

氏名	クエン フォック ムン NGUYEN PHUOC DUNG
学位(専攻分野)	博士(学術)
学位記番号	博 1 2 0 1 号
学位授与の日付	令和 8 年 3 月 23 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当
研究科・専攻	工芸科学研究科 物質・材料化学専攻
学位論文題目	Study on bacteriophages inhibiting <i>Cutibacterium acnes</i> and their phage-host co-evolution (アクネ菌を阻害するバクテリオファージと長期曝露後のファージ-宿主共進化に関する研究)
審査委員	(主査) 教授 亀井加恵子 准教授 熊田 陽一 教授 黒田 浩一

## 論文内容の要旨

*Cutibacterium acnes* (旧称 *Propionibacterium acnes*) はグラム陽性菌であり、尋常性ざ瘡およびインプラントや人工関節等の人工物関連感染症の主要な原因菌として広く知られている。近年の研究では、多くの国々で抗生物質耐性 *C. acnes* の驚異的な蔓延が報告されており、代替抗菌戦略の開発が求められている。代替抗菌戦略の有効な候補の一つが、細菌の菌種特異的に感染し、溶菌することができるバクテリオファージ (ファージ) を用いたファージセラピーである。ファージは菌種特異的に菌を殺すことができる利点がある一方で、ファージに対しても細菌が耐性を持つことが課題となっている。ファージセラピーを推進するためには、個々の細菌についてファージに対する耐性化機構を予測し、効率的にファージ耐性菌の出現を抑制する方法の確立が必要である。本論文では *C. acnes* を溶菌するファージ 2 種を単離するとともに、ファージに対する宿主菌の新規耐性化機構を明らかにした。

宿主として *C. acnes* NBRC 107605 (系統型 IA1) を用い、日本の家庭排水およびベトナムの歯科医院排水からそれぞれバクテリオファージ KIT08 および KIT09 を分離した。KIT08 は *C. acnes* NBRC 107605 に対して迅速な感染性と中程度の強い細菌溶解性を示し、IA1、IA2、IB、II 系統を含む広範な宿主範囲を有した。一方、宿主特異性がやや狭い KIT09 は、Multiplicity of Infection (MOI) 10 において最大 96 時間に及ぶ持続的な細菌溶解を示し、これは MOI 依存的な様式であった。両ファージとも、pH 3 の酸性環境および 40°C 以下の温度に耐える適切な熱安定性・pH 安定性を示し、化粧品や皮膚製品への応用が可能である。2 種のファージのゲノム解析により、約 29.5~29.9 キロベースの二本鎖環状 DNA を同定した。GC 含有量は 54~54.5% で、42 の ORF (オープンリーディングフレーム) を有し、そのうち 27~28 の CDS (コードドアンビエントシーケンス) に機能が予測された。

KIT08 の持続感染によって誘導された擬似溶原性耐性分離株は、バイオフィーム関連遺伝子の転写が抑制されたことと一致して、増殖速度が遅く、バイオフィーム形成が減少した。KIT08 のゲノム解析により、*Thermophilus* ファージ TP-J34 の Ltp タンパク質および *Escherichia* ファージ HK-022 の抑制因子タンパク質とそれぞれ相同性を示す推定タンパク質 gp39 および gp23 が同定

された。これにより、KIT08 が擬似溶原性サイクルにおいて二次感染抵抗性を誘導する潜在的なメカニズムが示唆された。

KIT09 による持続的な選択圧の後、3 つのファージ耐性細菌分離株が得られた。これらの変異株は野生型よりも小さなコロニーを形成したが、高いファージ吸着能力（20 分後でも 90%以上）を維持しており、耐性が吸着阻害によるものではないことを示した。全ゲノムシーケンス解析により、5 遺伝子にわたり 12 のヌクレオチド置換（うち 6 つの非同義変異を含む）が明らかになった。特に、二成分ヒスチジンキナーゼ、DNA processing protein A (DprA)、ThuA ドメインタンパク質をコードする遺伝子は、全ての耐性分離株で変異していた。

