

[別紙 2]

論文審査の結果の要旨

申請者氏名 高松大輔

Streptococcus suis は豚に髄膜炎、心内膜炎及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、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、遺伝子学的解析を行うための宿主・ベクター系が開発されていないことが挙げられる。本研究は、*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の作製と作製した解析系を用いて本菌の病原性を解析する上で重要な *S. suis* の多様性獲得メカニズムに関する知見を得ることを目的として行われ、論文の内容は以下の4章より構成される。

第1章 *S. suis* DAT1 株由来小型プラスミド pSSU1 の全塩基配列決定

S. suis 由来プラスミドの複製様式を明らかにし、*S. suis* への遺伝子導入用ベクター開発の基礎にすることを目的として、*S. suis* DAT1 株より小型プラスミド pSSU1 を分離し、その全塩基配列を決定した。決定した塩基配列を解析した結果、pSSU1 は、rolling circle (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ことから、pSSU1 は遺伝子導入用ベクター開発の基礎として適しているプラスミドであると考えられた。

第2章 *S. suis*-*E. coli* 用シャトルベクターの作製とその応用

第1章において明らかになった pSSU1 の複製に必要な領域を用いて、遺伝子導入用ベクター pSET1, pSET2, 及び pSET3 を作製した。作製したベクターの宿主菌への効率の良い導入と安定な維持には、宿主 RecA 蛋白質が必要であったが、各ベクターは *S. suis* だけでなく *Escherichia coli*, *Salmonella* Typhimurium, *S. pneumoniae*, 及び *S. equi* subsp. *equi* へも効率よく導入することができ、広宿主域のベクターとして利用できるようになった。さらに、*E. coli* ではクローニングができなかった *S. suis* *recA* 遺伝子全長を pSET2 を用いて *S. suis* でクローニングすることができ、*S. suis* *recA* 遺伝子破壊株の *recA* 遺伝子機能相補試験にも成功した。これらの成績から、これらのベクターが、*E. coli* ではクローニングが困

難な遺伝子を、*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。

第3章 *S. suis* 用温度感受性ベクターの作製とその応用

これまで *S. suis* での遺伝子破壊株の作製は、グラム陽性菌内では複製ができないベクターを用いて行われていた。しかし、この方法は、効率のよい形質転換系が必要なため、限られた株にしか応用できない。そこで著者は、形質転換効率に拘わらず目的の遺伝子を高率に破壊するためのベクターとして、pG+host3 の温度感受性(Ts) *ori* を利用した *S. suis* 用 Ts ベクター-pSET4s, pSET5s, 及び 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*, *S. equi* subsp. *zooepidemicus*, 及び *S. dysgalactiae* 内においても、温度感受性であることが確認された。さらに作製したベクターを用いて、*S. suis* のコレステロール結合型細胞障害毒素 *suilysin* をコードする *sly* 遺伝子の破壊株作製にも成功し、作製した Ts ベクターが、*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。

第4章 *S. suis sly* 遺伝子領域の水平伝播

分子遺伝学的解析系を用いて病原性の解析を行う場合、一般に特定の株を代表として用いることが多い。しかし、*S. suis* という菌種は多様性のある株により構成されているため、特定の株で得られた成績を、*S. suis* という種に当てはめて考察する上で、この様な多様性を生み出した分子遺伝学的背景についての知見を得ておくことは重要になる。そこで著者は *S. suis* の病原因子の候補の1つである *suilysin* に着目し、*suilysin* 非産生株の *sly* 遺伝子当該領域と産生株の *sly* 遺伝子領域の塩基配列と比較することにより、*sly* 遺伝子の水平伝播について考察した。その結果、*S. suis* の *sly* 遺伝子または *sly* 遺伝子非保有株の当該遺伝子領域に存在していた *orf102* 遺伝子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り、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ていることが明らかになった。これらの成績から、*S. suis* における異種菌からの遺伝子獲得および株間での遺伝子の交換は、*S. suis* の多様性獲得に貢献しているメカニズムであることが示された。

以上本論文は、*S. suis* の分子遺伝学的解析系を確立し、さらに、その解析系を使用して病原性の研究を行う上で重要な *S. suis* の多様性獲得メカニズムについての新知見を与えたもので、学術上、応用上貢献することが少なくない。よって審査委員一同は本論文が博士（獣医学）論文として価値あるものと認めた。