

## 論文審査の結果の要旨

申請者氏名 田 炳和

クオラムセンシングは遺伝子の発現を制御する細菌間コミュニケーションの一つの方法で、オートインデューサー(AIs)と呼ばれるシグナル物質により調節している。異なる種類のAIsを用いることから、いくつかのタイプのクオラムセンシングが報告されている。その一つ AI-2 は LuxS により合成され、細胞膜を通して放出される。AI-2 の細胞外への蓄積は近隣の異なる菌種によって認識される。LuxS は *Vibrio harveyi* の *luxS* 遺伝子にコードされている。相同の *luxS* はグラム陰性菌、グラム陽性菌に広く検出される。

消化管内は複雑な環境で、種々の異なるタイプの細菌が生息し、時として食品媒介病原菌が侵入する。消化管内の細菌の生態において、クオラムセンシングが重要な働きをしていることはすでに示唆されてきた。

本論文の目的は *luxS* を介したクオラムセンシングに注目し、食品媒介病原菌として *C. jejuni*, *S. Typhimurium*, *E. coli* O157:H7 における *luxS* 変異株の影響を明らかにすることにある。本論文は4章から構成され、各章は以下のとおりである。

第一章では始めに *C. jejuni* 遺伝子中に *luxS* の相同遺伝子をデータベースを用いて検出した。in vitro の実験で発育の初期段階で著しく上昇する AI-2 レベルは実験期間中の3日間継続した。*C. jejuni* にみられる *luxS* 相同遺伝子である Cj1198 は *tac* プロモーターのコントロール下で pEXT20 にクローニングされ、*luxS* 遺伝子を自然欠足した *E. coli* DH5 内に発現させた。*C. jejuni* 81116 株の *luxS* 欠足変異株は *flaA* の遺伝子転写を減少し(約野生株の43%)、運動性も低くなった。しかし、この *luxS* 変異株は野生株と同等の総べん毛タンパクレベルであった。電子顕微鏡の観察でべん毛構造は変異株においても保持されていた。また、自己凝集性は変異株では減少した。これらの結果は、クオラムセンシングは *C. jejuni* の表面構造の形成に関与していることを示唆した。

第二章では *C. jejuni* の cytolethal distending toxin(CDT)をコードしている *cdt* 遺伝子 (*cdtA*, *B* と *C*) を遺伝子転写レベルで解析した。*luxS* 変種株は *cdt* の発現に影響した。RT-PCRの結果から *cdtA*, *cdtB*, *cdtC* 遺伝子は *C. jejuni* においてポリシストロンオペロンを構成した。推定上の転写開始部位は *cdtA* の開始コドンから上流 81 塩基にあることがプライマー伸長解析により明らかとなった。*luxS* 変異株の転写レベルは野生株の約 61%であった。フローサイトメトリー解析により HeLa 細胞は G<sub>2</sub>/M 期で休止し、CDT 活性により通常みられる細胞形態に変化した。*luxS* 変異株の培養上清の細胞への添加では野生株の培養上

清処置に比べ細胞変性の程度は少なかった。これらの結果は*luxS*の機能は*C. jejuni*の*cdt*遺伝子の制御に関連していることを示唆した。

第三章では無菌マウスを用いて in vivo での *luxS* を介したクオラムセンシングについて検討した。マウス糞便由来の *E. coli* の *luxS* 変異株は腸内での定着に野生株との違いはみられなかった。AI-2 の *E. coli* 単独投与マウスの糞便での産生を測定した結果、AI-2 レベルは *E. coli* の腸内での増殖の初期段階で高くなった。しかし、腸内での AI-2 レベルは LB ブロスでの in vitro の培養よりも著しく低いものであった。また、*luxS* 変異株は in vitro、in vivo とともに AI-2 は産生されなかった。無菌マウスの盲腸内容物中での in vitro の *E. coli* の培養では、in vivo 同様に AI-2 レベルは低かった。*E. coli* の培養条件、好気培養、嫌気培養により AI-2 のレベルは影響を受けた。無菌マウスの盲腸内容物培地と LB ブロスともに AI-2 レベルは好気培養に比べて嫌気培養で低かった。AI-2 の産生はブドウ糖の添加により増加したが、好気培養に比べて嫌気培養では増加の割合が低かった。*E. coli* の腸内での発育のための栄養素と環境ストレスが AI-2 の in vivo での産生に重要な役割を演じていると考えられた。

*S. Typhimurium* の *luxS* 変異株は酸素制限条件下では野生株よりも HeLa 細胞への侵入性が上昇した。無菌マウスに変異株と野生株をそれぞれ投与したが、死亡率に差はみられなかった。*Salmonella* の *luxS* 変異株と上記 *E. coli* の野生株もしくは *luxS* 変異株の 2 株投与した無菌マウスではどちらの 2 株投与群も *Salmonella luxS* 変異株単独投与群よりも延命効果がみられたが、死亡率に 2 株投与群に差はみられなかった。

第四章では in vivo で *E. coli* O157:H7 の病原性に *luxS* 変異株がどのように影響するかを無菌マウスを用いて検討した。*luxS* 変異株と野生株に定着能、Stx 産生、マウス死亡率で差はみられなかった。シポフラキシン処置により *E. coli* の菌数は減少したが、Stx 産生は増加した。しかし、野生株と *luxS* 変異株で差はみられなかった。無菌マウスでの結果と異なり in vitro の培養では Stx 産生は野生株に比べて *luxS* 変異株では低かった。興味あることに、Stx 産生は好気培養に比べて微好気培養では著しく低下した。*recA* の発現も好気培養に比べて微好気培養で低かった。しかし、*recA* の発現は野生株と *luxS* 変異株で差はみられなかった。非病原性 *E. coli* E17 とその *luxS* 変異株を無菌マウスにあらかじめ定着させたマウスに *E. coli* O157:H7 の *luxS* 変異株を投与したが、いずれの群も死亡率に差はみられなかった。神経毒であるドーパミン処置により野生株に比べて *luxS* 変異株で 1.5 日の死亡の遅延がみられた。

以上、本論文は、食品媒介病原菌の病原性における *luxS* 変異の影響について重要な知見を得たものと考えられる。よって審査員一同は本論文が博士（獣医学）の学位論文として価値あるものと認めた。