

学位論文の内容の要旨

専攻	分子情報制御医学	部門	分子病態学
学籍番号	13D749	氏名	八木 弘文
論文題目	Ethanolamine utilization supports <i>Clostridium perfringens</i> growth in infected tissues		
<p>(論文要旨)</p> <p>【目的】</p> <p>Ethanolamine (EA) は細胞膜の主要な構成成分であり、生体内の各組織や腸内容物中に存在する。細菌の中にはEAを炭素源や窒素源として利用するものがあり、このEA代謝は、<i>eut</i> (ethanolamine utilization) operonを構成する一連の遺伝子群によって制御されている。近年、<i>Salmonella</i>や腸管出血性大腸菌においてEAの利用能と病原性との関連が報告されている。<i>Clostridium perfringens</i>はガス壊疽や食中毒の原因菌であるが、<i>eut</i> operonを持つ菌株と持たない菌株が存在することがゲノム解析から明らかになっている。本研究では、<i>C. perfringens</i>の増殖および病原性におけるEA利用システムの役割について検討した。</p> <p>【方法】</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. <i>C. perfringens</i> HN13株を親株として、in-frame deletion法によりEA ammonia-lyase (EAL) をコードする<i>eutABC</i>を欠失した変異株HY1701と<i>eut</i>遺伝子群の発現を制御する二成分制御システムをコードする<i>eutVW</i>を欠失した変異株HY1702を作製した。 2. HN13株, HY1701株, HY1702株およびHN1303株 ($\Delta virRS$)をTY培地, TY-1%glucose (G1) 培地, TY-1%EA (EA1) 培地およびTY-G1/EA1培地に接種し, 8時間培養後のOD₆₀₀を測定して増殖性を比較した。 3. TY-EA1培地に, EAL阻害剤であるhydroxocobalamin (OHCbl) を終濃度10 μM, 50 μM, 10 μMまたは200 μMになるように添加し, HN13株, HY1701株, ATCC13124株およびSM101株の増殖性を比較した。 4. 食中毒由来の17株を含む<i>C. perfringens</i>について, <i>eutB</i>, <i>cpe</i> (<i>C. perfringens</i> enterotoxin), <i>plc</i> (phospholipase C) および<i>pfoA</i> (perfringolysin O) 各遺伝子保有の有無をPCR法により調べた。 5. HN13株, HY1701株, HY1702株およびHN1303株をTY培地, TY-G1培地, TY-EA1培地およびTY-G1/EA1培地で2時間培養した後, RNAを採取し, <i>eutB</i>遺伝子の発現をqPCR法により比較した。 6. HN13株およびHY1701株を等量混合してマウス大腿部に接種し, 24時間後の筋肉組織中の菌数を比較した。また, HN13株, HY1701株をそれぞれ単独に接種したマウスの症状を1時間毎に接種24時間後まで観察し, スコアリングにより評価した。 <p>【結果】</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. 培地へのglucoseとEA添加はともにHN13株の増殖を促進した。HY1701株ではglucoseの添加によりHN13株と同様に増殖が促進されたが, EA添加による増殖促進効果は認められなかった。また, EAとglucoseを同時に添加した場合, HY1701株とHY1702株ではglucoseのみを添加した場合と同等の増殖促進効果がみられたが, HN13株とHY1303株ではglucose単独添加の場合に比較して増殖性が低下した。 2. TY-EA1培地へのOHCbl添加により, <i>eut</i>-positive <i>C. perfringens</i> (HN13株, ATCC13124株)では添加したOHCblの添加濃度依存性にEAによる増殖促進効果が抑制されたが, <i>eut</i>-negative <i>C. perfringens</i> (HY1701株, SM101株) についてはOHCbl添加濃度に関わらず増殖性に差を認めなかった。 			

3. *eutB*遺伝子は、ガス壊疽株2株およびプラスミド性*cpe* (*C. perfringens* enterotoxin) 保有株4株すべてで検出されたが、染色体性*cpe*保有株13株ではすべての株で検出されなかった。
4. EAの添加により、*eutB*の発現はHN13株、HN1303株で亢進したが、HY1702株ではEA非添加培地と同等であった。TY培地で培養したHN1303株での*eutB*発現は、同培地でのHN13株の発現と比較して有意に低値を示した。glucoseを添加するとHN13株、HY1702株での*eutB*の発現はTY培地での発現と比較して低下したが、HN1303株では低下せずHN13株と同等であった。
5. HN13株を接種したマウスはHY1701株接種マウスと比較して重症化傾向を示した。HN13株とHY1701株を等量接種したマウスの24時間後の筋肉組織中では、HN13株が優勢に増殖した。

【考察・結論】

本研究では、*C. perfringens*の*eut*システムが、*in vitro*および*in vivo*での本菌の増殖を支持することを示した。*C. perfringens*が感染組織中でEAを優先的に利用できることにより、増殖や病原性に寄与していることが示唆され、さらに、本菌の病原性因子のグローバルレギュレーターであるVirRSが、グルコースおよびEA利用状況に応じて、*eut*遺伝子群の発現に関与していると考えられた。これらの知見は、*eut*システムが*C. perfringens*により惹起されるガス壊疽および壊死性腸炎の治療標的となる可能性があり、EAL阻害剤であるOHCblがその候補薬物となり得ることを示すものである。

掲 載 誌 名	Microbial Pathogenesis		第 119巻
(公表予定) 掲 載 年 月	2018年4月11日 (オンライン公表) 2018年6月掲載	出版社(等)名	ELSEVIER
Peer Review	(有) . 無		

(備考) 論文要旨は、日本語で1, 500字以内にまとめてください。