



Title	プラスミドDNAが大腸菌の増殖速度に与える影響に関する研究
Author(s)	明野, 優也
Citation	大阪大学, 2017, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/61859
rights	
Note	やむを得ない事由があると学位審査研究科が承認したため、全文に代えてその内容の要約を公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

論文内容の要旨

氏 名 (明野 優也)	
論文題名	プラスミドDNAが大腸菌の増殖速度に与える影響に関する研究
論文内容の要旨 プラスミドは、細胞内でゲノムDNAとは独立に複製される小型のDNAである。プラスミドは、環境から細胞へ、あるいは細胞から別の細胞へと移動できる能力があるため、自然界では微生物間の遺伝子の運び屋として微生物の進化に関わっており、また、遺伝子操作のツールとして人間に活用されている。一方で、プラスミドは多くの場合、そのプラスミドを保有している微生物(宿主微生物)の増殖速度を低下させること、言い換えると、負荷になることが知られている。プラスミドが負荷となることは、微生物集団内でプラスミドが存続できるかどうかの重要なパラメータであるし、プラスミドを利用した物質生産においては収率を低下させる原因になる。そのため、プラスミドの負荷の原因を解明しようという努力がなされてきた。プラスミドの負荷の原因は、プラスミド上の遺伝子の発現や、プラスミドDNAの保持のために、宿主から資源を奪うからだと考えられている。これまでの研究では、プラスミド上の遺伝子の発現が負荷の原因となることが明らかにされてきたが、プラスミドDNAの保持が負荷となっているかは不明なままである。本研究では、その点を明らかにすることを大きな目的とした。 2章では、サイズのみが異なるプラスミドを利用する独自の測定手法をもちいて、プラスミドDNAの負荷がどれほどの大きさであるかを調べた。その結果、実験データと数理モデルから、1 kbpのプラスミドDNAあたり、増殖速度を0.030%だけ低下させることを示した。 3章では、2章とは異なる手法を用いて、改めてプラスミドDNAの負荷を測定することで、得られた値の信頼性を確認した。その結果、2章と3章で同様の実験結果が得られたことから、測定された値は、実験方法の影響を受けたものではなく信頼できるものであると確認した。そして、これらの結果を統合することで1 kbpのプラスミドDNAあたり、増殖速度を0.033%だけ低下させることを示した。また、3章では、なぜプラスミドDNAを保持することが負荷となるのかを調べた。そして、ヌクレオチドやポリメラーゼの不足が、プラスミドDNAの負荷の原因であることが示唆される結果を示した。 以上の結果から、プラスミドDNAの保持が、確かに負荷となっていて、1 kbpあたり宿主の増殖速度を0.033%低下させることを明らかにした。この値から、コピー数の少ない自然界のプラスミドでは、プラスミドDNAの負荷は、プラスミドの負荷の主要な要因にはならないと予想される。一方で、大量のプラスミドを微生物に保有させるような、産業上の応用では、プラスミドDNAの負荷は無視できないと言える。	

論文審査の結果の要旨及び担当者

氏 名 (明 野 優 也)			
論文審査担当者	(職)		氏 名
	主 査	教授	清水 浩
	副 査	教授	松田 秀雄
	副 査	教授	若宮 直紀
	副 査	教授	前田 太郎
	副 査	准教授	市橋 伯一

論文審査の結果の要旨

本論文は細菌内のDNA含量が細菌の増殖に与える影響を研究したものである。

第1章は序論であり、研究の背景と本研究の目的について述べられている。本論文の目的は、プラスミドDNAのコピー数を変えることにより細胞内のDNA含量を変化させ、DNA含量が細胞増殖に与える影響を定量的に明らかにすることである。

第2章では温度を変えることでプラスミドのコピー数を変える方法が試みられている。本論文で用いたプラスミドの複製は培養温度により変化する性質があり、この性質を用いて培養温度を変えることで、細胞内のプラスミドコピー数を変化させることに成功している。大きさの異なる3種類のプラスミドについて様々なコピー数における細胞増殖速度を測定し、細胞内DNA含量が大きくなるほど細胞増殖が阻害されることを明らかにしている。さらに数理モデルを使った解析により、DNAの1塩基当たりの増殖負荷量を見積もっている。

第3章ではプラスミドのコピー数を温度によらず変化させるために、プラスミドの複製起点の変異体を用いる手法が試みられている。プラスミドの複製起点に突然変異を入れることでコピー数の異なる4種類の変異体プラスミドを作成している。これらの複製起点を持つプラスミドについて、さらにランダムな配列を挿入することでサイズの異なるプラスミドを作成している。これら様々なコピー数、サイズのプラスミドを持つ細胞について増殖速度を測定し、細胞内のプラスミドDNA含量に依存して増殖速度が低下することを明らかにしている。その低下の程度を数理モデルを使って解析し、DNAの1塩基当たりの増殖負荷量を見積もっている。その値は、第2章で測定したDNA1塩基あたりの増殖速度低下の値とよく一致しており、第2章と第3章で得られた結果の正しさを支持していると結論付けている。

第4章で得られた結果を総括し、研究の展望を述べている。

このように、本論文では、異なる2つの方法で細胞増殖に対する細胞内のDNA含量による負荷を定量することに成功している。これまで、種々の研究により細胞内DNA含量は細胞増殖に影響することは予想されてきたが、その効果が測定された例はなく本研究で初めて定量的に明らかにされたといえる。この結果は、自然界でしばしば観察されるゲノムのサイズの減少や重複など、細胞内DNA含量の変化の影響を理解する上で、基礎的な知見として有用である。したがって、本論文は博士（情報科学）の学位論文として価値のあるものと認める。