

# 論文審査の結果の要旨

氏名 杉本（吉川）ひとみ

本論文は5章からなり、第1章では *Bacillus cereus* group を構成する菌の概要と検出、治療法について述べられている。第2章では *B. anthracis* 特異的溶解酵素 PlyG の触媒能について、第3章では PlyG の *B. anthracis* に対する特異的な結合について明らかにしており、第4章では *Bacillus cereus* の環境由来株の解析を行っている。そして第5章で本研究の総括が述べられており、これら5つの章を通して極めて近縁種から構成される *Bacillus cereus* group のうち、人に病原性を持つ *B. anthracis* 及び *B. cereus* に関して行った研究について述べられている。

第2章では、PlyG の触媒ドメインの変異体を用いた分析が行われた。

PlyG の触媒ドメイン N 末側 155 アミノ酸残基は T7 lysozyme の触媒ドメインと相同性が高い。T7 lysozyme では5残基が活性に関わると予想されており、うち3残基について部位特異的変異体を用いた解析がなされている。他の触媒ドメイン類似 lysin においてもこれら5残基に相当する部位の部位特異的変異によって活性が失われたという報告がある。PlyG の触媒ドメインと90%のホモロジーを持つ *B. anthracis* prophage 由来 endolysin PlyL について既に構造が決定されており、T7 lysozyme の構造との比較から、PlyG において H29、E90、H129、K135、C137 に相当するアミノ酸残基が活性に関与すると予想されている。本論文では、T7 lysozyme での解析と同様に H29、E90、K135 について部位特異的変異体を用いた解析を行った。その結果、K135A は Wild type の PlyG と同様の溶菌活性を示したのに対して、変異体 H29N、E90A は *B. anthracis* に対する溶菌活性を失っていた。

多くの lysin は細胞壁結合ドメインの存在が酵素活性に必須であるといわれている。そこで PlyG の C 末欠失変異体を作製し、その溶菌活性について上記と同様に測定したところ、PlyG の C 末欠失変異体は溶菌活性が見られなかった。PlyG は C 末の細胞壁結合ドメインが溶菌活性に必要であることが示された。

これまで、PlyG は *B. anthracis* に対して極めて強い溶菌能を持つことが知られていたが、触媒メカニズムについては不明であった。本論文では、T7 lysozyme と同様の部位が活性に関与しており、*B. anthracis* に対して溶菌を示すためには結合ドメインを必要とすることが示された。

第3章では、PlyG の *B. anthracis* 特異的溶菌メカニズムを解明するために、PlyG の結合ドメイン、PlyGB と *B. anthracis* の特異的な結合について詳細な解析が行われた。

まず、PlyGB のアミノ酸配列から立体構造の特徴を予測し、5つの領域に分類した。これら5つの領域を様々な組み合わせで欠失させた7種類の PlyGB の変異体をリコンビナント蛋白質として調製した。*B. anthracis* と変異体との結合は、ドットプロット法により解析を行った。その結果、PlyGB のほぼ中央部10残基を欠失した変異体のみ *B. anthracis*

との結合が検出できなかつた。その 10 残基のうち、近縁種に感染する他の phage との相同性が低い 3 残基 (L190、D195、Q199) に注目し、アラニンスキャニングを行った。その結果、L190、Q199 を A に置換した部位特異的変異体で *B. anthracis* への結合の低下が見られた。これらの成績から、L190 及び Q199 が *B. anthracis* への特異的な結合に関与していることが示唆された。

さらに、PlyG の菌体側リガンドに対する研究を行った。加熱、界面活性剤、蛋白質分解酵素、溶媒、強酸処理により処理した後の細胞壁であっても PlyG 結合することが確認された。他のリガンドが糖と予想されたライシン Ply118、500 と同様の性質であるため、リガンドが糖であることが示唆された。*B. anthracis* の細胞壁の糖成分は Rib、Gal、Glu、Mur、GlcN、ManN であることが発表されている。そこで、競合 ELISA 法を用いて、これらの糖が PlyGB と細菌細胞壁の結合に対して影響を与えるか否かについて検証した。Mur、GlcN、ManN は PlyGB と細菌細胞壁の結合を競合阻害し、これらの糖が結合に関与すると考えられた。

これまで PlyG の C 末の結合ドメインが特異的な結合に関与していることは報告されてきたが、詳細については不明であった。本論文は、PlyG の結合ドメインのほぼ中央部に位置する 2 つのアミノ酸残基が *B. anthracis* との特異的結合に関わること及び Mur、GlcN、ManN が結合に影響を及ぼすことを初めて明らかにした。

第 4 章では *B. cereus* の環境由来株の解析をするために、土壌から *B. cereus* 野生株を単離し、食中毒原因細菌の多型解析に用いられる Variable number tandem repeat (VNTR) により分析した。*Bacillus cereus* group の動物への感染ルートの一つとして、土壌由来のものによる汚染が挙げられ、環境中の *Bacillus cereus* group の動態を知ることは感染のコントロールに役立つ可能性がある。だが *Bacillus cereus* group の環境由来株の解析は世界的にもあまり行われておらず、日本ではこれまで報告がない。本論文では *Bacillus cereus* group のうち *B. cereus* について環境由来株の多型解析を行った。

VNTR 5 領域について解析した結果、同一地点由来株の VNTR 型は類似している傾向が見られたものの様々な VNTR 型が見られ、同一地点由来のコロニー間に多様性があることが確認された。一つの試料から複数の VNTR 型が認められたことから、土壌中に多様な VNTR 型の *Bacillus cereus* 株が存在していることが考えられる。よって、感染経路特定の際には、土壌資料からは出来るだけ多くの *Bacillus cereus* のコロニーを分離して存在する遺伝子型が何であるのかを調べる必要があると考えられる。今回用いた解析法は、環境由来菌のみならず臨床単離株の多型解析にも有用であることが期待される。

本論文は、*B. anthracis* 特異的溶解酵素 PlyG を詳細に解析し、*Bacillus cereus* の環境由来株の多型について解析を行った初めての論文であり、PlyG の *B. anthracis* に対する溶菌、結合機構についておよび *B. cereus* の環境中の分布について新たな知見を加えたことが評価される。

したがって、博士 (生命科学) の学位を授与できると認める。