

氏名	大浦 啓
学位の種類	博 士 (環 境 学)
学位記番号	博 甲 第 8185 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	環境中におけるシグナル物質を介した微生物間相互作用の解析

主査	筑波大学教授	博士 (工学)	野村 暢彦
副査	筑波大学准教授	博士 (農学)	山路 恵子
副査	筑波大学教授	博士 (農学)	高谷 直樹
副査	筑波大学助教	博士 (生物工学)	小川 和義

論 文 の 要 旨

大浦啓氏は本論文において、モデル細菌を用いて、属種の異なる他の細菌シグナルによる影響や属種の異なる細菌を共存させた際に生じるバイオフィーム形成への影響について調べ、異種異属間であっても細菌シグナルが特異的にバイオフィーム形成に関与することを明確にした。多くの細菌は環境中で単独で存在するのではなく、バイオフィーム(BF)と呼ばれる集団を形成して生息する。さらにその中で細菌自ら生産するシグナル物質を介して、細菌間でコミュニケーションが行われることが分かってきた。環境中では複数の微生物種が共存する複合 BF であるため、それら BF 内部において様々な微生物がシグナル物質を介して相互作用する現象は、非常に興味深い研究対象である。しかしながら、実際に環境中で共存する微生物同士の相互作用の詳細な研究は困難なため、著者はまず、一部のグラム陰性細菌が細胞外に分泌するインドールや 1-ナフトールなどの二環炭素化合物をシグナル物質として、それらがモデル微生物である緑膿菌の BF 形成に与える影響を評価した。その結果、BF 成熟時に 1-ナフトールを添加することにより BF の崩壊(=細胞脱離)が抑制されることを見いだしている。そして、そのメカニズム解明のため、緑膿菌 BF の脱離に必要な細菌の運動性に着目し、1-ナフトールによる運動性への影響を調べている。その結果、1-ナフトールは細菌の運動性の一種である Swarming のみを顕著に阻害することを見だし、BF の崩壊(脱離)の抑制は運動性の一種 Swarming の阻害に起因すると結論づけている。さらに、その Swarming 阻害のメカニズム解析を進めており、具体的には、緑膿菌の Swarming に運動性とともに関与することが知られている緑膿菌自ら生産する界面活性剤であるバイオサーファクタント(ラムノリピド)の生産量の変化などについても解析を進めた。しかし、ラムノリ

ピドには顕著な変化が無かったため、さらに1-ナフトールにより変化する遺伝子発現をマイクロアレイ法により網羅的に解析した。その結果、1-ナフトール添加時に転写が抑制された2つの推定転写因子を見だし、それら因子が実際に関与しているかについて分子生物学的手法を用いて検証している。具体的には、それらの2つの遺伝子の各一重破壊株とさらに両遺伝子の二重破壊株を構築し、それらを用いて運動性などの表現型を中心に詳細に解析している。そして、各一重破壊株では部分的に、二重破壊株では完全にSwarmingが顕著に阻害されることが示された。これらを踏まえた結果より、1-ナフトールは2つの新規転写因子を介して運動性を抑制することを明らかにしている。

また著者は、緑膿菌シグナル物質が他の異種微生物のBF形成に与える影響についても検討を進めている。モデル口腔細菌 *Streptococcus mutans* と緑膿菌との共培養による複合BF形成実験を行い、*S. mutans* の単独培養時と比較してBF形成量が顕著に減少することを見出している。そして、その作用機構を調べるため、緑膿菌が細胞外に分泌する因子について解析を進めた。そして、緑膿菌が産生する細胞外因子の中に *S. mutans* のBF形成抑制因子が存在する事が示され、さらにそれが熱安定性を有していることが確認され、熱安定性のある細胞外因子に着目してさらに検討を進めた結果、緑膿菌の細胞間コミュニケーションに使用されるシグナル物質の一つである Pseudomonas Quinolone Signal (PQS) であることを突き止めた。さらに著者は、PQSがどのように *S. mutans* のBF形成を阻害すのかについて解析を進めた。その結果、PQSによる *S. mutans* のBF形成阻害は、*S. mutans* のBF形成サイクルにおいて初期付着から成熟化へ移行するフェイズを阻害することを明らかにしている。すなわち、緑膿菌間で使用されるPQSシグナルが、属の異なる細菌のBF形成を抑制することを初めて明らかにした。

審 査 の 要 旨

細菌由来の二環炭素化合物が緑膿菌の生育に影響を与えないが、運動性を特異的に抑制するという知見は、新たな細菌制御因子の発見としても意義深い。また著者は、モデル細菌を用いた相互作用について特にバイオフィーム形成の表現型に着目して研究を行っており、細菌自身がコミュニケーションに使うシグナルが他の細菌のバイオフィーム形成を抑制することを見いだしている。これはシグナルが必ずしも同種のみだけでなく異種異属に関与することを示しており、微生物相互作用の見地からも重要な知見である。本論文の知見は、環境中における微生物間相互作用の一部を限定的に切り取ったものにすぎないが、これらの取り組みは異種微生物間相互作用を司る共通因子の解明に繋がることが期待される。

以上のように、本博士論文におけるシグナル物質を介した相互作用の知見は、基礎研究として高く評価出来る。また、環境では異種異属の微生物が共存し相互作用していることが考えられ、本論文における異種間相互作用の知見は、環境における微生物生態の観点からも有用である。

平成29年1月19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（環境学）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。