The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	Analysis on genetic linkage between TRH and urease genes in Vibrio parahaemolyticus
Author(s)	朴, 権三
Citation	大阪大学, 1999, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/41667
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	朴（ぼく）　権（けん）　三（さん）
博士の専攻分野の名称	博　士（医　学）
学　位　記　番　号	第　14470　号
学位授与年月日	平成11年3月25日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 医学系研究科病理系専攻
学　位　論　文　名	Analysis on genetic linkage between TRH and urease genes in *Vibrio parahaemolyticus* （腸炎ビブリオにおけるTRH 遺伝子とウレアーゼ遺伝子の遺伝学的連鎖についての解析）
論　文　審　査　委　員	（主査） 教　授　本田　武司 （副査） 教　授　品川日出夫　　教　授　木下タロウ

論　文　内　容　の　要　旨

【目的】

腸炎ビブリオの主な病原因子として耐熱性溶血毒（TDH）及びTDH類似溶血毒（TRH）が知られている。両毒素とも165個のアミノ酸残基からなる蛋白毒素であり，両者の間にはアミノ酸配列で67%の相同性がみられる。また両毒素は溶血活性，腸管毒性，心臓毒性などのいくつかの共通な生物活性を示す。最近，臨床分離腸炎ビブリオ菌株においてウレアーゼ産生性とTRH遺伝子（*trh*）の保有性が常に一致することを我々を含めた数グループの研究者が明らかにしてきた。本研究では主として腸炎ビブリオにおける*trh*とウレアーゼ遺伝子（*ure*）との関係について解析を行った。

【方法ならびに成績】

① 腸炎ビブリオのゲノム上での*trh*及び*ure*の存在位置

臨床分離腸炎ビブリオのゲノム上における*trh*及び*ure*の相対的位置関係をパルスフィールド電気泳動（PFGE）により解析を行った。供試菌株のゲノムDNAを制限酵素*Not*Iで消化した場合，*trh*，*ure*に対する各プローブはすべての菌株において一本の断片に反応した。両遺伝子間の距離をより詳細に解析するため*Bam*HI，*Sal*I，*Eco*RIなどの他の制限酵素で消化した結果，両遺伝子間の距離は十数kb以内に限定された。さらにLA－PCRの結果，*trh*と*ure*遺伝子（*ureC*：ウレアーゼ構造遺伝子）間の距離は8.5kbであることが明らかになった。これらの結果から両遺伝子は腸炎ビブリオの染色体上で遺伝学的に連鎖していることが示唆された。

② *trh*及び*ure*を含むDNA領域のクローン化と塩基配列の決定

臨床分離腸炎ビブリオAQ4673株より*trh*，*ure*両遺伝子を含む全35.9kbのDNA領域のクローン化をGene Walking法により行った。得られた各クローンはサブクローン化し，DNAシーケンサーLicor 4000L（Lincolin）を用い塩基配列の決定を行った。このDNA領域には計29個のORFが存在しており，G＋C含量は41.0%と腸炎ビブリオの全染色体のG＋C含量46－47%より低かった。クラスターを形成していた7個のORFはウレアーゼ産生のために必須の遺伝子群（*ure*遺伝子群）であると考えられた。また，*trh*と*ure*遺伝子群は6.3kb離れており，その間には*Proteus mirabilis*の*ureR*（ウレアーゼ発現のpositive regulator）及び大腸菌の*nik*（細胞膜から細胞質までのnickelイオンの伝達に関与する遺伝子群）と相同性が高い遺伝子群が存在していた。*trh*，*nik*遺伝子群及び*ure*遺伝

子群は2個のInsertion Sequence (IS) と考えられる配列にはさまれる格好で存在していた。以上の成績は，これらの遺伝子がトランスポゾンとして腸炎ビブリオの染色体上に挿入された可能性を示唆する。

