



Title	Vibrios Commonly Possess Two Chromosomes
Author(s)	岡田, 和久
Citation	大阪大学, 2005, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/45542
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、 https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed 大阪大学の博士論文について

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

氏名	岡田和久
博士の専攻分野の名称	博士(医学)
学位記番号	第19307号
学位授与年月日	平成17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	Vibrios Commonly Possess Two Chromosomes (ビブリオ属細菌は普遍的に二つの染色体を保有する)
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 堀井 俊宏

論文内容の要旨

[目的]

Vibrio 属細菌は海洋や汽水域、魚介類などから分離されるグラム陰性桿菌である。一部の *Vibrio* 属細菌は魚、貝、珊瑚、哺乳類の病原菌として知られている。ヒトに病原性を示す代表例としてコレラ症を引き起こす *V. cholerae* や毎年日本の食中毒原因の上位を占める *V. parahaemolyticus*、筋肉を壊死させ時にはヒトを死に至らせる *V. vulnificus* などがある。以前、本研究室で、*V. parahaemolyticus* が二つの染色体を保有することを報告した。細菌は一つの環状染色体をもつことが近年まで常識であったため、*Vibrio* 属細菌における複数の染色体の保有はユニークな現象として注目されている。しかし、複数の染色体の保有が *Vibrio* 属細菌のどこまで広がっているのかについてはいまだ明らかでなかった。本研究では非病原性細菌を含むより多くの *Vibrio* 属細菌およびその近縁の属種について、二つの染色体からなるゲノム構造の広がりを体系的に解析することを目的とした。また、近年 *Vibrio* 属細菌の染色体に見出されつつあるスーパーインテグロン (SI) に関する解析も行なった。SI は SI インテグレース遺伝子とそれに隣接したアタッチメントサイトからなる遺伝子獲得システムで、最初に報告された *V. cholerae* では SI のサイズは約 126 kb にわたりゲノムの約 3 %に相当している。

[方法ならびに成績]

供試菌株は、非病原性細菌を含む *Vibrio* 属細菌 36 種、*Photobacterium* 属 5 種、*Salinivibrio* 属 1 種 2 亜種、および近年まで *Vibrio* 科に分類されていた *Aeromonas* 属より 2 種、*Plesiomonas* 属より 1 種を用いた。染色体の数の推定はパルスフィールドゲル電気泳動法 (PFGE 法) でメガベースサイズの染色体を約 4 日間かけて泳動し、分離することで行なった。PFGE に用いるプラグ調製では、染色体の DNA 分解を出来る限り抑えるために、供試菌株の培養条件の検討や DNA 分解を阻害するチオ尿素 50 μM をバッファーに添加することで改善を試みた。染色体の著しい DNA 分解により明瞭なバンドが認められない 2 菌種を除く 34 菌種の *Vibrio* 属細菌において二つの染色体の保有が認められた。さらに、*Vibrio* 属以外の *Photobacterium* 属や *Salinivibrio* 属細菌などにも二つの染色体が認められたことから、二つの染色体を保有する菌種は *Vibrio* 科まで広がっていると考えられた。このことは二つの染色体の保有の起源が *Vibrio* 科の分岐時まで遡ることを示唆する。本研究で明らかになった *Vibrio* 属細菌のゲノムの特徴として

は、大染色体のサイズは比較的一定 (3.0–3.3 Mb) であること、小染色体のサイズにはばらつき (0.8–2.4 Mb) があること、二つの染色体以外に大きなレプリコン (>0.3 Mb) は認められること、および、染色体を一つだけ保有する *Vibrio* 属細菌は見い出されていないことなどが挙げられる。最近ゲノム解読が報告された *V. parahaemolyticus*、*V. vulnificus*、*V. cholerae* の 3 菌種はいずれも生存に必須なハウスキーピング遺伝子の大部分を大染色体に保持することが明らかになっている。*Vibrio* 属細菌は広く分岐する以前に二つの染色体を保有するようになり、生存に必須なハウスキーピング遺伝子を大染色体に大部分保持する一方で、小染色体を柔軟に変化させることで環境に適応してきたことが示唆される。

SI に関する解析では、36 菌種の *Vibrio* 属細菌を用いて SI インテグレースに対する縮重プライマーを作製し PCR で検索、直接シークエンス法で増幅産物の塩基配列を決定した。既報の SI インテグレースを保有する菌種を含む 14 菌種においてインテグレース配列が見い出された。うち 6 菌種は SI の保有が報告されていなかった。本研究で見い出された SI インテグレースを含めて作製した分子系統樹は、*Vibrio* 属細菌の SI インテグレースが他の細菌由来のインテグロンインテグレースと混ざらず、一つのクラスターを形成することを示した。この結果は *Vibrio* 属細菌の保有する SI が *Vibrio* 属細菌が広く分岐する以前に獲得された可能性を示唆する。

[総括]

小染色体の起源は *Vibrio* 科の分岐時まで遡ることが明らかになり、*Vibrio* 科細菌は生存に必須なハウスキーピング遺伝子を大染色体に大部分保持する一方で、小染色体を柔軟に変化させることで環境に適応してきたことが示唆された。また、*Vibrio* 属細菌の保有する SI は *Vibrio* 属細菌が広く分岐する以前に獲得された可能性を示唆する。

論文審査の結果の要旨

細菌は一つの環状染色体をもつことが近年まで常識であったが、コレラ菌、腸炎ビブリオは複数の染色体を保有していることが明らかになり、ユニークな性状として注目されてきた。しかし、この複数の染色体からなるゲノム構造の広がりは不明であった。申請者は 36 菌種の *Vibrio* 属細菌とその近縁種を供試菌株として複数染色体の広がりおよびゲノムの解析を行なった。同属内の菌種の大多数を用いた包括的なゲノム数に関する研究はこれまで皆無であった。申請者はパルスフィールドゲル電気泳動法により複数染色体の保有解析法の最適化を行なった。この解析手法を用いたところ、34 菌種の *Vibrio* 属細菌は全て二つの染色体を有すること、また大染色体のサイズはほぼ一定であるのに対し小染色体サイズは可変的であるという特徴がみられた。これらはバクテリアのゲノム進化を考える上で重要な知見である。従って申請者の *Vibrio* 属細菌のゲノムに関する解析は学位論文に値すると考えられる。