

博士学位論文

学位論文内容の要旨および審査結果の要旨

氏 名 三浦 祥

学位の種類 博士（獣医学）

学位授与の条件 酪農学園大学学位規程第3条第3項に該当

学位論文の題目 *Salmonella* 属菌における百日咳毒素様 ADP-リボシル化毒素
(ArtAB) の産生機構に関する研究

審査委員

主査 教授 内田 郁夫（獣医細菌学）

副査 教授 大杉 剛生（実験動物学）

副査 教授 村松 康和（人獣共通感染症学）

副査 准教授 臼井 優（食品衛生学）

学位論文要旨

Salmonella 属菌における百日咳毒素様 ADP-リボシル化毒素 (ArtAB) の産生機構に関する研究

酪農学園大学大学院獣医学研究科

獣医学専攻博士課程

獣医細菌学ユニット 三浦 祥

Salmonella は細胞内寄生菌であり、家畜、家禽に下痢、敗血症などを引き起こすことに加え、人の食中毒の原因としても重要である。近年いくつかの *Salmonella* 属菌において百日咳毒素様 ADP-リボシル化毒素 (ArtAB) が新たに見いだされ、その病原性に果たす役割が注目されている。本研究では ArtAB 毒素の産生機構を解明することを目的として、その遺伝子 (*artAB*) をコードするプロファージを同定し (第 I 章)、SOS 応答誘発物質と *artAB* の発現誘導およびファージ誘導との関連を解析するとともに (第 II 章)、*artAB* のマクロファージ内における発現およびその機構について解析し (第 III 章)、以下の結果を得た。

第 I 章では *Salmonella* 属菌の *artAB* をコードするプロファージに関する解析を実施した。*artAB* 遺伝子を保有し、その発現が確認されている *Salmonella enterica* subsp. serotype Typhimurium definitive phage type 104 (DT104)、*S. Worthington* および *S. bongori* の全ゲノム塩基配列を解析したところ、*artAB* はいずれの場合も菌の保有するプロファージにコードされていることが明らかとなり、これらをそれぞれ Art-DT104、Art-SW、および Art-Sb とした。Art-DT104 と Art-SW は比較的高い相同性 (77%) を示したが、Art-Sb は 2 つのプロファージに対して低い相同性 (43%以下) であり、サイズも小さく、incomplete phage として同定された。以上のことから、*artAB* は溶原ファージの水平伝搬により獲得されたものであることが推測された。さらに、*artA* と *artB* はプロファージ上において同一の転写産物に転写されていることから、両者はポリシストロン性のオペロンを構成していることが示唆された。

第 II 章では *artAB* の SOS 応答誘発物質による発現誘導機構の解明を目的として、各種 SOS 応答誘発物質の ArtAB 産生、*artA* および SOS 応答に関与する *recA* の発現、*artAB* をコードするプロファージの誘導に及ぼす影響について検証した。*Salmonella* 属菌における ArtAB 毒素産生誘導はマイトマイシン C (MTC) のみならずキノロン系抗生物質によっても起こり、ArtAB

の産生誘導は *artAB* 遺伝子の転写レベルでの誘導であることを明らかとした。*S. Typhimurium* DT104 および *S. Worthington* では *artAB* の発現には、*recA* の発現と Art フェージの誘導を伴うことが示されたが、*artAB* が incomplete phage にコードされている *S. bongori* においては、*recA* の発現誘導が起きるものの、フェージの誘導は認められない。一方、SOS 応答を誘導する物質として知られる H₂O₂ 処理により *S. Typhimurium* DT104 における *artAB* の転写レベルの有意な増加が認められたが、*S. Worthington* においては認められず、H₂O₂ による *artAB* 発現誘導は血清型や菌種により異なることが明らかとなった。

