

氏名(本籍)	黒田 誠 (兵庫県)
学位の種類	博士(医学)
学位記番号	博甲第2,171号
学位授与年月日	平成11年3月25日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
学位論文題目	<i>Staphylococcus aureus</i> のストレス応答機構
主査	筑波大学教授 理学博士 坂内 四郎
副査	筑波大学教授 医学博士 濱口 秀夫
副査	筑波大学併任教授 薬学博士 山本 達男 (国立国際医療センター研究所)
副査	筑波大学教授 理学博士 石井 哲郎

## 論文の内容の要旨

### (目的)

*Staphylococcus aureus*は病原性グラム陽性球菌であり、様々な病原因子を産生して多彩な疾患を起こす。しかし、同時に鼻腔、咽喉など粘膜や皮膚表層に常在する細菌である。その病原性は様々な条件により影響を受けるがそれは、*S. aureus*が環境条件に応答して様々な病原因子を産生するからである。本研究では、環境条件がどのような機構で病原因子の産生を調節するかを解明する前段階として、この菌において熱や重金属によるストレスが遺伝子発現とその産物にどのように作用するかを分子生物的に明らかにすることを目的とした。

### (対照と方法)

*S. aureus*に熱ストレスを加えて、その可溶性蛋白質を二次元電気泳動法で解析し、熱応答蛋白質を同定し、アミノ酸配列より応答遺伝子をクローニングした。クローニングした熱応答遺伝子の転写調節機構の解析には、ノザン・プロット、プライマー伸張法、プロモーター活性測定、ゲルシフト法、原子間力顕微鏡によった。二次元電気泳動法により同定できなかった熱応答遺伝子は、ディファレンシャル・ディスプレイ法により検索を行った。新たに得られた熱応答遺伝子に亜鉛耐性に関与する遺伝子があり、その遺伝子の局在はパルスフィールド電気泳動法により決定し、亜鉛の膜輸送に関する解析はプラズマ原子吸光測定法により検討した。

### (結果)

熱ストレスによって熱ショック蛋白質ファミリーが増産しており、HSP60オペロンは*hps10*, *hps60*, またHPS70オペロンは*hrc37*, *hsp20*, *hsp70*, *hsp40*, *orf35*によりオペロンを構成していた。HPS70オペロンは、三カ所のプロモーターと二カ所の転写終結領域により、開始・終結していることが明らかとなった。*hrc37*変異株では、親株に比べてHPSオペロンの転写が増強し、*hrc37*相補により転写抑制された。プロモーター下流には特徴的な逆方向反復配列(CIRCE)が存在し、その配列にHrc37蛋白質が結合していることが明らかになった。この結合は、原子間力顕微鏡でも確認された。

熱ストレスによるディファレンシャル・ディスプレイ法により、1) バクテリオ・ファージ関連遺伝子、2) 亜鉛耐性遺伝子、3) DNAジャイレース、4) NADPHキノンレダクターゼ、5) SOS応答遺伝子群、6) その他未同定遺伝子などが熱応答していることが明らかとなった。

亜鉛耐性に関与する*czr*オペロンは、*czrA*転写抑制因子と*czrB*膜蛋白質をコードする遺伝子で構成されていた。*czr*オペロンは、熱だけでなく、亜鉛、カドミウムに対しても転写増強し、その他二価重金属では転写増強し

なかった。*czrB* 変異株では親株に比べて亜鉛感受性になっており、また、亜鉛の細胞内蓄積量が増大していることが明らかになった。パルスフィールド電気泳動法による解析では、*czr* オペロンは染色体に局在していた。

(考察)

*S. aureus* の HPS70 オペロンは、プロモーター下流にある CIRCE 配列に Hrc37 蛋白質が結合することにより、転写抑制をうけていることが明らかとなった。

ディファレンシャル・ディスプレイ法により、様々なストレス応答遺伝子群が熱応答しており、熱ストレスは細胞に様々な障害をもたらす、細胞はそれら障害に多面的に対応し、耐性度を上げ適応しているものと推察された。

*czr* オペロンは、必須金属である亜鉛の排泄系に関与していることが明らかになった。このオペロンは染色体に局在していることから、毒性金属の耐性機構とは異なり、必要量の亜鉛を維持するためのハウスキーピング・ジーンとしての役割を担っていることが示唆された。

### 審 査 の 結 果 の 要 旨

熱に対する生物の反応は最も基本的なストレス応答として大腸菌を中心に分子レベルで詳細に研究されている。本論文は黄色ブドウ球菌について、その熱応答遺伝子を解析したものである。その結果、熱ショック蛋白質のオペロン構造など、この菌の熱応答の基本様式に関して、大腸菌のようなグラム陰性菌とは異なる面を明らかにした。黄色ブドウ球菌は院内感染の主要な病原菌であり、環境条件による病原因子の産生は最も注目される場所である。本論文の成果はそのような問題の解決にも寄与する可能性がある。

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。