

氏名(本籍)	おお 大	たに 谷	かおり 郁(愛知県)
学位の種類	博士(医学)		
学位記番号	博甲第2963号		
学位授与年月日	平成14年3月25日		
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当		
審査研究科	医学研究科		
学位論文題目	Clostridium perfringens (ウェルシュ菌)の毒素産生調節機構の解析		
主査	筑波大学教授	獣医学博士	八神健一
副査	筑波大学教授	医学博士	小山哲夫
副査	筑波大学教授	医学博士	中内啓光
副査	筑波大学教授	理学博士	坂内四郎

論文の内容の要旨

(目的)

ウェルシュ菌 (*C. perfringens*) は多数の毒素を産生し、その協調作用によってガス壊疽などの特徴ある病態を形成すると考えられる。本菌には複雑な毒素遺伝子発現調節ネットワークの存在が示唆されるが、この全貌を明らかにするためには、個々の遺伝子を解析するだけでなく全ゲノムを解読し、その調節システムを網羅的に解明することが必要である。

そこで、本研究ではウェルシュ菌全ゲノムシーケンスを決定し、毒素産生調節ネットワークの解明を目的とし、特にVirR/VirSシステムの支配下に存在する未知の二次的調節遺伝子の同定と、ウェルシュ菌における細胞間情報伝達のメカニズムを検討した。

(結果)

1. ゲノムシーケンスの決定

ウェルシュ菌全ゲノムシーケンスをランダムショットガンシーケンス法により決定した。ゲノムサイズは3,031,430bpで、GC含量は28.6%と極めて低いことが明らかとなった。本菌のゲノム上にはアミノ酸合成系の遺伝子がほとんど存在せず、また、二成分制御系遺伝子は合計46存在し、VirR/VirSシステムのみならず、他の二成分制御系遺伝子も毒素産生調節に密接に関与している可能性が示唆された。

2. 調節RNA, *vir X*の存在

二次的調節遺伝子の候補である*vir X*遺伝子について解析を行った。クローニングされた断片の欠失変異株の作製によりこの断片上の約0.4kbの領域(*vir X*)が少なくとも α -, θ -, κ -毒素の産生調節に関与すること、*vir X*変異株の解析から*vir X*遺伝子は α -, θ -, κ -毒素遺伝子を転写レベルで正に調節することが明らかとなった。さらに、この調節は*vir X*遺伝子領域がコードするペプチドによるのではなく、転写産物自身が関与していることが明らかとなり、調節RNAという新たな因子の存在が示唆された。

3. 細胞間情報伝達物質の解析

ゲノム解析の結果、グラム陽性菌、陰性菌に共通して存在する細胞間情報伝達物質AI-2 (Autoinducer-2)の産生に関与する*lux S*遺伝子の存在が明らかとなり、*lux S*が細胞間情報伝達物質VAP (Virulence activating pheromone)

の産生に関与している可能性が考えられた。そこで、VAPと*lux S*の関係を明らかにするため、*lux S*遺伝子の変異株を作製し解析を行った。その結果、*lux S*遺伝子は細胞間情報伝達に関与し、 θ -毒素遺伝子を転写レベルで正に調節していることが明らかとなった。しかし、この*lux S*変異株はVAPを産生しており、VAPの産生に直接的には関与しないことが明らかとなった。

そこで、ウェルシュ菌染色体ライブラリーを大腸菌DH5 α を用いて作製し、VAP産生に関与する遺伝子のクローニングを行い、ゲノム解析の結果と照合することにより3つのHypothetical proteinの存在を示し、これらの遺伝子がVAPの産生に関与している可能性が示唆された。これらの結果より、ウェルシュ菌には少なくとも2種の細胞間情報伝達機構(AI-2とVAP)が存在し、毒素遺伝子の転写を調節していることが明らかとなった。

(考察と結語)

ゲノム解析の結果より、本菌は多くのアミノ酸合成系の遺伝子が欠失しており、生存のためには外界よりアミノ酸等を取り込むことが必須であること、そのために多数の毒素を産生することにより宿主の細胞を破壊することが必要と考えられた。毒素産生時期が他の多くの細菌と違い対数増殖初期に最大となることから、他の菌とは違った毒素産生のシグナルが存在し、病原性のみでなく本菌の生存のための複雑な調節機構が存在することが考えられた。さらに本菌の全ゲノムシーケンスの結果、タンパクをコードしないと考えられる領域が多数存在し、これらの領域のRNA自身が*vir X*遺伝子と同様にさまざまな転写調節因子として働いている可能性が考えられた。今後、2つの細胞間情報伝達システムを中心に、DNAチップなどを用いてさらに解析を進め、毒素産生調節ネットワークの詳細を明らかにしたい。

審 査 の 結 果 の 要 旨

ウェルシュ菌 (*C. perfringens*) は芽胞を形成する偏性嫌気性細菌で、多数の毒素を産生し、その協調作用によってガス壊疽などの特徴ある病態を形成する。本菌の病原性には複雑な毒素遺伝子発現調節ネットワークの関与が示唆されるが、この全貌を明らかにするためには、個々の遺伝子の解析だけでなく全ゲノムを解読し、その調節システムを網羅的に解明することが必要である。本研究は、ウェルシュ菌全ゲノムシーケンスを決定し、毒素産生調節ネットワークの解明を目的として行われた。

本研究により、ウェルシュ菌の全ゲノムサイズは3,031,430bpで、GC含量は28.6%と極めて低いこと、ゲノム上にはアミノ酸合成系の遺伝子がほとんど存在しないこと、2種の細胞間情報伝達機構(AI-2とVAP)が存在し、毒素遺伝子の転写を調節することが明らかになった。

ウェルシュ菌全ゲノムシーケンスを決定したこと自体を高く評価でき、そのうえ、ウェルシュ菌に特有ないくつかの毒素産生調節機構を明らかにし、今後の毒素産生調節ネットワークの全貌の解明にもつながる優れた論文である。

よって、著者は博士(医学)の学位を受けるに十分な資格を有するものと認める。