

## 審査の結果の要旨

氏名 納庄 一樹

細菌は生物多様性の大部分を占めるため生物資源の宝庫であるが、自然界に棲む細菌のほとんどがコロニーとして分離できない状態にあることから、現在のところその資源を自由に利用することはできない。本論文は、申請者が設けた細菌のコロニー形成能が低い理由は特定の遺伝子機能が関わっているからであるとの仮説を、大腸菌 (*Escherichia coli*) を用いて実験的に証明していったものである。

本論文は、五つの章からなる本論とそれに続く補章により構成されている。

第 1 章では、細菌のコロニー形成に関する様々な研究を概説するとともに、コロニー形成しない状態の細菌のモデルとして申請者が解析した大腸菌の *fabB* 遺伝子変異株が見いだされた経緯が述べられている。*fabB* 遺伝子は、長鎖脂肪酸合成に関わる  $\beta$ -ketoacyl-ACP synthases I をコードする遺伝子である。

第 2 章では、大腸菌の *fabB* 遺伝子の温度感受性変異株を用いることでコロニー形成能を定量的に評価する系を確立した後に、この評価系を用いて *fabB* 遺伝子を欠失した大腸菌 ( $\Delta fabB$  株) ではコロニー形成能が完全に消失することを確認するとともに、この消失がオレイン酸を添加することで相補されることを明らかにしている。次に、LB 培地による液体培養と固体培養をした  $\Delta fabB$  株をオレイン酸添加固体培地に植菌し直してコロニー形成させる実験によって、 $\Delta fabB$  株は固体培養では数回程度の細胞分裂しか行わないのに対して、液体培養では植菌数の数万倍にまで増殖すること、ところがこの菌体はその後急速にコロニー形成能を失うことを明らかにしている。さらに、オレイン酸の添加量を変えた最少培地での培養による同様の実験も行い、オレイン酸の量が固体培養では菌体増殖速度と菌体増殖量の両方に反映するのに対し液体培養では菌体増殖量にのみ反映することを明らかにし、これらの結果を総合して以下の結論を得ている。すなわち、培養時のオレイン酸の要求量は固体培養の方が液体培養より多いこと、固体培養では脂肪酸を使い切る前に増殖が止まってしまうこと、培養により増殖した菌体のコロニー形成能は固体培養では最後まで維持されるのに対し液体培養では脂肪酸を使い切った時点から低下していくことであ

る。この結論をさらに補強するために、FabB の生産量をアラビノースの添加量によって調節できる構造のプラスミドを導入した  $\Delta fabB$  株を用いた実験を行い、コロニー形成能と FabB 生産量との間に強い正の相関があることを明らかにしている。そして最終的な大腸菌のコロニー形成能のモデルとして、細菌の増殖開始時点にはある障壁が存在しており、固体培養時には液体培養時よりもその障壁が大きいため、それを乗り越えて増殖するためには脂肪酸が関わる生理機能が必要であるとのモデルを提唱している。

第 3 章では、前章で提唱したコロニー形成能のモデルが、大腸菌以外の細菌にも適用できるかを検証している。細菌の脂肪酸合成には FabB と FabI (enoyl-ACP reductase I) が関与しており、両者はそれぞれセルレニンとトリクロサンにより阻害される。そこで、様々な濃度の両薬剤で大腸菌、枯草菌 (*Bacillus subtilis*)、コリネバクテリウム属細菌 (*Corynebacterium glutamicum*) を処理して脂肪酸合成能を低下させた際にコロニー形成能がどのように変化するかを調べている。まず、セルレニンあるいはトリクロサンを含む最少培地によって大腸菌野生株を固体培養して薬剤濃度に応じてコロニー形成能が低下することを明らかにし、さらに、セルレニンで処理した枯草菌ならびにトリクロサンで処理したコリネバクテリウム属細菌も薬剤濃度に応じてコロニー形成能が低下することを明らかにし、大腸菌以外の細菌にも申請者が提唱するモデルが適用できること示している。

第 4 章では、上記モデルの適用性を自然界に棲む細菌にも広げることができるとかを調べている。まず、自然界に棲む細菌のモデルとして viable but non-culturable (VBNC) 状態に陥った大腸菌野生株を対象に、この大腸菌をコロニー形成させる際にオレイン酸を供給することでコロニー数が増加することを明らかにし、大腸菌が VBNC 化する主要因の一つは脂肪酸量が低下して不足することにあると推定している。さらに、土壌細菌をコロニーとして分離する過程においても脂肪酸の供給によりプロテオバクテリア門の様々な細菌がコロニー形成能を回復することを示し、脂肪酸の関わる生理機能がコロニー形成能の制御に関わることを一般化するとともに、脂肪酸添加の応用的な意義について明らかにしている。

第 5 章では、総括として本研究をまとめるとともに、脂肪酸の関わる生理機能がどのような分子機構であるかの解析に向けた展望を述べている。

最後に補章では、脂肪酸不足が固体培養での増殖抑制を引き起こす要因の解明に向けた実験から得られた、未完了ながらも示唆的な結果が述べられている。

これらの研究成果は、学術上応用上寄与するところが少なくない。よって、審査委員一同は本論文が博士(農学)の学位論文として価値あるものと認めた。