



Title	ウエルシュ菌新型エンテロトキシンBECの同定と機能解析および遺伝子診断法の開発
Author(s)	余野木, 伸哉
Citation	大阪大学, 2019, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/72569
rights	
Note	やむを得ない事由があると学位審査研究科が承認したため、全文に代えてその内容の要約を公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

論文審査の結果の要旨及び担当者

(申請者氏名) 余野木 伸哉		
論文審査担当者	(職)	氏 名
	主 査 大阪大学教授	飯 田 哲 也
	副 査 大阪大学教授	堀 口 孝 幸
	副 査 大阪大学准教授	三 宅 仁 美

論文審査の結果の要旨

食中毒原因菌であるウエルシュ菌 (*Clostridium perfringens*) が産生するCPE (*Clostridium perfringens* Enterotoxin) は下痢症の発症に必須と考えられていた。ところが近年、CPEが検出されないウエルシュ菌による食中毒事例が発生していた。本研究ではこれらの事例に由来する分離菌からCPEと異なる新規のエンテロトキシンBEC (Binary Enterotoxin of *Clostridium perfringens*) を同定した。BECはBECaとBECbで構成されるADPリボシル化2成分毒素であった。BECは従来のADPリボシル化2成分毒素と同様に、a成分がNADase活性とアクチンに対するADPリボシル化活性を有し、両成分が協働して細胞を円形化させたことから、ファミリーが有する基本的な性質を保持していることを明らかとした。一方で、BECbは単独で下痢原性を示し、下痢症の主因となることとともに従来のb成分と異なる毒性発現機構を有していることを明らかにした。また、菌株等の解析からBEC産生性ウエルシュ菌株の分布と拡散に関する知見を提示した。以上の知見は、新規毒素の発見とその基本的小および特徴的な性状を提示しており、博士(医学)の学位授与に値する。

論文内容の要旨

Synopsis of Thesis

氏 名 Name	余野木 伸哉
論文題名 Title	ウエルシュ菌新型エンテロトキシンBECの同定と機能解析および遺伝子診断法の開発
論文内容の要旨 〔目的(Purpose)〕 ウエルシュ菌は人や動物の腸管のほかに、土壌、河川、海泥や食品中など広く環境中にも存在する、グラム陽性の芽胞を形成する桿菌である。このうち一部はウエルシュ菌エンテロトキシン (CPE; <i>Clostridium perfringens</i> Enterotoxin) を産生して食中毒の原因菌となることが知られている。我々はウエルシュ菌による食中毒が強く疑われるにも関わらず、分離菌がCPEを産生しない食中毒事件を2事例経験した。これらの分離菌が新規のエンテロトキシンを産生することを疑い、毒素の同定とその機能解析および診断法の構築を目的として研究を進めた。 〔方法ならびに成績(Methods/Results)〕 サックリングマウス試験による液体貯留活性を指標として、原因菌の培養上清濾液から毒素を精製し、精製毒素のN末端アミノ酸配列を解析した。分離菌からDNAを抽出して、次世代シーケンサーを用いて網羅的に塩基配列を解析した。DNA情報から得られたopen reading frame(ORF)の中に精製毒素のN末端アミノ酸配列を含むORFを検索し、1つの候補遺伝子を特定した。この候補遺伝子を欠損させた事例由来株を作製し、その培養上清濾液では液体貯留活性が消失することを確認した。 候補遺伝子がコードするタンパクのアミノ酸配列についてblastPを用いて検索すると、このタンパクはウエルシュ菌が産生するイオタ毒素やボツリヌス菌が産生するC2毒素などADPリボシル化2成分毒素のb成分と類似性を有していた。ゲノム配列の再検索によってコードタンパクのORFのすぐ近傍にa成分に該当する配列を確認した。新規エンテロトキシンはADPリボシル化2成分毒素と類似する2成分で構成されることから、我々は本毒素をBinary Enterotoxin of <i>C. perfringens</i> (BEC)、各成分をBECaおよびBECbと命名した。 一般的に、ADPリボシル化2成分毒素の活性発現には両成分が必要とされている。すなわち、b成分（膜結合成分）が細胞膜レセプターに結合後、オリゴマーを形成する。そこへa成分（酵素活性成分）が結合して複合体を形成し、複合体はエンドサイトーシスによって細胞内へ取り込まれる。a成分は細胞質でNAD⁺を基質としてアクチンをADPリボシル化し、細胞を円形化する。b成分は一般的に単独で生物活性を示さず、イオタ毒素b成分も多くの培養細胞に対して単独で細胞毒性を示さないが、A431およびA549のような特定の細胞種に単独で毒性を示すことが例外的に知られている。 BECの各成分について組換え毒素を作製して、その機能を解析した。BECaはADPリボシル化2成分毒素の活性発現に関与するアミノ酸配列をよく保存しており、NAD⁺の存在下でアクチンをADPリボシル化した。また、BECaの立体構造はその他のADPリボシル化毒素のa成分とよく類似していた。Vero細胞へBECを接種すると、BECaとBECbをそれぞれ単独で接種した場合には細胞に形態的変化は見られなかったが、同時に接種した場合には細胞が円形化した。サックリングマウスにBECを接種すると、BECbは単独で液体貯留活性を示した。BECaは単独では液体貯留活性を示さなかったが、BECbの存在下でその活性を高めた。 我々が経験したBEC産生性ウエルシュ菌による食中毒2事例の原因食品はいずれもローストビーフと考えられた。地方衛生研究所等の行状検査や汚染実態の調査に簡便に使用できる遺伝子検出系を構築し、汚染源と考えられるヒトおよびウシの腸内容物について汚染実態を調査した。BEC遺伝子保有株はCPE遺伝子保有株に比べて非常に少なかった。 〔総括(Conclusion)〕 ウエルシュ菌が産生する新規下痢原性毒素としてBECを同定した。BECはBECaとBECbの2成分で構成され、クロストリジウム属菌などが産生するADPリボシル化2成分毒素に分類された。BECaは従来のa成分と同様の作用を有しており、構造学的にもその類似性が確認された。BECbは従来のADPリボシル化2成分毒素のb成分と異なり、単独で液体貯留活性を示し、下痢症の主因であると考えられた。	