

Title	大腸菌0-157の感染タンパク質因子の構造解析とミヤコグサにおける発現
Author(s)	加藤, 智朗
Citation	大阪大学, 2005, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/45879">https://hdl.handle.net/11094/45879</a>
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">〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉</a> 大阪大学の博士論文について <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">〈/a〉</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	かとうともあき 加藤智朗
博士の専攻分野の名称	博士(工学)
学位記番号	第 19459 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 工学研究科応用生物工学専攻
学位論文名	大腸菌 O-157 の感染タンパク質因子の構造解析とミヤコグサにおける発現
論文審査委員	(主査) 教授 室岡 義勝  (副査) 教授 金谷 茂則 教授 小林 昭雄 教授 原島 俊 教授 福井 希一 教授 塩谷 捨明 教授 仁平 卓也 教授 関 達治 教授 卜部 格 教授 清水 浩 教授 大竹 久夫

#### 論文内容の要旨

腸管出血性大腸菌 O157 : H7 は TypeIII 分泌機構を利用して大腸管上皮細胞に定着、ベロ毒素を産生する。その臨床症状としては、血性の下痢、溶血性尿毒症症候群 (HUS) や脳症などがある。また、牛が最も高い汚染率を示しており、その保菌率は数%から 20%内外とされている。HUS や脳症などの合併症に対する明確な治療法が確立されていないことから感染予防が最も効果的であると思われ、また主要な感染源が牛と考えられることから、牛を対象とした O157 に対する経口ワクチンの開発を目的として本研究を行った。

第二章、第三章では O157 の TypeIII 分泌機構を構成する蛋白質である EspA および EspB についてその構造的、物理化学的性質についての解析を行った。CD、ANS 結合、NMR や沈降平衡などにより pH に対する安定性などについて分析した。CD によると両蛋白質ともに二次構造は酸性 pH でも保持されていた。しかしながら、ANS 蛍光から、pH2 では中性条件下に比べて疎水面が露出した構造を形成していることが示唆された。EspA については CD の尿素変性曲線から、pH3 においても中性 pH における天然状態に近い構造を保持している可能性が高いことが推察された。また NMR の結果より EspB は非変性状態、つまり自然の状態でも部分的に折れたたまった構造をとっていることが示唆された。pH に対する安定性が高いことが示唆され、経口ワクチンにおける抗原として適していると考えられた。

第四章ではミヤコグサの形質転換を行った。経口ワクチンにおいて、粘膜面ではその物理的、化学的バリアーのために、抗原性を保ったまま抗原を免疫担当組織へ送るデリバリー法の開発も必要であるため、キャリアーとしてモデル植物であり、類縁種が牧草として用いられているミヤコグサを利用することとした。今までに Gifu を用いた形質転換系の報告はあったが、今回はよりライフサイクルが短い Miyakojima をもちいた形質転換系についての検討も行った。その結果、Miyakojima を用いることにより形質転換に必要な期間を 3~4 ヶ月短縮することが出来た。T1 植物体において PCR、サザン、RT-PCR、ウェスタンの結果、目的遺伝子の導入およびその発現が確認できた。実用化に耐えうる経口ワクチンとするために、今後マウスなどを用いた形質転換植物のワクチンとしての効果を確認することが必要である。

## 論文審査の結果の要旨

本研究は牛を対象とした腸管出血性大腸菌 O157:H7 に対する経口ワクチンの開発を目的として、O157:H7 の TypeIII 分泌機構を構成する蛋白質である EspA および EspB の構造的、物理化学的性質の解析、ミヤコグサにおける発現系の構築および発現を行ったものである。これらの成果の要約は以下のとおりである。

O157:H7 の TypeIII 分泌系は基本構造である基部構造、ニードルと呼ばれる蛋白質を細胞外へ排出する構造のほかに、EspA により構成される伸縮可能な鞘状構造からなっている。また EspB は大腸上皮細胞に穴をあける働きを持つとも言われており、EspA 鞘状構造の先端に位置し、EspD と複合体を形成していると考えられている。O157:H7 の感染において TypeIII 分泌機構は感染に非常に重要であるが、その構造的、物理化学的性質は明らかにされていない。そこで円偏光二色性分析、ANS 結合、NMR や沈降平衡などにより、構造的、物理化学的性質を明らかにしている。円偏光二色性分析によると両蛋白質ともに二次構造は酸性 pH でも保持されているが、ANS 結合から pH2 では中性条件下に比べて疎水面が露出した構造を形成していることが示されている。EspA については円偏光二色性分析の尿素変性曲線から、酸性 pH においても中性 pH における天然状態に近い構造を保持している可能性が高いことが推察されている。また NMR の結果より、EspB は非変性状態、つまり自然の状態で部分的に折れたたまたま構造をとっていることを初めて明らかにしている。次に、経口ワクチン開発のためのミヤコグサの形質転換を行っている。過去に Gifu を用いた形質転換系の報告はあったが、今回はよりライフサイクルが短い Miyakojima をもちいた形質転換系についての検討も行っている。その結果、Miyakojima を用いることにより形質転換に必要な期間を 3~4 ケ月短縮することが可能であることが示されている。また T1 植物体において PCR、サザン、RT-PCR、ウェスタンの結果、目的遺伝子の導入およびその発現が確認できている。

以上のように、本論文は二つのタンパク質の構造的、物理化学的特性をはじめて明らかとしており、植物を利用した家畜を対象とする経口ワクチンという新しい生物工学的技術の扉を開くものである。よって本論文は博士論文として価値あるものと認める。