



Title	Genetic analysis of chromosomal region encoding lysophospholipase L2 of Vibrio Cholerae 01
Author(s)	Whayeb, Shatha Adnan
Citation	大阪大学, 1996, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/39892
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

氏 名	ウエイブ シャダ アドナン Whayeb Shatha Adnan
博士の専攻分野の名称	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	第 1 2 3 7 8 号
学 位 授 与 年 月 日	平成 8 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	Genetic analysis of chromosomal region encoding lysophospholipase L 2 of <i>Vibrio cholerae</i> O 1 (コレラ菌の lysophospholipase L 2 をコードする染色体領域の遺伝 学的解析)
論 文 審 査 委 員	(主査) 教 授 本 田 武 司 (副査) 教 授 松 田 守 弘 教 授 品 川 日 出 夫

論 文 内 容 の 要 旨

{目的}

コレラは現在でも世界的に公衆衛生上重要な疾病の一つである。コレラ菌に対する組換ワクチンはコレラ毒素のような主要病原因子を不活化することなどで既に数種類開発されているが、副作用的に起こる下痢はまだ完全には抑えられていないところから未知の下痢因子の存在が考えられている。コレラ菌のいくつかの病原因子（コレラ毒素等）の産生は ToxR/S/T 系によって制御されている事が知られているが、他の制御機構に関しては殆ど知られていない。

この研究の目的は、コレラ毒素 (CT) およびエルトル溶血毒 (HlyA) の産生を制御する未知の遺伝子を探索することで、今回、Lysophospholipase L 2 をコードする新しい遺伝子 (*lypA*) がコレラ毒素の産生を制御している事を見い出したので発表する。

{方法, 結果}

カナマイシン耐性トランスポゾン Tn 5 を持つ温度感受性プラスミドをエルトル型コレラ菌 N86 株に導入し、42℃の高温で Tn 5 を染色体 DNA に導入し、染色体遺伝子をランダムな位置で破壊した変異株ライブラリーを作製した。このライブラリーをコレラ毒素産生性、溶血性を指標にスクリーニングを行なったところ、両方の産生性を失った変異株が一株 (NF 404) 見い出されたので、この変異株について以下の解析を行なった。

NF 404 の Tn 5 挿入部位をカナマイシン耐性を利用してクローン化した後、Tn 5 に隣接する部位をプローブとして元株 N86 の遺伝子ライブラリーから相同する部位をクローン化した。この領域について制限酵素地図の作製、およびコレラ毒素遺伝子 (*ctxAB*) およびエルトル溶血毒遺伝子 (*hlyA*) をプローブとするサザンハイブリダイゼーションによって、この領域 12kb 内には *ctxAB*, *hlyA* が含まれていないことを確認した。

NF 404 の Tn 5 挿入部位周辺 2.6kb を pUC19 にクローン化し、全塩基配列を決定したところ、39.5kDa のタンパクをコードする open reading frame (*lypA*) を見い出した。LypA タンパクを遺伝子データベースを用いて検索したところ、LypA に大腸菌 lysophospholipase L 2 と約 50% の相同性が見い出された。また、*lypA* の下流には 19.9kDa のタンパクがコードされる未知の遺伝子が存在した。

lypA を含む 1.3-kb 断片を発現ベクター pT7-7 にサブクローン化し、この組換プラスミドで大腸菌を形質転換した。この大腸菌を遺伝子を誘導しながら菌を培養後、菌体抽出液の lysophospholipase 活性をリゾレシチン基質か

ら遊離する脂肪酸を指標にHPLCで測定したところ、対照に比較し著しく上昇していた。

lypA 遺伝子内の内部断片をスーサイドベクターにクローン化し、エルトール型コレラ菌N86株およびアジア（古典）型コレラ菌569B株に導入しそれぞれの株（N86-129株、569B-129株）の *lypA* を破壊したところ、どちらの場合も lysophospholipase 活性およびコレラ毒素産生性が著しく低下した。一方、NF404株に *lypA* を in trans で導入したところ、lysophospholipase 活性、コレラ毒素産生性は回復したが、溶血性は回復しなかった。また、*lypA* が破壊されたNF404株、N86-129株、569B-129株を用いてウサギ小腸結紮ループ試験において下痢原性を調べたところ、いずれの株も腸管内液体貯留活性（下痢原活性）は失っていた。

{考察}

今回見い出された *lypA* 遺伝子は大腸菌の lysophospholipase 遺伝子 *pldB* と相同性をもち、また、lysophospholipase L 2 活性を持つところから、コレラ菌の lysophospholipase 遺伝子であると考えられる。この遺伝子を欠失させると菌は病原性を失い、また、コレラ毒素の産生が著しく低下することから、lysophospholipase L 2 活性を持つ *lypA* 産生がコレラ毒素の産生を調節していることも示唆している。Lysophospholipase は生物界に広く観察され、細胞毒性をもつ lysophospholipids を制御していると考えられる酵素である。*LypA* はコレラ毒素発現を制御している *ToxR*、*ToxS*、*ToxT* とは相同性を持たず、この制御系との接点はみだされていない。したがって、今までに発見されていない新しいコレラ毒素産生の制御系であると考えられる。一方、*lypA* はNF404株を in trans で相補しなかったため、直接溶血毒産生を制御しているとは考えにくく、Tn5による polar effect によって他の未知の遺伝子に影響をあたえた可能性がある。

コレラ菌は非常に高い lysophospholipase 活性をもっていることから、この酵素が菌の生存に関係し、また、コレラの成立に寄与している可能性が示唆される。

論文審査の結果の要旨

コレラ毒素は、コレラ菌の下痢原性を説明する主要な病原因子である。本研究では、コレラ毒素の産生制御機構を明らかにする事を目的とし、まず、トランスポゾン Tn5 をコレラ菌に導入することによりコレラ毒素と溶血毒素の産生が著明に低下する変異株を分離した。この Tn5 挿入部位周辺をクローン化し、全塩基配列を決定したところ、*lypA* と名付けた新しい遺伝子を見い出した。この遺伝子産物は、リゾホスホリパーゼ活性を有していること、大腸菌のリゾホスホリパーゼ遺伝子 *pldB* と約50%の相同性を有していること、等も明らかにした。さらに、*lypA* 欠失コレラ菌を作成し、動物実験系でこの変異コレラ菌の病原性を調べたところ、下痢原性を失い、コレラ毒素産生性も失っていた。これらのことから、これまでいわれていたコレラ毒素の調節遺伝子である *ToxR*、*ToxS* とは異なる、新奇的な *lypA* 遺伝子がコレラ毒素の産生を制御していることを明らかにした。

これらの成績は、コレラ菌の病原性発現機構を理解する上で極めて重要な知見であり、学位に値すると認める。