

論文審査の要旨

博士の専攻分野の名称	博 士 (学 術)	氏名	CAIGOY Jant Cres Cainglet
学位授与の要件	学位規則第4条第1項2項該当		
論 文 題 目			
Regulation of biofilm formation via phosphorelay and quorum-sensing system in <i>Vibrio cholerae</i> (<i>Vibrio cholerae</i> におけるリン酸化とクオラムセンシングを介したバイオフィーム形成の制御)			
論文審査担当者			
主 査	教 授	島 本 整	
審査委員	教 授	三 本 木 至 宏	
審査委員	教 授	小 池 一 彦	
審査委員	准教授	中 山 達 哉	
〔論文審査の要旨〕			
<p>この研究は、嫌気条件下でのコレラ菌 (<i>Vibrio cholerae</i>) の病原因子の1つであるバイオフィーム形成におけるクオラムセンシングシステム制御因子 HapR と ArcAB の二成分シグナル伝達システムの制御を解明することを目的とした。</p> <p>本論文は、6章で構成されている。第1章は「序論」であり、コレラ菌やバイオフィームに関する基礎とクオラムセンシング、二成分シグナル伝達システムの基本的な内容について解説している。また、第6章の「総括」の部分では、本論文で明らかにした結果について総合的な考察を加え、将来の展望をまとめている。</p> <p>第2章では、クオラムセンシングシステム制御因子である HapR とコレラ菌のバイオフィーム形成との関係、および病原体のバイオフィーム形成に対する <i>hapR</i> 配列多型と酸素条件の影響について解析した。その結果、2つの主要な <i>hapR</i> ハプログループが確立された。<i>hapR1</i> は環境由来の非病原性菌株で構成されているが、<i>hapR2</i> はコレラを引き起こす高病原性株が大半を占めていた。フレームシフトおよび末端欠失の HapR 変異体は最も高いバイオフィーム形成を示したが、無傷の HapR 変異体は最も少ないバイオフィーム形成を示した。したがって、転写因子結合部位の破壊または HapR の二量体化を引き起こす突然変異によって、バイオフィーム抑制因子が機能を失い、より高度なバイオフィーム形成をもたらすことになることを明らかにした。</p> <p>第3章では、病原性コレラ菌株と <i>hapR2</i> ハプログループとの間の強い相関関係を利用して、病原性コレラ菌株を検出するための単純な対立遺伝子特異的分子マーカーを開発した。病原菌株を検出するために、共通のフォワードプライマーと対立遺伝子特異的なリバースプライマーを設計した。AS プライマーは、低効率から高効率のポリメラーゼまで幅広く使用でき、粗精製または精製された染色体 DNA を鋳型として PCR の高い特異性と高感度を示した。そして、魚介類サンプル中の病原性コレラ菌の存在を定性的に評価するには、アルカリペプトン水 (APW) を使用して魚介類サンプルを 7~8 時間濃縮する方法を提唱している。</p> <p>第4章では、コレラ菌のバイオフィーム形成に関与する二成分制御系 ArcAB システムと</p>			

HapR 制御因子の役割の解明を行った。機能的または非機能的な HapR のいずれかを有する同種の遺伝子型 *arcAB* 欠失変異株を構築した。全長の HapR を保有する *arcAB* 変異株はバイオフィルムの減少を示したが、フレームシフトおよび末端欠失 HapR を保有する *arcAB* 変異株は多様なバイオフィルム形成を示した。コレラ菌のバイオフィルム形成における ArcAB システムと HapR の間のエピスタティックな関係が推測されており、ArcAB システムは HapR 調節因子を介してコレラ菌バイオフィルム形成を直接制御していると考えられた。

第5章では、HapR を介したバイオフィルム形成に関する ArcAB システムの制御ネットワークを解明した。*hapR* プロモーターのレギュロン分析により、リン酸化 ArcA タンパク質の結合部位が推定された。次に、ゲルシフトアッセイにより、リン酸化 ArcA が *hapR* のプロモーター領域に結合できることが明らかになった。この遺伝子調節は、*hapA* 遺伝子の発現解析によって行われた。*arcAB* の破壊は *hapA* 発現の増加をもたらし、ArcA が *hapR* 発現を抑制することを示唆している。

結論として、本研究によってコレラ菌のバイオフィルム形成に関する新しい制御ネットワークが確立された。ArcAB システムは、全長の HapR を保有するコレラ菌株における *hapR* を抑制することにより、コレラ菌のバイオフィルム形成を促進することが明らかになった。本論文の成果は、将来コレラ菌の制御にも利用可能であり、大変興味深いものであるといえる。

以上、審査の結果、本論文は統合生命科学研究科学位論文評価基準を満たし、著者は博士（学術）の学位を授与される十分な資格があるものと認められる。