

(別紙1)

## 論文内容の要旨

申請者氏名 Nurhezreen binti Md Iqbal

本論文は、大腸菌 K-12 株一遺伝子 Bar-code 欠失株ライブラリーを用いた混合培養液中の各欠失株の菌体数変動を次世代シーケンサーで読み取る手法の確立と、その手法を用いた細菌の抗生物質耐性機構への問題に取り組んだ。

### 1) 一遺伝子 Bar-code 欠失株ライブラリーによる菌体数変動解析手法の確立

各欠失株を独立に一晩培養した培養液を等量ずつ混合し、混合培養液の作製を行った。200 遺伝子の欠失株混合培養での予備実験から、*mutH*や *mutL*など修復酵素遺伝子の欠失は変異導入が加速され、生育が促進されるサプレッサー変異が蓄積し、2 週間を経た段階で *mutator* 遺伝子欠失株が菌体数の大半を占めることが明らかとなった。欠失された遺伝子による直接的効果を見ることができないことから、*mutator* 遺伝子欠失株を実験系から除外し、以降の検討を行った。

LB 培地で、培地交換することなく連続で 3 週間の長期培養を行い、経時的に分取した各サンプルからの DNA 精製方法とバーコード領域の PCR による回収方法、さらに分取した培養液の培地交換後、再生育させた培養液からの DNA 精製手法およびバーコード領域断片の回収方法の条件検討および最適化を行った。

次いで、得られたバーコード領域の断片を次世代型シーケンサーで配列を読み取り、各バーコード配列の頻度をカウントすることで培養液中の各欠失株の分布を調べる手法を開発し、得られた頻度情報の統計解析手法の検討を行った。

取得シーケンス情報から信頼性の高いバーコード配列カウントを得るためのデータフィルタリング手法、頻度情報の標準化手法、可視化手法、統計解析手法及びマイニング手法の検討を行い、一連の実験・解析手法の確立を行った。解析結果は過去の文献情報との比較を行い、過去の知見との矛盾は見られず、新たに多くの長期定常期生残における遺伝子候補を取得することができ、本手法の優位性を確認した。

### 2) Bar-code 欠失株による抗生物質耐性機構に関するグローバル解析手法の開発。

抗菌性及び殺菌性、分子機構の違う薬剤 7 種を選び、各薬剤の非致死的濃度(IC50)で 24 時間混合培養後、非致死的であるが、より高濃度の薬剤を含んだ培地に移し、各欠失株の耐性の差を、バーコード解析により行った。

解析の結果、各薬剤の各濃度における菌体数変動の定量化を行い、菌体数を上昇させる遺伝子欠失群を同定した。各遺伝子の機能情報より、エネルギー産生に機能する遺伝子群が有意に非致死的濃度の薬剤中で菌体数の上昇が観察された。長期定常期での解析と比較したところ、これらの欠失株は長期定常状態でほとんど変動を示さない一定の菌体数を保つ集団であり、細胞内エネルギー状態の低下が休眠状態を誘導し、それらが持続生残細胞として薬剤を含む環境中を生き延びる可能性を見出した。

(別紙2)

## 論文審査結果の要旨

申請者氏名 Nurhezreen binti Md Iqbal

当研究室では、一貫して大腸菌網羅的リソースを活用したシステマティックな解析技術開発及びその解析を進めてきている。2006年に大腸菌の全予測遺伝子欠失株ライブラリーを完成し、広く国内外の研究者と共有し、現在では世界標準となっているリソースである。しかしこの欠失株は、それぞれ遺伝子欠失以外に個々の株を区別する方法が無く、それぞれ単独で解析する必要がある。二重欠失での遺伝的相互作用解析を開始するにあたり、混合培養での解析を可能にすべく新たに20塩基長の分子バーコードを導入した違う薬剤耐性を持つ欠失株ライブラリーの構築を進めた。このバーコードにより、個々の欠失株を混合し、配列を読むことで各欠失株の分布のモニターが可能と考えられる。

そこで、前任者と共に Bar-code 欠失株ライブラリーの評価及び実験系の確立を目的として、長期定常期における菌体数変動の定量解析を申請者の研究の導入として本学における研究を開始した。

まず、予備実験として約200遺伝子独立4クローンずつ混合し、LB培地で2週間培地交換せずに振盪培養を行った。経時的にサンプリング、ゲノムDNAの回収、PCRによるバーコード領域の回収、増幅用 Primer に導入する識別用配列、次世代型シーケンサーでの配列読み取りの各ステップの条件検討を進め、実験解析手法の確立を行った。最終的に、約3,500遺伝子、独立クローン2株ずつ合計で約7,000株を別々に一晚培養し、等量ずつ混合した培養液を作製した。この培養液をLB培地で3週間培養を続け、解析を行ったものが、博士論文の前半部分である。

論文の後半では、博士後期課程入学当初からの目的であった薬剤耐性機構に関する研究にバーコード解析を用い着手した。7種類の薬剤を用い、非致死濃度(IC50)で生育後、同じく非致死濃度ではあるが、より高濃度の薬剤環境での生育解析をバーコードの頻度カウントで行った。当初は、薬剤に対する耐性獲得機構を想定し研究を開始した。しかし解析の結果、エネルギー産生に関与する遺伝子群の欠失が優位に高濃度の薬剤中に観察されてきたこと、それらの遺伝子群が長期定常期での解析からは、培養期間中大きな変動を示さず一定の菌体数を保つ群に分類されたことが明らかとなった。この2点を検討した結果、耐性獲得では無く、持続生残細胞に着目し、博士論文として後半でまとめた。

本研究の知見は、持続生残細胞に関するこれまでの知見と合致し、さらに多くの新たな知見を付け加えることができた点は、今後の本分野における研究を加速するものとして高く評価されるものであり、学術上、応用上貢献するところが非常に大きい。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。