The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	Association of the Urease Gene with Enterohemorrhagic Escherichia coli Strains Irrespective of Their Serogroups of immune and inflammatory responses
Author(s)	中野, 政之
Citation	大阪大学, 2004, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/45371
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　中野政之（なかの まさゆき）

博士の専攻分野の名称　博　士（医　学）

学位記番号　第　18493　号

学位授与年月日　平成16年3月25日

学位授与の要件　学位規則第4条第1項該当

医学系研究科分子病態医学専攻

学位論文名　Association of the Urease Gene with Enterohemorrhagic *Escherichia coli* Strains Irrespective of Their Serogroups of immune and inflammatory responses
（腸管出血性大腸菌のウレアーゼ遺伝子についての研究）

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　杉本　　央

論文内容の要旨

＜目的＞

1996年に大阪府堺市で発生した集団食中毒事件より分離された腸管出血性大腸菌（EHEC）O157：H7（堺株）の全ゲノム配列が決定され、それまで存在が知られていなかった数多くの遺伝子が新たに見出された。本研究では、全ゲノム配列の解析により発見されたウレアーゼ遺伝子に着目し、解析を行った。

＜方法ならびに成績＞

はじめに、病原性大腸菌群においてウレアーゼ遺伝子の分布を調べたところ、ウレアーゼ遺伝子は血清型（O26、O111、O157）に関係なく臨床分離EHECに特異的に存在していた。また家畜などから分離されたEHECについても同様にウレアーゼ遺伝子の分布を調べたところ、EHEC感染患者より高頻度に分離される血清型（O26とO157）ではそれ以外の血清型よりも明らかに高い保有性を示すことが明らかとなった。

そこでEHECにおけるウレアーゼの産生性を調べたところ、遺伝子を保有しているにもかかわらずほぼすべてのEHEC菌株において活性を検出することができなかった。ウレアーゼ活性が認められない原因を調べるためにウレアーゼ蛋白に対するWestern blottingを行ったところ、ウレアーゼ蛋白の産生が検出された。この結果は、ウレアーゼ蛋白が産生されているにもかかわらず活性は認められないことを示している。次に、ウレアーゼ活性を保持する菌株と保持しない菌株とのウレアーゼ遺伝子群の塩基配列を比較したところ、ウレアーゼ活性を保持しない菌株ではウレアーゼのシャペロンをコードする*ureD*内の742番目の1塩基の変化（C→T）によりnonsense変異が生じていることが明らかとなった。この*ureD*内のnonsense変異はウレアーゼ活性を保持しないすべてのEHEC菌株に認められた。*ureD*内の変異がEHECにおけるウレアーゼ活性の有無に関与しているのかを調べるためにウレアーゼ活性を保持する菌株由来の*ureD*をウレアーゼ活性を保持しない菌株に相補したところ、相補した菌株では明らかなウレアーゼ活性が認められ、*ureD*内の変異がEHECにおけるウレアーゼ活性に重要であることが示唆された。

*ureD*内の塩基の変異が実際にEHEC菌株の中で起こっているかを調べるために*lacZ* reporter gene assay systemを構築し、解析を行った。その結果、目的とする*ureD*内の742番目の塩基のみの変異が認められ、それ以外の塩基

には変異が認められなかった。またこの *ureD* 内の 742 番目の塩基の変異を認識するプライマーを作製し、PCR を用いて存在する塩基を検出したところ、C と T のみが存在しているという結果が得られた。これらの結果より *ureD* 内の 742 番目の塩基が特異的に変異する可能性が示唆されたので、*lacZ* reporter gene assay を用いて塩基の変異率を測定したところ、EHEC では非病原性大腸菌と比較して有意に変異率が高いことが示された。

EHEC の病原性におけるウレアーゼの役割は現在のところ不明である。そこで、ウレアーゼの構造遺伝子である *ureC* や *ureD* 遺伝子欠損株を作製し、EHEC における役割の検討を行ったが、EHEC の病原性への関与は認められなかった。しかしながら、ウレアーゼ活性を保持する菌株と保持していない菌株を同じ培地の中で競合的に培養したところ、唯一の窒素源として尿素を添加した培地ではウレアーゼ活性を有する菌株が優位になったが、尿素を含まない培地ではウレアーゼ活性を保持しない菌株が優位になった。この結果は、活性型ウレアーゼの産生がある条件下では EHEC 菌株にとって不利益をもたらす可能性を示唆している。

＜総括＞

本研究では、ウレアーゼ遺伝子が臨床分離 EHEC に特異的に存在することを示した。また、EHEC のウレアーゼ活性はシャペロンをコードする *ureD* の塩基配列に依存していることを示し、*ureD* 内の nonsense 変異が EHEC において高頻度に生じることを明らかにした。さらに、ある条件下では活性型ウレアーゼが EHEC にとって不利益をもたらす可能性を示した。以上の結果より、ウレアーゼ遺伝子を保有しているにもかかわらずほぼすべての EHEC 菌株でウレアーゼ活性が認められないのは、*ureD* 内の 742 番目の塩基を変化させることでウレアーゼを不活性型にしているためであることが示唆された。

論文審査の結果の要旨

申請者は、1996 年に大阪府堺市で発生した集団食中毒事件より分離された腸管出血性大腸菌（EHEC）の全ゲノム配列の解析により新たに存在が認められたウレアーゼ遺伝子（*ure*）群に着目し、解析を行った。

申請者は、EHEC が他の多くの大腸菌が保有しないウレアーゼ遺伝子群を保有しているのにもかかわらず、ほぼすべての EHEC でウレアーゼ活性が認められないことを見出した。さらにその原因の解析を行い、ウレアーゼ遺伝子群のある１つの遺伝子（*ureD*）上の１塩基（シトシンとチミン）の変異によるものであることを、相補実験などにより明らかにした。さらに、このウレアーゼ遺伝子の１塩基の変異が特定の塩基の間（シトシンとチミン）で起こるものであり、また他の大腸菌に比べて EHEC において高頻度にこの変異を起こすメカニズムが存在している可能性を見出した。

このように、EHEC においてある特定の遺伝子の特定の部位の塩基を変異させることにより酵素活性を制御しているという報告はこれまではなく、申請者の報告が最初の例であると思われる。申請者の解析結果は、この変異の EHEC にとっての生物学的意義にも新たな示唆を与えた。よって、申請者の研究は EHEC の理解に新たな知見を加えるものであり、学位の授与に値するものと考えられる。