

氏名 (生年月日) <sup>よこたに</sup>横谷 <sup>あつし</sup>篤 (1993年3月11日)

学位の種類 博士(薬学)

学位記番号 博薬第217号

学位授与の日付 2022年3月19日

学位授与の要件 学位規則第4条第1項該当

学位論文題目 セレウス菌における PlcR 転写制御系の違いがスフィンゴミエリナーゼ産生量に与える影響の解析

論文審査委員 (主査) 教授 八尋 錦之助

(副査) 教授 藤室 雅弘

(副査) 教授 村木 優一

## 論文内容の要旨

### 序章

*Bacillus cereus* (セレウス菌) は、グラム陽性菌であり、リネンやタオル汚染、点滴ラインなどを通して、感染が広がる事がある。本菌は、食中毒の原因菌として有名である一方、免疫不全患者に敗血症などの重篤な感染症を引き起こす事がある。これまでの研究から、本菌が産生するスフィンゴミエリナーゼ (SMase) は、マクロファージの膜の流動性を低下させ、機能障害を引き起こし、セレウス菌の病原性に強く関与していると考えられる。多くのセレウス菌株は、SMase の遺伝子を保有しているにもかかわらず、SMase 産生菌株と産生しない非産生菌株に分類される。菌株間で SMase 産生量が異なる制御メカニズムに関する詳細な報告はされていない。セレウス菌では、SMase は、PlcR 転写制御系により制御されている。転写制御因子である PlcR は 34-kDa のタンパク質であり、対象遺伝子のプロモーター領域に存在する「PlcR box」と呼ばれる塩基配列に結合し、転写を活性化する。本論文では、セレウス菌における SMase 産生と PlcR 転写制御系の関係について研究を行った。

### 第1章：PlcR box 配列と SMase 産生量によるセレウス菌の分類

SMase の遺伝子はホスファチジルコリン特異的ホスホリパーゼ (PCPLC) の下流に位置し、PCPLC とオペロンを組んでいる。オペロン内には、PCPLC のプロモーター領域に PlcR box (PCPLC-PlcR box)、SMase のプロモーター領域に PlcR box 様の配列 (SMase-PlcR box) が存在する。特に、前者の PlcR box が、SMase を正に制御している事が分かっている。そこで、菌血症患者由来の臨床分離株 38 株と ATCC 由来のセレウス菌 2 株を用いて、PCPLC-PlcR box のシークエンス解析を行った。その結果、TATGAACATTTGCATA の配列を持つ Group I、TATGAAAATCTGCATA の配列を持つ Group II、TATGAACATTTACATA の配列を持つ Group III に分類できた。また、4 時間培養後の上清中 SMase 産生量と活性を測定したところ、Group I と Group II に属するセレウス菌の多くは産生量や SMase 活性が高かった一方で、Group III では SMase の産生量や活性が低かった。これらの結果より、PCPLC-PlcR box の配列が、セレウス菌の SMase 産生量に影響している事が示唆された。

## 第2章：定常期における SMase 産生の時間変化

SMase の産生は定常期開始点で最大を示し、定常期では時間依存的に減少する事が報告されており、SMase-PlcR box が SMase を負に制御している可能性も示唆されている。そこで、SMase-PlcR box のシーケンズ解析を行った結果、Group I では ATACAATACATGGAGGTAT の配列を、Group II では ATACAC----ATGGAGGTAT、Group III では ATACAA----ATGGAGGTAT を持っていた。次に、定常期での SMase 活性の時間変化を調べた結果、Group I の SMase 活性は、定常期開始点の培養 4 時間目で最大となり、その後、時間依存的に減少した。一方、Group II では、4 時間目までは Group I と同様の活性を示したが、4 時間目以降も SMase 活性が維持された。Group III は、4 時間目以降も活性が低かった。この結果より、PCPLC-PlcR box と SMase-PlcR box で SMase 産生を制御している事が示唆された。

## 第3章：PlcR box group 間におけるセレウス菌の病原性比較

次に、PlcR box group 間の SMase 産生の違いが、宿主に対する病原性に反映されるか比較検討を行った。まず、Balb/c マウスに ATCC14579, KPUM46, KPUM25, KPUM40 を腹腔内投与した。その結果、ATCC14579, KPUM46 (Group I) および KPUM25 (Group II) 感染マウスは 19 時間以内に 100% 致死に至った。一方、KPUM40 (Group III) では致死に至らなかった。以前の研究で、セレウス菌が産生する SMase は、マクロファージの細胞膜に含まれるスフィンゴミエリンを加水分解することにより食食を抑制することが報告されている。そこで、セレウス菌を RAW264.7 と培養し、gentamicin で処理することにより食食抑制能を検討した。その結果、SMase 非産生菌株である KPUM40 が食食された菌数は、SMase 産生菌株である ATCC14579, KPUM46, KPUM25 に比べて劇的に多かった。つまり、SMase 産生菌株はマクロファージからの食食を回避することができる。これらの結果から、SMase 産生菌株である Group I および II の病原性が、非産生菌株である Group III よりも高いことが示唆された。

