

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、 〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉 大阪大学の博士論文につい て 〈/a〉 をご参照ください。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

Osaka University

氏名	たにぐちとおる 谷口 暢
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 Tn3 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 *Clal* 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 *Clal* 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 血清を用いたウェ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種類のプラスミドを含むDNA断片の共通領域は、*EcoRI-SaII* (約1.1kb)で、この領域をジデオキシ法でシーケンスした。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Gly³⁰-Met³¹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Gly³⁰-Met³¹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Gly³⁰-Met³¹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。