

[ 別紙 2 ]

## 論文審査の結果の要旨

申請者氏名 吉村 和敏

申請者から提出された博士論文について平成 25 年 1 月 10 日(木)農学部 7 号館 A 棟 405 号室において審査委員会を開催し、論文の内容について審査した。審査委員は獣医学専攻の久和茂、関崎勉両教授、芳賀猛、平山和宏両准教授ならびに山田章雄教授で構成し、山田教授が主査を務めた。

申請者は第 1 章において、腸管出血性大腸菌 (*Escherichia coli* O157:H7, EHEC) の無菌マウス (GF) における致死的感染モデルを用いて、*Bifidobacterium* が EHEC 感染にどのような影響を与えるかを検討した。*Bifidobacterium* 6 菌種 9 株を GF マウスに事前投与した結果、*B. longum* subsp. *infantis* 157F-4-1 (*B. infantis* 157F)ならびに *B. longum* subsp. *longum* NCC2705 (*B. longum* NS)が EHEC による GF マウスの致死的感染に対し防御効果を示すことを明らかにした。しかし前者と同一の亜種であるが異なる株 *B. longum* subsp. *infantis* JCM1222<sup>T</sup> (*B. infantis*<sup>T</sup>)ならびに後者と同一亜種であるが異なる株である *B. longum* subsp. *longum* JCM1217<sup>T</sup> (*B. longum*<sup>T</sup>) にはこのような防御効果は認められなかった。申請者は更にこの防御効果は EHEC による志賀毒素 Stx2 産生の抑制および、産生された Stx2 の体内移行を阻害することによるものであることを明らかにした。また、感染防御効果は、従来その関与が示唆されている有機酸を介しているわけではないことも明らかにした。

第 2 章では Stx2 の体内移行の阻害の機構を明らかにすることを目的とし、腸管組織における宿主遺伝子発現と蛋白質発現を、それぞれ *B. infantis* 157F と *B. infantis*<sup>T</sup> を投与した GF マウスでオミックス解析により比較した。腸管組織は盲腸と結腸に分けて解析した。マイクロアレイ解析の結果、盲腸においては *Coll6a1* の転写が *B. infantis* 157F において有意に上昇していることが明らかになった。*Coll6a1* の発現上昇はリアルタイム PCR でも確認できた。一方、結腸においては 18 遺伝子の転写が *B. infantis* 157F において有意に低下していた。*Coll6a1* は XVI 型コラーゲンの  $\alpha$  鎖をコードする遺伝子であるが、この遺伝子の発現上昇がどのように *B. infantis* 157F による感染防御と関わるかは明らかではない。しかし、盲腸において唯一この遺伝子の発現に差が認められたことはこの遺伝子が *B. infantis* 157F 防御能に関与している可能性がある。

結腸で発現低下の認められた 18 遺伝子の多くは機能の不明なものが多いが、*Till3* はチューブリンにグリシンを結合させる酵素であることから、細胞骨格系の関与が疑われた。プロテオーム解析からは同様に細胞骨格系パスウェイに関連の深い蛋白質発現が感染防御能を示す *B. infantis* 157F 投与マウスに認められた。これらの成績から、*B. infantis* 157F の投与によりアクチンやチューブリンなど細胞骨格系の蛋白質発現が抑制され腸管上皮細胞

のタイトジャンクションが安定化することにより、Stx2 の血液中への取り込みが抑制されるものと申請者は考察している。

申請者は第3章で、なぜ *B. infantis* 157F を投与したマウスで EHEC からの Stx2 酸性が低下しているかの解明を試みた。はじめにマウス腸管内に Stx2 産生の促進あるいは抑制を促す物質が存在する可能性を検討するために、GF マウスの腸管内容物抽出液の存在下で EHEC を培養し、Stx2 の産生量を測定した。GF マウスの腸管内容物抽出液が存在すると Stx2 産生量が有意に上昇したことから腸管内容物には EHEC からの Stx2 産生を促進する物質があると考えられた。この物質が蛋白質である可能性および、*B. infantis* 157F と *B. infantis*<sup>T</sup> との間で蛋白質発現に差がある可能性を検討するために、*B. infantis* 157F と *B. infantis*<sup>T</sup> を投与したマウスの腸管内容物から調整した蛋白質分画を二次元電気泳動に供した。二次元電気泳動で得られるスポットの数及び位置に両者で相違は認められなかった。次に腸管内容物をエタノール沈殿にて高分子と低分子の分画に分け、それぞれの Stx2 産生への影響を調べたところ、高分子分画に Stx2 産生増強活性が認められた。この分画は多糖を多く含むことから多糖を更に酸性、アルカリ性、不溶性の3分画に分け、その活性を見たところ、酸性多糖分画に Stx2 産生増強活性が認められた。またこれらの分画を再び混合し、混合物中で EHEC を培養したところ酸性多糖の量に依存して Stx2 産生が変化することを明らかにした。次に GF マウスの腸管内容物から調整した多糖分画を用い、*Bifidobacterium* および EHEC の分解活性を比較したところ、*Bifidobacterium* では EHEC の感染防御効果を示した株のみが酸性多糖を分解できること、その他の多糖はいずれの菌も分解しないことが明らかになった。EHEC はいずれの分画も分解した。更に *B. infantis* 157F と *B. infantis*<sup>T</sup> を投与したマウスの腸管内容物中の多糖を定量したところ、EHEC 感染防御能を示す *B. infantis* 157F を投与したマウスでは酸性多糖の量が有意に低かった。これらの成績から申請者は、EHEC による Stx2 産生は酸性多糖の存在により増強されるが、感染防御能を示す菌株を事前に投与すると酸性多糖を競合的に消費するため、EHEC による Stx2 産生が抑制されると考察した。

以上の成績は腸管出血性大腸菌症において腸内細菌の特定の株が発症予防を司ることを示しており、今後プロバイオティクスを用いた腸管出血性大腸菌症の予防・治療に重要な知見を提供するものである。よって、審査委員一同は本論文が東京大学大学院農学生命科学研究科獣医学専攻の博士（獣医学）の学位論文として十分価値があると認めた。