




## 学位論文審査の結果の要旨

令和 元年 6月 18日

|           |                                                                                                                     |                                                                                          |
|-----------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------|
| 審査委員      | 主査                                                                                                                  | 中村隆範  |
|           | 副主査                                                                                                                 | 神鳥成弘  |
|           | 副主査                                                                                                                 | 竹崎直子  |
| 申請者       | 木納康博                                                                                                                |                                                                                          |
| 論文題目      | Counterselection system employing mutated <i>pheS</i> for markerless genetic deletion in <i>Bacteroides</i> species |                                                                                          |
| 学位論文の審査結果 | 合格 <input checked="" type="radio"/> ・ 不合格 <input type="radio"/> (該当するものを○で囲むこと。)                                    |                                                                                          |

## 〔要旨〕

*Bacteroides* 属は腸管内常在細菌叢を構成する優勢菌群であり、宿主の腸管上皮細胞機能や腸管免疫、さらには宿主の代謝系にも大きな影響を与えている。*Bacteroides* 属がどのように宿主生理機能へ関与しているのかを解明するためには、その責任遺伝子の同定が必要となる。しかしながら、*Bacteroides* 属では効率的な遺伝子破壊法が確立されていない。*pheS* は phenylalanyl-tRNA synthetase の  $\alpha$  subunit をコードする必須遺伝子であり、菌種間での相同性が高い。大腸菌 PheS の 294 番目のアラニンがグリシンに置換した変異型 PheS は基質特異性が低く、フェニルアラニンのハロゲン化アナログである *p*-chloro-phenylalanine (*p*-Cl-phe) を取り込む。結果的に *p*-Cl-phe の細胞毒性によって菌は死滅する。本研究では、変異型 *pheS* 遺伝子 (*pheS*\*) による *p*-Cl-phe 感受性を利用した counterselection 法を開発し、効率よく *Bacteroides* 属の遺伝子破壊株を作製するシステムの構築を試み、以下の結果を得た。

- 変異型 PheS\* が *Bacteroides* 属において *p*-Cl-phe 感受性を付与するのかを検討した。pLYL05 あるいは pLYL05-*pheS*\* を保有する *Bacteroides fragilis* (BF) YCH46 株を GAM 液体培地で一晚培養した後、培養液の 10 倍段階希釈液を 0-25 mM の *p*-Cl-phe を添加した GAM 寒天培地あるいは最小栄養寒天培地 (DMM) に 5  $\mu$ l スポットした。その結果、GAM 培地では両株間で顕著な増殖能の違いは認められなかったが、DMM 培地では *pheS*\* 保有株は対照株と比べ、5 mM *p*-Cl-phe の添加により顕著に増殖が阻害された。*Bacteroides thetaiotaomicron* (BT) においても BF と同様な傾向が認められ、DMM 培地では pNLY1-*pheS*\* ベクター保有株は pNLY1 対照株と比べ、5 mM 以上の *p*-Cl-phe 添加により増殖が阻害された。以上の結果より、変異型 *pheS*\* 遺伝子は DMM 培地上において counterselection 遺伝子として機能すると考えられた。
- 変異型 *pheS*\* 遺伝子の PCR 産物を erythromycin (Em) 耐性カセットとともに自殺ベクター pKK100-Ex にクローニングし、pKK100-ExpheS\* を得た。本プラスミドの遺伝子破壊における有用性の評価のため、BF の PS2 莢膜合成領域および BT の PS1 莢膜合成領域の欠失を試みた。その結果、BF では  $8.91 \times 10^{-3}$ 、BT では  $1.70 \times 10^{-3}$  という高頻度で目的の遺伝子欠損株が得られた。偽陽性率 (Em 耐性株の割合) は 0% であり、全てのクローンにおいて相同組換えによってベクター配列が除去されていた。

