional characterization of T-DNA transfer via VirB/D4 type IV secretion system in reference to conjugational DNA transfer (T-DNA 伝達と接合伝達の輸送機能に関する比較解析)			
論文審査担当者			
主 査	教授 鈴木 克 周		
審査委員	教授 高 橋 陽 介		
審査委員	教授 山 口 富美夫		
審査委員	教授 草 場 信		(植物遺伝子保管実験施設)
審査委員	教授 田 中 伸 和		(自然科学研究支援開発センター)
〔論文審査の要旨〕			
<p>根等癌腫病の病原体であるグラム陰性細菌(<i>Agrobacterium tumefaciens</i>)は腫瘍誘導プラスミド(Ti)を持ち、そのプラスミドの一部(T-DNA)を線状 DNA として植物細胞へと輸送注入することで宿主細胞を形質転換する。<i>Agrobacterium</i> を用いて遺伝子を導入し形質転換する技術は AMT 法と呼ばれ多数の植物に適用されているだけでなく、植物以外の生物への適用可能例が報告されつつあることから更に広い範囲の生物に T-DNA の輸送を行い形質転換できるようにすることが望まれている。T-DNA を受けとり形質転換される仕組みの研究は主にモデル植物のシロイヌナズナを用いて行なわれており、植物細胞内で機能するタンパク質の働きが解明されつつあるが、細胞表層上の分子の働きについての研究は発展途上にある。</p> <p>本研究論文の第 1 章は、酵母菌において AMT 効率に重要な核遺伝子を見出して機能を明らかにすることを目標とした研究の成果を記述している。まず、T-DNA は線状 DNA の形態で輸送されることから酵母人工染色体 (YAC) を T-DNA として使用することで導入された T-DNA を効率よくレプリコン化できるようにし、増殖に影響する変異体をも評価可能にした。次に、酵母の核遺伝子破壊株コレクションを受容体として用い AMT 効率の低下した変異体をスクリーニングした。その結果、効率が野生株に較べて大幅に低下した変異体株を計 4 株 (<i>srs2Δ</i>, <i>rad52Δ</i>, <i>smi1Δ</i>, <i>erg28Δ</i>) 得た。<i>ERG28</i> 遺伝子は、エルゴステロール合成酵素が細胞膜上で機能する際に足場として働く膜タンパク質をコードしている。野生型の酵母細胞の増殖は、<i>Agrobacterium</i> と共存培養すると抑制されるのに対して、<i>erg28Δ</i> 変異体は共存培養の影響をほとんど受けなかった。また、AMT 効率は酵母の細胞数に影響され、酵母細胞数が過剰になると顕著に低下した。従って、<i>erg28Δ</i> 変異体は共存培養中に細胞数が増加して過剰になることが AMT 効率を低下させる主因と考えられる。<i>erg28Δ</i> 変異は大腸菌が生物界間接合伝達によって輸送するプラスミドを受取る効率も低下させることも明らかになった。このように他種の生物を</p>			

感知して増殖を抑制する生理機能を担う酵母遺伝子は先例がなく興味深い。DNA 修復に関わる遺伝子の *SRS2* と *RAD52* を欠失した変異体に導入された T-DNA 分子の構造解析ならびに AMT 法以外の方法による線状および環状 DNA の導入効率の解析結果から、*SRS2* と *RAD52* 遺伝子は T-DNA 分子の環状化と線状レプリコンとして維持することの両方に重要であることがわかった。細胞壁合成の制御に関わる *SMII* 遺伝子の変異体は、エフェクタータンパク質の受容効率も低下している一方で、組込み型 T-DNA の受容効率は野生株並みであるなど多様な形質を示した。*SMII* がどのように T-DNA の受容プロセスにどのように関与しているのかは今後の課題である。

第 2 章では、AMT 法による大腸菌への DNA 輸送が可能なことを示した上で、輸送完了体が得られる効率をヌクレアーゼ遺伝子が抑制していることを明らかにした成果を記載している。この T-DNA 輸送を担っている細菌側の装置は VirB/D4 4 型輸送系と呼ばれる *Agrobacterium* 細胞膜上の複合体である。T-DNA 輸送装置は、バクテリア間で遺伝子の授受を行う接合伝達システムから派生したと推定されているが、未だに *Agrobacterium* と同じグラム陰性菌への T-DNA の輸送は報告されていなかった。そこで、グラム陰性菌である大腸菌を受容細胞とし、T-DNA 輸送用のニッカーゼ VirD2 が作用して輸送を主導する RB 配列を持つプラスミド (T-DNA モデルプラスミド) と接合伝達で輸送される可動性プラスミドのニッカーゼ遺伝子 *mob* と転移起点 (*oriT*) をもつプラスミドを用意し、それぞれ *Agrobacterium* から VirB/D4 - 4 型輸送系によって大腸菌 BW25113 ならびに酵母菌 BY4742 へ輸送する比較実験を行った。VirD2 による T-DNA 輸送は、Mob によるプラスミド伝達に比べ効率は低いものの、大腸菌でも輸送完了体を得ることができた。輸送後のプラスミドの構造を解析すると、RB 配列とその周辺の塩基配列に欠失や変異はなかったため、*Agrobacterium* が切断して輸送した DNA を受取った大腸菌は再び RB 配列での結合環状化を正確に行なうことが明らかになった。受容細胞の大腸菌株として 10 種類のエクソヌクレアーゼ遺伝子を 1 つ欠失した 10 個の変異体株を用いたところ、5 個の変異株で野生型株に較べて数倍から 5 倍程度まで受容頻度が高いことがわかった。それに加えて、自己伝達能を持つ F プラスミドと RP4 プラスミドの接合伝達効率も同様のヌクレアーゼ変異体で上昇することがわかった。これらの結果から、受容細胞のエクソヌクレアーゼは 4 型輸送系による外来 DNA の侵入に対して抑制的に作用すると考えられる。

上記の一連の成果は、菌類の *Agrobacterium* との相互作用とひいては T-DNA 受容に重要な新たな仕組みを明らかにし、更に、大腸菌を受容体としても輸送完了体が得られること、受容細胞のエクソヌクレアーゼ遺伝子が 4 型輸送系による水平伝達に対して抑制的であることを初めて示したものである。

以上審査の結果、本論文の著者は博士 (理学) の学位を授与される十分な資格があるものと認める。

公表論文

DNA repair genes *RAD52* and *SRS2*, a cell wall synthesis regulator gene *SMI1*, and the membrane sterol synthesis scaffold gene *ERG28* are important in efficient *Agrobacterium*-mediated yeast transformation with chromosomal T-DNA.

Ohmine Y, Satoh Y, Kiyokawa K, Yamamoto S, Moriguchi K, Suzuki K (2016)  
BMC Microbiology 16(1):58. doi: 10.1186/s12866-016-0672-0.

参考論文

A fast and practical yeast transformation method mediated by *Escherichia coli* based on a trans-kingdom conjugal transfer system: just mix two cultures and wait one hour.

Moriguchi K, Yamamoto S, Ohmine Y, Suzuki K (2016)  
PLoS One 11(2):e0148989. doi: 10.1371/journal.pone.0148989.