

氏名(本籍)	佐々木 啓 (山形県)
学位の種類	博士(医学)
学位記番号	博乙第2552号
学位授与年月日	平成23年7月25日
学位授与の要件	学位規則第4条第2項該当
審査研究科	人間総合科学研究科
学位論文題目	<b>Identification and characterization of RTX toxins in <i>Pasteurella pneumotropica</i></b> (肺パスツレラ菌の RTX 毒素の同定と解析)
主査	筑波大学教授 理学博士 石井 哲 郎
副査	筑波大学教授 医学博士 川 上 康
副査	筑波大学准教授 博士(医学) 斎 藤 慎 二
副査	筑波大学准教授 博士(人間・環境学) 森 川 一 也

## 論 文 の 内 容 の 要 旨

### (目的)

*Pasteurella pneumotropica* (肺パスツレラ菌) は、非運動性、非芽胞形成、グラム陰性の短桿菌である。同菌は、げっ歯類における日和見病原体として知られ、免疫不全の個体に感染した場合、肺炎や敗血症などの様々な症状を引き起こす。また、ペットなどを介してヒトへの感染例も報告されており、易感染者の症例では重篤な腹膜炎などが報告されている。近年実験動物のマウスコロニーにおける肺パスツレラ菌の汚染率が高くなってきており、実験動物の管理上、最も重要な病原性微生物の一つである。

*Pasteurellaceae* やその近縁種には、細胞傷害性の高い RTX toxin (repeat in the structural toxin; RTX 毒素) を産生する菌株が多数報告されている。この RTX 毒素は、カルシウムイオンを介し赤血球や免疫系細胞に対して傷害性を示すことが知られており、重要な病原性因子と考えられている。

肺パスツレラ菌がこの RTX 毒素を産生する可能性が考えられるが、これまで報告はない。そこで本研究では、肺パスツレラ菌の RTX 毒素の同定と解析を行うことを目的とした。

### (対象と方法)

肺パスツレラ菌の標準株 ATCC 35149 (type strain) を用い、RTX 毒素をコードする遺伝子群をゲノムライブラリーからスクリーニングによって同定した。同定された遺伝子をもとに組換えタンパク質を作製し、ヒツジとマウス血液に対する溶血性、タンパク質分解性、細胞外マトリックス (ECMs) への付着能、赤血球凝集性、さらに J774A.1 マウスマクロファージ細胞に対する細胞毒性試験に供試した。また、肺パスツレラ菌の野生株や近縁種を用い、RTX 毒素をコードする遺伝子の分布や関連する遺伝子多型について解析した。

### (結果)

肺パスツレラ菌標準株のゲノムライブラリーから、3種類の RTX 毒素をコードする遺伝子を選別した。それぞれ組換えタンパク質を作成して活性を検討した結果、80-kDa の PnxIA は、ヒツジとマウス血液に対して溶血性を示し、J774A.1 マウスマクロファージ細胞に対しては、これまで同定された RTX 毒素の中でもとくに高い細胞毒性を示した。151-kDa の PnxIIA は、溶血性と J774A.1 細胞に対して細胞毒性を示したが、

高いタンパク質分解能を有していた。最も分子量が大きい 250-kDa の PnxIIIa は、明確な溶血性は確認されなかったが、ECMs 付着能と赤血球凝集性を示す細胞外膜に存在する RTX 毒素であった。これらの RTX 毒素をコードする遺伝子は、野生株にも広く分布していることが確認されたが、マウスを宿主とした菌株に広く分布する傾向が見られた。3 種のすべての RTX 毒素を保有する菌株の多くは、16S rDNA や *rpoB* の解析により特定のグループやクラスターに分類されることが明らかになった。

#### (考察)

肺パスツレラ菌の 3 種類の RTX 毒素は、RTX 毒素の特徴でもある保存領域のリピート数がヒトや家畜の病原体が産生する RTX 毒素のリピート数よりも少なく、溶血性や細胞毒性以外にも、タンパク質分解能や ECMs 付着能など他の RTX 毒素には見られない特徴を持っていることが明らかになった。また、野生株の RTX 毒素をコードする遺伝子配列やアミノ酸配列は多様性に富んでおり、それらの機能についても菌株間で異なる可能性があると考えられた。

### 審 査 の 結 果 の 要 旨

本研究は、肺パスツレラ菌の 3 種類の RTX 毒素の構造と生理活性について研究したもので、マウス等実験動物の衛生管理に有用な結果であり、優れた研究成果であると評価できる。

平成 23 年 6 月 16 日、博士（医学）学位論文審査専門委員会において審査委員全員出席のもとに学力の確認を行い、論文について説明をもとめ、関連事項について質疑応答を行った結果、審査委員全員によって合格と判定された。

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。