

|           |                                                                                                                                                                                                                           |
|-----------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 氏 名       | こ いた ばし つとむ<br>小 板 槁 努                                                                                                                                                                                                    |
| 学位(専攻分野)  | 博 士 (医 学)                                                                                                                                                                                                                 |
| 学 位 記 番 号 | 医 博 第 2942 号                                                                                                                                                                                                              |
| 学位授与の日付   | 平 成 18 年 3 月 23 日                                                                                                                                                                                                         |
| 学位授与の要件   | 学 位 規 則 第 4 条 第 1 項 該 当                                                                                                                                                                                                   |
| 研究科・専攻    | 医 学 研 究 科 病 理 系 専 攻                                                                                                                                                                                                       |
| 学位論文題目    | Genetic characterization of <i>Escherichia coli</i> O157:H7 / - strains carrying the <i>stx<sub>2</sub></i> gene but not producing shiga toxin 2<br>( <i>stx<sub>2</sub></i> 遺伝子を保有するが志賀毒素を産生しない大腸菌 O157:H7/- の遺伝学的特性の解明) |
| 論文調査委員    | (主 査)<br>教 授 光 山 正 雄      教 授 杉 田 昌 彦      教 授 一 山 智                                                                                                                                                                      |

### 論 文 内 容 の 要 旨

腸管出血性大腸菌は、出血性大腸炎や溶血性尿毒症症候群などの重篤な臨床症状をともなう食中毒の原因菌である。腸管出血性大腸菌の主な病原因子は志賀毒素 (Shiga toxin, Stx) であり、Stx は抗原性の違いに基づいて Stx1 と Stx2 に分類される。腸管出血性大腸菌の同定には血清型の決定、および Stx 産生能の検査 (PCR 法による *stx* 遺伝子の検出または抗体法による Stx の検出) が実施される。本研究において申請者らは、*stx<sub>2</sub>* 遺伝子陽性ながら Stx2 非産生性大腸菌 O157 が存在することを示し、その Stx2 非産生性メカニズムを分子遺伝学的レベルで解明した。

日本およびタイで分離した大腸菌 O157:H7/- の中に、*stx<sub>2</sub>* 遺伝子陽性ながら、抗体法 (RPLA 法) により Stx2 が検出できない菌株が 9 株含まれていた。この中から代表菌株として選出した Thai-12 株の *stx<sub>2</sub>* 遺伝子の塩基配列は、既知の *stx<sub>2</sub>* 遺伝子と相同性が高かった。さらに Thai-12 株の *stx<sub>2</sub>* 遺伝子をクローン化したりコンビナントプラスミドを保有する大腸菌 MC1061 株では、RPLA 法により Stx2 の産生が確認できたので、抗原性の変異が原因で Stx2 が検出できない可能性は否定された。

Thai-12 株と大腸菌 O157 の標準菌株である EDL933 株の *stx<sub>2</sub>* プロモーター配列中に 2 塩基の相異が認められた。*stx<sub>2</sub>* 遺伝子は、*stx<sub>2</sub>* ファージ (ラムダ様ファージ) ゲノム中の *q* 遺伝子 (抗転写終結因子をコード) の下流の後期タンパク質遺伝子群中に含まれる。*q* 遺伝子を含む 1.4kb の *q-stx<sub>2</sub>* 領域では、EDL933 株の *stx<sub>2</sub>* ファージ (933W) と Thai-12 株の相同性は低く、Thai-12 株の *q* 遺伝子はバクテリオファージ  $\Phi$ 21 の *q* 遺伝子と相同性が高かった。また他の 8 株の Stx2 非産生性菌株の *q-stx<sub>2</sub>* 領域の塩基配列は、Thai-12 株の *q-stx<sub>2</sub>* 領域と相同性が非常に高かった。Thai-12 株の *q-stx<sub>2</sub>* 領域の塩基配列を検出する PCR 法を開発し、マレーシアで分離した *stx<sub>2</sub>* 陽性大腸菌 O157 を調べたところ、30% の菌株が陽性で、陽性株では RPLA 法により Stx2 産生が認められないかあるいは産生量が少なかった。この結果から、Thai-12 株と相同な *q-stx<sub>2</sub>* 領域を保有する大腸菌 O157 は Stx2 を産生しないか産生量が低いことが示された。

*lacZ* 遺伝子融合法を用いて *stx<sub>2</sub>* 遺伝子の転写効率を調べた。この結果 Thai-12 株の *stx<sub>2</sub>* プロモーターは 933W に比べて転写効率が著しく低下していることが示された。さらに、Thai-12 株における Stx2 産生量は、933W の *q* 遺伝子の導入・強制発現により増大したが、Thai-12 株の *q* 遺伝子の導入・強制発現では微増であったことから、Thai-12 株の *Q* タンパク質は抗転写終結因子としての機能が低下していることが示唆された。また Thai-12 株の *stx<sub>2</sub>* ファージはマイトマイシン C による誘導によって増殖しなかった。

以上より、Stx2 非産生性の原因は *stx<sub>2</sub>* プロモーターの変異、および *q* 遺伝子を含む広域の変異による *stx<sub>2</sub>* ファージ増殖能の欠如であることが明らかになった。また *stx<sub>2</sub>* 遺伝子陽性ながら Stx2 非産生性大腸菌 O157 が少なくともアジア地域に広く分布していることが示唆された。

## 論文審査の結果の要旨

大腸菌 O157 に代表される腸管出血性大腸菌の主たる病原因子は志賀毒素 (Stx) であるとされている。申請者らは日本およびタイにおいて、*stx<sub>2</sub>* 遺伝子を持っているが Stx2 非産生性の大腸菌 O157 を主として食品から分離した。代表菌株の *stx<sub>2</sub>* 遺伝子の塩基配列は標準臨床菌株のものと相同性が高く、リコンビナントプラスミド中のプロモーターにより Stx2 を産生させることができた。Stx2 非産生性菌株の *stx<sub>2</sub>* 遺伝子プロモーターは標準臨床菌株のものと比べて転写効率が非常に低かった。また Stx2 非産生性菌株の *stx<sub>2</sub>* ファージの Q タンパク質は抗転写終結因子としての機能が低く、マイトマイシン C による誘導でも *stx<sub>2</sub>* ファージが増殖しなかった。以上より *stx<sub>2</sub>* プロモーターの転写効率の低下、および *q* 遺伝子を含む領域の変異による *stx<sub>2</sub>* ファージ増殖能の欠如を Stx2 非産生性の原因として結論付けた。さらに、本研究で発見した Stx2 非産生性菌株に特有の塩基配列を利用して、感染症が発生していないマレーシアで食品から分離した大腸菌 O157 から *stx<sub>2</sub>* 遺伝子陽性ながら Stx2 非産生性菌株を多数発見した。

以上の研究は、腸管出血性大腸菌 O157 の病原性メカニズムおよびこの細菌による感染症の実態の解明に貢献し、腸管感染症の診断法の確立および疫学研究に寄与するところが多い。

したがって、本論文は博士（医学）の学位論文として価値あるものと認める。

なお、本学位授与申請者は、平成18年1月17日実施の論文内容とそれに関連した試問を受け、合格と認められたものである。