

(今村 圭吾)論文内容の要旨

主 論 文

Identification of a major glucose transporter in *Flavobacterium johnsoniae*: Inhibition of *F. johnsoniae* colony spreading by glucose uptake

Flavobacterium johnsoniae における major glucose transporter の同定: グルコースの取り込みによる *F. johnsoniae* のコロニー Spredding の阻害

今村圭吾、佐藤啓子、成田由香、近藤好夫、中根大介、内藤真理子、藤原卓、中山浩次

Microbiology and Immunology, Volume 62, Issue 8, 507–516, 2018

長崎大学大学院医歯薬学総合研究科医療科学専攻
(主任指導教員: 藤原 卓教授)

緒 言

Porphyromonas gingivalis などの歯周病原細菌は9型分泌機構 (T9SS) を介し、様々な病原タンパク質を分泌している。本研究の対象であるグラム陰性細菌 *Flavobacterium johnsoniae* は土壌中や水中に生息する細菌であるが、Bacteroidetes 門に属し、T9SSを構成する遺伝子群を保有している。本菌の T9SS はキチナーゼなど本菌を特徴づける菌体表層タンパク質の輸送に関与するとともに、本菌の滑走運動とも密接な関係がある。滑走運動により *F. johnsoniae* は colony spreading (CS) を起こす。この CS を利用し、T9SS を解明していくことが可能であると考えられているが、CS についての研究はあまりされていない。今回、CS と glucose の取り込みの関連性について解明した。

材料と方法

1. 供試株として、*F. johnsoniae* UW101、glucose の取り込みを行わない *Escherichia coli* LJ141 を用いた。
2. トランスポゾンミュータジェネシスを行うために Transposon-containing suicide plasmid R751::Tn4351 Ω 4 を用いた。その後、Tn 挿入部位周辺の DNA 配列を決定することで Tn 挿入部位の遺伝子 (*mfsA*) を同定した。
3. *mfsA* を欠失した変異株 ($\Delta mfsA$ mutant)、相補株 ($\Delta mfsA/mfsA^+$ 株)、*mfsA-gfp* 融合遺伝子を *mfsA* 欠失株に導入した株 ($\Delta mfsA/mfsA-gfp$ 株) を作成した。
4. glucose 取り込み試験は 2DG Uptake Measurement Kit にて測定し、2-deoxy-D-glucose、2,4-dinitrophenol (DNP)、carbonyl cyanide *m*-chlorophenylhydrazine (CCCP)、*N,N'*-dicyclohexylcarbodiimide (DCCD)、もしくは arsenate の阻害効果を検討した。
5. $\Delta mfsA/mfsA-gfp$ 株の GFP 蛍光を指標に MfsA の細胞内局在を調べた。コントロールとして DNA を検出する DAPI と細胞膜を検出する FM4-64 を作用させた。
6. 液体培地上で野生株、変異株および相補株の cell growth と glucose との関連性を調べた。

結 果

glucose による CS が抑制されない変異株をトランスポゾンミュータジェネシスにて作成した。Tn 挿入部位を同定したところ、major facilitator superfamily (MFS) transporter をコードする領域 (*mfsA*) に Tn 挿入変異があることがわかった。

そこで *mfsA* の欠失株を作成したところ、 $\Delta mfsA$ 変異株では、glucose の取り込みがほとんど検出されず、glucose による増殖促進効果がなかった。大腸菌 LJ141 に *mfsA* 野生遺伝子を導入した株においては glucose の取り込み、代謝が行われるようになった。

$\Delta mfsA/mfsA-gfp$ 株を蛍光顕微鏡にて観察したところ、MfsA は細胞膜に局在していた。

glucose 取り込み試験において、本菌の glucose の取り込みは、CCCP もしくは DNP 存在下では抑制された。

考 察

寒天培地上では、glucose を培地に添加することで *Flavobacterium johnsoniae* の CS が抑制されることが知られていたが、詳細なことは不明であった。今回の研究で、glucose 存在下の CS の抑制は MfsA を介した glucose の細胞内取り込みに部分的に依存することが示唆された。さらに、本菌による glucose の取り込みは ATPase 阻害薬である DCCD や arsenate では減少せず、脱共役剤である CCCP や DNP で抑制されることからプロトン駆動力にて行われていることが示唆された。

(備考) ※日本語に限る。2000 字以内で記述。A4 版。