第Ⅲ章では、*artAB* の *in vivo* での発現を調べるため、DT104 をマクロファージ様細胞 RAW264.7 細胞に貪食させ、細胞内での *artAB* の発現動態を解析した。*S. Typhimurium* DT104 の *artA* 発現量は感染後 RAW264.7 細胞内においては有意に上昇したが、*S. Worthington* および *S. bongori* では有意な上昇は認められなかった。しかし、細胞内の活性酸素種 (ROS) の産生を増加させる PMA で刺激した細胞内では 3 株全てにおいて *artA* および *recA* の発現が上昇し、*S. Typhimurium* DT104 および *S. bongori* では両遺伝子の発現は共に有意な上昇を示した。一方、マクロファージ細胞内において、*S. Worthington* および *S. bongori* では、酸化ストレス応答制御因子である *oxyR* の発現上昇が認められたが、*S. Typhimurium* DT104 の場合 PMA で刺激した場合においても有意な発現の上昇は認められなかった。OxyR の作用により誘導的に発現し、フェージの溶原化を維持するために必要な *cI* リプレッサー遺伝子の発現は *S. Worthington* において有意に上昇し、*S. Typhimurium* DT104 ではそれが認められなかった。蛍光免疫染色法によりマクロファージ内における *S. Typhimurium* DT104 の ArtA 産生が確認された。以上のことから、マクロファージ内における *S. Typhimurium* DT104 の *artAB* は細胞内の ROS の作用により発現するが、*S. Worthington* のように *oxyR* の発現応答の強い菌では *cI* リプレッサーによりフェージ誘導が抑制されるために *artAB* の細胞内発現が弱くなるものと推察された。すなわち、細菌の酸化ストレス応答の強弱が *in vivo* における毒素産生能に反映している可能性が示唆された。

以上の研究から、プロフェージ上にある *artAB* の発現誘導は SOS 誘発物質の刺激により引き起こされた SOS 応答によるフェージ誘導とそれに伴う *artAB* の転写の増加により起こることが示唆された。また、*artAB* のマクロファージ内での発現は SOS 応答誘発物質である H₂O₂ などの ROS により誘導されることも示唆された。本研究で得られた研究成果は、ArtAB 毒素の *Salmonella* 属菌における病原性因子としての役割を解明するための基礎知見となり *Salmonella* 症の診断、予防、治療法の開発・改良にもつながることが期待される。

論文審査の要旨および結果

1 論文審査の要旨および結果

審査は、1) 体裁を整え、新規性があり、明確に十分な根拠があるか、2) 科学および獣医学の発展に寄与する内容であるかの2点を重点に行われた。

論文の概要について

本研究では、近年 *Salmonella* 属菌において新たに見いだされた百日咳毒素様 ADP-リボシル化毒素 [ArtA/ArtB (ArtAB)] の産生機構を明らかにする目的で、ArtAB 遺伝子 [artA/artB (artAB)] の *in vitro* および *in vivo* における発現機構を解析した。まず、artAB をコードするプロファージを同定し (第 I 章)、次いで、SOS 応答誘発物質と artAB の発現誘導およびファージ誘導との関連を解析するとともに (第 II 章)、artAB のマクロファージ内における発現およびその機構について解析した (第 III 章)。

研究の背景と目的

Salmonella は細胞内寄生菌であり、家畜、家禽に下痢、敗血症などを引き起こすことに加え、人の食中毒の原因としても重要である。近年いくつかの *Salmonella* 属菌において百日咳毒素様 ADP-リボシル化毒素 ArtAB が新たに見いだされ、その病原性に果たす役割が注目されている。本研究においては、ArtAB の産生機構の解明を目的として、artAB 遺伝子を保有する *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serotype Typhimurium (*S. Typhimurium*) ファージ型 DT104、*S. Worthington* および *S. bongori* における当該遺伝子の *in vitro* 及び *in vivo* における発現機構の解明を試みた。

研究の成果

第 I 章では artAB が *S. Typhimurium* DT104、*S. Worthington* および *S. bongori* のいずれの場合も菌の保有するプロファージ (Art ファージ) にコードされていることを明らかとし、artAB はファージの水平伝搬により獲得されたものであることが示唆された。さらに、artA と artB はプロファージ上においてオペロンを構成していることが示された。

