

氏 名	YEE LII MIEN
博士の専攻分野の名称	博士（理学）
学 位 記 号 番 号	博理工甲第 825 号
学位授与年月日	平成 23 年 3 月 23 日
学位授与の条件	学位規則第 4 条第 1 項該当
学 位 論 文 題 目	枯草菌における SP10 ファージの増殖阻害機構の解析
論 文 審 査 委 員	委員長 准 教 授 朝 井 計 委 員 教 授 高 橋 康弘 委 員 教 授 松 本 幸次 委 員 准 教 授 仲 本 準

## 論文の内容の要旨

### 『序』

バクテリアにはバクテリオファージの侵入を阻止するための戦略がある。枯草菌 Marburg 株は SP10 ファージに対し、制限系 (*nonB* 遺伝子) と、欠陥プロファージ SPβ (*nonA* 遺伝子) による防御システムが存在し、両者を同時に欠失させた *nonA nonB* 二重変異株の中で、SP10 ファージが増殖できることが明らかにされた (Matsuoka *et al.*, 2004)。本研究では 135 kbp 長のプロファージ SPβ 領域内にある *nonA* 遺伝子の同定及び、SP10 ファージの感染、増殖を阻害する機構の解明を目的とした。

### 『1. SP10 ファージのゲノム解析』(発表論文 1)

SP10 ファージのゲノム配列を解読し、その配列情報を用いて、SP10 ファージの感染、増殖を阻害する機構の解明を行った。キャピラリーシーケンサー及び次世代シーケンサーにより、全長約 144 kbp のゲノムを解読した。

アノテーションを行った結果、SP10 ファージゲノムにはシグマ因子ホモログが 3 つコードされており、逐次的な発現によってファージの発達過程を制御していることが考えられた。そのため、シグマ因子を含め、12 個の ORF について転写解析を行った。その結果、初期ではシグマ因子 GP28 と多重感染を防ぐ因子、中期はゲノム合成など、後期は主に構造タンパク質が転写された。

SP10 ファージゲノムには枯草菌の唯一の制限系 (*nonB* 遺伝子産物) の認識配列が 36 ヶ所あることが分かった。それに対して、SP01 ファージゲノム上にはその認識配列が全くないことから、SP10 ファージは *nonB* 遺伝子産物である制限酵素によりゲノムが切断され、増殖を阻害されたと考えられる。

### 『2. SP10 ファージの増殖阻害機構の解析』(発表論文 2)

*nonA* 遺伝子が SP10 ファージの増殖のどの段階を阻害するかを解析するために、宿主の *nonA* 変異の有無が、ファージの吸着、ファージ遺伝子の転写、ファージゲノム複製及び合成に与える影響について解析を行った。その結果、野生型 *nonA* の枯草菌細胞にファージは吸着し細胞内で転写が誘発されたが、侵入したゲノムは細胞内に蓄積しないことから、野生型 *nonA* 遺伝子は SP10 ファージゲノムの合成、または複製を阻害

することが示唆された。

*nonA* 遺伝子が存在する SPβ は 187 個の ORF が予測されている巨大な領域である。SP10 ファージの増殖を阻害する領域を同定するために、SPβ を系統的に部分欠失させ、SP10 ファージの増殖に対する表現型で *nonA* 遺伝子の責任領域を絞った。その結果、SPβ の *bnrdE* の 5' 側の 1623 nt から下流遺伝子 *bnrdF* の 5' 側 249 nt の領域に SP10 ファージの増殖を阻害する *nonA* 遺伝子が存在すると考えられた。*bnrdE* と *bnrdF* はプロファージ SPβ のリボヌクレオチドレダクターゼ (RNR) の α と β subunit をコードしている。RNR は、リボヌクレオチド (NDP) をデオキシリボヌクレオチド (dNTP) に還元できる唯一の酵素であり、枯草菌ゲノムにもコードされている (*nrdE* と *nrdF*)。 *nonA* 変異株に、SPβ の *bnrdEF* 領域から増幅した断片 (*bnrdE* の 3' 側 225 nt から *bnrdF* の 5' 側 249 nt) を異所的に導入することで、再び SP10 ファージの増殖が阻害された。よって、*nonA* 遺伝子はこの領域内に存在していることが示された。

