

## 論文内容要旨

報告番号	甲 栄 第 28 / 号	氏名	安井 実希
題 目	Identification of Genes Associated with Sensitivity to Ultraviolet A (UVA) Irradiation by Transposon Mutagenesis of <i>Vibrio parahaemolyticus</i> (腸炎ビブリオにおけるトランスポゾン変異株を用いた長波長紫外線 (UVA) 感受性に関連する遺伝子の同定)		
<p>腸炎ビブリオは、下痢、頭痛、嘔吐、吐き気、および腹痛を症状とする急性胃腸炎を引き起こす可能性があるグラム陰性細菌であり、腸炎ビブリオによる食中毒は世界中で頻繁に発生している。紫外線照射は水や食物の殺菌に広く利用されており、紫外線はその波長によりUVA (320~400 nm)、UVB (280~320nm)、およびUVC (&lt;280 nm) に分類される。UVC照射はシクロブタンピリミジンダイマー等の光産物を形成して細菌のDNAに損傷を与えるが、一部の細菌種ではSOS応答などのDNA修復機構が備わっている。この修復機構によりUVC照射は遺伝子変異を誘導し、耐性菌が出現する可能性がある。紫外線殺菌に広く利用されているのはUVC波長の発光可能な低圧水銀ランプが主であるが、当研究グループはUVA発光ダイオード (LED) を用いた照射装置を開発した。UVA照射は細菌の細胞膜の損傷を引き起こし、活性酸素分子種を誘導させることにより死滅や増殖遅延をさせることを明らかにしたが、病原細菌を十分に不活性化させるためには、長時間や高エネルギーの照射が必要であった。より高い殺菌効果を得るためには、UVAの感受性に関与する因子を同定する必要があると考えた。そこで、本研究ではトランスポゾンを用いて腸炎ビブリオの遺伝子変異株ライブラリーを作成し、UVA感受性に関連する遺伝子を同定することを目的とした。</p> <p>腸炎ビブリオの野生株 (WT) 及び変異株ライブラリーにUVA-LEDを積算光量126kJ/m<sup>2</sup>で照射を行い、WTと比較して殺菌されやすい株 (高感受性株) の選別を行った。2段階の選別方法により、6つの変異株 (VP3069, VP3075, VP0136, VP0140, VP0097, VP0315) を選別した。これらの変異株はUVBやUVC照射に対する感受性はWTと差はなかったが、UVAのみに高い感受性を示した。アメリカ国立生物工学情報センター (NCBI) などのデータベース解析により、VP3069とVP3075はF型アデノシン三リン酸 (ATP) 合成酵素遺伝子 (<i>atp</i>)、VP0136とVP0140はgeneral secretion pathway 遺伝子 (<i>gsp</i>)、VP0097とVP0315はユビキノン (UQ) 生合成遺伝子 (<i>ubi</i>) の変異株であることがわかった。そこで、UVA感受性と細胞内のATP及びUQ濃度や細胞外へのタンパク質の輸送との関連性を検討した。<i>atp</i>変異株のVP3069とVP3075は細胞内ATP濃度がWTよりも低かったが、正常な遺伝子の補完により細胞内ATP濃度が増加し、UVA感受性もWTと同程度に回復した。次に、VP3069とVP3075に20mM L-セリン処理すると、細胞内ATP濃度とUVA感受性はWTと同程度まで回復した。また、<i>gsp</i>変異株のVP0136とVP0140は細胞膜での透過性が亢進することにより細胞外へのタンパク質が顕著に高かったが、正常な遺伝子の補完によりタンパク質の透過性とUVA感受性はWTと同程度まで回復した。さらに、<i>ubi</i>変異株のVP0097 とVP0315 はUQ-8の細胞内濃度がWTと比べて有意に異なったが、正常な遺伝子の補完によりUQ-8の細胞内濃度とUVA感受性はWTと同程度にまで回復した。</p> <p>以上の結果より、<i>atp</i>、<i>gsp</i>、および<i>ubi</i>遺伝子によって制御されるタンパク質やATPやUQ-8などの関連代謝産物はUVA照射に対する感受性に関与する可能性が示唆された。UVA照射により大腸菌の細胞内ATP濃度が変化することが報告されていることから、細胞内のATP濃度がUVA感受性の重要な因子の1つであると考えられた。また、本研究で選択された6つの変異株すべてが酸化ストレスの一種である過酸化水素に対して高い感受性を有していた。UQやgeneral secretion pathwayにより制御される外膜へのタンパク質輸送及びバイオフィルム形成は、酸化ストレスなどの細胞外ストレスに対する防御に働いているとの報告もある。よって、病原細菌の酸化ストレスに対する感受性を制御することがUVA照射による殺菌効果に有効であると考えられた。</p>			

