

## 論文審査の要旨および担当者

学位申請者	Sangkanjanavanich Nuttapone (DV14003 獣医衛生学)
学位論文題目	シグネチャータグトランスポゾン変異導入法によるロドコッカス・エクイのマウス感染への適応に関与する遺伝子の同定
担当者	主査 北里大学教授 向井 孝夫 副査 北里大学教授 胡 東良 副査 北里大学准教授 角田 勤 副査 弘前大学大学院准教授 浅野 クリスナ

## 論文審査の要旨

*Rhodococcus equi* (以下 *R. equi* とする) は、6 ヶ月齢以下の仔馬に化膿性肺炎や潰瘍を伴う腸炎などの疾病を引き起こすグラム陽性細菌である。本菌はマクロファージに感染し、その細胞内で増殖する細胞内寄生菌として知られている。*R. equi* が細胞内で生き残り増殖する能力は、病原性プラスミドを保有することにより獲得される。したがって病原性プラスミド脱落株はマクロファージ内で増殖できず、馬に対して病原性を示さない。強毒株は分子量 15~17 kDa の VapA と呼ばれる菌体表面蛋白を発現する。VapA は *R. equi* が細胞内で増殖する際に必須の因子であるが、その機能はまだ明らかでない。

かにされていない。*R. equi* を含有する食胞は初期エンドソームマーカーを正常に獲得するが、その後成熟が停滞することが知られている。近年、*in vitro* の組織培養において、VapA を細胞外から添加するとエンドソームの膨化や、LBPA, LC3, Rab7 の集積、カテプシン B の活性低下等が生じることが報告された。そこで本博士論文では、VapA 添加の影響が食胞内の細菌の生存に影響を与えうるか否かを調べた。その成果は、以下のように要約される。

## 1. 細胞外からの VapA の添加は病原性脱落株の細胞内増殖を回復させる

J774A.1 マウスマクロファージ細胞株に VapA 欠損株を感染させ、大腸菌で発現し精製された GST-VapA 融合蛋白と共培養したところ、培養 24 時間後に菌の増殖を示す細菌集塊が細胞内に観察された。一方、GST のみを添加した場合にはそのような細胞集塊は観察されなかった。これらの結果から GST-VapA の添加によりマクロファージの食胞内における抗菌作用が抑制された可能性が考えられた。そこで、通常はマクロファージ内では増殖できずに殺菌される大腸菌 DH5α 株を用いて同様の実験を行った。しかし、大腸菌 DH5α 株は GST-VapA 存在下でもマクロファージ内では増殖しなかった。さらに病原性プラスミドが脱落した *R. equi* 株（脱落株）をマクロファージに感染させ、GST-VapA 添加の影響を調べてみたところ、プラスミド脱落株もまたマクロファージ内で増殖して集塊を形成することが明らかとなった。以上の結果より、GST-VapA の添加はマクロファージの食胞内環境に何らかの影響を与えることが示唆された。また GST-VapA の添加により影響を受けた食胞内には抗菌的な作用

が残存しており、*R. equi* 病原性プラスミド脱落株は大腸菌とは異なりそのような抗菌的作用を克服して増殖する能力を保有していることが示唆された。

## 2. シグネチャータグトランスポゾン変異導入法による *R. equi* のマウス感染への適応に関与する遺伝子の同定

*R. equi* の病原性プラスミド脱落株が VapA の存在下で増殖できた一方で大腸菌は増殖できなかったことから、*R. equi* は病原性プラスミドに依存する能力以外に細胞内増殖を可能にする特性を有すると考えられた。*in vitro* における感染細胞内の菌の消失は緩慢であることから、著者は菌の消長がより観察しやすいマウス感染モデルを用いて感染に関与する *R. equi* 遺伝子の網羅的な同定を試みた。*R. erythropolis* のシャトルベクターに PCR で識別可能なタグ配列を組み込み、シグネチャータグトランスポゾン変異導入法により *R. equi* のマウス感染に関与する遺伝子を同定した。総計 4,650 株のトランスポゾン変異株を作製し、相互に識別可能な 25 株をインプットプールとして調整してマウスに投与した。感染 5 日後の肝臓から菌を分離し、抽出した DNA 中に含まれる各タグ配列の割合をリアルタイム PCR による半定量解析により調べた。インプットプールとアウトプットプールにおけるそれぞれのタグの割合を比較し、感染後に 5 倍以上の減少が見られたタグの変異株を感染能が低下した株として選出した。その結果、102 の変異株が選択されたが、それらのうちトランスポゾンの挿入部位が判明したのは 50 株であった。50 株のうち、15 株は病原性プラスミド上の遺伝子にトランスポゾンの挿入が見られた。残りの 35 株の VapA 発現をウエスタンブロー

ット解析により確認したところ、9株で VapA 発現の低下が生じていたが、26株は野生株と同程度の VapA 発現が観察された。トランスポゾンの挿入が見られた遺伝子には、アミノ酸代謝、脂質代謝、ビタミン合成、DNA の修復や組み換え、ペプチドグリカン生合成と分解、エネルギー代謝、非リボソームペプチド生合成に關与する遺伝子等が含まれていた。感染能の低下をもたらしたトランスポゾンの挿入部位として最も多かった遺伝子は非リボソームペプチド生合成に關与する REQ23810 遺伝子であった。

### 3. マウスマクロファージにおける *R. equi* トランスポゾン変異株の増殖

マクロファージ内で増殖する *R. equi* の能力はマウスへの感染の成立においても重要であると考えられる。したがって、マウス体内で生存する能力が低下した株の中にはマクロファージ内での生存能力が低下したものが含まれているかもしれない。そこで著者は前章で選択されたトランスポゾン変異株をマウスマクロファージに感染させ、それぞれの株のマクロファージ内での増殖を観察した。その結果、DEAD/DEAH helicase、oxidoreductase、acyl-CoA thioesterase、hypothetical protein (REQ26170)、carotenoid oxygenase、nitrite reductase large subunit NirB1 などの遺伝子が *R. equi* のマクロファージ内での増殖に必要であることが明らかとなった。

以上、本研究により著者は、*R. equi* の病原性プラスミド上にコードされる VapA が細胞外からの添加によりマクロファージのエンドソームに何らかの影響を与え、*R. equi* のファゴソーム内での増

殖を可能にすることを見出した。またこの研究において VapA により変化を受けた食胞内環境に *R. equi* が適応している可能性が提示された。そこで著者は、*R. equi* の研究に適用できるシグネチャータグトランスポゾン変異導入法を開発し、マウスやマクロファージ感染時に必要とされる遺伝子を同定した。見出された遺伝子の中にはこれまでに *R. equi* が動物やマクロファージ内での生存に必要なことが報告されていなかったものも含まれており、これらの知見は、*R. equi* のマクロファージ内での増殖や感染動物における病原性発揮に関わるメカニズムを理解する上で貴重な知見となるものと確信する。

審査員一同は、著者が研究者として十分な学識と資質を有しているとともに、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、合格と判定した。