




## 学位論文審査の結果の要旨

平成 30年 8月 28日

審査委員	主査	星野 克明			
	副主査	神鳥 成 34			印 
	副主査	門脇 則光			
願出者	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				
学位論文の審査結果	合格 <input checked="" type="radio"/> ・ 不合格 <input type="radio"/> (該当するものを○で囲むこと。)				

## 〔要旨〕

一部の細菌は、宿主の生体組織中に存在するethanolamine (EA)を炭素源や窒素源として利用しており、その代謝にはEA utilization (*eut*)オペロンを構成する一連の遺伝子群が関与している。近年、サルモネラ菌や腸管出血性大腸菌において、EA利用能と病原性との関連が報告されている。本研究では、ガス壊疽や食中毒の原因菌である*Clostridium perfringens*の増殖、および病原性におけるEA利用システムの役割を検討した。

*C. perfringens* HN13株について、EA ammonia-lyase (EAL)をコードする*eutABC*遺伝子を欠失するHY1701株と、二成分制御系をコードする*eutVW*遺伝子を欠失するHY1702株を作製した。HN13株、HY1701株、HY1702株の増殖性を、TY培地、1% glucoseを含むTY培地(G1)、および1% EAを含むTY培地(EA1)で比較した。HN13株の増殖はglucoseあるいはEA添加により促進したが、HY1701株およびHY1702株の増殖は、EA添加によって促進されなかった。EA添加による増殖は、*eut*遺伝子が必用である事が示された。

EAL阻害剤であるhydroxocobalamin (OHCbl)が、*eut*オペロンを保有する*C. perfringens*の増殖を抑制する事ができるか検討した。その結果OHCblは、用いた菌株のEA依存的な増殖を濃度依存的に抑制できることが明らかとなった。数種類の*C. perfringens*菌株について*eutB*遺伝子の保有状況を調べた結果、ガス壊疽株2株、および*cpe*遺伝子をプラスミドに保有する4株が陽性であった。一方で、*cpe*遺伝子を染色体に保有する菌株では*eutB*遺伝子が陰性であった。ガス壊疽の病態形成と*eut*遺伝子の保有状況に関連性が見られた。

EA添加による*eutB*遺伝子の発現変動を調べた結果、HN13株、HN1303株( $\Delta$ *virRS*)では発現レベルの亢進が確認できたが、HY1702株では亢進が見られずTY培地のみと同レベルであった。また、HN13株とHY1702株では、glucose添加により*eutB*遺伝子の発現レベルがTY培地のみで見られる発現レベルよりも低下した。一方で、HN1303株ではglucose添加により*eutB*遺伝子の発現亢進が見られた。これらの結果から、*C. perfringens*では、2種類の二成分制御系遺伝子(*virRS*, *eutVW*)が、glucoseとEAを利用できる環境に対応して、*eutB*遺伝子の発現を調節していることが

考えられた。

*In vivo*における*eutABC*遺伝子の機能を調べるために、HY1701株を用いるマウスガス壊疽感染モデルで解析した。その結果、HY1701株を接種したマウスでは、HN13株を接種したマウスと比較して、軽症の傾向を示した。また、HY1701株とHN13株を同数ずつ混合後、マウスに接種し、24時間後の筋肉組織中に見られる菌株の存在割合を調べた結果、HN13株が優勢に増殖している事が明らかとなった。

以上の結果から、*eut*オペロンが*C. perfringens*のEA利用能を決めており、EA依存的な菌の増殖に寄与している事が明らかとなった。また、感染組織中でのEA利用が、*C. perfringens*の病原性および増殖に関連していることが示唆された。*C. perfringens*のEA利用システムは、ガス壊疽や壊死性腸炎の治療標的となる可能性があるため、EAL阻害剤であるOHCblが候補薬物になると考えられる。

### 審査結果

平成30年8月22日に行われた学位論文審査委員会において、以下に示す様々な質疑応答が行われたが、それぞれに対して適切な回答が得られた。

1. 臨床で見られるガス壊疽の菌の由来について。また、健常者がガス壊疽株を保有している可能性はあるのか。
2. 食中毒株について、*eut*遺伝子、*cpe*遺伝子、*pfoA*遺伝子の保有状況とその臨床的意義は何か。
3. HY1701株( $\Delta$ *eutABC*)株について、EALをコードする*eutBC*遺伝子のみの欠失で充分ではないか。
4. glucoseとEA共存下でglucoseよりEAの利用が優先されるメカニズムがあるのか。また、両者の代謝経路が拮抗する可能性があるのか。
5. マウスガス壊疽モデルの症状(倦怠感)をどのようにして評価するのか。
6. OHCblがシアン中毒の治療に使用される場合の投与経路。
7. OHCblは菌の増殖を抑制するが、それ以外に病原因子の発現に影響するのか。
8. マウスガス壊疽モデルで、親株を接種したマウスと変異株を接種したマウスの症状の差が見られるが、増殖性の違いによるのか、病原因子の産生性に違いがあるためなのか。
9. 壊死性腸炎に対する治療効果評価のためのモデルはあるのか。

本研究は、*eut*オペロン遺伝子を有する*Clostridium perfringens*では、EA依存的に菌の増殖が亢進する事を示している。また、マウスを用いるガス壊疽感染実験で、EAL遺伝子が病原性の増大に寄与している事を明らかにした。ヒドロキシコバラミンは、*eut*オペロン遺伝子にコードされるEALの酵素活性を、不可逆的に阻害する薬剤である。このヒドロキシコバラミンが、EAに依存する菌の増殖を抑制できることも示した。*C. perfringens*感染に起因するガス壊疽、および壊死性腸炎に対する治療薬の候補を示唆した点で意義がある。本研究で得られた成果は、ガス壊疽に対する新しい治療戦略の開発に貢献すると考えられ学術的価値も高い。よって、本審査委員会では審査員全員一致して博士(医学)論文に相応しいものと判断し、合格とした。

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

(備考) 要旨は、1, 500字以内にまとめてください。