結論として、本研究では皮膚製品への応用に適した安定性を有する強力な抗菌活性を示す 2 種類の新規 *C. acnes* ファージを同定した。さらに、耐性株の分離・特性解析により擬似溶原性に関連する生理的トレードオフを明らかにし、CRISPR-Cas 非依存性メカニズムを初めて報告した。

## 論文審査の結果の要旨

*Cutibacterium acnes* は共生細菌であるが、尋常性ざ瘡、術後感染、人工物関連感染など多くの感染症で同定される。抗生物質に耐性を獲得した *C. acnes* が蔓延しており、抗生物質に代わる戦略が強く求められている。本研究は、抗生物質代替の有力な候補の一つであるバクテリオファージ（以下、ファージ）に着目している。ファージを利用するファージセラピーにおいて、ファージに対する耐性を獲得したファージ耐性菌の発生が課題となっている。申請者は、*C. acnes* を標的とするファージを用い、*C. acnes* がファージに対する耐性を獲得する機構を解明した。

申請者は、*C. acnes* を標的とするファージ KIT08 および KIT09 を単離、同定し、宿主範囲や増殖パラメータ等の特性を解析した。両ファージの全ゲノム配列を解析し、いずれも新規ファージであることを見出した。両ファージは、皮膚での *C. acnes* 感染症治療等に適した強力な溶菌活性と安定性を有していた。また、*C. acnes* はバイオフィルムを生産するために治療が困難になることが知られているが、両ファージとも *C. acnes* によるバイオフィルム生産を阻害することを見出した。これらは、両ファージの実用化の可能性を示唆している。

続いて KIT08 が宿主細菌に擬似溶原性を誘導することを明らかにした。擬似溶原細菌の全ゲノム配列解析結果に基づき、擬溶原性状態における SIE (Superinfection Exclusion : 重感染排除) に関与する複数の仮説について議論した。近年の研究では複数の *C. acnes* ファージが擬溶原性状態を誘導し得ることが指摘されているが、擬似溶原細菌と野生型細菌の生理学的トレードオフを特徴づけた研究は本研究が初めてである。KIT08 によって誘導される擬似溶原細菌は、細胞疎水性およびバイオフィルム産生の減少を示し、抗生物質との有望な相乗効果が認められた。すなわち、ファージと抗生物質の併用が抗生物質の効果を増強する可能性を示す有意義な研究成果である。

KIT09 に対する耐性を獲得した *C. acnes* IA1 系統 3 株についてファージ耐性獲得機構を解析した。興味深いことに、ファージ耐性菌は高いファージ吸着能力を維持しており、吸着阻害によらない耐性化であることを見出している。ファージ耐性菌 3 株の全ゲノム配列解析を行い、3 株に共通した複数の変異を明らかにするとともに、CRISPR-Cas 非依存性メカニズムによる耐性化であることを見出した。これは、細菌による新規なファージ耐性獲得機構であり、ファージ研究にお

ける学術的意義だけでなく、ファージの実用化にむけた社会的意義も大きいと考えられる。

本研究成果は、ファージに対する耐性化機構を予測し、効率的にファージ耐性菌の出現を抑制する方法の確立に向けた貴重な情報を与えるものである。本博士論文を構成する主要論文は、確立された査読制度を有する以下の国際科学雑誌に掲載されている。なお、いずれも申請人が筆頭著者である。

- 1) Nguyen, P. D., Nakanishi, K., Hosokawa, C., Han, N. S., Kitao, M., Yoshimoto, M., & Kamei, K. (2025). Characterization of the novel *Cutibacterium acnes* phage KIT08 and its associated pseudolysogenic bacterial isolate. *Archives of Microbiology*, 207(10), 1–18. <https://doi.org/10.1007/S00203-025-04451-8/TABLES/4>
- 2) Nguyen, P. D., Nakanishi, K., Nguyen, H. P. K., Nguyen, H. V., Kitao, M., Yoshimoto, M., & Kamei, K. (2025). Characterisation of the Novel *Cutibacterium acnes* Phage KIT09 and First Report of CRISPR-Cas-Independent Bacteriophage Resistance in Phylotype IA1. *International Journal of Molecular Sciences* 2025, Vol. 26, 26(24). <https://doi.org/10.3390/ijms262412166>