

氏名	妹尾 昌紀		
授与した学位	博士		
専攻分野の名称	歯学		
学位授与番号	博甲第5325号		
学位授与の日付	平成28年3月25日		
学位授与の要件	医歯薬学総合研究科機能再生・再建科学専攻 (学位規則第4条第1項該当)		
学位論文の題目	BCGにおけるc-di-GMPの菌体内過剰合成の増殖への影響に関する研究		
論文審査委員	仲野 道代 教授	友藤 孝明 准教授	大原 直也 教授

学位論文内容の要旨

【緒言】

細菌に特有のセカンドメッセンジャーのひとつ cyclic diguanylate monophosphate (c-di-GMP) は多くの菌が産生し、また利用している。菌種によってその作用は異なり、これまでにバイオフィルムの形成、菌体外基質の産生、病原因子の発現調節、細胞増殖や細胞周期の調節、菌体表層の付着性への関与など、多様な機能が報告されている。c-di-GMPはGGDEFドメインによって2分子のGMPから合成され、EALドメインあるいはHD-GYPドメインによって加水分解される。これらのドメインを含むタンパク質の種類数も菌種により大きく異なる。結核菌では持続感染時における生存や休眠状態からの覚醒に関与することが報告されている。また結核菌群ではc-di-GMPの合成と分解を行なうタンパク質は、GGDEFドメインとEALドメインを併せ持つタンパク質が1種類と、EALドメインのみを持つタンパク質が1つ存在するのみである。結核症のワクチンウシ型結核菌 (*Mycobacterium bovis*) 弱毒株 bacillus Calmette Guérin (BCG) の中で本邦で使用されているTokyo株では、JTY1390はGGDEFドメインとEALドメインの両方をコードし、JTY1393はEALドメインのみをコードする。そのため、c-di-GMPの合成にはJTY1390が関与し、加水分解にはJTY1390とJTY1393の両者が関与すると考えられている。本研究ではBCG Tokyo株のJTY1390をクローニングし、その全長あるいは部分タンパク質を発現するプラスミドの構築を行い、さらにそれらを過剰発現するBCGを作製した。そして作製した組換え菌を用いてc-di-GMPの産生量がBCGの増殖に及ぼす影響を検討した。

【材料・方法】

1. JTY1390全長(F)と、GAFドメインとGGDEFドメインをコードする領域(T)をそれぞれPCR法で増幅し、発現プラスミドpNN-FとpNN-Tを構築した。
2. *Mycobacterium smegmatis* mc²155のゲノムDNAを鋳型として、アセトアミダーゼ遺伝子の発現調節領域をPCR法にて増幅し、大腸菌-抗酸菌シャトルベクターpNN2をもとにした誘導型発現プラスミドpNN-AFとpNN-ATを構築した。
3. pNN-F, pNN-T, pNN-AF, およびpNN-ATを電気穿孔法によりBCG Tokyo株へ導入

し、KM含有7H10-ADC寒天培地に播種し、37℃で21日間培養した。

4. プラスミドpNN-AFとpNN-AT上のJTY1390のアセトアミドによる発現誘導をRT-PCR法で確認した。
5. 組換え体BCG/pNN-AFとBCG/pNN-ATを、アセトアミドを含むあるいは含まない7H9-ADC-Tween80液体培地と7H10-ADC寒天培地で培養した。

【結果】

1. pNN-FとpNN-Tを導入したBCGを播種した寒天培地上には集落が認められなかった。一方でpNN2, pNN-AF, pNN-ATを導入したBCGを播種した寒天培地上には集落が形成された。
2. 7H9-ADC-Tween80液体培地では、組換え体BCG/pNN2, BCG/pNN-AF, およびBCG/pNN-ATのいずれもアセトアミドの存在により増殖が抑制されたが、各株間で有意な差は認められなかった。なお、RT-PCRの結果、アセトアミドの存在下においてのみBCG/pNN-AFとBCG/pNN-ATにJTY1390の転写産物が認められた。
3. 7H10-ADC寒天培地では、BCG/pNN2とBCG/pNN-AFではアセトアミドの存在により集落の大きさが減少した。しかしBCG/pNN-ATではアセトアミドが存在しない場合でも他の菌に比べ集落は顕著に大きく、アセトアミド存在下では集落がさらに大きくなる傾向が認められた。RT-PCRの結果、いずれの株もアセトアミドが無い場合においてもJTY1390の転写産物が認められ、アセトアミド存在下ではBCG/pNN-AFとBCG/pNN-ATでJTY1390遺伝子の転写産物量の増加が認められた。

