

氏名(国籍)	ウィリアム バ テイン (ミャンマー連邦)		
学位の種類	博士(医学)		
学位記番号	博甲第 1,575 号		
学位授与年月日	平成 8 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	Molecular Analysis of Regulatory Mechanism of Perfringolysin O Production in <i>Clostridium perfringens</i> (ウエルシュ菌におけるパーフリンゴリジン O 産生の分子機構)		
主査	筑波大学教授	医学博士	三輪 正直
副査	筑波大学教授	医学博士	岡野 栄之
副査	筑波大学教授	医学博士	中内 啓光
副査	筑波大学教授	医学博士	濱口 秀夫
副査	筑波大学助教授	薬学博士	幸田 幸直

## 論 文 の 要 旨

### (目的)

ウエルシュ菌 (*Clostridium perfringens*) はグラム陽性芽胞形成性嫌気性桿菌であり、ガス壊疽、食中毒などの原因となる病原細菌である。菌は多種類の毒素を産生し、それらが協調的に作用して組織・細胞に特徴的な病態を形成する。これらの毒素は生体外環境ではほとんど産生されずヒトや動物に感染したときに産生され特異的な病態を惹起する。すなわち菌は環境状態を感知しその情報が毒素遺伝子の発現を調節するという、一連の遺伝子発現調節機構を有していることが示唆されている。

本研究では、その分子機構を解明するためにウエルシュ菌のひとつの毒素であるパーフリンゴリジン O (perfringolysin O,  $\theta$ -毒素) を代表例として、その毒素産生の調節機構を分子レベルで解析した。

### (方法)

供試菌は *C. perfringens* strain 13 を標準株とし、その毒素産生変異株を分離し、そのうち調節因子欠損変異株と同定された SI112 を主として解析に使用した。遺伝子操作は大腸菌とウエルシュ菌のシャトルベクター pJIR418 を用いて電気穿孔法によりトランスフォーメーション、相同組換えを行った。溶血活性の測定にはヒツジ赤血球を検出系とし、相補性(コンプリメンテーション)の測定には血液寒天培地による交差培養法によった。コロニーハイブリダイゼーション、サザンハイブリダイゼーション、ノザンハイブリダイゼーション、PCR、DNA シークエンス解析、転写開始点の測定などは常法によって行った。

### (結果および考察)

ウエルシュ菌は細胞壁が堅牢でしかも DNA 分解酵素活性が高いために遺伝子操作が困難であった。そこでまず電極ポレーション法によるトランスフォーメーション法を確立するために、菌株、培養、電圧、緩衝液などの条件を検討した。その結果 *C. perfringens* strain 13 が最も適した菌株であり、菌は後期対数増殖期にあるものが最も効率よく、15%グリセリン液、菌濃度  $10^{10}$ - $10^{12}$ CFU/ml、の懸濁液  $80 \mu\text{l}$ 、添加 DNA 量  $10$ - $20 \mu\text{l}$ 、通

電は40  $\mu$ F, 2.5kV/cm, 5.28ms/2mm が最適条件であった。この条件で形質転換株の分離率は $3.2 \times 10^6 / \mu$ gDNAであった。

ニトロソグアニジンで誘導した $\theta$ -毒素変異株は大きく2群に分けられ、交差培養法により $\theta$ -毒素の産生を回復する菌株 SI112と回復しない株 SI107が分離された。SI107は $\theta$ -毒素の構造遺伝子の変異であり、SI112は毒素構造遺伝子の発現調節遺伝子が欠損していることが推察されたので、SI112に strain13の染色体遺伝子ライブラリーを導入して、 $\theta$ -毒素産生を回復させる相補的遺伝子を検索した。その結果、新しい遺伝子 *virR* が分離された。この遺伝子の構造を解析した結果、これは多くの細菌が有する2成分制御系に属するモデュレーターであることが解った。さらにこの遺伝子は、SI112に*k*-毒素 (collagenase) や血球凝集素活性を回復させた。すなわちこの遺伝子は複数の毒素構造遺伝子の発現を調節していることが示された。

*virR* の下流に環境因子を感受する成分 (センサー) である *virS* の存在が示唆され、その遺伝子構造を決定した。*virR* と *virS* はオペロンを構成し、一本の mRNA に転写され、プロモーターは *virR* の上流に2箇所あった。下流に位置するプロモーターが主要な発現を調節しており、それに *virR/S* 産物が結合することで、発現を自己調節しているらしいことがわかった。

*virR/S* オペロンが $\theta$ -毒素の産生にどのように関与しているかを *virR/S* 変異株 (TS133) を用いて検討した。 $\theta$ -毒素遺伝子 (*pfoA*) はその上流に cis-dominant に発現を調節する構造 (*pfoR*) をもっている。*pfoR* はただ一つの転写開始点を有しており、*pfoR*-mRNA は *virR/S* 変異株では発現せず、*virR/S* の導入で発現が回復するので、*virR/S* の支配下にあることが明らかであった。*pfoA* の転写開始点は2箇所 (P1, P2) であり、P2は *virR/S* による *pfoA* の発現はおそらく *pfoR* を介して行われていると推察された。

$\theta$ -毒素の産生はその構造遺伝子 (*pfoA*) の上流に、正に発現を調節する遺伝子 (*pfoR*) と、さらに上位の調節遺伝子 (*virR/S*) により制御されていることが判明した。*virR/S* は同時に他の毒素遺伝子の発現をも制御していることから、この菌における毒素産生の機構には環境因子の感知から毒素分子産生まで精巧なネットワークがあることが確認された。このようなネットワークを遮断すれば病原因子の産生を阻止することが可能であり、これに基づいて新しい抗菌剤の開発につながる可能性がある。

## 審 査 の 要 旨

本論文は、ウエルシュ菌における毒素産生の機構について分子レベルで解析し、毒素遺伝子の発現が環境因子や細胞内情報伝達機構によりグローバルに調節されていることを解明している。巧みな手技を用いた精巧な実験によって意義深い事実を発見し、病原細菌の毒素産生を抑制する新しい考え方を提示しており、今後感染症の治療ないし対策に新しい方策の開発が可能であることを示唆した質の高い論文である。

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。