

[別紙 2]

論文審査の結果の要旨

申請者氏名 大崎慎人

グラム陽性病原細菌による感染成立に重要な役割を担う菌体表層蛋白質の中には、C 末端領域の LPXTG 配列を介して細胞壁に共有結合する cell-wall-anchored protein (CWAP) が多く存在する。*Staphylococcus aureus* では、CWAP は菌体表層に提示される過程で酵素 sortase による LPXTG 配列特異的な切断を受け、細胞壁に配置固定されることが示された。この CWAP 配置固定機構で中心的な役割を果たす sortase は *srtA* にコードされる。*Sta. aureus srtA* の類似遺伝子 (*srtA* homolog) は、グラム陽性菌ゲノム中に通常複数個存在すること、また、これら *srtA* homolog にコードされる蛋白質と *Sta. aureus* sortase との相同性は低いことが知られていた。しかし、sortase の存在が実証された細菌は、*Sta. aureus* および *Streptococcus gordonii* 以外にはなく、グラム陽性菌における sortase の媒介する CWAP 配置固定機構に関して更なる研究が必要とされていた。本研究は、豚のグラム陽性病原細菌である *Streptococcus suis* の sortase 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 3 章より構成される

sortase の基質と予想される *Str. suis* の CWAP は、Muramidase-released protein (MRP) 以外に報告されていないことから、第 1 章では、新規 CWAP の同定を目的とした *Str. suis* からの試料調整法の検討を行った。まず、菌体を muramidase で処理することで可溶化した細胞壁蛋白質の調製を行った。その結果、得られた蛋白質の 1 つがシステイン合成酵素であることを遺伝学的に明らかにした。しかし、本蛋白質は CWAP の特徴である LPXTG 配列を保有せず、今回の目的には用いた調整法が不適であると結論した。続いて、*S. suis* 細胞壁に共有結合しない蛋白質を除去するための方法を新たに考案した。すなわち、塩酸グアニジン不溶細胞壁成分を muramidase で消化した上清中の蛋白質を調製した。得られた蛋白質の N 末端アミノ酸配列を基に 4 つの遺伝子を同定し、これら遺伝子のうち 1 つは MRP を、残る 3 つは新規 CWAP (SntA, SntB, および SntC) をコードすることを明らかにした。これらの成績から、考案した試料調製法が *Str. suis* CWAP の粗精製に有用であ

ることを示した。

第2章では、*Str. suis* NCTC10234 株に5つの *srtA* homolog を見出し、これらを *srtA*, *srtB*, *srtC*, *srtD*, および *srtE* と命名して、その遺伝子領域の特徴を明らかにした。すなわち、*srtA* は DNA gyrase subunit A 遺伝子 (*gyrA*) 下流に位置し、この配置は *Str. gordonii* の sortase 遺伝子および他の *Streptococcus* 属菌の *srtA* homolog と共通していた。*srtB*, *srtC*, および *srtD* は、*srtA* と異なる領域でタンデムに並び、順列繰り返し配列が3つ周囲に存在した。*srtE* は上流に transposase をコードしたと考えられる偽遺伝子を伴い、更に他とは異なる領域に存在した。グラム陽性菌の *srtA* homolog 間の相同性は低いとされているが、*Str. suis* SrtA 蛋白質は、*Str. gordonii* sortase および *Streptococcus* 属菌の *gyrA* 下流に位置する *srtA* homolog にコードされる蛋白質に、特筆すべき高い相同性を示した。続いて、遺伝子破壊株の作出と粗精製した CWAP の2次元電気泳動解析とを併用し、遺伝子の機能を解析した。その結果、MRP, SntA, SntB, および SntC をはじめとする多くの CWAP の細胞壁への結合には *srtA* が必要とされること、一方、*srtBCD* および *srtE* はこれらの CWAP の細胞壁への結合には関与しないことを明らかにした。これらの成績から、*Str. suis* の5つの *srtA* homolog のうち、*srtA* が sortase 遺伝子であると結論した。また、他の *Streptococcus* 属菌でも同様に、sortase 遺伝子は *gyrA* 下流に位置すると推定した。更に、*srtA* の機能解析に用いた手法は、グラム陽性菌 CWAP を網羅的に同定する系としても利用可能であることを示唆した。

第3章では、由来および系統の異なる *Str. suis* 株を用いて *srtA* の保存状況を解析し、これら全ての株の *gyrA* 下流に *srtA* が位置することを明らかにした。更に、株の進化の過程で蓄積した点変異により *srtA* 配列に多様性が生じたが、遺伝子の機能は保存されていることを明らかにし、本菌種における *srtA* の生物学的重要性を示した。これらの成績から、*srtA* の媒介する CWAP 配置固定機構は、*Str. suis* が環境の変化に適応し生残するための戦略に普遍的に必要とされ、病原性の発揮はその中の一例であると考察した。

以上本論文は、*Str. suis* の菌体表層蛋白質の配置における sortase 遺伝子を同定し、同菌の分子進化に関し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。