

論文内容の要旨

申請者氏名 眞喜志 一

細菌の染色は種の同定や細胞の生理状態の観察を目的に広く用いられる手法である。中でも、寒天培地に特定の基質や色素を加えてコロニーの呈色の有無を評価する手法は、簡便であることから多くの場面で利用されている。しかしながら、これらの手法の多くは呈色の強さを目視による主観的評価であり、定量性を欠いていた。

アゾ染料の一種であるコンゴーレッドは、生化学や組織学において染色剤として利用され、バイオフィーム形成時特異的に合成されるアミロイド様繊維 (Curli 線毛) を赤く染める。コンゴーレッド染色法はこの特性を利用し、主に細菌のバイオフィーム形成能を判定するために利用されるコロニー染色手法である。バイオフィームは、医療器具の微生物汚染や慢性的な感染症の一因とされることから、医療分野での研究対象になっている。また、バイオフィームを用いて有用微生物を固体表面に固定化する技術開発など、生物工学的応用を目指した研究も多く、その形成メカニズム解明の意義は大きい。Curli 線毛の合成経路には多数の遺伝子が関与していると考えられており、バイオフィーム形成に関わる一群の遺伝子をゲノムワイドに検出する方法が望まれている。バイオフィーム形成能の評価実験として実績のあるコンゴーレッド染色法に定量性を付加し、更にゲノムワイドな遺伝子探索を可能にしたハイスループットなスクリーニング手法の開発は、医療分野・生物工学分野におけるバイオフィーム研究に有用な手法となる可能性が高い。そこで本研究では、コロニーの画像情報から呈色を検出し、定量化するシステムの開発、および大腸菌の一遺伝子欠失株ライブラリー (Keio collection) を用いたハイスループットなスクリーニング手法の開発を行なった。

呈色度の定量については、市販のスキャナーを利用した方法の検討を重ねた。その結果、反射光撮像の RGB カラー情報より色相 (Hue)、彩度 (Saturation)、明度 (Value) からなる HSV 色空間に変換し、彩度 S と明度 V の値から呈色度を定量化する方法の開発に至った。

開発手法の検証は、Curli 線毛形成に関与する遺伝子欠失株 ($\Delta csgA$, $\Delta csgD$, $\Delta cpxR$, $\Delta ipoS$) を用いて行なった。また、Curli 線毛タンパク質量と呈色との相関については、ウェスタンブロット法により検証を行なった。

さらに、開発した方法を用いて大腸菌の全遺伝子を対象として、新規バイオフィーム合成関連遺伝子の探索を行なった。その結果、新たに細胞生育と呈色による補正手法の検討を行うことで候補遺伝子群を得た。得られた候補遺伝子群のクラスター解析より、既知情報との整合性を確認するとともに、既知代謝ネットワーク間の新たな相互関係の同定と機能未知遺伝子の Curli 線毛合成経路へのマッピングに成功した。

(別紙2)

論文審査結果の要旨

申請者氏名 眞喜志 一

当研究室では、一貫して網羅性を持たせた解析技術開発とそれによる解析を進めてきている。また、市販スキャナーを活用した超高効率細胞生育モニタリングシステム (Colony-live) を開発し、網羅的な遺伝的相互作用の解析に活用している。

申請者は、新たに市販スキャナーを用いて細胞色情報の超高効率な解析システムの開発を行った。具体的には、博士後期課程より本システムの開発を始め、独自に反射光による色情報の定量化手法の確立を行った。当初、スキャナーからの R(red)・G(green)・B(blue)の3原色情報をそのまま利用し、解析を進めた。一方、画像処理分野において HSV の数値に変換して解析を進めることが汎用性を持たせるためにも重要であることを認識し、同分野の研究者に指導を仰ぎ、解析手法開発を進めた。これにより、色の種別に限定されることなく、各色 (色相) 毎の彩度及び明度による細胞の定量化システムの開発に至った。さらに、開発手法の大規模化を行い、大腸菌の全遺伝子を対象としたスクリーニングによる実証を行うことで、新たな知見や重要な結果を得た。

申請者は、色情報解析技術開発において、色の画像処理技術の習得と解析システムへの実装を一人で進めた。その結果、色を限定することなく、どの色にも対応可能な汎用性の高い定量システムの開発に成功した。また、実証実験からは、既知合成経路間の新たな相互関係、機能未知遺伝子群の合成経路への関与を同定するなど、新規知見の獲得に成功している。開発手法は、市販品を利用したシステムであり、今後生物学における網羅解析手法の一つとして、広く活用されるポテンシャルを備えたものである。

以上のように、本論文は生物学において広く利用されている染色を定量的に簡便かつ超高効率で解析可能にしたもので、学術上、応用上貢献するところが大きい。よって審査委員一同は、本論文が博士 (バイオサイエンス) の学位論文として価値あるものと認めた。