

論文の内容の要旨

論文題目 *Streptococcus suis* の分子遺伝学的解析

氏名 高松大輔

Streptococcus suis は豚に髄膜炎、心内膜炎および関節炎等を起こす病原菌で、まれに人にも感染し髄膜炎を起こすことがある。本菌には病原因子の候補がいくつか報告されているが、その起病性との関わりについては不明な点が多い。本菌における病原因子と発病メカニズムの解明を妨げている一因として、分子遺伝学的解析系の乏しさ、すなわち、本菌への遺伝子の導入や遺伝子の破壊を効率良く行うための宿主-ベクター系が開発されていないことが挙げられる。そこで著者は、*S. suis* において遺伝子導入および遺伝子破壊を行うためのベクターを作製し、その有用性を実証するため、今回一連の実験を行い、以下の成績を得た。さらに、病原因子の候補の多くは全ての強毒株に保有されているわけではないという事実に着目し、その分子遺伝学的背景を推察するために、以下の解析を行った。

まず、*S. suis* 血清型 2 型 DAT1 株が小型のプラスミド pSSU1 を保有していることを見出し、その全塩基配列を決定した。その結果、pSSU1 は全長 4,975bp で、6 つの open reading frame (ORF) を含んでいた。FASTA および BLAST を用いた相同性検索の結果、6 つの ORF にコードされる蛋白質のうち、ORF1, ORF2, および ORF5 は、*Streptococcus agalactiae* 由来のプラスミド pMV158 上にコードされる CopG, RepB, および Mob にそれぞれ高い相同性があり、さらに ORF4 は *Streptococcus ferus* 由来のプラスミ

ド pVA380-1 上にコードされる ORF3 に高い相同性があった。しかし、ORF3 および ORF6 については高い相同性を示す既知の蛋白質は見つからなかった。pMV158 の *copG* および *repB* 遺伝子は、このプラスミドの rolling circle (RC) 型の複製に関与する遺伝子であり、さらに pSSU1 上には、RC 型の複製をする際に重要な 2 回順向きに繰り返す配列と 2 箇所の replication origin (*ori*), すなわち double-strand *ori* および single-strand *ori* も存在したことから、pSSU1 は、RC 型の複製をする pMV158 family に属するプラスミドであることが明らかになった。

RC 型の複製をするプラスミドは、グラム陽性菌内だけでなく陰性菌内でも複製可能であることが多い。そこで、pSSU1 の RC 型の複製に必要な遺伝子領域に、抗生物質耐性遺伝子およびマルチクローニングサイト (MCS) を含む *lacZ'* 遺伝子を付加することにより、3 種のシャトルベクター pSET1, pSET2, および pSET3 を作製した。抗生物質耐性遺伝子としては、pSET1 にはクロラムフェニコール耐性遺伝子 (*cat*), pSET2 にはスペクチノマイシン耐性遺伝子 (*spc*), pSET3 にはその両者を使用した。これらのベクターは *S. suis* だけでなく *Escherichia coli*, *Salmonella* Typhimurium, *Streptococcus pneumoniae*, および *Streptococcus equi* subsp. *equi* へも効率よく導入することができた。また、*E. coli* では、DNA 断片が MCS に挿入された組換えプラスミドを持つ株を、X-gal を用いたカラーセクションによって選択することも可能だった。ところで、遺伝子解析のための宿主菌には、相同組換え頻度が低い *recA* 遺伝子変異株を使用することが多い。しかし、RC 型の複製をするプラスミドの中には、*recA* 遺伝子変異株内で不安定になるものもある。そこで、pUC19 を用いて作製した *S. suis recA* 遺伝子破壊株、既存の *E. coli recA* 遺伝子変異株、およびそれらの親株を用いて、3 種のベクターによる形質転換効率および各ベクターの菌内での安定性を調べた。その結果、*recA* 遺伝子変異株に対する形質転換効率は、pSET2 を用いた場合、*E. coli* では同等または僅かに低下した程度だったが、*S. suis* では著しく低下した。一方、pSET1 および pSET3 を用いた場合は、いずれの菌種でも、その効率は著しく低下した。また、抗生物質による選択圧非存在下では、親株に比べ *recA* 遺伝子変異株の方が、各ベクターの維持が不安定になることも明らかになった。次に、作製したベクターの有用性を実証するため、pSET2 を用いて *recA* 遺伝子全長のクローニングと *recA* 遺伝子破壊株の相補試験を行った。その結果、*E. coli* では *S. suis* の *recA* 遺伝子全長をクローニングすることができなかったが、*S. suis* ではクローニングに成功し、*S. suis recA* 遺伝子破壊株の *recA* 遺伝子の機能を相補することにも成功した。これらの成績から、pSET1, pSET2, および pSET3 がシャトルベクターとし

ただけではなく,*E. coli*ではクローニングが困難な*S. suis*の遺伝子を,*S. suis*で直接クローニングして解析するためのベクターとしても有用であることを示した。