報告番号	甲 栄 第 28 / 号	氏名	安井 実希
審査委員	主査 酒井 徹 副査 瀬川 博子 副査 首藤 恵泉		
題目	Identification of Genes Associated with Sensitivity to Ultraviolet A (UVA) Irradiation by Transposon Mutagenesis of <i>Vibrio parahaemolyticus</i> (腸炎ビブリオにおけるトランスポゾン変異株を用いた長波長紫外線 (UVA) 感受性に 関連する遺伝子の同定)		
著者	Miki Maetani-Yasui, Kazuaki Mawatari, Airi Honjo, Thi Kim Ngan Bui, Takaaki Shimohata, Takashi Uebanso, Mutsumi Aihara, Takahiro Emoto, Masatake Akutagawa, Yohsuke Kinouchi, Akira Takahashi		
	令和2年8月発行 Applied Sciences 第10巻第16号5549ページに発表済		
要旨	<p>本研究は、腸管病原性細菌である腸炎ビブリオの遺伝子変異株ライブラリを用いて長波長紫外線 (UVA) の感受性に関連する遺伝子の同定をしたものである。</p> <p>腸炎ビブリオは急性胃腸炎を引き起こす食中毒の病原菌で、世界中で感染事例が頻発している。本研究では UVA による感染対策に着目した。紫外線 (UV) は波長の長いものから UVA、UVB、UVC に分類される。広く殺菌紫外線として利用されている UVC 照射は光産物を形成して細菌の DNA に損傷を与える。一方、UVA は活性酸素種を誘導させることにより細菌の増殖遅延や死滅を引き起こすことがわかってきたが、長時間や高エネルギーの照射が必要であった。UVA 照射による殺菌効果をさらに高めるためには、UVA の感受性に関与する因子を同定する必要があると考えた。そこで本研究では、遺伝子変異株ライブラリを用いて UVA 感受性に関連する遺伝子を同定することを目的とした。</p> <p>トランスポゾンを用いて腸炎ビブリオの遺伝子変異株ライブラリを作成し、野生株と比較して UVA 照射特異的に殺菌されやすい UVA 高感受性株 6 株 (VP3069、VP3075、VP0136、VP0140、VP0097、VP0315) を選別した。米国国立生物工学情報センターなどのデータベース検索により、VP3069 と VP3075 は F 型アデノシン三リン酸 (ATP) 合成酵素遺伝子 (<i>atp</i>)、VP0136 と VP0140 は general secretion pathway 遺伝子 (<i>gsp</i>)、VP0097 と VP0315 はユビキノロン (UQ) 生合成遺伝子 (<i>ubi</i>) の変異株であった。<i>atp</i> 変異株は細胞内 ATP 濃度が野生株よりも低かったが、正常な遺伝子の補完により細胞内 ATP 濃度が増加し、UVA 感受性も野生株と同程度に回復した。<i>gsp</i> 変異株は細胞膜の透過性亢進により細胞外タンパク質濃度が顕著に高かったが、正常な遺伝子の補完により膜透過性と UVA 感受性は野生株と同程度まで回復した。また、<i>ubi</i> 変異株は細胞内 UQ-8 濃度が野生株と比べて有意に異なったが、正常な遺伝子の補完により UQ-8 濃度と UVA 感受性は野生株と同程度にまで回復した。以上の結果より、<i>atp</i>、<i>gsp</i>、および <i>ubi</i> 遺伝子によって制御されるタンパク質や ATP・UQ-8 などの関連代謝産物は UVA 照射に対する感受性に関与する可能性が示唆された。また、UVA 高感受性株 6 株すべてが過酸化水素に対して高い感受性を有していたことから、腸炎ビブリオの酸化ストレスに対する感受性を制御することが UVA 照射による殺菌効果に有効であると考えられた。</p> <p>本研究は、UVA 照射に対する感受性に関与する因子の同定により、腸管病原性細菌の腸炎ビブリオによる感染対策の新たな手法の開発に寄与するものであり、博士 (栄養学) の学位授与に値すると判定した。</p>		