【考察】

恒常発現型プラスミドpNN-FとpNN-Tを導入したBCGは集落を形成しなかったことから、はc-di-GMPの産生量の変化は大きなストレスに対する抵抗性に大きく関与する可能性が考えられた。

7H10-ADC寒天培地上ではBCG/pNN-AFとBCG/pNN-ATともに、アセトアミドによりプラスミド上のJTY1390の発現が誘導されたこと、そしてBCG/pNN-AFではなくBCG/pNN-ATのみで集落が大きくなったことから、c-di-GMPはBCGの増殖を正に制御していることが示唆された。

論文審査結果の要旨

c-di-GMP はこれまでに様々な菌種で解析が行われ、バイオフィルム形成、菌体外基質の産生、病原性因子の発現、細胞増殖、細胞周期、菌体表層の付着性に関与することが報告されている。結核菌を含む抗酸菌では、持続感染状態の維持や休眠状態からの覚醒に関与することが報告されているが、未だ不明な点が多い。本研究では結核ワクチンとして使用されているウシ型結核菌 (*Mycobacterium bovis*) 弱毒株 bacillus Calmette-Guérin (BCG) Tokyo 株を親株として、c-di-GMP の代謝酵素を過剰発現する株を作製し、これらの株を解析することで c-di-GMP の産生量が BCG の増殖に及ぼす影響を検討した。

Tokyo 株の JTY1390 は c-di-GMP の合成に関与する GGDEF ドメインと c-di-GMP の分解に関与する EAL ドメインの両方のドメインをコードする。Tokyo 株のゲノムから JTY1390 をクローニングし、この全長遺伝子、すなわち自身のプロモーターと GGDEF ドメインおよび EAL ドメインの両者をコードする遺伝子を持つプラスミド pNN-F と、EAL ドメインを欠くプラスミド pNN-T を作製し、作製したプラスミドを Tokyo 株に導入した。その結果、骨格となるプラスミド pNN2 導入株はコロニーが得られたが、pNN-F あるいは pNN-T 導入株ではコロニーが得られなかった。次にプロモーターをアセトアミドによって正に制御される誘導型プロモーターに変更したプラスミド pNN-AF と pNN-AT を作製し、BCG Tokyo 株に導入したところ、空ベクターを用いた場合と同様にコロニーが得られ、BCG/pNN-AF、および BCG/pNN-AT とした。また、pNN2 導入株を BCG/pNN2 とした。これらの株を 7H9-ADC-Tween80 培地で振とう培養したところ菌株間で増殖に差は認められなかった。しかし、7H10-ADC 寒天培地上ではアセトアミドによる誘導が無い場合に BCG/pNN-AT のコロニーは他の株のものに比べ大きかった。アセトアミドの添加により BCG/pNN-AT のコロニーはさらに大きくなった。これに対して BCG/pNN2 と BCG/pNN-AF のコロニーはアセトアミドの存在により抑制された。RT-PCR により JTY1390 の転写産物の有無を調べたところ、アセトアミドが存在するときのみ BCG/pNN-AF と BCG/pNN-AT において JTY1390 の転写産物が確認された。以上のことから、BCG の増殖に対して c-di-GMP は増殖を正に制御していることが示唆された。なお、pNN-F あるいは pNN-T 導入株ではコロニーが得られなかったことから、c-di-GMP は増殖を正に制御する以外の機能も担っていることが推測された。

本論文は、病原性を有する抗酸菌の特徴である遅発育や休眠様状態の制御機構の解明につながる知見を明らかにしたものであり、細菌の増殖の制御機構を理解するうえでも大変意義のあるものと評価できる。

よって、審査委員会は本論文に博士（歯学）の学位論文としての価値を認める。