The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	ヒト由来毒素原性大腸菌の定着因子CFA／IIIの構築に関与する遺伝子群のクローニングと解析
Author(s)	谷口, 暢
Citation	大阪大学, 1993, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/38167
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

The University of Osaka

【29】

氏　　名	谷口　暢（たにぐち　とおる）
博士の専攻分野の名称	博　士（医　学）
学位記番号	第　10637　号
学位授与年月日	平成5年3月25日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 医学研究科病理系専攻
学位論文名	**ヒト由来毒素原性大腸菌の定着因子CFA／Ⅲの構築に関与する遺伝子群のクローニングと解析**
論文審査委員	（主査） 教　授　本田　武司 （副査） 教　授　松田　守弘　　教　授　中田　篤男

論文内容の要旨

（目　的）

大腸菌（*Escherichia coli*）は，腸管内正常細菌叢を構成する重要な菌種である。しかし，何らかの病原因子（毒力）を獲得した一群の大腸菌は，ヒトに下痢を引き起こす。毒素原性大腸菌（enterotoxigenic *E. coli*:ETEC）の病原因子に関する研究は，本菌が産生するエンテロトキシン（LT，ST）の解析に始まったが，ETECによる下痢発症機構の説明には，エンテロトキシンの産生能だけでは不十分で，他の病原因子すなわち定着因子（colonization factor antigen:CFA）の重要性に注目されだした。しかし，これまでのヒト由来ETECが産生する定着因子の分子遺伝学的研究は，定着因子CFA／IとCFA／IIのmajor subunitであるpilinの構造遺伝子の解析のみで，線毛構築に必要な遺伝子群のクローニングおよび解析は，全くなされていない。

本研究では，ヒト由来ETECの定着因子とその病原性への関与の解明，さらには定着因子を利用したワクチン開発への基礎的な情報を得るため，当研究室で発見された定着因子CFA／III の構築遺伝子群のクローン化とそのpilin遺伝子の解析を試みた。

（方法ならびに成績）

1）CFA／III$^+$ プラスミドの単離

CFA／III，LT産生株ETEC260－1と31－10は，約95kb，約55kbおよび約4.4kb の3種類のプラスミドを保持している。CFA／III$^-$ 変異株は，そのうち約55kbプラスミドを欠失していることから，このプラスミドがCFA／III産生を支配していると考え，トランスポゾンTn *3*を挿入後，抗CFA／III血清による菌体凝集反応をスクリーニング法として大腸菌実験室株に形質転換した。その結果，約60kbのCFA／III$^+$ プラスミド（pSH1001）を単離することができた。

2）CFA／III 遺伝子群のクローン化

制限酵素*Cla*Iを用いて種々のpSH1001の欠失変異体を作製したところ，pSH1134（約32.5kb）のみがCFA／IIIを産生した。次に、pSH1134の*Cla*I断片（約11.5kb）をクローニングベクターpMW119へ，また，その断片と約2.9kb重なり合う*Bam*HI断片(約12.4kb）をpACYC184へそれぞれクローニングしpTT202およびpTT206を得，これら2種類のプラスミドを大腸菌HB101に共存させたところCFA／IIIの産生が認められ，且つ，抗CFA／III血清を用いたウエスタンブロッティング法によって精製CFA／IIIと同じ分子量約20.5kDaのバンドを検出した。一方，

pTT202のみでは線毛形成が認められないが，分子量約26.5kDaのバンドが検出できた。

3）CFA／III pilin遺伝子の解析

pTT202上のCFA／III pilin遺伝子領域を限定するため，種々のDNA断片をpMW119へサブクローニングしたところ，pTT201，pTT213およびpTT217にpTT202と同様の分子量約26.5kDaのバンドを検出した。この3種類のプラスミドが含むDNA断片の共通領域は，*Eco*RI-*Sal*I（約1.1kb）で，この領域をジデオキシ法でシークエンスした。その結果，714bpからなるオープンリーディングフレーム（ORF）が認められた。このORFは，238個のアミノ酸残基のポリペプチド（CFA／III pilin前駆体タンパク）をコードしており，この推定アミノ酸配列から計算した分子量は，25,309で，ウエスタンブロッティング法で求められた値（約26.5kDa）とほぼ一致した。精製CFA／IIIから決定されたN末側のアミノ酸配列とは，翻訳開始Metから数えて31番目のメチオニン残基から一致したことから，CFA／III pilin前駆体タンパクは，そのGly^{30}－Met^{31}間でpTT206の*Bam*HI断片上に存在する別の遺伝子産物（プロテアーゼ）によって切断（プロセッシング）を受けてCFA／III pilinタンパク（成熟タンパク，推定分子量21,605）になることが考えられた。また，このCFA／III pilinタンパクのN末から25個のアミノ酸残基までの領域は，疎水性アミノ酸で構成されており，この領域がpilin分子間の結合を担っていると考えられた。

（総　　括）

1）CFA／III構築に関与する遺伝子群が約55kbのプラスミド上に存在することが明らかになり，その領域を約17kbまでに限定した。

2）CFA／III pilin遺伝子は，714個の塩基で構成され，238個のアミノ酸残基からなるポリペプチド（推定分子量25,309）をコードしている。

3）CFA／III pilinは，分子量約25.3kDaの前駆体タンパクとして産生され，別の遺伝子産物（プロテアーゼ）によってGly^{30}－Met^{31}間で切断（プロセッシング）を受けて，分子量約21.6kDaの成熟pilinタンパクとなり，CFA／IIIが構築されることが分かった。

論文審査の結果の要旨

毒素原性大腸菌の下痢発症上エッセンシャルな第1ステップである腸管内定着現象には，本菌が産生する線毛状の定着因子が関与していることが最近明らかになってきている。本研究では，ヒト由来毒素原性大腸菌が産生する線毛状形態を有する定着因子（CFA／III）の構築に関与する遺伝子群のクローン化とそのmajor subunitであるpilinの構造遺伝子の解析を行った。その結果，CFA／III遺伝子群が約55kbプラスミド上に存在することを明らかにし，これをクローン化し，その遺伝子群領域を約17kbまでに限定した。さらに，CFA／III pilinの構造遺伝子を特定し，714bpからなる全ヌクレオチド配列を明らかにした。この結果から推定されるアミノ酸配列は，コレラ菌の定着因子と考えられているTcp線毛のアミノ酸配列とホモロジーの高い部分（N末端側）があるものの，これまで報告されていない構造を有することが明らかにできた。さらに，CFA／III pilinが前駆体タンパク（約25.3kDa）として産生され，同じプラスミド上に存在する別の遺伝子産物（プロテアーゼ）によってそのGly^{30}－Met^{31}間で切断を受け，成熟pilinタンパク（約21.6kDa）となってCFA／III が構築されることなども明らかにした。以上の知見は，ヒト由来毒素原性大腸菌の線毛構築のメカニズムの解明にとって先駆的な成績であり，また，線毛を利用した生ワクチン開発へも有力な手掛かりを与える成績でもあり，学位論文に値するものである。