③ 腸炎ビブリオのウレアーゼ活性と溶血活性に対する *ureR*, *ureC*, *nikD* 及び *trh* の関与

トランスポゾン上に見い出された *ure* 遺伝子群及び *nik* 遺伝子群はウレアーゼの産生性に関与すると推測されたので，これら遺伝子の欠損変異株の作製を試み，これらの遺伝子のウレアーゼ発現性への関与を解析した。まず，尿素を加えない条件では野生株のウレアーゼ活性はごく低かったが，尿素を0.1%加えた条件でウレアーゼ活性は尿素を加えない条件より100倍以上高かった。*ureR*, *nikD* 及び *ureC* 欠損株の場合，尿素を0.1%加えた条件でもウレアーゼの活性はごく低かった。尿素を0.1%加えた条件で *ureR* 欠損株のウレアーゼ活性が低かったことから，腸炎ビブリオの場合においても尿素によるウレアーゼの発現誘導に *ureR* が positive regulator として働いている可能性が考えられた。また，*nikD* を欠損した変異株でウレアーゼ活性は低かったのは，この遺伝子の欠損によりウレアーゼ活性部位への nickel イオンの導入がうまくいかないためと考えられた。しかし，同じトランスポゾン上に存在する *trh* の欠損株の場合には，ウレアーゼ活性には変化がみられなかったことから，*trh* はウレアーゼの発現には関与していないことが示唆された。また，逆に *ureR*, *nikD* 及び *ureC* 欠損は溶血活性には関与しないことが確認された。

④ ウレアーゼ病原性への関わり

腸炎ビブリオのウレアーゼが本菌の病原性に関与するか否かを野生株および作製した変異株でウサギ結紮腸管ループ試験を行うことにより検討を行った。10^8 個の菌量の供試菌をウサギ腸管ループに注入し，14－16時間後に液体貯留を調べた。その結果，*trh* 欠損株以外の *ureC*, *ureR* 及び *nikD* の欠損株では野生株と比べ液体貯留に有意差はなかった。

【総括】

腸炎ビブリオのゲノム DNA のうち *trh* 及び *ure* 遺伝子を含む35.9kb の塩基配列を決定し，29個の ORF を見い出した。これらのうち，*trh*, *ureR*, *nik* 遺伝子群及び *ure* 遺伝子群など計14個の ORF が2個のISにはさまれた形で，染色体上で局在していた。この結果，これら遺伝子がトランスポゾンとして腸炎ビブリオのゲノム上に挿入されたものであることを示唆し，臨床分離腸炎ビブリオにおいてウレアーゼの産生性と *trh* の保有性が常に一致するというこれまでの成績を支持すると考えられた。

論文審査の結果の要旨

腸炎ビブリオは日本で発見された食中毒原因菌であり，現在の国内の食中毒発生状況を見ても，細菌性食中毒原因菌として常に優位を占めている。本菌の主な病原因子として耐熱性溶血毒（TDH）及び TDH 類似溶血毒（TRH）などが明らかにされているが，本菌の病原性発現機構の詳細についてはいまだ不明な点も多い。

本論文では，臨床分離腸炎ビブリオにおけるウレアーゼ産生性と TRH 構造遺伝子（*trh*）の保有性が常に一致していることに着目し，*trh* 遺伝子とウレアーゼ遺伝子（*ure*）の存在様式を PFGE，サザンブロット及び LA－PCR を用い解析した。その結果，両遺伝子は染色体上で互いにごく近傍に存在していることを明らかにした。また，両遺伝子を含む DNA 領域（約30kb）の塩基配列を決定した結果，*trh* 及び *ure* 遺伝子群はトランスポゾンにより腸炎ビブリオの染色体上に挿入されたと考えられる成績を得た。さらにトランスポゾン上に存在する遺伝子のうちウレアーゼ発現に関与すると推測された *ureR*, *nikD* 及び *ureC* 遺伝子欠損株を作製し，これら遺伝子のウレアーゼ発現への関与について明らかにした。

以上の結果はいまだ不明な点の多い腸炎ビブリオの病原性の解明に重要な情報を提供することが期待され，学位に値するものと認める。