

氏 名	瀧 雄 介
学 位 の 種 類	博士（医学）
学 位 記 番 号	甲第 634 号
学位授与年月日	令和 3 年 3 月 15 日
学位授与の要件	自治医科大学学位規定第 4 条第 2 項該当
学 位 論 文 名	黄色ブドウ球菌における TSST-1 産生制御機構の解明
論 文 審 査 委 員	(委員長) 早 田 邦 康 教 授 (委 員) 興 水 崇 鏡 教 授 加 藤 大 智 教 授

論文内容の要旨

1 研究目的

毒素性ショック症候群（以下、TSS）は現在でも致死率の高い重篤な疾患である。黄色ブドウ球菌の産生する TSST-1 は、TSS の原因毒素である。TSST-1 は、*tst* 遺伝子によってコードされ、*sarA*、*agr*、*sigB*、*rot* など多くの遺伝子が TSST-1 の産生制御に関連する。黄色ブドウ球菌は約 30-50% のヒトの皮膚や粘膜に常在し、臨床分離される黄色ブドウ球菌の 20% は *tst* 遺伝子を有するが、TSS を発症する症例はまれである。多くの黄色ブドウ球菌が *tst* 遺伝子を持つにも関わらず TSS の発症頻度が非常に低い原因は明らかになっていない。

当部門にて、臨床分離された黄色ブドウ球菌に血清を添加して培養すると菌株によって TSST-1 産生量が大きく変化することが見いだされた。さらに、TSS 発症患者から分離された菌株は、血清添加により TSST-1 産生量が増加する傾向があったため、TSS 発症と血清による誘導能の関連性が疑われた。本研究の目的は、TSS 発症患者から分離された黄色ブドウ球菌株（TSS 株）と TSS 非発症患者由来株の TSST-1 産生制御機構を明らかにすることである。

2 研究方法

本邦で TSS の症例報告している施設より、TSS 株を 7 株分与頂いた。*tst* 遺伝子を有する TSS 非発症患者由来の黄色ブドウ球菌（非 TSS 株）7 株および黄色ブドウ球菌の代表株である N315 を比較対照とした。次世代シーケンサー MiSeq（Illumina）および第三世代シーケンサー MinION（Oxford Nanopore Technologies）を用いて、黄色ブドウ球菌株の全ゲノム解析を行った。また、血清誘導下における TSST-1 産生量を ELISA 法により測定した。さらに、*tst* プロモーター領域に同定された変異によるプロモーター直下の遺伝子転写量の変化をレポーターアッセイにより解析した。さらに、プロモーター変異の組換え株を作成し、血清による TSST-1 産生能誘導能を測定した。

3 研究成果

黄色ブドウ球菌株 14 株の全ゲノム解析より、TSS 株および非 TSS 株はそれぞれ 3 つの遺伝子型（Clonal complex (CC)-5、CC-8、CC-30）に分類された。血清を添加して菌株培養を行い培養上清の TSST-1 産生量を ELISA 法により測定したところ、CC-5 の TSS 株では著明に TSST-1 産生量が

増加したが、CC-5 の非 TSS 株では有意に TSST-1 産生量が低下した。*tst* プロモーター領域を比較すると *tst* 転写開始点の 107-115 塩基上流に存在する連続する T 塩基の数が、菌株により異なっていた。CC-5 の TSS 株の中で、3 株中 2 株では T 塩基が 8 個であったのに対し、残りの 1 株と非 TSS 株では 9 個であった。CC-30 と CC-8 においては TSS 株、非 TSS 株ともそれぞれ 7 個、6 個であった。このことから、TSST-1 産生量と *tst* プロモーター領域の変異との関連性が疑われた。

tst プロモーター内に見出した T 塩基数の多様性が *tst* プロモーター活性に与える影響を解析するために、T 塩基数が異なる *tst* プロモーターを *egfp* 遺伝子の上流に組み込みレポーターアッセイを行った。今回作成したレポーター株は、*tst* プロモーター領域に T 塩基を 6~9 有しており、その全ての株で、血清添加により蛍光強度が増大した。特に T 塩基数が 8 個の株の血清誘導能が一番高かった。さらに、T 塩基が 9 である N315 株と 8 である JMUB3007 株の *tst* プロモーターを組換えた菌株を作成し、血清添加による TSST-1 誘導能を測定したところ、T 塩基数が 8 の時に血清誘導能が高くなり、9 になると減少することを確認した。

4 考察

本研究により、TSS 発症株の中に、血清添加により TSST-1 が高産生する株が存在することが見出した。このことから、ヒト血清による TSST-1 誘導能と TSS の発症との間に関連性があることが推測された。ヒト血清誘導能に関わる *tst* プロモーター領域の変異は *tst* の転写開始点の 107 から 115 塩基上流に位置し、同変異周辺は黄色ブドウ球菌の病原性の転写調節因子 SarA の結合部位との相同性がみられた。T 塩基数が変化することで、SarA との親和性が変化し、*tst* プロモーター活性が変化すると考えられた。

5 結論

黄色ブドウ球菌株の *tst* プロモーター領域に含まれる連続する T 塩基領域の変異は、TSST-1 産生能に影響し、TSS 発症のリスク因子となりうる。

論文審査の結果の要旨

臨床場で経験した黄色ブドウ球菌による毒素性ショック症候群（Toxic shock syndrome：以下、TSS）の発症に関する研究で、ブドウ球菌の TSS 発症機序に関する研究を行い、血清の存在が TSS の発症に係りブドウ球菌が産生する外毒素である TSST-1 の産生能に強い影響を及ぼすことを見出した。さらに、TSST-1 をコードする *tst* 遺伝子のプロモーター領域のチミン塩基の数が産生能に関わっている可能性を示した。

自身の臨床での体験がきっかけとなった研究であり、研究のモチベーションとしても理想的であり、実際に重要な研究成果を得ることができている。研究は、指導教員である崔先生が以前に行った TSST-1 の産生に血清の添加が大きな影響を与えることを基盤にして行われており、この分野の新たな知見を得ており、優秀な研究成果であるといえる。

細菌株による血清添加に対する TSST-1 産生能に差のあることを確認し、その差が *tst* プロモーター領域の *tst* 転写開始点 107-115 塩基上流の連続するチミン塩基の数の違いによる可能性があることを見出した。さらにその点を検証するために、遺伝子操作によりチミン塩基の数を変化

させることによって、TSST-1 産生能が変化することを見出している。

学位論文には細かな修正点は必要であったが、おおむね良好な記述がなされており、委員の修正依頼に対しても迅速かつ適切な対応がなされていた。

最終試験の結果の要旨

全体としてプレゼンテーションはわかりやすく、十分にトレーニングを行ったうえでの発表であると思われる内容であった。研究の背景や目的、実験の方法および結果に関しても簡潔な説明を行うことができおり、考察に関しても良好な内容であった。

得られた結果に関する考察は十分であり、研究成果から得られた疑問点に関する把握もできていた。そのことは、審査委員からの質問に対する適切な返答に表れていた。

本研究に関する臨床的な問題点から実験を遂行するために必要な基礎的な知識は網羅されている印象であった。少なくともこれらの審査委員からの疑問に対しては、十分な回答を行っていた。研究を始めるに至った臨床の場における体験、その体験によって文献検索を行う上で得られた疑問、その疑問を解決するための手法、得られた実験成果によってさらに生じる疑問点などを的確に把握しており、学位に値すると思われる。