

氏名	阿 藤 寛 明
授与した学位	博 士
専攻分野の名称	薬 学
学位授与番号	博甲第2523号
学位授与の日付	平成15年 3月25日
学位授与の要件	自然科学研究科生体調節科学専攻 (学位規則第4条第1項該当)
学位論文の題目	<i>Vibrio vulnificus</i> における外因性シデロフォアの利用とFe ³⁺ - エロバクチンの取込みに関与する遺伝子の解析
論文審査委員	教授 山本 重雄 教授 篠田 純男 教授 成松 鎮雄

学 位 論 文 内 容 の 要 旨

*Vibrio vulnificus*は海水域から汽水域に棲息する通性嫌気性、グラム陰性桿菌であり、創傷感染症と経口感染症を惹起する病原菌である。本菌に汚染された海産物の摂取に起因する経口感染は、菌体が消化管からリンパ管へ侵入し、さらに全身へ分布するため、重篤で死亡率の高い敗血症を引き起こす。

本菌における必須元素鉄（イオン）の獲得様式については：1）ヘム鉄を利用する；2）鉄輸送キレート剤（シデロフォアと呼ばれる）であるvulnibactinを産生し、それを介して鉄を取り込む；3）他の微生物の産生する（外因性）シデロフォアであるdesferrioxamine Bを利用して、鉄を取り込む、などの報告があった。しかし、鉄獲得系の遺伝子レベルでの研究は端緒に着いたばかりであった。

申請者は本菌が鉄欠乏に応答して産生する（鉄制御）外膜蛋白質について検討を加え、上記の鉄源であるヘムやferric vulnibactinに対する受容体蛋白質の外に、新たに2種の鉄制御外膜蛋白質（76kDa および78 kDa）の産生を見出した。それぞれの蛋白質は鉄制限条件下、外因性シデロフォアであるaerobactin、あるいはdesferrioxamine Bを培地に添加した時に産生が顕著に誘導された。一方、FURTA法 (Stojiljkovic *et al.*, J. Mol. Biol., 236, 531-545 (1996) ;原理は鉄制御遺伝子がプロモーター領域にFur boxを特異的に持っていることに基づいている) を用いて、多数の鉄制御遺伝子断片を単離した。それらの中に、76 kDa外膜蛋白質のN-末端アミノ酸配列と一致するアミノ酸配列を有する遺伝子断片を見出した。この遺伝子の塩基配列を基に周辺領域をクローニングし、解析した。その結果、ferric aerobactinをコードする*iutA*、*iutA*の発現を調節していると推定される転写因子をコードする*iutR*、さらにその上流に、ferric aerobactinの細胞内取込みに関与するABC transporterをコードする*fhuCDB*を同定した。*iutA*については破壊株作成と性状解析により、その機能がferric aerobactinの受容体であることを確認した。IutRはGntR群転写因子に相同であり、*iutA*遺伝子のプロモーター領域にはIutRとの相互作用に関わると推定されるinverted repeat 配列が存在していた。鉄獲得関連遺伝子ではこの群に属する転写因子の関与は初めての例であり、その調節機構の解明は興味深い。

論文審査結果の要旨

*Vibrio vulnificus*は海水域から汽水域に棲息する通性、嫌気性、グラム陰性桿菌であり、創傷感染と経口感染を惹起する食中毒菌である。本菌は重篤で死亡率の高い敗血症を引き起こすことから、近年特に注目されている。一方、本菌では鉄獲得能と病原性発現の関連を示唆する多数の報告があり、ヘム鉄利用系や鉄輸送キレート剤（シデロフォアと呼ばれる）である vulnibactin の産生・分泌とこれを介する外界鉄取込み系が既に明らかにされている。さらに、他の微生物の産生する（外因性）シデロフォアの利用系の報告もあるが、詳細な解析はなされていなかった。

申請者は、まず、本菌が鉄欠乏に応答して発現する外膜蛋白質について詳細に検討し、上記のヘム鉄や ferric vulnibactin に対する受容体蛋白質の外に、新たに2種の誘導性鉄制御外膜蛋白質 (76 kDa 及び 78 kDa) を見出した。これら蛋白質の産生は鉄制限条件に加えて培地に外因性シデロフォアである aerobactin、または desferrioxamine B を添加すると顕著に増加した。さらに、鉄制御される遺伝子断片を網羅的に単離する方法を利用して、76 kDa 外膜蛋白質の N-末端アミノ酸配列と一致するアミノ酸配列を有する遺伝子断片を得た。次いで、その塩基配列情報を基に周辺領域をクローニングし、5種の鉄獲得系遺伝子 (*iutA*, *iutR*, *fhuCDB*) を見出した。*iutA*は、その破壊株の作成と性状解析によって ferric aerobactin に対する外膜受容体をコードする遺伝子であることを証明した。また、アミノ酸配列の相同性検索結果から、*fhuCDB*は ferric aerobactin 内膜輸送のための ABC transporter をコードすることを示した。*iutR*は転写因子 GntR との相同性や調節領域の塩基配列解析によって *iutA* の転写調節に関与することを示した。

以上のように、本研究は *V. vulnificus*における新規の鉄獲得系や関与する遺伝子群についての学術的に重要な知見を含んでおり、博士（薬学）の学位論文に値するものと認める。