

氏名（本籍）	山本 達也 （ 石川県 ）		
学位の種類	博 士（ 理学 ）		
学位記番号	博 甲 第 6907 号		
学位授与年月日	平成26年 3月25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	Studies on NonA-dependent Bacteriophage Abortive Infection in <i>Bacillus subtilis</i> Marburg Strain (枯草菌 Marburg 株における NonA 依存的バクテリオファージ不稔感染に関する研究)		
主査	筑波大学教授	理学博士	漆原 秀子
副査	筑波大学教授	博士（医学）	千葉 智樹
副査	筑波大学教授	理学博士	中村 幸治
副査	筑波大学教授	博士（工学）	野村 暢彦

論 文 の 要 旨

ファージの感染は真正細菌の主要な死因の一つとなっている。そのため真正細菌はファージに対する様々な防御機構をもっており、感染したファージの遺伝子の転写や翻訳、DNA複製を阻害することでファージの増殖、拡散を抑える防御機構は不稔感染と呼ばれている。不稔感染に関わる遺伝子はプラスミドや真正細菌ゲノム中のプロファージ領域など可動性因子上に存在しているため、水平伝播により様々な真正細菌でのファージ防御に寄与している。また、真正細菌はファージから多くの遺伝子を獲得しており、ファージに対する防御機構の解明は、宿主のゲノム進化を理解するためにも重要な課題である。しかしながら、不稔感染遺伝子の発現制御機構や機能については不明な点が多い。そこで、枯草菌Marburg株のSP10ファージに対する不稔感染遺伝子*nonA*について枯草菌のファージ防御にどのように寄与しているか精査し、不稔感染の分子機序を解析することを目的として研究を行った。

まず、*nonA*遺伝子の同定を行った。*nonA*遺伝子は枯草菌Marburg株においてプロファージSPβ領域の*bnrdE-F*遺伝子間領域に存在することが報告されている。しかし、これはSPβ領域を部分的に欠損させた株におけるSP10ファージに対する抵抗性を指標としており、*bnrdE-F*遺伝子間領域からの*nonA*遺伝子の発現を確認しているわけではない。そこで、RNAプローブを用いたノーザンブロット及び5'3'RACE法により、*nonA*遺伝子の発現とその転写領域を解析した。その結果、*nonA*はSP10ファージ感染時に*bnrdE-F*遺伝子間領域もしくは*bnrdE*、*bnrdF*遺伝子とは逆向きに*bnrdE* ORFの3'領域まで転写されていることが明らかとなった。その転写領域中には72アミノ酸のORFが予測された。このORFの開始コドン又はSD配列を変異させた株ではSP10ファージに対する抵抗性が失われたことから、*nonA*は*bnrdE-F*遺伝子間領域に存在し、72アミノ酸のタンパク質をコードしていることが立証された。

次に、*nonA*遺伝子の転写制御について解析した。*nonA*遺伝子はSP10ファージ非感染時には転写されず、SP10ファージ感染時のみ転写された。また、この転写はSP10ファージ遺伝子の発現が可能な制限修飾系欠損株でのみみられた。これらの結果から、SP10ファージ遺伝子が*nonA*遺伝子の転写を制御していることが示唆さ

れた。そこで、SP10ファージのシグマ因子を枯草菌内で発現させたところ、SP10ファージの σ Orf199-200を発現させたときのみ*nonA*が転写され、 σ Orf199-200が*nonA*の転写を活性化していることが明らかになった。

続いて、NonAがSP10ファージの増殖に与える影響について検証した。*nonA*をもつ枯草菌株ではSP10ファージ感染後、ファージ遺伝子の転写は正常に行われる一方、 capsid など一部のファージタンパク質の蓄積やファージ粒子の生成は検出されなかった。また、ファージ非感染細胞でNonAの発現を誘導すると呼吸活性が低下し、宿主の増殖が停止した。これらの結果から、NonAはファージの遺伝子発現を直接阻害するのではなく、枯草菌の増殖能を阻害することにより、不稔感染を成立させていることが示唆された。

以上の研究成果により、ファージ不稔感染機構の新奇の分子機序を明らかにすることができた。

審 査 の 要 旨

本学位論文において著者は、ファージの不稔感染に関与する遺伝子*nonA*を同定し、その制御機構と機能の解析を行った。*nonA*遺伝子が枯草菌のもつシグマ因子ではなく、感染したファージのシグマ因子によって転写制御されているという発見は、ファージ防御遺伝子の発現がファージのシグマ因子によって制御されていることを示した初めての例であり、ファージ防御機構の獲得と進化を議論する上で重要な知見である。また、NonAの発現が宿主の呼吸活性と増殖の低下を招くことを示す実験結果は、NonAがファージに感染された細胞を殺すことによってファージの増殖を防ぐ利他的な遺伝子として機能していることを示唆しており、真正細菌集団における生存戦略についてのさらなる研究に発展すると期待される。

平成26年1月28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（理学）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。