

氏名	吉田 圭太朗		
学位の種類	博 士 (農 学)		
学位記番号	博 甲 第 8156 号		
学位授与年月日	平成 29年 3月 24日		
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当		
審査研究科	生命環境科学研究科		
学位論文題目	Identification of Factors Involved in Biofilm Formation by a Non-motile Gram-negative Bacterium, <i>Paracoccus denitrificans</i> (非運動性グラム陰性細菌 <i>Paracoccus denitrificans</i> におけるバイオフィーム形成因子の解明)		
主査	筑波大学教授	博士 (工学)	野村 暢彦
副査	筑波大学教授	博士 (農学)	高谷 直樹
副査	筑波大学准教授	博士 (工学)	橋本 義輝
副査	筑波大学助教	博士 (生物工学)	小川 和義

論 文 の 要 旨

多くの細菌は環境中で単独で存在するのではなく、集団を形成して生息する。固体表面に形成される細菌の集団はバイオフィームと呼ばれ、環境中の細菌の主要な存在形態であることが明らかとなってきた。そのためバイオフィーム形成機構について理解することは、自然環境中での細菌の生態の理解と医療・産業界における細菌の制御に重要である。細菌の運動性はバイオフィーム形成における主要な因子の一つであり、バイオフィーム形成の初期には浮遊細菌の泳動性が固体表面への能動的な付着に重要となる。しかし、環境中には非運動性細菌も多く存在する。しかし、非運動性細菌のバイオフィーム形成機構は特にグラム陰性細菌において十分な知見が無い。

本論文では、吉田圭太朗氏は非運動性グラム陰性細菌 *Paracoccus denitrificans* を用いてバイオフィーム形成機構を解明することを目的としている。この目的を達成するために、分子生物学的解析のみならずイメージング解析を用いることによって、菌体表面に提示される疎水性タンパクが付着に関与することを明らかにした。本論文では、第一に、*P. denitrificans* がバイオフィーム形成をするか否かを調べている。その結果、本細菌が非運動性であるにも関わらず、流れの無い条件において気液界面で固体表面に付着し、バイオフィームを形成できることを見いだした。さらに、このバイオフィームの三次元構造解析を行い、バイオフィームの厚みは 3-5 μm と非常に薄く、菌体が密に存在するバイオフィームであることを明らかにした。次に、一般的にバイオフィームの構造は、細菌が細胞外へ分泌するタンパク質・多糖さらに細胞外 DNA によって維持されることから、これらの分解酵素を用いてどのような細胞外成分がバイオフィーム形成に関与して

いるのかを調べた。その結果、著者は細胞外タンパク質がバイオフィーム形成に必要であることが見いだした。さらに、このバイオフィーム形成に関与する遺伝子を同定するため、4416 株のトランスポゾン挿入変異株を作製し、バイオフィーム形成能のスクリーニングを行い 26 のバイオフィーム形成に関与する候補遺伝子を得た。その中で、6636 bp の ORF がそのアミノ酸配列から細胞外タンパクと推測され、この遺伝子の下流には I 型分泌装置をコードする 3 つの遺伝子が存在していることから、この遺伝子を biofilm-associated protein A (*bapA*) とし、その下流の 3 つの遺伝子を *bapB*、*bapC*、*bapD* と名付け、これらがバイオフィーム形成に関与すると推測した。そこで、それらの各遺伝子欠損株を構築し、バイオフィーム形成について調べ、いずれの *bap* 欠損株もバイオフィームを形成できなかったことから、これらの遺伝子がバイオフィーム形成に必要であることを明らかにした。さらに、BapA の局在をより詳細に解析するために、超解像蛍光顕微鏡を用いた BapA の観察を行い、BapA は細胞の表面に局在していることを明らかにした。あわせて細胞表層の BapA が菌体表面の疎水性の向上に寄与していることを明らかにした。よって、*P. denitrificans* は BapBCD によって菌体表面に分泌された BapA を介した疎水性相互作用によって固体表面に付着し、バイオフィームを形成することが示された。以上、著者は、非運動性細菌は浮遊状態で菌体表面の性質を変化させることにより受動的にバイオフィームを形成することとその機構を明らかにした。

審 査 の 要 旨

本研究により、水処理施設の活性汚泥に含まれる非運動性細菌のバイオフィームに関する新たな知見が見いだされた。細胞表層に存在する巨大タンパクが疎水性相互作用を介して基質表面との付着に寄与し、バイオフィーム形成に至ることを証明している。またその巨大タンパクの細胞表層への分泌に関与する遺伝子も同定している。さらに分子生物学的手法と最新のイメージング解析手法を組み合わせることで付着因子の細胞表層の局在位置などの理解を深めることに成功している。また巨大タンパクのリピート配列などの特徴についても知見を得ており、新たな基質付着因子を発見したことも評価出来る。これまでバイオフィーム形成は主に運動性細菌で研究がなされてきたが、非運動性細菌で新たなバイオフィーム形成因子まで解明されたことは意義深く、今後学術および応用に寄与することが期待される。

以上のように、本博士論文における非運動性細菌のバイオフィーム形成に関する新たな知見は、オリジナリティに富む研究であり、学術面のみならず水処理などの産業分野に有用な知見新となることから高く評価できる。

平成 29 年 1 月 16 日、学位論文審査委員会において、審査委員全員出席のもとに論文の審査及び最終試験を行い、本論文について著者に説明を求め、関連事項について質疑応答を行った。その結果、審査委員全員によって合格と判定された。

よって、著者は博士（農学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものとして認める。