

氏名(本籍)	佐藤 壽男 (神奈川県)
学位の種類	博士(医学)
学位記番号	博甲第 2961 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	腸管出血性大腸菌の志賀毒素転換ファージの分子生物学的解析
主査	筑波大学教授 獣医学博士 八神 健一
副査	筑波大学助教授 医学博士 清水 徹
副査	筑波大学助教授 博士(医学) 澁谷 彰
副査	筑波大学講師 博士(医学) 谷口 英樹

論文の内容の要旨

(目的)

病原性大腸菌 O157 に代表される腸管出血性大腸菌 (EHEC) は志賀毒素様毒素 (Stx) を産生し、血性下痢や、ときには死亡率の高い溶血性尿毒症症候群 (hemolytic uremic syndrome : HUS) を併発させることもある。我が国を含む先進国において EHEC は食中毒の原因菌の一つとして大きな問題となっており、現在、公衆衛生上最も重要な下痢原因菌のひとつである。Stx はバクテリオファージ上にコードされており、*stx* 遺伝子はこのファージによって伝達・伝播されている。Stx には免疫学的性質が異なる二つの型があり、一つは、物理的、生物学的及び免疫学的性質が *shigella dysenteriae* 1 型の産生する志賀毒素に完全に一致する Stx1, 他の一つは志賀毒素と免疫学的性質が異なる Stx2 であり、さらにいくつかの variant も存在する。

本研究では我が国で発生した食中毒事例において分離された EHEC O157 : H7 株の Stx 転換ファージの水平伝達機構を分子レベルで解析することを目的とした。

(対象と方法)

1996 年、岡山市及び盛岡市で発生した EHEC O157 : H7 集団発生事例より分離された Okayama O-27 株, Morioka V526 株から誘発分離した Stx 転換ファージを対象としてその全塩基配列を解析した。塩基配列は塩基配列解析ソフト DNASIS を用いて解析した。ORF の解析は DNA データベース (DDBJ) 検索プログラム BLAST を用いて行った。その結果に基づき各ファージ相互の、あるいは既知の Stx 転換ファージとの比較・解析を行い、さらに Stx 転換ファージの大腸菌ゲノム組み込み位置の解析を行った。

(結果)

E.coli O157H7 Okayama O-27 から誘発した Stx ファージは Stx1- I と Stx2 phage- I, *E.coli* O157H7 Morioka V526 から誘発分離したファージは Stx1 phage- II, および Stx2 phage- II とした。これらのファージは実験室系統大腸菌 *E.coli* C600 への溶原化の解析により、Stx1- I と Stx1- II は同一であると判断されたので、以下 Stx1 と記述する。Stx1 phage, Stx2 phage- I, Stx2 phage- II はそれぞれ immunity 特性及び宿主認識機構が異なっていることが解ったので、この 3 株のファージについて解析した。

それぞれのファージの全塩基配列を決定したところ、全長は Stx2 phage- I が 61,771bp, Stx1 phage が 59,872bp, Stx2 phage- II が 62,712bp であった。各ファージには相同性の高い配列が存在する一方、それぞれのファージに特異的な塩基配列が存在していた。Stx2 phage- I と Stx2 phage- II は同じ Stx2 毒素遺伝子を持ちながら、全配列では 80% のホモロジーしかなく、ファージの基本ゲノムや初期転写に関わる遺伝子群に相違が見られた。既報の *E.coli* O157H7 の全ゲノム配列の Stx2 と比較すると、この 2 種のファージはクロナリティーが異なるのではないかと示唆された。一方、同一宿主から誘発された Stx1 phage と Stx2 phage- II は、毒素遺伝子領域以外のホモロジーが高く、ファージ自体は同一クロナリティーである可能性が示唆された。また、全シーケンズデータ解析により、ファージゲノムの基本領域の ORF の機能、たとえばファージの生活環に関わる遺伝子などが予測できた。しかし、その一方、ファージの頭部、尾部等の骨格に関わる ORF は未知の配列であった。

Stx 転換ファージの大腸菌ゲノムへの挿入部位の検索を行った結果、この 3 種のファージはいずれも 23min 付近へ挿入されていた。また、ファージ側の *att site* は共通な構造をしていた。

(考察)

Stx2 phage- I, Stx1 phage, Stx2 phage- II の宿主認識には差があることが報告されているが、ファージのゲノム配列の解析からは、宿主認識の担当遺伝子を予測することができなかった。しかし、これらのファージの immunity, 転写調節, 溶菌等に関係する遺伝子は確定できた。決定した塩基配列に基づき、各ファージの immunity に関わる遺伝子を解析した結果、Morioka V526 から分離された Stx 転換ファージと Okayama O-26 から分離された Stx 転換ファージでは異なるクロナリティーであることが明らかとなった。他の Stx 転換ファージのデータも統合すると、Stx 転換ファージには少なくとも 2 種類の immunity 特性があるものと推定された。Stx 遺伝子上流には後期遺伝子の調節に関わる遺伝子 Q と推定される ORF が存在していた。Q 遺伝子と Q の作用部位 *qut* は Stx1 転換ファージ, Stx2 転換ファージを通じ高い相同性があった。Q は Q 遺伝子下流の遺伝子の発現を調節するので、ファージ誘発に伴う毒素産生に関わる可能性が示唆される。

審査の結果の要旨

腸管出血性大腸菌 (EHEC) は志賀毒素様毒素 (Stx) を産生し、血性下痢や、ときには死亡率の高い溶血性尿毒症候群 (hemolytic uremic syndrome : HUS) を併発させ、公衆衛生上最も重要な下痢原因菌のひとつである。本研究では我が国で分離された EHEC O157 : H7 株の Stx 転換ファージの水平伝達機構を分子レベルで解析することを目的とし、Stx 遺伝子の全塩基配列を決定し、各ファージ間の比較を行ったものである。

その結果、Stx 転換ファージはそれぞれに特有な種の保存領域と可変領域を持っていること、immunity 特性の差や相当する遺伝子領域の相同性から少なくとも 2 種類のファージが存在すること、毒素産生に関連する遺伝子群は各ファージ間で保存性が高いことを明らかにした。本研究で明らかになった Stx 転換ファージの全塩基配列は、今後、病原性因子の伝達機構を分子レベルで解明する上で有効な基礎データとなり、さらに疫学的マーカーとしての活用も期待できる。

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。