

論文内容の要旨及び審査結果の要旨

受付番号 医薬保博甲第707号 氏名 齋藤 和輝
論文審査担当者 主査 安藤 仁
副査 倉知 慎
山本 靖彦

学位請求論文

題 名 ボツリヌス菌における蛍光タンパク質発現系の構築

ボツリヌス症は、ボツリヌス菌が産生するボツリヌス神経毒素が全身の神経麻痺をひき起こし、時に致死的となる疾患である。発症には芽胞が腸内で発芽および増殖することが必要だが、健康な成人では成熟した腸内細菌叢がボツリヌス菌の定着・増殖に対して防御的に働く。一方、腸内細菌叢が未熟な乳児や抗生物質により細菌叢が攪乱した場合には、盲腸や大腸でボツリヌス菌が増殖・定着することが知られている。しかしながら、ボツリヌス症の発症において腸管内におけるボツリヌス菌の動態および発芽・増殖機構は未だ不明である。これらを明らかにするためにはボツリヌス菌感染時から発症までにおける腸管内での局在を明らかにする必要があるが、ボツリヌス菌を観察する技術は未だ確立されていない。そこで本研究では、蛍光タンパク質発現系を用いたボツリヌス菌の可視化法の開発を試みた。

まず、ボツリヌス菌 62A 株に mCherry 発現プラスミドを遺伝子導入し、蛍光タンパク質発現株を作製した。Fluorescence in situ hybridization (FISH) 法では芽胞が可視化し難い一方、mCherry タンパク質発現株は、芽胞および栄養菌体どちらの状態においても赤色蛍光を呈した。また、発芽途中の状態にある芽胞と栄養菌体の中間体も同様に赤色蛍光を呈した。したがって、mCherry タンパク質発現株はボツリヌス菌の生活環における様々な状態を可視化できることが示唆された。さらに、mCherry タンパク質発現株は、FISH 法を組み合わせることにより芽胞および発芽した栄養菌体を判別できることが示された。また、少なくとも *in vitro* では、mCherry タンパク質発現はボツリヌス菌の増殖および毒素産生に影響を与えないこと、ボツリヌス菌に適したレプリコンを有する発現ベクターを利用することにより、抗生物質による選択圧がない条件下でもプラスミドが安定的に保持されることを確認した。以上より、本法はボツリヌス菌を効果的に可視化できることが明らかになった。

本研究の成果は、ボツリヌス菌の腸管内での局在を明らかにし、ボツリヌス症の感染動態の解明や予防・治療法の向上につながるものと期待できることから、学位授与に値すると評された。