

論 文 要 旨

論 文 題 目

Gene Analysis of *Vibrio cholerae* NAGV14 Pilus and Its Distribution

(*Vibrio cholerae* のNAGV14線毛蛋白の遺伝子解析とその分布について)

氏 名 黒 不 洋 美



<目的> 病原菌が宿主細胞に定着することは感染の第一段階であり、定着因子の解明は発病機序の理解のみならずワクチン開発の糸口となる。本研究の目的は *Vibrio cholerae* 034 株から見出した腸上皮接着性を有する NAGV14 株の線毛について、線毛主要蛋白 (VcfA) の構造遺伝子 *vcfA* を解析し、同種株における *vcfA* の分布を明らかにすることである。

<方法> 遺伝子解析には接着性線毛を有する NAGV14 株を使用した。精製した chromosomal DNA を template とし、N-末アミノ酸配列 48 残基を基に degenerate PCR で 132bp の断片を増幅した。それを基に inverse PCR、PCR walking、続いて PCR in vitro Cloning Kit を用いて NAGV14 株の VcfA をコードする ORF を決定した。分布は *V. cholerae* 177 株 (01, 0139 株は計 84 株) に対し、type 4 pilus gene locus, *mshA*、及び NAGV14 株の *vcfA* の保有率を PCR 法にて検討した。

< 結果 > *VcfA* をコードする構造遺伝子 (*vcfA*) の ORF は短い signal sequence で始まる 162 個のアミノ酸 (推定 MW=16535Da) で構成され、N-末はフェニルアラニン、C-末側に 2 個のシステインを有した。大腸菌で発現させた *VcfA* 蛋白は SDS-PAGE で分子量約 16kDa であり推定分子量と一致したが、精製 NAGV14 線毛蛋白 (20kDa) より小さかった。推定アミノ酸配列の *MshA* に対する相同性は N-末側が高く、C-末側は低く全体で 67% であった。*vcfA* の上流・下流側の flanking regions はそれぞれ、MSHA gene locus 内にある *mshB*, *mshC* と高い相同性を認めた。分布は、① MSHA gene locus との共通領域 (*mshB*, *C* に相当) の primer set では 177 株中 169 株 (95%) が陽性。② *mshA* 特異的 primer set には全 01,0139 株と 4 株の non-01 株が陽性、③ *vcfA* (NAGV14 株) 特異的 primer set には non-01 株の 4 株のみが陽性であった。

< 考察 > NAGV14 の主要線毛構造遺伝子の

(*vcfA*) アミノ酸配列の特徴から type 4a pili と考えられ、MSHA 類似の type 4a pilus gene locus は *V. cholerae* に広く分布していることを初めて明らかにした。精製線毛蛋白の分子量 (20kDa) が、推定アミノ酸及びリコンビナント pilin 蛋白の分子量 (16kDa) より大であったことから、何らかの post-translational modification が考えられた。

論文審査結果の要旨

報告番号	* 課程博 論文博	第 号	氏名	黒木洋美
論文審査委員		平成14年 6月4日		
		主査教授	斎藤 厚	
		副査教授	山根 誠久	
		副査教授	渡部 久実	
(論文題目)				
Gene Analysis of <i>Vibrio cholerae</i> NAGV14 Pilus and Its Distribution				
(論文審査結果の要旨)				
1. 研究の背景と目的				
細菌の病原性において、宿主細胞への接着は極めて重要な要素であるが、コレラ菌をはじめとする <i>Vibrio cholerae</i> においてはその接着因子が不明のままである。細菌線毛は接着因子としての第一候補であるが、コレラ菌線毛はその機能を持たない。この研究ではコレラ菌と同種である NAG ビブリオから見出された接着因子線毛 (NAGV14) について線毛の主要蛋白をコードする遺伝子の解析を行い、コレラ菌との関係を検討したものである。				
2. 研究内容				
精製した線毛蛋白の N-末アミノ酸配列から、degenerate primer を作成し、その PCR product を probe として当該遺伝子を含む染色体断片を得た。その断片を self ligation し inverse PCR を行い、次に PCR walking 法などの手法を用いて目的とする遺伝子の全塩基配列を決定した。線毛蛋白の発現はこの遺伝子をプラスミドに組み込み、そのプラスミドを大腸菌および <i>V. cholerae</i> 株に形質転換して行った。この線毛遺伝子の同種株間における分布は3種類のプライマーセットを用いた PCR 法により検討した。結果として NAGV14 線毛はコレラ菌線毛と同類の Type 4 線毛であるが、C-末側のアミノ酸配列は特異的であった。この線毛はコレラ菌には存在せず、またコレラ菌線毛 MSHA は他の <i>V. cholerae</i> には殆ど存在しなかったことから、MSHA 線毛にコレラ菌の特質 (流行能など) が隠されていると推定した。				
3. 研究成果の意義と学術的水準				
これまで知られていなかった <i>V. cholerae</i> の接着性線毛遺伝子の解析によって、腸上皮接着能は主要線毛蛋白の C-末側に依存していること、類似線毛が同種株間で広く分布しているが、コレラ菌についてはその線毛が独特のものであることを示した。この結果はコレラ菌伝染力の要因が線毛に存在することを示唆したことから今後の研究に大きな刺激を与えたと言える。				
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。