第 II 章では、*S. Typhimurium* DT104 および *S. Worthington* における ArtAB の産生誘導がマイトマイシン C やキノロン系抗生物質などの SOS 応答誘発物質処理により起こり、それは artAB の転写レベルの誘導であり、その際 recA の発現と Art ファージの誘導を伴うことが示された。しかし、artAB が incomplete phage にコードされている *S. bongori* においては、artA および recA の有意な発現上昇が認められたが、ファージの誘導は認められなかった。SOS 応答誘発物質の一つである H₂O₂ の場合、*S. Typhimurium* DT104 における artA の転写レベルの有意な増加が認められたが、*S. Worthington* および *S. bongori* においてはそれが認められず、H₂O₂ による artAB 発現誘導は血清型や菌種により異なることが示唆された。

第 III 章では、artAB の *in vivo* での発現を調べるため菌をマクロファージ様細胞 RAW264.7 細胞に貪食させ、細胞内での artAB の発現動態を解析した。蛍光免疫染色法によりマクロファージ内における *S. Typhimurium* DT104 の ArtAB 産生が確認された。細胞内の活性酸素種 (ROS) の産生を増加させる PMA で細胞を刺激した場合、3 株全てにおいて artA および recA の発現が上昇し、*S. Typhimurium* DT104 および *S. bongori* では両遺伝子の発現は共に有意な上昇を示した。しかし、*S. Worthington* においては artA の発現は有意な上昇が見られなかった。一方、細胞内における酸化ストレス応答制御因子である oxyR の発現は *S. Worthington*

において上昇が認められたが、*S. Typhimurium* DT104 の場合、発現の上昇は認められなかった。OxyR の作用により発現が増加し、ファージの溶原化を維持するために必要な *cI* リプレッサー遺伝子の発現は *S. Worthington* において有意に上昇し、*S. Typhimurium* DT104 ではそれが認められなかった。以上の結果から、マクロファージ内における *S. Typhimurium* DT104 の *artAB* は細胞内 ROS の作用により発現するが、*S. Worthington* のように *oxyR* の発現応答の強い菌では *cI* リプレッサーによりファージ誘導が抑制されるために、*artAB* の細胞内発現が弱くなるものと推察された。すなわち、細菌の酸化ストレス応答の強弱が *in vivo* における毒素産生能に反映している可能性が示唆された。

研究の評価

本研究により、*Salmonella* 属菌に新たに見出された ArtAB 毒素の *in vitro* および *in vivo* における産生機構の解明が進んだ。特に *Salmonella* 属菌が細胞内寄生菌であることから、マクロファージ内において ROS が *artAB* の発現を誘導することおよび酸化ストレス応答の違いが毒素産生能に反映することは *Salmonella* の病原性を考える上で興味深い。本研究で得られた研究成果は、ArtAB 毒素の *Salmonella* 属菌における病原性因子としての役割を解明するための基礎知見となり、*Salmonella* 症の診断、予防、治療法の開発・改良にもつながることが期待される。

学位論文の一部を公表した論文

1. Miura S, Tamamura Y, Takayasu M, Sasaki M, Nishimura N, Tokugawa K, Suwa I, Murata R, Akiba M, Kusumoto M, Uchida I. Influence of SOS-inducing agents on the expression of ArtAB toxin gene in *Salmonella enterica* and *Salmonella bongori*. *Microbiology* 166:785-793. 2020
2. Miura S, Satoh R, Tamamura-Andoh Y, Tokugawa K, Beppu M, Nozaki C, Murata R, Kusumoto M, Uchida I. Intra-macrophage expression of ArtAB toxin gene in *Salmonella*. *Microbiology in press*(2022年2月3日アクセプト)

以上のことから、三浦 祥 氏は博士（獣医学）の学位を授与されるに十分な資格を有すると審査員一同は認めた。

2 最終試験の結果

審査委員 4 名が最終試験を行った結果、合格と認める。

2022年 2月7日

審査委員

主査 教授 内田 郁夫
副査 教授 大杉 剛生
副査 教授 村松 康和
副査 准教授 白井 優