PheS\* による counterselection 法は *Bacteroides* 属の効率的な遺伝子破壊法として有用と考えられる。

令和元年6月18日に行われた学位論文審査委員会においては、以下に示す様々な質疑が行われた。

1. 今回スライドで提示した *p*-Cl-Phe 添加による増殖阻害実験結果が、論文の Fig. 2 と一部異なるのはなぜか。  
→論文の Fig. 2 では、BF の *p*-Cl-Phe に対する感受性が高いため、BF と BT で *p*-Cl-Phe の添加濃度を別々に設定していた。今回は BF と BT の *p*-Cl-Phe に対する感受性の違いがわかりやすいように同じ濃度条件での結果を提示した。
2. BF と BT で *p*-Cl-Phe に対する感受性が異なるのはなぜか。  
→*p*-Cl-Phe の取り込み効率やプラスミド上の変異型 *pheS*\* 遺伝子の発現量が菌種間で異なるためと推測している。
3. BF と BT の荚膜生合成遺伝子領域の欠損株の取得率が BF で約 4%、BT で約 72%である。菌種間でこのように差がでるのはなぜか。  
→BF と BT の荚膜生合成遺伝子領域は同一ではないので、近傍の遺伝子構造や GC 含量の違いが相同組換えの起こりやすさに影響を与えた可能性が考えられる。
4. 本研究で BF と BT を選択した理由は何か。  
→BF は *Bacteroides* 属の代表菌種であり、*Bacteroides* 属の中で最も病原性が高いとされているため試験対象として選択した。また、BT は *Bacteroides* 属で全ゲノム配列が最も早く公開され、宿主との相互作用について最も研究が進んでいるため選択した。
5. 変異型 *pheS*\* 遺伝子は他の菌種でも応用可能か。  
→*pheS* 遺伝子は必須遺伝子であり、他の菌種でもその構造は良く保存されている。それぞれの菌種での条件設定は必要であるが、幅広い菌種に適用できると考えている。
6. GAM 培地で *p*-Cl-Phe の毒性が認められないのはなぜか。  
→GAM 培地は富栄養培地であり、フェニルアラニン含有量も高いと考えられる。フェニルアラニンと *p*-Cl-Phe の菌体内への取り込みが競合したためと推測される。最小栄養培地にはフェニルアラニンが含まれていないので、*p*-Cl-Phe が菌体内へ効率的に取り込まれるため毒性が出現したと考えている。
7. 従来のレプリカ法と比較して、どの程度組換え効率が改善したのか。  
→レプリカ法による negative selection では  $10^{-4}$  程度であったので、10 倍程度組換え効率が向上している。
8. BF において目的の欠損株の取得率が 4%と低かったが、これを改善する方法はあるか。  
→本研究では欠損領域の上流と下流それぞれ 2 kb の DNA 断片を fusion PCR で連結し、自殺ベクターへクローニングした。クローニングする上流領域と下流領域の DNA 断片長を変化させることで組換え頻度を調整できる可能性がある。
9. 今回使用した菌株はヒト由来か。ヒト由来の菌株の場合、欠損株を作製しても動物実験等で使用できるのか。  
→BF、BT とともにヒト由来株である。両菌種ともにマウス腸管にも定着するため、野生株または欠損株のノトバイオトを作製し、宿主生理機能に及ぼす影響等を解析することは可能である。
10. 培養時に 10%  $H_2$  を使用しているのはなぜか。  
→ $H_2$  と  $O_2$  をパラジウム触媒により  $H_2O$  へ変換し、 $O_2$  を除去して嫌気環境にするためである。

申請者はいずれの質問に対しても的確に回答し、医学博士の学位授与に値する十分な見識と能力を有することが認められた。本論文は、主要な腸内細菌である *Bacteroides* 属における効率的な遺伝子操作法を開発したものであり、その手法は微生物宿主間の相互作用の研究に貢献するものである。本研究成果は関連研究分野の発展に寄与するものであり、審査員全員一致して博士（医学）論文に相応しいものと判断し、合格とした。

|                |          |    |         |          |
|----------------|----------|----|---------|----------|
| 掲載誌名           | Anaerobe |    |         | 第 42 巻   |
| (公表予定)<br>掲載年月 | 2016年    | 9月 | 出版社(等)名 | ELSEVIER |

(備考) 要旨は、1, 500字以内にまとめてください。