



Title	Polymorphisms Influencing Expression of Dermonecrotic Toxin in Bordetella bronchiseptica
Author(s)	岡田, 圭祐
Citation	大阪大学, 2015, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/51891
rights	
Note	やむを得ない事由があると学位審査研究科が承認したため、全文に代えてその内容の要約を公開しています。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

論文内容の要旨

Synopsis of Thesis

氏 名 Name	岡田 圭祐
論文題名 Title	Polymorphisms Influencing Expression of Dermonecrotic Toxin in <i>Bordetella bronchiseptica</i> (気管支敗血症菌の皮膚壊死毒素DNTの産生量に関わる塩基多型の解析)
論文内容の要旨 〔目的(Purpose)〕 病原性細菌である気管支敗血症菌は広い宿主域を持ち、多種類の哺乳動物に呼吸器感染症を起こす。気管支敗血症菌の宿主動物種の指向性を理解するため、近年我々は、気管支敗血症菌罹患ブタに特徴的な病変である萎縮性鼻炎を起こしたブタから分離されたS798株の全ゲノム配列を決定し、既に全ゲノム配列が報告されている他動物由来株の比較解析を行った。その結果、萎縮性鼻炎の原因因子である皮膚壊死毒素遺伝子(<i>dnt</i>)上流配列中に、4つの塩基多型(SNPs)の存在が明らかになった。そこで、宿主指向性とDNT産生量の関係性を明らかにする目的で、<i>dnt</i>上流配列中のSNPsによるDNT産生量への影響を解析した。 〔方法ならびに成績(Methods/Results)〕 S798株の<i>dnt</i>の開始コドンから上流200 bp中に、ウサギ由来RB50株と比較して転写開始点から-129、-72、+22、+38の4カ所に塩基置換が見出された。他のブタ分離株の同領域の配列を決定したところ、RB50株と同じ配列を示した株、4カ所ともS798株と同一の塩基置換を示す株、4カ所のうち3カ所が同一の塩基置換を示す株が見出された。それぞれの株を塩基置換の組み合わせにより、RB50株や多くの動物由来株にみられるD1型、いくつかのブタ分離株で見出された4カ所のうち3カ所の塩基置換があるD2型、S798株で見出された4カ所の塩基置換があるD3型の3つの遺伝子型に分類した。それぞれの遺伝子型において、抗DNT抗体を用いたウェスタンブロッティングによるDNT発現量および、定量的RT-PCRによる<i>dnt</i>メッセンジャーRNAの転写量を比較した結果、D1、D2、D3の順に塩基置換が増えるに従って、発現量および転写量が増加していた。<i>dnt</i>の開始コドンから上流200 bpをβガラクトシダーゼ遺伝子に接続したレポータープラスミドを構築し、βガラクトシダーゼレポーターアッセイによる<i>dnt</i>プロモーター活性を比較した結果、D1、D2、D3の順に<i>dnt</i>プロモーター活性が増加していた。レポータープラスミド中の4塩基に塩基置換を導入し、それぞれのプロモーター活性への影響を解析した結果、特に-72および+22の2カ所のSNPsが<i>dnt</i>プロモーター活性に強く寄与していることが分かった。また、近年報告されたDNTの発現制御因子であるBvgAの認識配列予測アルゴリズムを用いて解析したところ、S798株における-72および+22の塩基置換は、<i>dnt</i>上流配列へのBvgAの結合親和性を高めていることが予想された。 他の動物由来株としてマウス由来株4株のDNTの発現を調べたところ、DNTを発現していなかった。<i>dnt</i>遺伝子周辺遺伝子の配列をマウス分離株で決定したところ、マウス由来株は<i>dnt</i>を含む上流200bpから下流93bpを欠損し、代わりにGC含量の高い14塩基ずつの逆方向反復配列を含む63bpが位置していた。 本研究で見出されたDNT高発現のプロモータータイプの株が、他の動物由来株および他のボルデテラ属細菌で見出されるかを調べるため、NCBIデータベース中の気管支敗血症菌株計60株の<i>dnt</i>プロモータータイプを決定した。D1と比べてDNTの発現レベルが高いD2は6株あり、うち3株はブタ由来、他の3株はサル、モルモット、イヌ由来が1株ずつであった。最もDNTの発現レベルが高いD3は、データベース上からは見出されなかった。全体ではD1が27株と最も多く、また本研究では分類されなかった<i>dnt</i>プロモーターは3種類11株見出された。<i>dnt</i>遺伝子を持たない株は16株あり、いずれの株でもマウス由来株で見出された配列と相同性の高い配列が挿入していた。当研究室で保管していた気管支敗血症菌株を合わせると、ブタ由来株16株中15株がD2もしくはD3のDNT高発現株だった。 〔総括(Conclusion)〕 本研究結果より、ブタから分離される気管支敗血症菌株は、DNT高産生株であることが明らかになった。このことは、気管支敗血症菌のDNTはブタボルデテラ感染症成立に深く関与している可能性を示唆している。	

論文審査の結果の要旨及び担当者

(申請者氏名) 岡田 圭祐		
論文審査担当者	(職)	氏 名
	主 査	大阪大学教授 堀口 安孝
	副 査	大阪大学教授 松浦 善弘
	副 査	大阪大学教授 目加田 英輔

論文審査の結果の要旨

気管支敗血症菌は広い宿主域を示し、多くの哺乳動物に呼吸器感染症を起こす。本論文は、比較ゲノム解析により、ブタ由来気管支敗血症菌株において萎縮性鼻炎の原因因子である皮膚壊死毒素遺伝子(*dnt*)上流配列中に4カ所の塩基多型が存在することを明らかにしている。さらに、塩基多型と発現量との関係性を調べたところ、*dnt*上流配列は4カ所の塩基多型のそれぞれの有無によりD1、D2、D3の3つの遺伝子型に分類され、それぞれの下流のDNT発現量はD1、D2、D3の順に増加した。データベース上の様々な動物由来株の配列により、DNT高発現を示すD2、D3の株は、ブタ由来株のみ分離頻度が高く、他の動物由来株では低かった。このことからDNTは、気管支敗血症菌のブタへの宿主指向性に関与することが示唆された。気管支敗血症菌のDNT発現に関わる遺伝子多型がブタ指向性に関与する可能性を示した本論文は、本菌の広い宿主特異性の一端を説明するものであり、学位の授与に値すると考えられる。