SP10 ファージのゲノム解析から SP10 ファージにも SPβ や枯草菌の RNR 遺伝子と非常に相同性の高い RNR ホモログ遺伝子 (*xnrdE* と *xnrdF*) が存在しており、*nonA* 遺伝子の影響が SP10 ファージの DNA 合成であることから、この SP10 の *xnrdEF* が *nonA* 遺伝子の標的と考え解析を行った。

温度感受性変異を用いた解析から枯草菌の *nrdE* をマルチコピープラスミドから過剰発現させた *xnrdEF* が非許容温度で相補する (ASK3013 株) ことが示された。そこで *bnrdEF* 領域内にある *nonA* 遺伝子がどのように SP10 ファージゲノムの合成または複製を阻害するかを検討するために、ASK3013 株に、キシロースで誘導できる *nonA* 遺伝子を含む DNA 断片を *lacA* 遺伝子座に導入した。その結果、挿入断片の非コード鎖を誘導した時、ASK3013 株の非許容温度での生育の相補が阻害された。従って、*nonA* 遺伝子は SP10 ファージの RNR ホモログ遺伝子 *xnrdEF* の機能を阻害したと考えられる。

## 『結論』

SP10 ファージの増殖を阻害したのは SP10 ファージの RNR 遺伝子機能を阻害する宿主のプロファージ SPβ 内の RNR 遺伝子の非コード鎖から転写される転写産物であることを示した。また、ファージ感染時に全長 332 bp の *bnrdEF* スペーサー領域が何らかの制御に関わっているが、キシロース誘導時はそれが必要ではないと考えられる。

## 論文の審査結果の要旨

イーリーメン氏（申請者）の提出した学位論文について、審査委員会は、平成 23 年 2 月 22 日（火）16:00～17:00 に埼玉大学理学部 3 号館第 3 会議室において公開で研究発表会を開催し、詳細な質疑応答を行って内容を審査した。審査結果の概要は以下の通りである。

バクテリアにはバクテリオファージの侵入を阻止するための戦略がある。枯草菌 Marburg 株は SP10 ファージに対し、制限修飾系（*nonB* 遺伝子）と、欠陥プロファージ SP $\beta$ （*nonA* 遺伝子）による防御システムが存在し、制限修飾系と欠陥プロファージ SP $\beta$  を同時に欠失させた *nonA nonA* 二重変異株の中で、SP10 ファージが増殖できることが明らかにされた（Matsuoka *et al.*, 2004）。本研究では 135 kbp 長のプロファージ SP $\beta$  領域内にある *nonA* 遺伝子の同定及び、SP10 ファージの感染、増殖を阻害する機構の解明を目的とした。

### 1) SP10 ファージのゲノム解析

SP10 ファージのゲノム配列を解読し、その配列情報を用いて、SP10 ファージの感染、増殖を阻害する機構の解明を行った。キャピラリーシーケンサー及び次世代シーケンサーにより、全長約 144 kbp のゲノムを解読した。

アノテーションを行った結果、SP10 ファージゲノムにはシグマ因子ホモログが 3 つコードされており、逐次的な発現によってファージの発達過程を制御していることが考えられた。そのため、シグマ因子を含め、12 個の ORF について転写解析を行った。その結果、初期ではシグマ因子 GP28 と多重感染を防ぐ因子、中期はゲノム合成など、後期は主に構造タンパク質が転写された。

SP10 ファージゲノムには枯草菌の唯一の制限系（*nonB* 遺伝子産物）の認識配列が 36 ヶ所あることが分かった。それに対して、SP01 ファージゲノム上にはその認識配列が全くないことから、SP10 ファージは *nonB* 遺伝子産物である制限酵素によりゲノムが切断され、増殖を阻害されたと考えられる。

