

(別紙様式第3号)

12/28/16

論 文 要 旨

論 文 題 目

Cloning, Sequencing and Expression of the Gene Encoding the Extracellular Metalloprotease of *Aeromonas caviae*

(*Aeromonas caviae*の菌体外金属プロテアーゼ遺伝子のクローニングと塩基配列の解析)

氏 名 川上浩司



＜目的＞アエロモナス属はグラム陰性通性嫌気性菌で水と食物を介して胃腸炎の原因となる。*Aeromonas caviae*にはhemolysin, cytotoxin, enterotoxin, hemmagglutininなど病原因子と推定される物質を産生することが報告されている。しかしこれらの物質の病原性にたいする役割は未だ明らかではない。*A. caviae*はproteaseを産生するが、1999年Tomaらは亜鉛依存性の金属proteaseを報告し、このN末アミノ酸配列は、病原性と関連を有する*Pseudomonas aeruginosa*のelastaseと高い相同性を示していると報告した。これに基づいて、今回筆者らは*Aeromonas*の産生するprotease(APK)の遺伝子(*apk*)を解析するとともに大腸菌に発現させたAPKの性状を明らかにした。＜方法＞遺伝子解析は次の順序で行った。1) *A. caviae* Ae6株の染色体DNAライブラリーをスキムミルク寒天培地上に開きコロニーの周囲に透明帯を形成したクローンを選択し、2) 選択したクローンのプラスミド




(2)

pA14からサブクローニングを行い、最終的にはprotease遺伝子を含む3.5kbの（制限酵素部位 *Bst*XI/*Sph*I junction - *Apa*I)フラグメントを含むプラスミドpKK3を作成した。3) pKK3で形質転換した大腸菌はコロニー周囲に透明帯を示したため protease遺伝子を含んでいると判断した。4) Protease遺伝子を含むDNAフラグメントの塩基配列はジデオキシ法を用いて決定した。発現した組み換え蛋白の精製は次の順序で行った。1) *apk*を含むプラスミドpKK3を持った *E. coli* JM109をアンピシリン加LB brothで培養、2) 培養上清を30~60%飽和硫酸で塩析、3) 透析後各種ゲル濾過カラムクロマトグラフィーで精製した。〈結果〉塩基配列解析の結果proteaseを産生するDNAフラグメントには1785bpのORFが存在し Zinc 依存性proteaseの motif(HEXXH)が存在し thermolysin family のzinc-dependent metalloproteaseであることが判明した。推定アミノ酸 595残基をコードし、

(3)

蛋白の推定分子量は63,253であった。推定アミノ酸配は *V.cholerae* のHA/P, *V.proteolyticus* のneutral protease, *P.aeruginosa* のelastase に50-60%の相同性を有していた。APKの精製結果、APKはSDS-PAGEで分子量約34kDaの位置に泳動され、塩基配列からの推定分子量と異なることは自己processingを行っていることが示唆された。Azocaseinを基質とした活性の至適pHは8.0でEDTA, Zincov, OPA, TEP添加にて阻害された。〈考察〉本研究の成果としては、1) *A.caviae*の産生するproteaseの遺伝子解析によってこのproteaseの属するfamilyを決定したこと、2) 推定アミノ酸の相同性検索により病原因子と関わりのある各菌のproteaseと相同性が存在することが判明したこと、3) Proteaseを大腸菌で発現させこの蛋白の性状を明らかにしたこと、などがあげられる。今後はこのproteaseが病原性とどのように関連しているかを明らかにしなければならない。

論文審査結果の要旨

報告番号	課程博 * 論文博	第 号	氏名	川上浩司
		平成 12年 7月 13日		
論文審査委員		主査教授	荻谷 研一	
		副査教授	斎藤 厚	
		副査教授	小杉 忠誠	
(論文題目)				
Cloning, sequencing and expression of the gene encoding the extracellular metalloprotease of <i>Aeromonas caviae</i>				
(論文審査結果の要旨)				
上記の論文に関して研究の背景と目的・研究内容・研究成果の意義と学術的水準について慎重に審査を行い、次のような審査結果を得た。				
1. 研究の背景と目的				
腸管病原菌である <i>Aeromonas</i> の病原因子は未だに不明な点が多い。プロテアーゼは補助的病原因子として注目されており、1999年に <i>Aeromonas</i> から精製された 34 kDa の metalloprotease AP34 は、その N 末端アミノ酸配列が既に病原因子として知られている <i>P. aeruginosa</i> のエラスターゼに高い相同性を示すことが判明している。本研究では、沖縄の下痢患者から分離した <i>Aeromonas caviae</i> Ae6 株の遺伝子ライブラリーから AP34 をコードする遺伝子をクローニングし、その性状解析を行った。				
2. 研究内容				
スキムミルク寒天培地を用いたスクリーニングとサブクローニングにより、プロテアーゼ産生能を有する 3.5 kb の Ae6 genome DNA 断片を得た。プロテアーゼ構造遺伝子は 1,785 bp から成り、アミノ酸 595 残基をコードしており、推定分子量は 63,253 であった。この全長アミノ酸配列 (APK) は <i>V. cholerae</i> の HAP、 <i>P. aeruginosa</i> のエラスターゼに 50-60% の相同性を有していた。また、大腸菌で発現させ periplasm から精製したプロテアーゼの分子量は AP34 と同様 34 kDa であったことから、分泌後に processing を受けていると考えられた。				
3. 研究成果の意義と学術的水準				
<i>Aeromonas</i> の病原因子は未だ解明されておらず、最近では外分泌蛋白質を中心に解析が行われている。本研究では、その一つである AP34 の遺伝子をクローニングして解析し、この酵素が zinc-dependent metalloprotease の thermolysin family に属することを明らかにした。 <i>Aeromonas</i> の分泌蛋白研究の一端を担い、病原因子解明への手がかりとなる知見を得たものであり、本研究は国際的に認められる高水準にあるものと判断した。				
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。