## 第4章：PlcR box 配列により SMase 産生が変化する要因の探索

これまでの結果から、PlcR box 配列が、SMase 産生に影響を与えている事が示唆されたことから、PlcR box 配列の違いが SMase 産生に与える要因の探索を行った。最初に、定常期における菌体中の SMase の mRNA 量の時間変化を調べた。その結果、Group I の mRNA は 4 時間目で最大量を示し、その後、減少した。Group II では、4 時間目から 8 時間目までに増加し、12 時間目では 4 時間目と同量程度まで減少した。また、Group III では、Group I や Group II と比較して、mRNA 量は少なかった。以上の事より、SMase 量と mRNA 量は相関しており、PlcR box 配列の違いが、SMase の転写に影響を与えている事が示唆された。次に、PlcR box と転写因子 PlcR との結合親和性を調べた。PCPLC-PlcR box では、Group III の結合親和性は Group I や Group II と比べて低かった。また、SMase-PlcR box では、Group I の結合親和性は Group II や Group III と比べて高かった。つまり、Group I では PCPLC-PlcR box (SMase を正に制御) と SMase-PlcR box (SMase を負に制御) が共に働き、Group II では PCPLC-PlcR box が Group I 同様に働くが、後者の働きが弱い。Group III では両者の働きが弱い事が示唆された。この結果は、SMase 産生の挙動と矛盾しない結果であると考えられる。

## 総括

PlcR box の配列の違いが SMase の産生に影響を与え、その結果、病原性が変化することが明らかとなった。加えて、PlcR box の配列によって転写因子との結合親和性が変化し、SMase の転写に影響

する事が、SMase 産生が異なる要因の一端であると見出した。新たな知見である PlcR box 配列に基づく分類は、高病原性セレウス菌の検出に貢献するものと期待している。

## 審査の結果の要旨

### 《緒言》

グラム陽性菌である *Bacillus cereus* (セレウス菌) は、食中毒の原因菌として知られている。一方、免疫不全患者では、敗血症などの重篤な感染症を引き起こす事がある。これまでの研究から、本菌が産生するスフィンゴミエリナーゼ (SMase) は、細胞障害を引き起こし、本菌の病原性に強く関与している。多くのセレウス菌株は、SMase の遺伝子を保有しているにもかかわらず、SMase 産生菌株と産生しない非産生菌株に分類される。本論文では、菌株間で SMase 産生量が異なる制御メカニズムに関して、SMase の発現に関与する転写制御因子である PlcR の結合するプロモーター領域に存在する「PlcR box」の塩基配列の違いに着目し研究を行った。

### 《審査結果の要旨》

第1章では、PlcR box 配列と SMase 産生量により、臨床分離株を含む 40 株を 3 つのグループに分類した。Group I と Group II に属するセレウス菌の多くは産生量や SMase 活性が高かった一方で、Group III では SMase の産生量や、その活性が低かった。

第2章では、全ての菌培養し、定常期における SMase 産生の時間変化を解析し、3 つのグループに分けられたプロモーター領域の配列によって、その産生量が異なる事を明らかにした。即ち、Group I の SMase 活性は、定常期開始点の培養 4 時間目で最大となり、その後、時間依存的に減少した。一方、Group II では、4 時間目までは Group I と同様の活性を示したが、4 時間目以降も SMase 活性が維持された。Group III は、4 時間目以降も活性が低かった。この結果より、PCPLC-PlcR box と SMase-PlcR box で SMase 産生を制御している事が示唆された。

第3章では、PlcR box の配列に基づいた各グループのセレウス菌の病原性を比較ため、各グループの代表株をマウスの腹腔内投与し致死活性を評価した。また、マクロファージに対する貪食能への影響を調べた。SMase を持続的に産生する菌株 (Group I, II) は、強いマウス致死活性、貪食回避能を有していた。一方、SMase の産生がほとんど無い Group III は、マウスに対する致死活性は無く、マクロファージにも多くの菌が貪食されていた。

第4章では、SMase のプロモーター領域への転写因子の結合能の違いの有無を SMase 産生の異なる 3 グループの代表株を用いて解析した。また、条件検討の段階ではあるが、PlcR box と転写因子 PlcR の親和性は、SMase 産生と一致する傾向が見られた。

### 《審査の結論》

本論文は、セレウス菌の主要な病原因子である SMase の産生が、個々の菌株のプロモーター領域 PlcR box の配列のわずかな違いによることを明らかにした。

PlcR box の配列によって転写因子との結合親和性が変化し、SMase の転写に影響する事が、SMase 産生が異なる要因の一端であることを示唆するデータを見出している。この検討部分に関しては更なる研究が必要であるが、本論文でのうまく行かなかった条件検討部分が基礎となり今後研究が進展する考えられる。

SMase の産生量と病原性発現が一致している事から、SMase 産生菌を早期に判別する事が重要である。この配列を元にした PCR による新規の迅速診断法の確立に寄与出来ること、また非病原性のセレウス菌をこのプロモーター領域の配列で判別出来ることから不要な抗菌薬処理により、耐性菌の出現を防ぐことができると期待される。

以上の事から、学位論文とその基礎となる報文の内容を審査した結果、本論文は博士（薬学）の学位論文としての価値を有するものと判断する。