

*Streptococcus suis*の分子遺伝学的解析

高松 大輔

Molecular genetic analysis of *Streptococcus suis*

Daisuke TAKAMATSU

*Streptococcus suis*は豚に髄膜炎、心内膜炎および関節炎等を起こす病原菌で、まれに人にも感染し髄膜炎を起こすことがある。本菌には病原因子の候補がいくつか報告されているが、その起病性との関わりについては不明な点が多い。本菌における病原因子と発病メカニズムの解明を妨げている一因として、分子遺伝学的解析系の乏しさ、すなわち、本菌への遺伝子の導入や遺伝子の破壊を効率良く行うための宿主-ベクター系が開発されていないことが挙げられる。そこで本研究では、*S. suis*において遺伝子導入および遺伝子破壊を行うためのベクターを作製し、その有用性を検証した。さらに、病原因子の候補の多くは全ての強毒株に保有されているわけではないという事実に着目し、その分子遺伝学的背景を推察するために、以下の解析を行った。

第1章 *S. suis* DAT1株由来小型プラスミドpSSU1の全塩基配列決定

*S. suis*由来のプラスミドの複製様式および複製の制御機構を明らかにし、*S. suis*への遺伝子導入用プラスミドベクター開発の基礎にすることを目的として、*S. suis*血清型2型DAT1株より小型プラスミドpSSU1を分離し、その全塩基配列を決定した。その結果、pSSU1は全長4,975bpで、6つのopen reading frame (ORF) を含んでいた。相同性検索の結果、6つのORFにコードされる蛋白質のうち、ORF1、ORF2、およびORF5は、*Streptococcus agalactiae*由来のプラスミドpMV158上にコードされるCopG、RepB、およびMobにそれぞれ高い相同性があった。pMV158のcopGおよびrepB遺伝子は、このプラスミドがrolling circle (RC) 型の複製をする際に関与する遺伝子であり、さらにpSSU1上には、RC型の複製に重要な2回順向きに繰り返す配列と2箇所の

replication origin (*ori*)、すなわちdouble-strand *ori*およびsingle-strand *ori*も存在したことから、pSSU1は、RC型の複製をするpMV158 familyに属するプラスミドであることが明らかになった。RC型の複製をするプラスミドは、グラム陽性菌内だけでなく陰性菌内でも複製可能であることが多いことから、pSSU1は遺伝子導入用プラスミドベクター開発の基礎として適しているプラスミドであると考えられた。

第2章 *S. suis*-*E. coli*用シャトルベクターの作製とその応用

第1章において明らかになったpSSU1のRC型の複製に必要な遺伝子領域に、抗生物質耐性遺伝子およびマルチクローニングサイトを含む*lacZ'* 遺伝子を付加することにより、3種の遺伝子導入用ベクターpSET1、pSET2、およびpSET3を作製した。作製したベクターの宿主菌への効率の良い導入と安定な維持には、宿主のRecA蛋白質が必要であったが、各ベクターは*S. suis*だけでなく*Escherichia coli*、*Salmonella* Typhimurium、*Streptococcus pneumoniae*、および*Streptococcus equi* subsp. *equi*へも効率よく導入することができ、広宿主域のシャトルベクターとして利用できることが明らかになった。さらに、*E. coli*ではクローニングができなかった*S. suis recA*遺伝子全長をpSET2を用いて*S. suis*でクローニングすることができ、*S. suis recA*遺伝子破壊株の*recA*遺伝子機能の相補試験にも成功した。これらの成績から、これらのベクターは、*E. coli*ではクローニングが困難な*S. suis*の遺伝子を、*S. suis*で直接クローニングして解析するためのベクターとしても有用であることが示され、今後の幅広い応用が期待された。

第3章 *S. suis*用温度感受性ベクターの作製とその応用

これまで*S. suis*での遺伝子破壊株の作製は、pUC19の様なグラム陽性菌内では複製ができないベクターを用いて行われていた。しかし、この方法では、効率のよい形質転換系が必要となるため、限られた株にしか応用できない。そこで著者は、形質転換の効率に拘わらず目的の遺伝子を高率に破壊するためのベクターとして、pG+host3の温度感受性(Ts) *ori*を利用した3種の*S. suis*用Tsベクター-pSET4s, pSET5s, およびpSET6sを作製した。ここで使用したTs *ori*は*S. suis*内だけでなく*S. equi* subsp. *equi*, *S. equi* subsp. *zoepidemicus*, および*Streptococcus dysgalactiae*内においても、28℃では*ori*として機能するが、37℃ではその機能が阻害された。さらに作製したベクターを用いて、*S. suis*のコレステロール結合型細胞傷害毒素suilysinをコードする*sly*遺伝子の破壊株を作ることにも成功した。これらの成績から、今回作製したTsベクターが、*S. suis*の遺伝子を効率よく破壊するための有用な道具となることだけでなく、獣医学領域で重要なその他のレンサ球菌の分子遺伝学的解析にも応用できることが示された。

第4章 *S. suis sly*遺伝子領域の水平伝播

分子遺伝学的解析系を用いて細菌の病原性の解析を行う場合、一般に特定の株を代表として用いることが多い。しかし、*S. suis*という菌種は多様な遺伝子型および表現型を持つ株によって構成されているため、特定の株で得

られた病原性に関する成績を、*S. suis*という種に当てはめて考察する上で、この様な多様性を生み出した分子遺伝学的背景についての知見を得ておくことは重要になる。そこで著者は*S. suis*の病原因子の候補の1つであるsuilysinに着目し、suilysin非産生性である*S. suis* DAT1株の*sly*遺伝子当該領域の塩基配列を決定し、*S. suis* DAT2株の*sly*遺伝子領域の塩基配列と比較することにより、*sly*遺伝子の水平伝播について考察した。その結果、*S. suis*の*sly*遺伝子または*sly*遺伝子非保有株の当該遺伝子領域に存在していた*orf102*遺伝子のどちらかの遺伝子が、可動因子に頼らない何らかの方法で異種菌から獲得された外来遺伝子であり、遺伝子獲得後、この遺伝子領域が*S. suis*株間でも水平伝播により交換されていることが明らかになった。これらの成績から、*S. suis*における異種菌からの遺伝子の獲得および株間での遺伝子の交換は、*S. suis*の病原細菌としての進化と、それに伴う多様性の獲得に貢献しているメカニズムであることが示された。

以上のように、本研究において確立した*S. suis*の遺伝子導入系および遺伝子破壊系は、今後、本菌だけでなく他のグラム陽性菌の病原因子の分子遺伝学的解析を行う際にも大いに貢献するものと期待される。さらに、*sly*遺伝子の水平伝播に関する知見は、*S. suis*の病原細菌としての進化およびその多様性獲得のメカニズムを解き明かす鍵になると思われる。