

論文審査の要旨

博士の専攻分野の名称	博 士 (学 術)	氏名	Erlia Narulita
学位授与の要件	学位規則第4条第①・2項該当		
論 文 題 目			
Molecular study on dynamic interaction between <i>Ralstonia solanacearum</i> and its phages in biocontrol of bacterial wilt disease (青枯病菌バイオコントロールにおけるファージ・宿主間動的相互作用の分子解析)			
論文審査担当者			
主 査	教 授	山 田	隆
審査委員	教 授	加 藤	純一
審査委員	教 授	黒 田	章夫
〔論文審査の要旨〕			
<p>薬剤耐性の病原細菌をコントロールする上で、天敵バクテリオファージ（以下「ファージ」という。）を用いる技術開発が注目されている。本研究においては、植物病原菌 <i>Ralstonia solanacearum</i> に感染するバクテリオファージ数種について、その感染機構、宿主との相互作用、宿主における耐性機構等について詳細に解析し、バイオコントロールへの有効活用について検討している。</p> <p>第1章では、青枯病菌 <i>R. solanacearum</i> と青枯病についての研究の歴史、青枯病菌の多様性、青枯病菌の病原性因子とその発現、青枯病対策の現状とその問題点について述べている。さらに、ファージを用いた病害コントロールの試み、従来分離されている青枯病菌ファージの特徴等に言及し、特に溶菌性の強い T7 型ファージ、ワクチンとして有望な繊維状ファージ、安定性の高いジャンボファージ等について紹介している。</p> <p>第2章では、宿主域が広く溶菌性の強い Podovirus 5 種類について、感染特性、ゲノム遺伝子構成、系統的相互関係、宿主との相互作用等について詳細に調べた結果を報告している。いずれのファージも 40.5-44.5 kbp の線状 dsDNA ゲノム(G+C=61~62%)を有していた。φRSB2 はゲノム上 RNAP 遺伝子が初期発現領域(Class I)に存在し、ファージ固有の転写プロモータが顕著であり、大腸菌の T7 型ファージと高い相同性を示した。一方、φRSB1 等他の4種においては、RNAP 遺伝子は Class II 領域に位置し、緑膿菌ファージ φKMV と類似性を示した。φRSB1 と φRSB2 の感染サイクルを比較した場合、後者は前者の約2倍の感染速度を示し、実験室混合感染においては常に前者を駆逐した。これは φRSB2 において初期発現 RNAP が効率良く後期遺伝子を発現させるためと推察された。これらのファージでは、多くの場合バーストサイズが 10~20 pfu/cell と小さく、一部で不稔感染が生じている可能性が示唆された。ファージ粒子を SYBR Gold で標識し、宿主菌との相互作用を蛍光顕微鏡を用いて追跡したところ、プラークを形成できない宿主菌（耐性菌）においても、ファージ吸着とともに DNA 注入が観察される場合があった。約 10%</p>			

程度の感染菌が死滅していた。これは青枯病菌における未知の不稔感染機構を示唆しており興味深い。

第3章では細菌線毛形成に働く PilQ 機能がファージ感染機構にも深く関与する事を報告している。繊維状ファージ(Inovirus)は IV 型線毛を受容体として感染することから、線毛非形成 $\Delta pilQ$ 変異株には感染できない。同時に、Myovirus, Podovirus, Jumbo phage 等 head-tail 構造ファージ各種も $\Delta pilQ$ 変異株には感染できないことを発見した。PilQ はグラム陰性細菌の外膜・内膜をつなぐ連結構造形成を通じて、ファージ DNA の取込みと移動を仲介すると考えられる。IV 型線毛は病原性に必須であり、ファージ耐性 $\Delta pilQ$ 変異株は完全に病原性を失っていた。

第4章では、ファージ耐性菌の出現について、その機構と関連遺伝子の網羅的検出を行っている。トランスポゾン挿入変異 Ps29 株ノックアウトライブラリーより 20 株の ϕ RSA1 (Myovirus)、 ϕ RSB1 (Podovirus)耐性変異株を取得し、変異領域を解析した。基本的に変異遺伝子は細胞表面リポ多糖生合成系酵素、外膜タンパク質等をコードしており、ファージ受容機構に関連するものと推定された。これにより複数ファージに共通した耐性機構の存在が明らかとなり、その詳細な解析に糸口を見いだした。ファージ耐性変異株は何れも非病原性を示した。

第5章では、これらの結果をもとに、ファージと細菌の動的相互作用における細胞表面受容体の変化と病原性変化の関係を示し、ファージ DNA の取込み機構、ファージ DNA 注入後の不稔感染に関する新たな知見を明確にした。これらの情報は、細菌とファージの相互進化機構を理解する上での学術的意義が高く、またファージを病原菌バイオコントロールに活用する応用面でも重要と思える。

以上より、本論文の著者は博士（学術）の学位を受けるに十分な資格を有するものと判断する。