### 2) SP10 ファージの増殖阻害機構の解析

*nonA* 遺伝子が SP10 ファージの増殖のどの段階を阻害するかを解析するために、宿主の *nonA* 変異の有無が、ファージの吸着、ファージ遺伝子の転写、ファージゲノム複製及び合成に与える影響について解析を行った。その結果、野生型 *nonA* の枯草菌細胞にファージは吸着し細胞内で転写が誘発されたが、侵入したゲノムは細胞内に蓄積しないことから、野生型 *nonA* 遺伝子は SP10 ファージゲノムの合成、または複製を阻害することが示唆された。

*nonA* 遺伝子が存在する SP $\beta$  は 187 個の ORF が予測されている巨大な領域である。SP10 ファージの増殖を阻害する領域を同定するために、SP $\beta$  を系統的に部分欠失させ、SP10 ファージの増殖に対する表現型で *nonA* 遺伝子の責任領域を絞った。その結果、SP $\beta$  の *bnrdE* の 3' 側の 942 nt から下流遺伝子 *bnrdF* の 5' 側 249 nt の領域に SP10 ファージの増殖を阻害する *nonA* 遺伝子が存在すると考えられた。*bnrdE* と *bnrdF* はプロファージ SP $\beta$  のリボヌクレオチドレダクターゼ (RNR) の  $\alpha$  と  $\beta$  subunit をコードしている。RNR は、リボヌクレオチド (NDP) をデオキシリボヌクレオチド (dNTP) に還元できる唯一の酵素であり、枯草菌ゲノムにもコードされている (*nrdE* と *nrdF*)。 *nonA* 変異株に、SP $\beta$  の *bnrdEF* 領域から増幅した断片 (*bnrdE* の 3' 側 225 nt から *bnrdF* の 5' 側 249 nt) を異所的に導入することで、再び SP10 ファージの増殖が阻害された。よって、*nonA* 遺伝子はこの領域内に存在していることが示された。

SP10 ファージのゲノム解析から SP10 ファージにも SP $\beta$  や枯草菌の RNR 遺伝子と非常に相同性の高い RNR ホモログ遺伝子 (*xnrDE* と *xnrDF*) が存在しており、*nonA* 遺伝子の影響が SP10 ファージの DNA 合成であることから、この SP10 の *xnrDEF* が *nonA* 遺伝子の標的と考え解析を行った。

温度感受性変異を用いた解析から枯草菌の *nrdE* をマルチコピープラスミドから過剰発現させた *xnrDEF* が非許容温度で相補する (ASK3013 株) ことが示された。そこで *bnrDEF* 領域内にある *nonA* 遺伝子がどのように SP10 ファージゲノムの合成または複製を阻害するかを検討するために、ASK3013 株に、キシロースで誘導できる *nonA* 遺伝子を含む DNA 断片を *lacA* 遺伝子座に導入した。その結果、挿入断片の非コード鎖を誘導した時、ASK3013 株の非許容温度での生育の相補が阻害された。従って、*nonA* 遺伝子は SP10 ファージの RNR ホモログ遺伝子 *xnrDEF* の機能を阻害したと考えられる。SP10 ファージの増殖を阻害したのは SP10 ファージの RNR 遺伝子機能を阻害する宿主のプロファージ SP $\beta$  内の RNR 遺伝子の非コード鎖から転写される転写産物であることを示した。また、ファージ感染時に全長 332 bp の *bnrDEF* スペーサー領域が何らかの制御に関わっているが、キシロース誘導時はそれが必要ではないと考えられる。

以上のように、本研究内容は以下の 2 点にまとめられる。(1)SP10 ファージの全ゲノム塩基配列を決定し、その性格付けを行った。(2) 枯草菌が SP10 ファージの増殖に対して、ファージゲノムにコードされているリボヌクレオチドレダクターゼの機能を阻害する新規のメカニズムを有することを見出した。これらの研究成果はファージやウイルスの感染を防御する新たな方法論を示すものである。なおこれらの結果は筆頭著者として 2 報の論文が査読付き国際専門誌に発表または発表予定になっている。これらの成果から、本審査委員会は、本学位論文が博士論文として十分な成果を得ているものとし、学位論文の審査に「合格」と判断した。