これまで *S. suis* において遺伝子破壊株を作製する際は、上述のごとく pUC19 の様なグラム陽性菌内では複製ができないベクターを用いて、破壊したい遺伝子の一部を *E. coli* にクローニング後、その遺伝子断片を含むベクターを形質転換の方法で *S. suis* に導入し、目的の遺伝子が相同組換えによって破壊された株を得ていた。しかし、ベクター上の遺伝子断片と染色体との間で相同組換えを起こした株を得るためには、組換えの頻度を上回る効率のよい形質転換系が必要となる。ところが、*S. suis* は一般に形質転換の効率が悪く、この方法は限られた株にしか応用できない。一方、他の菌では、形質転換の効率に拘わらず、高率に目的の遺伝子を破壊するために、低温ではプラスミドが維持されるが、一定温度以上では複製が阻害される温度感受性 (Ts) ベクターを用いた方法が利用されている。この Ts ベクターを利用すれば、破壊したい遺伝子を含むベクターを保有する株を、いったん低温で増殖させた後、培養温度をプラスミドが複製できない温度まで上げて、遺伝子破壊株を得ることができる。しかし、*S. suis* では Ts ベクターが利用されていなかったことから、今回、pG+host3 の Ts ori に、抗生物質耐性遺伝子 (*cat* または *spc*)、MCS を含む *lacZ'* 遺伝子、および *E. coli* 内では培養温度に拘わらず複製ができるように CoIE1 プラスミドの ori を付加した3種の *S. suis* 用 Ts ベクター pSET4s, pSET5s, および pSET6s を作製した。ここで使用した Ts ori は *S. suis* 内だけでなく *S. equi* subsp. *equi*, *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus*, および *Streptococcus dysgalactiae* 内においても、28°Cでは ori として機能するが、37°Cではその機能が阻害されることを確認した。次に、作製した Ts ベクターの有用性を実証するため、*spc* を持つ pSET4s を用いて、*S. suis* が産生するコレステロール結合型細胞障害毒素 *suilysin* の遺伝子 (*sly*) の破壊を試みた。まず、*sly* の大部分を *cat* に置き換えた *sly* 遺伝子領域 (*sly::cat*) を pSET4s に連結した *sly* 遺伝子破壊用プラスミド pSLYK を作製し、*S. suis* DAT2 株に導入した。いったん 28°C、クロラムフェニコールおよびスペクチノマイシン存在下で pSLYK を保有する *S. suis* DAT2 株を増殖させた後、培養温度を 37°Cに上げ、クロラムフェニコール耐性菌を選択した。選択されたクロラムフェニコール耐性菌のうち、2.6%はスペクチノマイシンには感受性で、ダブルクロスオーバーにより染色体上の *sly* が完全に *sly::cat* に置き換わった *sly* 遺伝子破壊株だった。これらの成績から、今回作製した Ts ベクターは、*S. suis* の遺伝子を効率よく破壊するための有用な道具となることを示した。

近年、ゲノムの全塩基配列決定の成績等から、細菌は同種または異種の間で、病原遺伝子や薬剤耐性遺伝子など多くの遺伝子を、水平伝播により交換していることが明らかになりつつある。また、本菌においても、制限修飾遺伝子が異種菌由来の外来遺伝子で、さらに *S. suis* の株間でも水平伝播したことが明らかになった。上述の *suilyisin* は、*S. suis* の病原因子の候補の1つであるが、全ての強毒株が *suilyisin* を産生しているわけではない。従って、本遺伝子の当該領域を *suilyisin* 産生および非産生株で比較解析することは、水平伝播による病原遺伝子の拡散および本菌の進化について新たな知見を与える可能性がある。そこで、*suilyisin* 非産生性である *S. suis* DAT1 株の *sly* 遺伝子当該領域の塩基配列を決定し、*S. suis* DAT2 株の *sly* 遺伝子領域の塩基配列と比較した。その結果、*sly* の上流と下流の遺伝子は両株に保存されていたが、DAT1 株には *sly* の代わりに全く異なる遺伝子 *orf102* が存在した。*sly* または *orf102* の 5' および 3' 末端に隣接する領域では、両株間でそれぞれ 65.9 および 66.5% の相同性があり、これらの遺伝子の周辺領域には長い繰り返し配列や可動因子の痕跡は見つからなかった。次に、血清型 1 ~ 28 型の参照株を含む計 66 株で、当該遺伝子領域の構造を調べたところ、この領域で遺伝子の再編成を起こしていた 6 株の例外を除く全ての株において、ゲノム上の同じ位置に *sly* または *orf102* のどちらかの遺伝子しか存在しなかった。この成績は、*sly* または *orf102* のどちらかの遺伝子が、可動因子に頼らない何らかの方法で異種菌から獲得された外来遺伝子であることを示唆する。さらに、血清型 1 ~ 28 型の計 43 株で 16S rRNA 遺伝子による系統樹を作成し、各遺伝子型の分布を調べた結果、16S rRNA 遺伝子の塩基配列が全く同じ株の中にも、*sly* を保有する株と *orf102* を保有する株の両者が存在することが明らかになった。また、全く同じ塩基配列の *orf102* 遺伝子を保有する DAT1 株と血清型 7 型参照株が、系統樹上では比較的遠縁であることも明らかになった。これらの成績から、この遺伝子領域が *S. suis* 株間でも水平伝播により交換されたことを示すだけでなく、*S. suis* における異種菌からの遺伝子の獲得および株間での遺伝子の交換は、制限修飾遺伝子等の特殊な遺伝子だけでなく、他の遺伝子領域でも起こっていることを示した。

以上のように、本研究において確立した *S. suis* の遺伝子導入系および遺伝子破壊系は、今後、本菌だけでなく他のグラム陽性菌の病原因子の分子遺伝学的解析を行う際にも大いに貢献するものと期待される。さらに、*sly* 遺伝子の水平伝播に関する知見は、*S. suis* の病原細菌としての進化およびその多様性獲得のメカニズムを解き明かす鍵になると思われる。