OUKA
The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	Ectopic expression of O antigen in Bordetella pertussis by a novel genomic integration system
Author(s)	石垣, 佳祐
Citation	大阪大学, 2018, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/69454
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

論文審査の結果の要旨及び担当者

（申請者氏名）石垣　佳祐

論文審査担当者	（職）	氏　名
主　査	大阪大学教授	堀口安彦
副　査	大阪大学教授	飯田哲也
副　査	大阪大学教授	塩田達雄

論文審査の結果の要旨

ボルデテラ属の病原細菌である百日咳菌と気管支敗血症菌は、前者がヒトのみを宿主としするのに対し、後者は様々な動物に呼吸器感染症を引き起こす。このように感染宿主特異性が大きく異なる二菌種であるが、遺伝学的に近縁で既知の病原因子の多くを共有しているため、どのような因子が宿主特異性の違いを決定するのかは全く明らかになっていない。過去の比較ゲノム解析の結果から、現在の百日咳菌は気管支敗血症菌に近い祖先種から遺伝子の欠失や転位を経て進化してきた可能性が示唆されている。そこで本論文では、気管支敗血症菌の遺伝子の導入により百日咳菌の宿主域を拡大できるのではないかと考え、研究の初段階として細菌人工染色体とファージの組換え機構を組み合わせた新規ゲノム相補システムを開発した。本システムは、最大約50 kbpの気管支敗血症菌の長鎖ゲノム断片の百日咳菌への挿入が可能である。百日咳菌が進化の過程で欠失した、O抗原発現に関わる*wbm*遺伝子領域（約32 kbp）を本システムによって導入したところ、O抗原発現百日咳菌の作出に成功した。作出したO抗原発現百日咳菌の性状解析の結果から、O抗原が気管支敗血症菌の広範な宿主特異性を規定する因子の一つである可能性が示唆された。また本システムは、今後ボルデテラ属菌の宿主特異性関連因子をスクリーニングする上で有用なツールとなり得る。以上の結果を踏まえ、本論文は学位の授与に値すると考えられる。

論　文　内　容　の　要　旨
Synopsis of Thesis

氏　　名 Name	石垣　佳祐
論文題名 Title	Ectopic expression of O antigen in *Bordetella pertussis* by a novel genomic integration system （新規ゲノム相補システムを用いたO抗原発現百日咳菌の作出と解析）

論文内容の要旨

〔目　的(Purpose)〕

ボルデテラ属の病原細菌である百日咳菌と気管支敗血症菌は、百日咳菌がヒトのみを宿主とし百日咳症を引き起こす一方で、気管支敗血症菌は様々な動物において呼吸器感染症の原因となるなど、その感染宿主特異性が明らかに異なることが知られている。しかしこれら二菌種は遺伝学的に近縁で、既知の病原因子の多くを共有しているため、現在までこのような宿主特異性の違いを規定する因子は明らかになっていない。過去の比較ゲノム解析の結果から現在の百日咳菌は、気管支敗血症菌に近い祖先種が遺伝子の欠失や転位を繰り返しながら進化し、この過程での新たな遺伝子の獲得は少ないことが示唆されている。そこで我々は気管支敗血症菌の遺伝子を百日咳菌に相補することで、本来ヒトにしか感染しない百日咳菌の宿主域を拡大できるのではないかと考えた。本研究の初段階として、気管支敗血症菌の長鎖のゲノム断片を百日咳菌に導入するための新規ゲノム相補システムの開発を目指した。次に、百日咳菌はその進化の過程で、O抗原の合成に必要な*wbm*遺伝子領域を欠失し、O抗原を発現しないことに注目し、気管支敗血症菌の*wbm*領域を相補して得られたO抗原発現百日咳菌の病原細菌としての性状を解析した。

〔方法ならびに成績(Methods/Results)〕

気管支敗血症菌の長鎖ゲノム断片を百日咳菌染色体中に安定に導入するために、細菌人工染色体 (Bacterial artificial chromosome: BAC) とファージの組換え機構を組み合わせることで、新規ゲノム相補システムを開発した。本システムではファージの組換え酵素が認識するアタッチメントサイトを、BACと百日咳菌染色体上にそれぞれ導入した。これによりファージの組換え酵素存在下で、BACが百日咳菌染色体に組み込まれることを確認した。パルスフィールドゲル電気泳動により分離した気管支敗血症菌の長鎖ゲノム断片をBACにクローニングすることで、現在までに最大約50 kbpの気管支敗血症菌ゲノム断片が百日咳菌染色体中に導入されることを確認している。本システムを用いて、24遺伝子から成り、約32 kbpに及ぶ気管支敗血症菌の*wbm*領域を百日咳菌染色体中に相補した。得られた組換え百日咳菌のリポ多糖 (LPS) を熱フェノール法により抽出し、Tricine-SDS-PAGE後に銀染色した結果、本来O抗原を発現する気管支敗血症菌のLPSと類似したバンドを確認した。また組換え百日咳菌のLPS中には、抗気管支敗血症菌血清を用いたウエスタンブロット法によって検出されるバンドが存在したことから、気管支敗血症菌型のO抗原が発現していることが明らかになった。O抗原発現百日咳菌の表現型を検証するため、ラット血清または抗菌薬ポリミキシンB存在下で培養し、ベクターコントロール株と生存率を比較した。その結果、O抗原発現百日咳菌は、ラット血清とポリミキシンBの両方に対して、コントロール株に比べ高い抵抗性を示した。O抗原発現百日咳菌とコントロール株の混合菌液をラットに投与し、感染8日、14日後に、鼻中隔、気管、肺を回収し、臓器内生菌数を測定した。その結果、鼻中隔からは同数の菌が回収されたが、気管、肺の両臓器ではO抗原発現百日咳菌が優勢に回収された。

〔総　括(Conclusion)〕

我々は本研究で開発した新規ゲノム相補システムを用いることで、長鎖のゲノム断片を百日咳菌に導入し、その表現型を変化させることに成功した。O抗原を発現した百日咳菌は、マウス下部気道においてコントロール株より有意に多く定着したことから、O抗原が気管支敗血症菌の広範な宿主特異性を規定する因子の一つである可能性が示唆された。本システムは今後、ボルデテラ属菌の宿主特異性に関わる因子のスクリーニングにおいて、有用なツールとなり得る。