

論文内容の要旨

申請者氏名 近藤 恒平

フェージセラピーを目指した基盤研究の一環として、研究蓄積の多い T4 フェージと大腸菌との相互作用解析を進めた研究である。

大腸菌一遺伝子欠失株ライブラリーを活用し、LB および MOPS-glucose 寒天培地での T4 フェージ抵抗性株のスクリーニングを行った。その結果、400 近い遺伝子欠失候補株を選択し、既知の抵抗性遺伝子群との比較から、選択手法の評価を行ない、その有効性を確認した。

LB 培地では 135 遺伝子が、MOPS-glucose 培地では 296 遺伝子がそれぞれ選択され、各候補株に対する細胞機能とフェージ耐性についての解析を進めた。その結果、LB 培地での選択では cryptic phage がコードする *ymlE*、*ymlR*、*ymlO*、*ymlP*、*ymlQ* などが検出され、MOPS 培地では、代謝に関わる候補株が多く、電子伝達系に関わる *nuoG* やムコイドの表現型を示す *lon* の欠失株などが選択された。

また、得られた候補株と T4 フェージとの相互作用の詳細を検討するため、液体培地による 1) 吸着アッセイ、2) 一段階増殖実験を行った。

まず、吸着アッセイにより、感染初期に関する遺伝子群の同定を行い、外膜リポ多糖合成・修飾に関与する酵素遺伝子群 (*lpcA*、*waaE*)、glycine 合成経路の *glyA*、16S rRNA のプロセッシング酵素の *ybeY*、転写伸長因子の *greA* などを同定した。また、転写・翻訳に関わる遺伝子群も、細胞表層構造の変化を引き起こすことで吸着に影響を及ぼしていると考察した。特に、*glyA* や *ybeY*、*greA* は過去に報告がなく、吸着に影響を与える新規な遺伝子群である。

次に、一段階増殖実験により細胞あたりのフェージ産生数の測定を行なった。その結果、転写・翻訳に関与する遺伝子群 (*greA*、*ychF*等) が T4 フェージ遺伝子群の転写・翻訳効率を減少させることにより、産生フェージ数が減少したものと考えられた。

一方、寒天培地ではムコイド様コロニーを形成し、耐性を示した株が存在したが、液体培地での検証実験では、感染効率の顕著な減少が観察されない候補株も存在し、固体培地と液体培地での違いが見られた。さらに、バイオフィームや細胞外高分子物質の変化がフェージ抵抗性に及ぼす影響を考え、ムコイド状コロニーを示した株 (*ΔydfK*、*ΔymfR*、*ΔansrR*、*ΔTU-2304*) について、バイオフィーム量を測定した。さらに、細胞外タンパク質を比較したところ、*ΔydfK*、*ΔymfR*、*ΔansrR* では 50 kDa のタンパク質量が増加しており、質量分析によって、鞭毛の FliC であることを確認した。*ΔydfK* と *ΔymfR* など、cryptic phage 遺伝子の欠失が FliC の発現量を増加させることなど、新規の知見である。*ΔydfK*、*ΔymfR*、*ΔansrR* 各欠失株の *fliC* を破壊すると、T4 フェージ感受性が上昇したことから、FliC から構成される鞭毛構造がフェージに対する防御機構の一つであると考えられた。

□ やむを得ない事由[図書出版、学術雑誌等への掲載、特許・実用新案出願、個人情報等の保護、その他 ()]により本要旨を非公表とする。

【※該当する事由に○印をすること】

論文審査結果の要旨

申請者氏名 近藤 恒平

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の開発およびその解析を進めてきた。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た後は、接合を用いた網羅的な遺伝的相互作用手法の開発と解析を進め、細胞内遺伝子間の相互作用解析を行ってきた。そこで申請者は、宿主・捕食者の種間相互作用解析の一例として、大腸菌・T4 ファージ間の網羅的な相互作用解析を提案し、研究室としては新しく種間の相互作用を解析するために本研究を開始した。

申請者は、宿主側の遺伝子がファージ感染サイクルに及ぼす影響の全体像を明らかにすることを目的に、一遺伝子欠失株ライブラリーを活用し、ファージ感染に対して耐性を示す欠失株のスクリーニングを開始した。

T4 ファージを含む軟寒天培地上に、全欠失株ライブラリーを一株ずつスポットし、溶菌度合いの異なる株の選択を行う方法を検討することで、実験手法の確立を試みた。まず、大腸菌培養液中の細胞数やファージ粒子濃度、培地組成などの条件を検討し、栄養培地 (LB) と最少培地 (M9-glucose) の2条件で一次スクリーニングを行った。その結果、LB 培地からは135株、M9-glucoseからは296株、全体で394株の欠失株を選抜した。続いて、一次スクリーニングで得られたファージ耐性候補株を、ファージ感染サイクルのどの段階に影響を及ぼしているかを調べるために、LB 液体培地での溶菌パターン、吸着アッセイ、および一段階増殖実験による分類を行ない、それぞれの分子機構について考察を行った。

まず、T4 ファージ耐性を示す既知遺伝子の情報と照らし合わせ、一次スクリーニングが十分に機能していることを確認した上で、その後の解析を進めているため、信頼性の高いスクリーニング系を確立できたと考えられた。また、既知のファージ耐性に寄与する遺伝子の他にも多くの新規な遺伝子候補を取得し、それらの分子基盤に関する考察を行った。さらに、これらの中には cryptic phage 由来の遺伝子欠失が、新たなファージ感染に影響を及ぼすなど、ファージ-ファージ間の相互作用について興味深い知見が新たに得られたことから、今後、分子機構を詳細に解析するための糸口を掴んだと考えられる。

以上のように、本論文は大腸菌と捕食者である T4 ファージとの宿主-捕食者間相互作用を系統的に進める解析手法を確立したものである。ファージセラピーなど、今後産業応用への期待が大きい分野でもあり、その基盤的研究としての意義も大きく、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。

やむを得ない事由 [図書出版, 学術雑誌等への掲載, 特許・実用新案出願, 個人情報等の保護, その他 ()] により本要旨を非公表とする。

【※該当する事由に○印をすること】