

05007
(別紙様式第3号)

論 文 要 旨

論 文 題 目

Molecular analysis of VcfQ protein involved in *Vibrio cholerae* type IV pilus biogenesis
(*Vibrio cholerae* type IV 線毛の形成に関するVcfQ蛋白の解析)

氏 名 宮 里 智 子 

論文要旨

< 目的 > : 病原細菌が粘膜表層へ定着することは感染症経過の第一段階である。従って、定着因子を明らかにする事は病原メカニズムを解明する上で重要であり、ワクチンの開発にもつながる。我々は腸上皮接着性を有する *Vibrio cholerae* 034、NAGV14 株線毛の機能を明らかにするために、NAGV14 線毛の gene cluster の解析を行ってきた。その結果 NAGV14 線毛の gene cluster にはコレラ菌 (*V. cholerae* 01) MSHA 線毛の構造 operon に含まれる 6 個の ORFs (*mshB*, *A*, *C*, *D*, *O*, *P*) に高い相同性を示す ORFs が存在することが分った。本研究ではその operon の最下流に位置する遺伝子 (*vcfQ*) を解析し、その機能について検討した。

< 方法 > : 塩基配列は、*V. cholerae* 01 の *mshQ* 遺伝子塩基配列から設計した primer を用いた primer walking で決定し、遺伝子構造を解析した。遺伝子産物 *VcfQ*

論文要旨

は、その C 末側を His-tagged 組換蛋白として大腸菌で発現したものを精製した。VcfQ の発現や局在の確認は抗 VcfQ 抗体を用いた Western blotting で調べた。VcfQ の機能は、vcfQ 遺伝子欠損株を作製して検討した。菌株間における vcfQ の分布は vcfQ の N 末側と C 末側の断片をプローブとした colony blotting で調べた。

< 結果 > : vcfQ は 1470 個のアミノ酸をコードし、コレラ菌の MshQ N-末上流に 651 bp の DNA 断片を付加した形であった。その DNA 断片の GC 含有量 (35.6 mol%) は、vcfQ の GC 含有量 (42.5 mol%) よりも低い値を示した。VcfQ は MshQ と抗原的に交差反応を示し、*V. cholerae* の外膜分画に存在する事が確認された。しかし、内膜分画における VcfQ の存在も同時に確認された。vcfQ 遺伝子欠損株では major pilin (VcfA) の産生はみられたが、線毛の形成は認められなかった。NAGV14 線毛に特異的な vcfQ

論文要旨

の N 末側をプローブとした colony blotting では *V. cholerae* 01 の 25 株中 1 株のみ陽性、0139 の 18 株は全て陰性であった。また、01 と 0139 以外の血清型では 50 株中 10 株 (20%) が陽性を示した。これに対し、コレラ菌と NAGV14 株で相同性が高い C 末側のプローブでは 01 株では 92%、0139 株では 100%、他の血清型株では 98% が陽性を示した。

< 考察 > : *VcfQ* が *V. cholerae* の外膜分画だけでなく内膜分画からも検出されたのは、外膜蛋白である *VcfQ* と内膜蛋白が複合体を形成していることが考えられる。*vcfQ* 遺伝子欠損株で *VcfA* の産生が認められることから、*VcfQ* は外膜に存在し NAGV14 線毛の形成に関与する蛋白であると言う事ができるだろう。*vcfQ* の N 末側の多様性は水平伝播に関係している事が考えられ、線毛構造と接着性の関連性を解く鍵になると思われる。

論文審査結果の要旨

報告番号	* 課程博 論文博	第 号	氏名	宮里 智子
論文審査委員		平成15年 7月 9日		
		主査教授	荻谷 研一	印
		副査教授	山根 誠久	印
		副査教授	斎藤 厚	印
(論文題目)				
Molecular analysis of VcfQ protein involved in <i>Vibrio cholerae</i> type IV pilus biogenesis.				
(論文審査結果の要旨)				
上記の論文について慎重に審査を行い、次のような結果を得た。				
1. 研究の背景と目的				
病原菌の宿主細胞に対する接着は感染の第一段階として極めて重要な現象である。接着因子は線毛であることが多いため、申請者らは <i>Vibrio cholerae</i> の線毛について検討し、 <i>V. cholerae</i> NAGV14 株から接着性の線毛を見出した。しかし同種の菌であるコレラ菌の線毛 (MSHA) が接着性を示さないことから、NAGV14 線毛との違いを明らかにする目的で線毛蛋白の構造オペロンを解析した。本研究はNAGV14 線毛のオペロンの中で最下流に位置する <i>vcfQ</i> 遺伝子の構造と機能を解析し、NAGV14 線毛のオペロンに関する一連の研究に終止符を打たせたものである。				
2. 研究内容				
遺伝子の塩基配列から <i>vcfQ</i> はそのN-末側に、 <i>mshQ</i> に見られないG+C含量の低い651 bpの配列を持つことが分った。その領域より下流のC-末側は <i>mshQ</i> とほぼ同一の配列であったため同領域の中で730bp に対応する組換え蛋白とその抗体を作成した。 <i>VcfQ</i> の所在を確認するため菌体を細胞質液、ペリプラスマ液、内膜、および外膜に分画し、Western blotting で反応させたところ <i>VcfQ</i> は膜分画に存在することが証明された。さらに <i>VcfQ</i> の機能を解明するため、suicide plasmid を用いて <i>vcfQ</i> 遺伝子欠損株 (isogenic mutant) および <i>vcfQ</i> 復元株を作成して野生株との対比を行ったところ、 <i>VcfQ</i> は発現した線毛蛋白から線毛形態を構築する過程で必須の役割を有することが判明した。				
3. 研究成果の意義と学術的水準				
この研究は <i>vcfQ</i> 遺伝子の構造を決定するとともに、その産物が外膜蛋白を構成していること、およびその外膜蛋白が線毛蛋白分子から線毛の形態を構築するために必須の役割を示すということを明らかにした。ここに高いオリジナリティーを認め、論文内容が国際的水準にあると考える。この成果はコレラ菌線毛の遺伝子機能解析にも重要な参考となり、 <i>V. cholerae</i> の線毛形成に関与する新たな因子を同定したことから病態のメカニズムを理解しワクチン抗原の開発へと繋がる大きな意義を有している。				
以上の結果から本論文は学位授与に十分値するものと判断した。				

- 備考
- 1 用紙の規格はA4とし縦にして左横書とすること。
 - 2 要旨は800字～1200字以内にまとめること。
 - 3 *印は記入しないこと。